

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

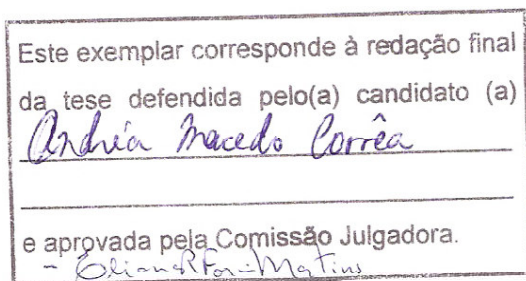
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA



ANDRÉA MACÊDO CORRÊA

**CITOTAXONOMIA DE REPRESENTANTES DA SUBFAMÍLIA RUBIOIDEAE
(RUBIACEAE) NOS CERRADOS DO ESTADO DE SÃO PAULO**



Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Vegetal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Regina Forni-Martins

Campinas
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C817c	Corrêa, Andréa Macêdo Citotaxonomia de representantes da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) nos cerrados do Estado de São Paulo / Andréa Macedo Corrêa. – Campinas, SP: [s.n.], 2007. Orientadora: Eliana Regina Forni-Martins. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Rubiaceae. 2. Rubioideae. 3. Cromossomos vegetais. 4. Ideograma. 5. Hibridação <i>in situ</i>. I. Forni-Martins, Eliana Regina. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título. (rcdt/ib)
-------	--

Título em inglês: Cytotaxonomy of representative Rubioideae subfamily (Rubiaceae) from "cerrados" of the São Paulo state.

Palavras-chave em inglês: Rubiaceae; Rubioideae; Plant chromosomes; Ideograms; *In situ* Hybridization.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Eliana Regina Forni-Martins, Maria Angélica Maciel Martinho Ferreira, Sigrid Luiza Jung Mendacoli, Neiva Izabel Pierozzi, João Semir.

Data da defesa: 02/03/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

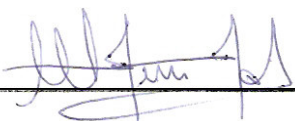
Campinas, 02 de Março de 2007

BANCA EXAMINADORA

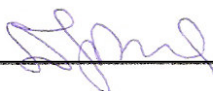
Dr^a. Eliana Regina Forni-Martins – Orientadora



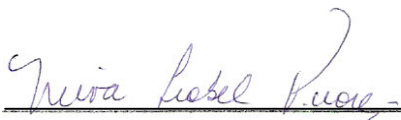
Dr^a. Maria Angélica Maciel Martinho Ferreira



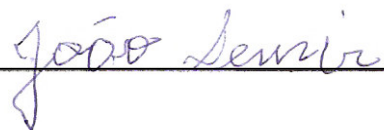
Dr^a. Sigrid Luiza Jung Mendaçolli



Dr^a. Neiva Isabel Pierozzi



Dr. João Semir



Dr^a. Luiza Sumiko Kinoshita - Suplente

Dr. Ricardo Lombelo - Suplente

Dr^a. Júlia Yamagishi Costa - Suplente

À minha família, de valor inestimável.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi concluído graças ao apoio e dedicação de várias pessoas, que contribuíram direta ou indiretamente para sua realização. Agradeço então:

A Deus;

À minha família, Agostinho e Aracilda, meus pais, Araceli e Junior, meus irmãos, Otávio Augusto, meu sobrinho, pelo apoio, mesmo à distância;

Ao meu marido Emerson, pelo apoio, companheirismo e auxílio nas coletas no campo;

À Dr^a. Eliana, minha orientadora, que novamente confiou no meu trabalho, ensinando e ajudando em diversos momentos;

À Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Laboratório de Biossistemática, pela infra-estrutura que possibilitou a realização desse trabalho;

Ao curso de Pós-graduação em Biologia Vegetal;

À FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa de doutorado concedida e os auxílios fornecidos a Dr^a. Eliana, possibilitando a realização dessa pesquisa;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico) pelo auxílio concedido a Dr^a. Eliana, auxiliando na realização dessa pesquisa;

Aos departamentos de Biologia Celular e Fisiologia Vegetal pela colaboração em algumas etapas do trabalho;

À pesquisadora Dr^a. Sigrid Luiza Jung Mendaçolli, Herbário do Instituto Agrônomo de Campinas, pela identificação das espécies apresentadas nesse trabalho;

Aos professores, Dr. André L.L. Vanzela (Universidade Estadual de Londrina) e Dr. Eduardo Moscone (Universidade de Córdoba – Argentina) pelos cursos de aperfeiçoamento oferecidos;

À pesquisadora Dr^a. Márcia Braga, do departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Botânica de São Paulo, pela importante colaboração no processo de degradação da parede celular de Rubiaceae;

Aos professores e funcionários do Departamento de Botânica, pelo ensinamento e auxílios prestados;

À colega e prof^a. Dr^a. Mariana E. Mansanares, pela importante ajuda no início dos trabalhos com Hibridação *in situ*;

Aos colegas de laboratório e departamento, pela convivência, palpites dados e apoio em diversos momentos, principalmente a Vanessa, pela ajuda muito importante, no final dos trabalhos;

Aos amigos pessoais, presentes mesmo fora do laboratório, Julia, Vanessa e Fábio, Carla e Rogério, Roslaine e Ricardo;

ÍNDICE

1. RESUMO GERAL	12
2. ABSTRACT	14
3. INTRODUÇÃO GERAL	16
4. CAPÍTULO 1 – Números cromossômicos de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) de Cerrado	
4.1. Resumo	24
4.2. Abstract	25
4.3. Introdução	26
4.4. Material e Métodos	28
4.5. Resultados e Discussão	34
4.6. Referências Bibliográficas	42
5. CAPÍTULO 2 - Números cromossômicos de espécies do gênero <i>Psychotria</i> - subfamília Rubioideae (Rubiaceae)	
5.1. Resumo	46
5.2. Abstract	47
5.3. Introdução	48
5.4. Material e Métodos	49
5.5. Resultados e Discussão	53
5.6. Referências Bibliográficas	65
6. CAPÍTULO 3 – Hibridação <i>in situ</i> DNAr 45S, na tribo <i>Psychotrieae</i> – Rubioideae – Rubiaceae	
6.1. Resumo	69
6.2. Abstract	70
6.3. Introdução	71

6.4. Material e Métodos	74
6.5. Resultados e Discussão	78
6.6. Referências Bibliográficas	84
7. CAPÍTULO 4 – Distribuição de sítios de DNAr 45S em duas espécies de <i>Borreria</i> – Spermacoceae - Rubioideae	
7.1. Resumo	88
7.2. Abstract	89
7.3. Introdução	90
7.4. Material e Métodos	92
7.5. Resultados e Discussão	96
7.6. Referências Bibliográficas	101
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	104
9. ANEXO 1	113

ÍNDICE DE FIGURAS

4. CAPÍTULO 1 – Números cromossômicos de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) de Cerrado

Figura 1: Caracteres reprodutivos de espécies da subfamília Rubioideae	30
Figura 2: Caracteres reprodutivos de espécies da subfamília Rubioideae	31
Figura 3: Cromossomos de espécies da subfamília Rubioideae	35
Figura 4: Ideogramas de espécies da subfamília Rubioideae	36

5. CAPÍTULO 2 - Números cromossômicos de espécies do gênero *Psychotria* - subfamília Rubioideae (Rubiaceae)

Figura 1: Caracteres reprodutivos de espécies do subgênero <i>Psychotria</i>	51
Figura 2: Caracteres reprodutivos de espécies do subgênero <i>Heteropsychotria</i>	51
Figura 3: Cromossomos de espécies do subgênero <i>Psychotria</i>	55
Figura 4: Cromossomos de espécies do subgênero <i>Heteropsychotria</i>	56
Figura 5: Ideogramas de espécies do subgênero <i>Psychotria</i>	57
Figura 6: Ideogramas de espécies do subgênero <i>Heteropsychotria</i>	58

6. CAPÍTULO 3 – Hibridação *in situ* DNAr 45S, na tribo *Psychotrieae* – Rubioideae – Rubiaceae

Figura 1: Hibridação <i>in situ</i> DNAr 45S em espécie do gênero <i>Palicourea</i>	82
Figura 2: Hibridação <i>in situ</i> DNAr 45S em espécie do gênero <i>Psychotria</i> , subgênero <i>Psychotria</i>	82
Figura 3: Hibridação <i>in situ</i> DNAr 45S em espécies do gênero <i>Psychotria</i> , subgênero <i>Heteropsychotria</i>	83
Figura 4: Hibridação <i>in situ</i> DNAr 45S em espécie do gênero <i>Rudgea</i>	83

7. CAPÍTULO 4 – Distribuição de sítios de DNAr 45S em duas espécies de *Borreria* – Spermacoceae - Rubioideae

Figura 1: <i>Borreria latifolia</i> : Flores, cromossomos e ideograma	99
Figura 2: Hibridação <i>in situ</i> DNAr 45S em <i>Borreria latifolia</i>	99
Figura 3: <i>Borreria verticillata</i> : Flores, cromossomos e ideograma	100
Figura 4: Hibridação <i>in situ</i> DNAr 45S em <i>Borreria verticillata</i>	100

ÍNDICE DE TABELAS

4. CAPÍTULO 1 – Números cromossômicos de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) de Cerrado

Tabela 1: Material testemunho das espécies da subfamília Rubioideae 29

Tabela 2: Números cromossômicos e características cariotípicas de espécies da subfamília Rubioideae 34

5. CAPÍTULO 2 - Números cromossômicos de espécies do gênero *Psychotria* - subfamília Rubioideae (Rubiaceae)

Tabela 1: Material testemunho das espécies do gênero *Psychotria* (Tribo Psychotrieae) 50

Tabela 2: Números cromossômicos e características cariotípicas de espécies do gênero *Psychotria* (Tribo Psychotrieae) 54

Tabela 3: Números cromossômicos de espécies de *Psychotria* (Tribo Psychotrieae), segundo literatura disponível 60

6. CAPÍTULO 3 – Hibridação *in situ* DNAr 45S, na tribo Psychotrieae – Rubioideae – Rubiaceae

Tabela 1: Números cromossômicos de espécies da tribo Psychotrieae 74

Tabela 2: Número de pares de sítios de DNAr 45S de espécies da tribo Psychotrieae 80

7. CAPÍTULO 4 – Distribuição de sítios de DNAr 45S em duas espécies de *Borreria* – Spermacoceae - Rubioideae

Tabela 1: Características cariotípicas das espécies de *Borreria* 92

Tabela 2: Número de pares de sítios de DNAr 45S das espécies de *Borreria* 97

Tabela 3: Números cromossômicos de espécies de *Borreria* (Tribo Spermacoceae), segundo literatura disponível 97

9. ANEXO 1

Tabela: Números cromossômicos de Rubiaceae segundo a literatura disponível 113

1. RESUMO GERAL

As Rubiaceae (A. L. de Jussieu), ordem Gentianales, subclado Euasteride I do clado Asteride, é composta por plantas de hábito variado, e compreende uma das maiores famílias de Angiospermas. A família está subdividida em quatro subfamílias, 637 gêneros e aproximadamente 10.700 espécies. São plantas cosmopolitas, com espécies de considerável expressão econômica como o café (*C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner), além de espécies de interesse farmacológico (*Cinchona* L.) e florístico (*Ixora* L., *Gardenia* J. Ellis e *Pentas* Benth.). Apresenta ampla distribuição, com considerável representação no Cerrado brasileiro, região considerada para esse estudo. Foram realizadas análises cromossômicas em espécies da subfamília Rubioideae, encontradas no estado de São Paulo, nas áreas das Estações Experimentais de Itirapina e Assis, na Reserva Biológica de Mogi-Guaçu e em Corumbá e Três Lagoas, Mato Grosso do Sul. Algumas contagens cromossômicas apresentadas concordaram com as já relatadas na literatura, como $2n = 20$ (*Coccocypselum lanceolatum* (Ruiz & Pav.) Pers.) e $2n = 22$ (*Coussarea hydrangeifolia* (Benth.) Müll. Arg. e *Psychotria hoffmannseggiana* (Willd. Ex Roem. & Schult.) Müll. Arg.). Foram obtidas contagens inéditas para o gênero *Rudgea* Salisb. ($2n = 44$ *R. viburnoides* (Cham.) Benth.), e para uma espécie da tribo Hedyotideae, *Manettia cordifolia* Mart. ($2n = 66$). Para a tribo Psychotria, foram apresentados dados inéditos para espécies pertencentes a três gêneros: *Decleuxia* H.B.K., com *Decleuxia fruticosa* (R. & S.) Kuntze ($2n = 20$); *Palicourea* Aubl. com $2n = 22$ em *Palicourea croceoides* Ham., *P. marcgravii* St. Hil. e *P. rigida* H.B.K., sendo que em *P. marcgravii*, a contagem divergiu da encontrada na literatura; e *Psychotria* L. com $2n = 22$ para *Psychotria lupulina* Benth., *P. marginata* Sw., *P. tenerior* (Cham.) M. Arg. e *P. trichophora* Müll. Arg.; $2n = 40$ para *Psychotria mapourioides* DC. e $2n = 44$ para *Psychotria carthagenensis* Jacq., *P. gracilentia* M. Arg., *P. sessilis* (Vell) M. Arg., *P. suterella* M. Arg. e *P. vellosiana* Benth. São apresentados também dados de hibridação *in situ* com DNAr 45S para a tribo Psychotrieae com seis espécies de

Psychotria, sendo uma do subgênero *Psychotria* (*P. carthagenensis*), cinco de *Heteropsychotria* (*Psychotria deflexa*, *P. hoffmannseggiana*, *P. trichophora*, *P. tenerior* e *P. vellosiana*), além de uma espécie do gênero *Palicourea* (*Palicourea marcgravii*) e uma *Rudgea* (*Rudgea. viburnoides*). O número de pares de sítios de DNAr 45S foi variável, assim como o número cromossômico das espécies. Não se observou relação entre o número de sítios e o nível de ploidia das espécies. A hibridação *in situ* DNAr 45S também foi aplicada em duas espécies da tribo Spermacoceae, gênero *Borreria* G. Mey. (*Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. e *B. verticillata* (L.) G. Mey.), nesse caso, as duas espécies apresentaram mesmo número cromossômico e ideogramas muito semelhantes, no entanto, a diferenciação no número de sítios de DNAr 45S possibilitou a discriminação das duas espécies de *Borreria*.

2. ABSTRACT

The Rubiaceae (A. L. de Jussieu) family, order Gentianales, sub-clade Euasteride I, Asteride clade, is composed by plants of varied habit, comprising one of the largest Angiosperm families, with four subfamilies, 637 genera and approximately 10.700 species. The family is cosmopolitan, including species of considerable economic expression like coffee (*C. arabica* L. and *C. canephora* Pierre ex A. Froehner), as well as with pharmacological (*Cinchona* L.) and floristic interest (*Gardenia* J. Ellis, *Ixora* L. and *Pentas* Benth.). It is a great family showing a broad range of distribution, with considerable representation in the Brazilian Cerrado the ecosystem considered in this study. Chromosome analyses were carried out in some species of Rubiaceae belonged to subfamily Rubioideae that occur in areas of Cerrado on the states of São Paulo (Experimental station of Itirapina and Assis and Biological Reserve of Mogi-Guaçu) and Mato Grosso do Sul (Corumbá and Três Lagoas counties). Some chromosome counts were in agreement to literature, as $2n = 20$ (*Coccocypselum lanceolatum* (Ruiz & Pav.) Pers.) and $2n = 22$ (*Coussarea hydrangeifolia* (Benth.) Müll. Arg. and *Psychotria hoffmannseggiana* (Willd. Ex Roem. & Schult.) Müll. Arg.). On the other hand, new counts were obtained for genus *Rudgea* Salisb. ($2n = 44$ *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth.), and for *Manettia cordifolia* Mart. ($2n = 66$), which belongs to the Hedyotideae tribe. For Psychotria tribe, we present new data for species from three genera: *Decleuxia fruticosa* (R. & S.) Kuntze ($2n = 20$); *Palicourea croceoides* Ham., *P. marcgravii* St. Hil. and *P. rigida* H.B.K., $2n = 22$ and *Psychotria* with $2n = 22$ for *Psychotria lupulina* Benth., *P. marginata* Sw., *P. tenerior* (Cham.) M. Arg. and *P. trichophora* Müll. Arg.; $2n = 40$ for *Psychotria mapouriioides* DC. and $2n = 44$ for *Psychotria carthagenensis* Jacq., *P. gracilentia* M. Arg., *P. sessilis* (Vell) M. Arg., *P. suterella* M. Arg. and *P. vellosiana* Benth. Inedit data of *in situ* hybridization with the 45S rDNA were obtained for eight species belonging to Psychotrieae tribe, being six for genus *Psychotria* (*Psychotria carthagenensis* subgenus *Psychotria*; *Psychotria deflexa*, *P. hoffmannseggiana*, *P. sciaphila*, *P. tenerior* and *P. vellosiana*, subgenus *Heteropsychotria*) one for genus *Palicourea* (*Palicourea*

marcgravii) and one for genus *Rudgea* (*Rudgea viburnoides*). The number of rDNA 45S sites varied among species. No relation was observed between the number of rDNA sites and the ploidy level of the species. The *in situ* hybridization with 45S rDNA was also applied in two species of the Spermacoceae tribe, *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. and *B. verticillata* (L.) G. Mey. Both species present the same chromosome number and very similar ideograms, but different number of 45S rDNA sites made possible the Karyotype discrimination between the two species of *Borreria*.

3. INTRODUÇÃO GERAL

A família Rubiaceae (A. L. de Jussieu) pertence à Ordem Gentianales, que é enquadrada por JUDD *et al.* (1999) no subclado Euasteride I do clado Asteride, no clado das Eudicotiledôneas. Estudos moleculares (BREMER & STRUWE, 1992; BREMER & JANSEN, 1991; BREMER, 1995) evidenciam o monofiletismo de Rubiaceae. Nas filogenias apresentadas por BACKLUND & BREMER (2000), a família Rubiaceae é o grupo mais antigo dessa Ordem, apresentando material fóssil com datação de cerca de 70 milhões de anos, sugerindo hipóteses sobre o centro de origem da ordem Gentianales. O ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG; 1998, 2003) evidenciou o posicionamento de Rubiaceae na Ordem Gentianales, ocupando uma posição basal no clado, sendo essa família, a que apresenta mais espécies dentro da ordem, cerca de 66%. Compreende cerca de 637 gêneros e aproximadamente 10.700 espécies, sendo a quarta maior dentre as angiospermas (ROBBRECHT, 1988). É composta por plantas de hábito muito variado, desde ervas, arbustos, árvores até trepadeiras, e que apresentam folhas simples de filotaxia oposta ou verticilada, geralmente com estípulas interpeciolares; as flores, em sua maioria, são actinomorfas e monóclinas, apresentam heterostilia e os frutos podem variar de drupáceo a seco capsular (JOLY, 1975).

São plantas cosmopolitas, porém com maior diversidade em regiões tropicais e subtropicais (JUDD *et al.*, 1999). No Brasil, é uma das mais bem representadas em levantamentos florísticos e fitossociológicos de várias formações vegetacionais, principalmente quando são incluídos indivíduos arbustivos e subarbustivos na amostragem (SALIS *et al.*, 1996). Tanto em florestas semidecíduas do sudeste (Rodrigues & Nave, 2000 **apud** GIANNOTTI & LEITÃO-FILHO, 2000), como no Cerrado, está presente entre as famílias com maior riqueza específica (GIANNOTTI & LEITÃO FILHO, 1992; MANTOVANI & MARTINS, 1993; CASTRO *et al.*, 1999; DURIGAN, 1999). São encontrados 25 gêneros de Rubiaceae no Cerrado sendo que no estado de São Paulo foram relatados 19 gêneros e um total de 34 espécies pertencentes à família. Em Assis, um dos últimos remanescentes de Cerrado no oeste do estado de São Paulo, foram levantadas 18 espécies de

Rubiaceae, entre árvores, arbustos, ervas e trepadeiras (DURIGAN, 1999). No geral, os gêneros de Rubiaceae representados no cerrado por maior número de espécies são *Alibertia* A. Rich. Ex DC. e *Psychotria* L., seguidos de *Borreria* G. Mey. (CASTRO *et al.*, 1999).

A família Rubiaceae destaca-se ainda por apresentar espécies de considerável expressão econômica, como o café (*C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner), um dos gêneros mais estudados; há também espécies de interesse farmacológico, como algumas do gênero *Cinchona* L. que apresentam quinino em sua casca, alcalóide utilizado no tratamento da malária (HARTEN, 1976; BARK, 2001). Destacam-se também espécies empregadas na ornamentação e paisagismo, como no gênero *Gardenia* J. Ellis, *Ixora* L. e *Pentas* Benth.. Algumas ainda são utilizadas na alimentação, como é o caso da *Genipa americana* L., conhecida popularmente como jenipapo, cujo fruto é utilizado na preparação de doce e licor (ZAPPI *et al.*, 1995).

De acordo com ROBBRECHT (1988), a família Rubiaceae é subdividida em quatro subfamílias, que são Cinchonoideae, com nove tribos e 83 gêneros; Ixoroideae, com duas tribos e 16 gêneros; Antirheoideae, com quatro tribos e 23 gêneros, e Rubioideae, com 12 tribos e 69 gêneros. De acordo com o mesmo autor existem ainda tribos e gêneros com posição incerta dentro da família. As quatro subfamílias são reconhecidas e separadas por um conjunto de caracteres, como por exemplo, o número de óvulos por lóculo, quantidade de endosperma e presença de ráfides por toda a planta.

A família Rubiaceae tem sofrido modificações recentes quanto ao reconhecimento das subfamílias. As filogenias, apresentadas na última década, demonstram que a família Rubiaceae seria mais naturalmente dividida em três subfamílias. A subfamília Ixoroideae é caracterizada por apresentar flores com corola contorcida e um mecanismo de polinização especializado, semelhante ao sistema existente em Asterales. A subfamília Cinchonoideae apresenta as três formas de pré-floração, contorcida, imbricada e valvar, ovário multiovulado e endosperma abundante grandes cristais de ráfide e sementes que apresentam a cobertura dorsal com depressões. A monofilia dessa

última subfamília não está bem sustentada pela cladística (JUDD *et al.*, 1999). E a subfamília Rubioideae, que contém a maioria das espécies da família, é usualmente definida pela combinação entre a presença de ráfides e pré-floração da corola valvar, com óvulos variando de numerosos a apenas um por lóculo. Essa subfamília está dividida em 16 ou 18 tribos, de acordo com o sistema de classificação adotado, sendo oito delas presentes em regiões tropicais e no Brasil (JUDD *et al.*, 1999).

De acordo com BREMER (1996), além das dificuldades em nível de subfamília, as Rubiáceas apresentam também problemas na delimitação de tribos. Devido a grande quantidade de gêneros e espécies, com difícil identificação, e por apresentarem caracteres morfológicos pouco distintivos e com gradações de difícil separação. De acordo com ROBBRECHT (1988) a presença de vários óvulos por lóculo é bastante variável, mas a presença de apenas um óvulo na placenta sustenta a posição da tribo Psychotrieae dentro da subfamília Rubioideae.

Para um melhor entendimento das espécies vegetais e subsidiar a análise do posicionamento taxonômico destas nos grupos em que estão contidas, estudos biossistemáticos envolvendo observações de campo, juntamente com análises laboratoriais com diferentes enfoques, como por exemplo, de compostos químicos, estruturas anatômicas, palinológicas ou de cromossomos das espécies, são essenciais e importantes (STACE, 1989). Poucos estudos biossistemáticos na família têm sido realizados, ressaltando trabalhos em alguns gêneros de interesse comercial, como *Coffea* L. e *Cinchona* L.

A citotaxonomia é o estudo das características estruturais, numéricas e comportamentais dos cromossomos, aplicadas à classificação taxonômica (STACE, 1989). Dos parâmetros citotaxonômicos, o número cromossômico é o mais amplamente conhecido para um grande número de taxa e, portanto, o mais utilizado como subsídio a estudos taxonômicos e evolutivos. Outros caracteres também são utilizados, como a morfologia e o tamanho dos cromossomos, o conteúdo de DNA nuclear, a estrutura do núcleo interfásico, padrões de bandamento ou a hibridação *in situ*, que

podem complementar a análise citotaxonômica inicial, baseada no número cromossômico (GUERRA, 1988).

Constatação de variações no número cromossômico pode ser muito útil na verificação da integridade de uma espécie ou no reconhecimento de espécies distintas a partir de um grupo com grande variabilidade morfológica, fisiológica ou distribuição geográfica (PIEROZZI & MENDAÇOLLI, 1997 e BORTOLETI *et al.*, 2002).

A utilidade da comparação de números cromossômicos pode ser ilustrada no gênero *Genipa* (Rubiaceae). ZAPPI *et al.* (1995) descreveram uma nova espécie, *Genipa infundibuliformis* Zappi & Semir, a partir de indivíduos inicialmente classificados como *Genipa americana*. As espécies foram consideradas distintas em função de diferenças morfológicas tanto vegetativas, como reprodutivas, além de estudos citogenéticos em desenvolvimento na época, que apontavam números cromossômicos diferentes em plantas tratadas como *Genipa americana* (GIBBS & INGRAM, 1982; GUERRA, 1986; PIEROZZI & DA CRUZ, 1988). O trabalho realizado por PIEROZZI & MENDAÇOLLI (1997) corroborou a separação de duas espécies de *Genipa* L., constatando-se $2n = 22$ em *G. americana* e $2n = 20$ em *G. infundibuliformis* (Tabela 3).

Alguns autores, como GUERRA (1988), STACE (1989) e SUZUKI *et al.* (1989), concordam que a variação cromossômica pode surgir de diferentes maneiras, mas suas conseqüências evolutivas estão relacionadas à multiplicação do grupo haplóide (poliploidia) e/ou aumento ou diminuição do número cromossômico original (disploidia). Também podem ocorrer alterações estruturais, com variações no tamanho cromossômico, na posição do centrômero, na quantidade de DNA, que pode ser perdido ou duplicado, e na quantidade de heterocromatina, sendo estas alterações estruturais melhor toleradas pelo organismo do que as numéricas (GUERRA, 1988).

Várias técnicas têm sido usadas na análise das mais diversas características cromossômicas. São encontrados na literatura vários exemplos de estudos bem sucedidos em citogenética e citotaxonomia vegetal. No Brasil, estão disponíveis estudos cromossômicos sobre vários grupos

taxonômicos distintos, como Leguminosae (BANDEL, 1974 e COLEMAN & DE MENEZES, 1980), e alguns de seus gêneros, como *Adesmia* DC. (MIOTTO & FORNI-MARTINS, 1994), *Sesbania* Scop.(FORNI-MARTINS & GUERRA, 1999) e *Machaerium* Pers.(MENDONÇA-FILHO *et al.*, 2002). Há outras famílias com diversas espécies estudadas, como Sapindaceae L. (LOMBELLO & FORNI-MARTINS, 1998), Malpighiaceae (LOMBELLO & FORNI-MARTINS, 2001, 2002a, 2002b), Asteraceae (MANSANARES *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006a, 2006b), Alismataceae (COSTA & FORNI-MARTINS, 2003), Cyperaceae (LUCENÑO *et al.*, 1998; VANZELA & GUERRA, 2000) e Orchidaceae (FÉLIX & GUERRA, 1999).

