

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



VANESSA MANCUSO DE OLIVEIRA

**“CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE ESPÉCIES DE
VERNONIA SCHREB. (ASTERACEAE: VERNONIEAE)
COM TÉCNICAS DE DIFERENCIAL LONGITUDINAL DE
CROMOSSOMOS (BANDAMENTOS E HIBRIDAÇÃO DE
DNA *IN SITU*)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Vanessa Mancuso de Oliveira
Eliana Regina Forni Martins
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. ELIANA REGINA FORNI MARTINS

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

OL43c	Oliveira, Vanessa Mancuso de Caracterização cariotípica de espécies de <i>Vernonia</i> Schreb. (Asteraceae: Vernonoeae) com técnicas de diferencial longitudinal de cromossomos (bandamentos e hibridação de DNA <i>in situ</i>) / Vanessa Mancuso de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientadora: Eliana Regina Forni Martins. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Cariótipos. 2. Citotaxonomia das plantas. 3. Cromossomos vegetais. I. Forni-Martins, Eliana Regina. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
--------------	---

Título em inglês: Karyotypic characterization of species of *Vernonia* Schreb. (Asteraceae: Vernoneae) with techniques of longitudinal differential of chromosomes (banding and DNA *in situ* hybridization).

Palavras-chave em inglês: Karyotypes; Plant cytotaxonomy; Plant chromosomes.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Eliana Regina Forni Martins, Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio, Neiva Izabel Pierozzi, Luiza Sumiko Kinoshita, Mariana Esteves Mansanares.

Data da defesa: 07/07/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

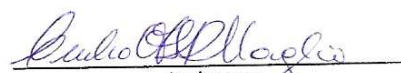
Campinas, 07 de julho de 2008.

BANCA EXAMINADORA

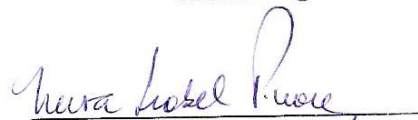
Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio


Assinatura

Profa. Dra. Neiva Izabel Pierozzi


Assinatura

Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita


Assinatura

Profa. Dra. Mariana Esteves Mansanares


Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello

Assinatura

Profa. Dra. Julie Henriette Antoniette Dutilh

Assinatura

Prof. Dr. João Semir

Assinatura

DEDICATÓRIA

Dedico à:

Fábio, meu esposo

Laércio e Elizabeth, meus pais

Laércinho e Thomaz, meus irmãos

AGRADECIMENTOS

Registro meus agradecimentos à Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins, pelo apoio e orientação durante estes oito anos de trabalho, desde minha Iniciação científica até o Doutorado.

Ao Prof. Dr. João Semir, pela co-orientação neste trabalho, sugestões e críticas.

Ao CNPq, FAEPEX/UNICAMP e à FAPESP pela concessão dos recursos financeiros.

Ao Departamento de Botânica/IB/UNICAMP e ao Laboratório de Biossistemática pela estrutura oferecida.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Botânica/IB/UNICAMP.

Aos amigos Andréa Macêdo, Carla Magioni, Christiano Verola, Iara Bressan, Itayguara Costa, Fernanda Ferrari, Juan Urdampilleta, Júlia Yamagishi, Kayna Agostini, Mariana Mansanares e Ruben Ávila, pela amizade e convívio.

Aos amigos Christiano Verola, Itayguara Costa, Leonardo Meirelles e Mariana Mansanares pelos materiais coletados.

Ao IBAMA e ao IEF-MG pelas autorizações de coleta e transporte de material botânico necessário para o desenvolvimento deste projeto.

Ao meu marido Fábio; aos meus pais, Laércio e Elizabeth; aos meus irmãos, Laércinho e Thomaz; à minha sogra e ao meu sogro, Maria Lúcia e Dionísio; à minha cunhada e ao cunhado, Degelaine e Gilberto... Muito obrigada pelo incentivo e carinho.

Aos membros desta banca, desde já pela disposição em ler este trabalho e pelas críticas que contribuirão muito nas publicações.

INDICE GERAL

Índice de Tabelas	IX
Índice de Figuras	XI
Resumo	XIII
Abstract	XV
Introdução Geral	1
Caracterização taxonômica do gênero <i>Vernonia</i>	1
Importância econômica do gênero <i>Vernonia</i>	5
Citotaxonomia.....	6
Estudos cromossômicos em <i>Vernonia</i>	8
Objetivos Gerais	10
Organização Geral da Tese	11
Referências Bibliográficas	14
Capítulo 1 - Número cromossômico e cariótipos de espécies de <i>Vernonia</i> sect. <i>Lepidaploa</i> (Asteraceae: Vernonieae)	21
Resumo.....	22
Introdução	23
Material e Métodos	25
Resultados	28
Discussão	29
Agradecimentos.....	37
Referências Bibliográficas	37
Capítulo 2 - Números cromossômicos em <i>Vernonia</i> (Asteraceae: Vernonieae) e o que eles significam taxonomicamente	50
Resumo.....	51
Introdução	52
Material e Métodos	55
Resultados e Discussão	56
Agradecimentos.....	63
Referências Bibliográficas	63

Capítulo 3 - Caracterização cariotípica de <i>Vernonia geminata</i> (Asteraceae, Vernonieae) com técnicas de diferenciação linear de cromossomos (CMA/DA/DAPI, AgNOR e hibridação de DNAr <i>in situ</i>)”	74
Resumo.....	75
Introdução	76
Material e Métodos	79
Resultados	82
Discussão	83
Agradecimentos.....	88
Referências Bibliográficas	88
Capítulo 4 - Sítios de DNAr 45S em espécies de <i>Vernonia</i> (Asteraceae, Vernonieae)	96
Resumo.....	97
Introdução	98
Material e Métodos	101
Resultados	103
Discussão	104
Agradecimentos.....	107
Referências Bibliográficas	107
Capítulo 5 - Bandamento CMA/DA/DAPI em espécies de <i>Vernonia</i> (Asteraceae, Vernonieae)	112
Resumo.....	113
Introdução	114
Material e Métodos	118
Resultados	120
Discussão	121
Agradecimentos.....	126
Referências Bibliográficas	126
Capítulo 6 – Bandamentos (CAM/DA/DAPI e AgNOR e FISH em três espécies de <i>Vernonia</i> , subseção <i>Macrocephalae</i> (Asteraceae, Vernonieae)	138
Resumo.....	139
Introdução	140
Material e Métodos	142

Resultados	145
Discussão	146
Agradecimentos.....	149
Referências Bibliográficas	149
Capítulo 7 - Ensaio para a aplicação da técnica de FISH em espécies de <i>Vernonia</i> utilizando os marcadores de DNAr 5S e DNA.....	156
Resumo.....	157
Introdução	158
Material e Métodos	162
Resultados e Discussão	165
Agradecimentos.....	167
Referências Bibliográficas	167
Considerações Finais	170

ÍNDICE DE TABELAS

Introdução Geral

Tabela I - Espécies de <i>Vernonia</i> analisadas no presente trabalho, distribuídas nas respectivas seções e subseções, de acordo com BAKER (1873) e JONES (1981)	12
---	----

Capítulo 1

Tabela I - Espécies de <i>Vernonia</i> analisadas, com respectivas localidades, habitats e material-testemunha	43
Tabela II - Espécies de <i>Vernonia</i> estudadas, número cromossômico, variação de tamanho cromossômico, comprimento total de cromatina (CTC), índice de assimetria (TF%), índice de assimetria intracromossômica (A1), índice de assimetria intercromossômica (A2) e fórmula cariotípica	44

Capítulo 2

Tabela I - Espécie de <i>Vernonia</i> analisadas no Capítulo 1 com as respectivas localidades, habitat e material-testemunha.	69
Tabela II - Espécies de <i>Vernonia</i> pertencentes à seção <i>Lepidaploa</i> que ocorrem no Brasil e que possuem número cromossômico conhecido, agrupadas de acordo com os grupos de BAKER (1873), gêneros de Robinson (1999), número cromossômico e referências	70

Capítulo 4

Tabela I - Espécies de <i>Vernonia</i> analisadas, com respectivas localidades, habitats e material-testemunha	110
Tabela II - Número cromossômico e números de sítios de DNAr 45S de espécies de <i>Vernonia</i>	110

Capítulo 5

Tabela I - Espécies de <i>Vernonia</i> analisadas, com respectivas localidades, habitats e material-testemunha	133
Tabela II - Número cromossômico e quantidade de bandas CMA ⁺ em espécies de <i>Vernonia</i>	134

Capítulo 6

Tabela I - Quantidade de bandas NOR e CMA+ e número de sítios observados na hibridação <i>in situ</i> (FISH) para DNAr 45S em espécies de <i>Vernonia</i> , subseção <i>Macrocephalae</i>	152
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1 – Algumas espécies de <i>Vernonia</i> estudadas: <i>V. geminata</i> , <i>V. polyanthes</i> e <i>V. scorpioides</i>	13
--	----

Capítulo 1

Figura 1 – Ideograma de espécies de <i>Vernonia</i> pertencentes à subseção <i>Scorpioideae</i> da seção <i>Lepidaploa</i>	45
Figura 2 – Ideograma de espécies de <i>Vernonia</i> pertencentes às subseções <i>Axilliflorae</i> , <i>Macrocephalae</i> e <i>Oligocephalae</i>	46
Figura 3 – Dispersão cariotípica para as espécies de <i>Vernonia</i> estudadas.....	47
Figura 4 – Cromossomos mitóticos de espécies de <i>Vernonia</i> , pertencentes às subseções <i>Scorpioideae</i> e <i>Macrocephalae</i>	48
Figura 5 – Cromossomos mitóticos de espécies de <i>Vernonia</i> , pertencentes às subseções <i>Axilliflorae</i> , <i>Oligocephalae</i> e <i>Paniculatae</i>	49

Capítulo 3

Figura 1 – Ideograma de <i>V. geminata</i> indicando, número e posição de bandas C, CMA+, NOR e número de sítios observados na hibridação <i>in situ</i> (FISH) para DNA 45S	93
Figura 2 – Metáfase de <i>Vernonia geminata</i> pop.1 e pop. 2, com coloração sequencial CMA/DA/DAPI, FISH e bandamento NOR.....	94
Figura 3 – Cromossomos mitóticos de <i>Vernonia geminata</i> pop.2 com cromossomos Bs.	95

Capítulo 4

Figura 1 – Sítios de DNAr 45S em espécies de <i>Vernonia</i>	111
---	-----

Capítulo 5

Figura 1 – Bandas ricas em CG em <i>Vernonia adamantium</i> , <i>V. fruticulosa</i> e <i>V. simplex</i>	135
--	-----

Figura 2 – Bandas ricas em CG em *Vernonia platensis*, *V. rubriramea* e *V. scorpioides* 136

Figura 3 – Bandas ricas em CG em *Vernonia beyrichii*, *V. condensata* e *V. polyanthes* 137

Capítulo 6

Figura 1 – *Vernonia bardanoides* 153

Figura 2 – *Vernonia linearifolia* 154

Figura 3 – *Vernonia tomentella* 155

Capítulo 7

Figura 1 – Produtos da amplificação do DNAr 5S e quantificação 170

Resumo

O gênero *Vernonia* é o maior da tribo Vernonieae (Asteraceae), possuindo mais de 1.000 espécies. O Brasil é o maior centro de diversidade das espécies do Novo Mundo deste gênero. As subdivisões de *Vernonia* têm sido de difícil circunscrição devido ao seu tamanho, que acomoda muitas variações e paralelismos. Recentemente, este gênero foi segregado em outros 22, e o mesmo ficou restrito apenas aos representantes da América do Norte. Entretanto, essa mudança não foi aceita por alguns autores. O objetivo deste trabalho foi subsidiar a proposta sobre a segregação de *Vernonia* em gêneros menores (*sensu* ROBINSON) ou da manutenção de sua integridade (*sensu* BAKER) mediante a comparação de cariótipo. No total, foram estudadas 14 espécies de *Vernonia*. Oito delas, pertencentes à seção *Lepidaploa*, correspondentes às subseções *Axilliflorae*, *Macrocephalae*, *Oligocephalae*, *Paniculatae* e *Scorpioideae* foram estudadas através da técnica de Giemsa. As espécies foram coletadas em áreas de cerrado e de campo rupestre e em ambiente perturbado, nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás. Foram realizadas contagens cromossômicas nestas mesmas espécies, que variaram de $2n=20$ a $2n=60$ e, elaborados cariótipos, verificando-se o predomínio de cromossomos metacêntricos, e alguns submetacêntricos. O tamanho dos cromossomos variou de 0,73 a 3,5 μm , o tamanho total de cromatina (CTC) de 23,5 a 44,9 μm e, o índice de assimetria TF% de 32,2 a 45,9. O índice de assimetria intracromossômica (A_1) variou de 0,30 a 0,85, enquanto o índice de assimetria intercromossômica (A_2) de 0,14 a 0,40. *Vernonia rubriramea* foi a espécie que mostrou ter cariótipo mais simétrico. Também foi elaborada uma coletânea dos números cromossômicos das espécies de *Vernonia*, incluindo os resultados obtidos e os disponíveis em literatura, como publicações de revisão e artigos específicos. Foram aplicadas as

técnicas de bandamentos AgNOR e CMA/DA/DAPI e a técnica de FISH com a sequência de DNAr 45S em algumas espécies de *Vernonia*, incluindo também algumas que tiveram seu cariótipo elaborado com técnicas de coloração convencional (Giemsa). De modo geral, as espécies apresentaram dois sítios de DNAr 45S terminais, sempre localizados no braço curto do cromossomo, com exceção de *V. condensata* e *V. geminata*, com quatro, e *V. bardanoides*, com seis sítios. A hibridação *in situ* evidenciou, na população de *V. geminata* coletada em Assis, um par de sítios de DNAr 45S centromérico, e na população coletada em Analândia, dois sítios apareceram em cromossomos B. Foram observados até seis cromossomos Bs nesta última população. Essa foi a única espécie que apresentou cromossomos extranumerários. Os bandamentos CMA/DA/DAPI e AgNOR evidenciaram em algumas espécies, um par de bandas CMA⁺ e um par de bandas NOR, sempre localizadas na região terminal do braço curto dos cromossomos, com exceção de *V. platensis* e *V. scorpioides*, que apresentaram três pares de bandas CMA⁺. Os dados cariotípicos obtidos no presente trabalho e mais dados em literatura não são suficientes para apoiar conclusivamente qualquer das propostas taxonômicas vigentes para *Vernonia*, devido à inexistência de um padrão cariotípico característico/distintivo para cada grupo taxonômico, ou seja, para suas seções e subseções (*sensu* BAKER) ou para os novos gêneros (*sensu* ROBINSON), considerados a partir de seu desmembramento. No entanto, até o momento, parece existir uma tênue relação com a conceituação de ROBINSON (1999a) para os gêneros *Lessingianthus*, *Vernonanthura*, e *Chrysolaena*, com os números cromossômicos obtidos. Diante da não disponibilidade de sondas funcionais com as sequências de DNAr 5S e DNA telomérico, tentou-se a obtenção de sondas específicas para *Vernonia* mediante a técnica de PCR com primers específicos. Obteve-se sucesso apenas na amplificação do DNA telomérico com os primers de *Arabidopsis* (Tel-1 e Tel-2).

Abstract

The genus *Vernonia* is the largest of the tribe Vernonieae (Asteraceae), comprising more than 1.000 species. The greatest center of diversity of this genus from the New World is in Brazil. The subdivisions of *Vernonia* have been a difficult constituency because of its size, which accommodates many variations and parallels. Recently, this genus was dismembered into 22 genera and *Vernonia* was restricted to North America. However, most of the modifications proposed were not accepted for others workers in this field. In order to assess the validity of maintaining this genus (*sensu* BAKER) or dividing it into several lesser genera (*sensu* ROBINSON), we described a mitotic analyses (Giemsa technique) of eight species of *Vernonia*, belonging to subsections *Axilliflorae*, *Macrocephalae*, *Oligocephalae*, *Paniculatae* and *Scorpioideae* of the section *Lepidaploa*. Specimens were collected in “cerrado”, rupicolous and disturbed areas, in the states of Sao Paulo, Minas Gerais and Goiás. Chromosome numbers ($2n=20$ to $2n=60$) and karyotypes were analyzed, with predominance of metacentric and some submetacentric chromosomes. The chromosomes size varied from 0.73 to 3.5 μ m, the total chromatin length (TCL) ranged from 23.5 to 44.9 μ m, and the asymmetry index TF% ranged from 32.2 to 45.9%. The intrachromosomal asymmetry index (A_1) varied from 0.30 to 0.85, while the interchromosomal asymmetry index (A_2) ranged from 0.14 to 0.40. The species *V. rubriramea* had the most symmetrical karyotype. We prepared a compilation of the chromosome numbers of species of *Vernonia*, including the results obtained here and the available literature, as publications of review and specific articles. We applied AgNOR and CMA/DA/DAPI banding and FISH with the sequence of rDNA 45S in some species of *Vernonia*, including some that had their karyotype analyzed with the Giemsa technique. The chromosome number ranged from $2n =$

20 to 60, but most frequent chromosomal numbers were $2n = 32$ and 34. Generally, the species showed two terminal sites of rDNA 45S, always located on the short arm of chromosome, except for *V. condensata* and *V. geminata*, with four, and *V. bardanoides*, with six sites. The technique of FISH showed in the population of *V. geminata* collected in Assis, one pair of centromeric sites of rDNA 45S, and the population collected in Analândia, two sites appeared in B chromosomes. That was the only species that showed extra numerous chromosomes. The CMA/DA/DAPI and AgNOR banding neither evidenced in some species, one pair of CMA⁺ bands and one pair of NOR bands, always located in the terminal region of the short arm of chromosome, except for *V. platensis* and *V. scorpioides*, which had three pairs of CMA⁺ bands. Despite of the little representativity of the samples, the karyotypic characters obtained in this study and in literature did not allow conclusive support to the taxonomic proposes to *Vernonia*, due to the inexistence of a distinctive/characteristic karyotypic pattern for each taxonomic group, which means, sections and subsections (*sensu* BAKER) or new genera (*sensu* ROBINSON). Nevertheless, the available data indicate only a tenuous relationship between the chromosome numbers observed here and reported in the literature compared to the taxonomic reorganization of the genera *Lessingianthus*, *Vernonanthura* and *Chrysolaena*. Due to the non-availability of functional probes with the rDNA 5S and telomeric sequences, we tried to obtain probes specific for *Vernonia* with the PCR technique with specific primers. We had sucess only in the DNA amplification with telomeric primers of *Arabidopsis* (Tel-1 and Tel-2).

INTRODUÇÃO GERAL

Caracterização taxonômica do gênero *Vernonia*

A família Asteraceae é considerada o segundo grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, com aproximadamente 1.535 gêneros e 23.000 espécies, representando cerca de 10% da flora mundial (BREMER 1994, 1996; JUDD *et al.* 1999). Apresenta plantas de hábito extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores (BREMER 1994). As Asteraceae são encontradas em todos os tipos de habitats, principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (BREMER 1994).

A América do Sul atualmente possui cerca de 30% da diversidade genérica de Asteraceae e 50% da diversidade específica (BREMER 1994; HIND 1993). No Brasil ocorrem aproximadamente 196 gêneros e 1.900 espécies desta família.

Estudos filogenéticos recentes têm gerado muitos posicionamentos taxonômicos diferentes nesta família com relação à conceituação e delimitação das subfamílias e tribos, além da real circunscrição dos inúmeros gêneros (PANERO & FUNK 2002).

Entre os trabalhos clássicos está o de BENTHAM (1873), que tendo como base os estudos de CASSINI (1817), LESSING (1829, 1830, 1831a, 1931b, 1832) e DE CANDOLLE (1836), separou as Asteraceae em duas subfamílias e 13 tribos. Essa classificação foi bem aceita e considerada a base da sistemática em que a família tradicionalmente é citada. Mais tarde, HOFFMANN (1894) realizou algumas modificações nessa classificação, mas reconheceu as subdivisões de BENTHAM (1873), sendo esse tratamento adotado por muito tempo nos trabalhos de Asteraceae.

BREMER & JANSEN (1992) publicaram um estudo filogenético baseado em dados morfológicos e moleculares com DNA de cloroplasto. Neste trabalho, excluíram a subtribo Barnadesiine de Mutiseae, elevando-a a categoria de subfamília.

As grandes modificações em relação às Asteraceae foram apresentadas por APG II (2003), em que dados moleculares associados a morfológicos resultaram na divisão da família em 10 subfamílias mais o grupo *Stiffia*. As Barnadesioideae emergiram como grupo irmão das outras Asteraceae e as Mutisioideae, juntamente com o grupo *Stiffia* e mais oito subfamílias, formaram um grupo monofilético sustentado por sinapormofias, como ramos do estilete longos, pilosos e inversão do DNA do cloroplasto.

Ainda que a divisão intrafamiliar ainda esteja em discussão, um dos maiores problemas dentro de Asteraceae é a circunscrição de gêneros com grande número de espécies, como *Aster* L., *Eupatorium* L., *Senecio* L. e *Vernonia* Schreb. No Brasil as grandes modificações são percebidas principalmente em *Eupatorium* e *Vernonia*, gêneros bem representados e muito importantes na flora brasileira (BREMER 1994; ROBINSON 1999a; NAKAJIMA 2000).

A tribo Vernonieae *sensu* BENTHAM (1873) provavelmente é uma das mais conhecidas das Asteraceae, e se diferencia por apresentar capítulo homógamo de flores hermafroditas, corolas tubulosas e os ramos dos estiletos agudos e longos (BREMER 1994). Possui distribuição pantropical, não ocorrendo em regiões temperadas e frias de ambos os hemisférios, apresentando muitas vezes espécies com um endemismo pronunciado para uma dada localidade (JONES 1977; BARROSO 1986; SEMIR 1991; BREMER 1994).

No Brasil, Vernonieae *sensu* BENTHAM (1873) foi revista por BAKER (1873), apresentando cerca de 40 gêneros e 450 espécies (JONES 1977, BARROSO 1986). BENTHAM (1873) classificou os gêneros desta tribo com base, principalmente, na variação do papus e em

algumas características da inflorescência, citando o gênero *Vernonia* como o mais representativo. Esta classificação foi aceita quase sem mudanças por HOFFMAN (1894), que não concordou com a inclusão do gênero *Gorceixia* Baker em Vernonieae e a transferência de *Gongrothammus* Steetz ex Peters para o gênero *Vernonia*. Segundo BREMER (1994), as classificações propostas para esta tribo não definem claramente os limites genéricos, existindo dúvidas e posições conflitantes quanto ao número de gêneros e de suas respectivas espécies.

Vernonia é um dos maiores gêneros de Asteraceae, com cerca 1.000 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da América, África e Ásia (LEITÃO FILHO *et al.* 1972; JONES 1982). Segundo DEMATTEIS & FERNÁNDEZ (2000) na América do Sul existem cerca de 350-400 espécies, com maior ocorrência no Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia.

Vernonia é um dos gêneros de maior complexidade taxonômica na família Asteraceae (DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998). Esta complexidade é gerada principalmente pela extrema diversidade de formas biológicas que o gênero exhibe (STUTTS 1988), desde pequenas ervas rosuladas até grandes árvores. Muitos autores já tentaram esclarecer a taxonomia do gênero (CABRERA 1944; JONES 1977, 1979a, 1979b, 1981, 1982; STUTTS 1981, 1988; ROBINSON 1987a, 1987b, 1987c, 1988a, 1988b, 1988c, 1990a, 1990b, 1992a, 1992b, 1993a, 1993b, 1994, 1996, 1999a, 1999b), porém, até o presente, os resultados são conflitantes. A importância do entendimento deste gênero para a classificação da tribo tem sido salientada desde JONES (1979a) até BREMER (1994).

Tradicionalmente o gênero *Vernonia* é caracterizado principalmente pelo tipo de substâncias químicas, em especial lactonas sesquiterpênicas, coloração das flores e número cromossômico (BENTHAM 1873; JONES 1982; ROBINSON 1999a, 1999b). As espécies do Novo Mundo apresentam flores arroxeadas e número cromossômico $n=16$ ou 17 , enquanto que as

espécies restritas ao Velho Mundo apresentam flores amareladas ou alaranjadas e número cromossômico $n=9$ ou 10 . Entretanto, há dificuldade na circunscrição das subdivisões devido ao tamanho do gênero, que acomoda muitas variações e paralelismos (JONES 1979b). No Brasil, a maioria das espécies pertence à seção *Lepidaploa* (Cass.) DC. e, esta seção está subdividida em seis subseções: *Axilliflorae* Benth., *Glomeratae* Benth., *Macrocephalae* Benth., *Oligocephalae* Benth., *Paniculatae* Benth. e *Scorpiodeae* Benth (BAKER 1873).

BREMER (1994) salientou que *Vernonia* se tornará um gênero monofilético se for reduzido drasticamente ou expandido para incluir um grande número de espécies, possivelmente enquadradas na maioria dos outros gêneros de Vernonieae. O autor concluiu que a única possibilidade praticável era dividir o gênero em outros monofiléticos menores.

O estudo mais recente é o de ROBINSON (1999a), que desmembrou o gênero *Vernonia* em outros 22 gêneros, e o mesmo ficou restrito apenas aos representantes localizados na América do Norte. Assim, as espécies de *Vernonia* da América do Sul e, principalmente brasileiras, foram segregadas nos gêneros: *Echinocoryne*, *Cyrtocymura*, *Eirmocephala*, *Lessingianthus*, *Chrysolaena*, *Cuatrecasacanthus*, *Joseanthus*, *Acilepidopsis*, *Mesanthophora*, *Vernonanthura*, *Minasia*, *Dasyandantha*, *Dasyanthina*, *Quechualia*, *Cololobus*, *Pseudopiptocarpha*, *Lepidaploa*, *Critoniopsis*, *Stenocephalum*, *Hololepis*, *Mattfeldonthus* e *Trepadonia*. As transferências destes gêneros, excluindo *Hololepis* DC e *Minasia* H. Rob, não foram aceitas por outros autores.

Importância econômica de *Vernonia*

O gênero *Vernonia* apresenta grande importância medicinal e mais de 20 espécies já estão documentadas como curativas no sistema etno-medicinal africano (JOHRI & SINGH 1997).

No Brasil, as folhas das plantas deste gênero são empregadas na medicina popular em casos de gripe, resfriados, tosses, bronquite, contusões, hemorróidas e infecções do útero (CORRÊA *et al.* 2004).

Em alguns países da África, muitas espécies de *Vernonia* são utilizadas medicinalmente para o tratamento de malária, infecções, amebíase e doenças sexualmente transmissíveis (KAMBIZI & AFOLAYAN 2001, TONA *et al.* 2004). Algumas já tiveram sua ação comprovada cientificamente, como a espécie *V. colorata* (Willd.) Drake, que possui atividade antibacteriana e antiinflamatória (RABE *et al.* 2002) e *V. cinerea* (L.) Less., com atividade analgésica, anti-inflamatória, antipirética e ação citotóxica (IWALEWA *et al.* 2003). Diversas espécies *Vernonia*, vulgarmente conhecidas como assa-peixe, são melíferas, sendo distribuídas em todo Brasil (BARTH *et al.* 2005).

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby é uma planta medicinal que possui o sistema subterrâneo rico em frutanos do tipo inulina que, por hidrólise enzimática, podem constituir alternativa para a produção comercial de frutose (PESSONI *et al.* 2004).

As folhas de *V. polyanthes* Less. são utilizadas no tratamento de afecções do aparelho respiratório, de problemas renais, de feridas e em torções, contusões e luxações. A espécie ainda é indicada como tônica e diurética (GRANDE *et al.* 1989).

Além disso, algumas espécies são produtoras de óleos essenciais e fornecem mel de boa qualidade, sendo procuradas pelas abelhas, tanto pelo néctar, como pelo pólen (BARTH *et al.* 2005).

Citotaxonomia

A análise taxonômica pode ser subsidiada por caracteres cromossômicos obtidos a partir do estudo citotaxonômico. A citotaxonomia baseia-se nas características estruturais e numéricas dos cromossomos e, portanto, faz parte do estudo citogenético (STACE 1989).

O número cromossômico de uma espécie é uma das principais características utilizadas na citotaxonomia de plantas, auxiliando na verificação da diferenciação das mesmas. Quando espécies de um complexo taxonômico possuem números cromossômicos discordantes, estes podem vir a ser um caráter que as separe, principalmente se a diferença cromossômica acompanhar as variações morfológicas (GUERRA 1988; STACE 1989). No que diz respeito às plantas medicinais, uma classificação taxonômica precisa é de fundamental importância para que se tenha controle do material de interesse.

O estudo do cariótipo é um importante instrumento na definição de uma espécie, já que pode auxiliar na resolução de problemas taxonômicos e mostra como muitas espécies estão relacionadas evolutivamente. Além disso, uma caracterização clara e precisa dos cromossomos também é fundamental quando se quer comparar citogeneticamente indivíduos e populações de uma mesma espécie (GUERRA 1988; STACE 1989).

Segundo RUAS (1991), a análise cariotípica envolvendo dados de tamanho dos cromossomos, relação entre os braços, presença de satélites e constrições secundárias, pode trazer informações valiosas. Além da análise cariotípica, outros dados, como o aspecto do

núcleo interfásico e o comportamento de cromossomos meióticos, são utilizados basicamente na Citotaxonomia (VOSA 1985; GUERRA 1988).

De acordo com STEBBINS (1977), os resultados obtidos mediante as análises citogenéticas são importantes ferramentas na compreensão de parentescos e dos mecanismos evolutivos que ocorrem dentro dos gêneros, famílias e até divisões. Como a morfologia e o número cromossômico não se alteram em função de variações ambientais (frio/calor – solo) ou fisiológicas (senescência) (GUERRA 1988), são caracteres taxonômicos relativamente confiáveis. Alterações nos padrões morfométricos significam um direcionamento evolutivo das espécies (GUERRA 1985).

As técnicas de bandamento cromossômico e de hibridação *in situ* têm contribuído para a análise taxonômica e evolutiva de diversos grupos de angiospermas (STACE 1989). O bandamento com fluorocromos (CMA e DAPI) é utilizado para determinar a composição de bases da heterocromatina (SCHWEIZER 1976). O fluorocromo DAPI (4'-6 diamino – 2 fenilindol) evidencia seqüências de DNA repetitivas ricas em adenina e timina (A-T), enquanto o CMA (cromomicina A₃) se liga à regiões ricas em citosina e guanina (C-G). A hibridação de DNA *in situ* (FISH) permite a análise do número e localização física de determinadas seqüências gênicas (SUMNER 1972; HESLOP-HARRISON *et al.* 1991). As principais seqüências de DNA repetitivo utilizadas na citogenética vegetal são as que codificam os genes de DNA ribossômicos 45S (18S-5,8S-26S) e 5S, de telômeros e microssatélites, além de alguns grupos de DNA satélites (SUMNER 1972; HESLOP-HARRISON *et al.* 1991).

Existem poucos estudos envolvendo técnicas de bandamento com fluorocromos e hibridação *in situ* em espécies de Asteraceae. Na tribo Vernonieae, em *Lychnophora*,

MANSANARES (2004) encontrou variado número de sítios de DNAr 45S (2 a 10) distribuídos entre algumas espécies, ressaltando a importância dos mesmos na caracterização de algumas espécies com problemas de delimitação taxonômica.

Na tribo Heliantheae, em dez das espécies de *Helianthus* L., VANZELA *et al.* (2002) caracterizaram a localização de sequências repetitivas (DNAr 45S e CMA₃) com níveis de ploidia diferentes, inferindo que rearranjos envolvendo pequenos segmentos de DNAr e heterocromáticos foram de grande importância na evolução das espécies deste taxon.

Na tribo Carduceae, em sete espécies de *Xeranthemum* L. e gêneros relacionados, GARNATJE *et al.* (2004) mostraram que os sítios de DNAr 45S e as bandas evidenciadas por CMA₃, na maioria das vezes são co-localizados, e também sugeriram que a disploidia descendente tem um papel proeminente na evolução do complexo estudado.

Estudos cromossômicos em *Vernonia*

O gênero é bastante variável, do ponto de vista cromossômico. Os números cromossômicos variam de $2n=18$ a 160 (DARLINGTON & WYLIE 1955; FEDOROV *et al.* 1969; MOORE 1973, 1974, 1977; GOLDBLATT 1981, 1984, 1985, 1988; GOLDBLATT & JOHNSON 1990, 1991, 1996, 1998, 2006, 2008).

Apesar da existência de alguns estudos (MATHEW & MATHEW 1982; RUAS *et al.* 1991; DEMATTEIS 1996, 1998a, 1998b, 2002; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b) a cariotipagem com técnicas convencionais abrange apenas cerca de 10% das espécies. Até o momento, a aplicação dessas técnicas, como por exemplo, a coloração de Giemsa (GUERRA 1983), não discrimina muito bem as espécies já estudadas (RUAS *et al.* 1991; DEMATTEIS 1996, 1998; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998a, 1998b, 2000), devido à pequena

variação de tamanho cromossômico e de posição centromérica. OLIVEIRA *et al.* (2007a, 2007b) analisaram 12 espécies brasileiras de *Vernonia* pertencentes à cinco subseções da seção *Lepidaploa sensu* BAKER (1873), e não observaram um padrão cariotípico característico/ distintivo para cada grupo taxonômico, ou seja, as seções e subseções (*sensu* Baker 1873) ou novos gêneros (*sensu* ROBINSON 1999a).

As espécies de *Vernonia* dos paleotrópicos apresentam número cromossômico básico $x=9$ ou 10, enquanto as espécies nos neotrópicos apresentam $x=17$, provavelmente derivado do número 9 (JONES 1979b). Esta probabilidade é apoiada por BREMER (1994) que referiu-se ao número $x=17$ como apomórfico quando comparado com a proximamente relacionada tribo Labiatae, onde $x=9$ prevalece.

Até o momento, informações cariotípicas obtidas por técnicas que promovem a diferenciação linear dos cromossomos (bandamento e hibridação *in situ*) são inexistentes para espécies do gênero *Vernonia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.
- BAKER, J.G. 1873. Compositae I. Vernoniae: In Martius, C.F & Eichler, A.G. (eds.). 6(2). *Flora brasiliensis*. Lipsiae, Monachii. pp 180.
- BARROSO, G. M. 1986. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Vol. III. Viçosa, Imp. Universitária da Univ. Federal de Viçosa, pp. 326.
- BARTH, M. O; MAIORINO, C.; BENATTI, A. P. T.; BASTOS, D. H. M. 2005. Determinação de parâmetros físico-químicos e da origem botânica de méis indicados indicados monoflorais do sudeste do Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25: 229-233.
- BENTHAM, G. 1873. Compositae: In: G. Bentham & J.D. Hooker (eds.) *Genera Plantarum*. London, Lovell Reeve 2: 163-533.
- BREMER, K. 1994. Asteraceae – Cladistic & Classification. Portland, Oregon, Timber Press. pp. 752.
- BREMER, K. 1996. Major clades and grades of the Asteraceae. In D.J.N. Hind & H.J. Beentje. Eds. Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference. Vol. 1. Kew: Royal Botanic Gardens. pp. 1-7.
- BREMER, K. & JANSEN, R.K. 1992. A new subfamily of the Asteraceae. *Annals of. Missouri Botanical Garden*. 79: 414-415.
- BREMER, K., JANSEN, R. K., KARIS, P. O., KÄLLERSJÖ, M., KEELEY, S. C., KIM, K.-J., MICHAELS, H. J., PALMER, J. D. & WALLACE, R. S. 1992. A review of the phylogeny and classification of the Asteraceae. *Nordic Journal of Botany* 12:141-148.
- CABRERA, A.L. 1944. Vernoniae argentinas (Compositae). *Darwiniana* 6 (3): 265-379.
- CASSINI, H. 1817. Aperçu des genres nouveaux foumes par M. Henri Cassini dans la famille dès Synanthéreés. Paris. *Bulletin des Sciences par la Société Philomatique* 4: 66-68.
- CORRÊA, R.M.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J.E.B.P.; REIS, E.S.; ALVES, T.L. 2004. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes tipos de secagem. *Ciência e Agrotecnologia* 28(2): 339-344.
- DARLINGTON, C.; WYLIE, A.P. 1955. Chromosome Atlas of Flowering Plants. 2ª edição. George Allen & Unwin LTD, Ruskin House Museum Street, London.
- DE CANDOLLE, A.P. 1836. *Compositae. Prodomus Systematics Naturalis Regni Vegetabilis* 5: 4-706.

- DEMATTEIS, M. 1996. Estudios cromosomicos en especies Argentinas de *Vernonia* (Asteraceae). *Bonplantia* 9(1-2): 103-110.
- DEMATTEIS, M. 1998a. Chromosome studies of some *Vernonia* species. (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 381 - 385.
- DEMATTEIS, M. 1998b. Karyotype analysis in some *Vernonia* species (Asteraceae) from South America". *Caryologia* 51: 279-288.
- DEMATTEIS, M. 2002. Cytotaxonomic analysis of South American species of *Vernonia* (Vernonieae: Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 139: 401-108.
- DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 1998. karyotypes of seven South American species of *Vernonia* (Asteraceae). *Cytologia* 63: 323-328.
- DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 2000. Chromosomes studies on nine South American species of *Vernonia* (Vernonieae, Asteraceae). *Caryologia* 53(1): 61.
- FEDOROV, A.A. 1969. *Chromosome number of flowering plants*. V.L. Komarov Botanical Institute, Leningrado.
- GARNATJE, T.; VALLÉS, J.; VILATERSANA, R.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; SILJAC-YAKOVLEV, S. 2004. Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). *Plant Biology* 6:140–146.
- GOLDBLATT, P. 1981. Index to plant chromosome numbers 1975-1978. *Monographs in systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V5. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1984. Index to plant chromosome numbers 1979-1981. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V8. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1985. Index to plant chromosome numbers 1982-1983. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V13. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1988. Index to plant chromosome numbers 1984-1985. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V23. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1990. Index to plant chromosome numbers 1986-1987. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V30. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.

- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1991. Index to plant chromosome numbers 1988-1989. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V40. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1996. Index to plant chromosome numbers 1992-1993. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V58. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1998. Index to plant chromosome numbers 1994-1995. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 2006. Index to plant chromosome numbers 2001-2003. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 2008. Index to plant chromosome numbers 2004-2006. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GRANDE, T.S.M.; TRINDADE, J.A.; PINTO, M.J.F.; FERREIRA, L.L.; CATELLA, A.C. 1989. Botanical survey on medicinal plants used by State of Minas Gerais, Brazil. Simpósio de Química e Farmacologia de Produtos Naturais.
- 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. 1985. Cytogenetics of Rutaceae III. Heterochromatin patterns. *Caryologia* 38: 335-366.
- GUERRA, M. 1988. *Introdução à citogenética Geral*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara.
- HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T.; ANAMTHAWAT-JONSSON, K.; LEITCH, A.R.; SHI, M.; LEITCH, I.J. 1991. In situ hybridation with automated chromosome denaturation. *Technique* 3:106-109.
- HIND, D.J.N. 1993. Notes of Compositae of Bahia, Brazil: I. *Kew Bulletin* 48: 245-277.
- HOFFMAN, C. 1894. Vernonieae: In Engler, A. & Prantl, K. (eds.) *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig, Wilhelm Engelmann, 8: 120-129.
- IWALEWA, E. O.; IWALEWA, O. J.; ADEBOYE, J. O. 2003. Analgesic antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* Less. leaf. *Journal of Ethnopharmacology* 86: 229.
- JOHRI, R.K. & SINGH, C. 1997. Medicinal uses of *Vernonia* species. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 19:744-752.

- JONES, S.B. 1977. Vernonieae – systematic review. In: Heywood VH, Harbone JB, Turner BL, eds. *The biology and chemistry of the Compositae I*, Vol. I, pp. 503-521. London: American Press.
- JONES, S.B. 1979a. Synopsis and pollen morphology of *Vernonia* (Compositae: Vernonieae) in the New World. *Rhodora* 81: 425-447.
- JONES, S.B. 1979b. Chromosome numbers of Vernonieae (Compositae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 106: 79-86.
- JONES, S.B. 1981. Synoptic classification and pollen morphology of *Vernonia* (Compositae: Vernonieae) in the Old World. *Rhodora* 83: 59-75.
- JONES, S.B. 1982. A revision of *Vernonia* series *Buddleiifoliae* (Compositae: Vernonieae). *Brittonia* 34: 102-117.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, P.F. *Plant Systematics/ A Phylogenetic Approach*. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999. cap. 8, p. 161-419.
- KAMBISI, L. & AFOLAYAN, A. J. 2001. An ethnobotanical study of plants used for the treatment of sexually transmitted diseases (njovhera) in Guruve District, Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology* 77: 5
- LEITÃO-FILHO, H.; ARANHA, C.; BACCHI, O. 1972. *Plantas invasoras de culturas no Estado de São Paulo*. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, Campinas, 291p.
- LESSING, C.F. 1829. De synanthereis herbarii regii berolinensis disertationes. I - Vernonieae. *Linnaea* 4: 240-356.
- LESSING, C.F. 1830. Synanthereis herbarii regii berolinensis, Dissertatio Segunda. *Linnaea* 5: 1-42.
- LESSING, C.F. 1831a. De synanthereis dissertatio Quarta. *Linnaea* 6: 240-288, 295-399.
- LESSING, C.F. 1831b. De synanthereis herbarii regii barolinensis disertationes. I – Verninieae. IV. *Vernoniearum mantissa*. *Linnaea* 6: 624-721.
- LESSING, C.F. 1832. Synopsis generum compositarum. Berlin: Duncker & Humblot.
- MANSANARES, M.E. 2004. Estudo citotaxonômico de espécies do gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophorinae). Tese de Doutorado. UNICAMP, Campinas SP.
- MATHEW, A. & MATHEW, P.M. 1982. Studies on South Indian Compositae II. Cytology of the genus *Vernonia* Schreb. *Cytologia* 47: 163-169.
- MOORE, R.J. (eds) 1973. Index to plant chromosome numbers 1967 – 1971. *Regnum veg.* 90: 1-539.