Quanto à família Rubiaceae, dispõe-se de informações cromossômicas para poucas espécies nativas, como em *Genipa* (PIEROZZI & MENDAÇOLLI, 1997). Os trabalhos estão concentrados no gênero exótico *Coffea*, que vem sendo estudado do ponto de vista citogenético há vários anos, com muitos resultados de caracterização cariotípica mediante a análise de cromossomos mitóticos (KRUG, 1934) e meióticos em paquíteno (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1988), com coloração convencional. Há também estudos cariotípicos utilizando técnicas de bandamentos convencionais (PIEROZZI *et al.*, 1999) e fluorocromos (PINTO-MAGLIO *et al.*, 2000). Técnicas de hibridação *in situ*, também foram utilizadas para identificar os progenitores da espécie *Coffea arabica* (RAINA *et al.*, 1998), além de estudos com marcadores moleculares (ANTHONY *et al.*, 2001).

Com relação às espécies de plantas de Cerrado, em geral informações sobre cromossomos são bastante escassas e encontradas de forma dispersa na literatura, como em COLEMAN (1982), GIBBS & INGRAN (1982), FORNI-MARTINS *et al.* (1995), FORNI-MARTINS & MARTINS (2000) e LOMBELLO & FORNI-MARTINS (2001 e 2002a). FORNI-MARTINS *et al.* (1995) e FORNI-MARTINS & MARTINS (2000) estudaram dezenas de espécies, pertencentes a diversas famílias botânicas, sendo incluída apenas uma espécie de Rubiaceae, *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum.

Mais recentemente, CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004), focalizando a caracterização cariotípica convencional de espécies de Rubiaceae de Cerrado, determinaram o número cromossômico e o ideograma de quatorze espécies, sendo seis pertencentes à subfamília Ixoroideae e oito à subfamília Rubioideae; desse total, apenas quatro espécies apresentavam número cromossômico já relatado, *Alibertia sessilis*, *Genipa americana* L. e *Psychotria hoffmannseggiana* (Willd. Ex Roem. & Schult.) Müll. Arg., com $2n = 22$ e *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. com $2n = 28$, sendo que para apenas uma havia ideograma descrito na literatura (*Genipa americana*). Foi observada constância de números cromossômicos em cinco espécies da subfamília Ixoroideae ($2n = 22$), além de uma espécie poliplóide, *Amaioua intermedia* Mart. com $2n = 66$. Por outro lado, a subfamília Rubioideae apresentou uma grande diversidade de números, sendo $2n = 20, 22, 28$ e 32 , com predomínio de números dentro de determinadas tribos, como $2n = 28$ nas três espécies estudadas de Spermacoceae. Todas as espécies apresentaram ideogramas simétricos, havendo uma predominância de cromossomos metacêntricos, com o tamanho dos cromossomos variando de $7,33 \mu\text{m}$ a $1,26 \mu\text{m}$.

Com base em dados de seu trabalho e da literatura, CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004), indicaram constância de números cromossômicos nas subfamílias Cinchonoideae e Antirheoideae ($2n = 22$), tidas como as mais basais por ROBBRECHT (1988). Por sua vez, em representantes da subfamília Ixoroideae, a variação de números cromossômicos foi pequena ($2n = 22, 66$), com predomínio de $2n = 22$ (Tabela 3, Anexo 1). Preliminarmente, sugeriu-se que a variação de números cromossômicos estaria relacionada à maior derivação da subfamília Rubioideae, cuja posição evolutiva já havia sido proposta por ROBBRECHT (1988).

Estudos de filogenia molecular sobre a subfamília Rubioideae realizados recentemente, por ANDERSSON & ROVA (1999), usando intron rps16 como marcador genético, demonstraram que o gênero *Psychotria* L. é polifilético, e que os gêneros *Rudgea* Salisb. e *Palicourea* Aubl. estão em outros dois clados separados. Esses resultados foram confirmados em outro estudo, enfocando a

tribo Psychotrieae, realizado por NEPOKROEFF *et al.* (1999), usando *ITS* e *rbcL*. Ainda no estudo de ANDERSSON & ROVA (1999), foi apresentado um clado contendo outros dois subclados: o primeiro onde se apresenta os gêneros *Hindsia* Benth. ex Lindl., *Declieuxia* H.B.K. e *Coccocypselum* P. Browne, mantidos na tribo Coccocypseleae, e o outro contendo *Coussarea* Aubl. e *Faramea* Aubl., mantidos na tribo Coussareeae. Mesmo com esses estudos, nenhuma das tribos da família Rubiaceae, principalmente da subfamília Rubioideae, apresenta boa delimitação tribal ou genérica (DELPRETE, 2004).

O presente estudo, objetivou a análise cariotípica de um maior número de espécies da subfamília Rubioideae e também a aplicação de técnicas mais refinadas na obtenção desses ideogramas, contribuindo não só para o esclarecimento de problemas taxonômicos, como para confirmar ou não a proposta de derivação associada entre caracteres morfológicos e variação de números cromossômicos. Além disso, também objetivou-se obter informações para o melhor conhecimento da flora do Cerrado, ecossistema extremamente ameaçado, face às altas taxas de devastação. O presente estudo é uma continuação do trabalho de CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004), já que dada à importância da família Rubiaceae, poucos estudos citológicos são realizados com representantes da família.

4. CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DA SUBFAMÍLIA RUBIOIDEAE – RUBIACEAE

4.1. RESUMO

A subfamília Rubioideae, está subdividida em 16 ou 18 tribos, de acordo com o sistema de classificação adotado, sendo oito delas presentes em regiões tropicais e no Brasil. São apresentadas análises cromossômicas para oito espécies pertencentes a quatro tribos e seis gêneros da subfamília Rubioideae. A tribo Coccocypseleae (Bremek) está representada pela espécie *Coccocypselum lanceolatum* (Ruiz & Pav.) Pers., $2n=20$; A tribo Coussareeae (Hook. f.), pela espécie *Coussarea hydrangeifolia* (Benth.) Müll. Arg., $2n=22$; A tribo Hedyotideae (Cham. & Schlecht.), com *Manettia cordifolia* Mart., $2n=66$ e a tribo Psychotrieae (A. Rich. Ex DC.), com o maior número de espécies e três gêneros, *Decleuxia fruticosa* (R.& S.) Kuntze, $2n=20$, *Palicourea* Aubl., com três espécies, *Palicourea croceoides* Ham., *P. marcgravii* St. Hil. e *P. rigida* H.B.K., todas com $2n=22$ e *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., $2n=44$. Os ideogramas apresentados mostraram apenas cromossomos metacêntricos para quase todas as espécies, exceto em *Rudgea viburnoides*, que apresentou um único par submetacêntrico. As medidas cromossômicas variaram de 4,04 μm a 1,16 μm . O maior CTC apresentado foi de 227,01 μm , pertencente à espécie que apresentou os maiores cromossomos, *Rudgea viburnoides* e o menor, 30,64 μm , foi encontrado em *Palicourea rigida*, espécie com os menores cromossomos, não sendo possível estabelecer uma relação entre o número e o tamanho cromossômico entre os gêneros e espécies. As contagens cromossômicas são inéditas para quatro das espécies, inclusive para dois gêneros, e os ideogramas são inéditos para cinco espécies.

4.2. ABSTRACT

The subfamily Rubioideae is subdivided in to 16 or 18 tribes, according to the classification system of considered, that eight of them occurring in tropical regions including Brazil. Chromosome analyses of eight species distributed in four tribes and six genera in the subfamily Rubioideae are presented. In this work, the Coccocypseleae (Bremek.) tribe was represented by *Coccocypselum lanceolatum* (Ruiz & Pav.) Pers., showing a $2n=20$; The Coussareeae (Hook. f.) tribe, by *Coussarea hydrangeifolia* (Benth.) Müll. Arg., with $2n=22$ and the Hedyotideae (Cham. & Schlecht.) tribe, with *Manettia cordifolia* Mart., showing $2n=66$. The fourth tribe was Psychotrieae (A. Rich. Ex DC.), with the largest number of species distributed in three genera, with *Decleuxia fruticosa* (R.& S.) Kuntze presenting $2n=20$, *Palicourea croceoides* Ham., *P. marcgravii* St. Hil. and *P. rigida* H.B.K., all with $2n=22$ and *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., showing $2n=44$. All ideograms obtained shown only metacentric chromosomes, except for *Rudgea viburnoides*, which presented only one submetacentric pair. The chromosome lenght varied from $4.04\text{ }\mu\text{m}$ to $1.16\text{ }\mu\text{m}$. The highest TCL (total chromatin length) value was observed in *Rudgea viburnoides* with $227.01\text{ }\mu\text{m}$, the species that presented the largest chromosomes. In opposite the lowest value, with $30.64\text{ }\mu\text{m}$, was found in *Palicourea rigida*, a specie with fewer chromosomes, without any relation with the chromosome number. The chromosome numbers are inedit for four species, also for two genera, and the ideograms were unknown for five species.

4.3. INTRODUÇÃO

A família Rubiaceae (A. L. de Jussieu) compreende cerca de 637 gêneros, distribuídos em três subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae (JUDD *et al.*, 1999). A subfamília Rubioideae é composta por plantas lenhosas ou herbáceas, com estípulas freqüentemente bífidas ou fimbriadas, presença de grandes quantidades de ráfides e cristais por toda a planta, pré-floração da corola quase sempre valvar, raramente imbricada ou contorcida, heterodistília muito comum, placenta pluriovulada ou com um simples óvulo ereto, raramente dois, número variado de sementes, frutos secos ou carnosos, e pólen com número variado de poros (ROBBRECHT, 1988). A subfamília Rubioideae é subdividida em 16 ou 18 tribos, de acordo com o sistema de classificação adotado, sendo oito delas presentes em regiões tropicais e no Brasil (JUDD *et al.*, 1999).

A tribo Coccocypseleae (Bremek) apresenta ervas rastejantes, estípulas inteiras, presença de ráfides, inflorescências terminais, ovário bilocular, placenta axilar com muitos óvulos, frutos carnosos, flores freqüentemente heterostílicas e pólen com três poros (ROBBRECHT, 1988). Essa tribo apresenta dois gêneros, *Coccocypselum* P. Browne e *Lipostoma* D. Don, no entanto, são conhecidos os números cromossômicos apenas de algumas espécies do primeiro (KIEHN, 1986).

A tribo Coussareeae (Hook. f.) é representada por árvores ou arbustos, raramente ervas, com estípulas intra ou interpeciolares, quase sempre divididas, raramente inteiras, presenças de ráfides, inflorescências terminais, raramente axilares ou nos nós, ovário com dois a cinco lóculos com um óvulo ereto em cada lóculo, frutos carnosos, flores freqüentemente heterostílicas, pólen muito variado apresentando de nenhuma a cinco aberturas (ROBBRECHT, 1988). Compreende apenas dois gêneros, *Coussarea* Aubl. e *Faramea* Aubl. É conhecido o número cromossômico de uma única espécie de *Coussarea*, *C. hydrangeifolia* (Benth.) Müll. Arg., $n = 11$ (CORRÊA & FORNIMARTINS, 2004).

A tribo Hedyotideae (Cham. & Schlecht.) é a que apresenta maior número de gêneros na subfamília Rubioideae, compreendendo 19 gêneros. Apenas três desses gêneros tem números

cromossômicos conhecidos, *Hedyotis* L., com $n = 17$, $70 - 82$ e $2n = 72$, $96 - 100$, $140 - 160$ (ROBBRECHT *et al.*, 1996, KIEHN, 1986 e CHURCH, 2003), *Oldenlandia* L., com $n = 9$ e 11 e $2n = 18$ (ROBBRECHT *et al.*, 1996 e CHURCH, 2003), e *Manettia* Boeckh. com $n = 12$ e 24 , e $2n = 22$ e 36 (FAGERLIND, 1937; POUCQUES, 1949 e FORNI-MARTINS & MACIAS, 2001). Essa tribo é composta por plantas normalmente herbáceas, raramente subarbustos ou árvores, com estípulas geralmente fimbriadas, presença de ráfides e algumas com látex, ovário bilocular, placentação axilar com 1, 2 ou vários óvulos, flores freqüentemente heterostílicas e pólen com três poros (ROBBRECHT, 1988).

A tribo Psychotrieae (A. Rich. Ex DC.) também uma das maiores em número de gêneros dentro da subfamília Rubioideae, é composta por árvores ou arbustos, raramente ervas, com estípulas sempre divididas, raramente inteiras, inflorescências terminais, raramente axilares ou nos nós, ovário com dois a cinco lóculos com um óvulo ereto em cada lóculo, frutos carnosos, flores freqüentemente heterostílicas, pólen muito variado apresentando nenhum a cinco aberturas (ROBBRECHT, 1988). Essa tribo também é uma das mais conhecidas e estudadas no que se refere ao número cromossômico. Compreende treze gêneros, dos quais três apresentam espécies com número cromossômico já descrito. *Hydnophytum* Jack, apresenta $2n = 40/44$ e 110 (ROBBRECHT *et al.*, 1996). *Palicourea* Aubl., apesar de ser um dos maiores gêneros, possui apenas duas espécies com o número cromossômico conhecido, *Palicourea marcgravii* A. St. -Hil., $2n = 22 + 3B$ (PINTO-MAGLIO *et al.*, 1997) e *P. rigida* Kunth, $n = 11$ (CORRÊA & FORNI-MARTINS, 2004). Inúmeras espécies do gênero *Psychotria* L. têm seus números cromossômicos relatados, variando de $n = 11$, 12 , 17 , 22 e 34 (GOLDBLATT, 1985; GOLDBLATT & JOHNSON, 1991 e 1994 e CORRÊA & FORNI-MARTINS, 2004) e $2n = 22$, 32 , 40 , 44 , 88 e 132 (BOLKHOVSKIKH *et al.*, 1969; GOLDBLATT, 1981; KIEHN, 1986; GOLDBLATT & JOHNSON, 1994; ROBBRECHT *et al.*, 1996; PINTO-MAGLIO *et al.*, 1997 e CORRÊA & FORNI-MARTINS, 2004). Esse gênero é um

dos mais variáveis no que se refere ao número cromossômico, merecendo um estudo à parte (Capítulo 2).

Visando uma maior contribuição para o conhecimento cromossômico da família Rubiaceae, esse trabalho foi realizado especialmente com espécies de cerrado no Brasil, complementando alguns dados já apresentados por CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004).

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1. Espécies estudadas

Foram coletados frutos maduros de espécies pertencentes a quatro tribos da subfamília Rubioideae (Figuras 1 e 2; Tabela 1) em áreas de Cerrado no estado de São Paulo: Estações Ecológicas e Experimentais de Assis (22°33'S e 50°22'W) e Itirapina (47°49'S e 22°15'W), na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (22°15'S e 47°08'W), no Parque Estadual de Vassununga – Gleba Pé de Gigante em Santa Rita do Passa Quatro (21°37'S e 47°38'W). Também foi feita uma coleta em uma área de reserva de cerrado do Observatório Abraão de Moraes, em Vinhedo (23°00'S e 46°57'W), pertencente à Universidade de São Paulo - USP. Algumas espécies foram coletadas numa região de Cerrado no estado de Mato Grosso do Sul, município de Três Lagoas (20°41'S e 51°40'W), localizada na divisa com o estado de São Paulo. Uma espécie foi coletada na Serra do Cipó, Fazenda do Geraldinho (19°17'S e 43°35'W), Minas Gerais, em área de campo rupestre. Para todas as espécies utilizadas foram coletados material-testemunha, e a identificação das mesmas foi feita com o auxílio da literatura taxonômica e de especialistas nos grupos. Os materiais-testemunho, referidos na tabela 1, foram depositados no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC).

Tabela 1 – Material testemunho de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) analisadas, com informações sobre respectivos locais de coleta e dados do coletor;

Tribo	Espécie	Local de coleta	Coletor	Nº de coleta
Coccocypseleae	<i>Coccocypselum lanceolatum</i> (Ruiz & Pav.) Pers.	Assis / Três Lagoas	Corrêa & Silva	03/70
Coussareeae	<i>Coussarea hydrangeifolia</i> (Benth.) Müll. Arg.	Mogi-Guaçu	Corrêa & Silva	01/15
Hedyotideae	<i>Manettia cordifolia</i> Mart.	Vinhedo	MagioneFracasso	18
Psychotrieae	<i>Decleuxia fruticosa</i> (R. & S.) Kuntze	Serra do Cipó	Mansanares	422
0	<i>Palicourea croceoides</i> Ham.	Itirapina	Corrêa & Silva	02/54
	<i>Palicourea marcgravii</i> A. St. -Hil.	Itirapina	Corrêa & Silva	01/45
	<i>Palicourea rigida</i> Kunth.	Santa Rita do Passa Quatro	Corrêa & Silva	05/90
	<i>Rudgea viburnoides</i> (Cham.) Benth.	Mogi-Guaçu	Corrêa & Silva	01/16

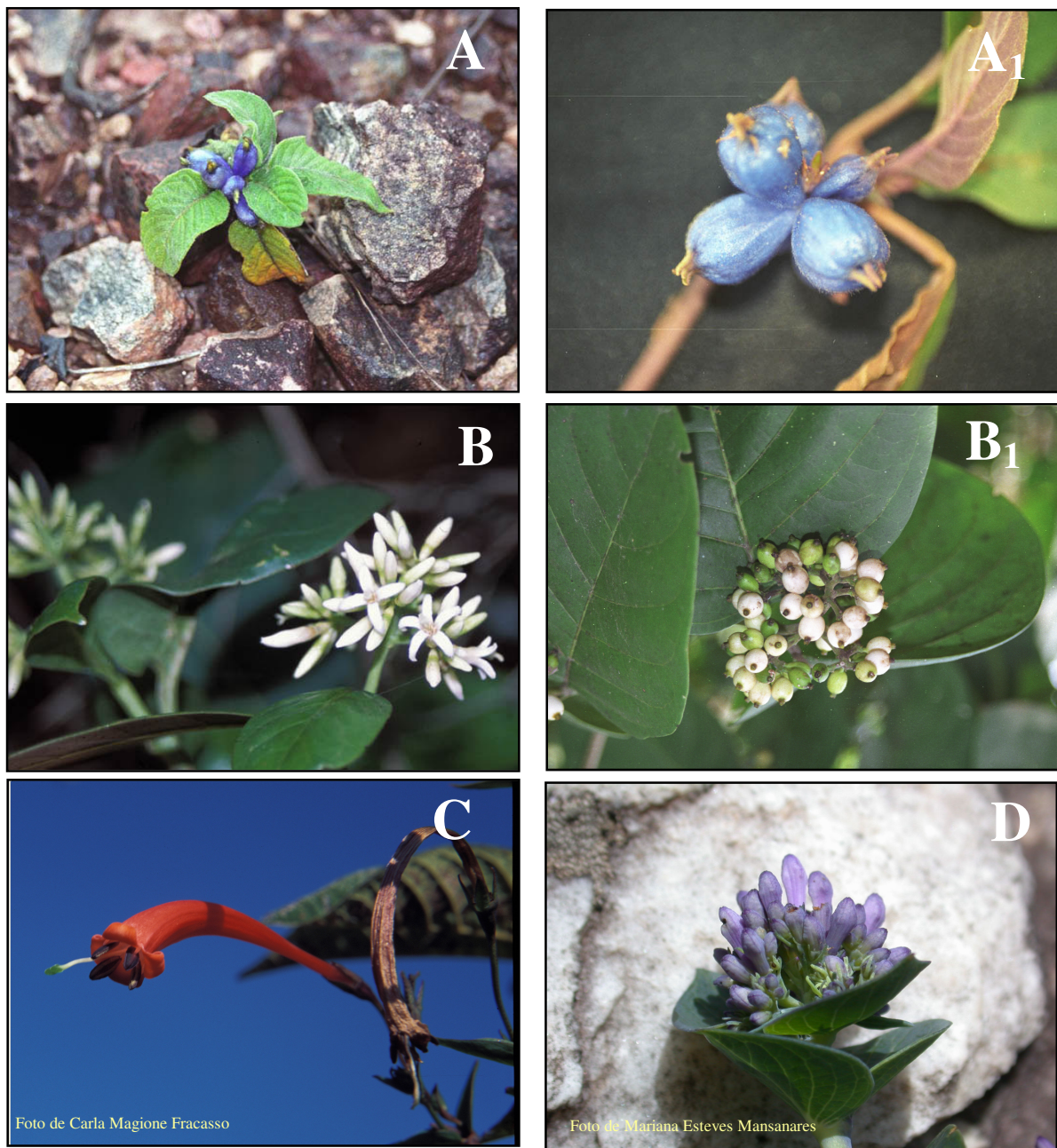


Figura 1 – Caracteres reprodutivos de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae): A e A₁ – *Coccocypselum lanceolatum*, frutos; B e B₁ – *Coussarea hydrangeifolia*, flores e frutos; C – *Manettia* sp., flores; D – *Decleuxia fruticosa*, flores.

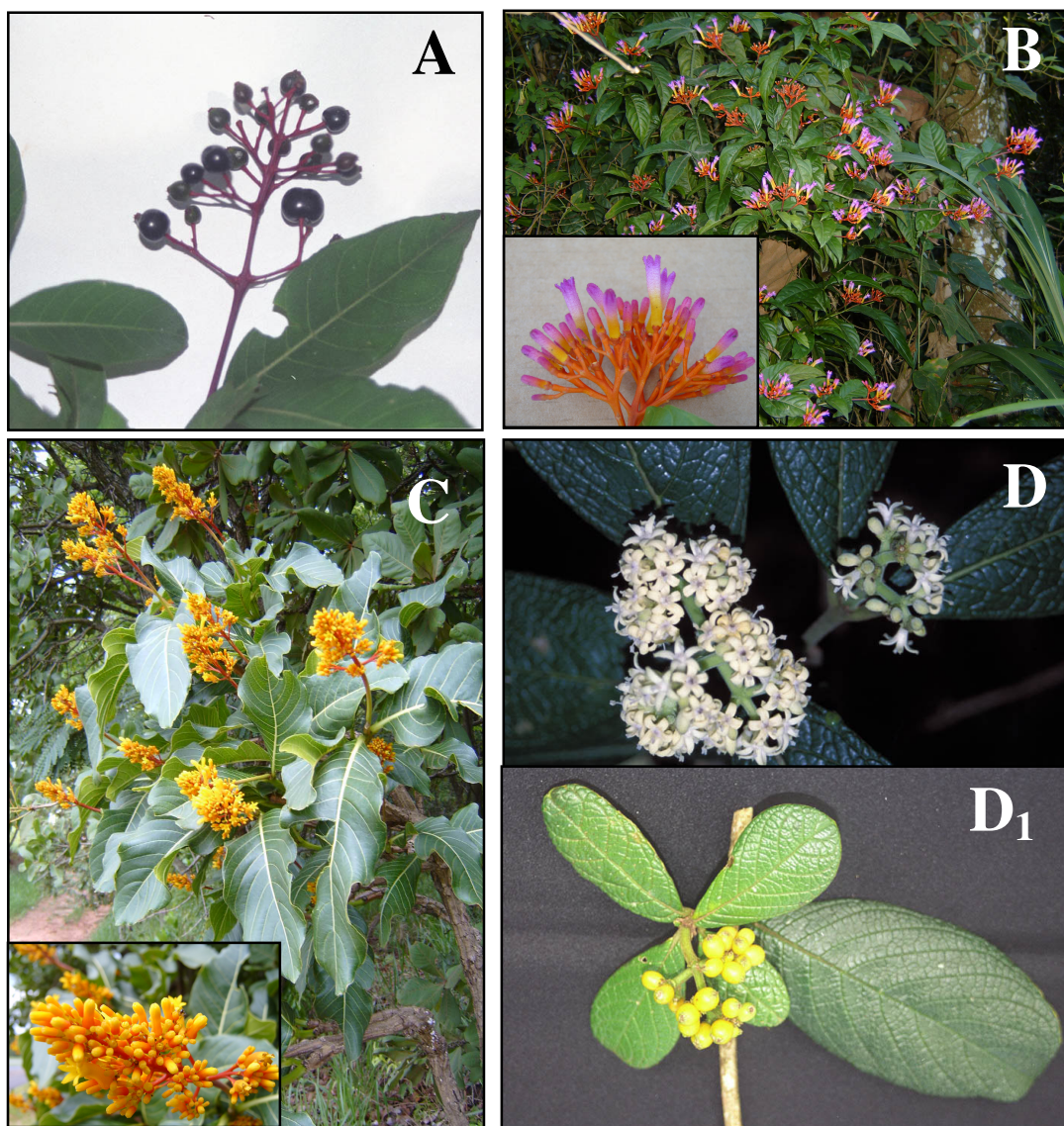


Figura 2 – Caracteres reprodutivos de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae): A – *Palicourea croceoides*, frutos; B – *Palicourea marcgravii*, inflorescências; C - *Palicourea rigida*, inflorescências; D e D₁ – *Rudgea viburnoides*, flores e frutos.

4.4.2. Germinação das sementes

Os frutos foram coletados no campo foram imediatamente beneficiados para a obtenção das sementes, que foram lavadas em solução de Hipoclorito de sódio a 5%, para diminuir a proliferação de fungos durante a germinação.

As sementes foram postas a germinar em placas de petri com papel de filtro umidecido com água destilada e mantidas em Câmara Germinadora (Tecnal), sob luz constante e temperatura de 28° C. O tempo para o surgimento da radícula foi de aproximadamente 120 dias (Dados não apresentados).

4.4.3. Pré-tratamento, fixação e armazenamento

Os frutos foram beneficiados para a limpeza das sementes, que foram postas a germinar em Câmara Germinadora, com temperatura constante de 28 °C. As radículas com aproximadamente 1cm de comprimento, de sementes recém germinadas, foram coletadas e pré-tratadas com soluções de para-diclorobenzeno saturado (p-DB) e 8-hidroxiquinoleína 0,002M (8-Hq) por aproximadamente 5 horas, às temperaturas de 16-18°C e 14-15°C, respectivamente. Posteriormente, foram fixadas em álcool:ácido acético (3:1) por 24 horas, em temperatura ambiente. Depois de fixadas, as raízes foram guardadas em álcool 70%, em freezer a -15°C até o momento de confecção das lâminas.

4.4.4. Coloração de Giemsa (GUERRA, 1983)

Para a coloração convencional de Giemsa, as raízes armazenadas foram lavadas com água destilada e hidrolizadas em HCl 5N por 25 minutos à temperatura ambiente; após uma nova lavagem, o meristema foi separado e fragmentado sobre lâmina, com adição de uma gota de ácido acético 45%. Foi adicionada uma lamínula e o material esmagado. Para a retirada da lamínula foi utilizado nitrogênio líquido. Após secagem, à temperatura ambiente, as lâminas foram mergulhadas

em solução de Giemsa 2% por aproximadamente 20 minutos; após, foram lavadas em água corrente, secas e montadas com nova lamínula, usando resina Entellan.

4.4.5. Elaboração de ideogramas

Foram elaborados os ideogramas para algumas das espécies analisadas, utilizando células com bom espalhamento cromossômico e condições adequadas para análise da morfologia dos cromossomos. Para a elaboração de ideogramas, para cada espécie, pelo menos dez células em metáfase mitótica foram desenhadas em câmara clara acoplada a microscópio óptico. O ideograma foi elaborado utilizando a média obtida para cada par cromossômico, incluindo o tamanho dos cromossomos, a posição do centrômero e da constrição secundária. A nomenclatura para a morfologia dos cromossomos seguiu GUERRA (1986), tendo por base o respectivo Índice centromérico – IC (divisão do tamanho do braço curto do cromossomo pelo tamanho total do mesmo, multiplicado por 100). Para a caracterização dos ideogramas de cada espécie também foram calculados o Comprimento Total da Cromatina – CTC (soma do tamanho individual de todos os cromossomos), e o Índice de Simetria – TF% do ideograma (soma do comprimento de todos os braços curtos dividido pelo comprimento total de todos os cromossomos do conjunto haplóide) (HUZIWARA, 1956). As células foram fotografadas em Fotomicroscópio Olympus BX51, em filme PB ISO 25 (Imagelink – Kodak) ou ISO 50 (PanF – Ilford).