- MOORE, R.J. (eds) 1974. Index to plant chromosome numbers 1972. *Regnum veg.* 91: 1-108.
- MOORE, R.J. (eds) 1977. Index to plant chromosome numbers 1973 – 1974. *Regnum veg.* 96: 1-257.
- NAKAJIMA, J.N. 2000. A família Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, MG. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007a. Cytotaxonomy of species of *Vernonia*, section *Lepidaploa*, group *Axilliflorae* (Asteraceae, Vernonieae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 154: 99-108.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007b. Cytotaxonomic studies in six species of *Vernonia* (Asteraceae: Vernonieae). *Caryologia* 60: 37-47.
- PANERO, J.L. & FUNK, V.A. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae⁴ (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115(4): 909-922.
- PESSONI, R.A.; OLMEDO, P.M.O; CLEMENTE FILHA, A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2004. Produção de concentrados de frutose por inulinases de *Penicillium janczewskii* e atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 24:372-377.
- RABE, T.; MULLHOLLAND, D.; VAN STADEN, J. 2002. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 80: 91.
- ROBINSON, H. 1987a. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), III: two new genera, *Cyrtucymura* and *Eirmocephala*. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 100: 844-855.
- ROBINSON, H. 1987b. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), the genus *Stenocephalum* Sch. Bip. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 100: 578-583.
- ROBINSON, H. 1987c. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), a new genus *Echinocoryne*. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 100: 584-589.
- ROBINSON, H. 1988a. A new combination of *Vernonia libertadensis*. S.B. Jones, with notes and descriptions of additional Andean species of *Baccharis*. *Phytologia*, 65: 34-46.
- ROBINSON, H. 1988b. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) IV. The new genus *Lessinglanthus*. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 100 (4): 929-951.

- ROBINSON, H. 1988c. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) V. The new genus *Chrysolaena*. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 100 (4): 952-958.
- ROBINSON, H. 1990a. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), VII: the genus *Lepidaploa*. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 103: 248-253.
- ROBINSON, H. 1990b. Six combinations in *Baccharoides* Moench and *Cyanthillium* Blume. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 103: 248-253.
- ROBINSON, H. 1992a. A new genus *Vernonanthura* (Vernonieae: Asteraceae) *Phytologia* 73: 65-76.
- ROBINSON, H. 1992b. *Mesanthopora*, a new genus of Vernonieae (Asteraceae) from Paraguay. *Novon* 2: 169-172.
- ROBINSON, H. 1993a. Three new genera of Vernonieae from South America, *Dasyandantha*, *Dasyandanthina* and *Quechualia* (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 106 (4): 775-785.
- ROBINSON, H. 1993b. A review of the genus *Critoniopsis* in Central and South America (Vernonieae: Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 106 (3): 606-627.
- ROBINSON, H. 1994. *Cololobus*, *Pseudopiptocarpha* and *Trepadonia*, three new genera from South America (Vernonieae: Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 107 (3): 557-568.
- ROBINSON, H. 1996. The status of generic and subtribal revisions in the Vernonieae. In: Hind, D.J.N. & Beentje, H.J. (eds.). 1996. *Compositae: Systematics*. Kew, Whitestable Litho Printers Ltd., 1: 511-529.
- ROBINSON, H. 1999a. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. *Smithonian Contributions to Botany*, 89: 1-116.
- ROBINSON, H. 1999b. Two new subtribes, Stokessinae and Pacourinae, of the Vernonieae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 112(1): 216-219.
- RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; VIEIRA, O.S.; MATZENBACHER, N.I. & MARTINS, N.S. 1991. Cytogenetics of genus *Vernonia* Schreber (Compositae). *Cytologia*, 56: 239-247.
- SCHWEIZER, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and Dapi. *Chromosoma* 58:307-324.
- SEMIR J. 1991. Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Veroniaceae: Compositae). Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas.

- STACE, C.A. 1989. *Plant Taxonomy and Biosystematics*. 2 edition. New York, Cambridge University Press.
- STEBBINS, G.L. 1977. *Flowering Plants*. Cambridge University Press, Cambridge.
- STUTTS, J.G. 1981. Taxonomic revision of *Pollalesta* H.B.K. (Compositae: Vernonieae). *Rhodora* 83: 385-419.
- STUTTS, J.G. 1988. Taxonomic revision of *Vernonieae* Subsect. *Chamaedrys* (Compositae: Vernonieae). *Rhodora* 90: 37-99.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- TONA, L.; CIMANGA, R. K.; MESIA, K.; MUSUAMBA, C.T.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HERNANS, N.; VAN MIERT, S.; PIETERS, L.; TOTTE, J.; VLIETINCK, A.J. 2004. In vitro antiparasitic activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 93: 27-32.
- VANZELA, A.L.L.; RUAS, C.F.; OLIVEIRA, M.F., RUAS, P.M. 2002. Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S probe. *Genetica* 114: 105-111.
- VOSA, C.G. 1985. Chromosome banding in plants. In: *Chromosome and Cell Genetics* (Sharma, A. K. and Sharma A. eds.). Gordon and Breach Science Publisher, London, pp. 79-104.

OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste trabalho foi o estudo cariotípico de 14 espécies do gênero *Vernonia* (Tabela I, Figura 1), ampliando o conhecimento da flora brasileira do ponto de vista cromossômico.

De forma mais específica, pretendeu-se subsidiar a análise citotaxonômica do gênero *Vernonia* contribuindo para a discussão sobre a integridade do mesmo (*sensu* Baker) ou sobre o seu desmembramento em gêneros menores (*sensu* Robinson). Caracteres cariotípicos, obtidos com técnicas de coloração convencional, de bandamento e de hibridação de DNA *in situ*, foram confrontados ao posicionamento taxonômico das respectivas espécies, seja nas categorias infragenéricas (*sensu* Baker) ou nos correspondentes gêneros propostos a partir do desmembramento de *Vernonia* (*sensu* Robinson).

ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE

Esta tese está organizada em sete capítulos. Alguns desses capítulos seguem os padrões de formatação para submissão a periódicos especializados:

- Capítulo 1: apresenta números cromossômicos, cariotipagem e uma abordagem citotaxonômica para oito espécies de *Vernonia*, pertencentes à seção *Lepidaploa*.
- Capítulo 2: traz uma revisão dos números cromossômicos e a discussão citotaxonômica do gênero *Vernonia*;
- Capítulo 3: aborda a caracterização linear dos cromossomos de duas populações de *V. geminata*, com técnicas de bandamento (CMA/DA/DAPI e AgNOR) e FISH de DNAr 45S.
- Capítulo 4: relata a aplicação da técnica de FISH com o marcador DNAr 45S em oito espécies de *Vernonia*.
- Capítulo 5: apresenta a técnica de bandamento CMA/DA/DAPI em nove espécies de *Vernonia*.
- Capítulo 6: relata os resultados da aplicação das técnicas de bandamento (CMA/DA/DAPI e AgNOR) e FISH com DNAr 45S para três espécies de *Vernonia* da subseção *Macrocephalae*.
- Capítulo 7: apresenta um ensaio para a extração de DNA e preparação de sonda com o marcador DNAr 5S.

Tabela I – Espécies de *Vernonia* analisadas no presente trabalho, distribuídas nas respectivas seções e subseções, de acordo com BAKER (1873) JONES (1981).

SEÇÃO/SUBSEÇÃO	ESPÉCIE
Seção <i>Orbisvestus</i> S.B. Jones Subseção <i>Orbisvestus</i> S.B. Jones	<i>V. condensata</i> Baker
Seção <i>Lepidaploa</i> (Cass.) DC.	<i>V. adamantium</i> Gardn.
Subseção <i>Axilliflorae</i> Benth.	<i>V. fruticulosa</i> Mart. ex DC. <i>V. geminata</i> HBK
	<i>V. bardanoides</i> Less.
Subseção <i>Macrocephalae</i> Benth.	<i>V. linearifolia</i> Less. <i>V. tomentella</i> Mart. ex DC.
Subseção <i>Oligocephalae</i> Benth.	<i>V. simplex</i> Less.
	<i>V. polyanthes</i> Less.
Subseção <i>Paniculatae</i> Benth.	<i>V. shwenkiaefolia</i> Mart. in DC. <i>V. beyrichii</i> Less.
	<i>V. platensis</i> (Sprengel) Less.
Subseção <i>Scorpioideae</i> Benth.	<i>V. rubriramea</i> Mart. <i>V. scorpioides</i> Pers.



Figura 1 – Algumas espécies de *Vernonia* estudadas pertencentes à seção *Lepidaploa sensu* BAKER (1873). *Vernonia geminata* Less., A – Detalhes da inflorescência e B – Hábito da planta. *Vernonia polyanthes* Less., C – Detalhes da inflorescência e D – Hábito da planta. *Vernonia scorpioides* Pers., E – Detalhes da inflorescência e F – Hábito da planta.

CAPÍTULO 1

NÚMEROS CROMOSSÔMICOS E CARIÓTIPOS DE ESPÉCIES DE *Vernonia* SECT.

***Lepidaploa* (ASTERACEAE: VERNONIEAE)**

Autores: OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J.

RESUMO

Foram estudadas, através da análise mitótica (técnica de Giemsa), oito espécies do gênero *Vernonia sensu* Baker (Asteraceae, Vernonieae), pertencentes à seção *Lepidaploa*, objetivando subsidiar as propostas de seu desmembramento em gêneros menores (*sensu* Robinson) ou da manutenção de sua integridade (*sensu* Baker). As espécies foram coletadas em áreas de cerrado, campo rupestre e beira de estrada, nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Foram realizadas contagens cromossômicas, que variaram de $2n=32$ a $2n=60$ e, elaborados os cariótipos, nos quais se verificou o predomínio de cromossomos metacêntricos, e alguns submetacêntricos. O tamanho dos cromossomos variou de 0,73 a 3,5 μ m, o tamanho total de cromatina (CTC) de 23,5 a 44,9 μ m e, o índice de assimetria TF% de 32,2 a 44,4. O índice de assimetria intracromossômica (A_1) variou de 0,32 a 0,85, enquanto o índice de assimetria intercromossômica (A_2) de 0,14 a 0,40. O diagrama de dispersão mostrou que a espécie *V. rubriramea* foi a que apresentou relativamente o cariótipo mais simétrico. Os resultados apresentados ainda não possibilitam a associação de um padrão cariotípico a qualquer agrupamento taxonômico (subseção/gênero). No entanto, até o momento, considerando os números cromossômicos disponíveis na literatura para inúmeras espécies, parece existir uma tênue relação dos mesmos com a conceituação de Robinson, para os gêneros *Lessingianthus*, *Vernonanthura* e *Chrysolaena*, considerados a partir do desmembramento de *Vernonia sensu* Baker.

INTRODUÇÃO

A tribo Vernonieae é diferenciada das outras Asteraceae pelo fato de seus representantes apresentarem capítulo homógamo de flores hermafroditas, corolas somente tubulosas e os ramos do estilete longos e agudos (BREMER 1994). Foi estabelecida por CASSINI (1817) e revista globalmente por vários autores (LESSING 1829, 1831a, 1931b, DE CANDOLLE 1836; BENTHAM 1873a, 1873b, HOFFMANN 1894).

Recentemente, ROBINSON (1999a), considerou que os tradicionais gêneros que compunham essa tribo deveriam ser reagrupados, sendo a sua proposição nem sempre bem aceita. Vários estudos com representantes da tribo, principalmente com o gênero *Vernonia*, efetuados por ROBINSON (1987a, 1987b, 1987c, 1988a, 1988b, 1988c, 1989, 1999a, 1999b, 1992a), culminaram com o desmembramento deste em 22 gêneros (BREMER 1994, ROBINSON 1999a).

O gênero *Vernonia* Schreb. *sensu* Baker possui mais de 1.000 espécies, formando o núcleo central da tribo Vernonieae. Possui distribuição pantropical e, no Brasil, compreende cerca de 40 gêneros e 450 espécies (BAKER 1873). Segundo dados mais recentes, existe na América do Sul cerca de 350-400 espécies, com maior ocorrência no sudeste do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Bolívia (DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 2000). O Brasil é o maior centro de diversidade de espécies de *Vernonia* do Novo Mundo (KEELEY & JANSEN 1994).

Do ponto de vista sistemático, *Vernonia* é um dos gêneros mais complexos da família Asteraceae (DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998), por apresentar extrema diversidade de formas biológicas (STUTTS 1988), desde pequenas ervas rosuladas escaposas até grandes árvores. Muitos autores já tentaram esclarecer a taxonomia do gênero (CABRERA 1944; JONES 1970, 1974, 1979a, 1981, 1982; STUTTS 1981, 1988; ROBINSON 1987a, 1987b, 1987c, 1988a, 1988b,

1988c, 1990a, 1990b, 1992a, 1992b, 1993a, 1993b, 1994; 1999a), porém, até o presente, seus resultados são contraditórios.

A maioria das espécies sulamericanas de *Vernonia* pertence à seção *Lepidaploa* (Cass.) DC. (BAKER 1873, BENTHAM 1873b). Segundo DEMATTEIS (2002), há diversos relatos de contagens cromossômicas para as espécies dessa seção, mencionando $x=10$ para a subseção *Oligocephalae*, $x=16$ para *Macrocephalae* e *Axilliflorae* e $x=17$ para *Paniculatae*.

Algumas espécies de *Vernonia* sect. *Lepidaploa* foram analisadas, mostrando que apesar de relativamente pequenos, os cromossomos apresentam algumas pequenas diferenças de tamanho e morfologia (RUAS *et al.* 1991; DEMATTEIS 1996, 1998, 2002; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b). A assimetria cariotípica é pouco variável entre as espécies, sugerindo que a diversificação deste gênero foi acompanhada por pequenas alterações na constituição cariotípica das espécies (DEMATTEIS 1996, 1998, 2002; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b).

Neste trabalho, objetivou-se o estudo citotaxonômico de oito espécies do gênero *Vernonia* da seção *Lepidaploa*, pretendendo subsidiar a discussão sobre a manutenção das espécies (*sensu* Baker) ou o seu desmembramento em outros gêneros menores (*sensu* Robinson). Tais análises deram enfoque à determinação do número cromossômico e à elaboração de cariótipos com técnicas convencionais, contribuindo para a análise da possível relação entre os caracteres cromossômicos e o posicionamento taxonômico de suas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas oito espécies do gênero *Vernonia*, da seção *Lepidaploa*, *sensu* BAKER (1873). As espécies foram encontradas em áreas de cerrado e de campo rupestre nos estados de São Paulo e de Minas Gerais (Tabela I), além de ambientes perturbados (beira de estrada). Foram coletados e herborizados ramos florais e vegetativos, seguindo as técnicas usuais. Materiais-testemunha de todas as espécies foram depositados no Herbário UEC (Departamento de Botânica, IB, Universidade Estadual de Campinas) (Tabela I). A identificação das espécies foi feita pelo Dr. João Semir, docente da Universidade Estadual de Campinas e especialista na taxonomia da família Asteraceae. As espécies foram classificadas de acordo com BENTHAM (1873) e BAKER (1873).

Para a realização dos estudos cromossômicos (número e morfologia) em mitose foi utilizada especificamente a região meristemática da raiz, que apresenta alta taxa de divisão celular. Os frutos foram colocados para germinar em caixas plásticas transparentes do tipo Gerbox, sobre papel filtro umedecido, à temperatura ambiente. Pontas de raízes recém-germinadas foram coletadas e submetidas a pré-tratamento com solução 8 – hidroxiquinoleína 0,002M, por 5 horas, a 14-15°C. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético) por 24 horas, transferidas para álcool 70% e estocadas em freezer.

As preparações citológicas foram coradas pela técnica convencional de Giemsa (GUERRA 1983). As raízes pré-tratadas foram hidrolisadas em HCl 5N, à temperatura ambiente, por 20 minutos e lavadas em água destilada. Para a preparação das lâminas, as pontas de raízes foram esmagadas em uma gota de ácido acético 45%, entre lâmina e lamínula. As lâminas foram congeladas em nitrogênio líquido por alguns minutos e as lamínulas foram, então, removidas com auxílio de uma lâmina de barbear. Após secas à temperatura ambiente,

as lâminas foram coradas com solução de Giemsa 2%, por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada para que o excesso de corante fosse retirado. Após secas, as lâminas foram montadas com Entelam.

Contagens cromossômicas em mitose foram realizadas, em média, em 20 células por espécie.

Na elaboração dos cariótipos, as células foram desenhadas com auxílio de câmara clara; os cromossomos desenhados foram medidos com a ajuda de um paquímetro digital, fazendo-se a devida comparação com uma escala micrométrica ampliada na mesma proporção. Os cromossomos foram medidos, em média, em 10 células de cada espécie, sendo utilizada como padrão a média da medida de cada par, incluindo tamanho do cromossomo, posição centromérica e de constrições secundárias. A nomenclatura para a morfologia cromossômica adotada neste trabalho foi a de GUERRA (1986).

Para a caracterização do cariótipo foram também utilizadas medidas como CTC (comprimento total de cromatina), calculado através da somatória do tamanho individual de todos os cromossomos e o IC (índice centromérico) de cada par cromossômico, calculado dividindo-se o tamanho do braço curto pelo tamanho individual do respectivo cromossomo e multiplicando-se por 100. Também foi calculado o índice TF% (índice de assimetria), através da soma de todos os índices centroméricos de cada par e dividindo-se pelo número de pares cromossômicos multiplicado por 100 (HUZIWARA 1962). Os índices de assimetria cariotípica intracromossômico (A_1) e intercromossômico (A_2) foram calculados segundo ZARCO (1986).

Para a confecção de ideogramas, optou-se pelo arranjo dos cromossomos pela forma e não pelo tamanho, seguindo os estudos anteriores de DEMATTEIS (1998) e DEMATTEIS & FERNÁNDEZ (1998), em que foram apresentados cariótipos de espécies da tribo Vernonieae.

Foi verificado que a visualização das diferenças cromossômicas torna-se mais evidente com este tipo de arranjo dos cromossomos no ideograma.

A análise das lâminas foi feita mediante a observação em fotomicroscópio comum. Células em condições adequadas de espalhamento e condensação cromossômica foram documentadas. As fotografias foram feitas em filme branco e preto Agfa Pan ISO 25.

RESULTADOS

Quatro números cromossômicos diferentes foram obtidos para as oito espécies de *Vernonia* analisadas, $2n=32, 34, 56$ e 60 (Tabela II, Figuras 4 e 5).

Observaram-se algumas diferenças nas fórmulas cariotípicas e nos ideogramas apresentados para *V. bardanoides*, *V. beyrichii*, *V. fruticulosa*, *V. linearifolia*, *V. platensis*, *V. rubriramea*, *V. scorpioides* e *V. simplex* (Tabela II, Figuras 1 e 2). Foram observados cromossomos metacêntricos e submetacêntricos em todas as espécies analisadas, no entanto, os cromossomos são, em sua maioria, metacêntricos (Tabela II, Figuras 1 e 2).

Não foi possível discriminar constrições secundárias nas espécies estudadas.

O tamanho cromossômico variou de $0,73$ a $3,5\mu\text{m}$ (Tabela II, Figuras 1 e 2). O comprimento total da cromatina (CTC) variou de $23,5$ a $44,9\mu\text{m}$ e o índice de simetria cariotípica TF% de $32,2$ a $45,9$. (Tabela II). O índice de assimetria intracromossômico (A_1) variou de $0,30$ a $0,85$, e o índice de assimetria intercromossômica (A_2) variou de $0,14$ a $0,40$ (Tabela II). O diagrama de dispersão mostrou que a espécie *V. platensis* é a espécie que possui o cariótipo mais assimétrico (Figura 3), considerando A_1 e A_2 em conjunto. O maior grau de assimetria cariotípica dessa espécie também é mostrado pelo menor índice TF%, igual a $32,2$ (Tabela II). Por outro lado, *V. rubriramea* é a espécie com cariótipo mais simétrico quando se considera a associação de A_1 e A_2 (Figura 3), porém não apresenta o maior índice TF%, que ocorre em *V. scorpioides* (Tabela II).

DISCUSSÃO

As contagens cromossômicas para o gênero *Vernonia* variam entre $2n=18$ a $2n=160$ (DARLINGTON & WYLIE 1955; FEDOROV 1969; MOORE 1973, 1974, 1977; GOLDBLATT 1981, 1984, 1985, 1988; GOLDBLATT & JOHNSON 1990, 1991, 1996, 1998, 2006, 2008), entretanto, as mais freqüentes são $2n=32$ e $2n=34$. No presente estudo, os números cromossômicos obtidos para as espécies de *Vernonia* (Tabela II), concordam com os números citados em literatura, com exceção de *V. bardanoides* e *V. simplex*, ambas com $2n=32$. Para *V. bardanoides*, JONES (1979b) relatou anteriormente $2n=34$. No entanto, em *V. simplex*, JONES (1982) e OLIVEIRA *et al.* (2007b) relataram $2n=34$, enquanto RUAS *et al.* (1991) apresentaram $2n=40$. As contagens cromossômicas para *V. beyrichii* ($2n=34$), *V. linearifolia* ($2n=32$) e *V. rubriramea* ($2n=32$) são inéditas.

A maioria das espécies de *Vernonia* brasileiras estudadas, do ponto de vista cromossômico, pertence à seção *Lepidaploa* (Cass.) DC. (RUAS *et al.* 1991; DEMATTEIS 1996, 1998, 2002; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b). Relatos de contagens cromossômicas para as espécies dessa seção mencionam $x=10$ para a subseção *Oligocephalae*, $x=16$ para *Macrocephalae* e *Axilliflorae* e $x=17$ para *Paniculatae* (DEMATTEIS 2002).

A única espécie aqui estudada da subseção *Axilliflorae sensu* Baker, *V. fruticulosa*, apresentou número cromossômico $2n=32$ (Tabela II, Figura 5). Esse número concorda com o citado anteriormente por OLIVEIRA *et al.* (2007a) e é múltiplo de 16, número básico mais freqüente para a subseção (DEMATTEIS 1998, 2002). Todas as espécies, com dados cromossômicos disponíveis, pertencentes a esta subseção, foram incluídas por ROBINSON (1999a) no gênero *Lepidaploa*, à exceção de duas, *V. glabrata* HBK ($2n=51$, ca. 52, JONES

1979b) e *V. polyphylla* Sch. Bip. ex Baker ($2n=64$, RUAS *et al.* 1991, DEMATTEIS 2002), transferidas para o gênero *Lessingianthus*.

As espécies *V. bardanoides* e *V. linearifolia*, que apresentaram $2n=32$ (Tabela II, Figura 4), pertencem à subseção *Macrocephalae sensu* Baker. A maioria das espécies desta subseção apresenta número cromossômico múltiplo de 16 e também tem como característica a alta frequência de poliplóides (DEMATTEIS 2002). A espécie *V. bardanoides* já havia sido estudada anteriormente por JONES (1979b) que, de forma discordante, relatou $n=17$ e 34. Todas as espécies desta subseção foram incluídas no gênero *Lessingianthus* por ROBINSON (1999a).

Para a subseção *Oligocephalae sensu* Baker, da qual foi estudada apenas a espécie *V. simplex*, o número cromossômico $2n=32$ (Tabela II, Figura 5) discorda do número mais freqüente para a subseção ($x=10$, DEMATTEIS 2002) e de citações anteriores para a mesma espécie ($2n=34$, JONES 1982, OLIVEIRA *et al.* 2007b; $2n=40$, RUAS *et al.* 1991). A maioria das espécies com dados cromossômicos disponíveis desta subseção foi transferida por ROBINSON (1999a) para o gênero *Chrysolaena*, com exceção de *V. mollissima* ($2n=54$, BERNADELLO 1986) e *V. simplex* ($2n=32$ no presente trabalho e $2n=34$, JONES 1982 e OLIVEIRA *et al.* 2007b), as únicas espécies que não apresentam número cromossômico múltiplo de 10, e que foram transferidas para *Lessingianthus*. A única exceção seria a menção de $2n=40$ para *V. simplex* (RUAS *et al.* 1991).

V. beyrichii é a única espécie estudada que pertence à subseção *Paniculatae sensu* Baker. Ela apresentou número cromossômico múltiplo de 17 ($2n=34$) (Tabela II, Figura 5), que é o mais freqüente para a subseção. Todas as espécies pertencentes a esta subseção foram

incluídas por ROBINSON (1999a) no gênero *Vernonanthura* e a maioria possui número cromossômico múltiplo de 17.

Nas três espécies pertencentes à subseção *Scorpioideae sensu* Baker, *V. platensis*, *V. rubriramea* e *V. scorpioides*, os números cromossômicos (Tabela II, Figura 4) concordaram com os citados anteriormente para esta subseção, que possui diversos números cromossômicos múltiplos, em maior frequência, de 10, 16 e 17 (DEMATTEIS 2002). No presente trabalho, *V. scorpioides* apresentou número cromossômico $2n=56$ (Tabela II, Figura 4), já citado anteriormente por JONES (1970), entretanto $n=17$ (JONES 1982), $2n=30$ (HUYNH 1965) e $2n=66$ (DEMATTEIS 1998) também já foram relatados para a espécie. A espécie *V. platensis*, com $2n=60$ (Tabela II, Figura 4) também já foi citada anteriormente por GALIANO & HUNZIKER (1987) e DEMATTEIS (2002), sempre com números múltiplos de 10 ($n=10, 20, 30$ e $2n=20, 40, 50, 60$). A maioria das espécies pertencente à *Scorpioideae* foi incluída por ROBINSON (1999a) no gênero *Crysolaena*.

Os números cromossômicos obtidos ainda não possibilitam a discussão citotaxonômica do gênero *Vernonia sensu* Baker de forma conclusiva, devido à impossibilidade de associação com um padrão cariotípico em cada uma das subseções. Entretanto, parece existir uma tênue relação entre os números cromossômicos obtidos neste trabalho e na literatura com a conceituação de ROBINSON (1999a) para os gêneros *Lessingianthus*, *Chrysolaena* e *Vernonanthura*, considerados a partir do desmembramento de *Vernonia sensu* Baker (1873) (OLIVEIRA *et al.*, Capítulo 1).

Além do resultado para *V. bardanoides* e *V. simplex*, existem outros relatos na literatura indicando diferenças de números cromossômicos entre populações de uma mesma espécie. Essas diferenças podem ser decorrentes de contagens cromossômicas errôneas, muitas

vezes decorrentes do pequeno tamanho dos cromossomos das plantas; de identificações botânicas incorretas, devido à grande complexidade do grupo em estudo (STACE 1989) e/ou espécies/indivíduos poliplóides com caracteres morfológicos intermediários; ou podem ser decorrentes de aneuploidia/displóidia.

Aneuploidia/displóidia é um fenômeno comum em plantas, e ocorre pela perda ou ganho de um ou de poucos cromossomos. Na displóidia, não há alteração na quantidade de DNA do genótipo, o que ocorre na aneuploidia (STEBBINS 1977). O número cromossômico resultante não é um múltiplo exato do número básico dos verdadeiros diplóides, e geralmente muitas espécies vegetais, particularmente as formas selvagens, podem tolerar poucos cromossomos adicionais ou faltantes (STEBBINS 1977; MALALLAH *et al.* 2001).

As Vernonieae do Novo Mundo, em contraste com as do Velho Mundo, mostram grande diversidade de número cromossômico e alta proporção de espécies poliplóides (JONES 1979b; RUAS *et al.* 1991). JONES (1979b) propôs $x=17$ como número básico para espécies de *Vernonia* do Novo Mundo, porém outros autores indicam $x=9$ (BERNADELLO 1986, DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000).

BERNADELLO (1986), em sua análise das espécies de *Vernonia* Schreb., propôs que *V. nudiflora* Less. ($n=17$) e *V. saltensis* Hieron ($n=16$) seriam diplóides e *V. mollissima* D. Don ex Hook. & Am. ($n=ca. 54$) seria um poliplóide, todos originados por poliploidia com base em $x=9$. DEMATTEIS & FERNÁNDEZ (1998, 2000) também sugeriram que o número cromossômico básico ancestral para o gênero *Vernonia* provavelmente seria $x=9$, que pode ter se originado a partir de $x=10$. A espécie *V. geminata* possui $2n=20$. Os números cromossômicos maiores, encontrados em muitas espécies americanas do gênero, são considerados derivados de $x=9$ por duplicação e posterior redução (JONES 1979b, DEMATTEIS 1996). SOLBRIG (1977) também

sugeriu que espécies com número cromossômico básico diferente de $x=9$ são muito comum na família Asteraceae, como acontece na tribo Vernonieae, que apresenta muitas espécies com $n=17$. Assim, a maior parte das espécies de Vernonieae do Novo Mundo pode ter surgido pela duplicação dos cromossomos de uma espécie $n=9$ para $n=18$, e então derivada por disploidia a partir deste poliplóide, originando o número $n=17$, amplamente conhecido entre as Vernonieae neotropicais, além de $n=16$ (presente estudo, cinco dentre nove espécies, Tabela II); RUAS *et al.* 1991; DEMATTEIS 1998b; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 2000, OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b).

No presente estudo, a análise das fórmulas cariotípicas evidencia o comprimento total de cromatina (CTC) como uma das principais diferenças entre as espécies, o qual nem sempre é relacionado à diferença de número cromossômico; apenas o índice TF% e a forma dos cromossomos foram relativamente semelhantes. A maioria dos cromossomos são metacêntricos e alguns são submetacêntricos (Tabela II).

O comprimento total da cromatina (CTC) exibiu grande amplitude de variação entre as espécies estudadas (23,5 a 44,9 μm) (Tabela II). Apesar de *V. rubriramea* possuir apenas $2n=32$ cromossomos, foi a segunda espécie com maior CTC (40 μm), por exibir cromossomos maiores (1,3 a 3,5 μm). As espécies com maior número cromossômico, *V. scorpioides* ($2n=56$) e *V. platensis* ($2n=60$), apresentaram baixo CTC (31 e 44,9 μm) em relação à quantidade de cromossomos, por apresentarem os menores cromossomos (0,73 a 2,2 μm) (Tabela II).

A amplitude de variação de tamanho cromossômico obtida neste trabalho é menor (0,73 a 3,5 μm) do que a apresentada por OLIVEIRA *et al.* (2007a, 2007b) para outras 11 espécies (0,9 a 4,9 μm). Entretanto, é maior do que a relatada para as cinco espécies analisadas por DEMATTEIS & FERNÁNDEZ (2000) (1,43 a 2,08 μm).

Todas as espécies aqui analisadas apresentam cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, porém em diferentes proporções (Tabela II, Figuras 1 e 2). A maioria dos cromossomos metacêntricos é do tipo A (entre 2,6 a 3,5 μ m) e B (entre 1,6 a 2,5 μ m) enquanto que a maioria dos submetacêntricos é do tipo B, ou seja, com tamanho intermediário (entre 1,6 a 2,5 μ m) (Tabela II, Figuras 1 e 2). Os cromossomos são, em sua maioria, metacêntricos, concordado com os dados avaliados em literatura para a tribo Vernonieae (RUAS *et al.* 1991; DEMATTEIS 1996, 1998; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000, OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b).

Segundo STEBBINS (1977), a assimetria cariotípica é uma tendência evolutiva nas angiospermas. Deste modo, no presente trabalho, foram calculados os índices de assimetria intracromossômica (A_1) e intercromossômica (A_2) e o índice de simetria TF%.

Com relação aos índices de assimetria intracromossômica (A_1) e intercromossômica (A_2), que são usados quando não existem grandes diferenças de tamanho e morfologia cromossômica, observaram-se algumas semelhanças entre as espécies analisadas (Tabela II, Figura 3). A relação entre os índices A_1 e A_2 de todas as espécies analisadas (Figura 3) mostra que existe pequena variação entre as mesmas. A maioria apresentou alto grau de assimetria intracromossômica, com índice A_1 , entre 0,7 a 0,83 (Tabela II). As espécies *V. rubriramea* e *V. fruticulosa* apresentam assimetria cariotípica intracromossômica mais diferenciada (Figura 3), tendo índices A_1 mais baixos, 0,32 e 0,30, respectivamente (Tabela II). Por outro lado, os índices A_2 aqui obtidos foram baixos para a maioria das espécies, entre 0,14 e 0,29, com exceção de *V. platensis*, que apresentou este índice de assimetria mais alto (0,40). Os resultados obtidos aqui, não são tão homogêneos em relação às espécies da subseção

Axilliflorae, obtidos por OLIVEIRA *et al.* (2007a), onde a amplitude de variação de A_1 foi de 0,13 a 0,22 e de A_2 , 0,14 a 0,19.

Cariótipos mais simétricos estão relacionados com TF% maiores, próximos de 50%, enquanto que valores mais baixos indicam assimetria, causada principalmente pelo deslocamento da posição do centrômero em alguns cromossomos (LOMBELLO & FORNI-MARTINS 1998). RUAS *et al.* (1991) sugeriram que a assimetria cariotípica em *Vernonia* é do tipo moderado. No presente trabalho, os índices TF% foram parecidos com os obtidos por RUAS *et al.* (1991) e por OLIVEIRA *et al.* (2007a, 2007b). No presente estudo, os valores de TF% variaram de 42,1 a 45,9, com exceção de *V. platensis*, que apresentou índice TF% igual a 32,2. Assim essa espécie poderia ser considerada a mais derivada dentre as estudadas aqui e a espécie *V. scorpioides*, como a mais primitiva.

RUAS *et al.* (1991), DEMATTEIS (1996, 1997) e DEMATTEIS & FERNÁNDEZ (1998) consideram que em *Vernonia*, espécies mais primitivas ($x=10$, $x=17$) possuem cromossomos maiores (1,9 a 2 μ m) do que as mais derivadas ($x=14$, 15; 1,3 a 1,4 μ m). Os resultados obtidos no presente estudo concordam, em parte, com os obtidos por DEMATTEIS & FERNÁNDEZ (1998) e com a teoria de STEBBINS (1977), discutida anteriormente. A espécie *V. platensis*, que seria considerada a mais derivada pelo critério de simetria cariotípica (STEBBINS 1977), apresentou cromossomos pequenos (0,92 a 2,2 μ m), porém possui número básico $x=10$. *Vernonia simplex* ($2n=32$, $x=16$), que seria considerada como a mais primitiva, em virtude do maior tamanho cromossômico (1,29 a 3,26 μ m), não possui número cromossômico básico múltiplo de 10 ou 17.

Apesar das diferenças em alguns parâmetros cariotípicos, os dados cromossômicos não parecem dar um amplo subsídio para a taxonomia deste grupo, não diferenciando

seções/subseções de *Vernonia* ou novos gêneros sugeridos a partir de seu desmembramento. Isso se deve ao fato de que os cromossomos são pequenos e as diferenças morfológicas não são prontamente detectadas mediante a análise de uma ou poucas células de cada espécie, mas são ressaltadas apenas pela comparação de valores médios, resultantes de uma maior amostragem. Entretanto, o conjunto de caracteres (número, tamanho e posição centromérica) pode ser útil na caracterização e distinção de espécies cuja morfologia externa (caracteres vegetativos e reprodutivos) seja muito parecida.

Essa situação pode ser exemplificada por *V. cincta* Griseb. e *V. scorpioides* (Lam.) Pers., nas quais a delimitação taxonômica e relações filogenéticas têm sido amplamente discutidas. Alguns autores consideram que *V. cincta* é uma variedade de *V. scorpioides* (CABRERA 1944, 1978), enquanto outros sugerem que são espécies diferentes (ROBINSON 1987). No entanto, do ponto de vista cromossômico, DEMATTEIS (1998) subsidiou a separação entre as duas espécies. Elas apresentam números cromossômicos distintos ($2n=60$ para *V. cincta* e $2n=66$ para *V. scorpioides*) e também diferenças na fórmula cariotípica, mostrando quantidades diferentes de cromossomos submetacêntricos e telocêntricos.

No presente trabalho, o número cromossômico obtido para *V. scorpioides* é diferente ($2n=56$), do que o apresentado por DEMATTEIS (1998), $2n=66$; por JONES (1982, $2n=17$ e por HUYNH 1965, $2n=30$), reforçando a dificuldade na delimitação taxonômica nessa espécie e sugerindo a existência de citótipos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos de Vanessa Mancuso de Oliveira e financiamento deste trabalho (#04/09982-1, #04/13165-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, J.G. 1873. Compositae I. Vernoniaeae: In Martius, C.F & Eichler, A.G. (eds.). 6(2). *Flora brasiliensis*. Lipsiae, Monachii. pp 180.
- BENTHAM, G. 1873a. Compositae: In: G. Bentham & J.D. Hooker (eds.) *Genera Plantarum*. London, Lovell Reeve 2: 163-533.
- BENTHAM, G. 1873b. Notes of the classification history, and geographical distribution of the Compositae. *Jour. Linn. Soc. Bot.* 13: 355-577.
- BERNARDELLO, L.M. (1986). Números cromosômicos en Asteraceae de Córdoba. *Darwiniana* 27: 169-178.
- BREMER K. 1994. Asteraceae: cladistics and classification. Timber Press, Portland.
- CABRERA, A.L. 1944. Vernoniaeae argentinas (Compositae). *Darwiniana* 6 (3): 265-379.
- CASSINI, A. H. G. 1817. Aperçu des genres nouveaux formes par M. Henri Cassini dans la famille des Synanthérées. *Bull. Soc. Plilo. Mii.* 4 : 66-68.
- COLEMAN, J.R. 1968. Chromosome numbers in Brazilian Compositae. *Rhodora* 70: 228-379.
- DARLINGTON, C.; WYLIE, A.P. 1955. Chromosome Atlas of Flowering Plants. 2º edição. George Allen & Unwin LTD, Ruskin House Museum Street, London.
- DE CANDOLLE, A.P. 1836. *Compositae. Prodomus Systematics Naturalis Regni Vegetabilis* 5: 4-706.
- DEMATTEIS, M. 1996. Estudos cromosômicos en especies Argentinas de *Vernonia* (Asteraceae). *Bonplandia* 9(1-2): 103-110.
- DEMATTEIS, M. 1998. Chromosome studies of some *Vernonia* species. (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 381-385.

- DEMATTEIS, M. 2002. Cytotaxonomic analysis of South American species of *Vernonia* (Vernonieae: Asteraceae). *Bot. Linn. Soc.*, 139: 401-108.
- DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 1998. karyotypes of seven South American species of *Vernonia* (Asteraceae). *Cytologia* 63: 323-328.
- DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 2000. Chromosomes studies on nine South American species of *Vernonia* (Vernonieae, Asteraceae). *Caryologia* 53(1): 61.
- FEDOROV, A.A. 1969. *Chromosome number of flowering plants*. V.L. Komarov Botanical Institute, Leningrado.
- GALIANO, N.G. & HUNZIKER, J.H. 1987. Estudios cariologicos em Compositae. IV. Vernonieae Y Eupatorieae. *Darwianiana*, 28: 1-8.
- GOLDBLATT, P. 1981. Index to plant chromosome numbers 1975-1978. *Monographs in systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V5. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1984. Index to plant chromosome numbers 1979-1981. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V8. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1985. Index to plant chromosome numbers 1982-1983. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V13. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1988. Index to plant chromosome numbers 1984-1985. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V23. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1990. Index to plant chromosome numbers 1986-1987. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V30. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1991. Index to plant chromosome numbers 1988-1989. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V40. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1996. Index to plant chromosome numbers 1992-1993. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V58. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1998. Index to plant chromosome numbers 1994-1995. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.

- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 2006. Index to plant chromosome numbers 2001-2003. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 2008. Index to plant chromosome numbers 2004-2006. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, 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.* *Rev. Brasil. Genet.* IX, 4: 741-743.
- GUERRA, M. 1988. *Introdução à citogenética Geral*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara.
- HOFFMAN, O. 1894. Vernonieae: In Engler, A. & Prantl, K. (eds.) *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig, Wilhelm Engelmann, 8: 120-129.
- HUZIWARA Y. 1962. Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosomes of *Aster*. *Amer. Jour. Bot.*, 49: 116-119.
- HUYNH, K. L. 1965: Contribution a l'etude caryologique. et embryologique des Phanerogames du Perou. *Memoires de la Societe Helvetique des Sciences Naturelles* 85: 1-178.
- JONES, S. B. 1970. Chromosome numbers in Compositae. *Bull. Torrey Bot. Club* 97: 168-174.
- JONES, S. B. 1974. Vernonieae (Compositae) chromosome numbers. *Bull. Torrey Bot. Club* 101: 31-34
- JONES, S.B. 1979a. Synopsis and pollen morphology of *Vernonia* (Compositae: Vernonieae) in the New World. *Rhodora* 81: 425-447.
- JONES, S.B. 1979b. Chromosome numbers of Vernonieae (Compositae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 106: 79-86.
- JONES, S.B. 1981. Synoptic classification and pollen morphology of *Vernonia* (Compositae: Vernonieae) in the Old World. *Rhodora* 83: 59-75.
- JONES, S.B. 1982. In: Lovè A, ed. IOPB chromosome number report LXXIV. *Taxon* 31: 126-127.
- KEELEY S. C. & JANSEN, R. K. 1994. Chloroplast DNA restriction site variation in the Vernoniaeae (Asteraceae), an initial appraisal of the relationships of New and Old World taxa and the morphology of *Vernonia*. *Plant Systematics and Evolution* 193: 249-265.

- LESSING, C.F. 1829. De synanthereis herbarii regii berolinensis dissetationes. I - Vernonieae. *Linneae* 4: 240-356.
- LESSING, C.F. 1831a. De synanthereis dissertatio Quarta. *Linneae* 6: 240-288, 295-399.
- LESSING, C.F. 1831b. De synanthereis herbarii regii barolinensis dissetationes. I – Verninieae. IV. *Vernoniearum mantissa*. *Linneae* 6: 624-721.
- LOMBELLO, R.A. & FORNI-MARTINS, E.R. 1998. Chromosomal studies and evolution in Sapindaceae. *Caryologia* 51 (1): 81-93.
- MALALLAH, G.A.; ATTIA, T.A.; MASOOD, M. 2001). Aneuploidy in wild *Picris babylonica* (Asteraceae) in Kuwait. *Cytologia* 66:241-246.
- MOORE, R.J. (eds) 1973. Index to plant chromosome numbers 1967 – 1971. *Regnum veg.* 90: 1-539.
- MOORE, R.J. (eds) 1974. Index to plant chromosome numbers 1972. *Regnum veg.* 91: 1-108.
- MOORE, R.J. (eds) 1977. Index to plant chromosome numbers 1973 – 1974. *Regnum veg.* 96: 1-257.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007a. Cytotaxonomy of species of *Vernonia*, section *Lepidaploa*, group *Axilliflorae* (Asteraceae, Vernonieae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 154: 99-108.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007b. Cytotaxonomic studies in six species of *Vernonia* (Asteraceae: Vernonieae). *Caryologia* 60: 37-47.
- ROBINSON, H. 1987a. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), III: two new genera, *Cyrtucymura* and *Eirmocephala*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100: 844-855.
- ROBINSON, H. 1987b. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), the genus *Stenocephalum* Sch. Bip. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100: 578-583.
- ROBINSON, H. 1987c. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), a new genus *Echinocoryne*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100: 584-589.
- ROBINSON, H. 1988a. A new combination of *Vernonia libertadensis*. S.B. Jones, with notes and descriptions of additional Andean species of *Baccharis*. *Phytologia* 65: 34-46.
- ROBINSON, H. 1988b. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) IV. The new genus *Lessinglanthus*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100 (4): 929-951.
- ROBINSON, H. 1988c. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) V. The new genus *Chrysolaena*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100 (4): 952-958.

- ROBINSON, H. 1989. *Acilepidopsis*, a new genus of Vernonieae from South America (Asteraceae). *Phytologia* 67:289-292.
- ROBINSON, H. 1990a. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), VII: the genus *Lepidaploa*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 103: 248-253.
- ROBINSON, H. 1990b. Six combinations in *Baccharoides* Moench and *Cyanthillium* Blume. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 103: 248-253.
- ROBINSON, H. 1992a. A new genus *Vernonanthura* (Vernonieae: Asteraceae) *Phytologia* 73: 65-76.
- ROBINSON, H. 1992b. *Mesanthopora*, a new genus of Vernonieae (Asteraceae) from Paraguay. *Novon* 2: 169-172.
- ROBINSON, H. 1993a. Three new genera of Vernonieae from South America, *Dasyandantha*, *Dasyandanthina* and *Quechualia* (Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 106 (4): 775-785.
- ROBINSON, H. 1993b. A review of the genus *Critoniopsis* in Central and South America (Vernonieae: Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 106 (3): 606-627.
- ROBINSON, H. 1994. *Cololobus*, *Pseudopiptocarpha* and *Trepadonia*, three new genera from South America (Vernonieae: Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 107 (3): 557-568.
- ROBINSON, H. 1996. The status of generic and subtribal revisions in the Vernonieae. In: Hind, D.J.N. & Beentje, H.J. (eds.). 1996. *Compositae: Systematics*. Kew, Whitestable Litho Printers Ltd., 1: 511-529.
- ROBINSON, H. 1999a. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. *Smithonian Contributions to Botany* 89: 1-116.
- ROBINSON, H. 1999b. Two new subtribes, Stokessinae and Pacourinae, of the Vernonieae (Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 112(1): 216-219.
- RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; VIEIRA, O.S.; MATZENBACHER, N.I. & MARTINS, N.S. 1991. Cytogenetics of genus *Vernonia* Schreber (Compositae). *Cytologia* 56: 239-247.
- SOLBRIG, O. T. 1997. Chromosomal cytology and evolution in the family Compositae. In: Heywood, V. H.; Harbone, J. B. & Turner, B. L. (eds.). *The Biology and Chemistry of the Compositae*. London. Academic Press. Pp. 267-281.
- STACE, C.A. 1989. *Plant Taxonomy and Biosystematics*. 2 edition. New York, Cambridge University Press.
- STEBBINS, G.L. 1977. *Flowering Plants*. Cambridge University Press, Cambridge.

- STUTTS, J.G. 1981. Taxonomic revision of *Pollalesta* H.B.K. (Compositae: Vernonieae). *Rhodora* 83: 385-419.
- STUTTS, J.G. 1988. Taxonomic revision of *Vernonieae* Subsect. *Chamaedrys* (Compositae: Vernonieae). *Rhodora* 90: 37-99.
- ZARCO, C.R. 1986. A new method for estimating karyotype asymetry. *Taxon*. 35(3): 526-530.

Tabela I – Espécies de *Vernonia* analisadas, com respectivas localidades, habitats e material testemunho. C – cerrado. CR – Campo rupestre. BE – Beira de estrada.

ESPÉCIE	LOCAL DE COLETA	HABITAT	Nº DO COLETOR
<i>V. bardanoides</i> Less.	Itirapina, SP	C	VM Oliveira 84
<i>V. beyrichii</i> Less.	Itambé do Mato Dentro, MG	C	IR Costa 138
<i>V. fruticulosa</i> Mart. ex DC.	Joaquim Felício, MG	C	IR Costa 536
<i>V. linearifolia</i> Less.	Joaquim Felício, MG	CR	ME Mansanares 435
<i>V. platensis</i> (Sprengel) Less.	Indaiatuba, SP	BE	VM Oliveira 85
<i>V. rubriramea</i> Mart.	Itambé do Mato Dentro, MG	C	IR Costa 139
<i>V. scorpioides</i> Pers.	São Miguel Arcanjo, SP	C	AM Corrêa 25
<i>V. simplex</i> Less.	Joaquim Felício, MG	CR	IR Costa 570

Tabela II – Espécies de *Vernonia* estudadas, número cromossômico (2n), variação de tamanho cromossômico, comprimento total da cromatina (CTC), índice de simetria (TF%), índice de assimetria intracromossômica (A₁), índice de assimetria intercromossômico (A₂) e fórmula cariotípica. A – 2,6 a 3,5µm, B – 1,6 a 2,5µm, C – 0,7 e 1,5 µm. m = metacêntrico. sm = submetacêntrico.

ESPÉCIE	2n	VARIAÇÃO DE TAMANHO	CTC	TF%	A1	A2	FÓRMULA CARIOTÍPICA
Subseção <i>Axilliflorae</i> Benth.							
<i>V. fruticulosa</i>	32	1,3 – 2,5	28,2	44,9	0,32	0,25	8m(A) + 3m(B) + 3sm(B) + 2sm(C)
Subseção <i>Macrocephalae</i> Benth.							
<i>V. bardanoides</i>	32	1,09 -1,73	23,5	43,19	0,77	0,14	3m(B) + 8m(C) + 2sm(B) + 3sm(C)
<i>V. linearifolia</i>	32	1,02 – 2,8	30,1	42,1	0,73	0,29	6m(A) + 4m(B) + 1m (C) + 2sm (A) + 1sm(B) + 2sm(C)
Subseção <i>Oligocephalae</i> Benth.							
<i>V. simplex</i>	32	1,29 – 3,26	35,9	42,3	0,75	0,26	9m(A) + 3m(B) + 2sm(A) + 3sm(A) + 1sm (B)
Subseção <i>Paniculatae</i> Benth.							
<i>V. beyrichii</i>	34	1,15 – 2,47	29,2	44,4	0,85	0,23	8m(B) + 6m(C) + 2sm(B) + 1sm(C)
Subseção <i>Scorpioideae</i> Benth.							
<i>V. platensis</i>	60	0,92 – 2,22	44,9	32,2	0,7	0,40	12m(A) + 6m(B) + 4 m(C) + 2 sm(A) + 4sm(B) + 2sm(C)
<i>V. rubriramea</i>	32	1,3 – 3,5	40,0	44,4	0,30	0,18	13m(A) + 1m(B) + 1sm(A) + 1sm(B)
<i>V. scorpioides</i>	56	0,73 – 1,6	31,0	45,9	0,72	0,22	9m(B) + 12m(C) + 4sm(B) + 3sm (C)

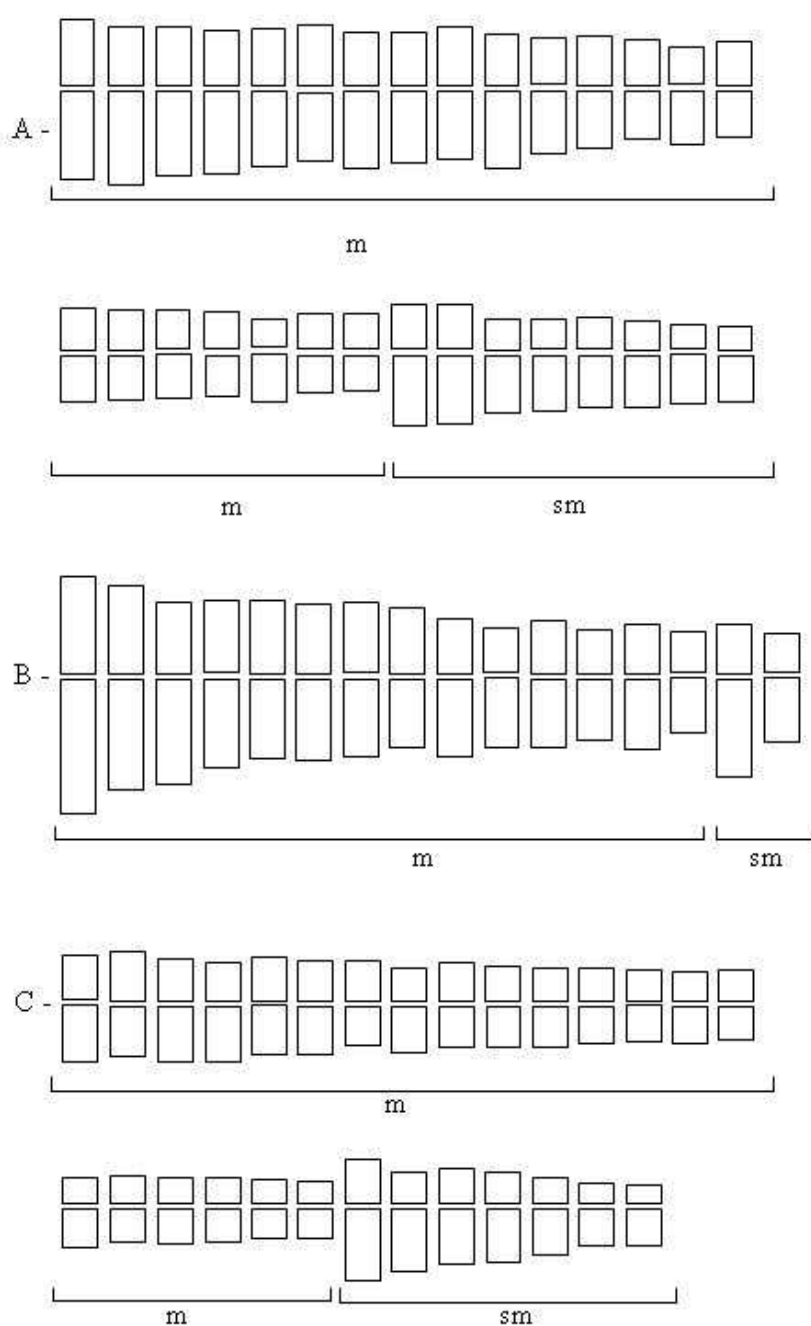


Figura 1 – Ideogramas de espécies de *Vernonia*, pertencentes à subseção *Scorpioideae*. A – *V. platensis* ($2n=60$), B – *V. rubriramea* ($2n=32$) e C – *V. scorpioides* ($2n=56$). m = metacêntrico, sm = submetacêntrico. Barra = $1\mu\text{m}$.

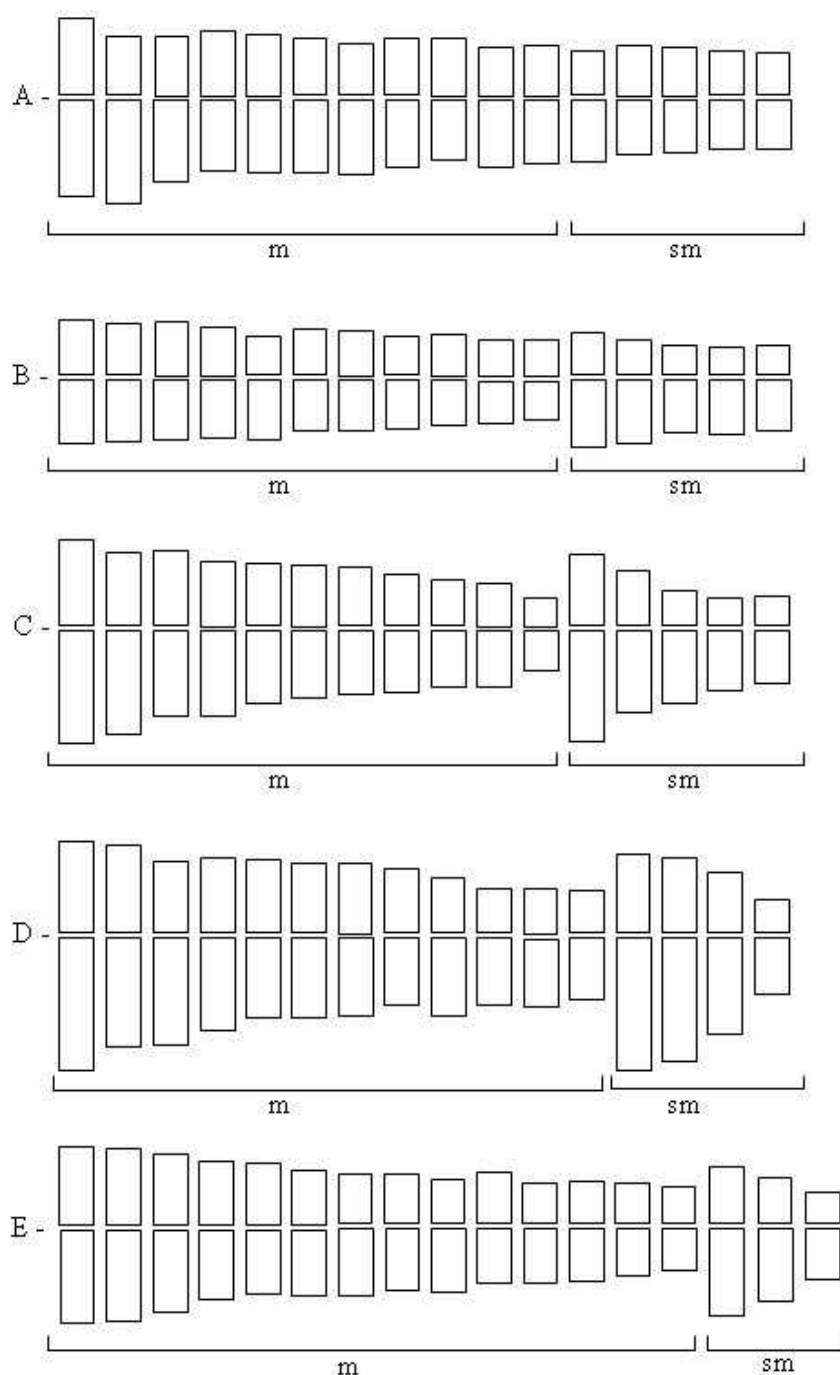


Figura 2 – Ideogramas de espécies de *Vernonia*, pertencentes às subseções *Axilliflorae* (A), *Macrocephalae* (B e C), *Oligocephalae* (D) e *Paniculatae* (E). A – *V. fruticulosa* ($2n=32$), B – *V. bardanoides* ($2n=32$), C – *V. linearifolia* ($2n=32$), D – *V. simplex* ($2n=32$) e E – *V. beyrichii* ($2n=34$). m = metacêntrico. sm = submetacêntrico. Barra = $1\mu\text{m}$.

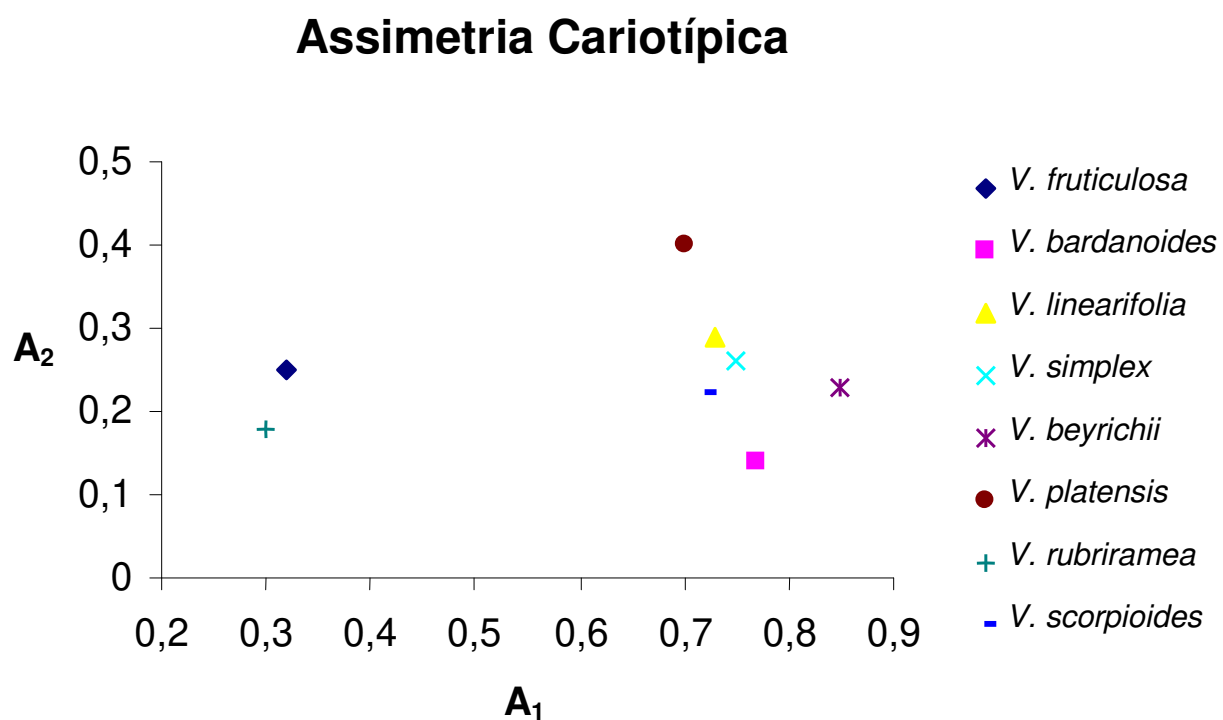


Figura 3 – Dispersão cariotípica para as espécies de *Vernonia* estudadas. A_1 = assimetria cariotípica intracromossômica e A_2 = assimetria cariotípica intercromossômica

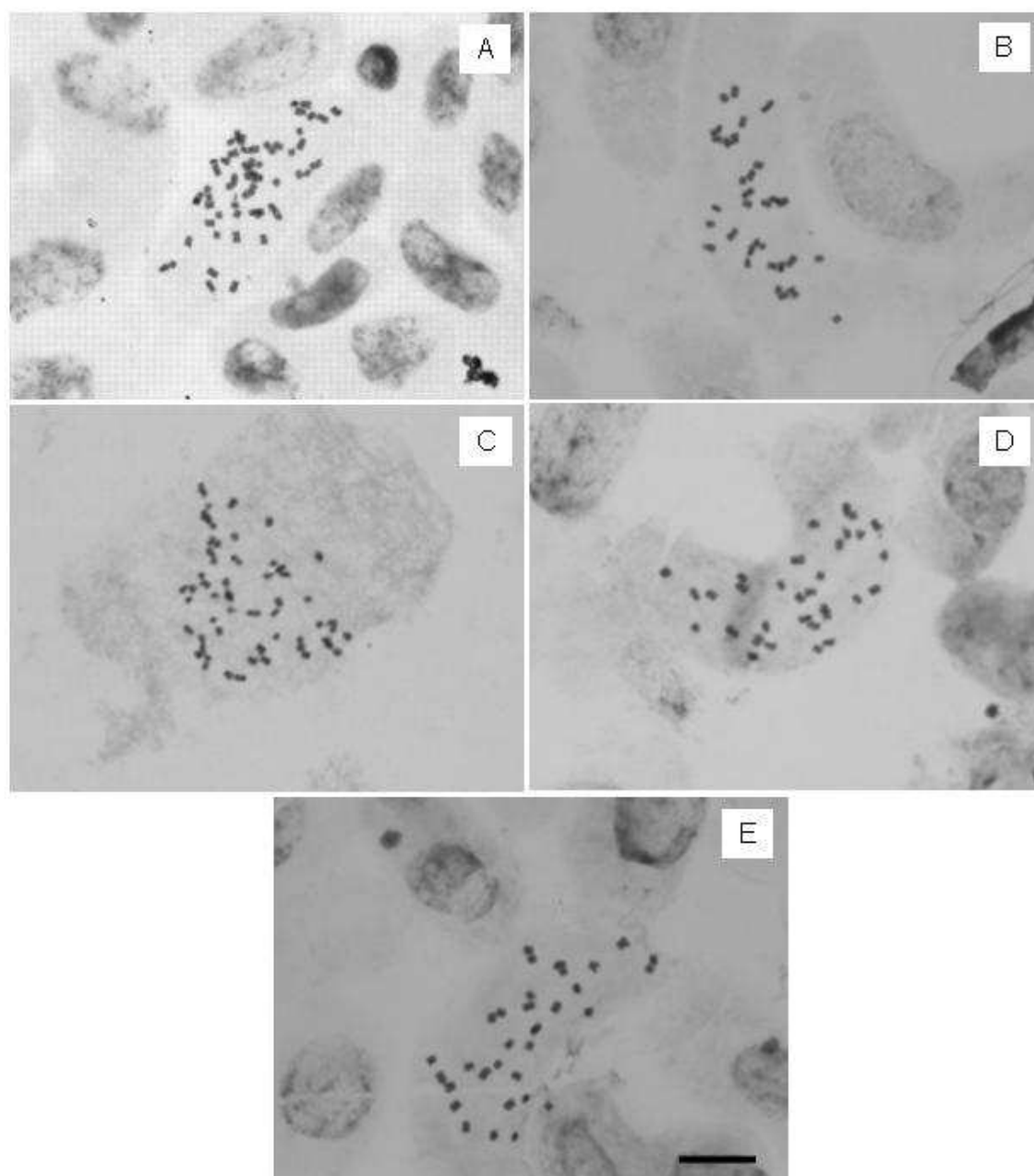


Figura 4 – Cromossomos mitóticos de espécies de *Vernonia*, pertencentes às subseções *Scorpioideae* (A a C) e *Macrocephalae* (D e E). A – *V. platensis* ($2n=60$), B – *V. rubriramea* ($2n=32$), C - *V. scorpioides* ($2n=56$), D – *V. bardanoides* ($2n=32$) e E – *V. linearifolia* ($2n=32$). Barra = $1\mu\text{m}$.

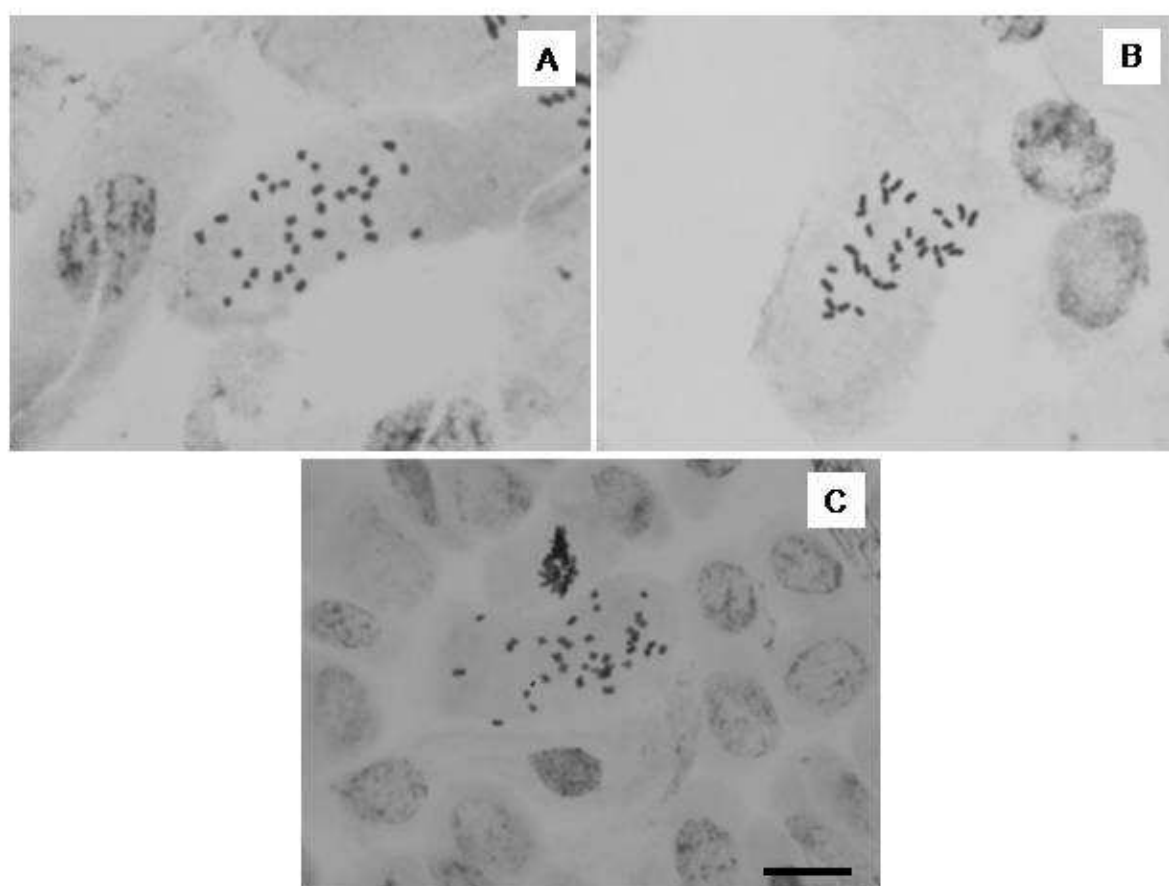


Figura 5 – Cromossomos mitóticos de espécies de *Vernonia*, pertencentes às subseções *Axilliflorae* (A), *Oligocephalae* (B) e *Paniculatae* (C). A – *V. fruticulosa* ($2n=32$), B – *V. simplex* ($2n=32$) e C – *V. beyrichii* ($2n=34$). Barra = 10 μ m.

CAPÍTULO 2

NÚMEROS CROMOSSÔMICOS EM *Vernonia* (ASTERACEAE: VERNONIEAE) E O QUE ELES SIGNIFICAM TAXONOMICAMENTE

Autores: OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J.

RESUMO

O gênero *Vernonia* Schreb. do ponto de vista sistemático, é o mais complexo da família Asteraceae, por apresentar extrema diversidade de formas biológicas. Recentemente, Robinson desmembrou-o em outros 22 gêneros, sendo a sua proposição nem sempre bem aceita. Com o objetivo de subsidiar as propostas de seu desmembramento (*sensu* Robinson) ou da manutenção de sua integridade (*sensu* Baker), foi feita uma coletânea dos números cromossômicos das espécies deste gênero usando dados do Capítulo 1 e dados de literatura, incluindo publicações de revisão e artigos disponíveis na literatura específica. Os números cromossômicos obtidos até o momento ainda não possibilitam a associação do número cromossômico com um grupo taxonômico específico (subseções/gênero). Entretanto, até que o momento, considerando os números cromossômicos disponíveis em literatura para diversas espécies, parece existir uma tênue relação dos mesmos com a conceituação de Robinson, para os gêneros *Lessingiathus*, *Vernonanthura* e *Chrysolaena*, considerados a partir do desmembramento de *Vernonia sensu* Baker.

INTRODUÇÃO

A tribo Vernonieae distingue-se das outras Asteraceae por apresentar apenas capítulo homógamo de flores hermafroditas, corolas tubulosas e os ramos do estilete longos e agudos (BENTHAM 1873a; BAKER 1873; BREMER 1994). Foi estabelecida por CASSINI (1817) e revista globalmente por vários autores (LESSING 1829, 1831a, 1931b, DE CANDOLLE 1836; BENTHAM 1873a, 1873b; HOFFMANN 1890). Apesar de ser considerada monofilética e bem estabelecida, as classificações propostas não definem claramente os limites genéricos, que são tênues, imprecisos e de difícil separação (BREMER 1994).

Possui distribuição pantropical, ocorrendo nas Américas, África, Ásia, Austrália, estando ausente na Europa (CABRERA 1944). As Vernonieae têm provavelmente seu centro de origem nos trópicos, onde se observa uma maior diversidade de espécies, além de conter os gêneros que são mais primitivos (CABRERA 1944). São reconhecidos dois centros de distribuição dos gêneros, um no sudeste do Brasil e outro na África (CABRERA 1944; JONES 1977; BARROSO 1986).

Vernonia sensu Baker é o maior gênero da tribo Vernonieae, possuindo mais de 1.000 espécies, formando o núcleo central da tribo (BREMER 1994). Na América do Sul existem cerca de 350-400 espécies, com maior ocorrência no sudeste do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Bolívia (DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 2000). O Brasil é o maior centro de diversidade de espécies de *Vernonia* do Novo Mundo (KEELEY & JANSEN 1994).

É um dos gêneros de maior complexidade taxonômica da família Asteraceae (DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998). Por apresentar extrema diversidade de formas biológicas (CABRERA 1944, STUTTS 1988) e possuir muitos gêneros, atualmente *Vernonia* ainda continua em discussão. Muitos autores já tentaram esclarecer a taxonomia do gênero (CABRERA 1944; JONES 1970, 1974, 1979, 1981, 1982; STUTTS 1981, 1988; ROBINSON 1987a, 1987b, 1987c,

1988a, 1988b, 1988c, 1990a, 1990b, 1992a, 1992b, 1993a, 1993b, 1994, 1999), porém os resultados são conflitantes. A maioria das espécies de *Vernonia* sul americanas pertence à seção *Lepidaploa* (Cass) DC. (BENTHAM 1873b; BAKER 1873).

Após estudos intensivos, ROBINSON (1987a, 1987b, 1987c, 1988a, 1988b, 1988c, 1989, 1999a, 1999b, 1992a) considerou que os tradicionais gêneros que compunham a tribo Vernonieae deveriam ser reagrupados, no entanto, a sua proposição não foi bem aceita. No gênero *Vernonia* Schreb, tais estudos culminaram com o desmembramento deste em 22 gêneros (BREMER 1994, ROBINSON 1999), e o mesmo ficou restrito apenas aos representantes localizados na América do Norte.

Em alguns países da África, muitas espécies de *Vernonia* são utilizadas medicinalmente para o tratamento de malária, infecções, amebíase e doenças sexualmente transmissíveis (KAMBIZI & AFOLAYAN 2001, TONA *et al.* 2004). Algumas já tiveram sua ação comprovada cientificamente, como a espécie *V. colorata*, que possui atividade antibacteriana e antiinflamatória (RABE *et al.* 2002) e *V. cinerea*, com atividade analgésica, anti-inflamatória, antipirética e também ação citotóxica (IWALEWA *et al.* 2003). Diversas espécies *Vernonia*, vulgarmente conhecidas como assa-peixe, são melíferas, sendo distribuídas em todo Brasil (BARTH *et al.* 2005).

Citologicamente, *Vernonia sensu* Baker é pouco conhecida. Os números cromossômicos variam de $2n = 18$ a 160 (DARLINGTON & WYLIE 1955; BOLKHOVISKIKH *et al.* 1969; MOORE 1973, 1974, 1977; GOLDBLATT 1981, 1984, 1985, 1988; GOLDBLATT & JOHNSON 1990, 1991, 1996, 1998). Algumas espécies de *Vernonia* sect. *Lepidaploa* foram analisadas, mostrando que apesar de relativamente pequenos, os cromossomos apresentam algumas pequenas diferenças de tamanho e morfologia (RUAS *et a.* 1991; DEMATTEIS 1996, 1998a, 1998b, 2002; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b). A

assimetria cariotípica é pouco variável entre as espécies, sugerindo que a diversificação do gênero foi acompanhada por pequenas alterações na constituição cariotípica das espécies (DEMATTEIS 1996, 1998a, 1988b, 2002; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b).

Neste trabalho, objetivou-se examinar os números cromossômicos de uma parte da seção *Lepidaploa* (*sensu* Baker) que ocorre no Brasil, em relação aos dois tratamentos taxonômicos para o gênero *Vernonia*: o de BAKER (1873), que mantém a integridade do gênero, e o de ROBINSON (1999), que o desmembrou em outros gêneros menores. Tais observações contribuirão, mesmo que parcialmente, para o exame da possível relação entre os caracteres cromossômicos e o posicionamento taxonômico de suas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

A coletânea dos números cromossômicos de espécies de *Vernonia* foi feita usando dados do Capítulo 1 (Tabela I) e de literatura, incluindo publicações de revisão específicas (DARLINGTON & WYLIE 1955; BOLKHOVISKIKH *et al.* 1969; MOORE 1973, 1974, 1977; GOLDBLATT 1981, 1984, 1985, 1988; GOLDBLATT & JOHNSON 1990, 1991, 1996, 1998, 2006, 2008) e artigos disponíveis na literatura (Tabela II). As espécies apresentadas no Capítulo 1 (Tabela I) foram encontradas em áreas de cerrado e campo rupestre, nos estados de São Paulo e de Minas Gerais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens para *V. beyrichii* ($2n = 34$), *V. rubriramea* ($2n = 32$), *V. linearifolia* ($2n = 32$) são inéditas (Tabela II). Algumas contagens obtidas para as espécies de *Vernonia* não diferem daquelas encontradas na literatura, como as de *V. simplex* e *V. bardanoides*, ambas com $2n = 32$, *V. platensis* com $2n = 60$ e *V. scorpioides* com $2n=56$. Anteriormente, JONES (1979) relatou $2n = 34$ para *V. bardanoides* (Tabela II). Entretanto, para *V. simplex* JONES (1982) relatou $2n = 34$, enquanto que RUAS *et al.* (1991) apresentou $2n = 40$ (Tabela II). Diversas contagens foram apresentadas para *V. platensis* sempre múltiplas de 10, como $2n = 20, 40, 50, 60$ (DEMATTEIS 2002) e 80 (DEMATTEIS 1998a), com exceção de $2n = 68$, relatado por JONES (1982) (Tabela II). Além de $2n = 56$, contagens diferentes também foram relatadas para *V. scorpioides*, como $n = 15, 17$ e 28 ± 1 (Tabela 2; ADEGBITE & AYODELE 2004; JONES 1982; JONES 1970) e $2n = 30$ (HUYNH 1965, ADEGBITE & AYODELE 2004). O número cromossômico obtido para *V. fruticulosa* concorda com o obtido anteriormente por OLIVEIRA *et al.* (2007a) (Tabela II).

Há outros relatos na literatura que mostram números cromossômicos diferentes entre populações de uma mesma espécie (Tabela II). Estas diferenças podem ser decorrentes de contagens errôneas, muitas vezes devido ao pequeno tamanho de cromossomos, ou a identificações botânicas incorretas, devido à grande complexidade do grupo em estudo (STACE 1989) e/ou de espécie/indivíduos poliplóides com características morfológicas intermediárias. A variabilidade numérica de cromossomos dentro de uma espécie pode realmente existir, caracterizando ecótipos ou raças cromossômicas. Os citótipos podem ser diferenciados a partir de eventos como aneuploidia/displóidia ou por poliploidia (MORAWETZ 1984). Citótipos poliplóides foram relatados em *V. platensis* ($2n = 20, 40, 50, 60$, DEMATTEIS 2002; $2n = 80$,

DEMATTEIS 1998a) (Tabela II) e em duas espécies que ocorrem na Argentina, *V. cincta* Griseb. ($2n = 60$, $x = 15$) e *V. saltensis* Hieron ($2n = 64$, $x = 16$) (DEMATTEIS 1998a).

Uma completa documentação da variabilidade cromossômica é fundamental para uma correta interpretação dos dados. Pelo fato de que os cromossomos constituem o próprio material genético, alterações no cariótipo são quase sempre significativas para o rumo evolutivo das espécies (GUERRA 1988). Há controvérsia sobre o status taxonômico de citótipos com diferentes níveis de ploidia: seriam raças cromossômicas de uma mesma espécie (por não haver diferenciação morfológica evidente) ou, aplicando-se o conceito biológico de espécie, seriam espécies distintas, já que não haveria fluxo gênico entre as diferentes formas (SOLTIS *et al.* 2007).

As contagens para *Vernonia* variam de $2n=18$ para algumas espécies africanas, como em *V. cinerea* (L.) Less. a 160 em *V. teyucuaensis* Cabrera, uma espécie argentina (DARLINGTON & WYLIE 1955; FEDOROV 1969; MOORE 1973, 1974, 1977; GOLDBLATT 1981, 1984, 1985, 1988; GOLDBLATT & JOHNSON 1990, 1991, 1996, 1998, 2006, 2008), entretanto, as mais frequentes são $2n = 32$ e $2n = 34$ (Tabela II).

As Vernonieae do Novo Mundo, em contraste com as do Velho Mundo, apresentam grande diversidade de números cromossômicos e alta taxa de espécies poliplóides (JONES 1979; RUAS *et al.* 1991). JONES (1979) considerou $x = 17$ como o número básico para as espécies de *Vernonia* do Novo Mundo, porém outros autores consideram $x = 9$ (BERNADELLO 1986, DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000). GALIANO & HUNZIKER (1987) estudando espécies de *Vernonia*, encontraram três possíveis números básicos, $x = 9$, 10 e 17, sugerindo que os números básicos $x = 17$ representariam poliplóides derivados de $x = 9$. Das espécies de *Vernonia* que ocorrem no Novo Mundo que tiveram o seu número cromossômico estudado,

apenas uma apresentou contagem múltipla de nove, *V. polyanthes*, com $n=18$ (COLEMAN 1968).

A maioria dos números cromossômicos obtidos para as espécies de *Vernonia* do continente americano é considerada derivada de $x = 9$ por duplicação e por posterior redução (JONES 1979, DEMATTEIS 1996). SOLBRIG (1977) sugeriu também que as espécies com o número cromossômico básico diferente de $x = 9$ são muito comuns na família de Asteraceae, o que acontece na maior parte da tribo Vernonieae, que apresenta muitas espécies com $n = 17$. Assim, a maioria das espécies de Vernonieae do Novo Mundo pode ter surgido pela duplicação dos cromossomos de uma espécie $n = 9$ para $n = 18$, e então derivada por disploidia a partir deste poliplóide, originando o número $n = 17$, conhecido amplamente entre as espécies de Vernonieae neotropicais, além de $n = 16$ (RUAS *et al.* 1991; DEMATTEIS 1998a, 1998b; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b; capítulo anterior (cinco entre oito espécies, Tabelas II)).

A maioria das espécies brasileiras de *Vernonia sensu* Baker estudadas do ponto de vista cromossômico pertence à seção *Lepidaploa* (Cass.) DC. (RUAS *et al.* 1991; DEMATTEIS 1996, 1998a, 1998b, 2002; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b). De acordo com ROBINSON (1990a) a maioria das espécies desta seção foi transferida para o gênero *Lepidaploa*. Os relatos de números cromossômicos para as espécies desta seção mencionam $x = 10$ para o grupo *Oligocephalae*, $x = 16$ para *Macrocephalae* e *Axilliflorae* e $x = 17$ para *Paniculatae* (DEMATTEIS 2002).