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As oito espécies de Rubioideae analisadas representam seis gêneros distintos, pertencentes às tribos Coccocypseleae, Coussareeae, Hedyotideae e Psychotrieae. Foram observadas diferenças quanto aos números cromossômicos ($2n = 20, 22, 44$ e 66) e no tamanho dos mesmos ($4,04$ a $1,16 \mu\text{m}$). Os cromossomos são metacêntricos, à exceção de um par submetacêntrico em *Rudgea viburnoides*.

Tabela 2 – Número cromossômico e características cariotípicas das espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae).

Tribo	Espécie	2n	Comprimento cromossômico (μm)	CTC (μm)	TF%	Fórmula cariotípica	Material Testemunha
Coccocypseleae	<i>Coccocypselum lanceolatum</i>	20	2,58 – 1,52	40,26	45,33	10m	03/70
Coussareeae	<i>Coussarea hydrangeifolia</i>	22	2,61 – 1,49	46,01	44,40	11m	01/15
Hedyotideae	<i>Manettia cordifolia</i>	66*	_____	_____	_____	_____	18
Psychotrieae	<i>Decleuxia fruticosa</i>	20**	_____	_____	_____	_____	422
	<i>Palicourea croceoides</i>	22*	2,06 – 1,19	35,21	47,98	11m	02/54
	<i>Palicourea marcgravii</i>	22#	2,40 – 1,41	41,52	44,37	11m	01/45
	<i>Palicourea rigida</i>	22	1,67 – 1,16	30,64	44,78	11m	05/90
	<i>Rudgea viburnoides</i>	44**	4,04 – 2,09	227,01	43,41	21m+1sm	01/16

*Contagens inéditas para a espécie e ** para o gênero, # número diferente do encontrado na literatura, CTC = comprimento total da cromatina, TF% = simetria cariotípica, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico.

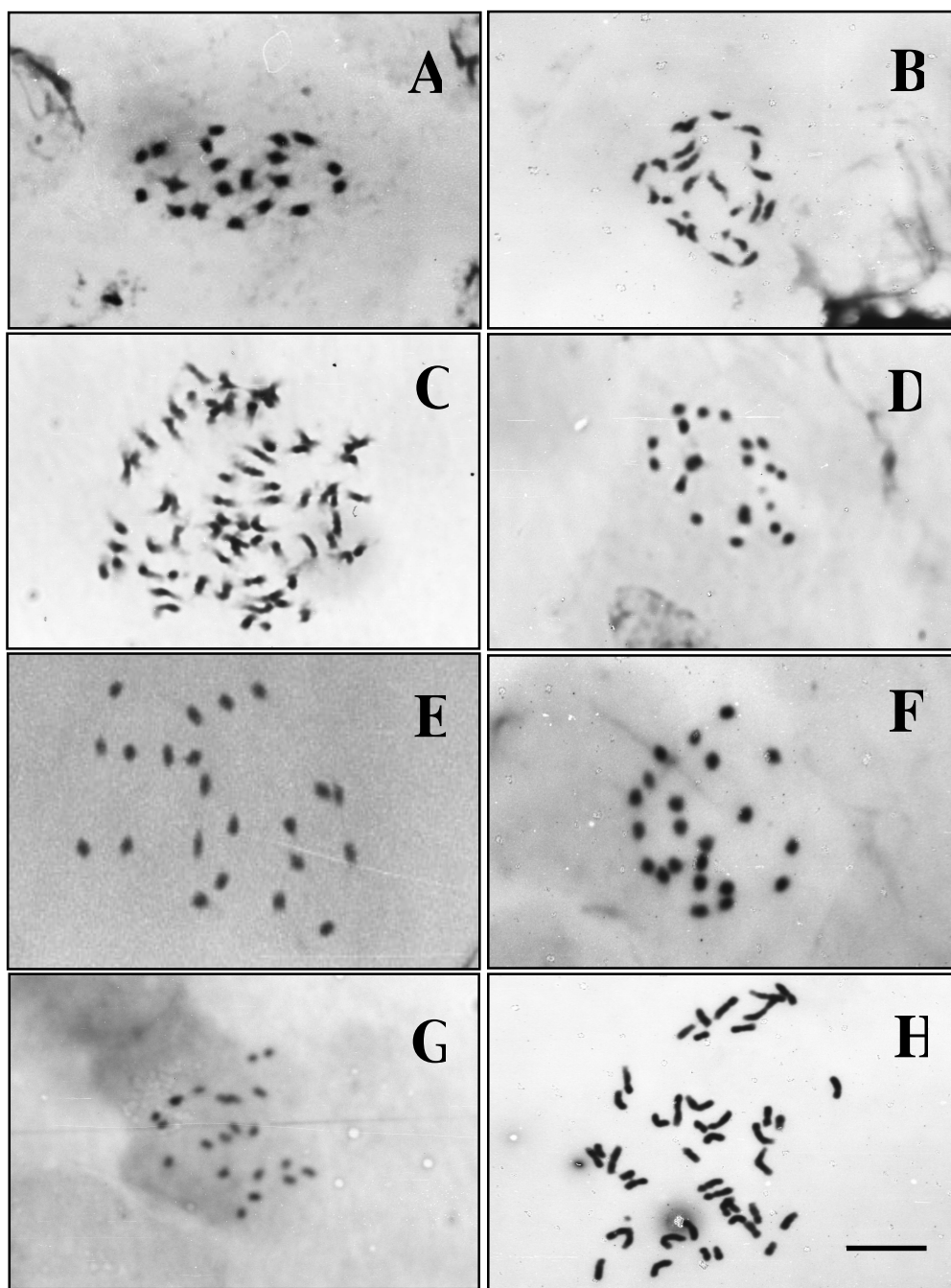


Figura 3 – Cromossomos de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae): A – *Coccocypselum lanceolatum*, $2n = 20$; B – *Coussarea hydrangeifolia*, $2n = 22$; C – *Manettia* sp., $2n = 66$; D – *Decleuxia fruticosa*, $2n = 20$; E – *Palicourea croceoides*, $2n = 22$; F – *Palicourea marcgravii*, $2n = 22$; G – *Palicourea rigida*, $2n = 22$; H – *Rudgea viburnoides*, $2n = 44$. Barra = 10 μ m

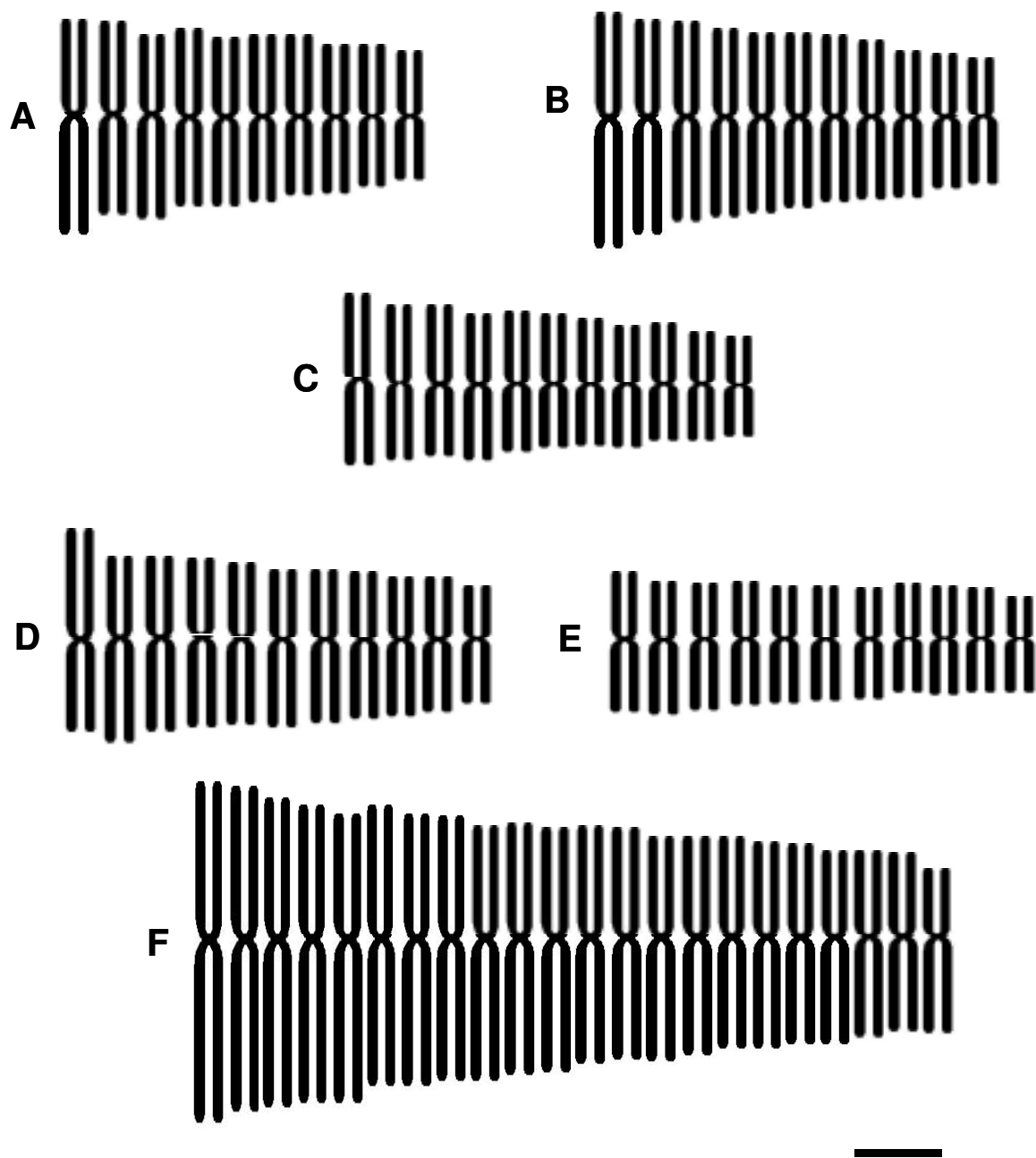


Figura 4 – Ideogramas das espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae):

A – *Coccocypselum lanceolatum*; B – *Coussarea hydrangeifolia*; C – *Palicourea croceoides*; D – *Palicourea marcgravii*; E – *Palicourea rigida*; F – *Rudgea viburnoides*. Barra = 1μm

Dentre as oito espécies estudadas, as contagens cromossômicas são inéditas em quatro espécies: *Manettia cordifolia*, *Decleuxia fruticosa*, *Palicourea croceoides*, e *Rudgea viburnoides*, sendo que em *Decleuxia* e *Rudgea* as contagens são inéditas como também para o gênero (Figura 3). Três espécies: *Coccocypselum lanceolatum*, *Coussarea hydrangeifolia* e *Palicourea rigida*, já haviam sido estudadas anteriormente por CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004), embora amostradas populações diferentes, tiveram seus números cromossômicos confirmados (Figura 3). Em *Coussarea hydrangeifolia* e *Palicourea rigida*, a determinação do número cromossômico havia sido feita em células meióticas ($n = 11$) (CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004). *Palicourea marcgravii* ($2n = 22$) apresentou contagem cromossômica igual à apresentada na literatura, diferindo na menção aos cromossomos B por PINTO-MAGLIO *et al.* (1997) ($2n = 22 + 3B$).

As contagens cromossômicas aqui observadas estão de acordo com a maioria das encontradas na literatura para as espécies e gêneros (Anexo 1), e também concordam com o número básico apresentado para a família Rubiaceae, que é $x = 11$ (DARLINGTON & WYLIE, 1955). Há também registros de outros números básicos de $x = 2, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 20$ e 22 (ROBBRECHT *et al.*, 1996), levando à necessidade de maiores estudos sobre a família.

O número cromossômico de *Coccocypselum lanceolatum* ($2n = 20$) diferiu daquele inicialmente proposto por DARLINGTON & WYLIE (1955) como $x = 11$, no entanto, outros representantes desse gênero, como por exemplo *Coccocypselum brevipetiolatum* Steyerl. e *C. decumbens* K. Krause, também apresentam essa mesma contagem nos resultados apresentados por KIEHN (1986). Ainda existem espécies com outros números diferentes do número básico descrito para a família, como é o caso de *Coccocypselum herbaceum* Aubl. ($2n = 10 - 12$), *C. hirsutum* Bartl. Ex DC. ($2n = 20 - 40$) e *C. lumbellatum* ($2n = 38 - 40$), todos descritos por KIEHN (1986) (Anexo 1). Pode-se sugerir que o número básico para a tribo Coccocypseleae seja $x = 10$, derivado provavelmente de $x = 11$, por rearranjos e perdas cromossômicas.

Na tribo Coussareeae, apenas um representante foi estudado e apresentado, *Coussarea hydrangeifolia*, $2n = 22$, cujo número cromossômico complementa o já registrado para o gênero, $n = 11$, em *Coussarea hydrangeifolia*, por CORRÊA E FORNI-MARTINS (2004). Isso sugere que o número básico da tribo coincidiu com o da família Rubiaceae, onde $x = 11$ (ROBBRECHT, 1988). Seus cromossomos são todos metacêntricos e o tamanho dos mesmos está entre a média de tamanhos encontrados nesse estudo para as outras espécies, de outras tribos e gêneros, já que esse registro de ideograma é inédito para a tribo (Figura 4).

A tribo Hedyotideae, segundo ANDERSON & ROVA (1999) é o grupo mais complexo da subfamília, com dificuldades na delimitação dos gêneros. Nenhum dado de morfologia cromossômica é conhecido para as espécies de *Manettia* ou de outros gêneros da tribo Hedyotideae. Essa tribo, aqui representada pela espécie *Manettia cordifolia* apresentou $2n = 66$ (Figura 3), tem a característica de apresentar tanto gêneros com número cromossômico alto, como *Hedyotis* ($2n = 96 - 100$) como com número cromossômico bem reduzido, em *Oldenlandia* ($2n = 18$). Outros números cromossômicos para o gênero *Manettia* são descritos na literatura, $n = 12$ para *M. luteo-rubra* (Vell.) Benth., *M. paraguariensis* Chodat e *M. robusta* (FORNI-MARTINS & MACIAS, 2001), e ainda temos $2n = 22$ para *M. bicolor* Paxton. (POUCQUES, 1949) e $2n = \text{ca. } 36$ em *M. coccinea* (Aubl.) Willd. e *M. inflata* Sprague (FAGERLIND, 1937). A maioria das espécies apresenta número cromossômico múltiplo de 12, sugerindo ser este, $x = 12$, o número básico para o gênero, embora ocorram espécies com $x = 22$. É necessário um maior conhecimento cromossômico desse gênero, para que se possa apresentar realmente seu número básico, e prováveis derivados para subsidiar uma análise citotaxonômica consistente.

As variações de números cromossômicos (Figura 3) obtidos nesse estudo (Tabela 2) para a tribo Psychotrieae (*Decleuxia*, *Palicourea* e *Rudgea*) também são encontradas na literatura (Anexo 1), com relatos de números desde $2n = 22$ ($n = 11$) em inúmeras espécies, até números relativamente altos, como $2n = 132$ em *Psychotria mahonii* C.H. Wright (KIEHN, 1985), ou $2n = 110 + 1$, em

Hydnophytum moseleyanum (ROBBRECHT, 1996). As contagens de números cromossômicos são escassas nos três gêneros aqui abordados, sendo prematuro sugerir seus números cromossômicos básicos, especialmente para *Decleuxia* ($2n = 20$ em *D. fruticosa*), que se diferencia de $x = 11$, número básico da família Rubiaceae.

No presente estudo o tamanho dos cromossomos variou de 4,04 μm , em *Rudgea viburnoides*, até 1,16 μm em *Palicourea rigida* (Tabela 2). Em média a maioria dos cromossomos apresentou entre 2,56 a 1,47 μm , com variação gradual em cada espécie, não agrupando classes descontínuas (Figura 4).

Quanto ao CTC, o maior valor observado foi em *Rudgea viburnoides* (227,01 μm), resultante dos maiores tamanhos cromossômicos e de um dos números cromossômicos mais altos ($2n = 44$), já que para *Manettia cordifolia* ($2n = 66$), não foi possível a confecção do ideograma, devido a pouca disponibilidade de material citológico, em perfeito estado de preparação. O menor CTC foi encontrado em *Palicourea rigida* (30,64 μm), espécie com $2n = 22$ e tamanho dos cromossomos abaixo da média das demais espécies estudadas (Tabela 2).

Nas espécies em que foi possível a caracterização morfológica dos cromossomos, todos se mostraram metacêntricos em *Coccocypselum lanceolatum*, *Coussarea hydrangeifolia*, *Palicourea croceoides*, *P. marcgravii* e *Palicourea rigida*. Já em *Rudgea viburnoides*, a maioria desses apresentou-se como metacêntrica, com apenas um par submetacêntrico. Não foi observada a presença de cromossomos telocêntricos ou acrocêntricos em nenhuma das espécies (Figura 4).

O TF%, segundo HUZIWARA (1956), é um dos parâmetros para inferir o grau de simetria cariotípica das espécies; ele representa a média da posição centromérica de todos os cromossomos de uma espécie. As espécies aqui estudadas apresentaram TF% variando de 43,41 em *R. viburnoides* a 47,98 em *P. croceoides*. O valor menor em *R. viburnoides* se deve ao fato da espécie ter apresentado um par de cromossomos submetacêntrico. O máximo de simetria cariotípica de uma

espécie se dá quando o índice TF% se aproxima de 50, onde todos os cromossomos seriam metacêntricos, isto é, apresentando os braços curtos e longos de mesmo tamanho (Tabela 2).

Para STEBBINS (1950), o conceito de simetria cariotípica envolve também a diferença no tamanho relativo dos cromossomos de cada ideograma. Nas espécies aqui apresentadas, a variação nos tamanhos dos cromossomos é gradual, como descrito anteriormente, não apresentando descontinuidade, o que reforça o caráter simétrico dos ideogramas dessas espécies (Figura 4).

Existem poucos registros de ideogramas de espécies de Rubiaceae, sendo na maioria espécies de *Coffea*. Por exemplo, PIEROZZI *et al.* (1999) apresentaram o ideograma de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner. e *C. dewevrei* de Wild. & T. Durand, ambas com $2n = 22$, onde a maioria dos cromossomos era submetacêntrico, com alguns pares metacêntricos; e com tamanhos cromossômicos variando de 2,38 a 0,83 μm e o TF% foi de 30,71 e 30,27 respectivamente.

Também são conhecidos ideogramas de algumas espécies brasileiras de cerrado, apresentados por CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004), com seis representantes da tribo Gardenieae, subfamília Ixoroideae (*Alibertia concolor* (Cham.) K. Schum., *A. edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC., *A. sessilis* (Vell.) K. Schum., *Amaioua intermedia* Mart., *Genipa americana* L. e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum.) e seis da subfamília Rubioideae, de quatro tribos, *Coccocypseleae* (*Coccocypselum lanceolatum*), *Coussareeae* (*Coussarea hydrangeifolia*), *Psychotrieae* (*Palicourea rigida*, *Psychotria deflexa* DC. e *P. hoffmannseggiana*) e *Spermacoceae* (*Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum., *B. verticillata* (L.) G. Mey. e *Richardia brasiliensis* Gomes), sendo que, no estudo atual duas dessas espécies se repetem (*Coccocypselum lanceolatum* e *Coussarea hydrangeifolia*), porém amostrando-se outras populações. Os cromossomos metacêntricos representaram a maioria, ou mesmo a totalidade nos ideogramas de algumas espécies e o tamanho desses cromossomos variam de 7,33 a 1,49 μm e o TF% indicou ideogramas mais simétricos, variando de 47,45 em *Borreria verticillata* a 40,06 em *Psychotria deflexa*. Esse padrão

cariotípico praticamente se repetiu nas espécies agora estudadas. Para uma das espécies, com nova população avaliada, *Coccocypselum lanceolatum* a fórmula cariotípica foi idêntica, para *Coussarea hydrangeifolia* havia sido obtido apenas o número cromossômico meiótico, sendo o ideograma inédito no atual estudo (CORRÊA & FORNI-MARTINS, 2004) (Figura 4).

Devido à grande riqueza de espécies da subfamília Rubioideae, torna-se inviável realizar uma análise do ponto de vista citotaxonômico, tendo por base os resultados obtidos no presente estudo e os disponíveis na literatura. Torna-se necessária uma ampliação da amostragem dos dados cariotípicos, principalmente referentes aos números cromossômicos, que poderão ser então confrontados com os arranjos taxonômicos da subfamília Rubioideae disponíveis na literatura, incluindo o estudo filogenético apresentado por ANDERSSON & ROVA (1999) para seus gêneros e tribos.

Todas as contagens (Tabela 2) efetuadas no presente trabalho são relevantes, pois vêm ampliar o conhecimento cromossômico da família Rubiaceae, que, apesar de ser uma das maiores dentro das Angiospermas, apresenta poucos dados cromossômicos relatados ou conhecidos, sendo mais escassos ainda para as espécies tropicais e subtropicais (KIEHN, 1986).

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, L. & ROVA, J. H. E. 1999. The *rps16* intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 214: 161-186.

BOLKHOVSKIKH, Z., GRIF, V., MATVEJEVA, T. & ZAKARYEVA, O. 1969. Chromosome numbers of flowering plants. Leningrad, Academy of Sciences of the USSR, 926p.

CHURCH, S. A. 2003. Molecular phylogenetics os *Houstonia* (Rubiaceae): descending aneuploidy and breeding system evolution in the radiation of the lineage across North America. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 27 (2): 223–238.

CORRÊA, A. M. & FORNI-MARTINS, E. R.; 2004. Estudos cromossômicos em espécies de Rubiaceae (A. L. de Jussieu) de Cerrado. *Caryologia* 57 (3): 250-258.

DARLINGTON, C. D. & WYLIE, A. P. 1955. Chromosome Atlas of Flowering Plants. University Press Aberdeen. 2 edition. 235-240.

FAGERLIND, F. 1937. Embryologische, zytologesche und besläunbungsexperimentelle studien in der familie Rubiaceae nebst Bemerkungen über einige polyploiditätsprobleme. *In*: DARLINGTON, C. D. & WYLIE, A. P. 1955. Chromosome Atlas of Flowering Plants. University Press Aberdeen. 2 edition. 235-240.

FORNI-MARTINS, E. R. & MACIAS, L. 2001. Números cromossômicos em espécies de *Manettia* (Rubiaceae). *In*: Resumos do 52º Congresso Nacional de Botânica e XXIV Reunião Nordestina de Botânica. João Pessoa – PB. p. 310.

GOLDBLATT, P. 1981. Index to plant chromosome numbers 1975-1978. V. 5. Missouri Botanical Garden.

GOLDBLATT, P. 1985. Index to plant chromosome numbers 1982-1983. V. 13. Missouri Botanical Garden.

GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E. 1991. Index to plant chromosome numbers 1988-1989. V. 40. Missouri Botanical Garden.

- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E. 1994. Index to plant chromosome numbers 1990-1991. V. 51. Missouri Botanical Garden.
- GUERRA, M. 1983. O uso de Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Ciência e Cultura* 35: 190-193.
- GUERRA, M. 1986. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética* IX 4: 741-743.
- HUZIWARA, Y. 1956. Karyotype analysis in some genera of compositae –I. Karyotype of Japanese *Eupatorium*. *Cytologia* 21: 114-123.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOG, E. A. & STEVENS, P. F. 1999. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates Inc., Sunderland. 363-366.
- KIEHN, M. 1986. Karyosystematische Untersuchungen in Rubiaceae: Chromosomenzählungen aus Afrika, Madagaskar und Mauritius. *Plant Systematics and Evolution* 149: 89-118.
- PIEROZZI, N. I., PINTO-MAGLIO, C. A. F. & CRUZ, N. D. da. 1999. Characterization of somatic chromosome of two diploid species of *Coffea* L. with acetic orcein and C-bands techniques. *Caryologia* 52: 1-8.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F., PIEROZZI, N. I.; CASTRO, S. C. P. & SOARES-SCOTT, M. D. 1997. Números cromossômicos de Rubiaceae de Jundiaí – SP, Estação Experimental de Jundiaí, Instituto Agrônomo de Campinas. *International Organization of Plant Biosystematics* 26-27.
- POUCQUES, M. L. DE. 1949. Becherches caryologiques sur les Rubiales. *In*: DARLINGTON, C. D. & WYLIE, A. P. 1955. *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. University Press Aberdeen. 2 edition. 235-240.
- ROBBRECHT, E. 1988. Tropical Woody Rubiaceae. *Opera Botanica Belgica* 1. 272 p.
- ROBBRECHT, E. 1996. Chromosome of Rubiaceae occurring in Malesia, the Philippines, New Guinea, and the Pacific. *Opera Botanica Belgica* 7: 249-260.

STEBBINS, G. L. 1950. Variation and evolution in plants. New York, Columbia University Press.

5. CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *PSYCHOTRIA* - SUBFAMÍLIA RUBIOIDEAE (RUBIACEAE)

5.1. RESUMO

O gênero *Psychotria* L. é pantropical e provavelmente o maior entre as angiospermas, ocorrendo em diferentes formações vegetacionais, como floresta, campo rupestre e cerrado. Foram estudados do ponto de vista cariotípico, 11 espécies de *Psychotria*, sendo dez delas inéditas. Os números variaram de $2n = 22$, em cinco espécies (*P. hoffmannseggiana* (Willd. ex Roem. & Schult.) Müll. Arg., *P. lupulina* Benth., *P. marginata* Sw., *P. trichophora* Müll. Arg. e *P. tenerior* (Cham.) M. Arg.), $2n = 40$ em *P. mapourioides* DC., a $2n = 44$ em outras cinco espécies (*P. carthagenensis* Jacq., *P. gracilenta* M. Arg., *P. sessilis* (Vell.) M. Arg., *P. suterella* M. Arg. e *P. vellosiana* Benth). Além das diferenças nos números cromossômicos, observou-se grande variação em relação ao tamanho dos mesmos e também na fórmula cariotípica de suas espécies. O tamanho dos cromossomos variou de 5,59 a 0,90 μm , não havendo relação entre o maior número cromossômico com o maior tamanho dos mesmos. Os cromossomos são, em sua maioria, metacêntricos, a exceção de *P. mapourioides*, que apresentou predominância de cromossomos submetacêntricos. A taxa de simetria cariotípica (TF%) variou de moderada (TF% = 38,83) a altamente simétrica (TF% = 50,00). Em *P. gracilenta* e *P. trichophora*, foi possível a visualização e determinação do tamanho de constrição secundária.

5.2. ABSTRACT

The *Psychotria* L. genus is pantropical and probably the greatest among angiosperms, occurring in different vegetal formations, as forests, “Cerrados” and “Campo rupestre”. In this work the chromosome numbers and the karyotypic characteristics of 11 species of *Psychotria* were determined. The chromosome numbers ranged from $2n = 22$, in five species (*P. hoffmannseggiana* (Willd. ex Roem. & Schult.) Müll. Arg., *P. lupulina* Benth., *P. marginata* Sw., *P. tenerior* (Cham.) M. Arg., and *P. trichophora* Müll. Arg.), to $2n = 40$ as observed in *P. mapouriioides* DC., and $2n = 44$ in five other species (*Psychotria carthagenensis* Jacq., *P. gracilentia* M. Arg., *P. sessilis* (Vell.) M. Arg., *P. vellosiana* Benth. and *P. suterella* M. Arg.). In addition to the differences showed in chromosome numbers, a great variation in relation to their length and karyotypic formulae of its species is also observed. The chromosome length varied from 5,59 to 0,90 μm and, for all species, no relation was observed between chromosome numbers and length. The chromosomes are mainly, metacentric, with exception of *P. mapouriioides* that presented mainly submetacentric chromosomes. The karyotypic asymmetry rate (TF%) ranged from moderate (TF% = 38,83) to highly symmetric (TF% = 50,00). In *P. gracilentia* and *P. trichophora* it was possible the visualization and size determination of secondary constrictions.

5.3. INTRODUÇÃO

O gênero *Psychotria* L. um dos maiores entre as angiospermas, compreendendo cerca de 2.000 espécies (DAVIS *et al.*, 2001), apresenta distribuição pantropical, ocupando ambientes variados. No Brasil são encontrados em diferentes formações vegetacionais, como florestas, campo rupestre e cerrado. Pertencendo à tribo Psychotrieae, esse gênero é reconhecido pela combinação das seguintes características: hábito arbustivo ou arbóreo, raramente subarbustivo a herbáceo com estípulas intra ou interpeciolares, quase sempre divididas, raramente inteiras, muitas ráfides e cristais por toda a planta, inflorescências terminais, raramente axilares; pré-floração da corola valvar, raramente imbricada; ovário com dois ou cinco lóculos, com um óvulo ereto em cada lóculo; flores freqüentemente heterostílicas; pólen muito variado, apresentando cinco ou nenhuma abertura e frutos carnosos (ROBBRECHT, 1988).

Esse gênero pode ser considerado como modelo para inferências sobre mecanismos de especiação nos trópicos (HAMILTON, 1989) e para a investigação sobre a evolução de sistemas reprodutivos como o hermafroditismo, a distília e a funcionalidade unissexual das espécies (NEPOKROEFF *et al.*, 1999).

Taxonomicamente o gênero *Psychotria* é bastante complexo, não só devido ao grande número de espécies, mas também à falta de conhecimento da grande variação morfológica de seus caracteres (NEPOKROEFF *et al.*, 1999). Muitas espécies do gênero *Psychotria* são de interesse farmacológico, como *P. carthagenensis* Jacq., que apresenta grandes quantidades de compostos alucinógenos (LOPES *et al.*, 2000).

Estudos filogenéticos baseados nos marcadores *ITS* e *rbcL* na tribo Psychotrieae indicam que *Psychotria* é identificado por caracteres apomórficos, e que constitui um grupo polifilético. A delimitação dos gêneros na tribo Psychotrieae é muito nebulosa, com os limites genéricos entre algumas espécies de *Palicourea* Aubl. e *Psychotria* L. de difícil delimitação (NEPOKROEFF *et al.*, 1999). Já ANDERSSON & ROVA (1999) realizaram um outro trabalho de filogenia molecular da

subfamília Rubioideae, usando o intron *rps 16* como marcador genético, confirmando o polifiletismo do gênero *Psychotria*, estas informações já haviam sido confirmadas também nos trabalhos de TAYLOR (1996), usando dados morfológicos, e no de BREMER (1996), usando dados moleculares com o marcador *rbcL*.

Por ser um dos maiores gêneros dentro da subfamília Rubioideae, a grande diversidade morfológica de seus caracteres e a pouca disponibilidade de poucos relatos de dados cromossômicos para suas espécies, especialmente para as espécies tropicais e subtropicais, levaram a continuidade dos estudos cromossômicos no gênero. Embora esse estudo não permita fazer uma análise citotaxonômica consistente, a análise cariotípica de algumas espécies brasileiras de *Psychotria* juntamente com a morfologia dessas espécies, podem contribuir para um melhor conhecimento sobre o gênero. Assim, o presente estudo objetivou discutir os caracteres cromossômicos em relação aos arranjos infragenéricos vigentes.

5.4. MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1. Espécies estudadas

Foram coletados frutos maduros de 11 espécies pertencentes à tribo Psychotrieae, gênero *Psychotria* (Figuras 1 e 2; Tabela 1) em áreas de Cerrado no estado de São Paulo: Estações Ecológicas e Experimentais de Assis (22°33'S e 50°22'W) e Itirapina (47°49'S e 22°15'W), na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (22°15'S e 47°08'W). Também foram feitas coletas no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – Instituto de Botânica (IBot) em São Paulo, área remanescente de Mata Atlântica (23°38'S e 46°38'W). Algumas espécies foram coletadas numa região de Cerrado em Corumbá (18°59'S e 59°39'W), no estado de Mato Grosso do Sul, próximo ao Pantanal Sul-matogrossense. Para todas as espécies utilizadas foram coletados material testemunho, e a identificação das mesmas foi feita com o auxílio da literatura taxonômica e de especialistas nos grupos. O agrupamento das espécies em subgêneros baseia-se em TAYLOR &

STEYERMARK (2004). Os materiais-testemunho foram depositados no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC).

Tabela 1 – Material testemunho de espécies de *Psychotria* (tribo Psychotrieae) estudadas.

Espécie	Local de coleta	Coletor	Nº de coleta
<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	Assis/ Corumbá	Corrêa & Silva / Zefa	01/19 -
<i>Psychotria gracilenta</i> M. Arg.	Mogi-Guaçu	Corrêa & Silva	01/13
<i>Psychotria hoffmannseggiana</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) Müll. Arg.	Mogi-Guaçu/ Itirapina	Corrêa & Silva	01/12 e 02/52
<i>Psychotria lupulina</i> Benth.	Itirapina	Corrêa & Silva	05/96
<i>Psychotria mapouriioides</i> DC.	Mogi-Guaçu	Corrêa & Silva	01/10
<i>Psychotria marginata</i> Sw.	Corumbá	Zefa	----*
<i>Psychotria sessilis</i> (Vell) M. Arg.	Itirapina	Corrêa & Silva	05/94
<i>Psychotria suterella</i> M. Arg.	Ibot - São Paulo	Forni-Martins	05/13
<i>Psychotria tenerior</i> (Cham.) M. Arg.	Mogi-Guaçu	Corrêa & Silva	01/27
<i>Psychotria trichophora</i> Müll. Arg.	Mogi-Guaçu	Corrêa & Silva	01/11
<i>Psychotria vellosiana</i> Benth.	Assis	Corrêa & Silva	01/28

----* Material ainda não incorporado ao Herbário UEC.



Figura 1 – Caracteres reprodutivos de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) – Tribo Psychotrieae, subgênero *Psychotria*: A – *Psychotria carthagenensis*, frutos; B– *Psychotria mapourioides*, frutos.

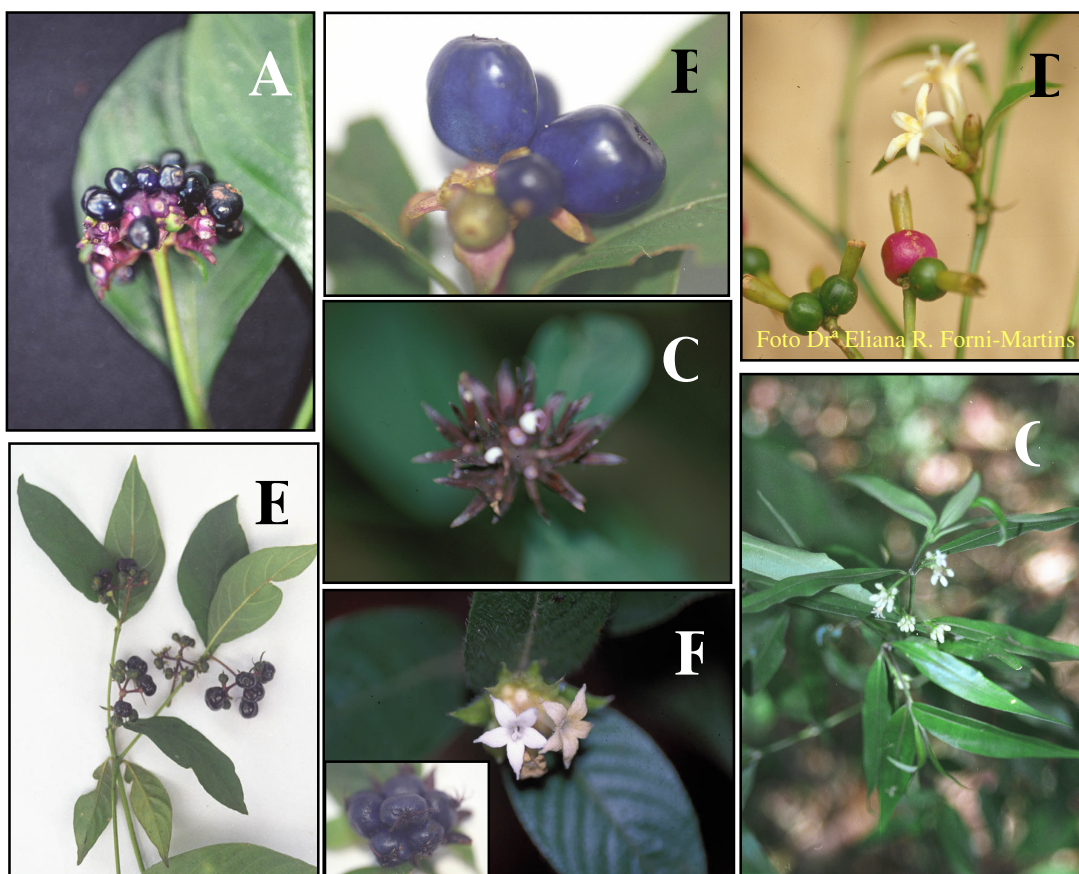


Figura 2 – Caracteres reprodutivos de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) – Tribo Psychotrieae, subgênero *Heteropsychotria*: A – *Psychotria gracilentia*, frutos; B – *P. hoffmannseggiana*, frutos; C – *P. lupulina*, frutos; D – *P. suterella*, flores e frutos; E – *P. tenerior*, frutos; F – *P. trichophora*, inflorescência e frutos; G - *P. vellosiana*, flores.

5.4.2. Germinação das sementes

Os frutos coletados no campo foram imediatamente beneficiados para a obtenção das sementes, que foram lavadas em solução de Hipoclorito de sódio a 5%, para diminuir a proliferação de fungos durante a germinação.

As sementes foram postas a germinar em placas de petri com papel de filtro umedecido com água destilada e mantidas em Câmara Germinadora (Tecnal), sob luz constante e temperatura de 28° C. O tempo para o surgimento da radícula foi de aproximadamente 120 dias (Dados não apresentados).

5.4.3. Pré-tratamento, fixação e armazenamento

As radículas com aproximadamente 1cm de comprimento, de sementes recém-germinadas, foram coletadas e pré-tratadas com soluções de para-diclorobenzeno saturado (p-DB) e 8-hidroxiquinoleína 0,002M (8-Hq) por aproximadamente 5 horas, às temperaturas de 16-18°C e 14-15°C, respectivamente. Posteriormente, foram fixadas em álcool:ácido acético (3:1) por 24 horas, em temperatura ambiente. Depois de fixadas, as raízes foram guardadas em álcool 70%, em freezer a -15°C até o momento de confecção das lâminas.

5.4.4. Coloração de Giemsa (GUERRA, 1983)

Para a coloração convencional de Giemsa, as raízes armazenadas foram lavadas com água destilada e hidrolizadas em HCl 5N por 25 minutos; após uma nova lavagem, o meristema foi separado e fragmentado sobre lâmina, com adição de uma gota de ácido acético 45%. Foi adicionada uma lamínula e o material esmagado. Para a retirada da lamínula foi utilizado nitrogênio líquido. Após secagem, à temperatura ambiente, as lâminas foram mergulhadas em solução de Giemsa 2% por aproximadamente 20 minutos; após, foram lavadas em água corrente, secas e montadas com nova lamínula, usando resina Entellan.

5.4.5. Elaboração de ideogramas

Foram elaborados os ideogramas para as espécies analisadas, utilizando células com bom espalhamento cromossômico e condições adequadas para análise da morfologia dos cromossomos. Para cada espécie, pelo menos 10 células em metáfase mitótica foram desenhadas em câmara clara acoplada a microscópio óptico. Os ideogramas foram elaborados utilizando a média obtida para cada par cromossômico, incluindo o tamanho dos cromossomos, a posição do centrômero e da constrição secundária. A nomenclatura para a morfologia dos cromossomos seguiu GUERRA (1986), tendo por base o respectivo Índice centromérico – IC (divisão do tamanho do braço curto do cromossomo pelo tamanho total do mesmo, multiplicado por 100). Para a caracterização dos ideogramas de cada espécie também foram calculados o Comprimento Total da Cromatina – CTC (soma do tamanho individual de todos os cromossomos), e o Índice de Simetria – TF% do ideograma (soma do comprimento de todos os braços curtos dividido pelo comprimento total de todos os cromossomos do conjunto haplóide) (HUZIWARA, 1956). As células foram fotografadas em Fotomicroscópio Olympus BX51, em filme PB ISO 25 (Imagelink – Kodak) ou ISO 50 (PanF – Ilford).

5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

São apresentados os dados cariotípicos das 11 espécies de *Psychotria*, sendo dez delas inéditas (Tabela 2). Os números variaram de $2n = 22$, em cinco espécies (*Psychotria hoffmannseggiana* (Willd. ex Roem. & Schult.) Müll. Arg., *P. lupulina* Benth., *P. marginata* Sw., *P. trichophora* Müll. Arg. e *P. tenerior* (Cham.) M. Arg.), $2n = 40$ em *P. mapourioides* DC., e $2n = 44$ em outras cinco espécies (*Psychotria carthagenensis* Jacq., *P. gracilentia* M. Arg., *P. sessilis* (Vell.) M. Arg., *P. suterella* M. Arg. e *P. vellosiana* Benth.) (Figuras 3 e 4). Esses resultados são uma importante contribuição ao conhecimento desse gênero, já que não existem muitos registros cariotípicos para *Psychotria* ou para as Rubiaceae em geral (KIEHN, 1986).

Além das diferenças nos números cromossômicos, observa-se grande variação em relação ao tamanho dos mesmos e também na fórmula cariotípica de suas espécies (Tabela 2; Figuras 3,4,5 e 6). O comprimento dos cromossomos variou de 5,59 a 0,90 μm , ficando em média entre 3,45 e 1,76 μm , não havendo relação entre o maior número cromossômico com o maior ou menor tamanho dos mesmos (Tabela 2). Os cromossomos são em sua maioria, metacêntricos, a exceção de *P. mapourioides*, sendo os ideogramas moderados (TF% = 38,83) a altamente (TF% = 50,00) simétricos.

Tabela 2 – Números cromossômicos e características cariotípicas de espécies de *Psychotria* – Rubioideae (Rubiaceae).

Subgênero	Espécie	2n	Comprimento cromossômico (μm)	Satélite (μm)	CTC (μm)	TF %	Fórmula cariotípica
<i>Psychotria</i>	<i>Psychotria carthagenensis</i>	44*	1,85 – 1,09		62,92	44,29	22m
	<i>Psychotria mapourioides</i>	40*	5,59 – 2,48		151,97	38,83	6m+14sm
	<i>Psychotria marginata</i>	22*	3,75 – 2,16		63,27	43,82	11m
<i>Heteropsychotria</i>	<i>Psychotria gracilentia</i>	44*	5,29 – 2,28	0,63	152,23	50,00	22m/1sat
	<i>Psychotria hoffmannseggiana</i>	22	5,08 – 2,63		81,75	42,07	9m+2sm
	<i>Psychotria lupulina</i>	22*	4,75 – 2,20		75,20	41,73	7m+4sm
	<i>Psychotria sessilis</i>	44*	1,73 – 1,00		58,55	43,03	22m
	<i>Psychotria suterella</i>	44*	1,64 – 0,90		54,69	43,51	22m
	<i>Psychotria tenerior</i>	22*	3,69 – 1,80		58,66	42,09	10m+1sm
	<i>Psychotria trichophora</i>	22*	3,42 – 1,95	0,67	58,70	45,65	11m/1sat
	<i>Psychotria vellosiana</i>	44*	1,56 – 0,93		55,86	47,86	22m

*Contagens inéditas para a espécie. CTC = comprimento total da cromatina, TF% = simetria cariotípica, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico e sat = satélite.

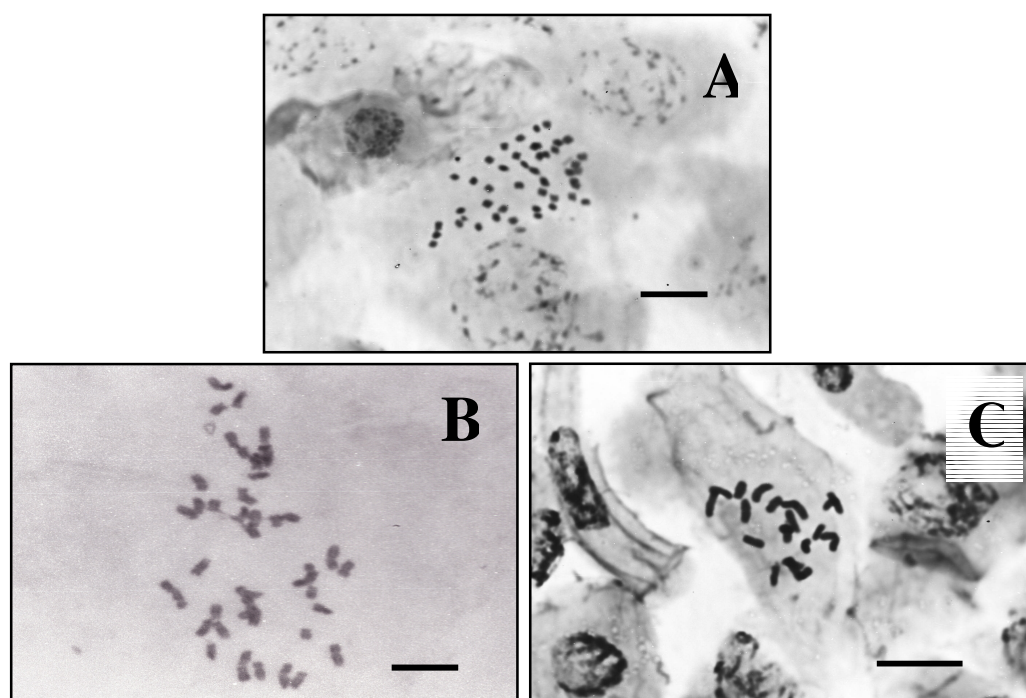


Figura 3 – Cromossomos de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) – Tribo Psychotieae, subgênero *Psychotria* : A – *Psychotria carthagenensis*, $2n = 44$; B – *P. mapourioides*, $2n = 40$; C - *P. marginata*, $2n = 22$. Barra = 10 μm

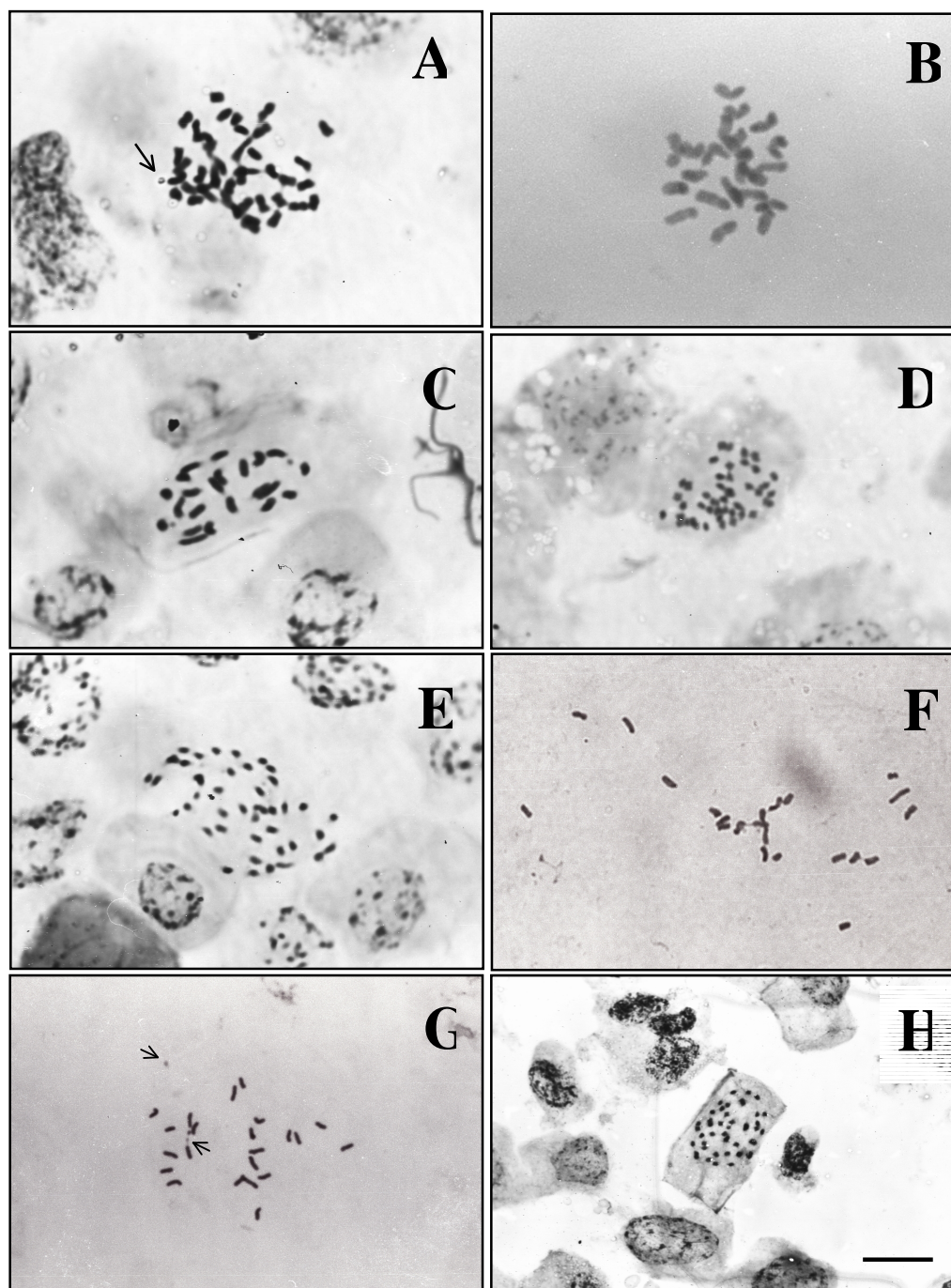


Figura 4 – Cromossomos de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) – Tribo Psychotieae, subgênero *Heteropsychotria*: A – *Psychotria gracilentia*, $2n = 44$; B – *P. hoffmannseggiana*, $2n = 22$; C – *P. lupulina*, $2n = 22$; D – *P. sessilis*, $2n = 44$; E – *P. suterella*, $2n = 44$; F – *P. tenerior*, $2n = 22$; G – *P. trichophora*, $2n = 22$; H – *P. vellosiana*, $2n = 44$. Seta = Satélite Barra = 10 μm

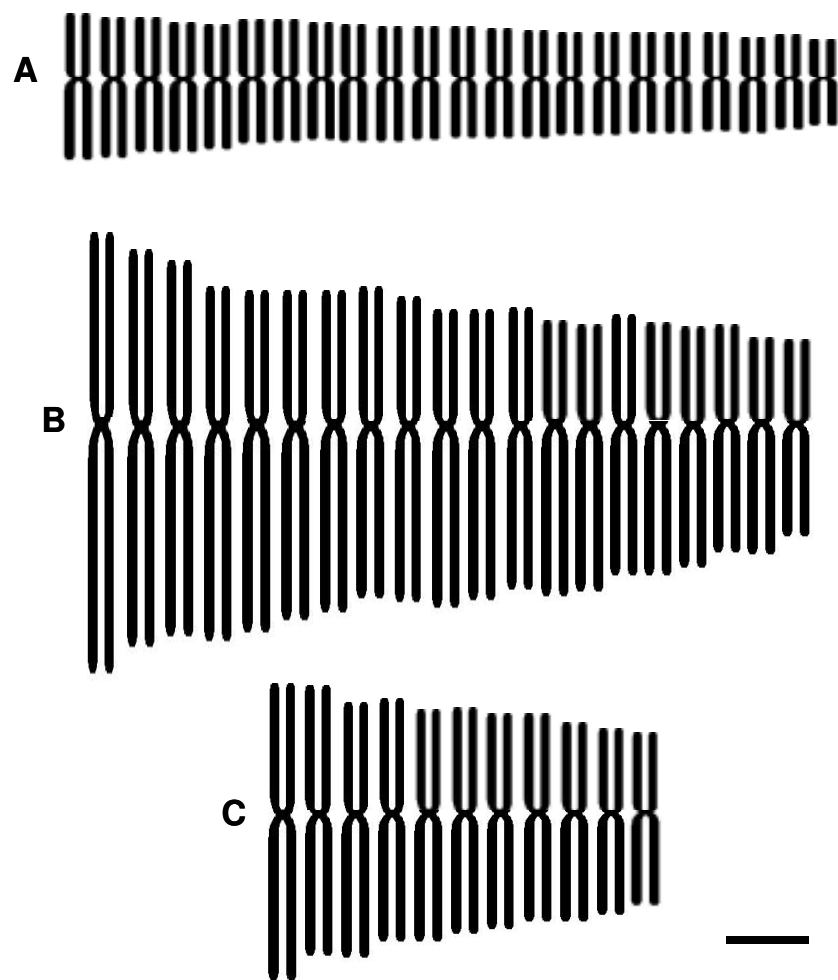


Figura 5 – Ideogramas das espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) – Tribo Psychotrieae, subgênero *Psychotria*: A – *Psychotria carthagenensis*; B – *P. mapourioides*; C – *P. marginata*., Barra = 1 μ m

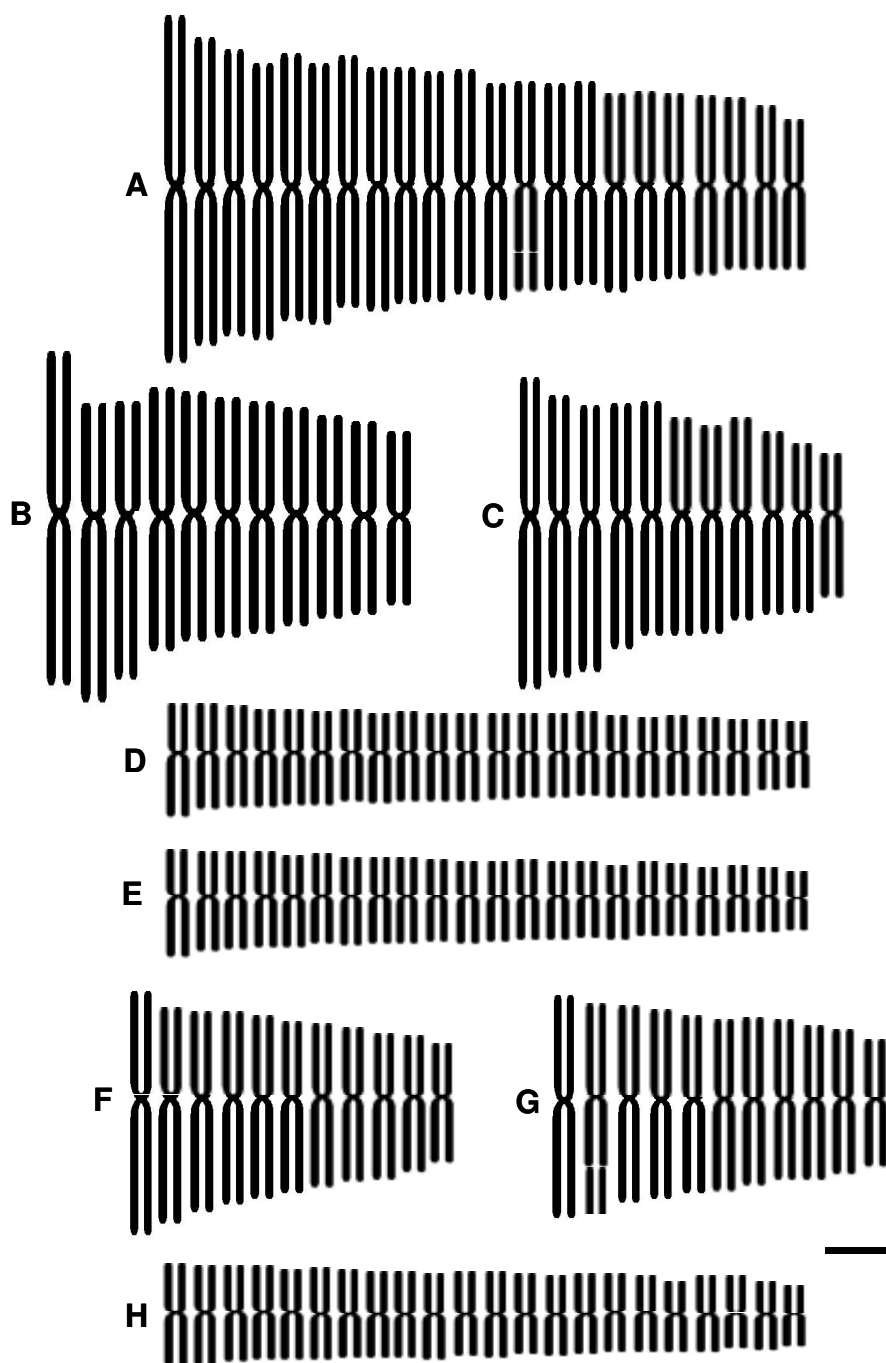


Figura 6 – Ideogramas das espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) – Tribo Psychotrieae, subgênero *Heteropsychotria*: A – *Psychotria gracilentia*; B – *P. hoffmannseggiana*; C – *P. lupulina*; D – *P. sessilis*; E - *P. suterella*; F - *P. tenerior*; G – *P. trichophora*; H - *P. vellosiana*. Barra = 1µm

As espécies com os maiores números cromossômicos ($2n = 40$ e 44) apresentaram-se bem diferenciadas quanto ao tamanho e à morfologia cromossômica (Figuras 3, 4, 5 e 6). Nestas espécies foram observadas desde os maiores cromossomos (Figuras 3B, 5B e 4A, 6A) e maior CTC (*P. gracilenta* e *P. mapourioides*, com 152,23 e 151,97 μm , respectivamente) até os menores cromossomos (Figuras 4D, 4E e 4H) e menor CTC (*P. suterella*, *P. vellosiana* e *P. sessilis*, com 54, 69, 55,86 e 58,55 μm). Além destas três espécies, *P. carthagenensis* ($2n = 44$) (Figura 3A), exibiu CTC intermediário (62,92 μm) por apresentar também cromossomos menores que algumas espécies com $2n = 22$. Assim, apesar de possuírem o dobro de cromossomos, o CTC dessas espécies com cromossomos pequenos é menor ou equivalente ao de três das espécies com $2n = 22$, *P. marginata*, *P. trichophora* e *P. tenerior* (63, 27, 58,70 e 58,66 μm , respectivamente). Dentre as espécies com $2n = 22$, duas se destacaram pelos seus maiores cromossomos (Figuras 4B e 4C), *P. hoffmannseggiana* (5,08 a 2,63 μm) e *P. lupulina* (4,75 a 2,20 μm), com CTC igual a 81,75 e 75,20 μm , respectivamente.