A única espécie aqui estudada da subseção *Axilliflorae sensu* Baker, *V. fruticulosa*, apresentou número cromossômico $2n = 32$ (Tabela II). Esse número concorda com o citado anteriormente por OLIVEIRA *et al.* (2007a) e é múltiplo de 16, número básico mais freqüente para a subseção (DEMATTEIS 1998a, 2002). Entretanto, para *Axilliflorae*, também ocorrem os

números básicos $x = 10, 14, 15, 17$ e 18 (KEELEY 1978; JONES 1979; DEMATTEIS 1998a, 2002; OLIVEIRA *et al.* 2007a). Todas as espécies, com dados cromossômicos disponíveis, pertencentes a esta subseção, foram incluídas por ROBINSON (1990a) no gênero *Lepidaploa*, à exceção de duas, *V. glabrata* HBK ($2n = 51$, ca. 52, JONES 1979) e *V. polyphylla* Sch. Bip. ex Baker ($2n = 64$, RUAS *et al.* 1991, DEMATTEIS 2002), transferidas para o gênero *Lessingianthus*. De acordo com ROBINSON (1990a), o gênero *Lepidaploa* pertence ao Complexo *Lepidaploa*, entretanto seus representantes diferenciam-se por apresentar capítulos sésseis, base do estilete nodular, cipselas algumas vezes glandulares, e falta das glândulas nos apêndices da antera. *Lessingianthus* caracteriza-se por apresentar capítulos pedunculados, pólen lofado, como os membros do gênero *Lepidaploa*, mas sem exina rizomatosa, falta do nódulo na base do estilete e de glândulas nas cipselas (ROBINSON 1988c).

Vernonia linearifolia e *V. bardanoides*, espécies que apresentaram número cromossômico $2n = 32$ (Tabela II), pertencem à subseção *Macrocephalae sensu* Baker. Essa subseção possui número cromossômico básico $x = 16$ e tem como característica uma alta frequência de poliplóides, segundo DEMATTEIS (2002), que estudou 10 espécies desta subseção, cinco diplóides ($2n = 32$), três triplóides ($2n = 64$) e uma octaplóide ($2n = 128$). *V. bardanoides* havia sido estudada anteriormente por JONES (1979), que de forma discordante, relatou $n = 17$ e 34 (Tabela II). Todas as espécies de *Macrocephalae* foram incluídas no gênero *Lessingianthus* por ROBINSON (1999).

Para a subseção *Oligocephalae sensu* Baker, do qual apenas *V. simplex* foi estudada neste trabalho, o número cromossômico $2n = 32$ discorda do número mais frequente para a subseção ($x = 10$, DEMATTEIS 2002) e de citações anteriores para a mesma espécie ($2n = 34$, JONES 1982; $2n = 40$, RUAS *et al.* 1991) (Tabela 2). BERNADELLO (1986) também relatou um número cromossômico discordante para o grupo, $2n = 54$, para *V. mollissima* Hook & Arn. A

maioria das espécies com dados cromossômicos disponíveis para esse grupo foi transferida por ROBINSON (1999) para o gênero *Chrysolaena*, com exceção de *V. mollissima* ($2n = 54$, BERNADELLO 1986) e *V. simplex* ($2n = 32$, Capítulo 1; $2n = 34$, JONES 1982; $2n = 40$, RUAS *et al.* 1991). Essas espécies são as únicas que não apresentam número cromossômico múltiplo de 10, e que foram transferidas para *Lessigianthus* (Tabela II). O gênero *Chrysolaena* também apresenta o pólen lofado e exina rizomatosa como *Lepidaploa*, mas difere por apresentar inflorescências não ramificadas, apêndice das anteras glandulares, e falta dos nódulos na base do estilete (ROBINSON 1988a).

V. beyrichii, a única espécie estudada aqui que pertence à subseção *Paniculatae sensu* Baker, apresentou número cromossômico múltiplo de 17 ($2n=34$) (Tabela II), o mais freqüente para o grupo. Todas as espécies pertencentes a esta subseção foram incluídas por ROBINSON (1999) no gênero *Vernonanthura* e apresentam número cromossômico múltiplo de 17, com exceção de *V. nudiflora* que além de $n = 17$ (JONES 1974, BERNADELLO 1986) e $2n = 34$ (STUTTS 1988, RUAS *et al.* 1991), também apresentou $n = 16$ e $2n = 32$ (COVAS & HUNZIKER 1954, HUNTER 1964) (Tabela 2). De acordo com ROBINSON (1999), *Vernonanthura* apresenta uma cauda na base das anteras, uma condição que não é observada nos outros grupos de *Vernonia*.

As contagens para *V. platensis*, *V. scorpioides* e *V. rubriramea* do grupo *Scorpioideae sensu* Baker (Tabela II) concordaram com as mencionadas anteriormente para essa subseção. *Scorpioideae* possui diversos números cromossômicos, múltiplos, em maior freqüência, de 10, 16 e 17 (DEMATTEIS 2002). No presente trabalho, *V. scorpioides* apresentou número cromossômico $2n = 56$ (Tabela II), já citado anteriormente por JONES (1970), entretanto $n = 17$ (JONES 1982) e $2n = 30$ (ADEGBITE & AYODELE 2004, HUYNH 1965) também já foram relatados para essa espécie. *Vernonia platensis*, com $2n = 60$, também já foi citada

anteriormente por GALIANO & HUNZIKER (1987), DEMATTEIS (2002) e ADEGBITE & AYODELE (2004) e, sempre com números múltiplos de 10 ($n = 10, 20, 30$ e $2n = 20, 40, 50, 60$) (Tabela II). A maioria das espécies pertencentes à *Scorpioideae* foi incluída por ROBINSON (1999) no gênero *Chrysolaena*. *Vernonia mariana* Mart. ($n = 17$, JONES 1982), *V. polyanthes* Less. ($n = 18$, COLEMAN 1968; $2n = 34$, RUAS *et al.* 1991; OLIVEIRA *et al.* 2007) e *V. tweediana* Baker ($n=17$, GALIANO & HUNZIKER 1987; $2n=34$, JONES 1982) foram incluídas em *Vernonanthura*, enquanto *V. argyrotrichia* Sch. Bip. ex Baker ($n = 17$, JONES 1979) (ROBINSON 1999) foi colocada em *Lepidaploa* (Tabela II).

Os resultados aqui obtidos e os dados de literatura (Tabela II) indicam uma tênue relação entre os números cromossômicos obtidos com a conceituação de ROBINSON (1999). No entanto esses dados ainda não possibilitam a discussão citotaxonômica do gênero *Vernonia* de forma conclusiva, pois somente algumas subseções/ espécies podem ser agrupados pelo número cromossômico. De acordo com ROBINSON (1988b), o gênero *Lessingianthus* compreende espécies com $x = 16$ e agrega todas as espécies à antiga subseção *Macrocephalae* de *Vernonia sensu* BAKER, duas espécies (*V. simplex* e *V. mollissima*) da antiga subseção *Oligocephalae* e duas espécies de *Axilliflorae* (*V. glabrata* e *V. polyphylla*). Essas três subseções apresentam $x = 10, 14, 15, 16$ e 17 , com predominância de 16. Parece haver coerência também para os gêneros *Chrysolaena* ($x = 10$), que agregou parte das subseções *Oligocephalae* e *Scorpioideae*, e *Vernonanthura* ($x = 17$), constituído por parte da subseção *Scorpioideae* e pela totalidade de *Paniculatae*. Entretanto existem exceções (Tabela II). A heterogeneidade de número cromossômico persiste em alguns gêneros propostos por Robinson (1999), especialmente em *Lepidaploa*, que absorveu *V. argyrotrichia* da subseção *Scorpioideae* e *V. eriolepis* Gardn. da subseção *Macrocephalae*, e todas as espécies do grupo *Axilliflorae* de Baker, à exceção *V. glabrata* e *V. polyphylla*.

Apesar de os números cromossômicos ainda não caracterizarem perfeitamente subseções/ gêneros de *Vernonia*, podem ser úteis na distinção de espécies cuja morfologia externa seja muito parecida. Essa situação pode ser exemplificada por *V. cincta* Griseb. e *V. scorpioides* (Lam.) Pers., nas quais a delimitação taxonômica e relações filogenéticas têm sido amplamente discutidas. Alguns autores consideram que *V. cincta* é uma variedade botânica de *V. scorpioides* (CABRERA 1944), enquanto outros sugerem que são espécies diferentes (ROBINSON 1987). No entanto, DEMATTEIS (1998a) subsidiou a separação entre as duas espécies com dados cariotípicos. Este autor registrou números cromossomos distintos ($2n = 60$ para *V. cincta* e $2n = 66$ para *V. scorpioides*) e também diferenças na fórmula cariotípica, mostrando quantidades diferentes de cromossomos submetacêntricos e telocêntricos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos de Vanessa Mancuso de Oliveira e financiamento deste trabalho (#04/09982-1, #04/13165-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGBITE, A. E. & AYODELE, M. S. 2004. Cytogenetic and phylogenetic studies in the genus *Vernonia* Schreb. *Feldes Repertorium* 115: 513 - 518.
- BAKER, J. G. 1873. Compositae I. Vernonieae: In Martius, C.F & Eichler, A.G. (eds.). 6(2). *Flora brasiliensis*. Lipsiae, Monachii. pp 180.
- BARROSO, G. M. 1986. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Vol. III. Viçosa, Imp. Universitária da Univ. Federal de Viçosa, pp. 326.
- BARTH, M. O; MAIORINO, C.; BENATTI, A. P. T.; BASTOS, D. H. M. 2005. Determinação de parâmetros físico-químicos e da origem botânica de méis indicados indicados monoflorais do sudeste do Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25: 229-233.
- BENTHAM, G. 1873a. Compositae: In: G. Bentham & J.D. Hooker (eds.) *Genera Plantarum*. Lovell Reeve 2: 163 - 533.
- BENTHAM, G. 1873b. Notes of the classification history, and geographical distribution of the Compositae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 13: 355 - 577.
- BERNARDELLO, L. M. (1986). Números cromosômicos en Asteraceae de Córdoba. *Darwiniana* 27: 169 - 178.
- BREMER, K. 1994. Asteraceae – Cladistic & Classification. Portland, Oregon, Timber Press. pp752.
- CABRERA, A. L. 1944. Vernonieae argentinas (Compositae). *Darwiniana* 6: 265 - 379.
- CASSINI, H. 1817. Aperçu des genres nouveaux foumes par M. Henri Cassini dans la famille des Synanthhéréées. *Bull. Sci. Soc. Phil.* 4: 66-68.
- COLEMAN, J. R. 1968. Chromosome numbers in Brazilian Compositae. *Rhodora* 70: 228 - 379.
- COVAS, G. & HUNZIKER, J. H. 1954. Estudios cariologicos en Antófitas IV parte. *Revista Invest. Agric.* 8: 249 - 253.

- DARLINGTON, C.; WYLIE, A.P. 1955. Chromosome Atlas of Flowering Plants. 2º edição. George Allen & Unwin LTD, Ruskin House Museum Street, London.
- DE CANDOLLE, A.P. 1836. *Compositae*. Prodomus Systematics Naturalis Regni Vegetabilis, 5: 4-706.
- DEMATTEIS, M. 1996. Estudos cromosômicos em espécies Argentinas de *Vernonia* (Asteraceae). *Bonplantia* 9: 103 - 110.
- DEMATTEIS, M. 1998a. Chromosome studies of some *Vernonia* species. (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 381 - 385.
- DEMATTEIS, M. 1998b. Karyotype analysis in some *Vernonia* species (Asteraceae) from South America. *Caryologia* 51: 279-288.
- DEMATTEIS, M. 2002. Cytotaxonomic analysis of South American species of *Vernonia* (Vernonieae: Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 139: 401 - 108.
- DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 1998. Karyotypes of seven South American species of *Vernonia* (Asteraceae). *Cytologia* 63: 323 - 328.
- DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 2000. Chromosomes studies on nine South American species of *Vernonia* (Vernonieae, Asteraceae). *Caryologia* 53: 55 - 61.
- FEDOROV, A.A. 1969. *Chromosome number of flowering plants*. V.L. Komarov Botanical Institute, Leningrado.
- GALIANO, N. G. & HUNZIKER, J. H. 1987. Estudios cariologicos em Compositae. IV. Vernonieae Y Eupatorieae. *Darwianiana* 28: 1 - 8.
- GOLDBLATT, P. 1981. Index to plant chromosome numbers 1975 - 1978. *Monographs in systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V5. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1984. Index to plant chromosome numbers 1979 - 1981. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V8. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1985. Index to plant chromosome numbers 1982 - 1983. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V13. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1988. Index to plant chromosome numbers 1984 - 1985. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V23. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.

- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1990. Index to plant chromosome numbers 1986 - 1987. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V30. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1991. Index to plant chromosome numbers 1988 - 1989. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V40. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1996. Index to plant chromosome numbers 1992 - 1993. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V58. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1998. Index to plant chromosome numbers 1994 - 1995. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 2006. Index to plant chromosome numbers 2001-2003. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 2008. Index to plant chromosome numbers 2004-2006. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GUERRA, M. 1988. *Introdução à citogenética Geral*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara.
- HOFFMAN, C. 1894. Vernonieae: In Engler, A. & Prantl, K. (eds.) *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig, Wilhelm Engelmann, 8: 120-129.
- HUNTER, G. E. 1964. Chromosome numbers in *Vernonia*: section *Lepidaploa*: subsection *Paniculatae verae*. *Southwest. Nat.* 9: 239 - 244.
- HUYNH, K. L. 1965: Contribution a l'etude caryologique. et embryologique des Phanerogames du Perou. *Memoires de la Societe Helvetique des Sciences Naturalles* 85: 1-178.
- IWALEWA, E. O.; IWALEWA, O. J.; ADEBOYE, J. O. 2003. Analgesic antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform end ether extracts of *Vernonia cinerea* Less. leaf. *Journal of Ethnopharmacology* 86: 229.
- JONES, S. B. 1970. Chromosome numbers in Compositae. *Bull. Torrey Bot. Club* 97: 168-174.
- JONES, S. B. 1974. Vernonieae (Compositae) chromosome numbers. *Bull. Torrey Bot. Club* 101: 31-34
- JONES, S.B. 1977. Vernonieae – systematic review. In: Heywood VH, Harbone JB, Turner BL, eds. *The biology and chemistry of the CompositaeI*, Vol. I, pp. 503-521. London: American Press.

- JONES, S. B. 1979. Synopsis and pollen morphology of *Vernonia* (Compositae: Vernonieae) in the New World. *Rhodora* 81: 425 - 447.
- JONES, S. B. 1981. Synoptic classification and pollen morphology of *Vernonia* (Compositae: Vernonieae) in the Old World. *Rhodora* 83: 59 - 75.
- JONES, S. B. 1982. In: Lovë A, ed. IOPB chromosome number report LXXIV. *Taxon* 31: 126 - 127.
- LESSING, C.F. 1829. De synanthereis herbarii regii barolinensis dissetationes. I - Vernonieae. *Linneae* 4: 240-356.
- LESSING, C.F. 1831a. De synanthereis dissertatio Quarta. *Linneae* 6:240-288, 295-399.
- LESSING, C.F. 1831b. De synanthereis herbarii regii barolinensis dissetationes. I – Verninieae. IV. *Vernoniearum mantissa*. *Linneae* 6: 624-721.
- KAMBISI, L. & AFOLAYAN, A. J. 2001. An ethnobotanical study of plants used for the treatment of sexually transmitted diseases (njovhera) in Guruve District, Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology* 77: 5
- KEELEY, S. C. 1978. A revision of the west Indian Vernonias (Compositae). *Jour. Arboretum* 59: 360-413.
- KEELEY S. C. & JANSEN, R. K. 1994. Chloroplast DNA restrinction site variation in the Vernoniaeae (Asteraceae), an initial appraisal of the relationships of New and Old World taxa and the morphology of *Vernonia*. *Plant Systematics and Evolution* 193: 249-265.
- MOORE, R. J. (eds) 1973. Index to plant chromosome numbers 1967 - 1971. *Regnum veget* 90: 1 - 539.
- MOORE, R. J. (eds) 1974. Index to plant chromosome numbers 1972. *Regnum veget.* 91: 1 - 108.
- MOORE, R. J. (eds) 1977. Index to plant chromosome numbers 1973--1974. *Regnum veget* 96: 1 - 257.
- MORAWETZ, W. 1984. Karyological races and ecology of Brazilian *Duguetia furfuraceae* compared with aromatic *Xylopia* (Annonaceae). *Flora* 175: 195-209.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007a. Cytotaxonomy of species of *Vernonia*, section *Lepidaploa*, group *Axilliflorae* (Asteraceae, Vernonieae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 154: 99-108.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007b. Cytotaxonomic studies in six species of *Vernonia* (Asteraceae: Vernonieae). *Caryologia* 60: 37-47.

- RABE, T.; MULLHOLLAND, D.; VAN STADEN, J. 2002. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 80: 91.
- ROBINSON, H. 1987a. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), III: two new genera, *Cyrtucymura* and *Eirmocephala*. *Proceedings of the Biological of Washington*. 100: 844 - 855.
- ROBINSON, H. 1987b. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), the genus *Stenocephalum* Sch. Bip. *Proceedings of the Biological of Washington*. 100: 578 - 583.
- ROBINSON, H. 1987c. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), a new genus *Echinocoryne*. *Proceedings of the Biological of Washington*. 100: 584 - 589.
- ROBINSON, H. 1988a. A new combination of *Vernonia libertadensis*. S.B. Jones, with notes and descriptions of additional Andean species of *Baccharis*. *Phytologia* 65: 34 - 46.
- ROBINSON, H. 1988b. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) IV. The new genus *Lessinglanthus*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100 (4): 929 - 951.
- ROBINSON, H. 1988c. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) V. The new genus *Chrysolaena*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100 (4): 952 - 958.
- ROBINSON, H. 1989. *Acilepidopsis*, a new genus of Vernonieae from South America (Asteraceae). *Phytologia* 67:289-292.
- ROBINSON, H. 1990a. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), VII: the genus *Lepidaploa*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 103: 248 - 253.
- ROBINSON, H. 1990b. Six combinations in *Baccharoides* Moench and *Cyanthillium* Blume. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 103: 248 - 253.
- ROBINSON, H. 1992a. A new genus *Vernonanthura* (Vernonieae: Asteraceae) *Phytologia* 73: 65 - 76.
- ROBINSON, H. 1992b. *Mesanthopora*, a new genus of Vernonieae (Asteraceae) from Paraguay. *Novon* 2: 169 - 172.
- ROBINSON, H. 1993a. Three new genera of Vernonieae from South America, *Dasyandantha*, *Dasyandanthina* and *Quechualia* (Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 106 (4): 775 - 785.
- ROBINSON, H. 1993b. A review of the genus *Critoniopsis* in Central and South America (Vernonieae: Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 106 (3): 606 - 627.
- ROBINSON, H. 1994. *Cololobus*, *Pseudopiptocarpha* and *Trepadonia*, three new genera from South America (Vernonieae: Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 107 (3): 557 - 568.
- ROBINSON, H. 1999. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. *Smithonian Contributions to Botany* 89: 1 - 116.

- RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; VIEIRA, A.O.S.; MATZENBACHER, N.I. & MARTINS, N.S. 1991. Cytogenetics of genus *Vernonia* Schreber (Compositae). *Cytologia* 56: 239 - 247.
- SOLBRIG, O. T. 1977. Chromosomal cytology and evolution in the family Compositae. In: Heywood, V. H.; Harbone, J. B. & Turner, B. L. (eds.). *The Biology and Chemistry of the Compositae*. London. Academic Press. Pp. 267-281.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; SCHEMSKE, D.W.; HANCOCK, J.F.; THOMPSON, J.N.; HUSBAND, B.C.; JUDD, W.S. 2007. Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* 56: no prelo.
- STACE, C.A. 1989. *Plant Taxonomy and Biosystematics*. 2 edition. New York, Cambridge University Press.
- STUTTS, J.G. 1981. Taxonomic revision of *Pollalesta* H.B.K. (Compositae: Vernonieae). *Rhodora* 83: 385 - 419.
- STUTTS, J.G. 1988. Taxonomic revision of *Vernonieae* Subsect. *Chamaedrys* (Compositae: Vernonieae). *Rhodora* 90: 37 - 99.
- TONA, L.; CIMANGA, R. K.; MESIA, K.; MUSUAMBA, C.T.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HERNANS, N.; VAN MIERT, S.; PIETERS, L.; TOTTE, J.; VLIETINCK, A.J. 2004. In vitro antiparasitic activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 93: 27-32.

Tabela I - Espécie de *Vernonia* analisadas no Capítulo 1 com as respectivas localidades, habitat e material-testemunho. C - cerrado, CR - campo rupestre.

ESPÉCIES	LOCAL DE COLETA	HABITAT	Nº DO COLETOR
<i>V. bardanoides</i> Less.	Itirapina, SP	C	VM Oliveira 84
<i>V. beyrichii</i> Less.	Itambé do Mato Dentro, MG	C	IR Costa 138
<i>V. fruticulosa</i> Mart. ex DC.	Joaquim Felício, MG	C	IR Costa 536
<i>V. linearifolia</i> Less.	Joaquim Felício, MG	CR	ME Mansanares 435
<i>V. platensis</i> (Sprengel) Less.	Indaiatuba, SP	R	VM Oliveira 85
<i>V. rubriramea</i> Mart.	Itambé do Mato Dentro, MG	C	IR Costa 139
<i>V. scorpioides</i> Pers.	São Miguel Arcanjo, SP	C	AM Corrêa 25
<i>V. simplex</i> Less.	Joaquim Felício, MG	CR	IR Costa 570

Tabela II – Espécies de *Vernonia* pertencentes à seção *Lepidaploa* que ocorrem no Brasil, agrupadas de acordo com os grupos de BAKER (1873), gêneros *sensu* ROBINSON (1999), número cromossômico (n, 2n) e referências.

Espécies/subseções <i>sensu</i> Baker	GÊNERO <i>SENSU</i> ROBINSON	n	2n	REFERÊNCIAS
SUBSEÇÃO AXILLIFLORAE BENTH.				
<i>V. adamantium</i> Gardn.	<i>Lepidaploa</i>	-	40	Oliveira <i>et al.</i> 2007a
<i>V. aurea</i> Mart.	<i>Lepidaploa</i>	17	-	Jones 1982
		-	32	Dematteis 1998a, 2002
<i>V. chalybae</i> Mart. ex DC.	<i>Lepidaploa</i>	-	32	Dematteis 1998a, 2002
<i>V. chamissonis</i> Less.	<i>Lepidaploa</i>	-	30	Oliveira <i>et al.</i> 2007a
<i>V. cotoneaster</i> (Willd. ex Spreng) Less.	<i>Lepidaploa</i>	-	32	Oliveira <i>et al.</i> 2007a
		-	30	Dematteis 1998a
<i>V. fruticulosa</i> Mart. ex DC.	<i>Lepidaploa</i>	16	-	Dematteis 1998a, Capítulo 1
		-	32	Oliveira <i>et al.</i> 2007a
<i>V. geminata</i> HBK	<i>Lepidaploa</i>	-	20	Oliveira <i>et al.</i> 2007a
<i>V. glabrata</i> Less.	<i>Lessingianthus</i>	17, 17+B	51, ca. 52, 67-68	Jones 1979b
<i>V. polyphylla</i> Sch.-Bip. ex Baker	<i>Lessingianthus</i>	-	64	Ruas <i>et al.</i> 1991; Dematteis 2007
		-	64	Dematteis 2002
<i>V. remotiflora</i> L.C. Rich	<i>Lepidaploa</i>	14	28	Dematteis 2002, 2007
		-	32	Oliveira <i>et al.</i> 2007a
<i>V. riedelli</i> Sch. Bip. ex Baker	<i>Lepidaploa</i>	-	36	Oliveira <i>et al.</i> 2007a
<i>V. trinitatis</i> Ekman	<i>Lepidaploa</i>	-	102	Keeley 1978
<i>V. sericea</i> Richard	<i>Lepidaploa</i>	17	-	Keeley 1978
SUBSEÇÃO MACROCEPHALAE BENTH.				
<i>V. bardanoides</i> Less.	<i>Lessingianthus</i>	17, 34	-	Jones 1979b
		-	32	Capítulo 1
<i>V. buddleiaefolia</i> Mart. ex. DC.	<i>Lessingianthus</i>	-	32	Oliveira <i>et al.</i> 2007b

<i>V. coriaceae</i> Less.	<i>Lessingianthus</i>	-	32	Dematteis 1998b
<i>V. dura</i> Mart. ex. DC.	<i>Lessingianthus</i>	-	32	Dematteis 1998b, 2002
<i>V. eriolepis</i> Gardn.	<i>Lepidaploa</i>	-	32	Dematteis 1998b
<i>V. heringeri</i> H. Rob.	<i>Lessingianthus</i>	-	32	Dematteis 1998b, 2002
<i>V. hystricosa</i> Cabrera et Dematteis	<i>Lessingianthus</i>	-	128	Dematteis 2002, 2007
<i>V. hovaelifolia</i> Gardn.	<i>Lessingianthus</i>	-	64	Dematteis 2002
<i>V. linearifolia</i> Less.	<i>Lessingianthus</i>	-	32	Capítulo 1
<i>V. lithospermifolia</i> Hieron	<i>Lessingianthus</i>	10	20	Dematteis 1998a
<i>V. obtusata</i> Less.	<i>Lessingianthus</i>	-	64	Dematteis 2002
<i>V. onopordioides</i> Baker	-	-	32	Dematteis 1998b
<i>V. onoporoides</i> Baker	<i>Lessingianthus</i>	-	ca. 80	Oliveira 2005
<i>V. pseudoincana</i> (Hieron.) Cabrera	<i>Lessingianthus</i>	-	32	Dematteis 2002
<i>V. rubricaulis</i> Humb. et Bonpl. var. <i>rubricaulis</i>	<i>Lessingianthus</i>	16	32	Dematteis 2002
<i>V. rubricaulis</i> Humb. et Bonpl. var. <i>australis</i>	<i>Lessingianthus</i>	32	64	Dematteis 2002
Hieron.				
<i>V. rugulosa</i> Sch. Bip. ex Baker	<i>Lessingianthus</i>	-	30	Dematteis 2002
<i>V. tomentella</i> Mart. ex DC.	<i>Lessingianthus</i>	-	32	Oliveira et al. 2007b
SUBSEÇÃO OLIGOCEPHALAE BENTH.				
<i>V. mollissima</i> Hook. & Arn.	<i>Lessingianthus</i>	ca. 54	-	Bernadello 1986
<i>V. pronpinqua</i> Hieron. var. <i>pronpinqua</i>	<i>Chrysolaena</i>	10	20	Dematteis 2002, 2007
<i>V. pronpinqua</i> Hieron. var. <i>canescens</i> (Chodat)	<i>Chrysolaena</i>	10	20	Dematteis 2002, 2007
Dematteis				
<i>V. sceptrum</i> Chodat	<i>Chrysolaena</i>	-	80	Dematteis 2002
<i>V. simplex</i> Less.	<i>Lessingianthus</i>	17	34	Jones 1982
		-	32	Capítulo 1
		-	40	Ruas et al. 1991
Subseção Paniculatae Benth.				
<i>V. amplexicaulis</i> R.E. Fries	<i>Vernonanthura</i>		34	Dematteis 2002
<i>V. beyrichii</i>	<i>Vernonanthura</i>	-	34	Capítulo 1
<i>V. echioides</i> Less.	<i>Vernonanthura</i>	34	-	Dematteis 2002
<i>V. ferruginea</i> Less.	<i>Vernonanthura</i>	-	34	Dematteis 2002

<i>V. fulva</i> Griseb.	<i>Vernonanthura</i>	17	34	Dematteis 2002
<i>V. incana</i> Less.	<i>Vernonanthura</i>	34	-	Dematteis 2002
<i>V. loretensis</i> Hieron.	<i>Vernonanthura</i>	17	34	Dematteis 2002
<i>V. nitidula</i> Less.	<i>Vernonanthura</i>	-	34	Sttuts <i>et al.</i> 1988
			34	Dematteis 2002
<i>V. nudiflora</i> Less.	<i>Vernonanthura</i>	17	-	Jones 1974, Bernadello 1986
		16	-	Hunter 1964
		16	32	Covas & Hunziker 1954
		-	34	Ruas <i>et al.</i> 1991, Sttuts <i>et al.</i> 1988
<i>V. PINGUIS</i> GRISEB.	<i>Vernonanthura</i>		68	Dematteis 2002
<i>V. SQUAMULOSA</i> HOOK. ET ARN.	<i>Vernonanthura</i>	17	34	Dematteis 2002
<i>V. WESTINIANA</i> LESS	<i>Vernonanthura</i>	17		Jones 1979b
SUBSEÇÃO SCORPIOIDEAE BENTH.				
<i>V. argyrotrichia</i> Sch.-Bip. ex Baker	<i>Lepidaploa</i>	17	-	Jones 1979b
<i>V. cognata</i> Less.	<i>Chrysolaena</i>	ca. 17, 34	-	Jones 1979b
<i>V. ferruginea</i> Less.	<i>Vernonanthura</i>	-	34	Dematteis & Fernández 1998
<i>V. flexuosa</i> Sims	<i>Chrysolaena</i>	ca. 17	-	Jones 1979b
		ca. 30-32	-	Hunziker <i>et al.</i> 1990
		-	40	Ruas <i>et al.</i> 1991
		20	40	Dematteis 2002
<i>V. mariana</i> Mart.	<i>Vernonanthura</i>	17	-	Jones 1982
<i>V. platensis</i> (Sprengel) Less.	<i>Chrysolaena</i>	-	20, 40	Hunter 1964, Cabrera 1944
		-	68	Jones 1982
		10, 20	-	Galiano & Hunziker 1986, Adegbite & Ayodele 2004
		10, 20, 30	20, 40, 50, 60	Dematteis 2002
		-	60	Capítulo 1
		-	80	Dematteis 1998a
<i>V. polyanthes</i> Less.	<i>Vernonanthura</i>	18	-	Coleman 1968
		-	32	Oliveira <i>et al.</i> 2007b
		-	34	Ruas <i>et al.</i> 1991, Oliveira <i>et al.</i> 2007b

<i>V. rubriramea</i> Mart.	<i>Vernonanthura</i>	-	32	Capítulo 1
<i>V. scorpioides</i> Pers.	<i>Chrysolaena</i>	28±1	-	Jones 1970
		17	-	Jones 1982
		15	-	Adegbite & Ayodele 2004
		-	30	Huynh 1965, Adegbite & Ayodele 2004
		-	56	Capítulo 1
<i>V. tweediana</i> Baker	<i>Vernonanthura</i>	9	34	Jones 1982
		17	-	Galiano & Hunziker 1987

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE *Vernonia geminata* (ASTERACEAE, VERNONIEAE) COM TÉCNICAS DE DIFERENCIAÇÃO LINEAR DE CROMOSSOMOS

Autores: OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J.

RESUMO

Buscando aprofundar o conhecimento cariotípico e contribuir para o melhor entendimento taxonômico do gênero *Vernonia*, foram aplicados, em duas populações de *V. geminata* (Asteraceae, Vernonieae), diferentes técnicas de bandamento cromossômico, incluindo-se NOR e a tripla coloração com fluorocromos CMA/DA/DAPI (CDD), e a técnica de hibridação de DNA *in situ* com a sequência de 45S de DNAr. Foram coletadas plantas de duas populações, em área de cerrado, uma no município de Assis (pop. 1) e outra em Analândia (pop. 2), estado de São Paulo. As duas populações apresentaram $2n=20$ cromossomos, porém foram observados cromossomos B na população 2. As duas populações de *V. geminata* apresentaram um par de bandas CMA⁺ e um par de bandas NOR, sendo as duas terminais. A hibridação *in situ* evidenciou, na população 1, dois pares de sítios de DNAr 45S, sendo dois sítios terminais e dois centroméricos, enquanto que a população 2 apresentou um par de sítios terminais e dois sítios em dois cromossomos B, um em cada. Houve coincidência de localização entre bandas CMA, NOR com um dos sítios de DNAr 45S. Não há dados comparativos em outras espécies de *Vernonia*.

INTRODUÇÃO

Vernonia Schreb. (Asteraceae, Vernoniae) compreende pequenas ervas rosuladas escaposas até grandes árvores (STUTTS 1988), distribuídas nas regiões tropicais da Ásia, África e América (DEMATTEIS 1998). Do ponto de vista sistemático, é um dos gêneros mais complexos da família (DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998), com cerca de 1.000 espécies (JONES 1977). Segundo DEMATTEIS & FERNÁNDEZ (2000), na América do Sul existem cerca de 350-400 espécies, com maior ocorrência no Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia. O sul do Brasil é o maior centro de diversificação do gênero (JONES 1977). Uma dessas espécies é *V. geminata*, que ocorre desde o México à América do Sul (ROBINSON 1990, JORGENSEN & ULLOA 1994), incluindo a região de cerrado no Brasil (OLIVEIRA *et al.* 2007a, IBGE 2004). É uma espécie melífera importante, sendo seu pólen detectado no mel e no alimento larval da espécie de abelha *Tetragonisca angustula*, encontrada em Chiapas, México (MARTINEZ-HERNANDEZ *et al.* 1994). Os cariótipos de *V. geminata* e de outras espécies de *Vernonia* foram descritos por Oliveira *et al.* (2007a), mediante técnica de coloração convencional. *V. geminata* apresenta $2n=20$ e cromossomos predominantemente metacêntricos, variando de 2,0 a 4,6 μ m.

A análise de cariótipos é fundamental para a caracterização citogenética de uma espécie e para examinar a variação entre seus indivíduos e/ou populações. A comparação de cariótipos de espécies diferentes também permite a análise taxonômica e evolutiva de um dado taxon, como um gênero. Muitas vezes, diferenças na assimetria de um cariótipo podem indicar como estes cromossomos se diversificaram quanto ao tamanho e à morfologia dentro de um grupo (GUERRA 1988). A assimetria cariotípica é pouco variável entre as espécies de *Vernonia*, sugerindo que a diversificação deste gênero foi acompanhada por pequenas alterações na constituição cariotípica das espécies (DEMATTEIS 1996, 1998; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000, OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b).

Os números cromossômicos em *Vernonia* variam entre $2n=18$ a $2n=160$ (DARLINGTON & WYLIE 1955; FEDOROV. 1969; MOORE 1973, 1974, 1977; GOLDBLATT 1981, 1984, 1985, 1988; GOLDBLATT & JOHNSON 1990, 1991, 1996, 1998, 2006, 2008; MOORE 1973, 1974, 1977). Em algumas espécies de *Vernonia*, como *V. cognata* Less. ($2n=ca.34$, 2 a 3 Bs) e *V. glabrata* Less. ($n=17$, $\pm 1B$), ocorre variação intraespecífica, pela ocorrência de cromossomos B (JONES 1979a, GALIANO & HUNZIKER 1987, DEMATTEIS 1997, 1998), que são geralmente heterocromáticos, pequenos e em número muito variável por indivíduo (DEMATTEIS 1997, 1998). Citologicamente, apenas 20% das espécies foram estudadas até o momento. A cariotipagem com técnicas convencionais abrange apenas 10% das espécies de *Vernonia* e não as discrimina muito bem, devido à pequena variação de tamanho cromossômico e de posição centromérica (RUAS *et al.* 1991; DEMATTEIS 1996, 1998; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000, OLIVEIRA *et al.* 2007a, b). Até o momento, informações cariotípicas obtidas por técnicas que promovem a diferenciação linear dos cromossomos (bandamento cromossômico e hibridação de DNA *in situ*) são escassas para espécies do gênero *Vernonia*.

Dentre as técnicas de bandamento, utiliza-se a coloração com fluorocromos para determinar a composição de bases da heterocromatina (SCHWEIZER 1976). O fluorocromo DAPI (4'-6 diamidino -2 fenilindol) evidencia sequências de DNA repetitivas ricas em adenina e timina (A-T), enquanto que o CMA (cromomicina A3) se liga à regiões ricas em citosina e guanina (C-G). Ao estudar o padrão de bandas heterocromáticas, em Rutaceae, subfamília Aurantioideae, GUERRA *et al.* (2000) observaram que os gêneros mais basais dentro do grupo apresentam menores quantidades de heterocromatina do que os gêneros mais derivados. Além do bandamento com fluorocromos, pode-se utilizar coloração específica com nitrato de prata, o bandamento NOR (GOODPASTURE & BLOOM 1975), para identificar

nucléolos e cromossomos que possuem regiões organizadoras de nucléolo que estiveram ativas na intérfase. Usando a coloração específica com nitrato de prata, MOSCONE *et al.* (1995) discutiram possíveis tendências na evolução cariotípica de *Capsicum* (Solanaceae) com $x=12$ cromossomos, e consideraram que a presença de quatro NORs (regiões organizadoras do nucléolo), localizadas no primeiro par de cromossomos metacêntricos e no 12º par de cromossomos subtelocêntricos, em um complemento diplóide, é considerada como uma condição plesiomórfica, ou seja, mais primitiva, por ocorrerem em espécies pertencentes ao subgrupo basal (A).

A hibridação *in situ* é um método preciso para localizar sequências específicas de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) no citoplasma, organelas, cromossomos ou núcleo de material biológico (LEITCH *et al.* 1994). As sequências de DNA mais frequentemente utilizadas como sondas são as de genes ribossomais (45S DNAr e 5S DNAr) e as teloméricas (WEISS-SCHNEEWEISS *et al.* 2003). Em algumas Asteraceae, como *Artemisia*, as técnicas de hibridação *in situ* e a coloração sequencial com fluorocromos CMA/DA/DAPI (ou CDD) são de grande valia. TORREL *et al.* (2003) observaram que, nos subgêneros *Artemisia* e *Seriphidium*, os sítios de DNAr 5S estão presentes em menor quantidade que os de 18S-5.8S-26S (45S) e que, o locus de DNAr 5S aparece, na maioria das vezes, na região terminal do cromossomo nucleolar e podem ocorrer em região rica em C-G, subsidiando a não separação do subgênero *Seriphidium* como um gênero independente.

Buscando ampliar o conhecimento cariotípico e contribuir para o melhor entendimento do gênero *Vernonia*, foram aplicadas as técnicas de bandamento cromossômico, NOR e a tripla coloração com fluorocromos CMA/DA/DAPI (CDD), e a técnica de hibridação de DNA *in situ* para a sequência de 45S de DNAr em indivíduos de duas populações de *V. geminata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados frutos, ramos florais e vegetativos de cerca de cinco indivíduos de duas populações de *V. geminata*. Essas populações foram coletadas em área de cerrado, no estado de São Paulo, sendo que a população 1 foi coletada na cidade de Assis e a população 2 em Analândia. Os ramos florais e vegetativos foram herborizados seguindo técnicas usuais. Materiais testemunho (pop. 1, VM Oliveira 44; pop. 2, VM Oliveira 82) foram depositados no Herbário UEC (Departamento de Botânica, IB, Universidade Estadual de Campinas).

Raízes recém-germinadas foram coletadas e submetidas a pré-tratamento com 8 – hidroxiquinoleína (8Hq) – solução 0,002M, por 5 horas, a 14-15°C. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético) por 24 horas, transferidas para álcool 70% e estocadas em freezer.

Para a preparação de lâminas com digestão enzimática, as raízes foram lavadas em tampão citrato-fosfato pH=4,8 e enxutas em papel filtro. As pontas da raiz foram digeridas em solução enzimática com 4% de celulase e 40% de pectinase, em câmara úmida, a 37°C por 2 horas. Foi feito o esmagamento das pontas de raízes entre lâmina e lamínula em uma gota de ácido acético 45%, retirando-se posteriormente a lamínula após banho em nitrogênio líquido. As lâminas utilizadas nas técnicas de bandamento CMA/DA/DAPI e NOR foram mantidas à temperatura ambiente por pelo menos um dia.

O bandamento CMA/DA/DAPI foi realizado seguindo-se o protocolo de MOSCONE *et al.* (1996). As lâminas foram coradas primeiramente com CMA₃ (cromomicina A3) 0,5mg/ml por 60 minutos, em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas lavadas com água destilada. Logo após, as lâminas foram coradas com DA (distamicina A) 10mg/ml por 15 minutos e lavadas novamente com água destilada. Finalmente, foram coradas com DAPI (4'-6

diamidino -2 fenilindol) 2mg/ml por 30 minutos. As lâminas foram lavadas novamente com água destilada e montadas com um meio de montagem contendo glicerol para fluorescência e tampão Mallvaine (1:1). Estas lâminas foram mantidas no escuro, à 37°C, por 3 dias, antes de serem observadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX51, com filtros específicos.