O gênero *Psychotria* apresenta muitos números cromossômicos diferentes, variando de $n = 11, 12, 17, 22$ e 34 (CORRÊA & FORNI-MARTINS, 2004; GOLDBLATT, 1985 e GOLDBLATT & JOHNSON, 1991 e 1994) e $2n = 22, 32, 40, 44, 88$ e 132 (BOLKHOVSKIKH *et al.*, 1969; CORRÊA & FORNI-MARTINS, 2004; GOLDBLATT, 1981; GOLDBLATT & JOHNSON, 1994; KIEHN, 1986; ROBBRECHT *et al.*, 1996 e PINTO-MAGLIO *et al.*, 1997), sendo um dos mais variáveis no que se refere ao número cromossômico. Portanto, os números encontrados estão de acordo com os já descritos para o gênero, e até mesmo a tribo Psychotrieae. O número básico do gênero também é variado, com menções de $x = 8, 11, 14, 17$ e 20 (ROBBRECHT, 1988) (Tabela 3).

Tabela 3 – Números cromossômicos de espécies de *Psychotria* – Rubioideae (Rubiaceae), segundo a literatura disponível.

Tribo	Espécie	n	2n	Referências bibliográficas
Psychotrieae	<i>Psychotria sp</i>		40	Lewis, W. H., 1966 <i>in</i> 2
	<i>Psychotria africana</i>		44	Fagerlind, F., 1937 <i>in</i> 2
	<i>Psychotria bacteriophila</i>		22	
	<i>Psychotria brasiliensis</i>		22	
	<i>Psychotria emetica</i>		22	
	<i>Psychotria hirtella</i>		22	
	<i>Psychotria undulata</i>		22	
	<i>Psychotria andamanica</i>	34		Lewis, W. H., 1966 <i>in</i> 2
	<i>Psychotria kurzii</i>	12		
	<i>Psychotria pendulata</i>	17		
	<i>Psychotria platyneura</i>	17		
	<i>Psychotria bisulcata</i>	11		Bir, S. S. <i>et al.</i> , 1982 <i>in</i> 7
	<i>Psychotria elongata</i>	22		
	<i>Psychotria bisulcata</i>	22		Bir, S. S. <i>et al.</i> , 1987 <i>in</i> 11
	<i>Psychotria congesta</i>	22		
	<i>Psychotria johnsonii</i>	22		
	<i>Psychotria truncata</i>	22		
	<i>Psychotria boninensis</i>	22		Ono, M., 1977 <i>in</i> 5
	<i>Psychotria brachyantha</i>		22	Mangenot, S. <i>et al.</i> , 1962 <i>in</i> 2
	<i>Psychotria calva</i>		22	
	<i>Psychotria corallifera</i>		22	
	<i>Psychotria hallei</i>		22	
	<i>Psychotria rufipilis</i>		22	
	<i>Psychotria selacea</i>		22	
	<i>Psychotria sodifera</i>		22	
	<i>Psychotria vogeliana</i>		44	
	<i>Psychotria capensis</i>	22		Kiehn, 1986
	<i>Psychotria kirkii</i>		22	
	<i>Psychotria mahonii</i>		132	
	<i>Psychotria orophila</i>		88	
	<i>Psychotria peduncularis</i>		22	
	<i>Psychotria congesta</i>		44	Chatha, G. S. <i>et al.</i> , 1987 <i>in</i> 10
	<i>Psychotria connata</i>	22		Philip, K. O. <i>et al.</i> , 1988 <i>in</i> 10
	<i>Psychotria flavida</i>	22		
	<i>Psychotria globicephala</i>	22		
	<i>Psychotria nudiflora</i>	22		
	<i>Psychotria subintegra</i>	11		
	<i>Psychotria curvifolia</i>	22		Philip, O. <i>et al.</i> , 1975 <i>in</i> 5
	<i>Psychotria forsteriana</i>		40/44	Robbrecht, 1996
	<i>Psychotria gardneri</i>		40/44	Kiehn, 1986
	<i>Psychotria sohmeri</i>		44	
	<i>Psychotria zeylanica</i>		40/44	
	<i>Psychotria globosa</i>		44	Gadella, T. W. J., 1977 <i>in</i> 5
	<i>Psychotria hoffmannseggiana</i>		22	Pinto-Maglio <i>et al.</i> , 1997
	<i>Psychotria ligustrifolia</i>		22	Lewis, W. H., 1962 <i>in</i> 2
	<i>Psychotria nairobiensis</i>		22	
	<i>Psychotria undata</i>		22	

Psychotrieae	<i>Psychotria nudiflora</i>		22	Selvaraj, R. <i>et al.</i> , 1985 in 9
	<i>Psychotria rubra</i>	11	22	Hsu, C. -C., 1967 in 3
	<i>Psychotria rubra</i>		44	Huang, S. -F. <i>et al.</i> , 1986 in 9
	<i>Psychotria serpens</i>		22	Hsu, C. -C., 1967 in 3
	<i>Psychotria sciadephora</i>	11		Gill, L. S. <i>et al.</i> , 1991 in 12
	<i>Psychotria subobliqua</i>	11		
	<i>Psychotria vogeliana</i>	11		
	<i>Psychotria swynnertonii</i>	11		Gill, L. S., 1978 in 5
	<i>Psychotria warneckei</i>		22	Baker, H. G., 1958 in 2
	<i>Psychotria deflexa</i>		32	Corrêa & Forni-Martins, 2004
	<i>Psychotria hoffmannseggiana</i>		22	Corrêa & Forni-Martins, 2004

2 – BOLKHOVSKIKH *et al.*, 1969
3 – MOORE, 1973
5 – GOLDBLATT, 1981
7 – GOLDBLATT, 1985

9 – GOLDBLATT & JOHNSON, 1990
10 – GOLDBLATT & JOHNSON, 1991
11 – GOLDBLATT & JOHNSON, 1994

Para a espécie *Psychotria hoffmannseggiana*, em uma nova população avaliada, foram observados dois pares de cromossomos submetacêntricos, portanto um a mais do já registrado por CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004) (Figuras 5B e 8B). Essa diferença na proporção de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos pode ser devido a algum efeito de técnica, como a condensação diferencial dos cromossomos durante o tratamento para inibição do ciclo celular. O índice centromérico (IC) do par cromossômico que apresentou a diferença morfológica foi de 40,60 e 38, 20, nas populações amostradas no primeiro e no atual estudo, respectivamente (Figuras 5B e 8B). Assim, esses índices centroméricos estão muito próximos aos valores de transição, na classificação morfológica proposta por GUERRA (1986), entre metacêntrico (de 50,0 a 40,1) e submetacêntrico (de 40,0 a 25,1). O TF% (42,07) e principalmente o CTC (81,75 µm), não apresentaram diferenças significativas em relação ao estudo anterior (CORRÊA & FORNI-MARTINS, 2004), reforçando o último fator apresentado para explicar a diferença de morfologia de um par cromossômico.

Dentre as 11 espécies estudadas, sete apresentaram cromossomos exclusivamente metacêntricos e os ideogramas mais simétricos, com TF% variando de 43,03 em *Psychotria sessilis* a 50,0 em *P. gracilenta*. Quatro espécies apresentaram também cromossomos submetacêntricos,

variando de um par em *P. tenerior* (TF% = 42,09) a 14 pares em *P. mapourioides* (TF% = 38,83), que apresentou o ideograma mais assimétrico (Figuras 5 e 6).

Psychotria gracilenta e *P. trichophora* (Figuras 6A e 6G) apresentaram, cada uma, um par de cromossomos com constrição secundária, ambas no braço longo de um dos cromossomos metacêntricos. A localização da constrição secundária nestas espécies é equivalente à descrita em espécies de *Coffea* por PIEROZZI *et al.* (1999). Constrições secundárias não foram observadas nas demais espécies de *Psychotria* estudadas, em função da técnica de coloração convencional, inespecífica para identificação de regiões organizadoras de nucléolo.

O gênero *Psychotria* foi subdividido em três subgêneros (subgêneros *Psychotria*, *Tetramerae* e *Heteropsychotria*) por PETIT (1964, 1966) e Steyermark (1972 *apud* NEPOKROEFF *et al.* 1999), com base em caracteres morfológicos e distribuição geográfica. As espécies apresentadas nesse estudo foram identificadas de acordo com essa subdivisão.

Nos trópicos são encontrados representantes dos subgêneros *Psychotria* e *Heteropsychotria*. Na amostragem desse estudo encontramos três espécies pertencentes ao subgênero *Psychotria* (*P. carthagenensis*, *P. mapourioides* e *P. marginata*) e oito espécies pertencentes ao subgênero *Heteropsychotria* (*P. gracilenta*, *P. hoffmannseggiana*, *P. lupulina*, *P. sessilis*, *P. suterella*, *P. tenerior*, *P. trichophora* e *P. vellosiana*) (BERRY *et al.*, 2004).

No subgênero *Psychotria*, duas espécies apresentaram números cromossômicos próximos, $2n = 44$ em *Psychotria carthagenensis* e $2n = 40$ em *P. mapourioides*; no entanto, seus tamanhos variaram de 1,85 – 1,09 μm a 5,59 – 2,48 μm , respectivamente, não se mostrando uma característica que auxilie na separação dos grupos. A espécie *P. carthagenensis* (TF% 44,29) tem todos seus pares cromossômicos metacêntricos, enquanto *P. mapourioides* apresentou a fórmula cariotípica mais assimétrica desse estudo, com a maioria de seus pares cromossômicos submetacêntricos (TF% = 38,83). No entanto, a diferença no número cromossômico é de grande valia para a taxonomia dessas espécies, pois os taxonomistas encontram muita dificuldade na identificação e diferenciação das

duas espécies quando utilizam apenas características morfológicas, havendo indivíduos com características intermediárias entre essas duas espécies (Mendaçolli, S.L.J. - Comunicação pessoal, 2007). Essa informação é de grande relevância e fortalece a necessidade de maiores relações entre estudos taxonômicos e citogenéticos, dando ênfase a trabalhos citotaxonômicos.

A outra espécie apresentada, *P. marginata*, $2n = 22$, têm todos os pares cromossômicos metacêntricos (TF% 43,82), apesar da menor quantidade de cromossomos, seus tamanhos são intermediários aos das outras duas espécies, $3,75 - 2,16\mu\text{m}$, apresentando um CTC (63,27) muito próximo ao da *P. carthagenensis* (62,92), que tem o dobro do número cromossômico (Tabela 2, Figura 4).

CORRÊA E FORNI-MARTINS (2004) apresentaram o ideograma de outra espécie do subgênero *Psychotria*, *P. deflexa* DC. ($2n = 32$), onde os cromossomos são muito grandes ($7,33 - 2,77\mu\text{m}$), sendo a maioria submetacêntricos, levando a um ideograma assimétrico (TF% = 40,06). Portanto, parece não haver um padrão cariotípico para as espécies enquadradas no subgênero *Psychotria* (Tabela 2, Figuras 3 e 5).

No subgênero *Heteropsychotria*, encontramos espécies com números cromossômicos variados, sempre múltiplos de 11 ($2n = 22$, *Psychotria hoffmannseggiana*, *P. lupulina*, *P. tenerior* e *P. trichophora* e $2n = 44$, *P. gracilentia*, *P. sessilis*, *P. suterella* e *P. vellosiana*),. Seus tamanhos cromossômicos e posição centromérica também foram bem variados (Tabela 2, Figuras 4 e 6), o que indica que nesse subgênero também não há um padrão cariotípico característico, de forma idêntica ao inferido para o subgênero *Psychotria*.

Assim, a caracterização cariotípica para as espécies aqui apresentadas baseada em técnicas de coloração convencional, não forneceu subsídios para apoiar a divisão subgenérica proposta para *Psychotria* por PETIT (1964, 1966) e por Steyermark (1972 *apud* NEPOKROEFF *et al.* 1999). Estudos filogenéticos têm indicado uma reorganização do gênero e também da tribo Psychotrieae

(NEPOKROEFF *et al.*, 1999; ANDERSSON & ROVA, 1999 e BREMER & MANEN, 2000) possibilitando outras abordagens para sua respectiva circunscrição. Infelizmente, até o momento, não é possível comparar os dados cariotípicos com os agrupamentos propostos pelos estudos filogenéticos, pois poucas espécies de *Psychotria* foram usadas na confecção dos cladogramas. Além disso, muitas delas não têm ocorrência nos trópicos, não coincidindo com a amostragem cromossômica apresentada nesse estudo.

O gênero *Palicourea*, que apresenta uma grande proximidade taxonômica com *Psychotria*, foi apresentado no capítulo anterior com três espécies (*Palicourea croceoides* Ham., *P. marcgravii* St. Hil. e *P. rigida* H. B. K.) e apresentou o mesmo número cromossômico para todas as espécies, $2n = 22$. O número cromossômico e as características cariotípicas dos mesmos são muito semelhantes com a maioria das espécies de *Psychotria* aqui apresentadas, contribuindo ainda mais para a proximidade taxonômica entre os dois grupos, apesar da pequena quantidade de espécies estudadas, em se tratando de gêneros tão numerosos.

5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, L. & ROVA, J. H. E.; 1999. The *rps16* intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 214: 161-186.

BERRY, P. E.; YATSKIEVYCH, K. & HOLST, B. K. 2004. Flora of the Venezuelan Guayana. Volume 8. Poaceae – Rubiaceae. 497 – 775.

BOLKHOVSKIKH, Z.; GRIF, V.; MATVEJEVA, T. & ZAKARYEVA, O. 1969. Chromosome numbers of flowering plants. Leningrad, Academy of Sciences of the USSR. 926p.

BREMER, B. 1996. Combined and separate analyses of morphological and molecular data in the plant family Rubiaceae. *Cladistics* 12: 21-40.

BREMER, B. & MANEN, J. F. 2000. Phylogeny and classification of the subfamily Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Sys. And Evolution* 225: 43 – 72.

CORRÊA, A. M. & FORNI-MARTINS, E. R.; 2004. Estudos cromossômicos em espécies de Rubiaceae (A. L. de Jussieu) de Cerrado. *Caryologia* 57 (3): 250 – 258.

DAVIS, A. P.; BRIDSON, D.; JARVIS, C. & GOVAERTS, R. 2001. The typification and characterizations of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). *Bot. J. Linnean Society* 135: 35 – 42.

GOLDBLATT, P., 1981. Index to plant chromosome numbers 1975-1978. V. 5. Missouri Botanical Garden.

GOLDBLATT, P., 1985. Index to plant chromosome numbers 1982-1983. V. 13. Missouri Botanical Garden.

GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E., 1990. Index to plant chromosome numbers 1986-1987. V. 30. Missouri Botanical Garden.

GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E., 1991. Index to plant chromosome numbers 1988-1989. V. 40. Missouri Botanical Garden.

GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E., 1994. Index to plant chromosome numbers 1990-1991. V. 51. Missouri Botanical Garden.

GUERRA, M. 1983. O uso de Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Ciência e Cultura* 35: 190-193.

GUERRA, M. 1986. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética* IX 4: 741-743.

HAMILTON, C. W. 1989. A revision of Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). Introductions and species 1 – 61. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76: 67 – 916.

HUZIWARA, Y. 1956. Karyotype analysis in some genera of compositae –I. Karyotype of Japanese *Eupatorium*. *Cytologia* 21, 114-123.

KIEHN, M. 1986. Karyosystematische Untersuchungen in Rubiaceae: Chromosomenzählungen aus Afrika, Madagaskar und Mauritius. *Plant Systematics and Evolution* 149: 89-118.

LOPES, S. A.; MORENO, P. R. H. & HENRIQUES, A. T. 2000. Growth characteristics and chemical analysis of *Psychotria carthagenensis* cell suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 259 – 264.

NEPOKROEFF, M., BREMER, B. & SYSTMA, K. J.; 1999. Reorganization of the genus *Psychotria* and the tribe Psychotieae (Rubiaceae) inferred from *ITS* and *rbcL* sequence data. *Systematic Botany* 24: 5-27.

PETIT, E.1964. Les espèces africaines du genre *Psychotria* L. (Rubiaceae) – I. *Bulletin du Jardin Botanique de l'État* 34: 1-229.

PETIT, E.1966. Les espèces africaines du genre *Psychotria* L. (Rubiaceae) – II. *Bulletin du Jardin Botanique de l'État* 36: 65-190.

PIEROZZI, N. I.; PINTO-MAGLIO, C. A. F. & CRUZ, N. D. da. 1999. Characterization of somatic chromosome of two diploid species of *Coffea* L. with acetic orcein and C-bands techniques. *Caryologia* 52: 1-8.

- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; PIEROZZI, N. I.; CASTRO, S. C. P. & SOARES-SCOTT, M. D. 1997. Números cromossômicos de Rubiaceae de Jundiaí – SP, Estação Experimental de Jundiaí, Instituto Agrônomo de Campinas. International Organization of Plant Biosystematics 26/27.
- ROBBRECHT, E. 1988. Tropical Woody Rubiaceae. Opera Botanica Belgica 1. 272 p.
- ROBBRECHT, E. 1996. Chromosome of Rubiaceae occurring in Malesia, the Philippines, New Guinea, and the Pacific. Opera Botanica Belgica 7: 249-260.
- TAYLOR, C. M. 1996. Overview of the Psychotrieae (Rubiaceae) in the Netropics. Opera Bot. Belgica 7: 261 – 270.
- TAYLOR, C. M. & STEYERMARK, J. A. 2004. Flora of the Venezuelan Guayana. Missouri Botanical Garden Press – St. Louis. Volume 8 – Poaceae-Rubiaceae. 497-775.

6. CAPÍTULO 3

**HIBRIDAÇÃO *in situ* de sítios de DNAr 45S, NA TRIBO *PSYCHOTRIEAE* – RUBIOIDEAE
– RUBIACEAE**

6.1. RESUMO

Já estudadas do ponto de vista cariotípico, algumas espécies da subfamília Rubioideae foram submetidas à hibridação *in situ*, com DNAr 45S, uma espécie de *Palicourea*, seis espécies de *Psychotria* e uma espécie de *Rudgea*, com números cromossômicos variados, $2n = 22$, em *Palicourea marcgravii* St. Hil. e em três espécies de *Psychotria* (*P. hoffmannseggiana* (Willd. ex Roem. & Schult.) Müll. Arg., *P. tenerior* (Cham.) M. Arg. e *P. trichophora* Müll. Arg.), $2n = 32$ em *Psychotria deflexa* DC. e $2n = 44$ em outras duas espécies de *Psychotria* (*P. carthagenensis* Jacq. e *P. vellosiana* Benth) e ainda em *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. A família Rubiaceae, apesar de ser uma das maiores entre as Angiospermas, não apresenta muitos estudos cromossômicos, especialmente com técnicas de diferenciação longitudinal dos mesmos. Para espécies nativas, aqui são apresentados resultados inéditos, utilizando a técnica de hibridação *in situ* com sequência de DNAr 45S. O número de pares de sítios de DNAr 45S foi variável, assim como o número cromossômico das espécies. No entanto, não se observou relação entre o número de sítios e o nível de ploidia das espécies.

6.2. ABSTRACT

Already studied of the karyotype point of view, some species of the subfamily Rubioideae had been submitted to the *in situ* hybridization, with DNAr 45S, one specie of *Palicourea*, six species of *Psychotria* and one specie of *Rudgea*, with varied chromosome numbers, $2n = 22$, in *Palicourea marcgravii* St. Hil. and in three species of *Psychotria* (*P. hoffmannseggiana* (Willd. ex Roem. & Schult.) Müll. Arg., *P. tenerior* (Cham.) M. Arg. and *P. trichophora* Müll. Arg.), $2n = 32$ in *Psychotria deflexa* DC. and $2n = 44$ in others two species of *Psychotria* (*P. carthagenensis* Jacq. and *P. vellosiana* Benth) and in *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Although Rubiaceae represent one of the largest families amongst angiosperms there are fewer cytotaxonomic studies in the family, especially regarding longitudinal differentiation (hybridization *in situ*) are applied. In this work we are showing new data applying the hybridization *in situ* technique using an 45S rDNA sequence in eight species of Rubiaceae belonging to the subfamily Rubioideae – tribe Psychotrieae. The numbers of 45S rDNA sites in the chromosome as well as the chromosome numbers were variable between species. In addition no one relation between the signal pairs and the ploidy level of species was observed.

6.3. INTRODUÇÃO

A família Rubiaceae (A. L. de Jussieu) com cerca de 637 gêneros e aproximadamente 10.700 espécies, é a quarta maior dentre as angiospermas (ROBBRECHT, 1988). O reconhecimento taxonômico de suas espécies é complexo, devido à diversidade morfológica e grande riqueza específica (CASTRO *et al.*, 1999). Além disso, de acordo com BREMER (1996), a família Rubiaceae também apresenta problemas na delimitação de subfamílias e tribos.

No Brasil, os estudos cromossômicos na família estão concentrados no gênero exótico *Coffea* L., com muitos resultados de caracterização cariotípica mediante a análise de cromossomos mitóticos (KRUG, 1934) e meióticos em paquíteno (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1988), com coloração convencional. Há também estudos cariotípicos utilizando técnicas de bandamentos convencionais (PIEROZZI *et al.*, 1999) e fluorocromos (PINTO-MAGLIO *et al.*, 2000). Técnicas de hibridação *in situ*, também foram utilizadas para identificar os progenitores da espécie *Coffea arabica* L. (RAINA *et al.*, 1998), também em *Coffea*, existem trabalhos combinando as técnicas de bandamentos com fluorocromos e hibridação *in situ* (LOMBELLO & PINTO-MAGLIO, 2004a, b, c), além de estudos com marcadores moleculares (ANTHONY *et al.*, 2001).

Com relação às espécies de Rubiaceae nativas, informações sobre cromossomos, são bastante escassas e encontradas de forma dispersa na literatura, sendo obtidas apenas com técnicas de coloração convencional e bandamento C, como em *Genipa* L. (PIEROZZI & MENDAÇOLLI, 1997) e *Alibertia* A. Rich. Ex DC. (FORNI-MARTINS & MARTINS, 2000). O trabalho mais recente, realizado por CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004) aborda o maior número de espécies de Rubiaceae de Cerrado, incluindo o número cromossômico e o cariótipo de quatorze espécies, sendo seis pertencentes à subfamília Ixoroideae e oito à subfamília Rubioideae. Nesse estudo, são apresentados dados inéditos de contagens cromossômicas e cariótipos para outras 17 espécies de Rubiaceae, subfamília Rubioideae, contribuindo muito para o conhecimento dessa família, sendo

dez espécies, com caracterização cariotípica convencional inéditas, pertencentes ao gênero *Psychotria*, o maior dentro de Rubiaceae.

Dentro da subfamília Rubioideae, composta por 16 ou 18 tribos, de acordo com o autor considerado, sendo oito delas presentes em regiões tropicais e no Brasil (JUDD *et al.*, 1999), encontramos gêneros bastante complexos quanto à identificação taxonômica e posicionamento dentro dos grupos a que pertencem, como é o caso da tribo Psychotrieae.

Na tribo Psychotrieae, *Psychotria* é o gênero mais complexo taxonomicamente não só devido ao grande número de espécies, cerca de 2.000, segundo DAVIS *et al.* (2001), mas também ao pequeno conhecimento da grande variação morfológica de seus caracteres (NEPOKROEFF *et al.*, 1999). A grande diversidade morfológica de seus caracteres e a disponibilidade de poucos relatos de dados cromossômicos (Anexo 1), especialmente para as espécies tropicais e subtropicais, ainda não permite uma análise citotaxonômica. Nesse estudo (Capítulos 1 e 2) são apresentados resultados para 19 espécies de Rubiaceae – Rubioideae, por caracterização cariotípica convencional. As espécies apresentadas pertencem a quatro tribos, e sete gêneros. Para a tribo Psychotrieae são apresentados dados para quatro gêneros, sendo 11 espécies de *Psychotria*, três de *Palicourea*, uma de *Rudgea* e uma de *Decleuxia* H. B. K.

A diferenciação longitudinal dos cromossomos, obtida por técnicas de bandamento cromossômico ou de citogenética molecular, tem trazido nova perspectiva na caracterização cariotípica (PINTO-MAGLIO *et al.*, 2000) e, portanto, para a citotaxonomia em geral. As técnicas de bandamento podem ser clássicas (C, AgNOR) ou empregar fluorocromos (CMA₃/DAPI), enquanto que na citogenética molecular vêm sendo aplicadas técnicas de hibridação *in situ* com fluorescência, envolvendo determinadas seqüências gênicas (FISH - fluorescent *in situ* hybridization) ou genomas inteiros (GISH - genomic *in situ* hybridization). Todas essas técnicas podem constituir-se em um valioso marcador citológico para a identificação cromossômica.

O estudo cariotípico, incluindo procedimentos como bandamentos C, bandamentos com fluorocromos (CMA₃/DA/DAPI) e a hibridação *in situ*, tem sido importantes para a indicação de possíveis origens híbridas e o posicionamento taxonômico de espécies.

A hibridação *in situ* utilizando DNAr, tem sido utilizada em diversos grupos vegetais. Um estudo realizado com *Vicia amoena* Fischer ex Ser. (Fabaceae), LI *et al.* (2001), utilizando hibridação *in situ* DNAr 45S e 5S na espécie tetraplóide *V. amoena* var. *amoena* e seus possíveis parentais diplóides (*V. amoena* var. *sericea* Kitag., *V. pseudorubus*, *V. dumetorum*, *V. pisiformis* e *V. cracca*), concluíram que a variedade não representava um autotetraplóide, mas sim um alotetraplóide, derivado de *V. amoena* var. *sericea*. Também através da hibridação *in situ* para DNAr 45S e DNAr 5S, TAGASHIRA & KONDO (2001) puderam observar que a evolução cromossômica em *Zamia* L. e *Ceratozamia mexicana* Brongn, com números cromossômicos 2n=16, provavelmente se deu por inversão pericêntrica e translocação desigual.

Através da utilização conjunta dos bandamentos C e com fluorocromos, do bandamento com AgNOR e hibridação *in situ* DNAr 45S, RAN *et al.* (1999) identificaram e diferenciaram os cariótipos de quatro espécies de *Clivia* Lindl. (Amaryllidaceae), que se apresentaram extremamente similares através das técnicas de coloração convencional, com 2n=22 cromossomos, sendo quatro pares metacêntricos e sete pares submetacêntricos. Mais recentemente, FREGONEZI (2006) diferenciou quatro espécies de *Cestrum* L. (Solanaceae), utilizando diversas técnicas de mapeamento físico para variadas regiões do DNA das espécies.

O presente estudo objetivou a caracterização cariotípica de algumas espécies de Rubiaceae – subfamília Rubioideae – tribo Psychotrieae. Para tanto, foram iniciados ensaios com FISH (DNAr 45S) em seis espécies de *Psychotria*, sendo uma do subgênero *Psychotria* e as outras cinco do subgênero *Heteropsychotria*, além de uma espécie do gênero *Palicourea* e uma do gênero *Rudgea*. A caracterização cariotípica convencional dessas espécies são apresentadas nos capítulos 1 e 2 desse estudo e no trabalho já publicado por CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004).

6.4. MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1. Espécies estudadas

Os experimentos de hibridação *in situ*, para a sequência DNAr 45S foram realizados nas espécies pertencentes à tribo Psychotrieae, gêneros *Palicourea*, *Psychotria* e *Rudgea* (Tabela 1). Essas espécies foram escolhidas em função dos dados cariotípicos disponíveis (CORRÊA & FORNI-MARTINS 2004, capítulos 1 e 2) com coloração convencional (Tabela 1) e da maior disponibilidade de sementes, o que permitiu a realização de inúmeros testes para o estabelecimento de protocolos com alterações nas técnicas utilizadas.

Essas espécies foram coletadas em áreas de Cerrado no estado de São Paulo, Estações Ecológicas e Experimentais de Assis (22°33'S e 50°22'W) e Itirapina (47°49'S e 22°15'W), na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (22°15'S e 47°08'W). Algumas espécies foram coletadas numa região de Cerrado em Corumbá (18°59'S e 59°39'W), no estado de Mato Grosso do Sul, próximo ao Pantanal Sul-matogrossense. Os materiais-testemunho estão depositados no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC).

Tabela 1 – Número cromossômico de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae), tribo Psychotrieae, segundo CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004), e capítulos 1 e 2.

Gênero / Subgênero	Espécie	2n	Nº de coleta*
<i>Palicourea</i>	<i>Palicourea marcgravii</i> A. St. -Hil.	22	01/45
<i>Psychotria</i> / <i>Psychotria</i>	<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	44	01/19
<i>Psychotria</i> / <i>Heteropsychotria</i>	<i>Psychotria deflexa</i> DC.	32	02/48
	<i>Psychotria hoffmannseggiana</i> (Willd. Ex Roem. & Schult.) Müll. Arg.	22	01/01
	<i>Psychotria tenerior</i> (Cham.) M. Arg.	22	01/27
	<i>Psychotria trichophora</i> Müll. Arg.	22	01/11
	<i>Psychotria vellosiana</i> Benth.	44	01/28
<i>Rudgea</i>	<i>Rudgea viburnoides</i> (Cham.) Benth.	44	01/16

* Coletor – Corrêa & Silva

6.4.2. Germinação das sementes

Os frutos coletados no campo foram imediatamente beneficiados para a obtenção das sementes, que foram lavadas em solução de Hipoclorito de sódio a 5%, para diminuir a proliferação de fungos durante a germinação.

As sementes foram postas a germinar em placas de petri com papel de filtro umidecido com água destilada e mantidas em Câmara Germinadora (Tecnal), sob luz constante e temperatura de 28° C. O tempo para o surgimento da radícula foi de aproximadamente 120 dias (Dados não apresentados).

6.4.3. Pré-tratamento, fixação e armazenamento

As sementes foram postas a germinar em Câmara Germinadora, com temperatura constante de 28 °C. Radículas com aproximadamente 1cm de comprimento, de sementes recém-germinadas, foram coletadas e pré-tratadas com soluções de para-diclorobenzeno saturado (p-DB) e 8-hidroxiquinoleína 0,002M (8-Hq) por aproximadamente 5 horas, às temperaturas de 16-18°C e 14-15°C, respectivamente. Posteriormente, foram fixadas em álcool:ácido acético (3:1) por 24 horas, em temperatura ambiente. Depois de fixadas, as raízes foram guardadas em álcool 70% em freezer a -15°C até o momento de confecção das lâminas.

6.4.4. Confecção das lâminas

Para a confecção das lâminas, as raízes armazenadas foram lavadas com tampão Citrato-Fosfato pH 4,8 quando no uso de Celulase/Pectinase 2/20% e tampão Acetato de Sódio 0,01M pH 4,7, quando usado Driselase 5%, por três vezes de 5 minutos cada. Primeiro as raízes foram colocadas em solução de Driselase 5% por 15 minutos, e depois colocadas em solução celulase/pectinase 2/20%, por 10 minutos. A digestão enzimática foi realizada nas seguintes condições:

A) *Driselase* 5% (BRAGA & DIETRICH, 1998 e GUERRA & SOUZA, 2002) com modificações

A hidrólise das raízes em solução enzimática *Driselase* 5% foi feita em câmara úmida na estufa a 37°C, por 15 minutos. Após, foram lavadas com tampão Acetato de Sódio 0,01M pH 4,7, por três vezes de 5 minutos cada, e levadas à solução enzimática com celulase/pectinase;

B) *Celulase / Pectinase* (GUERRA & SOUZA, 2002)

A hidrólise das raízes foi feita em solução com Celulase/Pectinase 2/20% por 10 minutos em câmara úmida na estufa à 37°C; após lavagem com tampão Citrato-Fosfato pH 4,8, por três vezes de 5 minutos cada, o meristema radicular foi separado e fragmentado sobre lâmina, com adição de uma gota de ácido acético 45%. Foi adicionada uma lamínula sobre o material e o mesmo esmagado. Para a retirada da lamínula foi utilizado nitrogênio líquido.

Após secagem, à temperatura ambiente, as lâminas foram guardadas em freezer à -20°C, para a utilização na técnica de hibridação *in situ*.

6.4.5. Hibridação fluorescente *in situ* (FISH – DNAr 45S) (HESLOP-HARRISON et al., 1991 e CUADRADO & JOUVE, 1994) com modificações

Essa técnica foi recentemente instalada no Laboratório de Biossistemática do IB/UNICAMP após a aquisição de equipamentos para o laboratório, durante o ano de 2005, através dos financiamentos FAPESP 2004/13041-8 e 2004/13165-9 e CNPq 471065/04-8 concedidos à Profa Dra Eliana Regina Forni-Martins. O procedimento passou a ser realizado sob supervisão da Dra. Mariana Esteves Mansanares.

A) *Preparação da sonda:*

Foi utilizado o fragmento de DNAr 45S de cerca de 12 kb contendo 25S;5,8S;18S com seus espaçadores. Este fragmento foi clonado no plasmídio pUC em *E.coli*, resistente a ampicilina. O

plasmídio foi separado pela técnica da miniprep e a concentração medida em um fluorômetro. A marcação foi feita por nick translation (Bionick Gibco) com biotina-14-dUTP.

B) Tratamento da lâmina e HIS:

Para a hibridação *in situ*, as lâminas foram preparadas com digestão enzimática das paredes celulares das pontas das raízes e armazenadas em freezer. Antes de iniciar a hibridação as lâminas foram tratadas com RNase 1% (1 RNase : 99 2xSSC), a 37°C por 1h. As lâminas foram lavadas em 2xSSC por 10 min no agitador e depois mergulhadas em Paraformaldeído 4%, à temperatura ambiente, por mais 10 min. Depois de lavadas novamente em 2xSSC, as lâminas foram imersas em álcool 70% por 5 min e em álcool 100% por mais 5 min. Após as lâminas estarem secas, foi acrescentada a mistura de hibridação, preparada enquanto as lâminas secavam. A mistura de hibridação consistiu de formamida 100%, dextran sulfato 50%, 20xSSC, sonda (40 ng μl^{-1}), DNA de bloqueio, SDS 10% e água. Depois de acrescentada a mistura de hibridação nas lâminas, estas foram colocadas em um termociclador, alternando as temperaturas de 90°C por 10 min e depois a 45°C por mais 10 min e, finalmente a 37°C. As lâminas foram então mantidas na estufa a 37°C, em câmara úmida e no escuro, por toda à noite.

C) Banhos pós-hibridação:

Após uma noite em estufa 37°C no escuro, foram feitos os banhos pós-hibridação, primeiramente com 2xSSC a 42°C por 5 min, depois com formamida 20% (20ml de formamida para 80ml de 0,1xSSC) a 42°C por 10 min. O terceiro banho foi feito em 0,1xSSC a 42°C por 5 min e outro novamente em 2xSSC a 42°C por 5 min. Depois, foram feitos um banho com 4xSSC 0,2% tween a 42°C, e outro com 4xSSC 0,2% tween à temperatura ambiente. Todos os banhos foram feitos em agitador.

D) Detecção da hibridação:

Para a detecção da hibridação, nas lâminas ainda molhadas, pingou-se 100µl de BSA 5% por 5 min. Depois foi eliminado o excesso batendo a lâmina sobre um papel absorvente e foram colocados 50µl da solução de detecção (avidina-FITC 1:100 BSA 5%). As lâminas foram colocadas em estufa a 37°C por 1h. Após duas lavagens com 4xSSC 0,2% tween por 10 min., as lâminas foram montadas utilizando 25ml de solução de iodeto de propídio (25 ml de antifading: Vectashield e glicerol na proporção 1:1 e 1 ml de iodeto de propídio - 50mg/ml). As células foram então fotografadas em microscópio de fluorescência, utilizando filme colorido Pro Image ISO 100, ou utilizando câmera digital refrigerada Evolution MP 5,0 Mp e programa de captura de imagens Image Pro-Plus 4.0.

6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para aplicação da técnica de hibridação *in situ* é desejável a degradação da parede celular para o extravasamento do citoplasma, possibilitando o espalhamento dos cromossomos e a penetração dos reagentes necessários, como corantes / fluorocromos e outros marcadores. Isso é possibilitado pela confecção das lâminas mediante digestão enzimática. Os testes realizados com celulase/pectinase não apresentaram os resultados esperados, mesmo quando testadas em concentrações diferentes (1/10% e 2/20%) e por tempos diferentes (1 à 5 horas), em temperatura ideal de 37°C.

Detectada a dificuldade para a quebra da parede celular, essencial para o bom resultado dos trabalhos, foi realizada pesquisa bibliográfica para o conhecimento das características da parede celular das espécies de Rubiaceae. BRAGA & DIETRICH (1998) utilizaram a enzima driselase para a digestão da parede celular das células de folhas de duas espécies de Rubiaceae, *Alibertia myrcifolia* Spruce ex K. Schum. e *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. Foi feito o contato com a Dr^a Márcia R. Braga, do Instituto de Botânica de São Paulo, e com sua ajuda, estabelecidos testes

para o uso da enzima na digestão da parede celular das espécies escolhidas para esse estudo. A driselase, utilizada em protocolo padrão de digestão enzimática para confecção de lâminas (GUERRA & SOUZA, 2002), trouxe melhores resultados no tratamento com duas horas de duração. Em períodos inferiores a duas horas, a parede celular não rompeu, e em tempos superiores a duas horas, os cromossomos foram danificados. Os resultados da digestão enzimática com driselase 5% foram muito melhores que os obtidos com celulase/pectinase.

Após levantamento bibliográfico para um melhor conhecimento da composição da parede celular na família Rubiaceae, foram realizados testes com a combinação das enzimas Driselase 5% e celulase/pectinase 2/20%, resultando então na digestão da parede, possibilitando a aplicação da técnica de hibridação *in situ*.

A adequação dessas técnicas poderá trazer informações muito importantes não só para a caracterização cariotípica como para sua comparação com o posicionamento taxonômico dessas espécies de Rubiaceae. Como já mencionado não há conhecimento sobre a aplicação de técnicas moleculares nos cromossomos de espécies de Rubiaceae nativas, havendo apenas informações disponíveis para espécies exóticas de *Coffea* L. (RAINA *et al.*, 1998; LOMBELLO & PINTO-MAGLIO, 2004a, b, c).

No caso da hibridação *in situ*, ocorreu a detecção de DNAr 45S em todas as espécies apresentadas (Tabela 2), já que essa sequência gênica é universal, estando presente em todas as espécies, variando apenas no número de sítios (APPELS, *et al.*, 1998). Os resultados para as espécies da tribo Psychotrieae (Tabela 2) são todos inéditos, de forma que não podem ser comparados com outros relatos.

Tabela 2 – Espécies de Rubiaceae – Rubioideae - Psychotrieae, relacionando o número cromossômico mitótico (2n) e o número de pares de sítios de DNAr 45S.

Gênero	Subgênero	Espécie	2n	DNAr 45S
<i>Palicourea</i>		<i>Palicourea marcgravii</i>	22	02
<i>Psychotria</i>	<i>Psychotria</i>	<i>Psychotria carthagenensis</i>	44	01
	<i>Heteropsychotria</i>	<i>Psychotria deflexa</i>	32	02
		<i>Psychotria hoffmannseggiana</i>	22	01
		<i>Psychotria tenerior</i>	22	01
		<i>Psychotria trichophora</i>	22	04
		<i>Psychotria vellosiana</i>	44	01
		<i>Rudgea viburnoides</i>	44	01

No gênero *Palicourea*, *Palicourea marcgravii*, $2n = 22$, apresentou dois pares de sítios (Figura 1) sendo um dos pares mais nítido que o outro. Não podemos afirmar se a quantidade de pares de sítios é característica para o grupo. Para DELPRETE (2004), o gênero *Palicourea* apresenta forte relacionamento com o gênero *Psychotria*, subgênero *Heteropsychotria*, o qual apresentou variação no número de pares de sítios para as espécies aqui apresentadas.

Considerando a divisão do gênero *Psychotria* em três subgêneros (subgêneros *Psychotria*, *Tetramerae* e *Heteropsychotria*) proposto por PETIT (1964, 1966) e por Steyermark (1972 *apud* NEPOKROEFF *et al.* 1999), com base em caracteres morfológicos e distribuição geográfica, aqui foram incluídas espécies pertencentes a dois desses subgêneros, *Heteropsychotria* e *Psychotria*, ambos de ocorrência nos trópicos.

Pertencente ao subgênero *Psychotria*, uma espécie foi estudada, *P. carthagenensis*, $2n = 44$, que apesar da grande quantidade de cromossomos, apresentou apenas um par de cromossomos contendo sítios de DNAr 45S (Figura 2). Já para o subgênero *Heteropsychotria*, são apresentados números cromossômicos e números de pares de sítios para cinco espécies, *P. hoffmannseggiana* e *P. tenerior*, $2n = 22$, *P. deflexa*, $2n = 32$, com dois pares de sítios de DNAr 45S e *P. vellosiana*, $2n =$

44, com apenas um par de sítios cada uma (Figura 3). Nesse subgênero, o número de pares de sítios de DNAr 45S não aumentou com o aumento do número cromossômico das espécies.

Psychotria trichophora, $2n = 22$, apresentou quatro pares de sítios DNAr 45S, bastante distintos do restante das espécies do subgênero. Esse resultado não possibilitou nenhuma inferência taxonômica, necessitando de mais informações, bem como para outras espécies para se ter um conhecimento mais amplo do gênero.

A espécie *Rudgea viburnoides* ($2n = 44$), também apresentou apenas um par de sítios (Figura 4). A princípio, esses dados de hibridação *in situ* não contribuem para elucidar o comportamento e posicionamento dessas espécies, no entanto, são de grande valia para o conhecimento de espécies nativas, já que todos os resultados aqui apresentados são inéditos. O número de sítios de DNAr 45S não mostrou relação com o nível de ploidia das espécies. Dentre as espécies com $2n = 44$, que são *Psychotria carthagenensis*, *P. vellosiana* e *Rudgea viburnoides*, não houve variação no número de pares de sítios. O número máximo de pares de DNAr 45S foi observado em *Psychotria trichophora* (04), espécie essa com $2n = 22$.

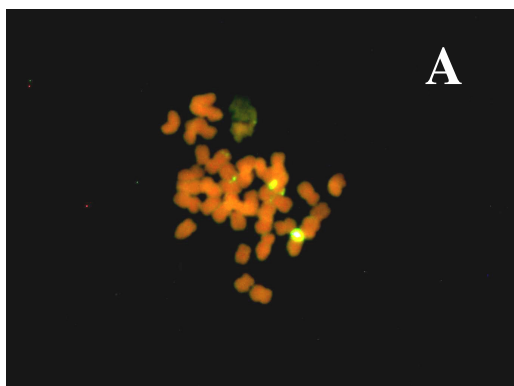


Figura 1 – Tribo Psychotrieae, gênero *Palicourea* – A – *Palicourea marcgravii*, $2n = 22$.

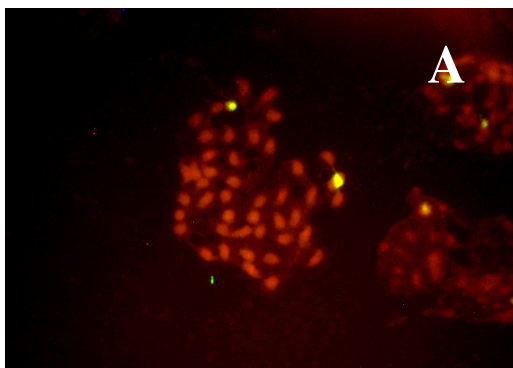


Figura 2 – Tribo Psychotrieae, gênero *Psychotria*, subgênero *Psychotria*: A - *Psychotria carthagenensis*, $2n = 44$.

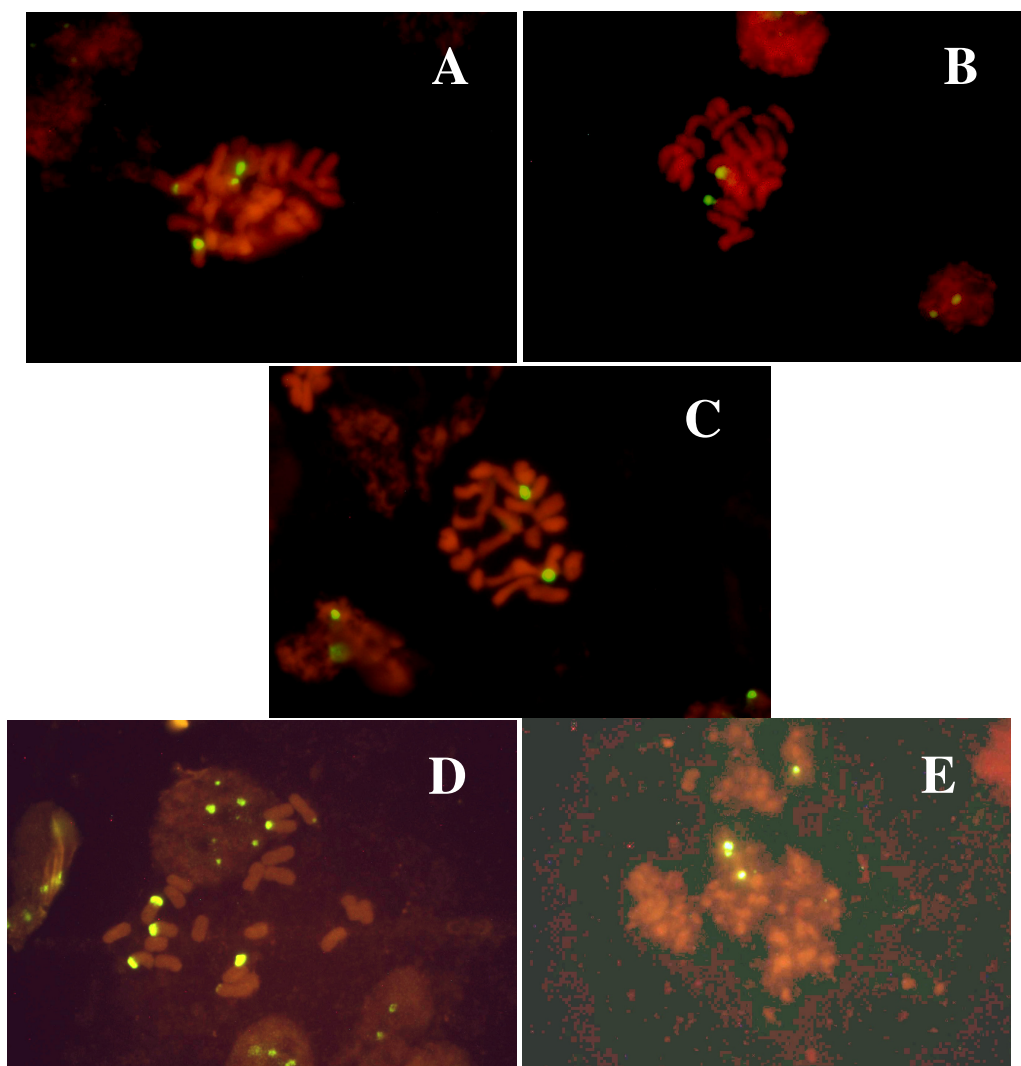


Figura 3 – Tribo Psychotrieae, gênero *Psychotria*, subgênero *Heteropsychotria*: A – *Psychotria deflexa*, $2n = 32$; B – *P. hoffmannseggiana*, $2n = 22$; C – *P. tenerior*, $2n = 22$; D – *P. trichophora*, $2n = 22$; E – *P. vellosiana*, $2n = 44$.

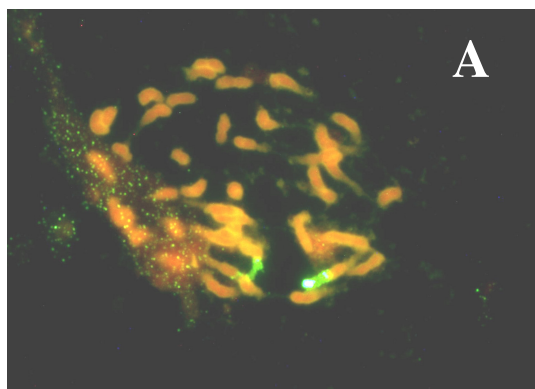


Figura 4 – Tribo Psychotrieae, gênero *Rudgea*: A – *Rudgea viburnoides*, $2n = 44$.

6.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J. & CHARRIER, A. 2001. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118: 53-65.
- APPELS, R.; MORRIS, R.; GILL, B. S. & MAY, C. E. 1998. Chromosome biology. Kluwer Academic Publishers. Boston, London. 401 p.
- BRAGA, M. R. & DIETRICH, S. M. C. 1998. Phytoalexin-inducing oligosaccharins from the cell walls of tropical Rubiaceae. *Rev. Bras. de Fisiologia Vegetal*. 10(2): 79-84.
- BREMER, B. 1996. Combined and separate analyses of morphological and molecular data in the plant family Rubiaceae. *Cladistics* 12: 21-40.
- CASTRO, A. A. J. F., MARTINS, F. R., TAMASHIRO, J. Y., SHEPHERD, G. J. 1999. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 192-224.
- CORRÊA, A. M. & FORNI-MARTINS, E. R.; 2004. Estudos cromossômicos em espécies de Rubiaceae (A. L. de Jussieu) de Cerrado. *Caryologia* 57 (3): 250 - 258.
- CUADRADO, A. & JOUVE, N. 1994. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-Banding in 6X-Triticale. *Chrom. Res.* 2: 231-238.
- DAVIS, A. P.; BRIDSON, D.; JARVIS, C. & GOVAERTS, R. 2001. The typification and characterizations of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). *Bot. J. Linnean Society* 135: 35 – 42.
- DELPRETE, P.G. 2004. Rubiaceae. <http://www.rubiaceae.org>
- FORNI-MARTINS, E. R. & MARTINS, F. R. 2000. Chromosome studies on Brazilian *Cerrado* plants. *Genetics and Molecular Biology* 23(4): 947-955.
- FREGONEZI, J. N.; FERNANDES, T.; TOREZAN, J. M. D.; VIEIRA, A. O. S. & VANZELA, A. L. L. 2006. Karyotype differentiation of four *Cestrum* (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. *Genetics and Molecular Biology* 29(1): 97-104.

- GUERRA, M. & SOUZA, M. J. 2002. Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Editora FUNPEC. Ribeirão Preto, SP. 131 p.
- HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T.; ANANTHAWAT-JONSSON, K.; LEITCH, A. R.; SHI, M. & LEITCH, I. J. 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *The technique*. 3: 106-109.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOG, E. A. & STEVENS, P. F. 1999. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates Inc., Sunderland. 363-366.
- KRUG, C. A. 1934. Contribuição para o estudo da citologia do gênero *Coffea*. I – Boletim Técnico 11, Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas – SP.
- LI, R.; TAYLOR, S. & JENKINS, G. 2001. Unraveling the phylogeny of tetraploid *Vicia amoena* (Fabaceae) and its diploid relatives using chromosomal landmarks. *Hereditas* 134: 219-224.
- LOMBELLO, R. A. & PINTO-MAGLIO, C. A. F. 2004a. Cytogenetic studies in *Coffea* L. and *Psilanthus* Hook. f. using CMA/DAPI and FISH. *Cytologia*. 69(1): 85-91.
- LOMBELLO, R. A. & PINTO-MAGLIO, C. A. F. 2004b. Heterochromatin and rDNA sites in *Coffea* L. chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI. I: *C. humilis*, *C. kapakata*, *C. sp.* Moloundou and *C. stenophylla*. *Caryologia*. 57(1): 11-17.
- LOMBELLO, R. A. & PINTO-MAGLIO, C. A. F. 2004c. Heterochromatin and rDNA sites in *Coffea* L. chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI. II: *C. canephora* cv. Apoatã, *C. salvatrix* and *C. sessiliflora*. *Caryologia*. 57(2): 138-143.
- NEPOKROEFF, M., BREMER, B. & SYSTMA, K. J.; 1999. Reorganization of the genus *Psychotria* and the tribe Psychotieae (Rubiaceae) inferred from *ITS* and *rbcL* sequence data. *Systematic Botany* 24: 5-27.
- PETIT, E. 1964. Les espèces africaines du genre *Psychotria* L. (Rubiaceae) – I. Bulletin du Jardín Botanique de l'État 34: 1-229.

- PETIT, E. 1966. Les espèces africaines du genre *Psychotria* L. (Rubiaceae) – II. Bulletin du Jardin Botanique de l'État 36: 65-190.
- PIEROZZI, N. I. & MENDAÇOLLI, S. L. J. 1997. Karyotype and C-band analysis in two species of *Genipa* L. (Rubiaceae, Gardenieae tribe). Cytologia 62: 81-90.
- PIEROZZI, N. I.; PINTO-MAGLIO, C. A. F. & CRUZ, N. D. da. 1999. Characterization of somatic chromosome of two diploid species of *Coffea* L. with acetic orcein and C-bands techniques. Caryologia 52: 1-8.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F. & CRUZ, N. D. da. 1988. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. Arabica* L. complement. Caryologia 51(1): 19-35.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CUÉLLAR, T. & BARBOSA, R. L. 2000. Aplicação de técnicas de citogenética molecular na caracterização dos cromossomos da espécie *Coffea arabica* L. In I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Resumos Expandidos. Poços de Caldas – MG 1: 444-446.
- RAINA, S. N.; MUKAI, Y. & YAMAMOTO, M. 1998. In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *coffea arabica* (Rubiaceae). Theor. Appl Genet. 97: 1204-1209.
- RAN, Y.; MURRAY, B.G. & HAMMETT, K. R. W. 1999. Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and *in situ* hybridization. Euphytica 106: 139-147.
- ROBBRECHT, E. 1988. Tropical Woody Rubiaceae. Opera Botanica Belgica 1. 272 p.
- TAGASHIRA, N. & KONDO, K. 2001. Chromosome phylogeny of *Zamia* and *Ceratozamia* by means of Robertsonian changes detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique of rDNA. Plant Systematics and Evolution 227: 145-155.

7. CAPÍTULO 4

DISTRIBUIÇÃO DE SÍTIOS DE DNAr 45S EM DUAS ESPÉCIES DE *BORRERIA* – SPERMACOCEAE - RUBIOIDEAE

7.1. RESUMO

O gênero *Borreria* G. Mey., pertencente à tribo Spermacoceae, abrange a maioria das plantas herbáceas da subfamília Rubioideae. Este gênero apresenta problemas de identificação taxonômica das suas espécies, além da escassez de contagens cromossômicas. Foram feitos estudos de citogenética convencional, complementado pela técnicas molecular da hibridação de DNAr *in situ*, localizando seqüências de DNAr 45S. As duas espécies estudadas, *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. e *Borreria verticillata* (L.) G. Mey., apresentaram $2n = 28$, número coincidente com a maior parte dos representantes dessa tribo, que possui número cromossômico básico $x = 14$. Os cariótipos das duas espécies apresentaram todos os pares cromossômicos metacêntricos e seus tamanhos variaram de 3,54 μm a 1,49 μm . *Borreria latifolia* apresentou dois pares e *B. verticillata* apresentou apenas um par de sítios de DNAr 45S, sempre observados nos braços curtos dos cromossomos, seguindo um padrão geral entre as angiospermas. A diferenciação no número de sítios de DNAr 45S possibilitou a discriminação das duas espécies de *Borreria*.

7.2. ABSTRACT

The *Borreria* G. Mey. genus, a member of the Spermacoceae tribe, encloses the majority of herbaceous plants in the subfamily Rubioideae. This genus presents several problems concerned to the taxonomic identification of its species as well as the lack of information about cytotaxonomic studies. In this chapter, determinations of chromosome numbers and ideogram analyses using conventional cytogenetic techniques are showed for two species of *Borreria* (*B. latifolia* (Aubl.) K. Schum. and *B. verticillata* (L.) G. Mey.). *In situ* hybridization using a probe of 45S rDNA was also applied. Both species show a chromosome number of $2n = 28$, coincident with most representants of this tribe, witch possess a basic chromosome number of $x = 14$. In the same way, both species have metacentric chromosomes, with length varying from 3,54 μm to 1,49 μm . Though *in situ* hybridization analyses, *Borreria latifolia* presented two pairs and *B. verticillata* only one pair of 45S rDNA signal, always observed in the shorter arms of the chromosomes, following a general pattern of angiosperms. The differences in the number of small signals of 45S rDNA make possible the differentiation between the two species of *Borreria*.

7.3. INTRODUÇÃO

A família Rubiaceae (A. L. de Jussieu) compreende cerca de 637 gêneros e aproximadamente 10.700 espécies, sendo a quarta maior dentre as angiospermas (ROBBRECHT, 1988). É composta por plantas de hábito muito variado, desde ervas, arbustos, árvores até trepadeiras. São plantas cosmopolitas, porém com maior diversidade em regiões tropicais e subtropicais (JUDD *et al.*, 1999). No Brasil, é uma das mais bem representadas em levantamentos florísticos e fitossociológicos de várias formações vegetacionais (SALIS *et al.*, 1996). Tanto em florestas semidecíduas do sudeste (Rodrigues & Nave, 2000 **apud** GIANNOTTI & LEITÃO-FILHO, 2000), como no Cerrado, está presente entre as famílias com maior riqueza específica (GIANNOTTI & LEITÃO FILHO, 1992; MANTOVANI & MARTINS, 1993; CASTRO *et al.*, 1999; DURIGAN, 1999).

O reconhecimento taxonômico das espécies de Rubiaceae é complexo, devido à diversidade morfológica e grande riqueza específica. Além disso, de acordo com BREMER (1996), essa família também apresenta problemas na delimitação de subfamílias e tribos. Dentro da subfamília Rubioideae, composta por 16 ou 18 tribos, de acordo com o sistema de classificação considerado, sendo oito delas presentes em regiões tropicais e no Brasil (JUDD *et al.*, 1999), encontramos gêneros bastante complexos quanto à identificação taxonômica e posicionamento dentro dos grupos a que pertencem, como é o caso da tribo Spermacoceae.

A tribo Spermacoceae abrange a maioria das plantas herbáceas da subfamília Rubioideae. É representada por cerca de 20 gêneros, com 250 –300 espécies de distribuição pantropical, e desses, aproximadamente 12 gêneros ocorrem no Brasil; e precisam de mais estudos para esclarecer suas delimitações genéricas (DESSEIN *et al.*, 2003). Apresenta problemas de identificação taxonômica das suas espécies, além da escassez de contagens cromossômicas e de resultados usando dados moleculares, que auxiliem essa identificação.

No gênero *Borreria* G. Mey., apesar de ser o maior dentro da tribo Spermacoceae, com cerca de 125 espécies (DESSEIN *et al.*, 2003), é conhecido o número cromossômico de apenas 19 espécies. O número de espécies estudadas é uma contribuição muito pequena, principalmente por observar-se uma variação de números cromossômicos muito grande, $n = 14, 26$ e 28 , e $2n = 22, 28, 32, 40, 44, 56, 64$ e 84 (Anexo 1 - BOLKHOVSKIKH, *et al.*, 1969; CORRÊA & FORNIMARTINS, 2004; GOLDBLATT, 1981 e 1985; GOLDBLATT & JOHNSON, 1990 e 1991). Poucos gêneros pertencentes à tribo Spermacoceae têm seus números cromossômicos conhecidos, com quatro espécies em *Diodia* L. e apenas uma espécie para *Mitracarpus* Zucc. ex Schult. & Schult. f., *Richardia* Kunth. e *Spermacoce* L., todas com $2n = 28$ (Anexo 1 - BOLKHOVSKIKH, *et al.*, 1969).

A diferenciação longitudinal dos cromossomos, obtida por técnicas de bandamento cromossômico ou de citogenética molecular, tem trazido nova perspectiva na caracterização cariotípica (PINTO-MAGLIO *et al.*, 2000) e, portanto, para a citotaxonomia em geral. As técnicas de bandamento podem ser clássicas (C, AgNOR) ou empregar fluorocromos (CMA₃/DAPI), enquanto que na citogenética molecular vêm sendo aplicadas técnicas de hibridação *in situ* com fluorescência, envolvendo determinadas seqüências gênicas (FISH - fluorescent *in situ* hybridization) ou genomas inteiros (GISH - genomic *in situ* hybridization). Todas essas técnicas podem constituir-se em um valioso marcador citológico para a identificação cromossômica.

O trabalho de DESSEIN *et al.* (2003), sobre a sistemática da tribo Spermacoceae, baseado em filogenias moleculares, utilizando como marcador, *rps16*, agrupou a maioria das espécies de Spermacoceae em três clados, com algumas espécies em clados não resolvidos. No entanto, foram utilizadas diversas espécies australianas e apenas uma espécie americana, de forma que os resultados não auxiliam os estudos das espécies encontradas no Brasil. Além disso, o gênero *Borreria* foi muito pouco representado no trabalho de DESSEIN *et al.* (2003). O presente estudo objetivou a aplicação

da técnica de hibridação *in situ* - FISH (DNAr 45S) - em duas espécies de *Borreria*, com dificuldades de identificação taxonômica.

7.4. MATERIAL E MÉTODOS

7.4.1. Espécies estudadas

Os testes com hibridação *in situ*, para a sequência DNAr 45S foram realizados nas espécies *Borreria latifolia* e *B. verticillata* (Figuras 14). Essas espécies foram escolhidas em função dos dados cariotípicos disponíveis (CORRÊA & FORNI-MARTINS 2004) com coloração convencional (Tabela 1, Figuras 1 e 3) e da maior disponibilidade de sementes, o que permitiu a realização de inúmeros testes com alterações nas técnicas utilizadas, para estabelecimento de um protocolo para esse grupo.

Essas espécies foram coletadas em áreas de Cerrado no estado de São Paulo, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (22°15'S e 47°08'W) e na Estação Ecológica e Experimental de Itirapina (47°49'S e 22°15'W). A identificação do material vegetal foi realizada pela Dr^a Nélida M. Bacigalupo, do Instituto de Botânica Darwinion, na Argentina. Os materiais testemunho estão depositados no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC).

Tabela 1 – Número cromossômico e características cariotípicas de espécies de *Borreria*, segundo CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004).

Espécie	2n	Comprimento cromossômico (µm)	CTC (µm)	TF%	Fórmula cariotípica	Nº de coleta*
<i>Borreria latifolia</i> (Aubl.) K. Schum.	28	2,96 – 1,49	60,25	43,87	14m	02/63
<i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.	28	3,54 – 1,76	70,32	47,45	14m	02/51

* Coletor – Corrêa & Silva

7.4.2. Germinação das sementes

Os frutos foram coletados no campo foram imediatamente beneficiados para a obtenção das sementes, que foram lavadas em solução de Hipoclorito de sódio a 5%, para diminuir a proliferação de fungos durante a germinação.

As sementes foram postas a germinar em placas de petri com papel de filtro umedecido com água destilada e mantidas em Câmara Germinadora (Tecnal), sob luz constante e temperatura de 28° C. O tempo para o surgimento da radícula foi de aproximadamente 60 dias (Dados não apresentados).

7.4.3. Pré-tratamento, fixação e armazenamento

As sementes foram postas a germinar em Câmara Germinadora, com temperatura constante de 28 °C. As radículas com aproximadamente 1cm de comprimento, de sementes recém-germinadas, foram coletadas e pré-tratadas com soluções de para-diclorobenzeno saturado (p-DB) e 8-hidroxiquinoleína 0,002M (8-Hq) por aproximadamente 5 horas, às temperaturas de 16-18°C e 14-15°C, respectivamente. Posteriormente, foram fixadas em álcool:ácido acético (3:1) por 24 horas, em temperatura ambiente. Depois de fixadas, as raízes foram guardadas em álcool 70% em freezer a -15°C até o momento de confecção das lâminas.

7.4.4. Confecção das lâminas

Para a confecção das lâminas, as raízes armazenadas foram lavadas com tampão Citrato-Fosfato pH 4,8 quando no uso de Celulase/Pectinase 2/20% e tampão Acetato de Sódio 0,01M pH 4,7, quando usado Driselase 5%, por três vezes de 5 minutos cada. Primeiro as raízes foram colocadas em solução de Driselase 5% por 15 minutos, e depois colocadas em solução celulase/pectinase 2/20%, por 20 minutos. A digestão enzimática foi realizada nas seguintes condições:

A) Driselase 5% (BRAGA & DIETRICH, 1998 e GUERRA & SOUZA, 2002) com modificações

A hidrólise das raízes em solução enzimática Driselase 5% foi feita em câmara úmida na estufa a 37°C, por 15 minutos. Após, lavagem com tampão Acetato de Sódio 0,01M pH 4,7, por três vezes de 5 minutos cada, após foi realizada a digestão enzimática com celulase/pectinase;

B) Celulase / Pectinase (GUERRA & SOUZA, 2002)

A hidrólise das raízes foi feita em solução com Celulase/Pectinase 2/20% por 10 minutos em câmara úmida na estufa à 37°C; após lavagem com tampão Citrato-Fosfato pH 4,8, por três vezes de 5 minutos cada, o meristema radicular foi separado e fragmentado sobre lâmina, com adição de uma gota de ácido acético 45%. Foi adicionada uma lamínula sobre o material e o mesmo esmagado. Para a retirada da lamínula foi utilizado nitrogênio líquido.

Após secagem, à temperatura ambiente, as lâminas preparadas foram guardadas em freezer à – 20°C, para a utilização na técnica de hibridação *in situ*.

7.4.5. Hibridação fluorescente *in situ* (FISH – DNAr 45S) (HESLOP-HARRISON et al., 1991 e CUADRADO & JOUVE, 1994) com modificações

Essa técnica foi recentemente instalada no Laboratório de Biossistemática do IB/UNICAMP após a aquisição de equipamentos para o laboratório, durante o ano de 2005, através dos financiamentos FAPESP 2004/13041-8 e 2004/13165-9 e CNPq 471065/04-8 concedidos à Profa Dra Eliana Regina Forni-Martins. O procedimento passou a ser realizado sob supervisão da Dra. Mariana Esteves Mansanares.

A) *Preparação da sonda:*

Foi utilizado o fragmento de DNAr 45S de cerca de 12 kb contendo 25S;5,8S;18S com seus espaçadores. Este fragmento foi clonado no plasmídeo pUC em *E.coli*, resistente a ampicilina. O

plasmídio foi separado pela técnica da miniprep e a concentração medida em um fluorômetro. A marcação foi feita por nick translation (Bionick Gibco) com biotina-14-dUTP.

B) Tratamento da lâmina e HIS:

Para a hibridação *in situ*, as lâminas foram preparadas com digestão enzimática das paredes celulares das pontas das raízes e armazenadas em freezer. Antes de iniciar a hibridação as lâminas foram tratadas com RNase 1% (1 RNase : 99 2xSSC), a 37°C por 1h. As lâminas foram lavadas em 2xSSC por 10 min no agitador e depois mergulhadas em Paraformaldeído 4%, à temperatura ambiente, por mais 10 min. Depois de lavadas novamente em 2xSSC, as lâminas foram imersas em álcool 70% por 5 min e em álcool 100% por mais 5 min. Após as lâminas estarem secas, foi acrescentada a mistura de hibridação, preparada enquanto as lâminas secavam. A mistura de hibridação consistiu de formamida 100%, dextran sulfato 50%, 20xSSC, sonda (40 ng μl^{-1}), DNA de bloqueio, SDS 10% e água. Depois de acrescentada a mistura de hibridação nas lâminas, estas foram colocadas em um termociclador, alternando as temperaturas de 90°C por 10 min e depois a 45°C por mais 10 min, e finalmente a 37°C. As lâminas foram então mantidas na estufa a 37°C, em câmara úmida e no escuro, por toda à noite.

C) Banhos pós-hibridação:

Após uma noite em estufa 37°C no escuro, foram feitos os banhos pós-hibridação, primeiramente com 2xSSC a 42°C por 5 min, depois com formamida 20% (20ml de formamida para 80ml de 0,1xSSC) a 42°C por 10 min. O terceiro banho foi feito em 0,1xSSC a 42°C por 5 min e outro novamente em 2xSSC a 42°C por 5 min. Depois, foram feitos um banho com 4xSSC 0,2% tween a 42°C, e outro com 4xSSC 0,2% tween à temperatura ambiente. Todos os banhos foram feitos em agitador.

D) *Detecção da hibridação:*

Para a detecção da hibridação, nas lâminas ainda molhadas, pingou-se 100µl de BSA 5% por 5 min. Depois foi eliminado o excesso batendo a lâmina sobre um papel absorvente e foram colocados 50µl da solução de detecção (avidina-FITC 1:100 BSA 5%). As lâminas foram colocadas em estufa a 37°C por 1h. Após duas lavagens com 4xSSC 0,2% tween por 10 min., as lâminas foram montadas utilizando 25ml de solução de iodeto de propídio (25 ml de antifading: Vectashield e glicerol na proporção 1:1 e 1 ml de iodeto de propídio - 50mg/ml). As células foram então fotografadas em microscópio de fluorescência, utilizando filme colorido Pro Image ISO 100, ou utilizando câmera digital refrigerada Evolution MP 5,0 Mp e programa de captura de imagens Image Pro-Plus 4.0.

7.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para aplicação da técnica de hibridação *in situ* é necessária a digestão da parede celular para o extravasamento do citoplasma, possibilitando o espalhamento dos cromossomos e a penetração dos reagentes usados, como corantes / fluorocromos e outros marcadores. Isso é possibilitado pela confecção das lâminas mediante digestão enzimática. Os testes realizados com celulase/pectinase não apresentaram os resultados esperados, mesmo quando testadas em concentrações diferentes (1/10% e 2/20%) e por tempos diferentes (1 à 5 horas), em temperatura ideal de 37°C, portanto foi necessário o uso de uma combinação de técnicas e enzimas mais específicas para Rubiaceae (Driselase 5%).

Foram confirmados os números cromossômicos das duas espécies estudadas anteriormente (Tabela 2), por CORRÊA & FORNI-MARTINS (2004).

Tabela 2 – Espécies de Rubiaceae-Rubioideae analisadas quanto ao número cromossômico mitótico (2n) (CORRÊA & FORNI-MARTINS, 2004) e o número de pares de sítios de DNAr 45S.

Tribo	Espécie	2n	DNAr 45S
Spermacoceae	<i>Borreria latifolia</i> (Aubl.) K. Schum.	28	02
	<i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.	28	01

O número cromossômico apresentado para as duas espécies (2n = 28) coincide com o número apresentado para a maioria das espécies da tribo Spermacoceae (x = 14) (Tabela 3) e todos os pares cromossômicos dessas duas espécies, *Borreria latifolia* e *B. verticillata*, são metacêntricos (CORRÊA & FORNI-MARTINS 2004) (Figuras 1 e 3).

Tabela 3 – Número cromossômico de espécies de *Borreria*, segundo a literatura disponível.

Tribo	Espécie	n	2n	Referências bibliográficas
Spermacoceae	<i>Borreria anthospermoides</i>		22	Shibata, K., 1962 in 7
	<i>Borreria articularis</i>	28	56	Majundar, L., 1975 in 5
	<i>Borreria eradii</i>	14		Philip, O. et al., 1975 in 5
	<i>Borreria pusilla</i>		56	Selvaraj, R., 1987 in 9
	<i>Borreria articularis</i>		64	Shivakumar, P. M. et al., 1983 in 7
	<i>Borreria ocymoides</i>		40	
	<i>Borreria pusilla</i>		32	
	<i>Borreria scabra</i>		56	
	<i>Borreria verticillata</i>		28	
	<i>Borreria verticillata</i>		28	Corrêa & Forni-Martins, 2004
	<i>Borreria dibrachiata</i>		56/84	Lewis, W. H. 1966 in 2
	<i>Borreria ocymoides</i>		28	
	<i>Borreria hispida</i>	26		Philip, K. O. et al., 1988 in 10
	<i>Borreria ocymoides</i>	14		
	<i>Borreria stricta</i>	28		
	<i>Borreria laevis</i>		24/28	Lewis, W. H., 1962 in 2
	<i>Borreria podocephala</i>		56	
	<i>Borreria terminalis</i>		84	
	<i>Borreria stachydea</i>		44	Miége, J., 1960 in 2
	<i>Borreria latifolia</i>		28	Corrêa & Forni-Martins, 2004
		2 – BOLKHOVSKIKH et al., 1969	9 – GOLDBLATT & JOHNSON, 1990	
		5 – GOLDBLATT, 1981	10 – GOLDBLATT & JOHNSON, 1991	
		7 – GOLDBLATT, 1985		

Foi possível visualizar dois pares de sítios de DNAr 45S, em *Borreria latifolia* (Figura 2), sendo um par maior e o outro menor, enquanto em *Borreria verticillata* (Figura 4), foi visualizado

um par de sítios, sendo todos terminais. No entanto, não foi possível identificar quais os cromossomos portadores de sinais, se estão entre os maiores ou entre os menores do genoma, pois o citoplasma não apresentou bom espalhamento para a obtenção de melhores resultados na hibridação *in situ*. Isso impediu um espalhamento adequado dos cromossomos e a penetração perfeita da sonda, prejudicando a marcação dos sítios de hibridação (DNAr 45S). A detecção de sítios de DNAr 45S em ambas as espécies de *Borreria*, ocorre tendo em vista que essa sequência gênica é universal, estando presente em todas as espécies, variando apenas no número de sítios (APPELS, *et al.*, 1998).

Através da utilização conjunta dos bandamentos C e com fluorocromos, do bandamento com AgNOR e hibridação *in situ* DNAr 45S, RAN *et al.* (1999) identificaram e diferenciaram os cariótipos de quatro espécies de *Clivia* (Amaryllidaceae), que se apresentam extremamente similares através das técnicas de coloração convencional, com $2n=22$ cromossomos, sendo quatro pares metacêntricos e sete pares submetacêntricos. Mais recentemente, FREGONEZI (2006) diferenciaram quatro espécies de *Cestrum* (Solanaceae), utilizando diversas técnicas de mapeamento físico para variadas regiões do DNA das espécies.

Não foi possível a localização dos sinais obtidos nesse estudo nos ideogramas das espécies de *Borreria*, no entanto, a adequação dessas técnicas poderá trazer informações muito importantes não só para a caracterização cariotípica como para sua comparação com o posicionamento taxonômico das mesmas. Contudo, a medida cromossômica, juntamente com o número de sítios de DNAr 45S aqui apresentados discriminou muito bem as duas espécies de *Borreria* estudadas. Como não há conhecimento sobre a aplicação dessas técnicas outras em espécies de Rubiaceae nativas, inclusive em *Borreria*, havendo apenas informações disponíveis em espécies exóticas de *Coffea* (RAINA *et al.*, 1998; LOMBELLO & PINTO-MAGLIO, 2004a, b, c) muitos estudos ainda serão necessários.

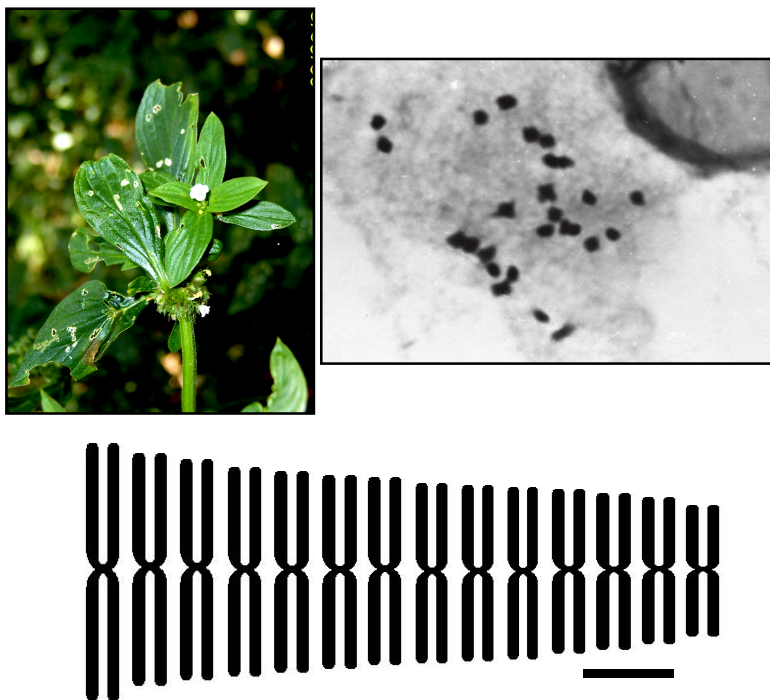


Figura 1 – *Borreria latifolia*, segundo CORRÊA & FORNI-MARTINS, 2004: Flores, Cromossomos, $2n = 28$ e Ideograma. Barra = $1\mu\text{m}$

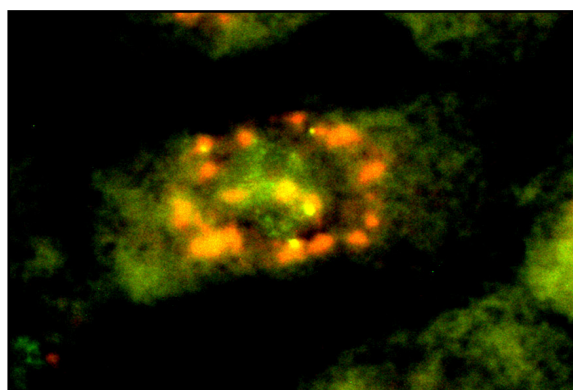


Figura 2 – *Borreria latifolia*: 4 sítios de Hibridação *in situ* DNAr 45S;

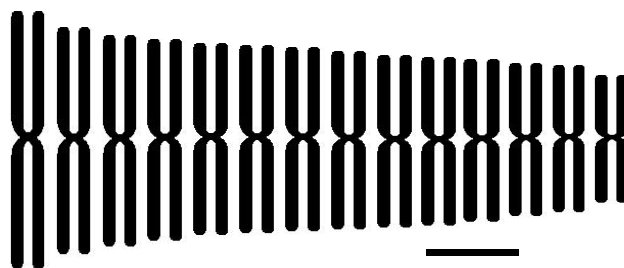
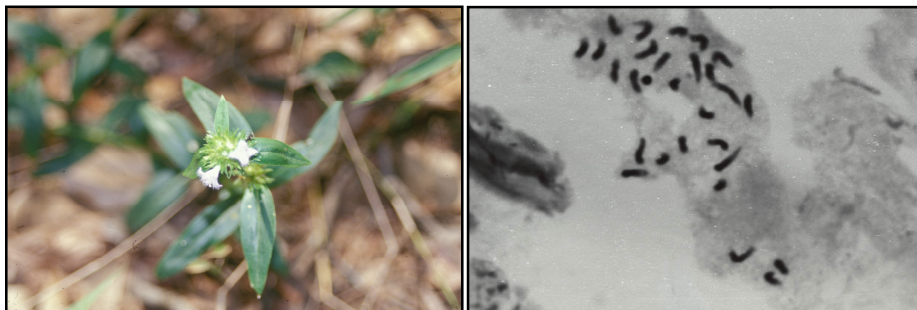


Figura 3 – *Borreria verticillata*, segundo CORRÊA & FORNI-MARTINS, 2004: Flores, Cromossomos, $2n = 28$ e Ideograma. Barra = $1\mu\text{m}$

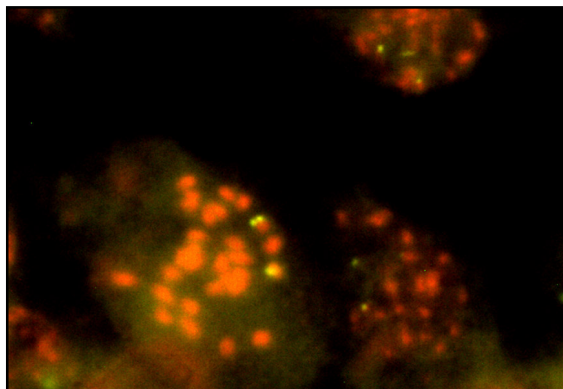


Figura 4 – *Borreria verticillata*: 2 sítios de Hibridação *in situ* DNAr 45S;
7.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPELS, R.; MORRIS, R.; GILL, B. S. & MAY, C. E. 1998. Chromosome biology. Kluwer Academic Publishers. Boston, London. 401 p.
- BOLKHOVSKIKH, Z.; GRIF, V.; MATVEJEVA, T. & ZAKARYEVA, O. 1969. Chromosome numbers of flowering plants. Leningrad, Academy of Sciences of the USSR. 926p.
- BRAGA, M. R. & DIETRICH, S. M. C. 1998. Phytoalexin-inducing oligosaccharins from the cell walls of tropical Rubiaceae. *Rev. Bras. de Fisiologia Vegetal*. 10(2): 79-84.
- BREMER, B. 1996. Combined and separate analyses of morphological and molecular data in the plant family Rubiaceae. *Cladistics* 12: 21-40.
- CASTRO, A. A. J. F., MARTINS, F. R., TAMASHIRO, J. Y., SHEPHERD, G. J. 1999. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 192-224.
- CORRÊA, A. M. & FORNI-MARTINS, E. R.; 2004. Estudos cromossômicos em espécies de Rubiaceae (A. L. de Jussieu) de Cerrado. *Caryologia* 57 (3): 250 - 258.
- CUADRADO, A. & JOUVE, N. 1994. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-Banding in 6X-Triticale. *Chrom. Res.* 2: 231-238.
- DESSEIN, S.; JANSEN, S.; ROBBRECHT, E. & SMETS, E. 2003. A new species of Spermacoceae (Rubiaceae) from the Manika high plateau (Katanga; R. D. Congo). *Nord. J. Bot.* 22: 513 – 523.
- DURIGAN, G., BACIC, M. C., FRANCO, G. A. D. C. & SIQUEIRA, M. F. de. 1999. Inventário Florístico do Cerrado na Estação Ecológica de Assis, SP. *Hoehnea* 26 (2): 149 – 172.
- FREGONEZI, J. N.; FERNANDES, T.; TOREZAN, J. M. D.; VIEIRA, A. O. S. & VANZELA, A. L. L. 2006. Karyotype differentiation of four *Cestrum* (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. *Genetics and Molecular Biology* 29(1): 97-104.
- GIANNOTTI, E. & LEITÃO FILHO, H. F. 1992. Composição Florística do Cerrado da Estação Experimental de Itirapina (SP). *In Anais do 8º Congresso SBSP*. 21-25.

- GIANNOTTI, E. & LEITÃO FILHO, H. F. 2000. Matas Ciliares: Conservação e Recuperação. São Paulo. Edusp. Fapesp 49-71.
- GOLDBLATT, P., 1981. Index to plant chromosome numbers 1975-1978. V. 5. Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P., 1985. Index to plant chromosome numbers 1982-1983. V. 13. Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E., 1990. Index to plant chromosome numbers 1986-1987. V. 30. Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E., 1991. Index to plant chromosome numbers 1988-1989. V. 40. Missouri Botanical Garden.
- GUERRA, M. & SOUZA, M. J. 2002. Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Editora FUNPEC. Ribeirão Preto, SP. 131 p.
- HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T.; ANANTHAWAT-JONSSON, K.; LEITCH, A. R.; SHI, M. & LEITCH, I. J. 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. The technique. 3: 106-109.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOG, E. A. & STEVENS, P. F. 1999. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates Inc., Sunderland. 363-366.
- LOMBELLO, R. A. & PINTO-MAGLIO, C. A. F. 2004a. Cytogenetic studies in *Coffea* L. and *Psilanthus* Hook. F. using CMA/DAPI and FISH. Cytologia. 69(1): 85-91.
- LOMBELLO, R. A. & PINTO-MAGLIO, C. A. F. 2004b. Heterochromatin and rDNA sites in *Coffea* L. chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI. I: *C. humilis*, *C. kapakata*, *C. sp.* Moloundou and *C. stenophylla*. Caryologia. 57(1): 11-17.
- LOMBELLO, R. A. & PINTO-MAGLIO, C. A. F. 2004c. Heterochromatin and rDNA sites in *Coffea* L. chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI. II: *C. canephora* cv. Apoatã, *C. salvatrix* and *C. sessiliflora*. Caryologia. 57(2): 138-143.

- MANTOVANI, W. & MARTINS, F.R. 1993. Florística do Cerrado na Reserva Biológica de Moji-Guaçu, SP. *Acta Botanica Brasilica* 7(1): 33-60.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CUÉLLAR, T. & BARBOSA, R. L. 2000. Aplicação de técnicas de citogenética molecular na caracterização dos cromossomos da espécie *Coffea arabica* L. *In* I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Resumos Expandidos. Poços de Caldas – MG 1: 444-446.
- RAINA, S. N.; MUKAI, Y. & YAMAMOTO, M. 1998. In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *coffea arabica* (Rubiaceae). *Theor. Appl Genet.* 97: 1204-1209.
- ROBBRECHT, E. 1988. Tropical Woody Rubiaceae. *Opera Botanica Belgica* 1. 272 p.
- SALIS, S. M.; ZICKEL, C. S. & TAMASHIRO, J. Y. 1996. Fitossociologia do sub-bosque da mata da Reserva Municipal de Santa Genebra, Campinas (Estado de São Paulo). *Naturalia* 21: 171-180.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- ANDERSSON, L. & ROVA, J. H. E.; 1999. The *rps16* intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 214: 161-186.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG). 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 531-553.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG). 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.
- ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J. & CHARRIER, A. 2001. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118: 53-65.
- APPELS, R.; MORRIS, R.; GILL, B. S. & MAY, C. E. 1998. *Chromosome biology*. Kluwer Academic Publishers. Boston, London. 401 p.
- BACKLUND, N. M. & BREMER, B.; 2000. Phylogenetic relationship within the Gentianales based on *ndhF* and *rbcL* sequences, with particular reference to the Loganiaceae. *American Journal of Botany* 87: 1029-1043.
- BANDEL, G. 1974. Chromosome numbers and evolution in the Leguminosae. *Caryologia* 27: 17-32.
- BARK, J. 2001. *Cinchona* (Rubiaceae) and other medicines. *Economic Botany* 55(1): 3-6.
- BERRY, P. E.; YATSKIEVYCH, K. & HOLST, B. K. 2004. *Flora of the Venezuelan Guayana*. Volume 8. Poaceae – Rubiaceae. 497 – 775.
- BOLKHOVSKIKH, Z.; GRIF, V.; MATVEJEVA, T. & ZAKARYEVA, O. 1969. Chromosome numbers of flowering plants. Leningrad, Academy of Sciences of the USSR. 926p.

- BORTOLETI, K. C. A.; BENKO-ISEPPON, C. A. M. & GITAÍ, J. 2002. Variabilidade Citogenética intra e interpopulacional em *Genipa americana* L. detectada com os Fluorocromos CMA e DAPI. In Anais do 53º Congresso Nacional de Botânica. Recife – PE. 460 p.
- BRAGA, M. R. & DIETRICH, S. M. C. 1998. Phytoalexin-inducing oligosaccharins from the cell walls of tropical Rubiaceae. Rev. Bras. de Fisiologia Vegetal. 10(2): 79-84.
- BREMER, B. 1995. Branch support and tree stability. Cladistics 10: 295-304.
- BREMER, B. 1996. Combined and separate analyses of morphological and molecular data in the plant family Rubiaceae. Cladistics 12: 21-40.
- BREMER, B. & JANSEN, R. K. 1991. Comparative restriction site mapping of the chloroplast DNA implies new phylogenetic relationships within the Rubiaceae. American Journal of Botany 78: 198-213.
- BREMER, B. & MANEN, J. F. 2000. Phylogeny and classification of the subfamily Rubioideae (Rubiaceae). Plant Sys. And Evolution 225: 43 – 72.
- BREMER, B. & STRUWE, L. 1992. Phylogeny of the Rubiaceae and the Loganiaceae: congruence or conflict between morphological and molecular data? American Journal of Botany 79: 1171-1184.
- CASTRO, A. A. J. F., MARTINS, F. R., TAMASHIRO, J. Y., SHEPHERD, G. J. 1999. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? Annals of the Missouri Botanical Garden 86: 192-224.
- CHURCH, S. A. 2003. Molecular phylogenetics of *Houstonia* (Rubiaceae): descending aneuploidy and breeding system evolution in the radiation of the lineage across North America. Mol. Phyl. and Evolution 27 (2): 223 – 238.
- COLEMAN, J. R. & DE MENEZES, E. M. 1980. Chromosome number in the Leguminosae from the State of São Paulo, Brazil. Rhodora 82: 475-481.
- COLEMAN, J. R. 1982. Chromosome numbers of angiosperms collected in the state of São Paulo. Revista Brasileira de Genética. 3: p. 533-549.

- COSTA, J. Y. & FORNI-MARTINS, E. R.; 2003. Karyology of some Brazilian species of Alismataceae. Botanical Journal of the Linnean Society 143: 159-164.
- CORRÊA, A. M. & FORNI-MARTINS, E. R.; 2004. Estudos cromossômicos em espécies de Rubiaceae (A. L. de Jussieu) de Cerrado. Caryologia 57 (3): 250 - 258.
- CUADRADO, A. & JOUVE, N. 1994. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-Banding in 6X-Triticale. Chrom. Res. 2: 231-238.
- DARLINGTON, C. D. & WYLIE, A. P. 1955. Chromosome Atlas of Flowering Plants. University Press Aberdeen. 2 edition. 235-240.
- DAVIS, A. P.; BRIDSON, D.; JARVIS, C. & GOVAERTS, R. 2001. The typification and characterizations of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). Bot. J. Linnean Society 135: 35 – 42.
- DELPRETE, P.G. 2004. Rubiaceae. <http://www.rubiaceae.org>
- DESSEIN, S.; JANSEN, S.; ROBBRECHT, E. & SMETS, E. 2003. A new species of Spermacoceae (Rubiaceae) from the Manika high plateau (Katanga; R. D. Congo). Nord. J. Bot. 22: 513 – 523.
- DURIGAN, G., BACIC, M. C., FRANCO, G. A. D. C. & SIQUEIRA, M. F. de. 1999. Inventário Florístico do Cerrado na Estação Ecológica de Assis, SP. Hoehnea 26 (2): 149 – 172.
- FAGERLIND, F., 1937. Embryologische, zytologische und beschleunigungsexperimentelle studien in der familie Rubiaceae nebst Bemerkungen über einige polyploiditätsprobleme. In: DARLINGTON, C. D. & WYLIE, A. P. 1955. Chromosome Atlas of Flowering Plants. University Press Aberdeen. 2 edition. 235-240.
- FÉLIX, L. P. & GUERRA, M. 1999. Chromosome analysis in *Psychomorphis pusilla* (L.) Dodson & Dressler: the smallest Chromosome number known in Orchidaceae. Caryologia 52 (3-4): 165-168.
- FORNI-MARTINS, E. R.; PINTO-MAGLIO, C. A. F. & CRUZ, N. D. 1995. Chromosome numbers in Brazilian Cerrado plants. Revista Brasileira de Genética 18(2): 281-288.

- FORNI-MARTINS, E. R. & GUERRA, M. 1999. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. Species (Fabaceae). *Caryologia* 52 (1-2): 97-103.
- FORNI-MARTINS, E. R. & MACIAS, L. 2001. Números cromossômicos em espécies de *Manettia* (Rubiaceae). *In*: Resumos do 52º Congresso Nacional de Botânica e XXIV Reunião Nordestina de Botânica. João Pessoa – PB. P. 310.
- FORNI-MARTINS, E. R. & MARTINS, F. R. 2000. Chromosome studies on Brazilian *Cerrado* plants. *Genetics and Molecular Biology* 23(4): 947-955.
- FREGONEZI, J. N.; FERNANDES, T.; TOREZAN, J. M. D.; VIEIRA, A. O. S. & VANZELA, A. L. L. 2006. Karyotype differentiation of four *Cestrum* (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. *Genetics and Molecular Biology* 29(1): 97-104.
- GIANNOTTI, E. & LEITÃO FILHO, H. F. 1992. Composição Florística do Cerrado da Estação Experimental de Itirapina (SP). *In* Anais do 8º Congresso SBSP. 21-25.
- GIANNOTTI, E. & LEITÃO FILHO, H. F. 2000. Matas Ciliares: Conservação e Recuperação. São Paulo. Edusp. Fapesp 49-71.
- GIBBS, P. E. & INGRAM, R. 1982. Chromosome numbers of some Brazilian flowering plants. *Notes Royal Botanical Garden Edinburg* 40 (2): 399-407.
- GOLDBLATT, P., 1981. Index to plant chromosome numbers 1975-1978. V. 5. Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P., 1985. Index to plant chromosome numbers 1982-1983. V. 13. Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E., 1990. Index to plant chromosome numbers 1986-1987. V. 30. Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E., 1991. Index to plant chromosome numbers 1988-1989. V. 40. Missouri Botanical Garden.

- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D. E., 1994. Index to plant chromosome numbers 1990-1991. V. 51. Missouri Botanical Garden.
- GUERRA, M. 1983. O uso de Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Ciência e Cultura* 35: 190-193.
- GUERRA, M. 1986. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética* IX 4: 741-743.
- GUERRA, M. 1986. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco I. *Revista Brasileira de Genética* 9: 21-40.
- GUERRA, M. 1988. Introdução a Citogenética Geral. Ed. Guanabara. Rio de Janeiro – RJ. 142p.
- GUERRA, M. & SOUZA, M. J. 2002. Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Editora FUNPEC. Ribeirão Preto, SP. 131 p.
- HAMILTON, C. W. 1989. A revision of Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). Introductions and species 1 – 61. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76: 67 – 916.
- HARTEN, A. M. VAN. 1976. Evolution of Crop Plants. Longman, London and New York. 255-257.
- HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T.; ANANTHAWAT-JONSSON, K.; LEITCH, A. R.; SHI, M. & LEITCH, I. J. 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Thechnique*. 3: 106-109.
- HUZIWARA, Y. 1962. Karyotype analysis in some genera of compositae – VIII. Further studies on the chromosome of Asteride. *American Journal of Botany* 49, 116-119.
- JOLY, A. B. 1975. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. EDUSP, São Paulo. 554-573.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOG, E. A. & STEVENS, P. F. 1999. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates Inc., Sunderland. 363-366.

- KIEHN, M. 1986. Karyosystematische Untersuchungen in Rubiaceae: Chromosomenzählungen aus Afrika, Madagaskar und Mauritius. *Plant Systematics and Evolution* 149: 89-118.
- KRUG, C. A. 1934. Contribuição para o estudo da citologia do gênero *Coffea*. I – Boletim Técnico 11, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas – SP.
- LI, R.; TAYLOR, S. & JENKINS, G. 2001. Unraveling the phylogeny of tetraploid *Vicia amoena* (Fabaceae) and its diploid relatives using chromosomal landmarks. *Hereditas* 134: 219-224.
- LOMBELLO, R. A. & FORNI-MARTINS, E. R. 1998. Chromosomal studies and evolution in Sapindaceae. *Caryologia* 51(1): 81-93.
- LOMBELLO, R. A. & FORNI-MARTINS, E. R. 2001. Cytological studies on *Banisteriopsis* C. B. Robinson ex small and *Hereropterys* Kunth (Malpighiaceae). *Cytologia* 66: 253-259.
- LOMBELLO, R. A. & FORNI-MARTINS, E. R. 2002a. Cytogenetics of twelve species of Malpighiaceae A. Juss. From Southeastern Brazil. *Caryologia* 55(3): 239-248.
- LOMBELLO, R. A. & FORNI-MARTINS, E. R. 2002b. Cytogenetics and Evolutionary Analysis of *Lophanthera*, na Amazonian Arboreal Malpighiaceae. *Cytologia* 67: 41-45.
- LOMBELLO, R. A. & PINTO-MAGLIO, C. A. F. 2004a. Cytogenetic studies in *Coffea* L. and *Psilanthus* Hook. F. using CMA/DAPI and FISH. *Cytologia*. 69(1): 85-91.
- LOMBELLO, R. A. & PINTO-MAGLIO, C. A. F. 2004b. Heterochromatin and rDNA sites in *Coffea* L. chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI. I: *C. humilis*, *C. kapakata*, *C. sp.* Moloundou and *C. stenophylla*. *Caryologia*. 57(1): 11-17.
- LOMBELLO, R. A. & PINTO-MAGLIO, C. A. F. 2004c. Heterochromatin and rDNA sites in *Coffea* L. chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI. II: *C. canephora* cv. Apoatã, *C. salvatrix* and *C. sessiliflora*. *Caryologia*. 57(2): 138-143.
- LOPES, S. A.; MORENO, P. R. H. & HENRIQUES, A. T. 2000. Growth characteristics and chemical analysis of *Psychotria carthagenensis* cell suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 259 – 264.

- LUCEÑO, M.; VANZELA, A. L. L. & GUERRA, M. 1998. Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique* 76(3): 440-449.
- MANSANARES, M. E.; FORNI-MARTINS, E. R. & SEMIR, J. 2002. Chromosome numbers in the genus *Lychnophora* Mart. (Lychnophorinae, *Vernonieae*, Asteraceae). *Caryologia* 55(4): 367-374.
- MANTOVANI, W. & MARTINS, F.R. 1993. Florística do Cerrado na Reserva Biológica de Moji-Guaçu, SP. *Acta Botanica Brasilica* 7(1): 33-60.
- MENDONÇA FILHO, C. V.; FORNI-MARTINS, E. R. & TOZZI, A. M. G. A. 2002. New chromosome counts in Neotropical *Machaerium* Pers. species (Fabaceae) and their taxonomic significance. *Caryologia* 55(2): 111-114.
- MIOTTO, S. T. S. & FORNI-MARTINS, E. R. 1994. Número cromossômico em espécies brasileiras de *Adesmia* DC. (Leguminosae – Faboideae). *Acta Botânica Brasileira* 8(1): 3-9.
- NEPOKROEFF, M., BREMER, B. & SYSTMA, K. J.; 1999. Reorganization of the genus *Psychotria* and the tribe Psychotieae (Rubiaceae) inferred from *ITS* and *rbcL* sequence data. *Systematic Botany* 24: 5-27.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2006a. Cytotaxonomy of species of *Vernonia* (Asteraceae, *Vernonieae*, *Lepidaploa* subsect. *Axillifloare*). *Botanical Journal of the Linnean Society*. Aceito.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2006b. Cytotaxonomic studies in six species of *Vernonia*. *Caryologia*. Submetido.
- PETIT, E. 1964. Les espèces africaines du genre *Psychotria* L. (Rubiaceae) – I. *Bulletin du Jardin Botanique de l'État* 34: 1-229.
- PETIT, E. 1966. Les espèces africaines du genre *Psychotria* L. (Rubiaceae) – II. *Bulletin du Jardin Botanique de l'État* 36: 65-190.

- PIEROZZI, N. I. & MENDAÇOLLI, S. L. J. 1997. Karyotype and C-band analysis in two species of *Genipa* L. (Rubiaceae, Gardenieae tribe). *Cytologia* 62: 81-90.
- PIEROZZI, N. I.; PINTO-MAGLIO, C. A. F. & CRUZ, N. D. da. 1999. Characterization of somatic chromosome of two diploid species of *Coffea* L. with acetic orcein and C-bands techniques. *Caryologia* 52: 1-8.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F. & CRUZ, N. D. da. 1988. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. Arabica* L. complement. *Caryologia* 51(1): 19-35.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; PIEROZZI, N. I.; CASTRO, S. C. P. & SOARES-SCOTT, M. D. 1997. Números cromossômicos de Rubiaceae de Jundiaí – SP, Estação Experimental de Jundiaí, Instituto Agrônomo de Campinas. *International Organization of Plant Biosystematics* 26/27.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CUÉLLAR, T. & BARBOSA, R. L. 2000. Aplicação de técnicas de citogenética molecular na caracterização dos cromossomos da espécie *Coffea arabica* L. In I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Resumos Expandidos. Poços de Caldas – MG 1: 444-446.
- POUCQUES, M. L. DE., 1949. Becherches caryologiques sur les Rubiales. In: DARLINGTON, C. D. & WYLIE, A. P. 1955. *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. University Press Aberdeen. 2 edition. 235-240.
- RAINA, S. N.; MUKAI, Y. & YAMAMOTO, M. 1998. In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *coffea arabica* (Rubiaceae). *Theor. Appl Genet.* 97: 1204-1209.
- RAN, Y.; MURRAY, B.G. & HAMMETT, K. R. W. 1999. Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and *in situ* hybridization. *Euphytica* 106: 139-147.
- ROBBRECHT, E. 1988. Tropical Woody Rubiaceae. *Opera Botanica Belgica* 1. 272 p.
- ROBBRECHT, E. 1996. Chromosome of Rubiaceae occurring in Malesia, the Philippines, New Guinea, and the Pacific. *Opera Botanica Belgica* 7: 249-260.

- SALIS, S. M.; ZICKEL, C. S. & TAMASHIRO, J. Y. 1996. Fitossociologia do sub-bosque da mata da Reserva Municipal de Santa Genebra, Campinas (Estado de São Paulo). *Naturalia* 21: 171-180.
- STACE, C. A. 1989. *Plant Taxonomy and Biosystematics*. 2 ed. New York, Cambridge University Press.
- STEBBINS, G. L. 1950. *Variation and evolution in plants*. New York, Columbia University Press.
- SUZUKI, D. T.; GRIFFITHS, A. J.F.; MILLER, J. H. & LEWONTIN, R. C. 1989. *Introdução à Genética*. 4 edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan.
- TAGASHIRA, N. & KONDO, K. 2001. Chromosome phylogeny of *Zamia* and *Ceratozamia* by means of Robertsonian changes detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique of rDNA. *Plant Systematics and Evolution* 227: 145-155.
- TAYLOR, C. M. 1996. Overview of the Psychotrieae (Rubiaceae) in the Netropics. *Opera Bot. Belgica* 7: 261 – 270.
- TAYLOR, C. M. & STEYERMARK, J. A. 2004. *Flora of the Venezuelan Guayana*. Missouri Botanical Garden Press – St. Louis. Volume 8 – Poaceae-Rubiaceae. 497-775.
- VANZELA, A. L. L. & GUERRA, M. 2000. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genetics and Molecular Biology* 23(2): 453-456.
- ZAPPI, D.C.; SEMIR, J. & PIEROZZI, N. I. 1995. *Genipa infundibuliformis* sp. nov. and notes on *Genipa americana* (Rubiaceae). *Kew Bulletin* 50(4): 761-771.

9. ANEXO 1

Números cromossômicos de espécies da subfamília Rubioideae (Rubiaceae), segundo a literatura disponível.

Tribo	Espécie	n	2n	Referências bibliográficas
Argostemmateae	<i>Argostemma hookeri</i>		32	Robbrecht, 1996
	<i>Argostemma sp</i>		22	
Spermacoceae	<i>Diodia maritime</i>		28	Mangenot, S. <i>et al.</i> , 1962 <i>in</i> 2
	<i>Diodia natalensis</i>		28	Lewis, W. H., 1966 <i>in</i> 2
	<i>Diodia teres</i>		28	Jinno, T., 1956 <i>in</i> 2
	<i>Diodia virginiana</i>		28	Lewis, W. H., 1962 <i>in</i> 2
	<i>Mitracarpus hirtus</i>		28	Robbrecht, 1996
	<i>Richardia brasiliensis</i>		28	Corrêa & Forni-Martins, 2004
	<i>Spermacoce assurgens</i>		28	Robbrecht, 1996
Coccocypseleae	<i>Coccocypselum brevipetiolatum</i>		20	Kiehn, 1986
	<i>Coccocypselum decumbens</i>		20	
	<i>Coccocypselum guianense</i>		40	
	<i>Coccocypselum herbaceum</i>		10/12	
	<i>Coccocypselum hirsutum</i>		20/40	
	<i>Coccocypselum sp</i> (Mexico)	20		
	<i>Coccocypselum lumbellatum</i>		38/40	
	<i>Coccocypselum lanceolatum</i>		20	Corrêa & Forni-Martins, 2004
Coussareeae	<i>Coussarea hydrangeifolia</i>	11	22	Corrêa & Forni-Martins, 2004/ Capítulo 1
Anthospermeae	<i>Coprosma ernodeoides</i>		220	Robbrecht, 1996
	<i>Coprosma foliosa</i>		44	
	<i>Coprosma longifolia</i>		44	
	<i>Coprosma montana</i>		44	
	<i>Coprosma propinqua</i>		44	
	<i>Coprosma repens</i>		44	
	<i>Coprosma robusta</i>		44	
	<i>Coprosma rhynchocarpa</i>		44	
	<i>Coprosma rugosa</i>		44	
	<i>Coprosma strigulosa</i>		44	
	<i>Nertera granadensis</i>		44	Robbrecht, 1996
	<i>Nertera setulosa</i>		40	Dawson & Beuzenberg, 2000
Hedyotideae	<i>Hedyotis centranthoides</i>		100	Robbrecht, 1996
	<i>Hedyotis eliator</i>		100	
	<i>Hedyotis litoralis</i>		96/100	
	<i>Hedyotis Terminalis</i>		96/100	
	<i>Hedyotis lessertiana</i>		72±3	Kiehn, 1986
	<i>Hedyotis trimenii</i>	70/82	140 / 160	
	<i>Manettia cordifolia</i>		66	Capítulo 1
	<i>Oldenlandia corymbosa</i>		18	Robbrecht, 1996
Psychotrieae	<i>Decleuxia fruticosa</i>		20	Capítulo 1
	<i>Hydnophytum longiflorum</i>		40/44	Robbrecht, 1996
	<i>Hydnophytum moseleyanum</i>		110±1	
	<i>Hydnophytum sp</i>		44	
	<i>Palicourea croceoides</i>		22	Capítulo 1
	<i>Palicourea macgravii</i>		22+3B /22	Pinto-Maglio <i>et al.</i> , 1997/ Capítulo 1
	<i>Palicourea rigida</i>	11	22	Corrêa & Forni-Martins, 2004/ Capítulo 1
	<i>Rudgea viburnoides</i>		44	Capítulo 1
Morindeae	<i>Morinda forsteri</i>		22	Robbrecht, 1996
Ophiorrhizeae	<i>Ophiorrhiza laxa</i>		22	Robbrecht, 1996
	<i>Ophiorrhiza sp</i>	11	22	
Rubieae	<i>Relbunium birsutum</i>		44	Diers, L., 1961 <i>in</i> 2

<i>Relbunium birsutum</i>	22	Huynh, K. L., 1965 in 2
<i>Relbunium hypocarpium</i>	66	
<i>Relbunium microphyllum</i>	22	Dempster, L. T., 1973 in 4
<i>Rubia cordifolia</i>	22	Kiehn, 1986

1 – DARLINGTON & WYLIE, 1955	7 - GOLDBLATT, 1985
2 – BOLKHOVSKIKH <i>et al.</i> , 1969	8 - GOLDBLATT, 1988
3 – MOORE, 1973	9 – GOLDBLATT & JOHNSON, 1990
4 – MOORE, 1977	10 - GOLDBLATT & JOHNSON, 1991
5 – GOLDBLATT, 1981	11-GOLDBLATT&JOHNSON,1994
6 – GOLDBLATT, 1984	