O bandamento NOR foi realizado de acordo com MOSCONE *et al.* (1995). As lâminas foram mergulhadas em tampão borato (0,01M; 1 tampão: 10H₂O dd) por 10 minutos e, em seguida, lavadas com água destilada. Após isso, cada lâmina, recebeu uma gota de solução de nitrato de prata e, em cima da gota, foi colocada uma malha de nylon. As lâminas foram mantidas à 60°C durante 60 minutos e, em seguidas foram mergulhadas em água destilada por 5 minutos. Após secas, as lâminas foram montadas com Entelan.

A hibridação *in situ* foi realizada de acordo com CUADRADO & JOUVE (1994), com modificações de FREGONEZI *et al.* (2004). Foi utilizado o fragmento de DNAr 45S de trigo (sonda pTa71) de cerca de 12kb contendo a sequência 28S-5,8S-18S com os seus espaçadores. Este fragmento foi clonado no plasmídio pUC18 em *E. coli*, resistente a ampicilina. O plasmídio foi separado pela técnica da miniprep e a concentração foi medida em um fluorômetro. A marcação da sonda foi feita por nick translation (Bionick Gibco) com biotina-14dATP. Antes de iniciar a hibridação, as lâminas foram tratadas com RNase 1% (1 RNase Tipo I: 99 2xSSC) pH 7,0, à 37°C por 1 hora. As lâminas foram lavadas em 2xSSC por 10 minutos sob agitação, mergulhadas em paraformaldeído 4% por mais 10 minutos, e depois lavadas novamente com 2xSSC. As lâminas foram imersas em álcool 70% por 5 min e em álcool 100% por mais 5 min. Após as lâminas secarem, a preparação foi coberta pela mistura de hibridização. A mistura de hibridização foi composta por formamida 100%, PEG (polietilenoglicol) 50%, 20xSSC, sonda (DNAr 45S; 100-200ng μl^{-1}), DNA de bloqueio

(esperma de salmão), SDS (dextran sulfato de sódio) 10% e água. Depois de acrescentada a mistura de hibridização nas lâminas, estas foram colocadas em um termociclador, sendo submetidas a três ciclos de 10 min. cada, às temperaturas de 90°C, 50°C e 38°C. As lâminas foram então mantidas na estufa a 37°C, em câmara úmida e no escuro, por toda a noite. Foram feitos os banhos pós-hibridação, primeiramente com 2xSSC a 42°C por 5 min, formamida 20% (20ml de formamida para 80ml de 0,1xSSC) a 42°C por 10 min, 0,1xSSC a 42°C por 5 min e outro novamente em 2xSSC a 42°C por 5 min, 4xSSC/Tween 20 0,2% a 42°C e outro com 4xSSC/Tween 20 0,2% à temperatura ambiente. Todos os banhos foram feitos sob agitação. As lâminas foram tratadas com 50µl de BSA (Albumina de soro bovino) 5% por 5 min. Foram adicionados 50µl da solução de detecção, contendo 1:100 de avidina-FITC, e os cromossomos foram contracolorados com iodeto de propídio.

A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico (bandamento NOR) e de epifluorescência (hibridação *in situ* e bandamento CMA/DA/DAPI). Para as fotomicrografias de coloração convencional e bandamento NOR foi utilizado filme preto e branco, ISO 25, enquanto que, para as fotomicrografias de bandamento CMA/DA/DAPI foi utilizado filme preto e branco, ISO 100. As fotografias da hibridação *in situ* foram feitas com filme colorido Kodak ProImage, ISO 100. Foram observadas, no mínimo, 10 células em condições adequadas de espalhamento e contração cromossômica para cada coloração.

O ideograma foi baseado na análise de 10 metáfases mitóticas. Os cromossomos foram arranjados pela forma e não pelo tamanho, seguindo os estudos anteriores de DEMATTEIS (1998) e DEMATTEIS & FERNÁNDEZ (1998), em que foram apresentados cariótipos de espécies da tribo Vernonieae.

RESULTADOS

As duas populações estudadas apresentaram $2n=20$. No entanto, na população 2, além dos 20 cromossomos do cariótipo normal, observaram-se estruturas pequenas e arredondadas, interpretadas como sendo cromossomos B, que variam (0 a 6) entre diferentes células de um mesmo indivíduo (Figura 3).

As duas populações apresentaram um par de bandas CMA⁺ na região terminal do braço curto do quarto par de cromossomos submetacêntricos (Figuras 1, 2A e 2B). Ambas não apresentaram bandas DAPI (DAPI neutro) (Figura 2C e 2D).

O bandamento NOR possibilitou, nas duas populações, a visualização de um par de bandas terminal no braço curto do quarto par de cromossomos submetacêntricos (Figuras 1, 2G e 2H).

A hibridação *in situ* evidenciou, na população 1, dois pares de sítios de DNAr 45S, um próximo à região centromérica, no braço curto do sexto par de cromossomos metacêntricos e, outro na região terminal do braço curto do quarto par de cromossomos submetacêntricos. Na população 2 observou-se também dois pares de sítios, um situado na região terminal do braço curto do quarto par de cromossomos submetacêntricos e outros dois sítios em cromossomos Bs (Figuras 1, 2E e 2F).

DISCUSSÃO

Segundo RUAS *et al.* (1991), DEMATTEIS (1996, 1998), DEMATTEIS & FERNÁNDEZ (1998, 2000) e OLIVEIRA *et al.* (2007a, b), em *Vernonia*, a cariotipagem com técnicas convencionais não discrimina muito bem as espécies já estudadas, devido à pequena variação de tamanho cromossômico e de posição centromérica. Dentre as espécies de *Vernonia* pertencentes à subseção *Axilliflorae*, estudadas por OLIVEIRA *et al.* (2007a), *V. geminata* é a que possui cariótipo mais diferenciado, por ser a única com $2n=20$ (padrão do grupo é $x=16$), por possuir cromossomos com maior amplitude de variação de tamanho (2,0 a 4,6 μ m) e por apresentar maior proporção de cromossomos submetacêntricos, em relação aos metacêntricos (6m+4sm). Estudos envolvendo técnicas que promovem a diferenciação linear dos cromossomos são inexistentes para espécies do gênero, de forma que não há muitos padrões de comparação com os resultados aqui obtidos.

Houve coincidência na localização da região corada com nitrato de prata, CMA⁺ e o sítio de DNAr 45S, próxima à região terminal, no braço curto do quarto cromossomo submetacêntrico, nas duas populações (Figuras 1 e 2). Entretanto, nem todos os sítios de DNAr foram corados positivamente com CMA (região centromérica do braço curto do sexto par de cromossomos metacêntricos e cromossomos B, (Figuras 1 e 2). A presença de sítios de DNAr 45S em cromossomos B já foi relatada anteriormente em outras Asteraceae como *Crepis capillaris* L. (JAMILENA *et al.* 1994) e *Brachycome dichromosomatica* C.R. Carter. B. (MARSCHNER *et al.* 2007). Números diferentes de sítios de DNAr 45S e bandas CMA⁺ também foram observados em *Cestrum* (Solanaceae) (FREGONEZZI *et al.* 2006), *Helianthus* (VANZELA *et al.* 2002) e *Crotalaria* (Leguminosae – Papilionoideae) (MONDIN *et al.* 2007). De acordo com MONDIN *et al.* 2007 (2004), em *Crotalaria*, uma das bandas CMA⁺ pode não ter sido

visualizada devido ao seu tamanho reduzido, o que também pode estar ocorrendo na população 1 do presente estudo. A mesma localização da região CMA⁺ e o sítio de DNAr 45S demonstra que o mesmo é rico em GC. De acordo com TORREL *et al.* (2003), em *Artemisia*, sítios de DNAr são ricos em GC e basicamente ligados às AgNORs. Esse mesmo padrão também ocorre em outras plantas, como *Hypochaeris* (CERBAH *et al.* 1995), *Dendranthema* (KONDO *et al.* 1996a) e *Chrysanthemum* (KONDO *et al.* 1996b).

O bandamento NOR detecta somente as regiões organizadoras do nucléolo ativas, que são transcritas na intérfase que antecede à divisão celular, enquanto que a hibridação *in situ* evidencia as regiões do organizador nucleolar (NOR) ativas e inativas (MURRAY *et al.* 1992). Em *Lathyrus sativus*, MURRAY *et al.* (1992) não encontraram relação entre o número de sinais de hibridação e o número de bandas NOR, relatando que um dos sítios detectado pela sonda estava inativo. Da mesma maneira, GALASSO *et al.* (1995) relataram em *Vigna unguiculata* que, dentre os múltiplos sítios de DNAr 45S apenas os quatro maiores apresentaram impregnação pelo nitrato de prata, resultado interpretado como uma inativação das NORs. SHI *et al.* (1996) relataram também que em *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris*, na intérfase, nem todos os sinais de DNAr 45S associavam-se ao nucléolo. OLIVEIRA *et al.* (2007a) não observaram constrições secundárias e satélites com técnicas de coloração convencional em *V. geminata*, confirmando as limitações dessa técnica na detecção de regiões organizadoras do nucléolo, já relatados por outros autores, como BERG & GREILHUBER (1993) em *Cestrum*. No presente trabalho não observou-se a coincidência entre o número de sítios de DNAr 45S e bandas NOR.

A ausência do sítio de DNAr 45S centromérico no sexto cromossomo metacêntrico da população 2 (Figura 1B) pode indicar a deleção dessa sequência, presente na população 1

(Figura 1A). Entretanto, pode também estar relacionada ao tamanho reduzido dessa sequência, em decorrência de pequenas alterações estruturais, prejudicando a visualização do sítio. A técnica de hibridação *in situ* é mais qualitativa do que quantitativa, entretanto uma associação entre o tamanho dos sinais de hibridação e o número de sequências de DNAr repetidas pode ser demonstrada, de maneira que sinais mais intensos representam sítios com maior número de sequências repetidas do que sinais menos intensos (ZURITA *et al.* 1997, FREGONEZI *et al.* 2004).

LIMA DE FARIA (1976) sugeriu que sinais de hibridação em braço curto de cromossomos é uma tendência geral dentro das Asteraceae. Estudos envolvendo hibridação de DNAr 45S em espécies desta família também mostraram esta tendência (GATT *et al.* 1998, 1999; VANZELA *et al.* 2002; WEISS-SHNEEWEISS *et al.* 2003; GARNATJE *et al.* 2004; FREGONEZI *et al.* 2004). TORREL *et al.* (2003) observaram, em Asteraceae, nos subgêneros *Artemisia* e *Seriphidium*, pertencentes ao gênero *Artemisia*, que os sítios de DNAr 5S estão presentes em menor quantidade que os de 18S-5.8S-26S e que, o loci de DNAr localiza-se, na maioria das vezes, na região terminal do cromossomo e ocorrem em região rica em C-G, mostrando que não há sentido dividir *Artemisia* nesses dois subgêneros.

A disploidia pode ter papel proeminente na evolução da espécie estudada, assim como é o caso relatado para muitas espécies de Asteraceae. Em espécies de *Hipochaeris* pequenas alterações estruturais, tais como translocações, inversões envolvendo perda e ganho de fragmentos cromossômicos, algumas vezes contendo a região de DNAr 45S, são sugeridas para explicar a disploidia encontrada na sua evolução cariotípica (WEISS-SCHNEEWEISS *et al.* 2003). *H. maculata*, espécie considerada ancestral dentro desse grupo, através de translocação seguida de perda cromossômica, teria originado formas transitórias, as quais por perda da região contendo DNAr, teriam originado a espécie *H. rosengurtii*, ou ainda por inversão, *H.*

apergioides (WEISS-SCHNEEWEISS *et al.* 2003). Em *Helianthus*, foram detectadas pequenas variações nos cromossomos, indicando em alguns casos, a perda ou ganho de regiões de DNAr, e estas alterações estruturais teriam papel importante na especiação deste gênero (VANZELA *et al.* 2002). Os resultados apresentados, no presente estudo, ainda são insuficientes para concluir quais são os mecanismos envolvidos em *Vernonia*.

Na população 2, observou-se variação cromossômica intraespecífica numérica, pela ocorrência de até seis cromossomos B ($2n=20+0-6B$). Esses cromossomos extras ocorrem em várias espécies de plantas, incluindo *Vernonia* (JONES 1979a; GALIANO & HUNZIKER 1987; DEMATTEIS 1997, 1998) e outras Asteraceae, como *Mikania* (MAFFEI *et al.* 1999; RUAS *et al.* 2000), *Crepis capillaris* (WHITEHOUSE *et al.* 1981) e *Calycadomia paniciflora* (CARR & CARR 1982). Os cromossomos B são geralmente heterocromáticos, pequenos e em número muito variável por indivíduo (GUERRA 1988). A confirmação dos cromossomos B exige mais estudos de comportamento meiótico, tendo em vista que se espera que seja irregular, com a formação de univalentes, migração preferencial para um dos pólos ou, retardo anafásico (GUERRA 1988; JONES 1995). Embora não sejam homólogos com os cromossomos do complemento normal, em milho, cromossomos B podem parear entre si, formando quiasmas, (JONES & REES 1982). Baseado em diversos estudos em diferentes grupos taxonômicos, CAMACHO *et al.* (2000) apontaram que os cromossomos B podem ser derivados dos cromossomos A ou de cromossomos sexuais.

Não são disponíveis, na literatura, informações com a técnica de hibridação *in situ* em outras espécies de *Vernonia*, nem com todas as técnicas de bandamento aqui aplicadas a *V. geminata*. Assim, não há base comparativa dentro do gênero, porém parece ser significativa a variação intraespecífica em *V. geminata*, no que diz respeito aos possíveis cromossomos B e

às diferenças no padrão de sítios de DNAr 45S. Estudos cromossômicos complementares em *V. geminata* e em outras espécies de *Vernonia* utilizando outras sondas de DNA poderão contribuir para o entendimento taxonômico e evolutivo desse grupo de plantas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos de Vanessa Mancuso de Oliveira e financiamento deste trabalho (#02/11805-5, #04/09982-1, #04/13165-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERG, C., GREILHUBER, J., 1993. Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum* (Solanaceae): *C. strigillatum*, *C. fasciculatum*, and *C. elegans*. *Pl. Syst. Evol.* 185: 133-151.
- CAMACHO, J.P.M.; SHARBEL, T.F.; BEUKEBOOM, L.W. 2000. B chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 355: 163-178.
- CARR, G.D. & CARR, R.L. 1982. Micro and nucleolar-organizing B-chromosomes in *Calycadenia* (Asteraceae). *Cytologia* 47: 79-87.
- CERBAH, M.; COULAUD, J.; GODELLE, B.; SILJAK-YAKOVLEV, S. 1995. Genome size, fluorochrome banding and karyotype evolution in some *Hypochaeris* (Asteraceae). *J. Hered.* 38: 689-695.
- 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. *Chromosome Research.* 2: 331-338.
- DARLINGTON, C.; WYLIE, A.P. 1955. Chromosome Atlas of Flowering Plants. 2º edição. George Allen & Unwin LTD, Ruskin House Museum Street, London.
- DEMATTEIS, M. 1996. Estudios cromosomícos en especies Argentinas de *Vernonia* (Asteraceae). *Bonplandia* 9(1-2): 103-110.
- DEMATTEIS, M. 1997. Números cromosómicos y cariotipos de algunas especies de *Vernonia* (Asteraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 33(1-2): 85-90.
- DEMATTEIS, M. 1998. Chromosome studies of some *Vernonia* species. (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 381-385.
- DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 1998. karyotypes of seven South American species of *Vernonia* (Asteraceae). *Cytologia* 63: 323-328.
- DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 2000. Chromosomes studies on nine South American species of *Vernonia* (Vernonieae, Asteraceae). *Caryologia* 53(1): 61.
- FEDOROV, A.A. 1969. *Chromosome number of flowering plants*. V.L. Komarov Botanical Institute, Leningrado.

- FREGONEZI, J. N., TOREZAN, J. M.D. & VANZELA, A. L.L. 2004. A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence *in situ* hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA₃ banding. *Genet. Mol. Biol.* 27(2): 223-227.
- GALASSO, I.; SCHMIDT, T.; PIGNONE, D.; HESLOP-HARRISON, J.S. 1995. The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L.) Walp: the physical organization and characterization of 18S-5.8S-25S rRNA genes, 5S genes, telomere-like sequences, and a family of centromeric repetitive DNA sequences. *Theor. Appl. Gen.* 9: 928-935.
- GALIANO, N.G. & HUNZIKER, J.H. 1987. Estudios cariologicos em Compositae. IV. Vernonieae Y Eupatorieae. *Darwianiana*, 28: 1-8.
- GARNATJE, T.; VALLÉS, J.; VILATERSANA, R.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; SILJAC-YAKOVLEV, S. 2004. Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). *Pl. Biol.* 6:140-146.
- GATT, M.; DING, H.; HAMMETT, K.; MURRAY, B. 1998. Polyploidy and evolution in wild and cultivated *Dahlia* species. *Annals of Botany* 84: 39-48.
- GOLDBLATT, P. 1981. Index to plant chromosome numbers 1975-1978. *Monographs in systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V5. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1984. Index to plant chromosome numbers 1979-1981. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V8. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1985. Index to plant chromosome numbers 1982-1983. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V13. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1988. Index to plant chromosome numbers 1984-1985. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V23. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1990. Index to plant chromosome numbers 1986-1987. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V30. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1991. Index to plant chromosome numbers 1988-1989. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V40. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1996. Index to plant chromosome numbers 1992-1993. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V58. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1998. Index to plant chromosome numbers 1994-1995. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.

- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 2006. Index to plant chromosome numbers 2001-2003. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 2008. Index to plant chromosome numbers 2004-2006. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOODPASTURE, C. & BLOOM, S.E. 1975. Vizualization of nuclear organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- GUERRA, M. 1988. *Introdução à citogenética Geral*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara.
- GUERRA, M.; SANTOS, K.G.B; B, E.B; EHRENDORFER, F. 2000. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantieae – a case os parallel chromosome evolution. *American Journal of Botany*: 87(5): 735-747.
- IBGE. 2004. Reserva Ecológica do IBGE. Ambiente e Plantas Vasculares. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro.
- JAMILENA, M. RUIZ-REJÓN, C.; RUIZ-REJÓN, M. 1994. A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. *Journal of Cell Science* 107:703–708.
- JONES, S.B. 1977. Vernonieae – systematic review. In: Heywood VH, Harbone JB, Turner BL, eds. *The biology and chemistry of the CompositaeI*, Vol. I, pp. 503-521. London: American Press.
- JONES, S.B. 1979b. Chromosome numbers of Vernonieae (Compositae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 106: 79-86.
- JONES, R.N. 1995. B chromosomes in plants. *Transley Reviews* 85: 411-434.
- JONES, R.N & REES, H. 1982. B chromosomes. Academic Press Inc. (London) Ltd. London. 266p.
- JORGENSEN, P. M. & C. ULLOA U. 1994. Seed plants of the high Andes of Ecuador---A checklist. *AAU Reports*. 34: 1-443.
- KONDO, K.; HONDA, Y.; TANAKA, R. 1996a. Chromosome marking in *Dendranthema japonica* var. *wakasaense* and its closely related species by fluorescence *in situ* hybridization using rDNA probe. *Kromosomo* II-81: 2785-2791.
- KONDO, K.; KOKUBUGATA, G.; HONDA, Y. 1996b. Marking and identification of certain chromosomes in wild *Chrysanthemum* and cycads by fluorescence *in situ* hybridization. *Genet. Polon.* 37A: 24-26.
- LEITCH, A.R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D. & LEITCH, I.J. 1994. *In situ hybridization*. BIOS Scientific Publishers LTD, Oxford.
- LIMA DE FARIA, A. 1976. The chromosome field: I. Prediction of the localization of ribosomal cistrons. *Hereditas* 83: 1-22.
- MAFFEI, E.M.D.; MARIN-MORALES, M.A.; RUAS, P.M. 1999. Chromosomal polymorphism in 12 populations of *Mikania micrantha* (Compositae). *Genet. Mol. Biol.*, 22(3): 433-444.

- MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, E., CUADRIELLO-AGUILAR, J. I., RAMÍREZ ARRIAGA, E., MEDINA CAMACHO, M., SOSA-NAJERA, M.S. MELCHOR - SÁNCHEZ, J.E. 1994. Foraging of *Nannotrigona testaceicornis*, *Tetragona jaty*, *scaptotrigona pachysoma* and *Plebeia* sp. at Tacana región, Chiapas, México. *Grana*, V. 33: 205-217.
- MARSCHNER, S.; MEISTER, A.; BLATTNER, F.; HOUBEN, A. 2007. Evolution and function of B chromosomes 45S rDNA in *Brachycome dichromatica*. *Genome* 50: 638-644.
- MONDIN M.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. 2007. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. *Genet. Mol. Biol.* 30(1): 65-72.
- MOORE, R.J. (eds) 1973. Index to plant chromosome numbers 1967 – 1971. *Regnum veg.* 90: 1-539.
- MOORE, R.J. (eds) 1974. Index to plant chromosome numbers 1972. *Regnum veg.* 91: 1-108.
- MOORE, R.J. (eds) 1977. Index to plant chromosome numbers 1973 – 1974. *Regnum veg.* 96: 1-257.
- MOSCONE EA, LAMBROU M, EHRENDORFER F. 1996. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 202: 37–63.
- MOSCONE E.A., LOIDL J., EHRENDORFER F., HUNZIKER A.T. 1995. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *American Journal of Botany* 82: 276–287.
- MURRAY, B.G.; BENNETT, MD.; HANMET, R.W. 1992. Secondary constrictions and NORs of *Lathyrus* investigated by silver staining and *in situ* hibridization. *Hered.* 68: 473-478.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007a. Cytotaxonomy of species of *Vernonia*, section *Lepidaploa*, group *Axilliflorae* (Asteraceae, Vernonieae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 154: 99-108.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007b. Cytotaxonomic studies in six species of *Vernonia* (Asteraceae: Vernonieae). *Caryologia* 60: 37-47.
- ROBINSON, H. 1990. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), VII: the genus *Lepidaploa*. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 103: 248-253.
- RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; VIEIRA, O.S.; MATZENBACHER, N.I. & MARTINS, N.S. 1991. Cytogenetics of genus *Vernonia* Schreber (Compositae). *Cytologia*, 56: 239-247.
- RUAS, P. M., RUAS, C. F., MAFFEI, E. M. D., MARIN-MORALES, M. A. M., AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; AGUIAR, M. L. R. 2000. Chromosome studies in the genus *Mikania* (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 23(4): 979 – 984.
- SCHWEIZER, D. 1976. Reserve fluorescent chromosome banding with Cromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307-324.
- SHI, L.; ZHU, T.; KEIN, P. 1996. Ribosomal RNA genes in soybean and common bean: chromosomal organization, expression, and evolution. *Theor. Appl. Gen.*: 93: 136-141.

- SILJAK-YAKOVLEV, S.; CERBAH, M.; COULAUD, J.; STOIAN, V.; BROWN, S.C., JELENIC, S. PAPES, D. 2002. Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. *Theor. Appl. Genet.* 104: 505-512.
- STUTTS, J.G. 1988. Taxonomic revision of *Vernonieae* Subsect. *Chamaedrys* (Compositae: Vernonieae). *Rhodora* 90: 37-99.
- TORREL, M.; CERBAH, M.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; VALLÈS, J. 2003. Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescence *in situ* hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Plant Syst. Evol.* 239: 141-153.
- VANZELA, A.L.L.; RUAS, C.F.; OLIVEIRA, M.F., RUAS, P.M. 2002. Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S probe. *Genetica* 114: 105-111.
- WEISS-SCHNEEWEISS, H., T. STUESSY, S. SILJAK-YAKOVLEV, C. BAEZA & J. PARKER. 2003. Systematic and evolutionary implications of karyotypes of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae) from South America. *Plant Systematics and Evolution* 241: 171-184.
- WHITEHOUSE, C., EDGAR, L.A., JONES, G.H., PARKER, J.S. 1981. The population cytogenetics of *Crepis capillaris* I. Chiasma variation. *Heredity* 47: 95-103.
- ZURITA, F.; SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M.; JIMÉNEZ, R.; DE LA GUARDIA, R.D. 1997. Interchromosomal, intercellular and interindividual variability of NORs with silver staining and *in situ* hybridization. *Heredity* 78: 229-234.

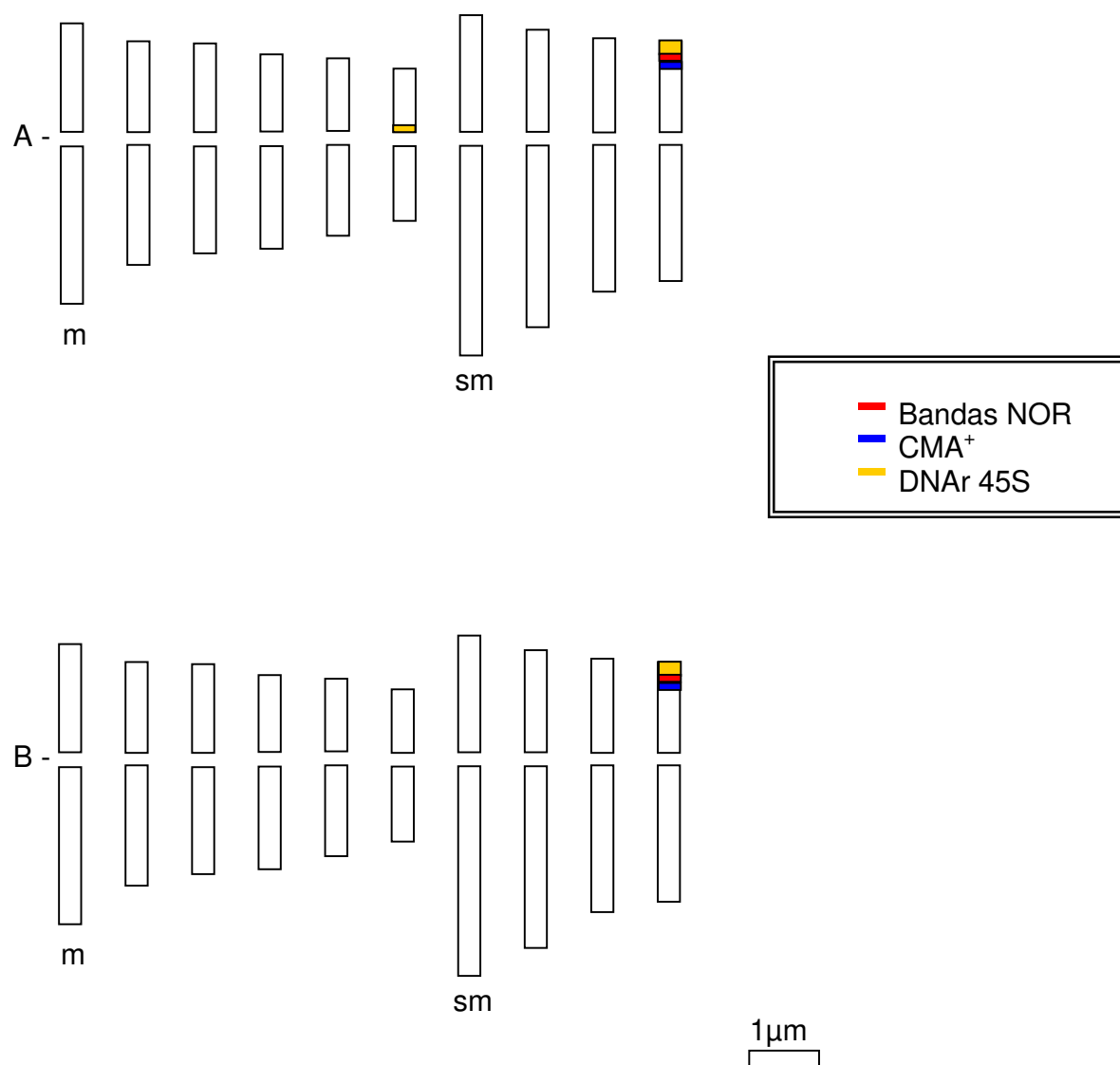


Figura 1 - Ideogramas de *V. geminata* indicando número e posição de bandas CMA⁺, NOR e número de sítios observados na hibridação *in situ* (FISH) para DNAr 45S. A – população 1 e B – população 2. m=metacêntrico, sm=submetacêntrico.

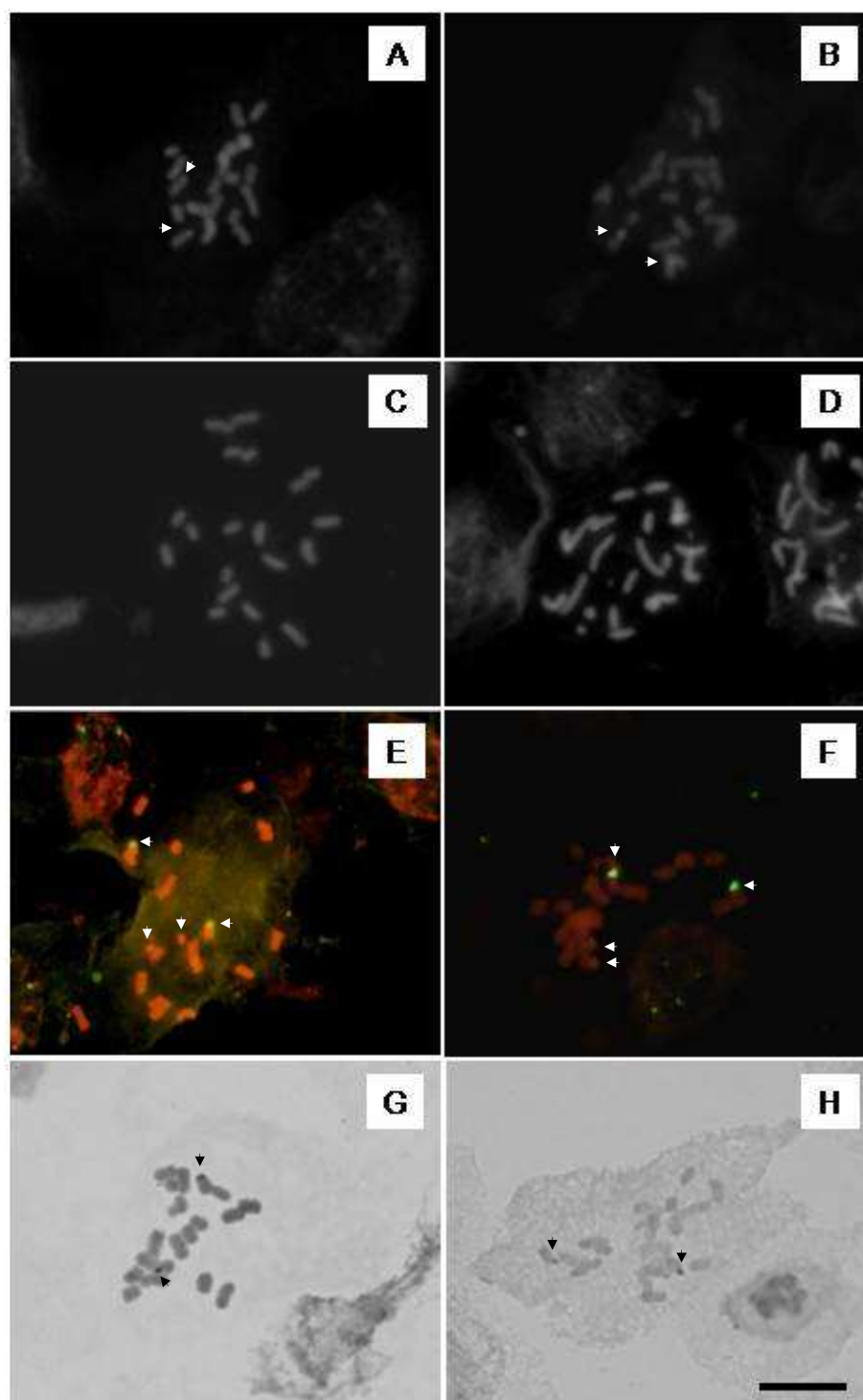


Figura 2 – Metáfases de *Vernonia geminata* pop. 1 (A, C, E e G) e pop. 2 (B, D, F, H). A a D – Coloração sequencial CMA/DA/DAPI (A e B – CMA₃ e C e D – DAPI), E e F- FISH e G e H - Bandamento AgNOR. Barra= 10µm.

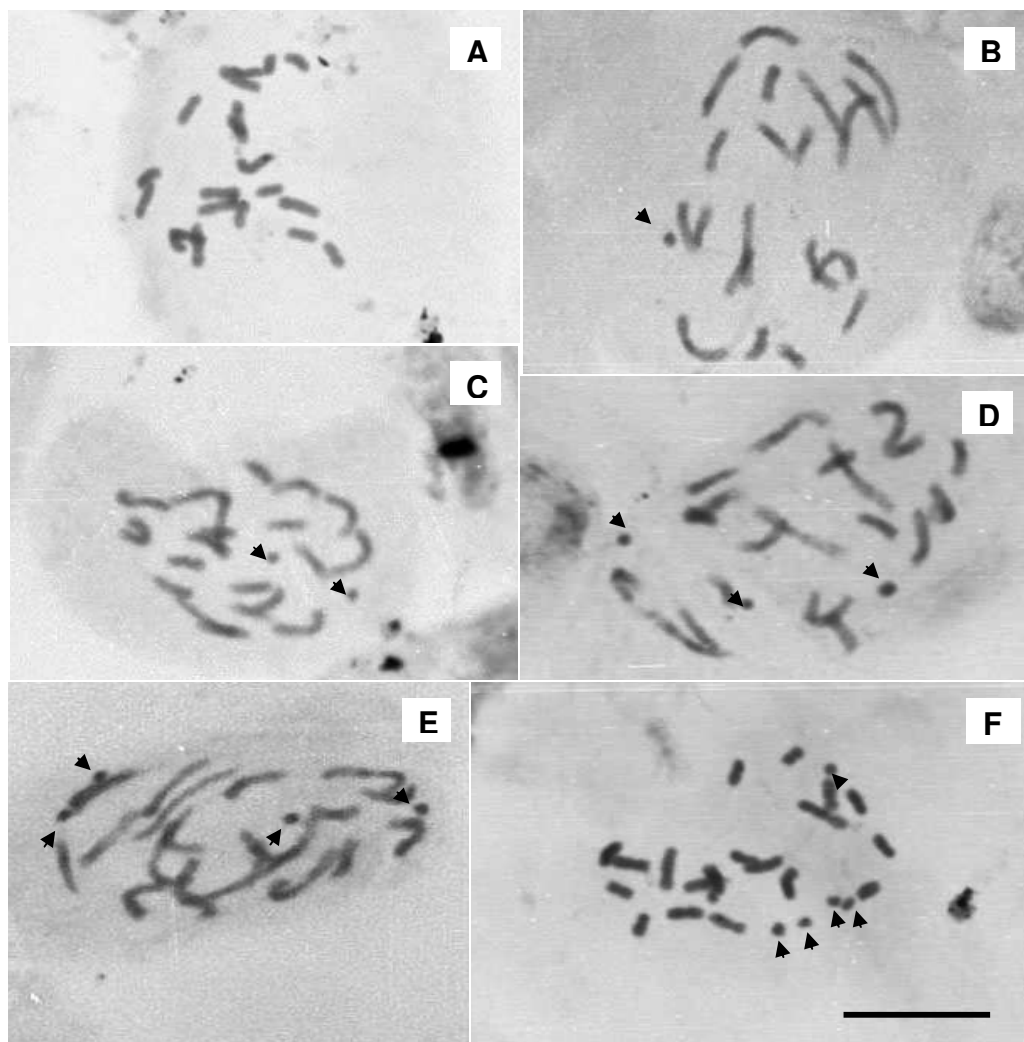


Figura 3 – Cromossomos mitóticos de *Vernonia geminata* pop.2 ($2n=20+0-6B$). A – Célula sem cromossomos Bs. B – Célula com 1 cromossomo B; C – Célula com 2 cromossomos B; D – Célula com 3 cromossomos B; E - Célula com 4 cromossomos B; F - Célula com 5 cromossomos B. Barra = 10 μ m.

CAPÍTULO 4

SÍTIOS DE DNAR 45S EM ESPÉCIES DE *Vernonia* (ASTERACEAE, VERNONIEAE)

Autores: OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J.

RESUMO

Vernonia é um dos gêneros mais complexo e numeroso da família Asteraceae e apresenta também diversidade de números cromossômicos. A comparação de cariótipos, obtidos por técnicas de coloração convencional, auxilia pouco na diferenciação de espécies de *Vernonia* com números cromossomos coincidentes, devido à pequena variação do tamanho cromossômico e de posição centromérica. Técnicas de diferenciação linear dos cromossomos (bandamentos diversos e hibridação *in situ*), além de fornecer uma base para o estudo da organização do genoma, podem subsidiar a taxonomia. Esses estudos são escassos em *Vernonia*. Buscando ampliar o conhecimento cariotípico e contribuir para o melhor entendimento taxonômico do gênero, foi aplicada, em sete espécies, a técnica de hibridação de DNA *in situ* para a sequência de 45S de DNAr. *Vernonia beyrichii*, *V. condensata*, *V. fruticulosa*, *V. polyanthes* e *V. rubriramea* foram coletadas em área de cerrado, enquanto que *V. adamantium* e *V. shwenkiaefolia* foram coletadas em áreas de campo rupestre, nos estados de Minas Gerais e São Paulo. O número cromossômico variou de $2n = 32$ a 40. Todas as espécies apresentaram 2 sítios de DNAr 45S, exceto *V. condensata*, que apresentou 4 sítios. Os sítios de DNA 45S ocorreram próximos à região terminal do braço curto do cromossomo. Também se observou variação na intensidade dos sinais de DNAr. Não foi possível indicar em quais cromossomos localizam-se os sítios.

INTRODUÇÃO

A tribo Vernonieae Cass. apresenta distribuição pantropical, com 89 gêneros e 1700 espécies na América, Ásia e África (DEMATTEIS 2007). É distinta das outras tribos da família Asteraceae por apresentar capítulo homógamo de flores hermafroditas, corolas tubulosas e ramos dos estiletes longos e agudos (BREMER 1994). Segundo BREMER (1994) essa tribo precisa ser reclassificada, pois há dúvidas e posições conflitantes quanto ao número de gêneros e de suas respectivas espécies.

Em uma recente reclassificação, ROBINSON (1987a, 1987b, 1987 c, 1988a, 1988b, 1988c, 1990a, 1990b, 1999a, 1999b) reorganizou os tradicionais gêneros que compunham essa tribo, sendo sua proposição nem sempre aceita, principalmente para *Vernonia*, o qual foi desmembrado em 22 outros gêneros. Segundo KEELEY & TURNER (1990) e ROBINSON (1999a), certamente as posições taxonômicas de algumas espécies de Vernonieae ainda são duvidosas e, para resolver esse problema taxonômico, são necessárias informações de áreas importantes, como a citogenética, a química em conjunto com as variações morfológicas.

Vernonia Schreb. é o gênero mais extenso da tribo Vernonieae, com cerca de 1.000 espécies (JONES 1977). Na América do Sul a maioria das espécies ocorre no sudeste do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Bolívia (DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 2000). É um dos gêneros mais complexos da família Asteraceae do ponto de vista sistemático, (DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998) devido à extrema diversidade de formas biológicas que exhibe (STUTTS 1988), desde pequenas ervas a grandes árvores.

A análise de cariótipos é fundamental para a caracterização citogenética de uma espécie e para examinar a variação entre seus indivíduos e/ou populações (GUERRA 1988). Apesar da variação de números cromossômicos observada no gênero, a comparação de

cariótipos, obtidos por técnicas de coloração convencional, auxilia pouco na diferenciação das espécies com mesmo número, devido à pequena variação do tamanho cromossômico e da posição centromérica (DEMATTEIS 1996, 1998; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b). A assimetria cariotípica é pouco variável entre as espécies, sugerindo que a diversificação deste gênero foi acompanhada por mudanças no número cromossômico e por pequenas alterações na constituição cariotípica das espécies com mesmo número cromossômico (DEMATTEIS 1996, 1998; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b).

Técnicas de diferenciação linear dos cromossomos (bandamentos diversos e hibridação *in situ*), além de fornecer uma base para o estudo da organização do genoma, têm subsidiado a análise taxonômica de diversos grupos de plantas, como em Rutaceae (GUERRA *et al.* 2000), Asteraceae (FREGONEZI *et al.* 2004, GARNATJE *et al.* 2004, MANSANARES 2004) e Leguminosae (MONDIN *et al.* 2007). Essas técnicas possibilitam a observação detalhada das transformações que ocorrem em grupos de espécies próximas taxonomicamente, que apresentam cariótipos muito semelhantes (CERBAH *et al.* 1995, 1998).

Estudos envolvendo a utilização da técnica de hibridação de DNA *in situ* são escassos em espécies da família Asteraceae e a única espécie do gênero *Vernonia* estudada até o momento por esta técnica foi *V. geminata* H.B.K., que apresentou $2n = 20$ cromossomos com 4 sítios de DNAr 45S (OLIVEIRA *et al.*, Capítulo 3). Em *Lychnophora*, outro gênero da tribo Vernonieae, MANSANARES (2004) encontrou número variado de sítios (2 a 10) distribuídos entre algumas espécies, ressaltando a importância dos mesmos na caracterização de algumas espécies com problemas de delimitação taxonômica.

A localização de sítios de DNAr 45S foi apresentada para espécies de outras tribos de Asteraceae, como Mutisieae e Lactuceae. Em *Chaptalia nutans* (L.) Pol. (tribo Mutisieae), FREGONEZI *et al.* (2004) caracterizaram citótipos não diferenciados morfológicamente, com $2n = 50$ e 100 , encontrando, respectivamente, quatro e oito sítios de DNAr 45S. Em *Hypochaeris* L. (tribo Lactuceae), vários estudos com a aplicação desta técnica foram realizados (CERBAH *et al.* 1998; WEISS-SCHEEWEISS *et al.* 2003; RUAS *et al.* 2005), o que possibilitou traçar uma evolução cariotípica neste gênero.

Buscando ampliar o conhecimento cariotípico e contribuir para o melhor entendimento de *Vernonia*, foi aplicada, a técnica de hibridação de DNA *in situ* para a sequência de 45S de DNAr em sete espécies do gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas sete espécies de *Vernonia*. As espécies foram encontradas em áreas de cerrado e campo rupestre, nos estados de São Paulo e Minas Gerais (Tabela I). Foram coletados e herborizados ramos florais e vegetativos, seguindo as técnicas usuais. Materiais testemunhos de todas as espécies foram depositados no Herbário UEC (Departamento de Botânica, IB, Universidade Estadual de Campinas). A identificação das espécies foi feita pelo Dr. João Semir, docente da Universidade Estadual de Campinas e especialista na taxonomia da família Asteraceae. As espécies foram classificadas de acordo com BENTHAM (1873) e BAKER (1873).

Raízes recém-germinadas foram coletadas e submetidas a pré-tratamento com 8 – hidroxiquinoleína (8Hq), solução 0,002M, por 5 horas, a 14-15°C. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético) por 24 horas, transferidas para álcool 70% e estocadas em freezer.

Para a preparação de lâminas com digestão enzimática, as raízes foram lavadas em Tampão citrato-fosfato pH=4,8 e enxutas em papel filtro. As pontas da raiz foram digeridas em solução enzimática com 4% de celulase e 40% de pectinase, em câmara úmida, a 37°C por 2 horas. Foi feito o esmagamento das pontas de raízes entre lâmina e lamínula em uma gota de ácido acético 45%, retirando-se posteriormente a lamínula em nitrogênio líquido.

A hibridação *in situ* foi realizada de acordo com CUADRADO & JOUVE (1994), com modificações de FREGONEZI *et al.* (2004). Foi utilizado o fragmento de DNAr 45S de cerca de 12kb contendo a sequência 28S-5,8S-18S com os seus espaçadores. Este fragmento foi clonado no plasmídio pUC18 em *E. coli*, resistente a ampicilina. O plasmídio foi separado pela técnica da miniprep e a concentração foi medida em um fluorômetro. A marcação da

sonda foi feita por nick translation (Bionick Gibco) com biotina-14dATP. Antes de iniciar a hibridação, as lâminas foram tratadas com RNase 1% (1 RNase Tipo I: 99 2xSSC) pH 7,0, à 37°C por 1 hora. As lâminas foram lavadas em 2xSSC por 10 minutos sob agitação, mergulhadas em paraformaldeído 4% por mais 10 minutos, e depois lavadas novamente com 2xSSC. As lâminas foram imersas em álcool 70% por 5 min e em álcool 100% por mais 5 min. Após as lâminas secarem, a preparação foi coberta pela mistura de hibridização. A mistura de hibridização foi composta por formamida 100%, PEG (polietilenoglicol) 50%, 20xSSC, sonda (DNAr 45S; 100-200ng μl^{-1}), DNA de bloqueio (esperma de salmão), SDS 10% e água. Depois de acrescentada a mistura de hibridização nas lâminas, estas foram colocadas em um termociclador, sendo submetidas a três ciclos de 10min cada, às temperaturas de 90°C, 50°C e 38°C. As lâminas foram então mantidas na estufa a 37°C, em câmara úmida e no escuro, por toda a noite. Foram feitos os banhos pós-hibridação, primeiramente com 2xSSC a 42°C por 5 min, formamida 20% (20ml de formamida para 80ml de 0,1xSSC) a 42°C por 10 min, 0,1xSSC a 42°C por 5 min e outro novamente em 2xSSC a 42°C por 5 min, 4xSSC/Tween 20 0,2% a 42°C e outro com 4xSSC/Tween 20 0,2% à temperatura ambiente. Todos os banhos foram feitos sob agitação. As lâminas foram tratadas com 50 μl de BSA 5% por 5 min. Foram adicionados 50 μl da solução de detecção, contendo 1:100 de avidina-FITC, e os cromossomos foram contracorados com iodeto de propídio.

A análise das lâminas foi feita em microscópio de epifluorescência Olympus BX51, com filtros adequados. Foram observadas, no mínimo, 10 células em condições adequadas de espalhamento e contração cromossômica para cada coloração. As células foram documentadas com um sistema de captura de imagens digital, utilizando o programa Image-pro Plus.

RESULTADOS

Três números cromossômicos diferentes foram obtidos para as espécies analisadas: $2n = 32, 34$ e 40 (Tabela II, Figuras 1 a 8).

A hibridação *in situ* evidenciou sítios de DNAr 45S sempre próximos à região terminal do braço curto do cromossomo. Todas as espécies apresentaram 2 sítios de hibridação, exceto *V. condensata*, que apresentou 4 sítios (Tabela II, Figuras 1 a 8). Nessa espécie, os dois pares de sítios de DNAr 45S apresentaram tamanhos diferentes (Figura 3).

Não foi possível indicar em quais cromossomos localizam-se os sítios.

DISCUSSÃO

Os números cromossômicos obtidos para as espécies estudadas ($2n=32$, 34 e 40; Tabela II; Figuras 1 a 5) concordam com os relatados anteriormente (OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b; OLIVEIRA *et al.*, Capítulos 1 e 2). A contagem para *V. condensata* ($2n=32$) é inédita.

Apesar da diversidade de números cromossômicos entre espécies de *Vernonia* (OLIVEIRA *et al.*, Capítulo 1), estudos cariotípicos feitos até o momento indicam que, devido à predominância de cromossomos metacêntricos e alguns submetacêntricos, o grau de assimetria é semelhante e bastante baixo nas espécies de *Vernonia*, auxiliando pouco na diferenciação das mesmas (DEMATTEIS 1997, 1998; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b).

Informações cariotípicas obtidas por técnicas de diferenciação linear dos cromossomos (bandamentos diversos e hibridação *in situ*) são inexistentes em *Vernonia*.

Espécies com números coincidentes de cromossomos, como *V. condensata*, *V. rubriramea* e *V. fruticulosa* ($2n = 32$), podem ser parcialmente diferenciadas pelo número de sítios de DNAr 45S (4, 2 e 2, respectivamente), o que reforça o uso desses dados no estudo citotaxonômico de *Vernonia*. Entretanto, no caso particular dessas três espécies, elas são bem distintas do ponto de vista morfológico, de forma que a taxonomia clássica já seria suficiente para diferenciar esses táxons.

As outras espécies analisadas, com $2n=34$ e $2n=40$, apresentaram constância no número de sítios de DNAr 45S, de maneira que não seria possível diferenciá-las apenas por esse marcador cromossômico, mas pelo número cromossômico.

Todas as espécies analisadas apresentam os sinais de hibridação no braço curto dos cromossomos, reafirmando a sugestão de LIMA DE FARIA (1976), que esta é uma tendência

geral dentro das Asteraceae. As espécies apresentaram também padrão semelhante à espécie estudada anteriormente por OLIVEIRA *et al.* (Capítulo 3), *V. geminata*, apresentando sítios de DNAr 45S terminais relativamente grandes, excetuando-se o fato de *V. geminata* apresentar um par de sítios centroméricos, os quais são bem menores do que os terminais. No presente estudo, *V. condensata* também apresentou um par de sítios menores que o outro (Figura 3).

Segundo ZURITA *et al.* (1997) e FREGONEZI *et al.* (2004), a técnica de FISH é mais qualitativa do que quantitativa, evidenciando uma associação entre o número e tamanho dos sítios e das sequências de DNAr. Assim sinais maiores poderiam indicar sítios com maior número de sequências repetidas do que os sinais menores. As diferenças de tamanho dos sítios de DNAr 45S observadas no presente estudo podem estar relacionadas a pequenas alterações estruturais nos cromossomos.

Para o caso de *Vernonia*, os dados obtidos aqui ainda são insuficientes para inferir quais são os mecanismos envolvidos na evolução cariotípica, tendo em vista a pequena porcentagem (cerca de 10%, OLIVEIRA *et al.* 2007b) de espécies com cariótipos elaborados. Certamente a disploidia é fator importante na evolução cariotípica de *Vernonia*, tendo em vista a diversidade de número cromossômico de suas espécies ($2n = 18, 20, 32, 34, 36, 40, 56$).

Para a análise das possíveis alterações estruturais, como inversões e translocações, por exemplo, a ampliação do número de marcadores (bandas e sítios de DNA) poderá trazer as informações necessárias para o entendimento de sua importância na evolução cariotípica de *Vernonia*. Além disso, o papel das alterações estruturais na derivação de espécies poderia ser avaliado pelo estudo meiótico de híbridos interespecíficos entre espécies supostamente relacionadas, como no estudo de KYHOS (1965). Esse autor definiu a origem de duas espécies

de *Chaenactis* D.C. (Asteraceae), com $2n = 10$, a partir de uma com $2n = 12$, pela ocorrência de diferentes translocações e pela perda de distintos segmentos cromossômicos.

A exemplo do sugerido para *Vernonia*, a disploidia e as alterações estruturais nos cromossomos parecem ter tido papel proeminente na evolução de muitas outras espécies de Asteraceae. VANZELA *et al.* (2002) detectaram pequenas variações estruturais nos cromossomos de espécies de *Helianthus* L., indicando em alguns casos, ganho ou perda de regiões de DNAr, e relataram que estas alterações teriam um papel importante na especiação deste gênero.

Pequenas alterações estruturais, como translocações e inversões envolvendo perda e ganho de fragmentos cromossômicos, algumas vezes contendo a região de DNAr 45S, também são sugeridas para explicar a disploidia encontrada na evolução cariotípica de espécies de *Hypochaeris* (WEISS-SCHNEEWEISS *et al.* 2003). Segundo WEISS-SCHNEEWEISS *et al.* (2003), *H. maculata* L., considerada como ancestral, através de translocação seguida de perda cromossômica, teria originado formas transitórias, as quais por perda da região contendo DNAr teriam originado a espécie *H. rosengurtii* Cabrera, ou ainda, por inversão, *H. apergioides* Hook. & Arn.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos de Vanessa Mancuso de Oliveira e financiamento deste trabalho (#02/11805-5, #04/09982-1, #04/13165-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, J. G. 1873. Compositae I. Vernoniaeae: In Martius, C.F & Eichler, A.G. (eds.). 6(2). *Flora brasiliensis*. Lipsiae, Monachii. pp 180.
- BENTHAM, G. 1873. Compositae: In: G. Bentham & J.D. Hooker (eds.) *Genera Plantarum*. London, Lovell Reeve 2: 163-533.
- BREMER, K. 1994. Asteraceae – Cladistic & Classification. Portland, Oregon, Timber Press. pp752.
- CERBAH, M.; COULAUD, J.; GODELLE, B.; SILJAK-YAKOVLEV, S. 1995. Genome size, fluorochrome banding and karyotype evolution in some *Hypochaeris* (Asteraceae). *J. Hered.* 38: 689-695.
- CERBAH, M.; COULAUD, J.; SILJAK-YAKOVLEV, S. 1998. rDNA organization and evolutionary relationships in the *Hypochaeris* (Asteraceae). *J. Heredity* 89: 312-318.
- 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* 2:231-338.
- DEMATTEIS, M. 1996. Estudos cromosomicos en especies Argentinas de *Vernonia* (Asteraceae). *Bonplantia* 9(1-2): 103-110.
- DEMATTEIS, M. 1998. Chromosome studies of some *Vernonia* species. (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 381-385.
- DEMATTEIS, M. 2007. Taxonomic notes on the genus *Chrysolaena* (Vernoniaeae, Asteraceae), including a new species endemic to Paraguay. *Ann. Bot. Fennici* 44: 56-64.
- DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 1998. karyotypes of seven South American species of *Vernonia* (Asteraceae). *Cytologia* 63: 323-328.
- DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 2000. Chromosomes studies on nine South American species of *Vernonia* (Vernoniaeae, Asteraceae). *Caryologia* 53(1): 61.

- FREGONEZI, J. N., TOREZAN, J. M.D. & VANZELA, A. L.L. 2004. A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence *in situ* hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA₃ banding. *Genet. Mol. Biol.* 27(2): 223-227.
- GARNATJE, T.; VALLÉS, J.; VILATERSANA, R.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; SILJAC-YAKOVLEV, S. 2004. Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). *Pl. Biol.* 6:140-146.
- GUERRA, M. 1988. *Introdução à citogenética Geral*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara.
- GUERRA, M.; SANTOS, K.G.B; B, E.B; EHRENDORFER, F. 2000. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioidae – a case os parallel chromosome evolution. *American Journal of Botany*: 87(5): 735-747.
- JONES, S.B. 1977. Vernonieae – systematic review. In: Heywood VH, Harbone JB, Turner BL, eds. *The biology and chemistry of the CompositaeI*, Vol. I, pp. 503-521. London: American Press.
- KEELEY, S.C. & TURNER, B.L. 1990. A preliminary Cladistic analysis of the genus *Vernonia* (Vernonieae: Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 4: 45-66.
- KYHOS, D. 1965 The independent aneuploid origin of two species of *Chaenactis* (Compositae) from a common ancestor. *Evolution* 19: 26-43
- LIMA DE FARIA, A. 1976. The chromosome field: I. Prediction of the localization of ribosomal cistrons. *Hereditas* 83: 1-22.
- MANSANARES, M. E. 2004. Estudo citotaxonômico de espécies do gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophorinae). Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas.
- MONDIN M.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. 2007. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. *Genet. Mol. Biol.* 30(1): 65-72.
- OLIVEIRA, V.M. 2005. Estudos citotaxonômicos em espécies do gênero *Vernonia* Schreb. (Asteraceae: Vernonieae). Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007a. Cytotaxonomy of species of *Vernonia*, section *Lepidaploa*, group *Axilliflorae* (Asteraceae, Vernonieae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 154: 99-108.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007b. Cytotaxonomic studies in six species of *Vernonia* (Asteraceae: Vernonieae). *Caryologia* 60: 37-47.
- ROBINSON, H. 1987a. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), III: two new genera, *Cyrtucymura* and *Eirmocephala*. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 100: 844-855.
- ROBINSON, H. 1987b. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), the genus *Stenocephalum* Sch. Bip. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 100: 578-583.

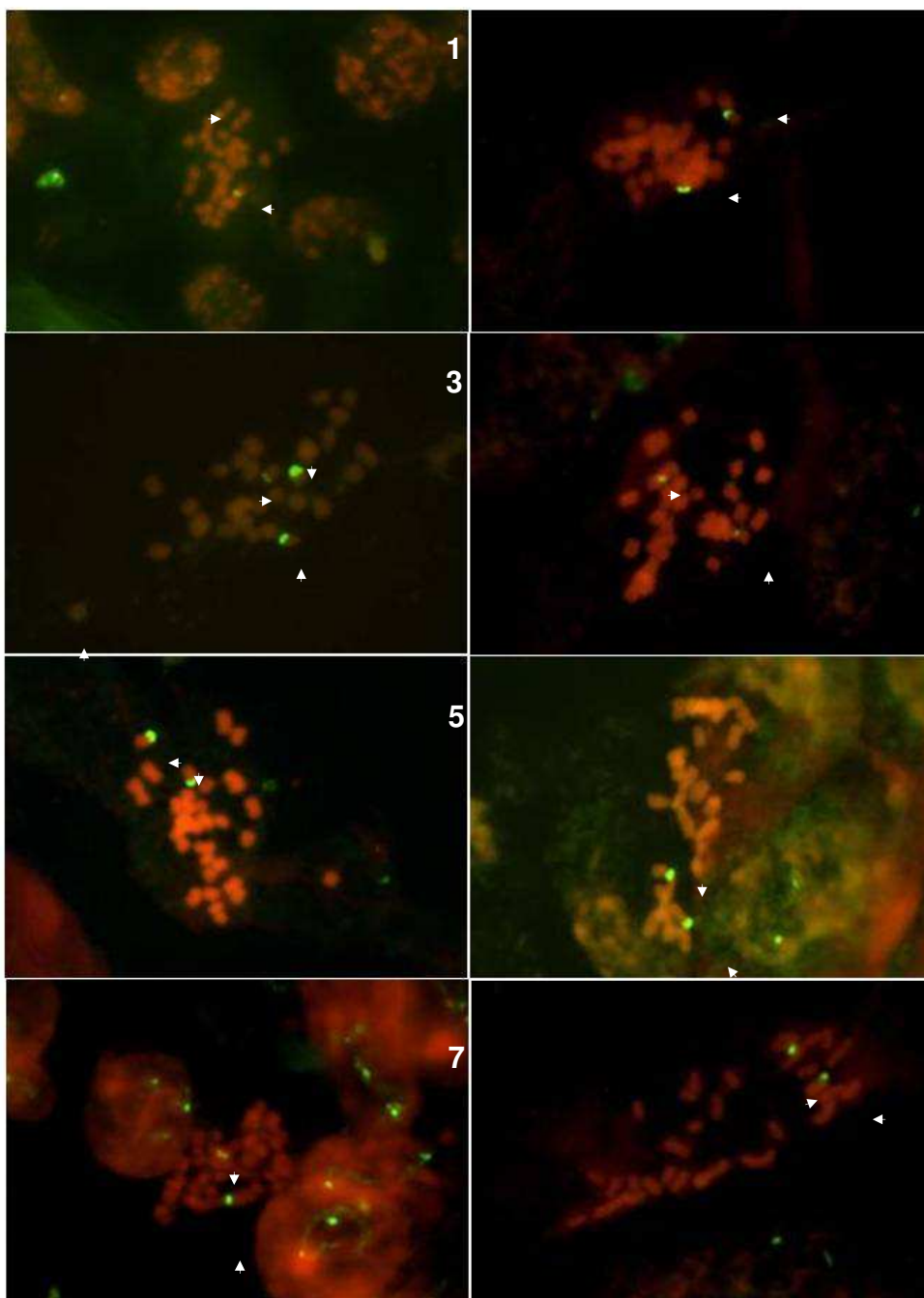
- ROBINSON, H. 1987c. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), a new genus *Echinocoryne*. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 100: 584-589.
- ROBINSON, H. 1988a. A new combination of *Vernonia libertadensis*. S.B. Jones, with notes and descriptions of additional Andean species of *Baccharis*. *Phytologia*, 65: 34-46.
- ROBINSON, H. 1988b. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) IV. The new genus *Lessinglanthus*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100 (4): 929-951.
- ROBINSON, H. 1988c. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) V. The new genus *Chrysolaena*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100 (4): 952-958.
- ROBINSON, H. 1990a. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), VII: the genus *Lepidaploa*. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 103: 248-253.
- ROBINSON, H. 1990b. Six combinations in *Baccharoides* Moench and *Cyanthillium* Blume. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 103: 248-253.
- ROBINSON, H. 1999a. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. *Smithsonian Contributions to Botany*, 89: 1-116.
- ROBINSON, H. 1999b. Two new subtribes, Stokessinae and Pacourinae, of the Vernonieae (Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 112(1): 216-219.
- RUAS, C.F.; VANZELA, A.L.L.; SANTOS, M.O.; FREGONEZI, J.N.; RUAS, P.L.; MATZENBACHER, N.I.; AGUIAR-PERECÍN, M.L.R. 2005 Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genet Mol Biol* 28:129-139.
- STUTTS, J.G. 1988. Taxonomic revision of *Vernonieae* Subsect. *Chamaedrys* (Compositae: Vernonieae). *Rhodora* 90: 37-99.
- VANZELA, A.L.L.; RUAS, C.F.; OLIVEIRA, M.F., RUAS, P.M. 2002. Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S probe. *Genetica* 114: 105-111.
- WEISS-SCHNEEWEISS, H., T. STUESSY, S. SILJAK-YAKOVLEV, C. BAEZA & J. PARKER. 2003. Systematic and evolutionary implications of karyotypes of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae) from South America. *Plant Systematics and Evolution* 241: 171-184.
- ZURITA, F; SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M.; JIMÉNEZ, R.; DE LA GUARDIA, R.D. 1997. Interchromosomal, intercellular and interindividual variability of NORs with silver staining and in situ hybridization. *Heredity* 78: 229-234.

Tabela I – Espécies de *Vernonia* analisadas com as respectivas localidades, local de coleta e material-testemunho. C – Cerrado. CR – campo rupestre.

ESPÉCIE	LOCAL DE COLETA	HABITAT	Nº DO COLETOR
<i>V. adamantium</i> Gardn.	MG, Diamantina	CR	ME Mansanares 389
<i>V. beyrichii</i> Less.	MG, Itambé do Mato Dentro	C	IR Costa 536
<i>V. condensata</i> Baker	SP, Analândia	C	VM Oliveira 117
<i>V. fruticulosa</i> Mart. ex DC.	MG, Joaquim Felício	C	IR Costa 536
<i>V. polyanthes</i> Less. pop.1	SP, Mogi Guaçu	C	VM Oliveira 11
<i>V. polyanthes</i> Less. pop. 2	SP, Analândia	C	VM Oliveira 79
<i>V. rubriramea</i> Mart.	MG, Itambé do Mato Dentro	C	IR Costa 139
<i>V. shwenkiaefolia</i> Mart. in DC.	MG, Diamantina	CR	ME Mansanares 387

Tabela II – Número cromossômico (2n) e números de sítios de DNAr 45S de espécies de *Vernonia*.

ESPÉCIE	2n	Nº DE SÍTIOS
<i>V. adamantium</i> Gardn.	40	2
<i>V. beyrichii</i> Less.	34	2
<i>V. condensata</i> Baker	32	4
<i>V. fruticulosa</i> Mart. ex DC.	32	2
<i>V. polyanthes</i> Less. pop. 1	34	2
<i>V. polyanthes</i> Less. pop. 2	34	2
<i>V. rubriramea</i> Mart.	32	2
<i>V. shwenkiaefolia</i> Mart. in DC.	34	2



Figuras 1 a 8: Sítios de DNAr 45S em espécies de *Vernonia*. 1 – *V. adamantium* ($2n = 40$, 2 sítios), 2 – *V. beyrichii* ($2n = 34$, 2 sítios), 3 – *V. condensata* ($2n = 32$, 4 sítios), 4 – *V. fruticulosa* ($2n = 32$, 2 sítios), 5 – *V. polyanthes* pop. 1 ($2n = 34$, 2 sítios), 6 – *V. polyanthes* pop. 2 ($2n = 34$, 2 sítios), 7 – *V. shwenkiaefolia* ($2n = 34$, 2 sítios), 8 – *V. rubriramea* ($2n = 32$, 2 sítios). A seta indica os sítios de DNAr 45S.

CAPÍTULO 5

BANDAMENTO CMA/DA/DAPI EM ESPÉCIES DE *Vernonia* (ASTERACEAE, VERNONIEAE)

Autores: OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J.

RESUMO

A tribo Vernonieae apresenta alguns problemas em sua taxonomia, os quais resultam em discordância sobre o número de gêneros e suas respectivas espécies. Dentre seus gêneros, *Vernonia* é um dos mais complexos, exibindo extrema diversidade de formas biológicas. Apesar da diversidade de números cromossômicos, o grau de assimetria é semelhante e muito baixo entre as espécies de *Vernonia*, auxiliando pouco na diferenciação das mesmas. Estudos envolvendo técnicas de diferenciação linear dos cromossomos (bandamentos diversos e hibridação *in situ*) podem subsidiar a taxonomia. Esses estudos são escassos em *Vernonia*. Com o objetivo de ampliar o conhecimento cariotípico e contribuir para o melhor entendimento taxonômico do gênero, foi aplicada a técnica de tripla coloração CMA/DA/DAPI em nove espécies de *Vernonia*: *V. adamantium*, *V. beyrichi*, *V. condensata*, *V. fruticulosa*, *V. platensis*, *V. polyanthes*, *V. rubriramea*, *V. scorpioides* e *V. simplex*. As espécies foram coletadas no estado de São Paulo e Minas Gerais. O bandamento CMA/DA/DAPI possibilitou a visualização de 2 bandas CMA⁺, sempre próximas à região terminal do braço curto de um par de cromossomos em todas as espécies analisadas, com exceção de *V. platensis* e *V. scorpioides*, que apresentaram 6 bandas. Todas as espécies não apresentaram bandas DAPI. Não foi possível indicar em quais cromossomos localizam-se as bandas.

INTRODUÇÃO

A tribo Vernonieae pertence à família Asteraceae e possui uma distribuição pantropical, com uma grande parte das suas 1.300 espécies encontradas no Brasil e na África (CABRERA 1944; BARROSO 1986). Pode ser caracterizada em geral por suas folhas alternas e capítulos discóides, normalmente homógamos. Entretanto, as características mais distintivas são o estilete fino e ramos de ápice agudo, com indumento abaixo da bifurcação o qual se prolonga até os ramos (BREMER 1994).

A tribo Vernonieae apresenta alguns problemas em sua taxonomia, os quais resultam em discordância sobre o número de gêneros e suas respectivas espécies (BREMER 1994). É considerada a mais complexa da família Asteraceae por apresentar extrema diversidade de formas biológicas, desde pequenas ervas até grandes árvores (DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998).

Recentemente, os tradicionais gêneros que compunham a tribo até então foram reorganizados por ROBINSON (1999) sendo a sua proposição nem sempre aceita, principalmente para o gênero *Vernonia*, o qual foi desmembrado em 22 outros (BREMER 1994). Segundo KEELEY & TURNER (1990) e ROBINSON (1999), certamente as posições taxonômicas de algumas espécies de Vernonieae ainda são duvidosas e, para resolver esse problema taxonômico são necessárias informações de áreas importantes, como a citogenética, a química e do aprofundamento da análise de variabilidade morfológica.

O gênero *Vernonia* Schreb. compreende espécies de hábito variado (BREMER 1994), distribuídas nas regiões tropicais da Ásia, África e América (JONES 1977). Possui mais de 1.000 espécies, formando o núcleo central da tribo Vernonieae (BREMER 1994). Muitos autores já tentaram esclarecer a taxonomia do gênero (CABRERA 1944; JONES 1970, 1974,

1979, 1981, 1982; STUTTS 1981; ROBINSON 1987a, 1987b, 1987c, 1988a, 1988b, 1988c, 1990a, 1990b, 1992a, 1992b, 1993a, 1993b, 1994, 1999), porém os resultados são controversos.

Citologicamente, o gênero *Vernonia* não tem sido muito estudado. Cerca de 20% de suas espécies tiveram seu número cromossômico investigado. Os números cromossômicos variam de $2n = 18$ a 160 (DARLINGTON & WYLIE 1955; BOLKHOVISKIKH *et al.* 1969; MOORE 1973, 1974, 1977; GOLDBLATT 1981, 1984, 1985, 1988; GOLDBLATT & JOHNSON 1990, 1991, 1996, 1998).

O cariótipo também é fundamental quando se quer comparar citogeneticamente espécies diferentes, ou examinar a variação entre indivíduos de uma mesma espécie. Muitas vezes a simetria de um cariótipo pode indicar como estes cromossomos se diversificaram dentro de um grupo (GUERRA 1988). Neste contexto, algumas espécies de *Vernonia* foram estudadas por RUAS *et al.* (1991), DEMATTEIS (1996, 1997, 1998a, 1998b, 2002, 2007), DEMATTEIS & FERNÁNDEZ (1998, 2000) e OLIVEIRA *et al.* (2007a, 2007b), mostrando que apesar de pequenos, os cromossomos apresentam diferenças de tamanho e morfologia. O índice de assimetria é pouco variável entre as espécies de *Vernonia*, sugerindo que a diversificação deste gênero foi acompanhada por pequenas alterações na constituição cariotípica das espécies (DEMATTEIS 1996, 1998a; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b).

Até o momento, outras informações cariotípicas como padrão de bandas e hibridação de DNA *in situ* são escassas para as espécies de *Vernonia*. Os únicos resultados foram obtidos no presente estudo (OLIVEIRA *et al.*, Capítulos 3 e 4). OLIVEIRA *et al.* (Capítulo 4) aplicaram a técnica de FISH com a seqüência de DNAr 45S em sete espécies deste gênero e observaram

que todas apresentavam dois sítios de DNAr, com exceção de *V. condensata*, que apresentou quatro sítios. Observaram também que os sítios de DNAr 45S ocorriam sempre próximos à região terminal do braço curto do cromossomo. OLIVEIRA *et al.* (Capítulo 3) caracterizaram duas populações de *V. geminata*, com diferentes técnicas de bandamento e FISH com DNAr 45S. A hibridação *in situ* evidenciou na população 1, dois pares de sítios de DNAr 45S, sendo dois terminais, ocorrendo no braço curto, na região terminal, e dois centroméricos, ocorrendo no braço curto. Na população 2 também foram observados quatro sítios, dois também ocorrendo no braço curto, na região terminal, de um dos pares cromossômicos do cariótipo normal e dois sítios ocorrendo em cromossomos B. As duas populações também apresentaram um par de bandas CMA⁺ terminais e um par de bandas AgNOR, sendo que ambas ocorrem em braços curtos de cromossomos do cariótipo normal. Existem alguns trabalhos sobre o assunto envolvendo outras espécies da família Asteraceae. VANZELA *et al.* (2002) caracterizaram populações diplóides, tetraplóides e hexaplóides de *Helianthus* L. através da técnica de hibridação *in situ*. Também mediante a técnica de FISH, FREGONEZZI *et al.* (2004) caracterizaram citótipos não diferenciados morfológicamente, de *Chaptalia nutans* (L.) Poir., com $2n = 50$ e $2n = 100$, encontrando, respectivamente, quatro e oito sítios de DNAr 45S.

GARNATJE *et al.* (2004) estudaram sete espécies de *Xeranthemum* L. e gêneros relacionados, e observaram que as bandas CMA⁺ e os sítios de DNAr 45S, na maioria das vezes, possuem a mesma localização, sugerindo que sequências ribossômicas repetidas poderiam estar interespaçadas na heterocromatina.

Dentre as técnicas de bandamento, utiliza-se a coloração com fluorocromos para determinar a composição de bases da heterocromatina (SCHWEIZER 1976). O fluorocromo DAPI (4' - 6 diamino - 2 fenilindol) evidencia sequências de DNA repetitivas ricas em

adenina e timina (AT), enquanto o CMA₃ (cromomicina A₃) se liga a regiões ricas em citosina e guanina (CG). Para se obter maior contraste das regiões onde o CMA está ligado, pode ser usado o contra-corante DA (distamicina). A DA se liga nas regiões ricas em AT, e por competição desses segmentos, ocorre um maior contraste da fluorescência de regiões ricas em CG (SCHWEIZER & AMBROS 1994, MARCON *et al.* 2003, 2005). Em diversos grupos de vegetais, vários autores têm relatado que a heterocromatina constitutiva rica em AT pode ocorrer ao longo dos cromossomos (SCHWARZACHER & SCHWEIZER 1982; BESENDORFER *et al.* 2002), enquanto que a heterocromatina constitutiva rica em CG tem sido frequentemente detectada associada às regiões organizadoras do nucléolo (NORs) (MOSCONE *et al.* 1995; GUERRA *et al.* 2000). SINCLAIR & BROWN (1971) consideraram que as características de constituição de bases nesses tipos/nessas posições cromossômicas são regra em grupos de vegetais. No entanto, também existem relatos de heterocromatina constitutiva rica ou moderadamente rica em AT associada a NOR (GUERRA *et al.* 2000, BESENDORFER *et al.* 2002).

Buscando ampliar o conhecimento cariotípico e contribuir para o melhor entendimento do gênero, foi aplicada a técnica de tripla coloração com fluorocromos CMA/DA/DAPI (CDD) em nove espécies de *Vernonia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas nove espécies de *Vernonia* coletadas em áreas de cerrado e de campo rupestre, e em ambiente perturbado, nos estados de São Paulo e de Minas Gerais (Tabela 1). Foram coletados e herborizados ramos florais e vegetativos, seguindo as técnicas usuais. Materiais testemunhos de todas as espécies foram depositados no Herbário UEC (Departamento de Botânica, IB, Universidade Estadual de Campinas) (Tabela 1). A identificação das espécies foi feita pelo Dr. João Semir, docente da Universidade Estadual de Campinas e especialista na taxonomia da família Asteraceae. As espécies foram classificadas de acordo com BENTHAM (1873) e BAKER (1873).

Raízes recém-germinadas foram coletadas e submetidas a pré-tratamento com solução de 8 – hidroxiquinoleína (8Hq) - 0,002M, por 5 horas, a 14 - 15°C. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético) por 24 horas, transferidas para álcool 70% e estocadas em freezer.

Para a preparação de lâminas com digestão enzimática, as raízes foram lavadas em Tampão citrato-fosfato pH = 4,8 e enxutas em papel filtro. As pontas da raiz foram digeridas em solução enzimática com 4% de celulase e 40% de pectinase, em câmara úmida, a 37°C por 2 horas. Foi feito o esmagamento das pontas de raízes entre lâmina e lamínula em uma gota de ácido acético 45%, retirando-se posteriormente a lamínula em nitrogênio líquido. As lâminas foram armazenadas à temperatura ambiente por pelo menos um dia.

O bandamento CMA/DA/DAPI seguiu o protocolo de MOSCONE *et al.* (1996). As lâminas foram coradas primeiramente com CMA (cromomicina A3) 0,5mg/ml por 60 minutos; em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas lavadas com água destilada. Logo após, as lâminas foram coradas com DA (distamicina A) 10mg/ml por 15 minutos e lavadas

novamente com água destilada. Finalmente, foram coradas com DAPI (4'-6 diamidino -2 fenilindol) 2mg/ml por 30 minutos. As lâminas foram lavadas novamente com água destilada e montadas com um meio de montagem contendo glicerol para fluorescência e tampão Mallvaine (1:1). Estas lâminas foram mantidas no escuro, à 37°C, por 3 dias, antes de serem observadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX 51, com filtros apropriados.

A documentação das células foi feita mediante um sistema de captura de imagens digital, utilizando o programa Image-pro Plus.

RESULTADOS

As nove espécies analisadas apresentaram de $2n = 32$ a 60 cromossomos (Tabela 2).

O bandamento CMA/DA/DAPI possibilitou a visualização de 2 bandas CMA⁺, sempre próximas à região terminal do braço curto de um par de cromossomos em todas as espécies analisadas, com exceção de *V. scorpioides* e *V. platensis* que apresentaram 6 bandas (Tabela 2, Figuras 1 a 6). Nenhuma espécie apresentou bandas DAPI (DAPI neutro) (Figuras 1 a 6).

Não foi possível indicar em quais cromossomos localizam-se as bandas CMA⁺.

DISCUSSÃO

Os estudos citogenéticos referentes ao gênero *Vernonia* mostram que os cromossomos são pequenos e apresentam pequenas diferenças de tamanho e morfologia (RUAS *et al.* 1991; DEMATTEIS 1996, 1998a; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b). A diferenciação cariotípica é pequena entre as espécies, auxiliando pouco na diferenciação das mesmas. Isso sugere que a diversificação dentro de *Vernonia* foi acompanhada por pequenas alterações na constituição cariotípica das espécies além de variação do número cromossômico (RUAS *et al.* 1991; DEMATTEIS 1996, 1998a; DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998, 2000; OLIVEIRA *et al.* 2007a, 2007b). Os números cromossômicos variam de $2n = 18$ a 160 (DARLINGTON & WYLIE 1955; FEDOROV 1969; MOORE 1973, 1974, 1977; GOLDBLATT 1981, 1984, 1985, 1988; GOLDBLATT & JOHNSON 1990, 1991, 1996, 1998, 2006, 2008), no entanto os números $2n = 32$ e 34 são mais freqüentes. Os números cromossômicos obtidos para as espécies estudadas ($2n = 32$ a 60, Figuras 1 a 3) concordam com os obtidos anteriormente por OLIVEIRA *et al.* (2007a, 2007b) e OLIVEIRA *et al.* (Capítulos 1 e 2). Para *V. polyanthes*, além de $2n = 34$ relatado aqui e por RUAS *et al.* (1991) e OLIVEIRA *et al.* (2007b), COLEMAN (1968) relatou $n=18$ e OLIVEIRA *et al.* (2007b) $2n = 32$.

Técnicas que possibilitam uma comparação mais detalhada em grupos de espécies próximas taxonomicamente e que apresentam cariótipos muito semelhantes, como as de bandamentos e de hibridação de DNA *in situ* (CERBAH *et al.* 1995, 1998) são escassas em *Vernonia*. Os únicos resultados para espécies de *Vernonia* foram obtidos no presente estudo (OLIVEIRA *et al.* Capítulos 3 e 4).

A observação de 2 a 6 bandas de CMA⁺ (Tabela II, Figuras 1 a 3), revelando a presença de heterocromatina rica em CG, mostra uma quantidade de bandas maior que a

relatada para *V. geminata* (OLIVEIRA *et al.* Capítulos 3). Essa espécie apresentou duas bandas CMA⁺ localizadas na região terminal do braço curto do quarto par de cromossomos submetacêntricos.

A heterocromatina talvez represente um dos fatores mais importantes na evolução (EDELMAN & LIN 1995). Variações da quantidade de heterocromatina são utilizadas em estudos de filogenia e na solução de problemas genéticos (SCHWARZACHER *et al.* 1980). Alguns autores relataram que a existência de pouca heterocromatina no cariótipo indica uma condição plesiomórfica (primitiva) e muita heterocromatina indica uma condição apomórfica (derivada) para a espécie (GREILHUBER *et al.* 1981; GUERRA *et al.* 2000; REDI *et al.* 2001). Esta característica é considerada uma tendência geral para os grupos vegetais em níveis supra e infra-genéricos, comumente interpretada como um acúmulo de heterocromatina durante a evolução (GREILHUBER *et al.* 1981). GUERRA *et al.* (2000), ao estudar o padrão de bandas heterocromáticas, em Rutaceae, subfamília Aurantioideae, observaram que os gêneros mais basais dentro do grupo apresentaram menores quantidades de heterocromatina do que os gêneros mais derivados.

Ainda não é possível inferir que a maior quantidade de heterocromatina rica em CG, observada em *V. scorpioides* e *V. platensis* (6 bandas cada) indique uma condição apomórfica para essas espécies. Entretanto, no presente estudo, dentre as espécies estudadas no Capítulo 1 (Oliveira *et al.*, Capítulo 1), *V. platensis* pode ser considerada a espécie mais derivada por apresentar cariótipo mais assimétrico e possuir os menores cromossomos (0,92 a 2,2µm). Porém, *V. platensis* apresenta número cromossômico múltiplo de 10, e alguns autores (RUAS *et al.* 1991, DEMATTEIS 1996, 1997 e DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998) consideram que espécies de *Vernonia* que apresentam número cromossômico básico $x=10$ e 17 são mais

primitivas e as que apresentam $x=14$ e 15 são mais derivadas. No mesmo contexto, *V. scorpioides* também apresentou características consideradas derivadas. Além de possuir número cromossômico múltiplo de 14 ($2n=56$), também apresenta cromossomos muito pequenos ($0,73$ a $1,6 \mu\text{m}$) (OLIVEIRA *et al.*, Capítulo 1).

Para que essa hipótese venha a ser confirmada são necessários mais estudos complementares, principalmente envolvendo a técnica de bandamento C, em outras espécies do gênero *Vernonia*. O bandamento-C permite a observação da quantidade total de heterocromatina numa espécie e que se tenha um panorama das modificações que ocorreram durante a sua evolução. Segundo GUERRA (2000), é comum a ocorrência de blocos heterocromáticos (bandas C) que não apresentam reação para nenhum tipo de fluorocromo, seja ele específico para regiões ricas em AT ou CG, bem como ocorre em casos que as bandas C têm sido classificadas como neutras, ou seja, não podem ser classificadas quanto a natureza das sequências que as compõem, se ricas em AT ou CG.

A presença de heterocromatina constitutiva rica em CG tem sido comumente detectada em diversas espécies de vegetais (SCHWARZACHER & SCHWEIZER 1982; BESENDORFER *et al.* 2002), inclusive na família Asteraceae, nos gêneros *Artemisia* L. (TORRELL *et al.* 2003), *Helianthus* L. (VANZELA *et al.* 2002), *Hypochaeris* L. (CERBAH *et al.* 1995; WEEIS-SCHNEEWEISS *et al.* 2003; RUAS *et al.* 2005), *Crepis* L., *Galinsoga* Ruiz & Pav. e *Chaptalia* Vent. (FREGONEZI *et al.* 2004) e *Xeranthemum* L. (GARNATJE *et al.* 2004). A heterocromatina constitutiva rica em CG tem sido detectada principalmente associada às NORs (MOSCONE *et al.* 1995, 1996; GUERRA *et al.* 2000, TORREL *et al.* 2003). No entanto, outras regiões no genoma ricas em CG, não relacionadas às NOR, também são detectadas através de CMA (GUERRA *et al.* 2000; DE MELO *et al.* 2001). Segundo SCHWARZACHER & SCHWEIZER (1982),

em *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce 85% da heterocromatina não associada à NOR é rica em CG.

GARNATJE *et al.* (2004) estudaram sete espécies de *Xeranthemum* e gêneros relacionados, pertencentes à tribo Carduceae (Asteraceae), e observaram que as bandas CMA⁺ e os sítios de DNAr 45S, na maioria das vezes, possuem a mesma localização, sugerindo que sequências ribossômicas repetidas poderiam estar interespaçadas na heterocromatina. Em geral, em plantas há coincidência na localização das regiões organizadoras de nucléolo e das bandas CMA⁺ (BERGER 1993), como em *Vernonia geminata* (OLIVEIRA *et al.*, Capítulo 3). Essas bandas não fazem parte da sequência de DNAr 45S, mas são arrançadas contiguamente (APPELS *et al.* 1998). VANZELA *et al.* (2002) descreveram a localização de sequências repetitivas (45S e CMA₃) em dez espécies de *Helianthus* (tribo Heliantheae) com diferentes níveis de ploidia e sugeriram que rearranjos envolvendo pequenos segmentos heterocromáticos e de DNAr tiveram grande importância na evolução das espécies deste gênero.

Não foram observadas bandas DAPI nas espécies estudadas no presente estudo (Figuras 1 a 3). A ausência de bandas DAPI também é comumente relatada em outros grupos de plantas, como em Cyperaceae, na espécie *Rhynchospora ciliata* (G. Mey.) Kük. (VANZELA & GUERRA 2000), e em Leguminosae, no gênero *Vigna* Savi (GALASSO *et al.* 1995).

Os dados obtidos até o momento, utilizando técnicas para a diferenciação linear dos cromossomos, como o bandamento por fluorocromos, no presente estudo, ainda são restritos a um número reduzido de espécies de *Vernonia*. Entretanto, o estudo citogenético poderá ser subsídio importante para o estudo taxonômico e da evolução cariotípica de *Vernonia*, à medida

que novas espécies venham a ser estudadas por outras metodologias e que se confirme a diversidade nos diferentes tipos de caracteres cromossômicos analisados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos de Vanessa Mancuso de Oliveira e financiamento deste trabalho (#04/09982-1, #04/13165-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPELS, R., MORIS, R.; GILL, S.; MAY, C. 1998. *Chromosome Biology*. Boston: Kluwer. 401p.

BAKER, J. G. 1873. Compositae I. Vernoniaeae: In Martius, C.F & Eichler, A.G. (eds.). 6(2). *Flora brasiliensis*. Lipsiae, Monachii. pp 180.

BENTHAM, G. 1873. Compositae: In: G. Bentham & J.D. Hooker (eds.) *Genera Plantarum*. London, Lovell Reeve 2: 163-533.

BARROSO, G. M. 1986. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Vol. III. Viçosa, Imp. Universitária da Univ. Federal de Viçosa, pp. 326.

BERGER, R., GREILHUBER, J. 1993. C-bands and chiasma distribution in *Scilla amoena*, *S. ingridae*, and *S. mischtschenkoana* (Hyacinthaceae). - Pl. Syst. Evol. 184: 125-137.

BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M.E.; PAPES, D. 2002. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Aliaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 139: 99-108.

BREMER, K. 1994. Asteraceae – Cladistic & Classification. Portland, Oregon, Timber Press. pp752.

CABRERA, A.L. 1944. Vernoniaeae argentinas (Compositae). *Darwiniana* 6 (3): 265-379.

CERBAH, M.; COULAUD, J.; GODELLE, B.; SILJAK-YAKOVLEV, S. 1995. Genome size, fluorochrome banding and karyotype evolution in some *Hypochaeris* (Asteraceae). *J. Hered.* 38: 689-695.

CERBAH, M.; COULAUD, J.; SILJAK-YAKOVLEV, S. 1998. rDNA organization and evolutionary relationships in the *Hypochaeris* (Asteraceae). *J. Heredity* 89: 312-318.

COLEMAN, J. R. 1968. Chromosome numbers in Brazilian Compositae. *Rhodora* 70: 228 - 379.

DARLINGTON, C.; WYLIE, A.P. 1955. Chromosome Atlas of Flowering Plants. 2ª edição. George Allen & Unwin LTD, Ruskin House Museum Street, London.

- DEMATTEIS, M. 1996. Estudios cromosomicos en especies Argentinas de *Vernonia* (Asteraceae). *Bonplandia* 9(1-2): 103-110.
- DEMATTEIS, M. 1997. Números cromosómicos y cariotipos de algunas especies de *Vernonia* (Asteraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 33(1-2): 85-90.
- DEMATTEIS, M. 1998a. Chromosome studies of some *Vernonia* species. (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 381-385.
- DEMATTEIS, M. 1998b. Karyotype analysis in some *Vernonia* species (Asteraceae) from South America". *Caryologia* 51: 279-288.
- DEMATTEIS, M. 2002. Cytotaxonomic analysis of South American species of *Vernonia* (Vernonieae: Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 139: 401 - 108.
- DEMATTEIS, M. 2007. Taxonomic notes on the genus *Chrysolaena* (Vernonieae, Asteraceae), including a new species endemic to Paraguay. *Ann. Bot. Fennici* 44: 56-64.
- DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 1998. karyotypes of seven South American species of *Vernonia* (Asteraceae). *Cytologia* 63: 323-328.
- DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 2000. Chromosomes studies on nine South American species of *Vernonia* (Vernonieae, Asteraceae). *Caryologia* 53(1): 61.
- DE MELO, N. F.; CERVI, A. C. & GUERRA, M. 2001. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant Systematic and Evolution* 226: 69-84.
- EDELMAN, J.R. & LIN, Y. J. 1995. Repetitive DNA/heterochromatin: can it be the "driving force" of evolution and speciation? *Cytobios* 83: 117-127.
- FEDOROV, A.A. 1969. *Chromosome number of flowering plants*. V.L. Komarov Botanical Institute, Leningrado.
- FREGONEZI, J. N., TOREZAN, J. M.D. & VANZELA, A. L.L. 2004. A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence *in situ* hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA₃ banding. *Genet. Mol. Biol.* 27(2): 223-227.
- GALASSO, I.; SCHMIDT, T; PIGNONE, D.; HESLOP-HARRISON, J.S. 1995. The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L.) Walp: the physical organization and characterization of 18S-5.8S-25S rRNA genes, 5S genes, telomere-like sequences, and a family of centromeric repetitive DNA sequences. *Theor. Appl. Gen.* 9: 928-935.
- GARNATJE, T.; VALLÉS, J.; VILATERSANA, R.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; SILJAC-YAKOVLEV, S. 2004. Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). *Pl. Biol.* 6:140-146.

- GOLDBLATT, P. 1981. Index to plant chromosome numbers 1975 - 1978. *Monographs in systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V5. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1984. Index to plant chromosome numbers 1979 - 1981. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V8. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1985. Index to plant chromosome numbers 1982 - 1983. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V13. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. 1988. Index to plant chromosome numbers 1984 - 1985. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V23. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1990. Index to plant chromosome numbers 1986-1987. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V30. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1991. Index to plant chromosome numbers 1988-1989. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V40. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1996. Index to plant chromosome numbers 1992-1993. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V58. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 1998. Index to plant chromosome numbers 1994-1995. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 2006. Index to plant chromosome numbers 2001-2003. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GOLDBLATT, P. & JOHNSON, D.E. 2008. Index to plant chromosome numbers 2004-2006. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. V69. Sant Louis, Missouri Botanical Garden.
- GREILHUBER, J.; DEUMLING, B.; SPETA, F. 1981. Evolutionary aspects of chromosome banding, heterochromatin, satellite DNA, and genome size in *Scilla* (Liliaceae). *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 94: 249-266.
- GUERRA, M. 1988. *Introdução à citogenética Geral*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara.
- GUERRA, M. 2000. Chromosome number variation and evolution in monocots. In: Wilson K.L., Morrison, D.A. (eds) *Monocots – Systematics and evolution*, Vol.1. *Proceedings*

of Second Internacional Conference on the comparative biology of the Monocots. CSIRO, Melbourne, 125-134.

- GUERRA, M.; SANTOS, K.G.B; B, E.B; EHRENDORFER, F. 2000. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae – a case of parallel chromosome evolution. *American Journal of Botany*: 87(5): 735-747.
- JONES, S. B. 1970. Chromosome numbers in Compositae. *Bull. Torrey Bot. Club* 97: 168-174.
- JONES, S. B. 1974. Vernoniae (Compositae) chromosome numbers. *Bull. Torrey Bot. Club* 101: 31-34
- JONES, S.B. 1977. Vernoniae – systematic review. In: Heywood VH, Harbone JB, Turner BL, eds. *The biology and chemistry of the Compositae I*, Vol. I, pp. 503-521. London: American Press.
- JONES, S.B. 1979. Chromosome numbers of Vernoniae (Compositae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 106: 79-86.
- JONES, S. B. 1981. Synoptic classification and pollen morphology of *Vernonia* (Compositae: Vernoniae) in the Old World. *Rhodora* 83: 59 - 75.
- JONES, S. B. 1982. In: Lové A, ed. IOPB chromosome number report LXXIV. *Taxon* 31: 126 - 127.
- KEELEY, S.C. & TURNER, B.L. 1990. A preliminary Cladistic analysis of the genus *Vernonia* (Vernoniae: Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 4: 45-66.
- MARCON A.B.; BARROS I.C.L.; GUERRA M. 2003. A karyotype comparison between two closely related *Acrostichum* L. (Pteridaceae) species. *American Fern Journal* 93: 116–125.
- MARCON A.B.; BARROS I.C.L.; GUERRA M. 2005. Variation in Chromosome Numbers, CMA Bands and 45S rDNA Sites in Species of *Selaginella* (Pteridophyta). *Annals of Botany* 95: 271-276.
- MOORE, R.J. (eds) 1973. Index to plant chromosome numbers 1967 – 1971. *Regnum veg.* 90: 1-539.
- MOORE, R.J. (eds) 1974. Index to plant chromosome numbers 1972. *Regnum veg.* 91: 1-108.
- MOORE, R.J. (eds) 1977. Index to plant chromosome numbers 1973 – 1974. *Regnum veg.* 96: 1-257.
- MOSCONE EA, LAMBROU M, EHRENDORFER F. 1996. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 202: 37–63.

- MOSCONE E.A., LOIDL J., EHRENDORFER F., HUNZIKER A.T. 1995. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *American Journal of Botany* 82: 276–287.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007a. Cytotaxonomy of species of *Vernonia*, section *Lepidaploa*, group *Axilliflorae* (Asteraceae, Vernonieae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 154: 99-108.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007b. Cytotaxonomic studies in six species of *Vernonia* (Asteraceae: Vernonieae). *Caryologia* 60: 37-47.
- REDI, C.A.; GARAGNA, S.; ZACHARIAS, H.; ZUCCOTTI, M.; CAPANNA, E. 2001. The other chromatin. *Chromosoma* 110: 136–147.
- ROBINSON, H. 1987a. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), III: two new genera, *Cyrtucymura* and *Eirmocephala*. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 100: 844-855.
- ROBINSON, H. 1987b. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), the genus *Stenocephalum* Sch. Bip. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 100: 578-583.
- ROBINSON, H. 1987c. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), a new genus *Echinocoryne*. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 100: 584-589.
- ROBINSON, H. 1988a. A new combination of *Vernonia libertadensis*. S.B. Jones, with notes and descriptions of additional Andean species of *Baccharis*. *Phytologia*, 65: 34-46.
- ROBINSON, H. 1988b. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) IV. The new genus *Lessinglanthus*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100 (4): 929-951.
- ROBINSON, H. 1988c. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) V. The new genus *Chrysolaena*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100 (4): 952-958.
- ROBINSON, H. 1990a. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae), VII: the genus *Lepidaploa*. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 103: 248-253.
- ROBINSON, H. 1990b. Six combinations in *Baccharoides* Moench and *Cyanthillium* Blume. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 103: 248-253.
- ROBINSON, H. 1992a. A new genus *Vernonanthura* (Vernonieae: Asteraceae) *Phytologia* 73: 65-76.
- ROBINSON, H. 1992b. *Mesanthopora*, a new genus of Vernonieae (Asteraceae) from Paraguay. *Novon*, 2: 169-172.
- ROBINSON, H. 1993a. Three new genera of Vernonieae from South America, *Dasyandantha*, *Dasyandanthina* and *Quechualia* (Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 106 (4): 775-785.
- ROBINSON, H. 1993b. A review of the genus *Critoniopsis* in Central and South America (Vernonieae: Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 106 (3): 606-627.

- ROBINSON, H. 1994. *Cololobus*, *Pseudopiptocarpha* and *Trepadonia*, three new genera from South America (Vernonieae: Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 107 (3): 557-568.
- ROBINSON, H. 1999. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. *Smithonian Contributions to Botany*, 89: 1-116.
- RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; VIEIRA, O.S.; MATZENBACHER, N.I. & MARTINS, N.S. 1991. Cytogenetics of genus *Vernonia* Schreber (Compositae). *Cytologia*, 56: 239-247.
- RUAS, C.F.; VANZELA, A.L.L.; SANTOS, M.O.; FREGONEZI, J.N; RUAS, P.L.; MATZENBACHER, N.I.; AGUIAR-PERECÍN, M.L.R. 2005 Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genet Mol Biol* 28:129-139.
- SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHEIZER, D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype of the world. 13. Elsevier, Amsterdam.
- SCHWARZACHER, T. & SCHWEIZER, D. 1982. Karyotype analysis and heterochromatin differentiation with Giemsa C-banding and fluorescent counterstaining in *Cephalanthera* (Orchidaceae). *Plant Syst Evol* 141:91-113.
- SCHWEIZER, D. 1976. Reserve fluorescent chromosome banding with Cromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307-324.
- SCHWEIZER D., AMBROS P.F. 1994. Chromosome banding. In: Gosden JR, ed. *Methods in molecular biology*, Vol. 29. Totowa: Humana Press, 97-112.
- SINCLAIR, J.H. & BROWN, D.D. 19771. Retention of common nucleotide sequences in the ribosomal DNA of eukaryotes and some of their physical characteristics. *Biochemistry* 10: 2761-2769.
- STUTTS, J.G. 1981. Taxonomic revision of *Pollalesta* H.B.K. (Compositae: Vernonieae). *Rhodora* 83: 385-419.
- TORREL, M.; CERBAH, M.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; VALLÈS, J. 2003. Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescence *in situ* hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Plant Syst. Evol.* 239: 141-153.
- VANEZELA, A.L.L. & GUERRA, M. 2000. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genet. Mol. Biol.* 23(2): 453-456.
- VANZELA, A.L.L.; RUAS, C.F.; OLIVEIRA, M.F., RUAS, P.M. 2002. Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S probe. *Genetica* 114: 105-111.

- WEISS-SCHNEEWEISS, H., T. STUESSY, S. SILJAK-YAKOVLEV, C. BAEZA & J. PARKER. 2003. Systematic and evolutionary implications of karyotypes of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae) from South America. *Plant Systematics and Evolution* 241: 171-184.

Tabela 1 – Espécies de *Vernonia* analisadas, com respectivas localidades, habitats e material testemunho. C – cerrado. CR – Campo rupestre. BE – Beira de estrada.

ESPÉCIE	LOCAL DE COLETA	HABITAT	Nº DO COLETOR
<i>V. adamantium</i> Gardn.	MG, Diamantina	CR	ME Mansanares 389
<i>V. beyrichii</i> Less.	MG, Itambé do Mato Dentro	C	IR Costa 138
<i>V. condensata</i> Baker	SP, Analândia	C	VM Oliveira 117
<i>V. fruticulosa</i> Mart. ex DC.	MG, Joaquim Felício	C	IR Costa 536
<i>V. platensis</i> (Sprengel) Less.	SP, Indaiatuba	BE	VM Oliveira 85
<i>V. polyanthes</i> Less.	SP, Analândia	C	VM Oliveira 79
<i>V. rubriramea</i> Mart.	MG, Itambé do Mato Dentro	C	IR Costa 139
<i>V. scorpioides</i> Pers.	SP, São Miguel Arcanjo	C	AM Corrêa 25
<i>V. simplex</i> Less.	MG, Itambé do Mato Dentro	CR	IR Costa 147

Tabela 2 – Número cromossômico e quantidade de bandas CMA⁺ em espécies de *Vernonia*.

ESPÉCIE	2N	BANDAS CMA ⁺
<i>V. adamantium</i> Gardn.	40	2
<i>V. beyrichii</i> Less.	34	2
<i>V. condensata</i> Baker	32	2
<i>V. fruticulosa</i> Mart. ex DC.	32	2
<i>V. platensis</i> (Sprengel) Less.	60	6
<i>V. polyanthes</i> Less.	34	2
<i>V. rubriramea</i> Mart.	32	2
<i>V. scorpioides</i> Pers.	56	6
<i>V. simplex</i> Less.	32	2

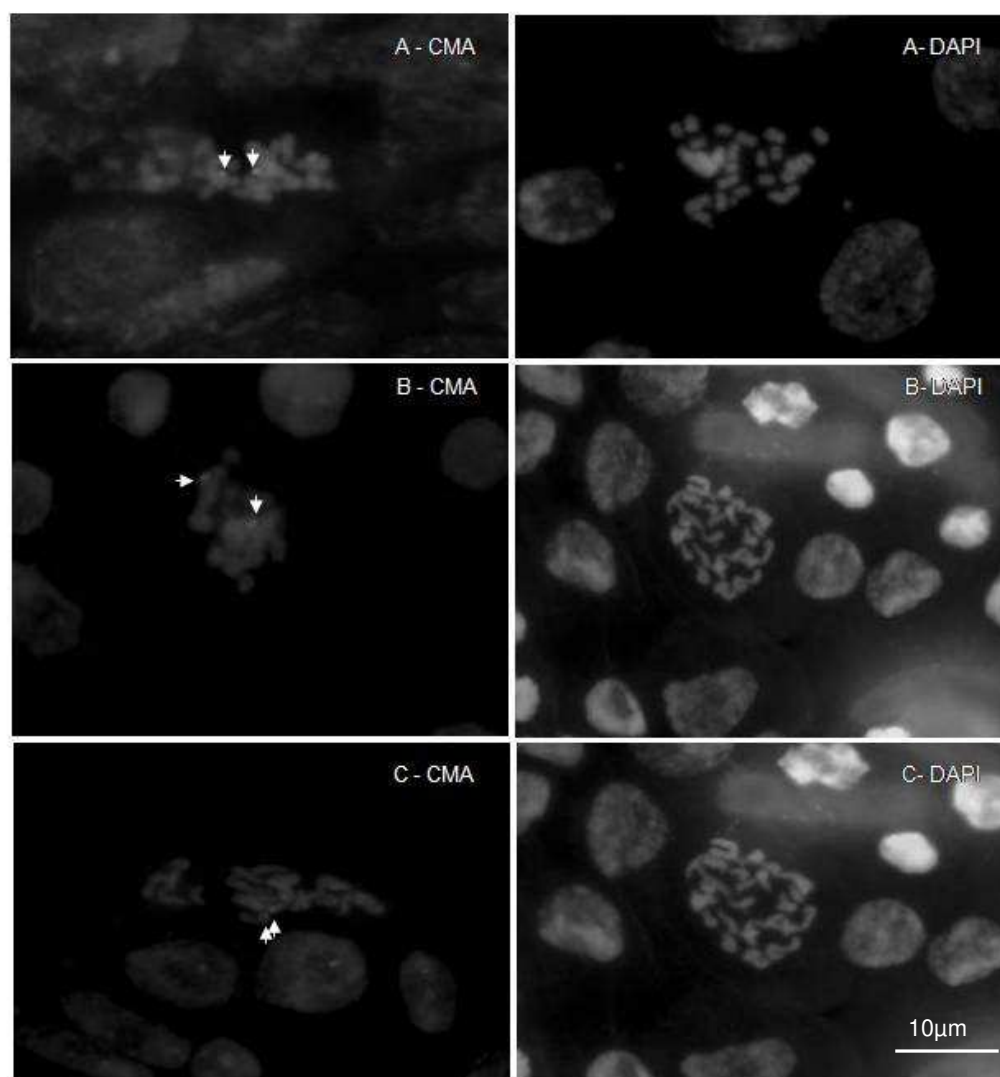


Figura 1: Bandas ricas em CG (indicadas pela seta) em espécies de *Vernonia*. A – *V. adamantium* ($2n = 40$, 2 bandas CMA⁺). B – *V. fruticulosa* ($2n = 32$, 2 bandas CMA⁺) e C – *V. simplex* ($2n = 32$, 2 bandas CMA⁺).

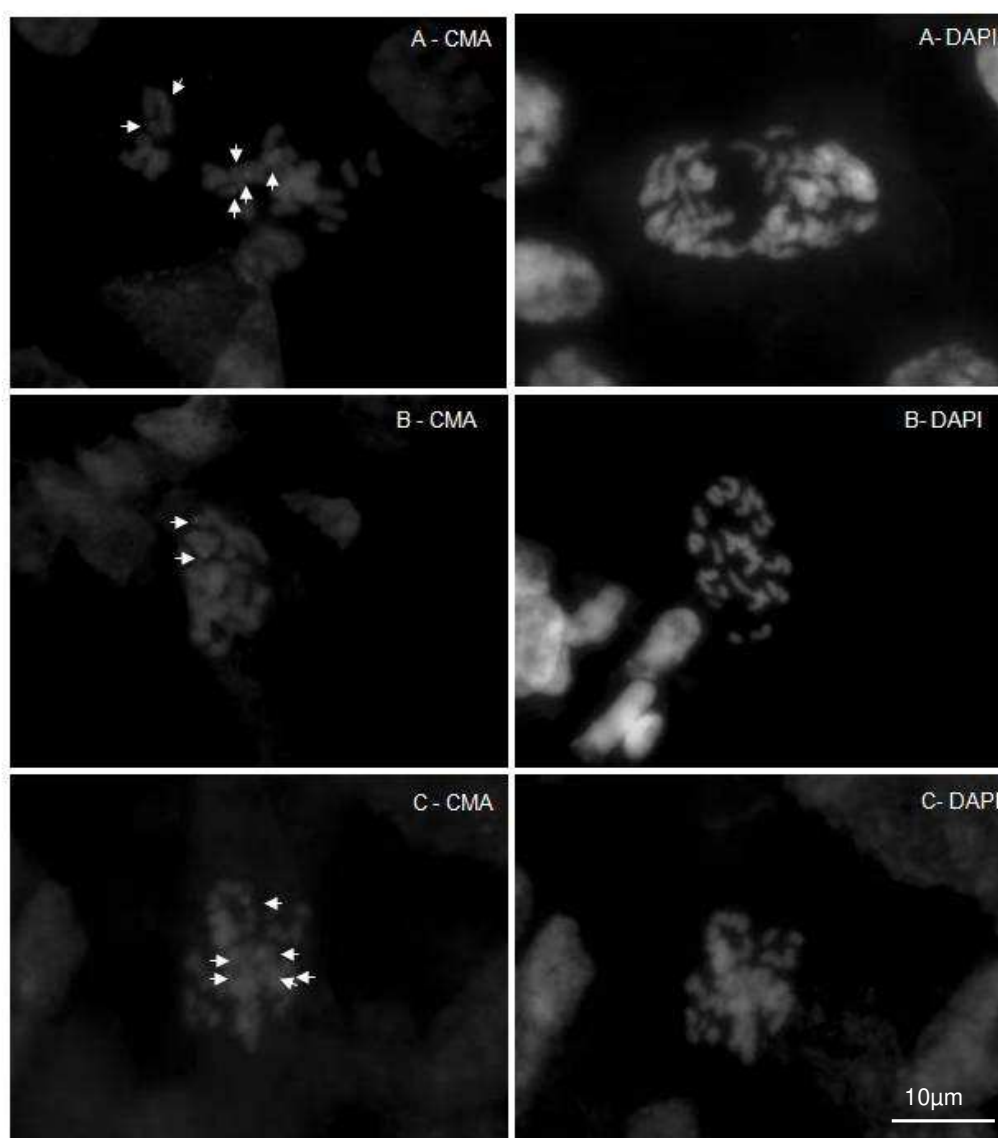


Figura 2: Bandas ricas em CG (indicadas pela seta) em espécies de *Vernonia*. A – *V. platensis* ($2n = 60$, 6 bandas CMA^+). B – *V. rubriramea* ($2n = 32$, 2 bandas CMA^+) e C – *V. scorpioides* ($2n = 56$, 6 bandas CMA^+).

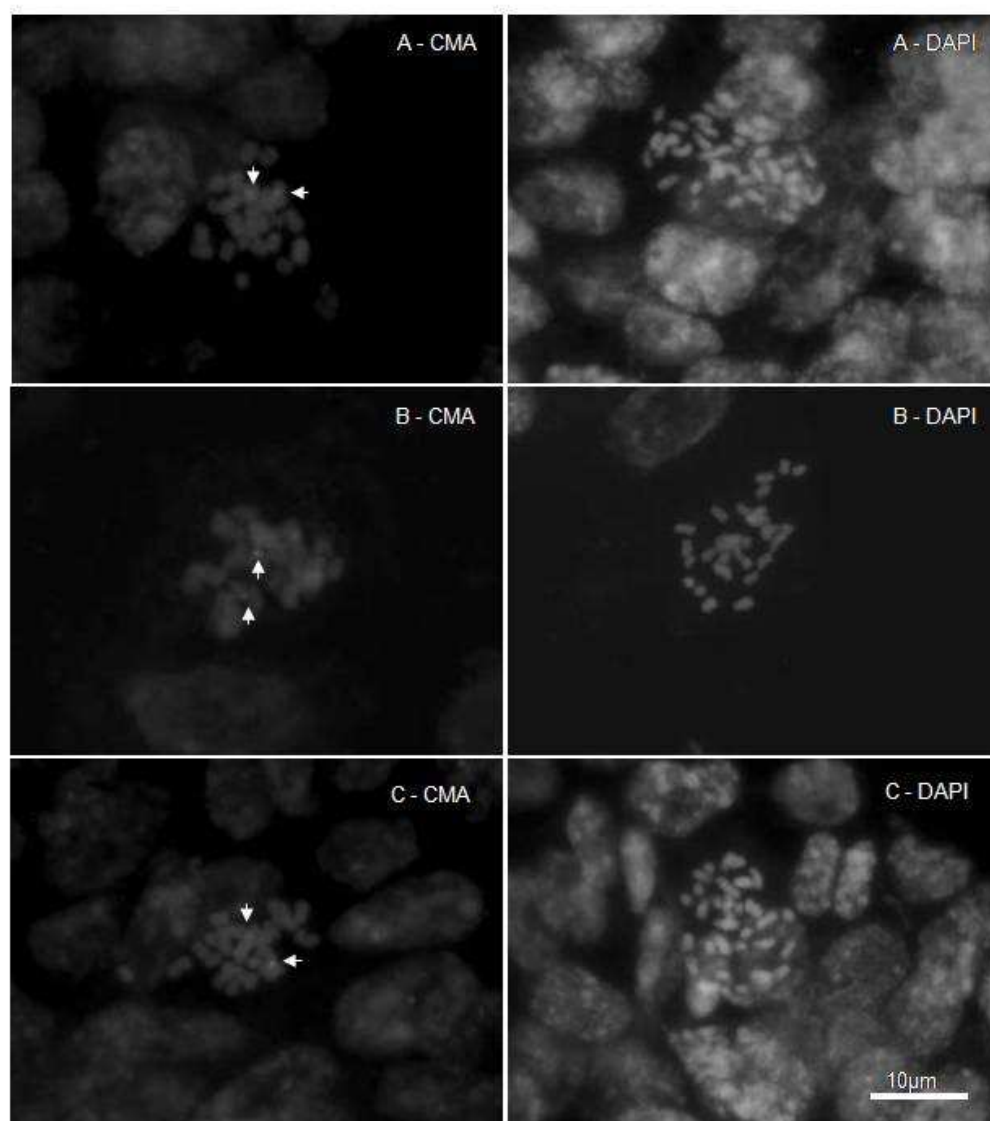


Figura 3: Bandas ricas em CG (indicadas pela seta) em espécies de *Vernonia*. A – *V. beyrichii* ($2n = 34$, 2 bandas CMA^+). B – *V. condensata* ($2n = 32$, 2 bandas CMA^+) e C – *V. polyanthes* ($2n = 34$, 2 bandas CMA^+).

CAPÍTULO 6

BANDAMENTOS E FISH EM TRÊS ESPÉCIES DE *Vernonia*, SUBSEÇÃO

***MACROCEPHALAE* (ASTERACEAE, VERNONIEAE)**

Autores: OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J.

RESUMO

Objetivando ampliar o conhecimento cariotípico e contribuir para o melhor entendimento taxonômico do gênero *Vernonia* (Asteraceae, Vernonieae), foram aplicadas, em três espécies da subseção *Macrocephalae*, diferentes técnicas de bandamento cromossômico, incluindo-se NOR e a tripla coloração com fluorocromos CMA/DA/DAPI (CDD), e a técnica de hibridação de DNA *in situ* para a sequência de DNAr 45S. *V. bardanoides* foi coletada em área de cerrado, no município de Itirapina, estado de São Paulo, enquanto que *V. linearifolia* e *V. tomentella* foram coletadas em áreas de campo rupestre, nos municípios de Joaquim Felício e Diamantina respectivamente, estado de Minas Gerais. Todas as espécies apresentaram um par de bandas CMA⁺ terminais e um par de bandas NOR terminais. A hibridação *in situ* evidenciou, em *V. linearifolia* e *V. tomentella*, um par de sítios de DNAr 45S terminais, enquanto que a espécie *V. bardanoides* apresentou dois pares de sítios de DNAr 45S terminais. Não foi possível indicar em quais cromossomos localizam se as bandas e os sítios de DNAr 45S.

INTRODUÇÃO

A tribo Vernonieae apresenta alguns problemas em sua taxonomia, a qual reflete uma discordância sobre o número de gêneros e de suas respectivas espécies e é considerada a mais complexa da família Asteraceae por apresentar extrema diversidade de formas biológicas (DEMATTEIS & FERNÁNDEZ 1998).

Recentemente, os tradicionais gêneros que compunham a tribo foram reorganizados por ROBINSON (1999b) sendo a sua proposição nem sempre aceita, principalmente para o gênero *Vernonia*, o qual foi desmembrado em 22 outros (BREMER 1994).

Entre as Vernonieae do Novo Mundo, um dos grupos mais interessantes, segundo BAKER (1873), é a subseção *Macrocephalae* Baker do gênero *Vernonia*. Essa subseção compreende cerca de 100 taxas distribuídos amplamente no sudeste do Brasil, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Argentina (ROBINSON 1988b). É representada por plantas herbáceas perenes e/ou arbustos com xilopódio, com capítulos de tamanhos médios ou grandes dispostos em inflorescências cimosas e possuem pólen do tipo B, os quais possuem cristas fortemente baculadas (ROBINSON 1988b). Apesar de *Macrocephalae* individualizar-se pelos padrões de inflorescência e tipo de pólen, a posição taxonômica de algumas espécies ainda não é clara (DEMATTEIS 1997). ROBINSON (1988b) segregou todas as espécies desta subseção em um gênero diferente, chamado *Lessingianthus*, com base no tipo de pólen, em algumas características morfológicas externas e também no número cromossômico, citando o número básico $x=16$ como o freqüente para o grupo.

Essa subseção possui como característica a alta freqüência de poliplóides e a maioria das espécies apresenta número cromossômico múltiplo de 16 (DEMATTEIS 1998, 2002; OLIVEIRA *et al.* 2007b). DEMATTEIS (2002) estudou 10 espécies desta subseção, das quais nove

apresentaram número cromossômico básico múltiplo de 16, sendo cinco diplóides ($2n=32$), três tetraplóides ($2n=64$) e uma octaplóide ($2n=128$).

A comparação de ideogramas e cariótipos, obtidos por técnicas de coloração convencional auxilia pouco na diferenciação das espécies da subseção *Macrocephalae* já estudadas, principalmente devido à pequena variação do tamanho cromossômico e de posição centromérica (DEMATTEIS 1997, 1998; OLIVEIRA *et al.* 2007b). Em sua maioria, os cromossomos são metacêntricos e submetacêntricos (DEMATTEIS 1997, 1998; OLIVEIRA *et al.* 2007b), com exceção de *V. lilacina* e *V. polyphylla*, que também apresentam alguns cromossomos subtelocêntricos (DEMATTEIS 2000). Técnicas de diferenciação linear dos cromossomos (bandamentos diversos e hibridação *in situ*), além de fornecer uma base para o estudo da organização do genoma, podem subsidiar a taxonomia. Até o momento, informações cariotípicas obtidas por essas técnicas são escassas em *Vernonia*.

Buscando ampliar o conhecimento cariotípico e contribuir para o melhor entendimento do gênero, foram aplicadas, em três espécies de *Vernonia* pertencentes à subseção *Macrocephalae*, diferentes técnicas de bandamento cromossômico, incluindo-se bandamentos AgNOR e a tripla coloração com fluorocromos CMA/DA/DAPI (CDD), e a técnica de hibridação de DNA *in situ* para a sequência de 45S de DNAr.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas três espécies de *Vernonia* pertencentes à subseção *Macrocephalae* Baker. *V. bardanoides* (VM Oliveira 84) foi coletada em área de cerrado, no município de Itirapina, estado de São Paulo, enquanto que *V. linearifolia* (ME Mansanares 435) e *V. tomentella* (ME Mansanares 413) foram coletadas em áreas de campo rupestre, no estado de Minas Gerais, nos municípios de Joaquim Felício e Diamantina, respectivamente (Tabela I). Foram coletados e herborizados ramos florais e vegetativos, seguindo as técnicas usuais. Materiais testemunhos de todas as espécies foram depositados no Herbário UEC (Departamento de Botânica, IB, Universidade Estadual de Campinas). A identificação das espécies foi feita pelo Dr. João Semir, docente da Universidade Estadual de Campinas e especialista na taxonomia da família Asteraceae. As espécies foram classificadas de acordo com BENTHAM (1873) e BAKER (1873).

Raízes recém-germinadas foram coletadas e submetidas a pré-tratamento com solução de 8 – hidroxiquinoleína (8Hq) – 0,002M, por 5 horas, a 14-15°C. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético) por 24 horas, transferidas para álcool 70% e estocadas em freezer.

Para a preparação de lâminas com digestão enzimática, as raízes foram lavadas em Tampão citrato-fosfato pH=4,8 e enxutas em papel filtro. As pontas da raiz foram digeridas em solução enzimática com 4% de celulase e 40% de pectinase, em câmara úmida, a 37°C por 2 horas. Foi feito o esmagamento das pontas de raízes entre lâmina e lamínula em uma gota de ácido acético 45%, retirando-se posteriormente a lamínula em nitrogênio líquido. As lâminas utilizadas nas técnicas de bandamento CMA/DA/DAPI e AgNOR foram armazenadas à temperatura ambiente por pelo menos um dia.

O bandamento CMA/DA/DAPI seguiu o protocolo de MOSCONE *et al.* (1996). As lâminas foram coradas primeiramente com CMA (cromomicina A3) 0,5mg/ml por 60 minutos; em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas lavadas com água destilada. Logo após, as lâminas foram coradas com DA (distamicina A) 10mg/ml por 15 minutos e lavadas novamente com água destilada. Finalmente, foram coradas com DAPI (4'-6 diamidino -2 fenilindol) 2mg/ml por 30 minutos. As lâminas foram lavadas novamente com água destilada e montadas com um meio de montagem contendo glicerol para fluorescência e tampão Mallvaine (1:1). Estas lâminas foram mantidas no escuro, à 37°C, por 3 dias, antes de serem observadas em microscópio de epifluorescência.

O bandamento NOR foi realizado de acordo com MOSCONE *et al.* (1995). As lâminas foram mergulhadas em tampão borato (0,01M; 1 tampão: 10H₂O dd) por 10 minutos e, em seguida, lavadas com água destilada. Após isso, cada lâmina, recebeu uma gota de solução de nitrato de prata e, em cima da gota, foi colocada uma malha de nylon. As lâminas foram mantidas a 60°C durante 60 minutos e, em seguida foram mergulhadas em água destilada por 5 minutos. Após secas, as lâminas foram montadas com Entelan.

A hibridação *in situ* foi realizada de acordo com CUADRADO & JOUVE (1994), com modificações de FREGONEZI *et al.* (2004). Foi utilizado o fragmento de DNAr 45S de cerca de 12kb contendo a sequência 28S-5,8S-18S com os seus espaçadores. Este fragmento foi clonado no plasmídio pUC18 em *E. coli*, resistente a ampicilina. O plasmídio foi separado pela técnica da miniprep e a concentração foi medida em um fluorômetro. A marcação da sonda foi feita por nick translation (Bionick Gibco) com biotina-14dATP. Antes de iniciar a hibridação, as lâminas foram tratadas com RNase 1% (1 RNase Tipo I: 99 2xSSC) pH 7,0, à 37°C por 1 hora. As lâminas foram lavadas em 2xSSC por 10 minutos sob agitação,

mergulhadas em paraformaldeído 4% por mais 10 minutos, e depois lavadas novamente com 2xSSC. As lâminas foram imersas em álcool 70% por 5 min e em álcool 100% por mais 5 min. Após as lâminas secarem, a preparação foi coberta pela mistura de hibridização. A mistura de hibridização foi composta por formamida 100%, PEG (polietilenoglicol) 50%, 20xSSC, sonda (DNAr 45S; 100-200ng μl^{-1}), DNA de bloqueio (esperma de salmão), SDS 10% e água. Depois de acrescentada a mistura de hibridização nas lâminas, estas foram colocadas em um termociclador, sendo submetidas a três ciclos de 10min cada, às temperaturas de 90°C, 50°C e 38°C. As lâminas foram então mantidas na estufa a 37°C, em câmara úmida e no escuro, por toda a noite. Foram feitos os banhos pós-hibridação, primeiramente com 2xSSC a 42°C por 5 min, formamida 20% (20ml de formamida para 80ml de 0,1xSSC) a 42°C por 10 min, 0,1xSSC a 42°C por 5 min e outro novamente em 2xSSC a 42°C por 5 min, 4xSSC/Tween 20 0,2% a 42°C e outro com 4xSSC/Tween 20 0,2% à temperatura ambiente. Todos os banhos foram feitos sob agitação. As lâminas foram tratadas com 50 μl de BSA 5% por 5 min. Foram adicionados 50 μl da solução de detecção, contendo 1:100 de avidina-FITC, e os cromossomos foram contracolorados com iodeto de propídio.

A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico (bandamento AgNOR) e de epifluorescência (hibridação *in situ* e bandamento CMA/DA/DAPI). Foram observadas, no mínimo, 10 células em condições adequadas de espalhamento e contração cromossômica para cada coloração.

RESULTADOS

As três espécies analisadas apresentaram $2n=32$ cromossomos.

O bandamento com nitrato de prata (NOR) demonstrou constância no número e localização de bandas em todas as espécies. Foi observado sempre um par de bandas localizadas próximas à região terminal do braço curto de um de seus cromossomos (Figuras 1B, 2B e 3B).

Em *V. linearifolia* e *V. tomentella*, o bandamento CMA/DA/DAPI possibilitou a visualização de um par de bandas CMA^+ , enquanto que a espécie *V. bardanoides* apresentou três pares de cromossomos com bandas CMA^+ (Figuras 1C, 2C e 3C). Nas três espécies, as bandas CMA^+ sempre ocorreram próximas à região terminal do braço curto de um de seus cromossomos (Figuras 1C, 2C e 3C). As três espécies não apresentaram bandas DAPI (DAPI neutro) (Figuras 1D, 2D e 3D).

A hibridação *in situ* evidenciou sítios de DNAr 45S sempre próximos à região terminal do braço curto do cromossomo, sendo um par em *V. linearifolia* e em *V. tomentella* e três em *V. bardanoides* (Figuras 1A, 2A e 3A).

Ainda não foi possível indicar em quais cromossomos localizam-se as bandas NOR e CMA^+ e os sítios de DNAr 45S.

DISCUSSÃO

O número cromossômico obtido para as espécies estudadas ($2n=32$, Figuras 1, 2 e 3) concorda com os obtidos anteriormente por OLIVEIRA *et al.* (2007b) e OLIVEIRA *et al.* (Capítulo 2). No entanto, JONES (1979b), de forma discordante, relatou $n=17$ e 34 para *V. bardanoides*. OLIVEIRA *et al.* (Capítulo 1) estudaram anteriormente duas das três espécies aqui analisadas, *V. bardanoides* e *V. linearifolia*. Ambas apresentaram ideogramas muito parecidos, com cromossomos pequenos, sendo 11 metacêntricos e cinco submetacêntricos, e alto índice de simetria, diferenciando-se apenas no comprimento total da cromatina.

No presente estudo houve coincidência entre a quantidade dos sítios de DNAr 45S, bandas NOR e bandas CMA⁺ em *V. linearifolia* e *V. tomentella*. Por outro lado, *V. bardanoides* apresentou apenas dois dos seis sítios de DNAr, coincidentes com bandas NOR (Figuras 1B, 2B e 3B). Apesar da coincidência do número de bandas, na maioria dos casos, não se pode dizer que em cada uma das três espécies estudadas, as bandas NOR e CMA⁺ e os sítios de DNAr 45S se localizem num mesmo cromossomo. Entretanto, tendo por base outros estudos em que são relatados algumas coincidências de localização desses marcadores, no presente estudo estamos assumindo, preliminarmente, essa mesma possibilidade.

Em *V. geminata*, sítios de DNAr também são relacionados às NORs (OLIVEIRA *et al.*, capítulo 3) e também são fisicamente adjacentes com sequências ricas em GC. GARNATJE *et al.* (2004) estudaram sete espécies de *Xeranthemum* L. e gêneros relacionados, pertencentes à tribo Carduceae (Asteraceae), e observaram que as bandas CMA⁺ e os sítios de DNAr 45S, na maioria das vezes, possuem a mesma localização, sugerindo que sequências ribossômicas repetidas poderiam estar interespaçadas na heterocromatina. Em geral, em plantas há coincidência na localização das regiões organizadoras de nucléolo e das bandas CMA⁺ (BERGER & GREILHUBER 1993). Essas bandas não fazem parte da sequência de DNAr 45S,

mas são arranjadas contiguamente (APPELS *et al.* 1998). VANZELA *et al.* (2002) descreveram a localização de sequências repetitivas (45S e CMA₃) em dez espécies de *Helianthus* L. (tribo Heliantheae) com diferentes níveis de ploidia e sugeriram que rearranjos envolvendo pequenos segmentos heterocromáticos e de DNAr tiveram grande importância na evolução das espécies deste gênero.

A ausência de bandas DAPI nas três espécies de *Vernonia* estudadas (Figuras 1D, 2D e 3D) também é comumente relatada em outros grupos de plantas, como em Cyperaceae, na espécie *Rhynchospora ciliata* (VANZELA & GUERRA 2000).

O DNA ribossômico (DNAr) é responsável pela síntese de proteínas por meio da transcrição dos diferentes tipos de RNAr e esses genes estão localizados em porções que, após a condensação, formam as constrições secundárias, denominadas regiões organizadoras do nucléolo (LEVIN 2002). No entanto, nem sempre existe coincidência no número de sítios de DNAr 45S e bandas NOR, pois o nitrato de prata detecta somente as regiões ativas, que estão sendo transcritas na intérfase que antecede à divisão celular. Por outro lado, a hibridação *in situ*, detecta as regiões com sequências de DNAr 45S ativas e inativas (MURRAY *et al.* 1992). MURRAY *et al.* (1992) não encontraram relação entre o número de sinais de hibridação e o número de bandas NOR em *Lathyrus sativus* L., relatando que um dos sítios detectado pela sonda estava inativo. Em *Vigna unguiculata* (L.) Walp., dentre múltiplos sítios de DNAr 45S, apenas os quatro maiores apresentaram marcação pelo nitrato de prata, resultado interpretado como uma inativação das NORs (GALASSO *et al.* 1995). Situação idêntica foi observada em *V. geminata* (OLIVEIRA *et al.*, Capítulo 3).

As técnicas de bandamento e hibridação *in situ* permitem a análise do número e a localização física de segmentos heterocromáticos e sequências gênicas que não são identificadas pelas técnicas convencionais (GUERRA 1988). Oliveira *et al.* (Capítulo 1) não

observaram constrições secundárias e satélites em *V. bardanoides* e *V. linearifolia*, o que confirma as limitações da técnica na sua visualização utilizando a coloração de Giemsa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos de Vanessa Mancuso de Oliveira e financiamento deste trabalho (#02/11805-5, #04/09982-1, #04/13165-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPELS, R., MORIS, R.; GILL, S.; MAY, C. 1998. *Chromosome Biology*. Boston: Kluwer. 401p.

BAKER, J. G. 1873. Compositae I. Vernoniae: In Martius, C.F & Eichler, A.G. (eds.). 6(2). *Flora brasiliensis*. Lipsiae, Monachii. pp 180.

BENTHAM, G. 1873. Compositae: In: G. Bentham & J.D. Hooker (eds.) *Genera Plantarum*. Lovell Reeve 2: 163 - 533.

BERG, C.; GREILHUBER, J. 1993. Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum* (Solanaceae): *C. strigillatum*, *C. fasciculatum*, and *C. elegans*. *Pl. Syst. Evol.* 185: 133-151.

BERGER, R., GREILHUBER, J. 1993. C-bands and chiasma distribution in *Scilla amoena*, *S. ingridae*, and *S. mischtschenkoana* (Hyacinthaceae). - *Pl. Syst. Evol.* 184: 125-137.

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-triticales. *Chromosome Research*. 2: 331-338.

DEMATTEIS, M. 1996. Estudos cromosômicos em espécies Argentinas de *Vernonia* (Asteraceae). *Bonplandia* 9(1-2): 103-110.

DEMATTEIS, M. 1997. Números cromosômicos y cariotipos de algunas especies de *Vernonia* (Asteraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 33(1-2): 85-90.

DEMATTEIS, M. 1998. Chromosome studies of some *Vernonia* species. (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 381-385.

DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 1998. karyotypes of seven South American species of *Vernonia* (Asteraceae). *Cytologia* 63: 323-328.

DEMATTEIS, M. & FERNÁNDEZ, A. 2000. Chromosomes studies on nine South American species of *Vernonia* (Vernoniae, Asteraceae). *Caryologia* 53(1): 61.

- FREGONEZI, J. N., TOREZAN, J. M.D. & VANZELA, A. L.L. 2004. A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence *in situ* hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA₃ banding. *Genet. Mol. Biol.* 27(2): 223-227.
- GALASSO, I.; SCHMIDT, T.; PIGNONE, D.; HESLOP-HARRISON, J.S. 1995. The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L.) Walp: the physical organization and characterization of 18S-5.8S-25S rRNA genes, 5S genes, telomere-like sequences, and a family of centromeric repetitive DNA sequences. *Theor. Appl. Gen.* 9: 928-935.
- GARNATJE, T.; VALLÉS, J.; VILATERSANA, R.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; SILJAC-YAKOVLEV, S. 2004. Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). *Pl. Biol.* 6:140-146.
- GOODPASTURE, C. & BLOOM, S.E. 1975. Visualization of nuclear organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- GUERRA, M. 1988. *Introdução à citogenética Geral*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara.
- JONES, S.B. 1979a. Synopsis and pollen morphology of *Vernonia* (Compositae: Vernonieae) in the New World. *Rhodora* 81: 425-447.
- JONES, S.B. 1979b. Chromosome numbers of Vernonieae (Compositae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 106: 79-86.
- LEVIN, D.A. 2002. *The role of chromosomal change in plant evolution*. Oxford University Press. 230 p.
- MOSCONE EA, LAMBROU M, EHRENDORFER F. 1996. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 202: 37-63.
- MOSCONE E.A., LOIDL J., EHRENDORFER F., HUNZIKER A.T. 1995. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *American Journal of Botany* 82: 276-287.
- MURRAY, B.G.; BENNETT, MD.; HANMET, R.W. 1992. Secondary constrictions and NORs of *Lathyrus* investigated by silver staining and *in situ* hibridization. *Hered.* 68: 473-478.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007a. Cytotaxonomy of species of *Vernonia*, section *Lepidaploa*, group *Axilliflorae* (Asteraceae, Vernonieae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 154: 99-108.
- OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J. 2007b. Cytotaxonomic studies in six species of *Vernonia* (Asteraceae: Vernonieae). *Caryologia* 60: 37-47.
- ROBINSON, H. 1988a. A new combination of *Vernonia libertadensis*. S.B. Jones, with notes and descriptions of additional Andean species of *Baccharis*. *Phytologia*, 65: 34-46.

- ROBINSON, H. 1988b. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) IV. The new genus *Lessinglanthus*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100 (4): 929-951.
- ROBINSON, H. 1988c. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) V. The new genus *Chrysolaena*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 100 (4): 952-958.
- ROBINSON, H. 1999a. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. *Smithsonian Contributions to Botany*, 89: 1-116.
- ROBINSON, H. 1999b. Two new subtribes, Stokessinae and Pacourinae, of the Vernonieae (Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 112(1): 216-219.
- RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; VIEIRA, O.S.; MATZENBACHER, N.I. & MARTINS, N.S. 1991. Cytogenetics of genus *Vernonia* Schreber (Compositae). *Cytologia*, 56: 239-247.
- VANEZELA, A.L.L. & GUERRA, M. 2000. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genet. Mol. Biol.* 23(2): 453-456.
- VANZELA, A.L.L.; RUAS, C.F.; OLIVEIRA, M.F., RUAS, P.M. 2002. Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S probe. *Genetica* 114: 105-111.

Tabela I – Quantidade de bandas NOR e CMA⁺ e número de sítios observados na hibridação *in situ* (FISH) para DNAr 45S em espécies de *Vernonia*, subseção *Macrocephalae*.

ESPÉCIE	2n	BANDAS NOR	BANDAS CMA ⁺	FISH
<i>V. bardanoides</i> Less.	32	2	6	6
<i>V. linearifolia</i> Less.	32	2	2	2
<i>V. tomentella</i> Mart. ex DC.	32	2	2	2

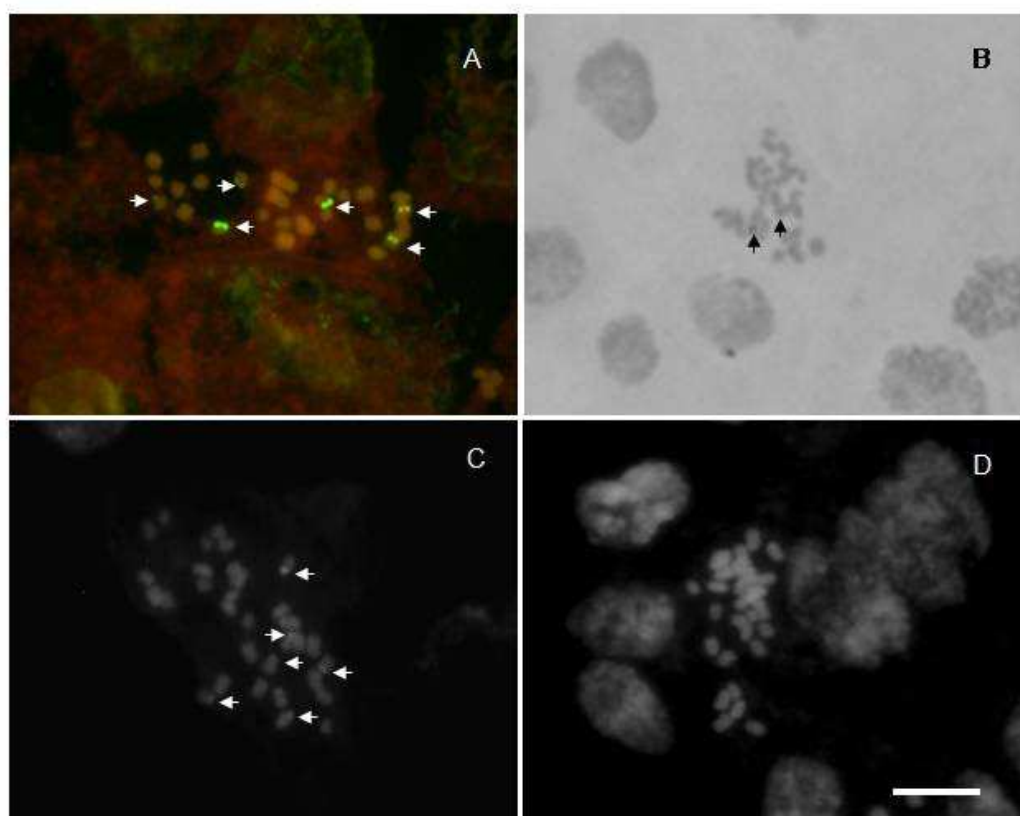


Figura 1: *Vernonia bardanoides*. A – Hibridação *in situ*, B – Bandamento NOR, C – CMA₃, D – DAPI. Barra = 10µm

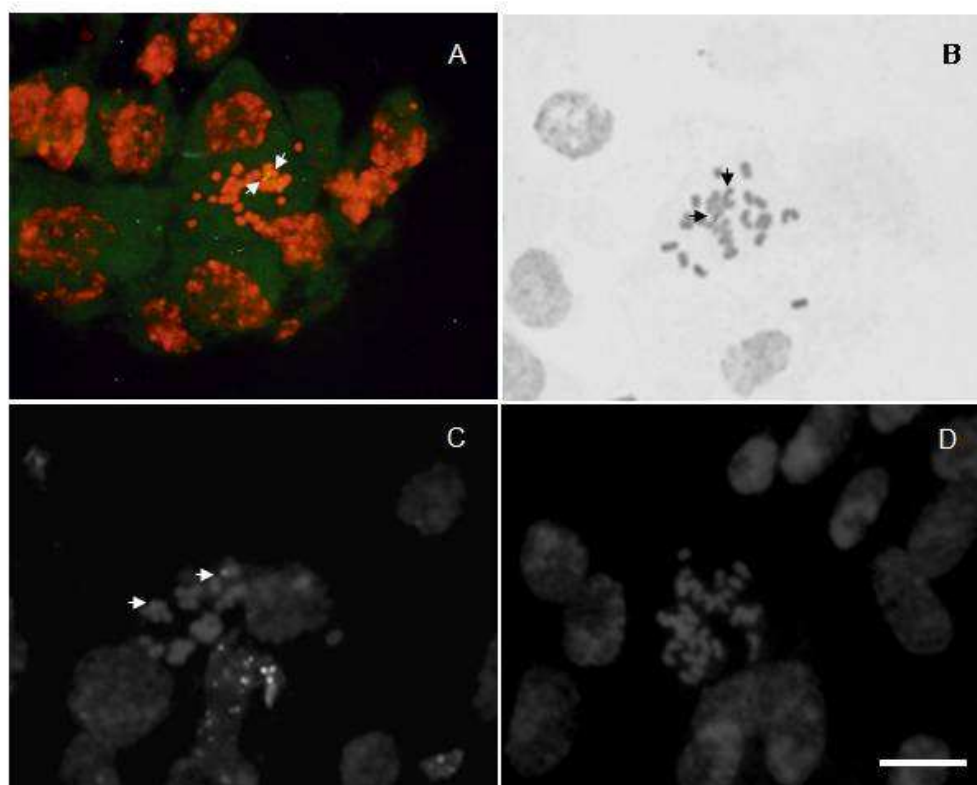


Figura 2: *Vernonia linearifolia*. A – Híbridação *in situ*, B – Bandamento NOR, C – CMA₃, D – DAPI. Barra = 10µm

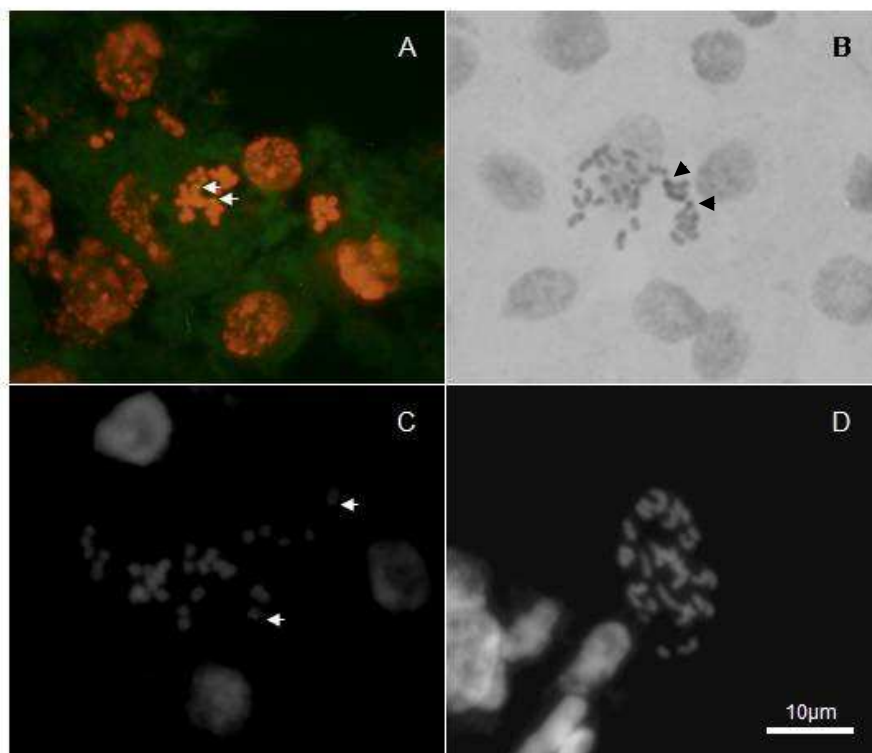


Figura 3: *Vernonia tomentella*. A – Hibridação *in situ*, B – Bandamento NOR, C – CMA₃, D – DAPI. Barra = 10µm

CAPÍTULO 7

ENSAIOS PARA A APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE FISH EM ESPÉCIES DE *Vernonia* UTILIZANDO OS MARCADORES DE DNAr 5S E DNA TELOMÉRICO

Autores: OLIVEIRA, V.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; SEMIR, J.

RESUMO

A técnica FISH constitui em um valioso marcador citológico para a identificação cromossômica, fornecendo informações importantes para a taxonomia e filogenia de um determinado grupo ou possibilitando a distinção entre espécies. Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo a preparação da sonda de DNAr 5S e de DNA telomérico, a partir de técnicas moleculares para que se possa futuramente, através da hibridação *in situ*, obter um maior detalhamento cariotípico das espécies de *Vernonia*. A extração de DNA genômico total foi feita utilizando-se a espécie *Vernonia polyanthes*. As amostras de DNAs foram utilizadas para amplificação do DNAr 5S e do DNA telomérico a partir de uma reação de PCR. Obteve-se sucesso na amplificação do DNA telomérico com os primers de *Arabidopsis* (Tel-1 e Tel-2), porém não se conseguiu a amplificação do DNAr 5S a partir da reação de PCR com os primers utilizados, de *Arabidopsis* (RTPCR 5S1 e RTPCR 5S2), *Allium* (EP6 e EP7) e *Nicotiana* (5SrDNA-3 e 5Sr DNA-4).

INTRODUÇÃO

A utilização de técnicas de citogenética molecular, como a de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) tem ampliado em muito os horizontes da caracterização cariotípica, permitindo localizar sequências específicas de DNA/RNA tanto ao longo dos cromossomos como no núcleo interfásico (HESLOP-HARRISON *et al.* 1991, MALUSZYNSKA & HESLOP-HARRISON 1993). Esta técnica tem sido aplicada a diferentes grupos taxonômicos, constituindo-se em um valioso marcador citológico para a identificação cromossômica, fornecendo informações importantes para a taxonomia e filogenia de um determinado grupo ou possibilitando a distinção entre espécies, bem como a caracterização de citótipos, de possíveis híbridos e de seus parentais (GUERRA 1988, CERBAH *et al.* 1998, SCHWARZACHER *et al.* 1989, SCHWEIZER 1976, SNODOW *et al.* 2002). As sequências de DNA repetitivo mais comumente utilizadas são as de DNAr 45S, DNAr 5S, teloméricas e microssatélites.

Sequências de DNA ribossômico 5S (DNAr 5S) também têm-se mostrado de grande aplicabilidade como marcador genético para identificação de espécies e híbridos. O DNA 5S apresenta-se repetido centenas a milhares de vezes no genoma, formando uma família multigênica que é responsável pela codificação do RNA ribossômico 5S (RNAr 5S) (UDOVICIC *et al.* 1995). Cada repetição do DNAr 5S contém uma região conservada de 120 pares de bases, que codifica o RNAr 5S, e um segmento de DNA espaçador não transcrito altamente variável. O uso das repetições de DNAr 5S apresenta algumas vantagens sobre os demais marcadores disponíveis, pois a presença desse conjunto de sequências codificantes conservadas, mais o DNA espaçador não transcrito, favorecem a técnica de PCR e consequentemente, o isolamento do DNA espaçador das mais diferentes espécies, sem um conhecimento prévio do genoma da espécie em questão (UDOVICIC *et al.* 1995).

VAIO *et al.* (2005) analisaram a distribuição do DNAr 5S em citótipos de *Paspalum quadrifarium* (Poaceae) e encontraram correspondência no número e posição dos sítios entre os diplóides e tetraplóides, sendo dois na região proximal do primeiro par cromossômico no diplóide e quatro na região proximal do primeiro par cromossômico no tetraplóide.

TORREL *et al.* (2003) observaram em *Artemisia* (Asteraceae) que, nos subgêneros *Artemisia* e *Seriphidium*, os sítios de DNAr 5S estão presentes em menor quantidade que os de 45S e que, o loci de DNAr 5S aparecem, na maioria das vezes, na região terminal dos cromossomos e podem ocorrer na região rica em CG. Essas informações cariotípicas subsidiaram a não separação de *Artemisia* e *Seriphidium* em gêneros independentes.

GALASSO *et al.* (1995) fizeram uma caracterização dos cromossomos de *Vigna unguiculata*, utilizando-se as sondas de DNAr 45S e 5S, de uma sequência repetitiva isolada da região centromérica e de sequências teloméricas. A espécie mostrou múltiplos sítios de DNAr 45S localizados em diferentes cromossomos e dois pares com DNAr 5S, sendo que um dos sítios aparecia próximo a um dos sítios de DNAr 45S e outro em um cromossomo sem estes marcadores. Os quatro maiores sítios de DNAr 45S apresentaram marcação pelo nitrato de prata, enquanto os sítios menores não. Isto foi interpretado como uma inativação deste loco, mas que não necessariamente ele seja inativo durante todo o ciclo de vida da planta.

O DNA telomérico consiste de sequências repetidas em tandem, extremamente conservadas encontradas nos telômeros dos cromossomos (MEAGHER & VASSILIADIS 2005; ABD EL-TWAB & KONDO 2006). A maioria das plantas superiores apresenta telômeros do tipo *Arabidopsis* (FUCHS *et al.* 1995), que foi caracterizado em *Arabidopsis thaliana* (RICHARDS & AUSUBEL 1988). O número de sequências teloméricas é uma característica espécie-específica, equivalente a 2 – 5 Kb em *Arabidopsis thaliana* (ADAMS *et al.* 2001; RICHARDS & AUSUBEL 1988) e a 60-160 Kb em *Nicotiana tabacum* (FAJKUS *et al.* 1995). De acordo com FUCHS *et al.*

(1995) a distribuição dessas sequências dentro dos complementos cromossômicos pode elucidar os mecanismos da evolução cariotípica, especialmente a alteração do número cromossômico diplóide entre taxas proximamente relacionados.

Em *Leucanthemella linearis* (Matsum.) Tzuvelev, ABD EL-TWAB & KONDO (2007) encontraram sequências teloméricas repetitivas terminais e intersticiais, indicando a existência de mutação cromossômica, como translocação e inversão. FUCHS *et al.* (1995) revisaram a organização de sequências teloméricas em várias espécies de plantas e concluíram que poucas espécies apresentam esses tipos de sequências na região intercalar dos cromossomos ou ainda não apresentam sinais terminais detectáveis.

A primeira etapa para uma hibridação bem sucedida é a obtenção de uma sonda bem marcada. Sondas de DNAr 5S, isoladas a partir de *Lotus japonica* e *Triticum aestivum* (pTa794) e de DNA telomérico, obtidas junto a outros pesquisadores, como o Prof. Dr. Marcelo Guerra (UFPE) e Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela (UEL), não se mostraram funcionais em testes preliminares realizados no Laboratório de Biossistemática/Depto. de Botânica/IB/UNICAMP. Também não se encontram disponíveis no GenBank sequências de DNAr 5S de qualquer espécie de *Vernonia* ou de algum gênero da tribo Vernonieae. Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo a preparação da sonda de DNAr 5S e de DNA telomérico a partir de técnicas moleculares para que se possa futuramente, através da hibridação *in situ*, obter um maior detalhamento cariotípico das espécies de *Vernonia*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A extração de DNA genômico total foi feita utilizando-se a espécie *Vernonia polyanthes*.

A extração seguiu o protocolo de DOYLE & DOYLE (1987):

Amostras de folhas (cerca de 500mg) foram maceradas sob congelamento com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana. Ao macerado foi adicionando 10 ml de tampão CTAB pré-aquecido a 65 °C, seguindo-se a homogeneização e transferência para tubos eppendorf. As amostras foram mantidas por 60 minutos em banho-maria, com constante agitação. Ao retirar os tubos do banho-maria, foram adicionados 5 ml de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Homogeneizou-se rapidamente em vortex. Os tubos foram então centrifugados a 9500 rpm, por 10 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e foi adicionado 500 µl de isopropanol em cada tubo. O material foi homogeneizado por inversão do tubo. O tubo foi deixado em repouso por 20 minutos e em seguida foi centrifugado a 9500 rpm, por 15 minutos a 20 °C. O pellet foi lavado com 10 ml de solução de lavagem por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, o tubo foi seco com lenço de papel e o pellet ressuspendido em 1 ml de TE. Foi adicionado 500 µl de acetato de sódio 7,5M e 3,5 ml de etanol absoluto por amostra durante 30 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 9500 rpm, por 10 minutos a 4 °C. O pellet gelatinoso foi ressuspensão em 100 ml de TE, transferido para tubo eppendorf e deixado à temperatura ambiente para dissolver. Essas amostras de DNAs foram utilizadas para amplificação do DNAr 5S a partir de uma reação de PCR, para servirem como sondas para o mapeamento físico deste loco nos cromossomos através do FISH.

Os primers utilizados para amplificar a sequência de DNAr 5S, via PCR foram os EP6 e EP7 (*Allium*), 5SrDNA-3 e 5SrDNA-3 (*Nicotiana*) e RTPCR 5S1 e RTPCR 5S2

(*Arabidopsis*); e para amplificar a sequência de DNA telomérico foram os Tel-1 e Tel-2 (*Arabidopsis*):

EP6: 5' – TAG GAC GAT ACG GTT C – 3' (forward)

EP7: 5' – CTA TTT GCT CAC TCT A – 3' (reverse)

5SrDNA-3: 5' – GTC CTT GGG CGA GAG TAG TA – 3' (forward)

5SrDNA-4: 5' – GGT GCG TTA GTG CTG GTA TG – 3' (reverse)

RTPCR 5S1: 5' – GGA TCG GAT CAT ACC AG – 3' (forward)

RTPPCR 5S2: 5' – GAG GGA TCG AAC AAC AG – 3' (reverse)

Tel-1: 5' – GTTAGGGTTAGGGTTAGG – 3' (forward)

Tel-2: 5' – GGTTAGGGTTAGGGTTAG – 3' (reverse)

Na reação de PCR foram utilizados 10 ng de DNA genômico, mM de dNTPs, 300 mM de cada primer (forward e reverso), 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 µl de Taq polimerase. As condições de PCR foram determinadas de acordo com o fabricante de cada primer. O produto obtido foi purificado utilizando-se o kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,8%, para confirmação e quantificação dos fragmentos amplificados. O gel foi corado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml e submetido a luz UV. A quantidade de DNA obtida (cerca de 25 ng/ul) foi estimada pela comparação da intensidade de fluorescência emitida pelas bandas do DNA isolado com o utilizado como padrão.

O laboratório de Biossistemática do DBT/IB/UNICAMP ainda não dispunha de reagentes e equipamentos necessários para a eletroforese no momento da realização dos ensaios. Esta foi realizada graças à colaboração de pesquisadores do Departamento de Genética e Evolução (DGE) do IB / UNICAMP (Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães

Pereira) e do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) / UNICAMP (Profa. Dra. Anete Pereira de Souza).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação às sondas obtidas de outros laboratórios, a falta de sucesso na obtenção de resultados pode ter sido devida à perda da cepa recombinante com DNAr 5S de *Lotus japonica* e de *Triticum aestivum* (pTa794) e a inadequação dos primers utilizados na amplificação da sequência do DNA telomérico. Além disso, as sequências de DNA 5S são um pouco mais variáveis que as de DNAr 45S (GUERRA 2004), onde, por exemplo, uma sonda obtida a partir do genoma de trigo (pTa71) foi utilizada para localizar o DNAr em muitas outras plantas (até pteridófitas e gimnospermas) e animais (peixes e gafanhotos).

Diante da não-disponibilidade de sondas funcionais com a sequência de DNAr 5S e de DNA telomérico, ou da indisponibilidade de sequências no GenBank, para amplificação de sondas específicas para *Vernonia*, tentou-se a obtenção das mesmas mediante a técnica de PCR com primers específicos.

Segundo WANG & CUTLER (1993), o segredo do sucesso da PCR (“Polymerase Chain Reaction”) reside na capacidade da reação de amplificar uma sequência precisa de DNA aliada à sua simplicidade, rigor, elevada sensibilidade e especificidade. A finalidade é produzir uma quantidade apreciável de um segmento específico de DNA a partir de uma quantidade mínima (MULLIS 1990). O DNA molde sofre uma amplificação controlada por enzimas, obtendo-se milhões de cópias do fragmento de DNA de interesse. Não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar (mesmo que se encontre misturado com DNA de outras espécies), uma vez que a especificidade da PCR é dada pelos *primers* (FERREIRA & GRATTAPAGLIA 1996).

Contudo, a PCR também tem limitações, como a necessidade de conhecer a sequência de DNA a amplificar para que possam ser sintetizados *primers* específicos (BROWN *et al.* 1993). Outras desvantagens são a relativa facilidade com que ocorre contaminação da amostra por DNA estranho (uma vez que se trata de uma técnica muito sensível) e a limitada extensão

da sequência que é possível amplificar (é difícil aplicar a PCR a sequências maiores do que 5kb). De acordo com BROWN *et al.* (1993), pode também ocorrer incorporação errônea de bases durante a replicação.

No presente estudo, não se obteve sucesso na amplificação do DNAr 5S a partir da reação de PCR com os primers utilizados, de *Arabidopsis* (RTPCR 5S1 e RTPCR 5S2) (Figura 1), *Allium* (EP6 e EP7) e *Nicotiana* (5SrDNA-3 e 5Sr DNA-4). Uma explicação para a não amplificação seria a que os primers aqui utilizados não seriam específicos para o gênero. Entretanto, obteve-se sucesso na amplificação do DNA telomérico com os primers de *Arabidopsis* (Tel-1 e Tel-2).

Pretende-se futuramente fazer a marcação da sonda telomérica mediante a técnica de nick translation (Bionick Gibco) com biotina-14dATP e realizar novos ensaios para a obtenção de sonda de DNAr 5S, utilizando outros três tipos de primers já disponíveis no Laboratório de Biossistemática/Depto. de Botânica/IB/UNICAMP. A realização desses novos ensaios será facilitada pela aquisição recente de reagentes e equipamentos necessários. Destacam-se a aquisição de equipamento para quantificação de DNA (após a extração) e para a realização e visualização dos resultados de eletroforese (cuba, fonte, fotodocumentador), graças ao apoio financeiro da FAPESP (Auxílio à pesquisa, processos 04/13165-9 e 06/51985-3).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos de Vanessa Mancuso de Oliveira e financiamento deste trabalho (#04/09982-1, #04/13165-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL-TWAB, M. H. & KONDO, K. 2006. FISH physical mapping of 5S, 45S and *Arabidopsis*-type telomere sequence repeats in *Chrysanthemum zawadskii* showing intra-chromosomal variation and complexity in nature. *Chromosome Botany* 1: 1-5.
- ADAMS, S.P.; HARTMAN, T.P.V.; LIM, K.Y.; CHASE, M.W.; BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J.; LEITCH, A.R. 2001. Loss and recovery of *Arabidopsis* -. type telomere repeat sequences 5' – (TTTAGGG)_n -3' in the evolution of major radiation of flowering plants. *Proc. R. Soc. Lond.* 268: 1541-1546.
- BROWN, M. P., HUGHEY, R., KROGH, A., MIAN, I. S., SJÖLANDER, K., & HAUSSLER, D. 1993. Using Dirichlet mixture priors to derive hidden Markov models for protein families. In: Hunter, L., Searls, D., & Shavlik, J. (eds) *Proc. of First Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology*. 47-55, Menlo Park, CA: AAAI/MIT Press.
- CERBAH M, COULAND J & SILJAK-YAKOVLEV S. 1998. rDNA organization and evolutionary relationships in the *Hypochaeris* (Asteraceae). *J. Heredity* 89: 312-318.
- DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* 19: 11-15.
- FAJKUS, J.; KOVAŘÍK, A.; KRALOVICS, R.; BEZDEK, M. 1995. Organization of telomeric and subtelomeric chromatin in the higher plant *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.* 247: 633-638.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-CENARGEN, Brasília. 220p.
- FREGONEZI JN, TOREZAN JMD & VANZELA ALL. 2004. A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using *in situ* hybridization with a 45rDNA probe and C-CMA₃ banding. *Genetics and Molecular Biology* 27 (2): 223-227.
- FUCHS, J.; BRANDES, A.; SCHUBERT, I. 1995. Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Plant Syst. Evol.* 196: 227-241
- GALASSO, I.; SCHMIDT, T; PIGNONE, D.; HESLOP-HARRISON, J.S. 1995. The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L.) Walp: the physical organization and

- characterization of 18S-5.8S-25S rRNA genes, 5S genes, telomere-like sequences, and a family of centromeric repetitive DNA sequences. *Theor. Appl. Gen.* 9: 928-935.
- GUERRA, M. 1988. *Introdução à Citogenética Geral*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara.
- GUERRA, M (organizador). 2004. *FISH – Fluorescent in situ hybridization. Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP. 184 p.
- HESLOP-HARRISON, J. S., T. SCHWARZACHER, K. ANAMTHAWAT-JÓNSSON, A. R. LEITCH, M. SHI, AND I. J. LEITCH. 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* 3: 109-115.
- MANSANARES ME. 2004. Estudo citotaxonômico de espécies do gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophorinae). Tese de Doutorado em biologia Vegetal. Instituto de Biologia. UNICAMP.
- MALUSZYNSKA J, HESLOP-HARRISON JS. 1993 . Molecular cytogenetics of the genus *Arabidopsis* : *In situ* localization of rDNA sites, chromosome numbers and diversity in centromeric heterochromatin. *Annals of Botany* 71: 479-484.
- MEAGHER, T.R. & VASSILIADIS, C. 2005. Phenotypic impacts of repetitive DNA in flowering plants. *New Phytologist* 168:71-80
- MULLIS, K.B. 1990. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* 4: 36-43.
- RICHARDS, E.J. & AUSUBEL, F.M. 1988. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53: 127-136.
- SCHWARZACHER, T., LEITCH, A. R., BENNETT, M. D. & HESLOP-HARRISON, J. S. 1989. *In situ* localization of Parental Genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany* 64: 315-324.
- SCHWEIZER, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307-324.
- SNOWDOW, R., KUSTERER, B. & HORN, R. 2002. Structural genome analysis using molecular cytogenetics techniques. *Progress in Botany* 63: 55-79.
- TORREL, M.; CERBAH, M.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; VALLÈS, J. 2003. Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescence *in situ* hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Plant Syst. Evol.* 239: 141-153.
- UDOVICIC, F., MCFADDEN, G.I. AND LADIGES, P.Y. 1995. Phylogeny of *Eucalyptus* and *Angophora* based on 5S rDNA spacer sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 247-256

- VAIO M, SPERANZA P, VALLS JF, GUERRA M & MAZZELA C. 2005. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany* 96: 191-200.
- WANG H.; QI, M.; CUTLER, A.J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res* 21: 4153-4154.

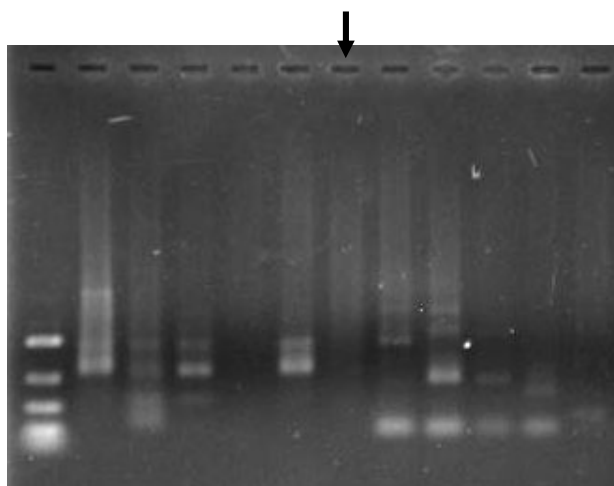


Figura 1: Produtos da amplificação do DNAr 5S, caracterização e quantificação. A seta indica a canaleta correspondente à *Vernonia polyanthes*. Observa-se que não houve formações de bandas. Primer utilizado RTPCR 5S.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Este trabalho contribuiu para um melhor conhecimento cromossômico do gênero *Vernonia*, incluindo contagens cromossômicas inéditas e elaboração de cariótipos com técnicas variadas em diversas espécies.

2. Dentre as 14 espécies estudadas, foram apresentadas contagens inéditas para as espécies: *V. beyrichii* ($2n=34$), *V. condensata* ($2n=32$), *V. linearifolia* ($2n=32$) e *V. rubriramea* ($2n=32$).

3. Foram encontrados seis números cromossômicos diferentes: $2n=20$, 32, 34, 40, 56 e 60, sendo os mais frequentes $2n=32$ e 34.

4. Observou-se variação cromossômica intraespecífica numérica em *V. geminata*, pela ocorrência de até seis cromossomos B ($2n=20+0-6B$) em células de uma das duas populações estudadas (pop.2).

5. Até o momento, parece existir uma tênue relação entre os números cromossômicos obtidos no presente trabalho e os disponíveis na literatura, com a conceituação taxonômica de ROBINSON (1999a) para os gêneros *Lessingianthus*, *Vernonanthura* e *Chrysolaena*, considerados a partir do desmembramento de *Vernonia sensu* BAKER (1873).

6. O número de espécies de *Vernonia* sul-americanas com cariótipo analisado passou de 20 para 28.

7. Dentre as oito espécies estudadas com técnicas de coloração convencional, em todos os cariótipos analisados houve predomínio de cromossomos metacêntricos, porém alguns submetacêntricos, em geral de menor tamanho, foram encontrados. Os tamanho dos cromossomos das espécies de *Vernonia* aqui estudadas variou de 0,73 a 3,26 μ m.

8. As espécies de *Vernonia* exibem moderado grau de simetria cariotípica, devido à pequena variação de tamanho e de formas dos cromossomos. Considerando os índices de assimetria A_1 e A_2 em conjunto, a espécie *V. platensis* é a que possui o cariótipo mais assimétrico e *V. rubriramea* é a espécie com cariótipo mais simétrico. Tendo por base o índice TF%, a simetria cariotípica é crescente de *V. platensis* (TF%=32,2) até *V. scorpioides* (TF%=45,9).

9. Dentre as 13 espécies analisadas com a técnica de bandamento CMA/DA/DAPI, 11 apresentaram um par de bandas CMA⁺ e 2 apresentaram 3 pares. As bandas foram localizadas sempre nos braços curtos dos cromossomos e em posição terminal.

10. As quatro espécies analisadas com a técnica de bandamento AgNOR apresentaram um par de bandas NOR, sempre localizadas nos braços curtos dos cromossomos e em posição terminal.

11. As 12 espécies de *Vernonia* analisadas com a técnica de FISH apresentaram sítios de DNAr 45S localizados sempre nos braços curtos dos cromossomos e em posição terminal, com exceção de *V. geminata*, que além de um par sítios terminais, apresentou um par de sítios de DNAr 45S centroméricos. Todas as espécies apresentaram 1 par de sítios de DNAr 45S, com exceção de *V. geminata* e *V. condensata* que apresentaram 2 pares e, *V. bardanoides*, que apresentou 3 pares.

9. Na população 2 de *V. geminata*, dois dos quatros sítios de DNAr 45S ocorreram nos cromossomos Bs.

12. Novos marcadores devem ser usados para ampliar a caracterização cariotípica de *Vernonia*. Até o momento, obteve-se sucesso na amplificação do DNA telomérico com os primers de *Arabidopsis* (Tel-1 e Tel-2), para a preparação de sondas.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado/doutorado intitulada “Caracterização cariotípica de espécies de *Vernonia* Schreb. (Asteraceae: Vernonieae) com técnicas de diferencial longitudinal de cromossomos (bandamentos e hibridação de DNA *in situ*)”:

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

(x) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº 2006/05), intitulado “Sequências de DNA/RNA de diversas espécies de plantas, como DNAr 45S, DNAr 5S, teloméricas e etc”.

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº _____).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº _____).

Imessa momentoso de Oliveira
Aluno

Elia R Forni Martins
Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Helena Coutinho F. de Oliveira

Nome:

Função:

Profa. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP