

CAROLINE DO AMARAL POLIDO

“Estudo cromossômico da tribo *Dalbergieae sensu Klitgaard & Lavin (2005)*, com ênfase no clado *Dalbergia s. str.* (Leguminosae, Papilionoideae)”

“Chromosome studies of the tribe *Dalbergieae sensu Klitgaard & Lavin (2005)* with emphasis on *Dalbergia s. str.* clade (Leguminosae, Papilionoideae)”

**CAMPINAS
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAROLINE DO AMARAL POLIDO

**“Estudo cromossômico da Tribo Dalbergieae *sensu* Klitgaard &
Lavin (2005), com ênfase no Clado Dalbergia *s. str.*
(Leguminosae, Papilionoideae)”**

**“Chromosome studies of the tribe Dalbergieae *sensu* Klitgaard
& Lavin (2005) with emphasis on Dalbergia *s. str.* clade
(Leguminosae, Papilionoideae)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese defendida pela candidata

Caroline do Amaral Polido

Eliana Regina Forni Martins

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do Título de
Doutora em Biologia Vegetal

Orientadora: Profª. Dra. Eliana Regina Forni Martins

Coorientadora: Dra. Ana Paula de Moraes

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P759e Polido, Caroline do Amaral, 1983-
Estudo cromossômico da tribo Dalbergieae *sensu* Klitgaard & Lavin (2005) com ênfase no clado Dalbergia *s. str.* (Leguminosae, Papilionoideae) / Caroline do Amaral Polido. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Eliana Regina Forni Martins.
Coorientador: Ana Paula de Moraes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citogenética. 2. Fabaceae. 3. Cromossomos – Classificação. 4. Coloração cromossômica. 5. Hibridização *in situ*. I. Forni-Martins, Eliana Regina, 1957-. II. Moraes, Ana Paula de, 1977-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Chromosome studies of the tribe Dalbergieae *sensu* Klitgaard & Lavin (2005) with emphasis on Dalbergia *sensu stricto* clade (Leguminosae, Papilionoideae)

Palavras-chave em inglês:

Cytogenetics

Fabaceae

Chromosomes - Classification

Chromosome painting

In situ hybridization

Área de concentração: Taxonomia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Eliana Regina Forni Martins [Orientador]

Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi

Ana Paula Fortuna Perez

Andréa Pedrosa Harand

Ricardo Augusto Lombello

Data de defesa: 15-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 15 de julho de 2013

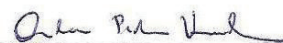
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins (orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Andrea Pedrosa Harand




Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Fortuna Perez



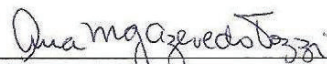
Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello



Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi



Assinatura

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide



Assinatura

Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita



Assinatura

Profa. Dra. Ângela Lúcia Bagnatori Sartori



Assinatura

RESUMO

Leguminosae Adans. configura-se entre as maiores e mais importantes famílias de Angiospermas. Com 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies, está amplamente distribuída mundialmente e representa um dos principais elementos dos ecossistemas brasileiros. Dalbergieae *s. l.*, uma das maiores tribos de Papilionoideae, não tem sua circunscrição definida, uma vez que a mesma vem sendo radicalmente alterada nos últimos anos. Sendo assim, são necessários dados adicionais, além dos taxonômicos, para auxiliar essa questão. Desse modo, esse estudo objetivou fornecer e analisar dados citogenéticos de representantes de Dalbergieae, sobretudo do clado Dalbergia *s. str.*, com a finalidade de auxiliar no melhor entendimento taxonômico e evolutivo da tribo. Além disso, o presente trabalho também teve como objetivos aprofundar as análises cromossômicas, a partir da produção de novas sondas para a hibridização fluorescente *in situ*, contribuindo para o conhecimento cromossômico de representantes de Leguminosae. Para isso, foram utilizadas as técnicas de coloração convencional com Giemsa, de bandamento cromossômico CMA/DAPI e de hibridização *in situ* (FISH). Foi efetuada uma revisão dos números cromossômicos já publicados para o clado Dalbergia *s. str.*, os quais foram analisados em conjunto com os dados obtidos neste trabalho. As novas sondas foram confeccionadas a partir de sequências de DNA de *Phaseolus vulgaris* L. inseridas em cromossomos artificiais de bactérias (BACs) e de sequências de DNA microssatélites (SSRs) de *Aeschynomene falcata* (Poir.) DC. O número cromossômico predominante entre as espécies observadas foi $2n=20$. O número básico encontrado foi $x=10$, tanto para o clado Dalbergia *s. str.* quanto para a tribo Dalbergieae. As variações de número e morfologia encontradas nas espécies analisadas não permitiram agrupá-las. Dados referentes ao bandamento e FISH mostraram-se homogêneos na maioria das espécies, com duas bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais ou proximais, dois sítios 5S proximais e dois sítios 45S terminais ou proximais, estes sempre co-localizados com as bandas CMA⁺/DAPI⁻. As mudanças de posição podem estar relacionadas a rearranjos cromossômicos ou transposição. Dentre as sondas confeccionadas a partir de sequências em BACs de *Phaseolus*, apenas uma (BAC 18B15) marcou um par de cromossomos de *Aeschynomene sensitiva* Sw. na região proximal. Em relação às sondas confeccionadas a partir de SSRs de *A. falcata*, três (Aesfal.1, Aesfal.8 e Aesfal.11) apresentaram sinais em um par cromossômico apenas em *A. falcata*. Apesar dos dados citogenéticos apresentados neste estudo não fornecerem elementos suficientes para subsidiar as discussões taxonômicas a respeito do clado Dalbergia *s. str.*, os dados permitiram vislumbrar um panorama mais completo da citogenética neste grupo. A partir da ampliação das análises cromossômicas conclui-se que a poliploidia teve um papel importante na evolução cromossômica gerando a diversidade de números observados a partir do número básico $x=10$. Em conjunto com a poliploidia, rearranjos cromossômicos possivelmente alteraram posições dos sítios de DNAr 5S e 45S nos diferentes gêneros analisados. Além disso, a utilização de novas sondas permitiu que sequências espécie-específicas fossem encontradas, sendo este um passo importante para a citogenética do grupo em questão.

Palavras-chave: Fabaceae, complexos taxonômicos, morfologia cromossômica, bandas CMA⁺/DAPI⁻, sítios de DNAr 5S e 45S, novas sequências de DNA

ABSTRACT

Leguminosae Adans. is among the largest and most important families of Angiosperms. With 727 genera and about 19.325 species, it is widely distributed, representing a major component of Brazilian ecosystems. Dalbergieae *s. l.*, a major tribe of Papilionoideae, has not a clear delimitation, since it has been changed radically in recent years. Therefore, additional data are needed, beyond the morphologic data, to assist in this question. Thus, this study aimed to provide and analyze cytogenetically species of Dalbergieae, especially the Dalbergia clade *s. str.*, in order to contribute to a better understanding of its evolution and taxonomy. Furthermore, this study also aimed to deepen the chromosomal analysis in this group, by developing new probes for fluorescence *in situ* hybridization and contributing to the chromosome knowledge of representatives of Leguminosae. For this, we used the Giemsa technique of conventional staining, chromosome banding with CMA and DAPI and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). A review of chromosome numbers previously published for the Dalbergia clade *s. str.* was performed and the data analyzed together with the results obtained in this work. The new probes were developed from DNA sequences of *Phaseolus vulgaris* L. inserted in bacterial artificial chromosomes (BACs) and microsatellite DNA sequences (SSRs) of *Aeschynomene falcata* (Poir.) DC. Among the species, the prevalent chromosome number was $2n = 20$. The basic number was found to be $x=10$ both for Dalbergia clade *s. str.* as for the Dalbergieae tribe. Variations in number and morphology found in the analyzed species did not allow to group them. Data concerning the banding and FISH were homogeneous in most species, with two terminal or proximal CMA⁺/DAPI⁻ bands, two proximal 5S rDNA sites and two terminals or proximal 45S rDNA sites, the latter always co-located with the CMA⁺/DAPI⁻ bands. Changes in the position of 45S rDNA sites may be related to chromosomal rearrangements or transposition. Among the probes made from *Phaseolus* sequences in BACs, only one (BAC 18B15) labelled a pair of chromosomes from *Aeschynomene sensitive* Sw in proximal region. Regarding the probes from SSRs of *A. falcata*, three (Aesfal.1, and Aesfal.8 Aesfal.11) presented signals in only one chromosome pair in *A. falcata*. Although cytogenetic data presented in this study did not provide sufficient evidence to support discussions about the taxonomic of Dalbergia clade *s. str.*, it provides powerful tools for cytogenetic studies in this group. From this extended analysis it can be concluded that polyploidy played an important role in the chromosome evolution, with diversity of numbers from the basic number $x=10$. In conjunction with polyploidy, chromosomal rearrangements changed positions 5S and 45S rDNA sites in different genera. Furthermore, the use of new probes allowed species-specific sequences to be found, this being an important contribution to the cytogenetics of the group.

Keyword: Fabaceae, taxonomic complexes, chromosomal morphology, CMA⁺/DAPI⁻, rDNA 5S and 45S sites; new DNA sequences

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVO GERAL	12
Objetivos específicos	12
ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE	13
APÊNDICE	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 1: Implicações evolutivas dos numerosos cromossômicos e da morfologia cariotípica no clado <i>Dalbergia s. str.</i> (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae)	
RESUMO	26
Introdução	27
Metodologia	28
Resultados	30
Discussões	32
Referências bibliográficas	37
CAPÍTULO 2: Caracterização cariotípica em espécies de <i>Dalbergieae s. l.</i> (Leguminosae, Papilionoideae)	
RESUMO	53
Introdução	54
Metodologia	55
Resultados	56
Discussões	58
Referências Bibliográficas	60

CAPÍTULO 3: Characterization of 11 microsatellite loci for *Aeschynomene falcata* (Leguminosae) and cross-amplification in related species

ABSTRACT	70
INTRODUCTION	70
METHODS AND RESULTS	71
CONCLUSIONS	72
LITERATURE CITED	72
APPENDIX 1.	76

CAPÍTULO 4: A utilização de novas sequências de DNA como sondas para Hibridização *in situ* em representantes de Dalbergieae (Leguminosae, Papilionoideae)

RESUMO	78
Introdução	79
Metodologia	80
Resultados e Discussão	82
Referências Bibliográficas	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS	89

DEDICATÓRIA

Dedico à:
Antonio e Rosângela, meus pais,
pelo apoio, sempre!

"Uma hora ou outra o destino se ajeita, as coisas se acertam, o passado é esquecido, as dores cicatrizam. Quem tem que ficar, fica; o que é verdadeiro permanece; e o que não é some. Não tenha pressa, não guarde mágoas, não queira pouco... Sempre queira o melhor. Espere na sua. Aprenda a ser paciente. Aprenda a ouvir uma boa música quando a tristeza bater. Aprenda a ignorar o que te faz mal. Aprenda, sobretudo, a ter fê."

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Profª. Dra. Eliana Regina Forni Martins, pela dedicada orientação. Uma excelente profissional e exemplo de pessoa, sempre disposta a ajudar todos ao seu redor. Com certeza vou me espelhar nela para seguir essa nova caminhada!

A Dra. Ana Paula de Moraes, minha co-orientadora, por me ensinar pacientemente as técnicas citogenéticas que eu tanto amo; e acima de tudo, a Ana Paula amiga, por todos os momentos de conversas fiadas, desabafos e amparo nas horas difíceis. Amiga para a vida toda!

Aos membros da pré-banca, Profª. Dra. Andrea Pedrosa Harand, Profª. Dra. Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi e Dr. Silvo Kleio Costa Silva, e da banca, Profª. Dr. Andrea Pedrosa Harand, Profª. Dra. Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi, Profª. Dra. Ana Paula Fortuna Perez e Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello, pela leitura e pelas valiosas sugestões para a melhoria deste trabalho.

As instituições de fomento CAPES CNPq (Processo 076.158.108/2010-0), FAEPEX/UNICAMP e à FAPESP (Processo 2010/19132-6) pela concessão da bolsa de doutorado e dos recursos financeiros.

Ao Departamento de Biologia Vegetal/IB/UNICAMP, a pós-graduação, em especial a secretária Maria Roseli, e ao Laboratório de Biossistemática pela estrutura oferecida.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Vegetal/IB/UNICAMP, em especial a Iara Bressan, pelo apoio fundamental no início da minha vida em Campinas.

A todas as pessoas que me mandaram sementes, especialmente a Erli Souza, Itayguara Ribeiro da Costa e Carlos Victor Mendonça Filho.

A professora Anete Pereira de Souza por me permitir utilizar o Laboratório de Biologia Molecular/UNICAMP para desenvolvimento dos microssatélites, em especial a Camila, pela ajuda essencial.

Aos professores Andrea Pedrosa Harand e Marcelo Guerra por permitirem o meu “estágio” no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Vegetal/UFPE. Não esquecendo de agradecer meu querido professor amigo Arthur, além da Magdalena (ótima anfitriã), do Silvo e todos os demais do laboratório pela calorosa recepção.

Aos inúmeros amigos que fiz durante esses quatro anos felizes em que vivi em Campinas. Certamente escreveria outra tese para citar todas as pessoas importantes, então agradeço a agradável convivência com as loiras da Anatomia Vegetal, as ótimas conversas com a galerinha da Taxonomia e Ecologia. Não posso deixar de citar as meninas do Clube da Luluzinha, pelos nossas conversas fiadas (o Bar do Zé é testemunha disso) e maravilhosa convivência durante esses anos. Nossas reuniões salvaram muitos sábados, né meninas?! Um agradecimento especial a Zilda e a Talita, as grandes companheiras de república!

Preciso agradecer de forma especial à galerinha da Biossistemática. Ao pessoal da Biologia Reprodutiva pelas altas discussões (no bom sentido) e aos amigos da Citogenética, Van, Nair, Luana, Vic, Klenya, Rafa, Thaíssa, João, Ana Laura e Eliane, por contribuírem não apenas com a minha formação profissional, mas com a pessoal principalmente. Esse laboratório é o exemplo de respeito e convivência pacífica. Mas e agora, quem vai mandar aí?! Hehe!

Aos meus amigos de Dourados, a galera do mestrado, Vô Wagner, Vó Olga, tios e primos, que mesmo de longe, torceram por mim e fizeram parte dessa importante etapa da minha vida.

Aos meus tios Wagner e Cristina, a minha prima Michele e esposo Caio e a querida Luiza, por me acolherem com tanto amor e carinho na casa deles. Com certeza com eles por perto foi mais fácil aguentar a distância de 1,000 km!

Aos meus pais, Antonio e Rosângela, aos meus irmãos, Igor e Diego, e cunhada Giuliana pelo amor, incentivo, paciência, renúncias, enfim, tudo o que sou hoje vem da presença deles na minha vida!

Um agradecimento especial ao Bruno, o amor da minha vida, por ter aguentado firme e forte um namoro à distância!

E por fim, a Deus pelo dom da Vida!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 01. Cladograma representativo da ordem Fabales	02
Figura 02. Cladograma representativo das subfamílias de Leguminosae	02
Figura 03. Cladograma representativo da Tribo Dalbergieae <i>s.l</i>	05
Figura 04. Cladograma representativo do clado Dalbergia <i>s. str.</i>	05
Figura 05. Principais etapas da técnica de hibridização <i>in situ</i> (FISH)	09

Apêndice

Figura 1. Representantes da tribo Dalbergieae <i>s. l.</i>	15
---	----

CAPÍTULO 1

Figura 01. Números cromossômicos de species do clado Dalbergia <i>s. str.</i>	49
Figura 02. Comprimento Total da Cromatina (CTC)	50
Figura 03. Prováveis números básicos (x) da tribo Dalbergieae <i>s.l</i> , com ênfase no clado Dalbergia <i>s. str.</i>	51

CAPÍTULO 2

Figura 01. Bandamento CMA/DAPI e FISH em metáfases integrantes do clado Dalbergioide	66
Figura 02. Bandamento CMA/DAPI e FISH em metáfases de integrantes do clado Dalbergioide	67

CAPÍTULO 4

Figura 01. Hibridização in situ a partir de sondas de BACs e SSR	87
Figura 02. Hibridação in situ a partir de sondas SRR	88

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 01. Trabalhos citotaxonômicos realizadas com species brasileira de leguminosas	11
--	----

Apêndice

Tabela 01. Relação de espécies estudadas nesta tese, com os respectivos locais de coleta, formação vegetacional e herbário	14
---	----

CAPÍTULO 1

Tabela 01. Caracterização cromossômica de species da tribo Dalbergieae <i>s.l.</i>	45
Tabela 02. Contagens efetuadas para representantes do clado <i>Dalbergia s. str.</i> disponíveis na literatura e apresentados no presente estudo	46

CAPÍTULO 2

Tabela 01. Caracterização cromossômica de espécies da tribo Dalbergieae <i>s. l.</i>	64
---	----

CAPÍTULO 3

Table 01. Genetic characterization of 11 microsatellite loci amplified for <i>Aeschynomene falcata</i> (Poir.) DC. (n=15)	74
Table 02. The microsatellite loci of <i>A. falcata</i> tested for cross-amplification in 14 individuals of four species	75

INTRODUÇÃO

Leguminosae Adans. (Fabaceae Lindl.) é a terceira maior família dentre as Angiospermas, com 727 gêneros e aproximadamente 19.325 espécies, e encontra-se amplamente distribuída, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (Lewis *et al.* 2005). Conhecida também por Fabaceae, está incluída entre as principais famílias na maioria dos ecossistemas brasileiros, com 212 gêneros e 2.729 espécies, e tem se destacado como elemento importante das comunidades vegetais (Bortoluzzi *et al.* 2004; Souza & Lorenzi 2005; Lima *et al.* 2013).

A família apresenta grande importância econômica e ecológica. Muitas de suas espécies são ricas em proteínas, sendo consideradas como fonte eficiente na dieta da população humana e animal. A madeira das espécies arbóreas é utilizada na construção civil e na confecção de mobílias, além do emprego de espécies na indústria farmacêutica (Polhill & Raven 1981; Lewis 1987; Lewis *et al.* 2005). Além disso, muitos de seus representantes são capazes de formar nódulos com bactérias fixadoras de nitrogênio e têm potencial para uso em sistemas agroflorestais, para reabilitação de áreas degradadas e para ajudar na manutenção da sustentabilidade dos solos (Herrera *et al.* 1993; Franco & Faria 1997).

Estudos taxonômicos e moleculares indicam a família como monofilética, pertencente à ordem Fabales, juntamente com Quillajaceae, Surianaceae e Polygalaceae (APG 2009; Figura 01). Leguminosae apresenta-se tradicionalmente dividida em três subfamílias - Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Faboideae) – sendo que a primeira é parafilética enquanto as duas últimas são monofiléticas (APG 2009; Figura 02).

Papilionoideae é a maior subfamília, com 28 tribos e cerca de 13.800 espécies (Lewis *et al.* 2005). Suas espécies apresentam uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde desertos secos e frios até florestas tropicais quentes e úmidas, além de exibir uma enorme variedade de hábitos (Polhill & Raven 1981; Lewis *et al.* 2005). Dalbergieae *s. l.* é uma das maiores tribos da subfamília, com 49 gêneros e aproximadas 1.325 espécies, e suas espécies estão amplamente distribuídas, principalmente nas regiões tropicais (Lavin *et al.* 2001; Lewis *et al.* 2005).

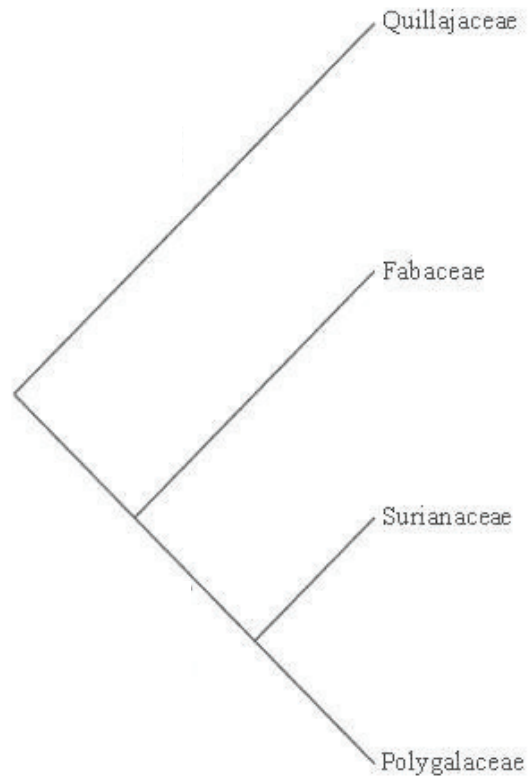


Figura 01. Cladograma representativo da ordem Fabales (adaptado de Angiosperm Phylogeny Website).

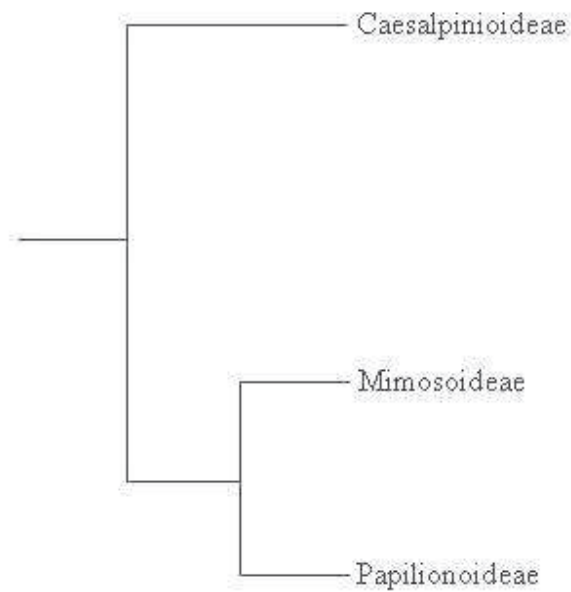


Figura 02. Cladograma representativo das subfamílias de Leguminosae.

Sistemática da tribo Dalbergieae *s. l.*

Apesar de Dalbergieae *s. l.* ser uma das maiores tribos de Papilionoideae, sua filogenia ainda não está bem definida, pois nos últimos anos a circunscrição da tribo vem sofrendo alterações radicais (Lewis *et al.* 2005; Cardoso *et al.* 2012a, b).

Polhill (1981) circunscreveu Dalbergieae *s. l.* com 19 gêneros de hábito lenhoso, com flores supostamente plesiomórficas, frutos com um ou poucos núcleos seminíferos especializados e indeiscentes e uma a poucas sementes com alcalóides. O autor dividiu os gêneros em dois grupos, um ao redor de *Andira* Lam., com *Hymenolobium* Benth., *Vatairea* Aubl., *Vataireopsis* Ducke, *Dalbergia* L.f. e *Machaerium* Pers., e outro ao redor de *Pterocarpus* Jacq., com os demais gêneros.

Lima (1990), em estudo morfológico de frutos e sementes, reforçou a existência de dois grupos dentro da tribo Dalbergieae *s. l.*, porém com modificações: um grupo formado por *Andira*, *Hymenolobium*, *Vatairea* e *Vataireopsis* e um segundo com os gêneros restantes. Mais recentemente, estudos com dados moleculares sugeriram que os gêneros do primeiro grupo não pertencem ao clado Dalbergioide (Lavin *et al.* 2001; Pennington *et al.* 2001; Wojciechowshy 2003; Wojciechowshy *et al.* 2004; Cardoso *et al.* 2012a, b), sendo considerados como grupos-irmão do clado Dalbergioide *s. str.* (Lavin *et al.* 2001). Entretanto, a fim de se evitar mudanças temporárias que levem a instabilidade nomenclatural, no tratamento de Klitgaard & Lavin (2005) esses gêneros permanecem incluídos em Dalbergieae *s. l.*, que foi tratado como grupo “formal”.

Os estudos de Lavin *et al.* (2001) a partir de marcadores moleculares confirmaram a monofilia para as “leguminosas dalbergióides”. O grupo Dalbergieae propriamente dito, ou clado Dalbergioide *s.l.*, compreende gêneros considerados em antigas tribos como: Adesmieae *sensu* Polhill (1981), Aeschynomeae *sensu* Rudd (1981) e Dalbergieae *sensu* Polhill (1981), além da subtribo *Bryinae* de Desmodieae *sensu* Ohashi *et al.* (1981) e do gênero *Diphysa* Jacq. de Robineae *sensu* Polhill & Sousa (1981). Recentemente, Cardoso *et al.* (2012a) acrescentaram três espécies de *Acosmium* Schott. *s.l.* no clado Dalbergioide *s.l.*.

Em síntese, a tribo Dalbergieae *s. l.* é constituída pelo clado Adesmia *s. str.* (seis gêneros), clado *Pterocarpus s. str.* (22 gêneros) e clado *Dalbergia s. str.* (17 gêneros), além de quatro gêneros isolados, *Vatairea*, *Vataireopsis*, *Hymenolobium* e *Andira* (Figura 03). No Brasil ocorrem 28 gêneros, em diferentes formações vegetacionais, onde diversos

gêneros apresentam seu centro de diversidade, como na Amazônia (*Andira*, *Dalbergia*, *Machaerium*, *Paramacherium* Ducke, *Vatairea*, *Vataireopsis*), na Restinga (*Cranocarpus* Benth.), no Cerrado (*Platymiscium* Vogel, *Riedeliella* Harms.) e no Chaco Sulmatogrossense (*Geoffroea* Jacq.).

Dentro de Dalbergieae *s. l.*, o clado *Dalbergia s. str.* é o maior, com 17 gêneros e aproximadamente 706 espécies. A maioria dos gêneros é encontrada no continente africano, porém *Diphysa* Jacq., *Pictetia* DC., *Soemmeringia* Mart. e *Weberbauerella* Ulbr. são gêneros neotropicais; *Machaerium* Pers. é transatlântico; *Aeschynomene* L. e *Dalbergia* L.f. são gêneros pantropicais e *Geissaspis* Wight & Arn. ocorre na Ásia (Klitgaard & Lavin 2005).

Dentre os gêneros do clado, *Aeschynomene* está dividido em dois ramos; *Aeschynomene* subg. *Ochopodium*, agrupado com *Dalbergia* e *Machaerium*, e *Aeschynomene* subg. *Aeschynomene*, com *Cyclocarpa* Afzelius ex Baker, *Soemmeringia* Mart., *Smithia* Ailton, *Kotschya* Endl., *Humularia* P.A. Duvign, *Bryaspis* P.A. Duvign e *Geissaspis* Wight & Arn. (Figura 04).

Ribeiro *et al.* (2007), a partir de estudos moleculares com os marcadores DNA de cloroplasto - intron trnL-F - e DNA nuclear – DNA ribossomal ITS/5.8S, confirmaram a subdivisão do gênero *Aeschynomene* em dois ramos. Apesar da maioria das árvores estar bem resolvidas, os autores sugerem novos estudos, especialmente em relação à *Aeschynomene* subg. *Ochopodium*, com possibilidade deste grupo se tornar um novo gênero. Neste sentido, dados adicionais são necessários para definir melhor as relações dentro da tribo Dalbergieae *s. l.* (Lavin *et al.* 2001; Pennington *et al.* 2001; Wojciechowshy *et al.* 2003; Wojciechowshy *et al.* 2004; Klitgaard & Lavin 2005), especialmente do clado *Dalbergia s. str.*. Dentre as possíveis abordagens, destacam-se os estudos citogenéticos.

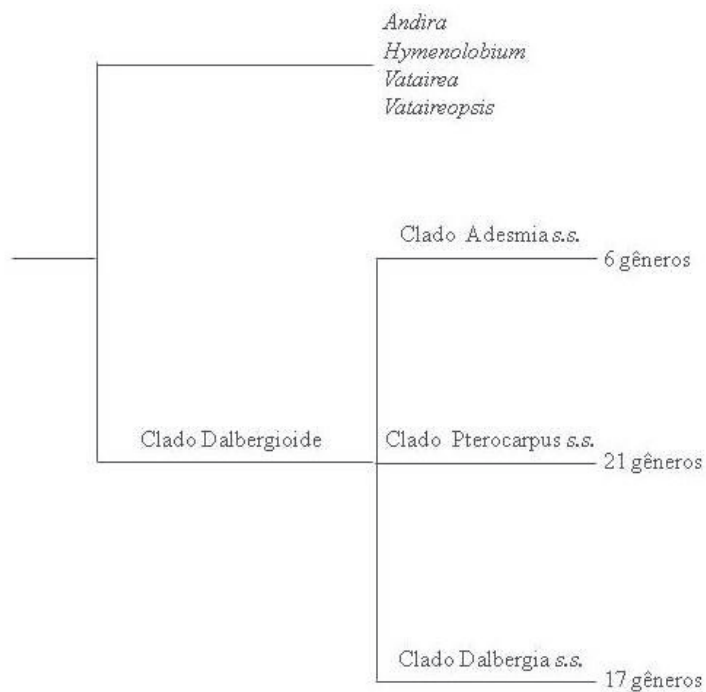


Figura 03. Cladograma representativo da Tribo Dalbergieae s. l. (adaptado de Klitgaard & Lavin 2005).

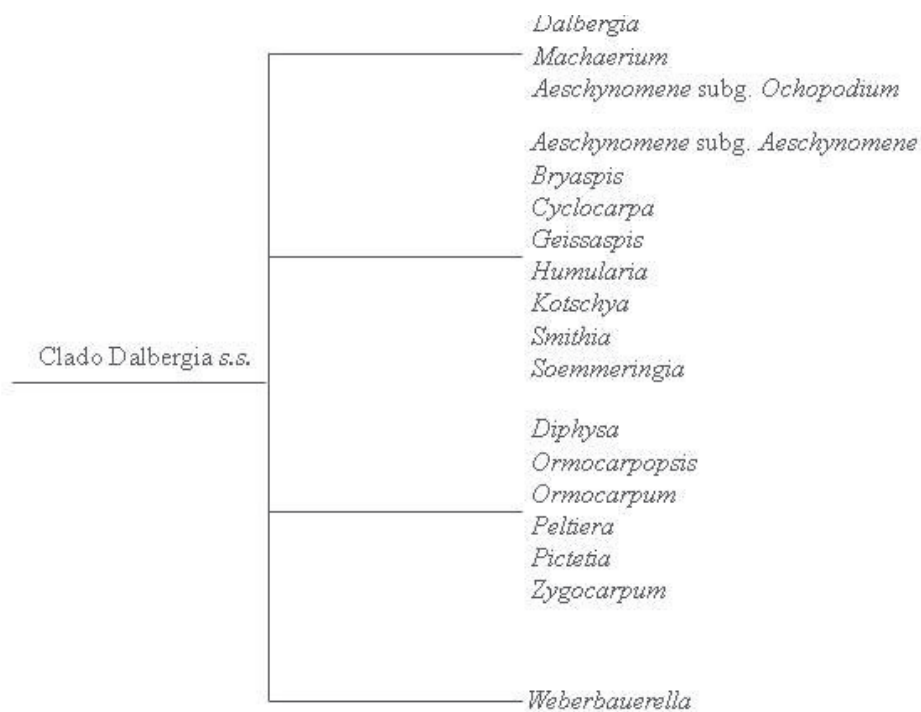


Figura 04. Cladograma representativo do clado Dalbergia s. str. (adaptado de Klitgaard & Lavin 2005).

Estudos citogenéticos: importância, técnicas desenvolvidas e aplicações

Estudos cromossômicos associados com a taxonomia de grupos de plantas, em diferentes níveis hierárquicos, podem indicar as relações evolutivas entre espécies e assim auxiliar na solução de problemas taxonômicos (Stebbins 1971; Levin 2002; Schubert & Lyzak 2011; Guerra 2012).

O número cromossômico é o parâmetro citotaxonômico mais amplamente empregado, sendo que diferenças neste caráter podem refletir diferenças entre unidades taxonômicas, permitindo separar espécies, principalmente se a diferenciação cromossômica acompanha as variações morfológicas e/ou moleculares (Guerra 2008). As análises de número cromossômico com técnicas de coloração convencional, normalmente são acompanhadas das análises de morfologia cromossômica, onde estão incluídos o tamanho relativo e/ou absoluto dos cromossomos, a posição do centrômero e a presença de constrições secundárias (Guerra 1988; Stace 1989; Guerra 2012).

Porém, há casos em que apenas o estudo do cariótipo com técnicas convencionais não é suficiente para elucidar as relações cromossômicas. Em relação à Leguminosae, suas espécies são conhecidas por apresentar, em sua maioria, cromossomos pequenos, com morfologia similar, tornando a diferenciação dos pares uma tarefa árdua. Neste sentido, a aplicação de técnicas de diferenciação longitudinal dos cromossomos, como bandamento cromossômico e hibridização de DNA *in situ* (FISH), amplia o número de marcas nos cromossomos, gerando resultados mais informativos. A aplicação dessas técnicas facilita uma melhor identificação cromossômica, demonstrando assim a base estrutural dos mecanismos envolvidos nas mudanças cromossômicas e, conseqüentemente, as relações evolutivas entre espécies (Pedrosa-Harand & Guerra 2004; Jiang & Gill 2006).

Dentre as técnicas de bandamento cromossômico, o bandamento CMA/DAPI destaca-se por ser de fácil aplicação, utilizando corantes fluorescentes na identificação das bandas heterocromáticas, qualificando-as de acordo com a sua composição de bases. Algumas regiões de heterocromatina, compostas de DNA repetitivo, frequentemente apresentam uma proporção de bases púricas (adenina/timina – A/T) ou pirimídicas (citosina/guanina – C/G) diferente do resto do genoma. Desta forma, os fluorocromos empregados – a cromomicina A₃ (CMA), que cora preferencialmente regiões ricas em GC e o 4-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), com preferência a regiões ricas em AT – revelam

um número variável de regiões brilhantes, ou positivas, com CMA (banda CMA⁺) ou com DAPI (banda DAPI⁺) (Schweizer 1976). Frequentemente, as bandas negativas (mais escuras que o restante do cromossomo) ocorrem na mesma posição das bandas positivas do fluorocromo complementar (Jacobs *et al.* 2000).

A técnica de FISH permite localizar sequências de DNA diretamente nos cromossomos, baseada na complementaridade de bases entre o DNA do cromossomo e da sonda (Guerra 2004; Figura 05). Assim, a técnica permite ampliar o número de marcadores passíveis de análise, via localização direta nos cromossomos.

As sondas mais utilizadas são as sequências correspondentes aos genes ribossomais (DNAr 45S e 5S), principalmente devido ao alto grau de conservação e tamanho de sítio, grande o suficiente para permitir a sua visualização. Contudo essas sequências, por serem altamente conservadas, apresentam variação apenas em número e/ou posição entre espécies relacionadas, não podendo caracterizar uma espécie/gênero. Desse modo, atualmente busca-se utilizar novas sequências de DNA na caracterização cromossômica, tais como as sequências de cópia simples, dentre elas as gênicas, e as sequências de DNA repetitivo, dentre os quais os microssatélites.

A principal barreira para a utilização de sequências de cópia simples estava na dificuldade de visualização do sinal, devido ao pequeno tamanho das sequências que estavam abaixo da sensibilidade limite da técnica. Porém, isso foi resolvido com a utilização de fluorocromos mais potentes e com a utilização de vetores, como os BACs (Cromossomos Artificiais de Bactérias), que suportam insertos maiores de DNA (Jackson *et al.* 1999).

As bibliotecas genômicas oferecem uma fonte inestimável de sequências de DNA, tanto de cópia simples como repetitivas, as quais podem ser utilizadas como sonda. A ampliação da quantidade de sondas passíveis de serem localizadas permite a integração de mapas gênicos e cromossômicos, como a comparação destes mapas integrados entre espécies e grupos. Os vetores BACs (Cromossomos Artificiais de Bactérias) são os mais amplamente utilizados e com eles já foram elaboradas bibliotecas para a maioria das plantas de interesse econômico como, por exemplo, *Solanum tuberosum* L. (Dong *et al.* 2000), *Oryza sativa* L. (Cheng *et al.* 2002), *Brassica oleraceae* L. (Howell *et al.* 2002), *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Islam-Farid *et al.* 2002), *Musa balbisiana* Colla (Safár *et al.*

2004) e *Gossypium barbadense* L. (Wang *et al.* 2006). As bibliotecas genômicas constituem uma fonte praticamente inesgotável de sondas cromossômicas, facilitando em muito a tarefa de caracterizar longitudinalmente os cromossomos, como já realizado em *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (Moraes *et al.* 2008) e nas leguminosas *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (Pedrosa *et al.* 2002) e *Phaseolus vulgaris* L. (Pedrosa-Harand *et al.* 2008, 2009; Fôñseca *et al.* 2010).

A maior parte do genoma é constituída de sequências repetitivas, que se distribuem de forma dispersa ao longo do genoma ou concentrada, formando blocos - as sequências em tandem. Essas sequências podem auxiliar na determinação das relações filogenéticas entre as espécies, uma vez que as mesmas são frequentemente espécie ou gênero-específicas (Hemleben 2007; Koukalova *et al.* 2010). Dentre as sequências repetitivas temos as de microsatélite (SSR), formadas por monômeros de 1 a 6 nucleotídeos e as de oligonucleotídeos, formadas por até 20 nucleotídeos. Tais sequências podem ser características de um gênero e até mesmo de uma espécie. Desta forma, as sequências mais conservadas, presentes em um grande número de espécies podem servir como indicação de proximidade/distância entre espécies e podem ser mapeadas diretamente nos cromossomos, como demonstrado em trigo e centeio (Cuadrado & Schwarzacher 1998; Cuadrado *et al.* 2000,), cevada (Cuadrado & Joive 2007), representantes de Triticeae (Cuadrado *et al.* 2008; Brasileiro-Vidal *et al.* 2005) e *Dendrobium* Sw. (Begum *et al.* 2009).

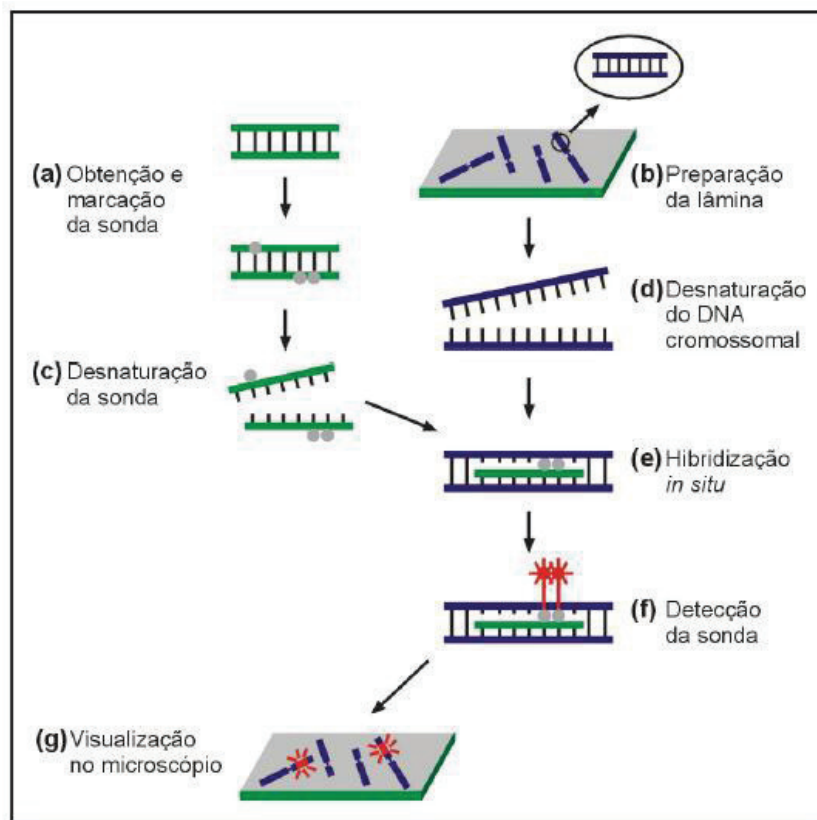


Figura 05. Principais etapas da técnica de hibridização *in situ* (FISH). A marcação da sonda **(a)** é feita independentemente da preparação da lâmina **(b)**. Em seguida, a sonda e o DNA cromossômico são desnaturados **(c, d)** e, quando colocados em contato, a sonda hibridiza *in situ* **(e)** com o DNA-alvo. A marcação da sonda pode ser detectada por anticorpos ligados a fluorocromos **(f)** e visualizada diferencialmente ao microscópio **(g)**. Reproduzido de Guerra 2004.

A citogenética em Leguminosae

Apesar do número considerável de trabalhos relacionados a contagens cromossômicas e análise de cariótipos de espécies de Leguminosae, esses dados não são suficientes para compor um panorama completo da evolução cromossômica da família. Dentre os estudos cromossômicos na família que se destacam está o realizado por Goldblatt (1981a, b), com leguminosas americanas, que sugeriu como número básico ancestral da família $x=7$. Bairiganjan & Patnaik (1989) analisaram 118 espécies de Leguminosae e propuseram o agrupamento dos gêneros a partir do número básico, além de definir $x=10$ como número básico de família. Poggio *et al.* (2008) efetuaram uma revisão de

dados cromossômicos de leguminosas americanas, demonstrando uma grande variação no número gamético, na morfologia cromossômica e no tamanho do genoma, relacionando essas variações a diversos eventos ocorrentes em Leguminosae, tais como poliploidia, disploidia, aneuploidia e hibridação.

Estudos cromossômicos utilizando marcadores moleculares em leguminosas são escassos, especialmente quando se considera a riqueza de espécies da família. No geral, técnicas de bandamento e FISH são utilizadas principalmente em espécies de interesse agrônomo ou econômico, como por exemplo: *Trifolium repens* L. (Ansari *et al.* 1999), *Phaseolus* L. (Moscone *et al.* 1999; Pedrosa-Harand *et al.* 2008, 2009; Fonsêca *et al.* 2010; Almeida & Pedrosa-Harand 2011), *Lupinus* L. (Naganowska & Zielinska 2002), *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (Ohmido *et al.* 2010) e *Vigna* Savi (Bortoleti 2012), sendo pouco empregadas para espécies selvagens (Souza & Benko-Iseppon 2004; Liu *et al.* 2006).

No Brasil muitos estudos cromossômicos merecem destaque, tais como os trabalhos realizados por Bandel (1974), que verificou o número cromossômico de 42 espécies da família. Também há estudos focando a citologia de Leguminosae de uma determinada região do Brasil, como os estados de São Paulo (Coleman & De Menezes 1980), Ceará (Alves & Custódio 1989) e Pará (Souza & Benko-Iseppon 2004).

Alguns estudos citotaxonômicos foram de suma importância para a resolução de problemas taxonômicos em leguminosas, como para os gêneros *Leucaena* Benth. (Cardoso *et al.* 2000), *Lupinus* L. (Maciel & Schifino-Wittman 2002), *Acosmium* Schott e *Leptolobium* Vogel (Rodrigues *et al.* 2009), assim como para os complexos *Cassia* L., *Senna* Mill. e *Chamaecrista* Moench (Biondo *et al.* 2005a) e *Camptosema* Hook. & Arn. e gêneros relacionados (Sede *et al.* 2006). Além destes trabalhos, um número considerável de estudos citotaxonômicos foi efetuado para leguminosas brasileiras (Tabela 01).

Trabalhos relacionados à citotaxonomia de Dalbergieae *s. l.* ainda são relativamente escassos. Apenas uma parte das espécies da tribo apresentam números cromossômicos relatados na literatura, os quais variam de $2n=18$ ($n=9$) em *Machaerium lunatum* (L.f.) Ducke (Gill & Husaini 1985; Husaini & Gill 1986) a $2n=80$ em *Aeschynomene afrapera* J. Léonard (Renard *et al.* 1983), sendo que a maioria apresenta $2n=20$. Considerando a flora brasileira, estudos para representantes da tribo foram efetuados em *Stylosanthes* Sw. (Vieira & Aguiar Perecin 1993); *Adesmia* DC. (Miotto & Forni-Martins 1994) e *Machaerium*

(Mendonça-Filho 2002). Estudos baseados em bandamento cromossômico e hibridização *in situ* foram realizados apenas para espécies de *Arachis* L. (Seijo *et al.* 2004; Seijo *et al.* 2007; Robledo & Seijo 2008; Silva *et al.* 2010).

Tabela 01. Alguns trabalhos citotaxonômicos realizados com espécies brasileiras de leguminosas

Subfamília	Gênero(s)	Autor(s)
Caesalpinioideae	<i>Senna</i> Mill.	Biondo <i>et al.</i> (2005b)
Caesalpinioideae	Diversos	Biondo <i>et al.</i> (2005c)
Caesalpinioideae	<i>Chamaecrista</i> Moench	Biondo <i>et al.</i> (2006a)
Caesalpinioideae	Diversos	Bortoluzzi <i>et al.</i> (2007)
Mimosoideae	<i>Leucaena</i> Benth.	Schifino-Wittmann (2004)
Mimosoideae	<i>Mimosa</i> L.	Dahmer <i>et al.</i> (2011)
Papilionoideae	<i>Phaseolus</i> L., <i>Vigna</i> Savi e <i>Macroptilium</i> (Benth.) Urb.	Forni-Martins & Cruz (1985) Forni-Martins (1989)
Papilionoideae	<i>Trifolium</i> L.	Schifino-Wittmann & Fernandes (1988)
Papilionoideae	<i>Sesbania</i> Scop.	Forni-Martins <i>et al.</i> (1994) Forni-Martins & Guerra (1999)
Papilionoideae	<i>Crotalaria</i> L.	Oliveira & Aguiar-Perecin (1999) Mondin (2003), Flores <i>et al.</i> (2006) Mondin <i>et al.</i> (2007)
Papilionoideae	<i>Dahlstedtia</i> Malme	Teixeira <i>et al.</i> (2002)
Papilionoideae	<i>Eriosema</i> (DC.) Desv. e <i>Rhynchosia</i> Lour.	Biondo & Battistin (2006b)
Papilionoideae	<i>Lupinus</i> L.	Camilo <i>et al.</i> (2006)
Papilionoideae	<i>Mucuna</i> Adans.	Agostini <i>et al.</i> (2009)

OBJETIVO GERAL

Esse estudo objetivou fornecer dados cromossômicos que poderão contribuir para o melhor entendimento taxonômico e evolutivo da tribo Dalbergieae *s. l.*, principalmente do clado Dalbergia *s. str.*

Objetivos específicos

- Investigar uma possível existência de um padrão cariotípico que possa ser usado como caráter taxonômico para apoiar ou não as recentes propostas sobre a circunscrição da tribo Dalbergieae;
- Averiguar o número básico e os principais eventos de evolução cromossômica operantes na tribo Dalbergieae;
- Aprofundar as análises cromossômicas, mediante a produção de novas sondas para a FISH, por meio de diferentes técnicas, visando selecionar tanto sequências repetitivas, quanto sequências de cópia simples.

ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE

Esta tese está organizada em quatro capítulos. O primeiro capítulo analisou a possível contribuição do número e da morfologia cromossômica como características taxonômicas nas propostas a respeito da circunscrição do clado *Dalbergia s. str.* e dos gêneros que o compõe. O segundo investigou os padrões cariotípicos de representantes de *Dalbergieae s. l.* a partir das técnicas de bandamento cromossômico e FISH com a finalidade de auxiliar no posicionamento das espécies dentro da tribo. O terceiro capítulo apresenta o desenvolvimento de uma biblioteca de microssatélites e encontra-se formatado de acordo com as normas do periódico *American Journal of Botany*. O último capítulo objetivou aprofundar as análises cromossômicas de *Dalbergieae s. l.* a partir de sondas provenientes de bibliotecas genômicas de BACs de *Phaseolus vulgaris* e de bibliotecas de microssatélites de *Aeschynomene falcata*.

APÊNDICE

Relação de gêneros e espécies estudadas

Neste estudo foram analisadas 32 amostras de 23 espécies pertencentes a seis gêneros distintos. As espécies foram coletadas em diferentes localidades, em formações vegetacionais variadas. Materiais testemunha foram depositados em vários herbários nacionais. Estas informações estão compiladas na Tabela 02. Para algumas espécies do estudo, características como hábito, flor e fruto estão apresentadas na Figura 07.

Tabela 01. Relação das espécies estudadas nesta tese, com os respectivos locais de coleta, formação vegetal e herbário.

Gênero	Espécie	Localidade	Vegetação	Herbário
<i>Aeschynomene</i> L. (subg. <i>Aeschynomene</i>)	<i>A. ciliata</i> Vogel	Porto Murтинho/MS	Chaco	CGMS
	<i>A. sensitiva</i> Sw.	Linhares/ES	Mata Atlântica	UEC
<i>Aeschynomene</i> L. (subg. <i>Ochopodium</i>)	<i>A. elaphroxylon</i> (Guil. & Perr.) Taub.	Rio de Janeiro/RJ	Mata Atlântica	JBRJ
	<i>A. falcata</i> (Poir.) DC	Porto Murтинho/MS	Chaco	CGMS
		Barreiras/BA	Cerrado	JBRJ
	<i>A. histrix</i> Poir.	Porto Murтинho/MS	Chaco	CGMS
		Bonito/MS	Cerrado/Floresta Estacional	CGMS
	<i>A. paniculata</i> Willd. ex Vogel	Itirapina/SP	Cerrado	UEC
		São Roque de Minas/MG	Cerrado	UEC
		Porto Murтинho/MS	Chaco	CGMS
<i>Dalbergia</i> L.f.	<i>Dalbergia</i> sp.	Feira de Santana/BA	Cerrado	JBRJ
	<i>D. cearensis</i> Ducke	Quexadá/CE	Caatinga	EAC
	<i>D. ecastaphyllum</i> (L.) Taub.	Florianópolis/SC	Restinga	UEC
	<i>D. frutescens</i> (Vell.) Britto	Águas de Lindóia/SP	Mata Atlântica	UEC
		São Roque de Minas/MG	Cerrado	UEC
	<i>D. miscolobium</i> Benth.	Diamantina/MG	Cerrado	HDJF
		São Roque de Minas/MG	Cerrado	UEC
	<i>D. nigra</i> (Vell.) Alemão ex Benth	Campinas/SP	Cerrado	UEC
		Linhares/ES	Mata Atlântica	CVRD
		Pinheiros/ES	Mata Atlântica	UEC
		Rio de Janeiro/RJ	Mata Atlântica	JBRJ
<i>Geoffroea</i> Jacq.	<i>G. striata</i> (Will.) Morong	Porto Murтинho/MS	Chaco	CGMS
<i>Machaerium</i> Pers.	<i>Machaerium</i> sp.	Jundiaí/SP	Mata Atlântica	UEC
	<i>M. acutifolium</i> Vogel	Porto Ferreira/SP	Cerrado	UEC
	<i>M. hirtum</i> (Vell.) Stellfeld	Campinas/SP	Cerrado	UEC
	<i>M. nyctitans</i> (Vell.) Benth.	Linhares/ES	Mata Atlântica	CVRD
	<i>M. oblongifolium</i> Vogel	Castilho/SP	Cerrado	CEUL
	<i>M. opacum</i> Vogel	Jundiaí/SP	Mata Atlântica	UEC
	<i>M. vestitum</i> Vogel	Campinas/SP	Cerrado	UEC
	<i>M. villosum</i> Vogel	Jundiaí/SP	Mata Atlântica	UEC
<i>Stylosanthes</i> Sw.	<i>S. hamata</i> (L.) Taub.	Porto Murтинho/MS	Chaco	CGMS
<i>Zornia</i> J.F. Gmel.	<i>Z. reticulata</i> Sm.	Porto Murтинho/MS	Chaco	CGMS

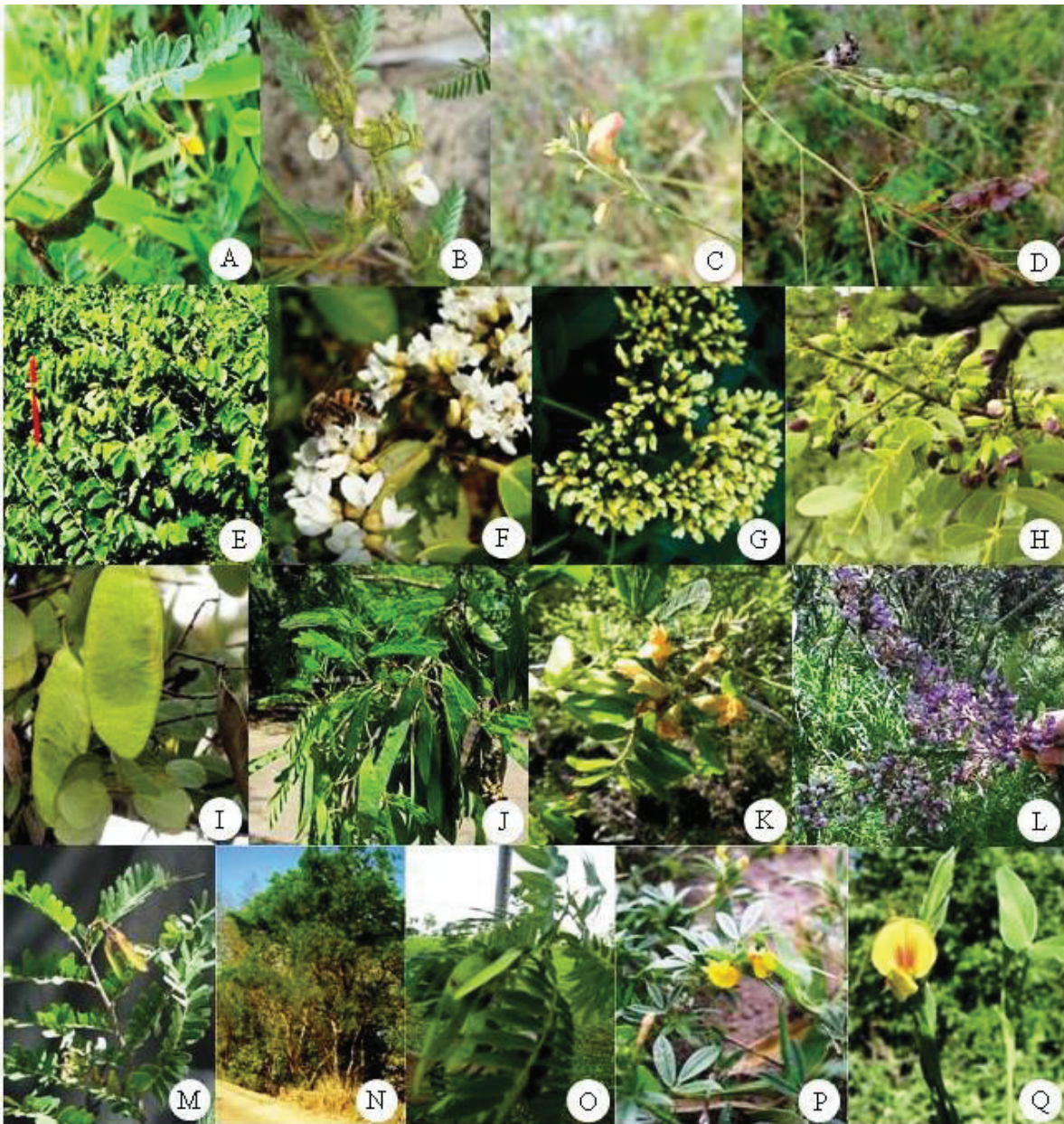


Figura 01. Representantes da tribo Dalbergieae s. l.: **A.** *Aeschynomene falcata* (Poir.) DC. (RT Queiroz); **B.** *A. histrix* Poir. (WL Silva e Silva); **C.D.** *A. paniculata* Willd. ex Vogel: **C.** flor (RT Queiroz) e **D.** fruto (RT Queiroz); **E.F.** *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. **E.** hábito (PZ Souza) e **F.** flor (PZ Souza); **G.** *D. frutescens* (Vell.) Britto (PPA Ferreira); **H.I.** *D. miscolobium* Benth. **H.** flor (GH Shimizu) e **I.** fruto (RT Queros); **J.** *D. nigra* (Vell.) Alemão ex Benth. (CA Polido); **K.** *Geoffroea striata* (Will.) Morong (MV Martins); **L.M.N.** *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld: **L.** flor (CA Polido), **M.** fruto (MV Martins) e **N.** hábito (CA Polido); **O.** *M. villosum* Vogel (CA Polido); **P.** *Stylosanthes hamata* (RB Pinto); **Q.** *Zornia reticulata* Sm. (EP Seleme).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, C & Pedrosa-Harand, A. 2011. Contrasting rDNA evolution in Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) and Common Bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). **Cytogenetic and Genome Research** **132**: 212–217.
- Agostini, K; Forni-Martins, ER; Tozzi, AMGA & Sazima, M. 2009. Microsporogenesis and pollen morphology of *Mucuna japura* and *M. urens* (Leguminosae – Faboideae - Phaseoleae). **Phytomorphology** **59**: 69-77.
- Alves, MAO & Custódio, AVC. 1989. Citogenética de leguminosas coletadas no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Genética** **12**: 81-92.
- Ansari, HA; Ellison, NW; Reader, SM; Badaeva, ED; Friebe, B; Miller, TE & Williams, M. 1999. Molecular cytogenetic organization of 5S and 18S-26S rDNA loci in White Clover (*Trifolium repens* L.) and related species. **Annals of Botany** **83**: 199-206.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society** **161**: 105-121.
- Bairiganjan, GC & Patnaik, SN. 1989. Chromosomal evolution in Fabaceae. **Cytologia** **54**: 51-64.
- Bandel, G. 1974. Chromosome numbers and evolution in the Leguminosae. **Caryologia** **27**: 17-32.
- Begum, R; Alam, SS; Menzel, G & Schmidt, T. 2009. Comparative molecular cytogenetics of major repetitive sequence families of three *Dendrobium* (Orchidaceae) from Bangladesh. **Annals of Botany** **104**: 863-872.
- Biondo, E; Miotto, STS & Schifino-wittmann, MT. 2006a. Cytogenetics of species of *Chamaecrista* Moench. (Leguminosae – Caesalpinioideae) native to Southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** **150**: 429-439.
- Biondo, E & Battistin, A. 2006b. Número e morfologia de cromossomos de espécies do gênero *Eriosema* (DC.) G. Don. e *Rhynchosia* Lour. (Leguminosae) nativas da região sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha** **12**: 19-27.
- Biondo, E; Miotto, STS; Schifino-wittmann, MT & Castro, B. 2005a. Cytogenetics and citotaxonomy of brasilian species of *Senna* Mill. (Cassieae-Caesalpinieae-Leguminosae). **Caryologia** **58**(2): 152-163.
- Biondo, E; Miotto, STS & Schifino-Wittmann, MT. 2005b. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** **28**(4): 797-808.
- Biondo, E; Miotto, STS & Schifino-wittmann, MT. 2005c. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae – Leguminosae do sul do Brasil. **Ciência Floresta** **15**(3): 241-248.

- Bolkhoviskikh, Z; Grif, V; Matvejeva, T & Zakharyeva, HV. 1969. **Chromosome Number of Flowering Plants**. V.L. Komarov Botanical Institute. Academy of Sciences of the USSR, Moscou. 926p.
- Bortoleti, KC; Benko-Iseppon, AM; Melo, NF & Brasileiro-Vidal, AC. 2012. Chromatin differentiation between *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek na *V. unguiculata* (L.) Walp. Fabaceae. **Plant Systematics na Evolution 298**: 689-693.
- Bortoluzzi, RLC; Biondo, E; Miotto, STS & Schifino-Wittmann, MT. 2007. Abordagens taxonômicas e citogenéticas em Leguminosae-Caesalpinioideae na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências 5**: 339-341.
- Bortoluzzi, RLC; Carvalho-Okano, RM; Garcia, FCP & Tozzi, AMGA. 2004. Leguminosae, Papilionoideae no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. II: árvores e arbustos Eecandentes. **Acta Botanica Brasilica 18**(1): 49-71.
- Brasileiro-Vidal, AC; Cuadrado, A; Brammer, SP; Benko-Iseppon, AM & Guerra, M. 2005. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*. **Genetics and Molecular Biology 28**: 308-313.
- Camilo, MF; Pozzobon, MT & Schifino-Wittmann, MT. 2006. Chromosome numbers in South American Andean species of *Lupinus* (Leguminosae). **Bonplandia 15**(4): 113-119.
- Cardoso, D; Lima, HC; Rodrigues, RS; Queiroz, LP; Pennington, RT; Lavin, M. 2012a. The realignment of *Acosmium* sensu strict with the Dalbergioid clade (Leguminosae: Papilionoideae) reveals a proneness for independent evolution of radial floral symmetry among early-branching papilionoid legumes. **Taxon 61**(5): 1057-1073.
- Cardoso, D.; Queiroz, LP; Pennington, RT; Lima, HC; Fonty, E; Wojciechowski, MF and Lavin, M. 2012b. Revisiting the phylogeny of Papilionoid legumes: new insights from comprehensively sampled early-branching lineages. **American Journal of Botany 99**(12): 1991-2013.
- Cardoso, MB; Schifino-Wittmann, MT & Bonanes-Zanettini, MH. 2000. Taxonomic and evolutionary implications of intraspecific variability in chromosome numbers of species of *Leucaena* Benth. (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society 134**: 549-556.
- Cheng, Z; Presting, GG; Buell, CR; Wing, A & Jiang, J. 2001. High-resolution pachytene chromosome mapping of Bacterial Artificial Chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. **Genetics 157**: 1749-1757.
- Coleman, JR & De Menezes, EM. 1980. Chromosome number in the Leguminosae from the state of São Paulo, Brazil. **Rhodora 82**: 475-481.

- Cuadrado, A; Cardoso, M & Jouve, N. 2008. Physical organisation of simple sequence repeats (SSRs) in Triticeae: structural, functional and evolutionary implications. **Cytogenetic Genome Research** **120**: 210-219.
- Cuadrado, A & Jouve, N. 2007. The nonrandom distribution of long clusters of all possible classes of trinucleotide repeats in barley chromosomes. **Chromosome Research** **15**: 711-720.
- Cuadrado, A; Schwarzacher, T & Jouve, N. 2000. Identification of different chromatin classes in wheat using *in situ* hybridization with simple sequence repeat oligonucleotides. **Theoretical Applied Genetic** **101**: 711-717.
- Cuadrado, A & Schwarzacher, T. 1998. The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. **Chromosoma** **107**: 587-594.
- Dahmer, N; Simon, MF; Schifino-Wittmann, MT; Hughesm, CE; Miotto, STS & Giuliani, JC. 2011. Chromosome numbers in the genus *Mimosa* L.: cytotaxonomic and evolutionary implications. **Plant Systematics Evolution** **291**: 211-220.
- Dong, F; Song, J; Naess, SK; Helgeson, JP; Gebhardt, C & Jiang, J. 2000. Development and application of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in Potato. **Theoretical and Applied Genetics** **101**: 1001-1007.
- Flores, AS; Corrêa, AM; Forni-Martins, ER & Tozzi, AMGA. 2006. Chromosome number in brazilian species of *Crotalaria* (Leguminosae, Papilionoideae) and their taxonomic significance. **Botanical Journal of the Linnean Society** **151**: 271-277.
- Fonsêca, A; Ferreira, J; Santos, TRB; Mosiolek, M; Bellucci, E; Kami, J; Gepts, P; Geffroy, V; Schweizer, D; Santos, Karla GB & Pedrosa-Harand, A. 2010. Cytogenetic map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Chromosome Research** **18**(4): 487-502.
- Forni-Martins, ER & Guerra, M. 1999. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. species (Fabaceae). **Caryologia** **52**(1-2): 97-103.
- Forni-Martins, ER; Franchi-Tanibata, M & Cardelli-de-Lucena, MA. 1994. Karyotypes of species of *Sesbania* Scop. (Fabaceae). **Cytologia** **59**: 479-482.
- Forni-Martins, ER. 1989. **Cariótipo e sua análise numérica como subsídio a estudos taxonômicos e evolutivos de *Phaseolus* L., *Vigna* Savì e *Macroptilium* (Bentham) Urban (Leguminosae Papilionoideae)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 146p.
- Forni-Martins, ER & Cruz, ND. 1985. Estudos citotaxonômicos no complexo *Phaseolus-Vigna-Macroptilium* (Leguminosae Papilionoideae). In: Aguiar-Perecin, MLR; Martins, P. & Bandel, G. (eds). 1985. **Tópicos de Citogenética e Evolução de Plantas**. I Colóquio de Citogenética e Evolução de Plantas, Piracicaba, janeiro de 1984. Ribeirão Preto, SP, Sociedade Brasileira de Genética. p. 155-172.

- Franco, AA & Faria, SM. 1997. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry** **29**(5/6): 897-903.
- Gill, LS & Husaini, SWH. 1985. Cytology of some arborescent Papilionoideae (Leguminosae) of southern Nigeria. **Boletim da Sociedade Broteriana** **58**(2): 187-200.
- Goldblatt, P. 1981a. Cytology and the phylogeny of Leguminosae. In: Polhill, RM & Raven, PH (ed.). 1981. **Advances in Legume Systematics**. Part 2. Kew, Royal Botanic Gardens. p. 427-463.
- Goldblatt, P. 1981b. Chromosome numbers in Legumes II. 1981. **Annal Missouri Botanic Garden** **68**: 551-557.
- Guerra, M. 2012. Cytotaxonomy: the end of childhood. **Plant Biosystems** **146**(3): 703-710.
- Guerra, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research** **120**: 339-350.
- Guerra, M. 2004. Hibridização *in situ*: Princípios Básicos. In: **FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. p.01 - 32.
- Guerra, M. 1988. **Introdução à Citogenética Geral**. Editora Guanabara. 142p.
- Hemleben, V; Kovarik, A; Torres-Ruiz, RA; Volkov, RA & Beridze, T. 2007. Plant highly repeated satellite DNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. **Systematic Biodiversity** **5**: 277-289.
- Herrera, MA; Salamanca, CP & Barea, JM. 1993. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover Desertified Mediterranean Ecosystems. **Applied Environmental Microbiology** **59**(1): 129-133.
- Howell, EC; Barker, GC; Jones, GH; Kearsey, MJ; King, GJ; Kop, EP; Ryder, CD; Teakle, GR; Vicente, JG & Armstrong, SJ. 2002. Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of *Brassica oleracea*. **Genetics** **161**: 1225-1234.
- Husaini, SWH & Gill, LS. 1986. Cytology of the tribe Dalbergieae (Leguminosae) from Nigeria. **Fedd. Rep.** **97**: 469-473.
- Islam-Faridi, MN; Childs, KL; Klein, PE; Hodnett, G; Menz, MA; Klein, RR; Rooney, WL; Mullet, JE; Stelly, DM & Price, HJ. (2002) A molecular cytogenetic map of Sorghum chromosome: 1. Fluorescence *in situ* Hybridization analysis with mapped Bacterial Artificial Chromosomes. **Genetics** **161**:345–353.

- Jackson, SA; Dong, F & Jiang, J. 1999. Digital mapping of bacterial artificial chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. **The Plant Journal** **17**: 581-587.
- Jacobs, MD; Gardner, RC & Murray, BG. 2000. Cytological characterization of heterochromatin and rDNA in *Pinus radiata* and *P. taeda*. **Plant Systematic Evolution** **223**: 71-79.
- Jiang J & Gill BS. 2006. Current status and the future of Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) in plant genome research. **Genome** **49**: 1057-1068.
- Klitgaard, BB & Lavin, M. 2005. Dalbergieae *sensu lato*. In: Lewis, GP; Schire, B; Mackinder, B & Lock, M. 2005. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew. p.309-335.
- Koukalova, B; Moraes, AP; Renny-Byfield, S; Matyasek, R; Leitch, AR & Kovarik, A. 2010. Fall and rise of satellite repeats in allopolyploids of *Nicotiana* over *c.* 5 million years. **New Phytologist** **186**: 148-160.
- Lavin, M; Pennington, RT; Klitgaard, BB; Sprent, JI; Lima, HC & Gasson, PE. 2001. The Dalbergioid Legumes (Fabaceae) delimitation of a pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany** **88**(3): 503-533.
- Levin, DA. 2002. **The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution**. Oxford University Press. 230p.
- Lewis, GP; Schire, B; Mackinder, B & Lock, M. 2005. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew. 577p.
- Lewis, GP. 1987. **Legumes of Bahia**. Royal Botanic Gardens, Kew. 369p.
- Lima, H.C. de; Queiroz, L.P.; Morim, M.P.; Souza, V.C.; Dutra, V.F.; Bortoluzzi, R.L.C.; Iganci, J.R.V.; Fortunato, R.H.; Vaz, A.M.S.F.; Souza, E.R. de; Filardi, F.L.R.; Valls, J.F.M.; Garcia, F.C.P.; Fernandes, J.M.; Martins-da-Silva, R.C.V.; Perez, A.P.F.; Mansano, V.F.; Miotto, S.T.S.; Tozzi, A.M.G.A.; Meireles, J.E.; Lima, L.C.P. ; Oliveira, M.L.A.A.; Flores, A.S.; Torke, B.M.; Pinto, R.B.; Lewis, G.P.; Barros, M.J.F.; Schütz, R.; Pennington, T.; Klitgaard, B.B.; Rando, J.G.; Scalon, V.R.; Cardoso, D.B.O.S.; Costa, L.C. da; Silva, M.J. da; Moura, T.M.; Barros, L.A.V. de; Silva, M.C.R.; Queiroz, R.T.; Sartori, A.L.B.; Camargo, R.; Lima, I.B. 2013. *Fabaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>)
- Lima, HC. 1990. Tribo Dalbergieae (Leguminosae-Papilionoideae) – Morfologia dos frutos, sementes e plântulas e sua aplicação na sistemática. **Archivos Jardim Botânico do Rio de Janeiro** **30**: 1-42.

- Liu, B; Chen, C; Li, X; Qi, L & Han, S. 2006. Karyotype analysis and physical mapping of 45S rDNA in eight species of *Sophora*, *Robinia*, and *Amorpha*. **Frontiers of Biology in China** **3**: 290–294.
- Maciel, HS & Schifino-Wittmann, MT. 2002. First chromosome number determinations in South-Eastern South American species of *Lupinus* L. (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **139**: 395-400.
- Mendonça-Filho, CV; Forni-Martins, ER & Tozzi, AMGA. 2002. New chromosome counts in neotropical *Machaerium* Pers. species (Fabaceae) and their taxonomic significance. **Caryologia** **55**: 111–114.
- Miotto, STS & Forni-Martins, ER. 1994. Número cromossômico em espécies brasileiras de *Adesmia* DC. (Leguminosae-Faboideae). **Acta Botanica Brasilica** **8**(1): 3-9.
- Mondin, M; Serejo, JAS & Aguiar-Perecin, MLR. 2007. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. **Genetics and Molecular Biology** **30**: 65-72.
- Mondin, M. 2003. **Estudo da evolução cariotípica do gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae) com o emprego de técnicas de Bandamento Cromossômico e Hibridação in situ Fluorescente (FISH)**. Tese de Doutorado. Piracicaba. ESALQ, Universidade de São Paulo. 107p.
- Moraes, AP; Soares-Filho, WS & Guerra, M. 2007. Karyotype diversity and the origin of Grapefruit. **Chromosome Research** **15**: 115-121.
- Moscone, EA; Klein, F; Lambrou, M; Fuchs, J & Schweizer, D. 1999. Quantitative karyotyping and dual color FISH mapping of 5S and 18S 25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). **Genome** **42**: 1224-1233.
- Naganowska, B & Zielinska, A. 2002. Physical mapping of 18S-25S rDNA and 5S rDNA in *Lupinus* via Fluorescent *in situ* Hybridization. **Cellular and Molecular Biology Letters** **7**: 665-670.
- Ohmido, N; Ishimaru, A; Kato, S; Sato, S; Tabata, S & Fukui, K. 2010. Integration of cytogenetic and genetic linkage maps of *Lotus japonicus*, a model plant for legumes. **Chromosome Research** **18**: 287–299.
- Oliveira, ALPC. & Aguiar-Perecin, MLR. 1999. Karyotype evolution in the genus *Crotalaria* L. **Cytologia** **64**: 164-174.
- Pedrosa-Harand, A; Kami, J; Gepts, P; Geffroy, V & Schweizer, D. 2009. Cytogenetic mapping of Common Bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. **Chromosome Research** **17**: 405-417.
- Pedrosa-Harand, A; Porch, T & Gepts, P. 2008. Standard nomenclature for Common Bean chromosomes and linkage groups. **Annual Report of the Bean Improvement**

Cooperative 51: 106-107.

- Pedrosa-Harand, A & Guerra, M. 2004. Contribuições da FISH para a citogenética de plantas. In: **FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. p.33 -59.
- Pedrosa, A; Sandal, N; Stougaard, J; Schweizer, D & Bachmair, A. 2002. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. **Genetics** **161**(4): 1661-1672.
- Pennington, RT; Lavin, M; Ireland, H; Klitgaard, BB; Preston, J & Hu, JM. 2001. Phylogenetic relationships of basal Papilionoid legumes based upon sequences of the chloroplast *trnL* Intron. **Systematic Botany** **26**(3): 537-556.
- Poggio, L; Espert, SM & Fortunato, RH. 2008. Citogenética evolutiva en leguminosas americanas. **Rodriguesia** **59**: 423-433.
- Polhill, RM. 1981. Dalbergieae. In: Polhill, RM & Raven, PH. 1981. **Advances in Legume Systematics**. Royal Botanic Gardens, Kew. Part I. xvi. 425p.
- Polhill, RM & Raven, PH. 1981. **Advances in Legume Systematics**. Royal Botanic Gardens, Kew. Part I. xvi. 425p.
- Renard, R; Lambinon, J; Reekmans, M; Veken, PV & Govaert M. 1983. Nombres chromosomiques de quelques Angiospermes du Rwanda, du Burundi et du Kenya. **Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique** **53**: 342–371.
- Ribeiro, RA; Lavin, M; Lemos-Filho, JP; Mendonça-Filho, CV; Santos, FR & Lovato, MB. 2007. The genus *Machaerium* (Leguminosae) is more closely related to *Aeschynomene* sect. *Ochopodium* than to *Dalbergia*: inferences from combined sequence data. **Systematic Botany** **32**(4): 762-771.
- Robledo G & Seijo G. 2008. Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. **Genetics and Molecular Biology** **31**: 717-724.
- Rodrigues, RS Corrêa, AM; Forni-Martins, ER & Tozzi, AMGA. 2009. Números cromossômicos em espécies de *Acosmium* Schott e *Leptolobium* Vogel (Leguminosae, Papilionoideae). **Acta Botanica Brasilica** **23**(3): 902-906.
- Safár, J; Noa-Carrazana, JC; Vrána, J; Bartons, J; Alkhimova, O; Sabau, X; Simková, H; Lheureux, F; Caruana, ML; Dole, J & Piffanelli, P. 2004. Creation of a BAC resource to study the structure and evolution of the Banana (*Musa balbisiana*). **Genome** **47**: 1182–1191.
- Schifino-Wittmann, MT & Fernandes, MIB. 1988. Chromosome numbers, karyotypes and meiotic behavior of population of some *Trifolium* (Leguminosae) species. **Brazilian Journal of Genetics** **11**: 379-390.

- Schifino-Wittmann, MT. 2004. Citogenética do gênero *Leucaena* Benth. **Ciência Rural** **34**(3): 3009-314.
- Schubert, I & Lysak, MA. 2011. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. **Trends in Genetics** **27**: 207-216.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and dapi. **Chromosoma** **58**: 307-324.
- Sede, SM; Fortunato, RH & Poggio, L. 2006. Chromosome evaluation of Southern South American species of *Camptosema* and allied genera (Diocleinae – Phaseoleae – Papilionoideae – Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **152**: 235-243.
- Seijo, G; Lavia, GI; Fernandez, A; Krapovickas, A; Ducasse, DA; Bertioli, DJ & Moscone, EA. 2007. Genomic relationships between the cultivated Peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. **American Journal of Botany** **94**(12): 1963–1971.
- Seijo, JG; Lavia, GI; Fernández, A; Krapovickas, A; Ducasse, D & Moscone, EA. 2004. Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany** **91**: 1294-1303.
- Silva, SC; Martins, MIG; Santos, RC; Peñaloza, APS; Melo-Filho, PA; Benko-Iseppon, AM; Valls, JFM & Carvalho, R. 2010. Karyological features and banding patterns in *Arachis* species belonging to the *Heteranthae* section. **Plant Systematics and Evolution** **285**(3-4): 201-207.
- Souza, MGC & Benko-Iseppon, AM. 2004. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionoideae species of Pará, Amazonas, Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** **144**: 181–191.
- Souza, VC & Lorenzi, H. 2005. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 640p.
- Stace, CA. 1989. **Plant Taxonomy and Biosystematics**. 2 edition. Cambridge University Press, New York. 264p.
- Stebbins, GL. 1971. **Chromosomal Evolution in Higher Plants**. Reading: Addison-Wesley. 216p.
- Teixeira, SP; Forni-Martins, ER & Ranga, NT. 2002. Cytological and developmental studies of pollen grain in *Dahlstedtia pinnata* and *D. pentaphylla* (Leguminosae Papilionoideae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **138**: 461-471.

- Vieira, MLC & Aguiar-Perecin, MLR. 1993. A cytotaxonomic study in twelve Brazilian taxa of *Stylosanthes Sw.*, Leguminosae. **Cytologia** **58**: 305-311.
- Wang, XF; Ma, J; Wang, WS; Zheng, YM; Zhang, GY; Liu, CJ & Ma ZY. 2006. Construction and characterization of the first Bacterial Artificial Chromosome library for the Cotton species *Gossypium barbadense L.* **Genome** **49**(11):1393-8.
- Wojciechowski MF; Lavin M & Sanderson MJ. 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the Family. **American Journal of Botany** **91**: 1845–1861.
- Wojciechowski MF. 2003. Reconstructing the phylogeny of Legumes (Leguminosae): an Early 21st Century Perspective. In: Klitgaard BB, Bruneau A, eds. **Advances in Legume Systematics** **10**. Royal Botanical Gardens, Kew. 5-35.

CAPÍTULO 1

Implicações evolutivas dos números cromossômicos e da morfologia cariotípica no clado *Dalbergia s. str.* (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae)

RESUMO - Dalbergieae *s. l.* é uma das tribos mais representativas de Leguminosae, no entanto, sua circunscrição vem sendo drasticamente alterada e ainda não está bem resolvida. O clado Dalbergia *s. str.* é o maior da tribo, com 17 gêneros e aproximadamente 706 espécies, apresentando alguns complexos taxonômicos. Estudos citotaxonômicos podem auxiliar no esclarecimento de problemas taxonômicos, porém, até o momento foram negligenciados para representantes do clado Dalbergia *s. str.* Desse modo, este estudo teve como objetivo averiguar uma possível contribuição do número cromossômico na elucidação de problemas taxonômicos do clado em questão. Para isso, foram efetuadas contagens cromossômicas e análise morfológica de 20 espécies dos gêneros *Aeschynomene* L., *Dalbergia* L.f. e *Machaerium* Pers. em conjunto com levantamentos bibliográficos de estudos cromossômicos de representantes do clado Dalbergia *s. str.* Para quatro espécies, a contagem cromossômica foi efetuada pela primeira vez e para outras cinco, as contagens discordaram de dados já publicados. Ao total, são conhecidos os números cromossômicos para 72 espécies de oito gêneros do clado Dalbergia *s. str.*, sendo $2n=20$ o mais frequente, ocorrendo em 55 espécies. A ocorrência de poliploides múltiplos de $n=10$ foi observada em oito espécies, enquanto números cromossômicos não múltiplos de 10 foram notados em 18 espécies. Observou-se uma variação gradual entre o tamanho dos cromossomos dentro de cada espécie, o que refletiu na variação do tamanho do complemento cromossômico (CTC), notando-se diferenças significativas entre o CTC dos dois citótipos de *A. elaphroxylum*. Foram observados cromossomos acrocêntricos em cinco espécies de *Aeschynomene* e um par de cromossomos com satélites foi observado em *A. falcata*, *Dalbergia ecastaphyllum*, *D. miscolobium* e *Machaerium vestitum*. O número básico sugerido para o clado Dalbergia *s. str.* é $x=10$, assim como para Dalbergieae *s. l.*, porém se observa uma variação desse número tanto no clado quanto na tribo, provavelmente relacionado a eventos de poliploidia e aneuploidia, como observado no clado Dalbergia *s. str.* Para *Aeschynomene*, devido à variação do número cromossômico entre as espécies, esse caráter não sustenta a divisão do gênero em dois grupos. Sugere-se uma revisão do posicionamento dos gêneros *Diphysa* Jacq., *Kotschy* Endl., *Ormocarpum* P. Beauv. e *Smithia* Ailton dentro da tribo, uma vez que a partir dos números cromossômicos aqui analisados, tais gêneros diferem de forma significativa dos demais que compõem Dalbergieae *s. l.*

Palavras-chave: Fabaceae, citotaxonomia, citótipos, aneuploidia, poliploidia

Introdução

Dalbergieae *s. l.* é uma das tribos mais representativa de Leguminosae, com 49 gêneros e aproximadamente 1.325 espécies. Porém sua circunscrição não está bem definida, uma vez que vem sendo radicalmente alterada nos últimos anos. Segundo a classificação de Klitgaard & Lavin (2005), a tribo Dalbergieae propriamente dita (ou clado Dalbergioide) compreende gêneros retirados de outras tribos, organizados agora nos clados Adesmia *s. str.* (seis gêneros), Pterocarpus *s. str.* (21 gêneros) e Dalbergia *s. str.* (17 gêneros), além de quatro gêneros isolados (*Andira* Lam., *Hymenolobium* Benth., *Vatairea* Aubl. e *Vataireopsis* Ducke).

Dalbergia *s. str.*, o maior clado da tribo, é formado pelo agrupamento de 17 gêneros e cerca de 706 espécies e também não apresenta relações filogenéticas definidas. Nesse clado está inserido o gênero *Aeschynomene* L. separado em dois ramos, *Aeschynomene* subgen. *Ochopodium*, agrupado com *Dalbergia* L.f. e *Machaerium* Pers., e *Aeschynomene* subgen. *Aeschynomene*, com *Bryaspis* P.A. Duvign, *Cyclocarpa* Afzelius ex Baker, *Geissaspis* Wight & Arn., *Humularia* P.A. Duvign, *Kotschya* Endl., *Soemmeringia* Mart. e *Smithia* Aiton. Estudos realizados por Ribeiro *et al.* (2007), baseados em marcadores DNA de cloroplasto e DNA ribossomal, sugerem que *Aeschynomene* subgen. *Ochopodium* possa vir a se tornar outro gênero.

Análises cromossômicas associadas com a taxonomia, a citotaxonomia, têm auxiliado na organização da diversidade biológica em diferentes níveis hierárquicos, refletindo as relações evolutivas e auxiliando na resolução de problemas taxonômicos, porém levando em consideração o dinamismo na evolução dos caracteres cromossômicos (Stebbins 1971; Levin 2002; Schubert & Lyzak 2011; Guerra 2012). Segundo Guerra (2008), o número cromossômico constitui um dos parâmetros citotaxonômicos mais amplamente empregados e facilmente obtido dentre os padrões utilizados nas análises cromossômicas, permitindo separar espécies, principalmente se a diferença cromossômica acompanha as variações morfológicas e/ou moleculares.

A utilização de estudos citotaxonômicos foi importante na resolução de alguns complexos em Leguminosae, como para os gêneros *Leucaena* Benth. (Cardoso *et al.* 2000), *Lupinus* L. (Maciel & Schifino-Wittman 2002), *Machaerium* Per. (Mendonça-Filho *et al.* 2002), *Acosmium* Schott e *Leptolobium* Vogel (Rodrigues *et al.* 2009), assim como para os

complexos *Cassia* L., *Senna* Mill. e *Chamaecrista* Moench (Biondo *et al.* 2005) e *Camptosema* Hook. & Arn. e gêneros relacionados (Sede *et al.* 2006).

Em relação ao clado *Dalbergia s. str.*, estudos cromossômicos ainda são pouco frequentes, principalmente se comparados ao grande número de espécies compreendidas dentro do clado. Apenas uma pequena parte das espécies tem seus números cromossômicos relatados na literatura, variando de $2n=18$ ($n=9$) em *Machaerium lunatum* (L.f.) Ducke (Gill & Husaini 1985; Husaini & Gill 1986) a $2n=80$ em *Aeschynomene afrapera* J. Léonard (Renard *et al.* 1983). No estudo realizado por Mendonça-Filho *et al.* (2002) duas espécies de *Machaerium* taxonomicamente semelhantes e frequentemente confundidas foram mantidas separadas devido a diferença dos seus números cromossômicos: $2n=20$ para *M. aculeatum* Raddi e $2n=40$ para *M. hirtum* (Vell.) Stellfeld. Isso comprova a importância da análise de números cromossômicos, especialmente para espécies que pertencem a complexos taxonômicos.

Na tribo, o detalhamento cariotípico foi realizado apenas em *Stylosanthes* Sw. (Vieira *et al.* 1993). Até o momento nenhum trabalho foi realizado para espécies do clado *Dalbergia s. str.*

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a possível contribuição do número cromossômico e de características morfológicas de representantes do clado *Dalbergia s. str.* como caráter taxonômico nas propostas a respeito da circunscrição do clado e dos gêneros que o compõe. Para tanto, este trabalho realizou a análise de espécies ocorrentes no Brasil em conjunto com a revisão de estudos de números cromossômicos existentes na literatura.

Metodologia

Estudos cromossômicos

Para a análise mitótica foram coletados frutos com sementes de 29 amostras de 20 espécies dos gêneros *Aeschynomene* L. (seis espécies), *Dalbergia* L.f. (seis) e *Machaerium* Pers. (oito) de diferentes localidades e formações vegetacionais variadas (Tabela 01). A identificação das espécies foi efetuada através de bibliografias especializadas, análise comparativa com exsicatas e consultas a especialistas. Os binômios foram classificadas de acordo com w3Tropicos – MOBOT – Missouri Botanical Garden (www.tropicos.org). A

circunscrição adotada foi de Klitgaard & Lavin (2005). Materiais testemunha estão depositados nos Herbários CEUL, CGMS, CVRD, EAC, JBRJ, HDJF e UEC.

As sementes foram germinadas em Gerbox[®] com papel filtro umedecido e cultivadas em câmara incubadora BOD a 25°C. As radículas recém-emergidas foram pré-tratadas em solução de 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) a 0.002M, por 20-24 horas a 10°C. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução 3:1 (etanol: ácido acético, v:v) por 20-24 horas à temperatura ambiente e estocadas a – 20°C até o preparo das lâminas.

As raízes foram lavadas em água destilada, hidrolizadas em HCl 5N por 20 minutos à temperatura ambiente e transferidas novamente para água destilada. As pontas de raízes foram maceradas em ácido acético 45%, cobertas com lamínula e congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula. As lâminas foram coradas em solução de Giemsa 2% por 15-20 minutos e montadas com Entelan[®] (Guerra 1983).

As melhores células foram fotografadas em microscópio BX51 (Olympus), acoplado com câmera CCD digital Evolution MT com auxílio do software Image ProPlus v6 (Media Cybernetics, Inc.). Para cada amostra, a confirmação da contagem cromossômica baseou-se em pelo menos 10 células.

O programa Adobe Photoshop CS4 PT-BR (Adobe Systems, Inc.) foi utilizado para determinar o tamanho dos cromossomos, além de auxiliar no balanceamento uniforme de cores, contraste e brilho. Foi calculado o comprimento total da cromatina (CTC) de cada espécie, que é a soma do tamanho de todos os seus cromossomos. O tamanho dos cromossomos foi medido a partir de sete células de cada espécie/população. A diferença do CTC entre as espécies/citótipos de um mesmo gênero foi analisada através de ANOVA, pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) e o gráfico foi confeccionado por boxplot com mediana a quartil, utilizando BioEstat 5.0 (Ayres *et al.* 2007).

Análise dos dados de literatura

Foram consultados os dados da base de números cromossômicos do IPCN – Index to Plant Chromosome Number - Missouri Botanical Garden (<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>) e das obras de referência de números cromossômicos Bolkhoviskii (1969), Goldblatt (1981, 1984, 1985, 1988), Goldblatt & Johnson (1990, 1991, 1994, 1998, 2000) e Moore (1973, 1974, 1977).

Resultados

Número Cromossômico

O número cromossômico mais frequente dentre as 20 espécies estudadas foi $2n=20$, observado em 16 espécies, sendo exclusivo para 14 (Tabela 01; Figura 01a, b, c, d, e). Números diferentes de $2n=20$ foram observados especialmente em espécies de *Aeschynomene*: duas pertencentes ao subgênero *Aeschynomene*, *A. ciliata* Vogel e *A. sensitiva* Sw., e uma pertencente ao subgênero *Ochopodium*, *A. histrix* Poir., todas com $2n=22$ (Figura 01f). Tanto as espécies de *Dalbergia*, quanto as de *Machaerium* apresentaram $2n=20$, exceção feita a *M. opacum* Vogel com $2n=34$ (Figura 01g).

Variação intrapopulacional do número diplóide foi observada em duas espécies, *A. elaphroxylon* (Guill & Perr.) Taub. e *A. paniculata* Willd.ex Vogel, sendo que na primeira foram observados os números $2n=20/40$ (Figura 01f) em plantas cultivadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro e na segunda, $2n=20/22$ (Figuras 01a, h) na população de Porto Murtinho/MS.

Tamanho e morfologia cromossômica

Em relação ao tamanho cromossômico, observou-se uma variação gradual entre os cromossomos dentro de cada espécie, mas uma grande variação foi observada quanto aos tamanhos dos cromossomos entre as espécies (desde 0,36 μm em *A. histrix* até 3,83 μm em *D. frutescens* (Vell.) Britto), o que refletiu na variação do tamanho do complemento cromossômico (CTC; Tabela 01). O CTC variou entre 14,05 μm em *A. histrix* a 80,88 μm em *A. elaphroxylon*. Para *Aeschynomene*, o CTC teve maior variação interespecífica (Figura 2A), seguido por *Dalbergia* (Figura 2B) e *Machaerium* (Figura 2C). Para *A. elaphroxylon* foram notadas diferenças significativas entre o CTC dos dois citótipos (diplóide e poliploide), sendo o valor do poliploide o dobro do diplóide (Figura 2A).

Quanto à morfologia dos cromossomos, cinco das seis espécies de *Aeschynomene* apresentaram um par de cromossomos acrocêntricos e um par de cromossomos com satélites foram observados em *A. falcata* (Poir.) DC., *D. ecastaphyllum* (L.) Taub., *D. miscolobium* e *M. vestitum* Vogel.

Banco de dados

A partir da união dos resultados obtidos nesse estudo e do levantamento de dados disponíveis na literatura, atualmente são conhecidos números cromossômicos para 72 espécies de oito dos 17 gêneros do clado *Dalbergia s. str.*, o que representa 10% das espécies e 47% dos gêneros do clado (Tabela 02). Para quatro espécies, *A. ciliata*, *D. frutescens*, *D. miscolobium* e *M. vestitum*, a contagem cromossômica foi efetuada pela primeira vez no presente estudo (Tabela 01). Para outras cinco espécies, *A. histrix*, *A. sensitiva*, *M. hirtum*, *M. nyctitans* (Vell.) Benth. e *M. opacum* Vogel, as contagens discordaram de dados já publicados (Tabelas 01 e 02).

O número cromossômico mais frequente no clado *Dalbergia s. str.* foi $2n=20$, ocorrendo em 55 espécies, sendo exclusivo para 48. A poliploidia, com número múltiplo de 10, foi observada em oito espécies. Números cromossômicos não múltiplos de 10 foram observados em 18 espécies. Para *Bryaspis*, *Cyclocarpa*, *Geissaspis*, *Humularia*, *Ormocarposia* R. Vig., *Peltiera* Du Puy & Labat, *Soemmeringia*, *Weberbauerella* Ulbr. e *Zygocarpum* Thulin & Lavin não existem registros de número cromossômico.

Em *Aeschynomene* foram efetuadas 22 contagens cromossômicas, 10 para o subgênero *Aeschynomene* e 12 para *Ochopodium*, representando 12% das espécies do gênero. Dezesete destas espécies apresentaram $2n=20$, sendo que para 13 esse número foi exclusivo. No subgênero *Aeschynomene* o número variou entre $2n=20$, 22, 38 e 40, enquanto que para *Ochopodium* foram observados $2n=20$, 22, 40 e 80. Três espécies do subgênero *Aeschynomene* apresentaram mais de um número cromossômico (*A. sensitiva* – $2n=20/22$ e *A. aspera* L., *A. indica* L. – $2n=38/40$), enquanto uma espécie do subgênero *Ochopodium* apresentou variação dispoloide dentro de uma mesma população (*A. paniculata* – $2n=20/22$).

Das 250 espécies de *Dalbergia*, apenas 19 espécies (7,5%) tiveram o número cromossômico determinado, sendo $2n=20$ para todas. Em relação a *Machaerium*, 20 (15,4%) das 130 espécies do gênero apresentaram contagens cromossômicas. Dezoito espécies apresentaram $2n=20$, sendo este número cromossômico exclusivo para 15 espécies. Apenas *M. lunatum* (L.f.) Ducke ($n=9$), e *M. sericiflorum* Vogel ($2n=40$) divergiram de $2n=20$. Citótipos poliploides foram verificados em *M. hirtum* e *M. nyctitans* (Vell.) Benth. (ambas com $2n=20/40$), além de *M. opacum*, que apresentou $n=10$ e $2n=34$.

Diphysa Jacq., *Kotschya* e *Pictetia* DC. apresentaram contagens cromossômicas para apenas uma espécie cada, o que representa, do total de espécies dos gêneros, 6,5%, 3% e 12,5%, respectivamente. O número cromossômico determinado para as espécies dos gêneros foram $2n=16$, $2n=28$ e $2n=20$, nesta ordem. Para *Ormocarpum* P. Beauv. e *Smithia*, quatro espécies de cada gênero tiveram o número cromossômico definido, representando 22% e 20%, respectivamente, do total de espécies dos gêneros. O número cromossômico de *Ormocarpum* variou de $2n=24$ e $2n=26$, enquanto que para *Smithia* foi observado $2n=38$ para todas as espécies.

Considerando os quatro ramos distintos do clado *Dalbergia s. str.*, no primeiro ramo, que agrega os gêneros *Dalbergia*, *Machaerium* e *Aeschynomene* subgen. *Ochopodium*, houve predomínio de $2n=20$. No segundo ramo, além de *Aeschynomene* subgen. *Aeschynomene*, cujo $2n=20$ também foi observado na maioria das espécies, apenas dois dos outros sete gêneros apresentaram informações a respeito de contagens cromossômicas: *Smithia* ($2n=38$) e *Kotschya* ($2n=28$). O terceiro reúne seis gêneros, dos quais *Diphysa* apresenta $2n=16$, *Pictetia* possui $2n=20$ e *Ormocarpum* $2n=24/26$. No último ramo, o único gênero, *Weberbauerella*, não possui contagem cromossômica (Figura 03).

Discussões

Número cromossômico

A variação do número cromossômico nas espécies estudadas, como observado para algumas espécies de *Aeschynomene* e *Machaerium*, pode ser originada a partir de alterações cromossômicas estruturais e/ou numéricas. Assim, essa variação possivelmente está relacionada a eventos de poliploidia e aneuploidia (Guerra 2008; Schubert & Lyzak 2011). Considerano o conceito de Apples *et al.* (1998) e Sharma & Sen (2002), quando observada dentro de uma única espécie, indica a ocorrência de citótipos (populações com número cromossômico diferente).

Pelo menos 8% das espécies identificadas variaram em nível de ploidia, não contabilizando as espécies com variações aneuploides. Assim, se for levado em conta cada nível de ploidia como uma nova espécie críptica, então a diversidade biológica será muito superior à prevista (Rieseberg & Willis 2007). Em leguminosas, a ocorrência de citótipos já foi descrita em *Mimosa pudica* L., onde foram observados vários níveis de ploidia em

distintas populações, definindo-a como uma espécie polimórfica com ampla distribuição geográfica (Seijo & Vanni 1999, Dahmer *et al.* 2011). O mesmo foi encontrado para *Senna* Mill. e *Chamaecrista* Moench onde os citótipos apresentam-se relacionados com a distribuição geográfica das espécies (Biondo *et al.* 2005). Entretanto, a variação de números cromossômicos em uma mesma espécie pode ser decorrente de erros de contagem cromossômica ou até mesmo de identificação botânica (Guerra 1990; Biondo *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2010).

No presente trabalho foi verificada a ocorrência de citótipos em duas espécies do subgênero *Ochopodium*: *A. elaphroxylon* ($2n=20/40$) e *A. paniculata* ($2n=20/22$). Em *A. elaphroxylon*, uma espécie africana, nos indivíduos cultivados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, essa variação pode estar relacionada com a possível vinda de sementes de mais de uma população, com dois níveis de ploidia (diploide e tetraploide). É provável que no estudo realizado por Auquier & Renard (1975) tenha sido amostrada apenas uma população natural tetraploide ($2n=40$). A formação de gametas não reduzidos leva ao desenvolvimento de citotipos poliploides, sendo que o stress ambiental contribui de forma significativa para o estabelecimento de indivíduos poliploides (Ramsey & Schemske 1998).

Em *A. paniculata*, indivíduos da mesma população, ocorrentes na região do Chaco, apresentaram $2n=20/22$, o que sugere que eventos de diferenciação cromossômica estejam atuando (Stace 1989). O Chaco é um meio com características ambientais extremas, que exercem forte pressão de seleção sobre as espécies que lá ocorrem (Hueck 1972). Da mesma forma como citado anteriormente para formação de poliploides, o stress ambiental pode favorecer a fixação de anormalidades cromossômicas, como aneuploidia, principalmente quando associadas com o surgimento de combinações adaptativas em ambientes extremos (Charlesworth 2009, Ramsey & Willis 2007). Provavelmente, o par cromossômico adicionado pode indicar alguma vantagem adaptativa, e ser fixado na população, levando ao estabelecimento do citótipo (Belyayev 2013).

Nas populações periféricas frequentemente há um incremento na taxa de recombinação, especialmente sob condições estressantes (Grant, 1981; Levin, 2002) favorecendo a produção de gametas com rearranjos cromossômicos desbalanceados, como translocações e múltiplas pequenas deleções, o que poderá levar ao surgimento de citótipos.

Em outras espécies de *Aeschynomene*, *A. sensitiva* ($2n=20/22$), *A. aspera* e *A. indica* (ambas $2n=38/40$), também notou-se a presença de aneuploidia. Goldblatt (1981a) e Poggio *et al.* (2008) relataram a existência de tal evento para Leguminosae.

A poliploidia foi observada em 23% das espécies de *Aeschynomene* e 20% de representantes de *Machaerium*, contradizendo as informações de Coleman & Demenezes (1980) e Mendonça-Filho *et al.* (2002), que consideraram secundários os eventos de poliploidia nesses gêneros. Por outro lado, diversos autores já afirmavam a existência e a importância da poliploidia em Leguminosae em estudos baseados em diferentes espécies desta família (Goldblatt 1981a; Cardoso *et al.* 2000; Biondo *et al.* 2005; Almada *et al.* 2006; Flores *et al.* 2006; Trenchard *et al.* 2008; Dahmer *et al.* 2011; Santos *et al.* 2012), inclusive para gêneros da tribo Dalbergieae (Cameron 1967; Tedesco *et al.* 2002).

Em *Machaerium*, chama a atenção *M. lunatum* (L.) Ducke e *M. opacum*, cujas contagens ($n=9$ e $n=10/2n=34$, respectivamente) são atípica para o gênero. A morfologia do complemento cromossômico de *M. opacum* é similar à apresentada nos cromossomos das demais espécies estudadas, não sendo possível inferir qual rearranjo cromossômico foi responsável pela grande mudança de número cromossômico. Análises cariotípicas mais detalhadas, com aplicação de um maior número de marcadores, poderão auxiliar na elucidação da evolução cromossômica deste gênero.

Número básico

Goldblatt (1981b) sugeriu $x=11$ como provável número básico de Dalbergieae *s. l.*, apesar de reconhecer que $n=10$ teria surgido cedo na evolução da tribo, sendo basal para a maioria dos gêneros. Bairiganjan & Patnaik (1989), em estudo realizado para diversos representantes de Papilionoideae, determinaram que gêneros pertencentes à tribo Dalbergieae *s. l.* apresentavam $x=10$. A partir dos dados compilados neste estudo, onde se observou que 82% das espécies apresentaram números cromossômicos múltiplos de 10, o número básico $x=10$ parece ser bem suportado para o clado Dalbergia *s. str.*

Em relação à tribo, o mesmo número básico ($x=10$) pode ser considerado, uma vez que nos demais cladogramas (*Adesmia s. str.* e *Pterocarpus s. str.*), número cromossômicos múltiplos de 10 são predominantes entre as espécies já estudadas. Nos gêneros isolados (*Andira* Lam., *Hymenolobium* Benth., *Vatairea* Aubl. e *Vataireopsis* Ducke) há registros de contagens cromossômicas apenas para espécies de *Andira* ($2n=22$), o que sugere $x=11$

como número básico desse grupo, porém com esse número restrito de contagens, não se pode confirmar tal informação.

Os gêneros *Diphysa*, *Kotschya*, *Ormocarpum* e *Smithia* não apresentam $x=10$, o que pode estar relacionado com relação dúbia desses gêneros com o clado *Dalbergia s. str.* – os mesmos pertenciam a outras tribos antes da atual circunscrição definida por Klitgaard & Lavin (2005): *Diphysa* ($2n=16$) era enquadrada na tribo Robinieae, *Ormocarpum* ($2n=24/26$) em Ormocarpinae, além de *Kotschya* ($2n=28$) e *Smithia* ($2n=38$), ambos em Aeschynomeneinae. Assim, mesmo tendo características morfológicas semelhantes (flor, frutos e sementes), os dados cromossômicos sugerem uma maior distância desses gêneros dos demais analisados dentro do clado *Dalbergia s. str.* e os possíveis números básicos são $x=8$ (*Diphysa* e *Ormocarpum*), $x=13$ (*Ormocarpum*), $x=14$ (*Kotschya*) e $x=19$ (*Smithia*).

Tamanho cromossômico e CTC

Apesar do tamanho cromossômico das espécies aqui estudadas apresentarem uma grande amplitude entre os menores e maiores cromossomos (0,36-3,83 μm), essa variação esta compatível à observada em outros grupos de Leguminosae, tais como *Lathyrus* L. (4,37-8,86 μm , Seijo & Fernández, 2003), *Phaseolus* L. (0,78-2,36 μm , Mercado-Ruaro & Delgado-Salinas 1998); *Sesbania* Scop (2,12-6,99 μm , Forni-Martins *et al.* 1994), *Stylosanthes* Sw. (1-2,8 μm , Cameron 1967) e *Vicia* L. (0,64-2,46 μm , Joseph & Bouwkamp 1978). Dados cariotípicos para outras espécies do clado *Dalbergia s. str.* não estão disponíveis na literatura.

O CTC foi correlacionado positivamente com o número cromossômico e/ou tamanho do mesmo. Mercado-Ruaro & Delgado-Salinas (1998) consideraram que diferenças de CTC entre espécies de *Phaseolus* estavam relacionadas com aberrações cromossômicas (no caso aneuploidia) e também com a função dos segmentos heterocromáticos durante o processo de evolução do grupo. No presente estudo as diferenças de CTC podem também estar relacionadas com alterações numéricas (aneuploidia, poliploidia) como observado em *Aeschynomene* que apresentou variação no número cromossômico ($2n=20, 22, 40$). Entretanto, em *Dalbergia* a causa da diferença no tamanho dos cromossomos de *D. frutescens* em relação às outras espécies é o tamanho de cada cromossomo, e não variação em número. A mesma correlação é usada para *Machaerium oblongifolium*.

Os cromossomos acrocêntricos encontrados nesse estudo em espécies de *Aeschynomene* são pouco frequentes em Leguminosae, sobretudo em Papilionoideae (Kumari & Bir 1990), sendo observados para algumas espécies de *Vicia* L. (Maxted *et al.* 1991; Weber & Schifino-Wittmann 1999) e *P. vulgaris* (Sarbhoy 1977, 1980, Mercado-Ruaro & Delgado-Salinas 2000). A presença de satélites em cromossomos é comum em Leguminosae, como observado em *Stylosanthes* (Vieira *et al.* 1993), *Sesbania* (Forni-Martins *et al.* 1994), *Lathyrus* (Klamt & Schifino-Wittmann 2000), *Crotalaria* L. (Almada *et al.* 2006; Flores *et al.* 2006), como notado nesse trabalho para *A. falcata*, *D. ecastaphyllum*, *D. miscolobium* e *M. vestitum*. A região distendida, muitas vezes não observada, está relacionada com as regiões organizadoras do nucléolo, fazendo com que o satélite se distancie do cromossomo. Frequentemente a presença de satélite leva a confusões na determinação de número cromossômico.

Após a análise do número e morfologia cromossômica de espécies do clado *Dalbergia s. str.* ficou evidente a importância de dois eventos de evolução cromossômica: a aneuploidia, com papel já conhecido para espécies de Leguminosae, e a poliploidia, que surge como um processo importante na diversificação do clado *Dalbergia s. str.*, com 16,7% das espécies apresentando uma possível origem poliploide ou citótipos poliploides. Com base no levantamento de números cromossômicos, reforça-se o número básico de Dalbergieae como $x=10$. Os parâmetros número e morfologia cromossômica não suporta a divisão de *Aeschynomene* em dois gêneros diferentes, uma vez que a variação entre e dentro dos subgêneros foi similar. Por outro lado, sugere maior atenção ao gênero *Machaerium*, que devido ao aparecimento de números cromossômicos atípicos (*M. lunatum* e *M. opacum*), pode estar evidenciando processos de evolução cromossômica bastante importantes. Além disso, os gêneros recém-agrupados no clado *Dalbergia s. str.*, *Diphysa*, *Kotschyia*, *Ormocarpum* e *Smithia* precisam ser melhores avaliados do ponto de vista filogenético, uma vez que os mesmos apresentam número básico desviando de $x=10$.

Referências bibliográficas

- Almada, RD; Daviña, JR & Seijo, JG. 2006. Karyotype analysis and chromosome evolution in southernmost South American species of *Crotalaria* (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **150**: 329-341.
- Alves, MAO & Custódio, AVD. 1989. Citogenética de leguminosas coletadas no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Genética** **12**(1): 81–92.
- Apples, R; Morris, R; Gill, BS & May, CE. 1998. **Chromosome Biology**. Kluwer Academic Publishes. 401pp.
- Atchison, E. 1951. Studies in the Leguminosae.VI. Chromosome number among tropical woody species. **American Journal of Botany** **38**(7): 538-547.
- Auquier, P & Renard, R. 1975. Nombres chromosomiques de quelques angiospermes du Rwanda, Burundi et Kivu (Zaire) - I. **Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique** **45**: 421–445.
- Ayres, M; Ayres Júnior, M; Ayres, DL; Santos, AAS. 2007. **Bio-estat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. ONG Mamiraua. Belém, Pará.
- Bairiganjan, GC & Patnaik, SN. 1989. Chromosomal evolution in Fabaceae. **Cytologia** **54**: 51-64.
- Bandel, G. 1974. Chromosome numbers and evolution in the Leguminosae. **Caryologia** **27**: 17-32.
- Belyayev A. 2013. Chromosome evolution in marginal populations of *Aegilops speltoides*: causes and consequences. **Annals of Botany** **111**: 531–538.
- Berger, CA; Witkus, ER & McMahon, RM. 1958. Cytotaxonomic studies in the Leguminosae. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** **85**(6): 405-414.
- Biondo, E; Miotto, STS & Schifino-Wittmann, MT. 2005. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** **28**(4): 797-808.
- Bir, SS & Sidhu, M. 1980. Cyto-palynological studies on weed flora of cultivable lands of Patiala district (Punjab). **Journal of Palynology** **16**: 85–105.
- Bir, SS & Kumari, S. 1977. Evolutionary status of Leguminosae from Pachmarhi, Central India. **Nucleus** **20**: 94-98.
- Bir, SS & Kumari, S. 1975. In IOPB chromosome number reports XLIX. **Taxon** **24**: 501–516.

- Bolkhovskikh, Z; Matvejeva, VG & Zakharyeva, O. 1969. **Chromosome numbers of Flowering Plants**. Academy of Sciences to the USSR. 926p.
- Cameron, DF. 1967. Chromosome number and morphology of some introduced *Stylosanthes* species. **Australian Journal of Agricultural and Resource Economics** **18**: 375-379.
- Cardoso, MB; Schifino-Wittmann, MT & Bonanes-Zanettini, MH. 2000. Taxonomic and evolutionary implications of intraspecific variability in chromosome numbers of species of *Leucaena* Benth. (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **134**: 549-556.
- Charlesworth, B. 2009. Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. **Nature Reviews Genetics** **10**: 195–205.
- Coleman, JR. 1982. Chromosome numbers of Angiosperms collected in the state of São Paulo. **Revista Brasileira de Genética** **5**: 533–549.
- Coleman, JR & Demenezes, EM. 1980. Chromosome numbers in Leguminosae from the state of Sao Paulo, Brazil. **Rhodora** **82**: 475–481.
- Dahmer, N; Simon, MF; Schifino-Wittmann, MT; Hughes, CE; Miotto, STS & Giuliani, JC. 2011. Chromosome numbers in the genus *Mimosa* L.: cytotaxonomic and evolutionary implications. **Plant Systematics and Evolution** **291**: 211-220.
- Fernandez, A. 1977. Números cromosômicos en Angiospermas. **Hickenia** **1**: 83–86.
- Forni-Martins, ER; Tanibata, MF & Cardelli-de-Lucena, MA. 1994. Karyotypes of species of *Sesbania* Scop. (Fabaceae). **Cytologia** **59**: 479-482.
- Flores, AS; Corrêa, AM; Forni-Martins, ER & Tozzi, AMGA. 2006. Chromosome number in brazilian species of *Crotalaria* (Leguminosae-Papilionoideae) an their taxonomic significance. **Botanical Journal of the Linnean Society** **151**: 271-277.
- Frahm-Leliveld, JA. 1960. Chromosome numbers in leguminous plants. **Acta Botanica Neerlandica** **9**(3): 327-329.
- Gill, LS & Husaini, SWH. 1985. Cytology of some arborescent Papilionoideae (Leguminosae) of Southern Nigeria. **Boletim da Sociedade Broteriana** **58**(2): 187-200.
- Goldblatt, P. 1988. Index to Plant Chromosome Numbers 1984–1985 (Editor). **Monographs in Systematic Botany Missouri Botanical Garden** **23**.
- Goldblatt, P. 1985. Index to Plant Chromosome Numbers 1982–1983 (Editor). **Monographs in Systematic Botany Missouri Botanical Garden** **13**.

- Goldblatt, P. 1984. Index to Plant Chromosome Numbers 1979–1981 (Editor). **Monographs in Systematic Botany Missouri Botanical Garden 8.**
- Goldblatt, P. 1981a. Index to Plant Chromosome Numbers 1974–1978 (Editor). **Monographs in Systematic Botany Missouri Botanical Garden 6.**
- Goldblatt, P. 1981b. Cytologia and the phylogeny of Leguminosae. In: Polhill, RM & Raven, PH. (Eds.). **Advances in Legume Systematics.** Kew: Royal Botanical Garden, p. 427 - 463.
- Goldblatt, P & Johnson, DE. 2000. Index to Plant Chromosome Numbers 1996–1997 (editor). **Monographs in Systematic Botany Missouri Botanical Garden 81.**
- Goldblatt, P & Johnson, DE. 1998. Index to Plant Chromosome Numbers 1994–1995 (editor). **Monographs in Systematic Botany Missouri Botanical Garden 58.**
- Goldblatt, P & Johnson, DE. 1994. Index to Plant Chromosome Numbers 1990–1991 (editor). **Monographs in Systematic Botany Missouri Botanical Garden 51.**
- Goldblatt, P & Johnson, DE. 1991. Index to Plant Chromosome Numbers 1988–1989 (Editor). **Monographs in Systematic Botany Missouri Botanical Garden 40.**
- Goldblatt, P & Johnson, DE. 1990. Index to Plant Chromosome Numbers 1986–1987 (Editor **Monographs in Systematic Botany Missouri Botanical Garden 30.**
- Grant V. 1981. Plant speciation, 2nd edn. New York: Columbia University Press.
- Guerra, M. 2012. Cytotaxonomy: The end of childhood. **Plant Biosystems 146(3):** 703-710.
- Guerra, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic Genome Research 120:** 339-350.
- Guerra, M. 1990. A situação da citotaxonômica de Angiospermas nos tropicos e, em particular, no Brasil. **Acta Botanica Brasilica 4(2):** 75-86.
- Guerra, M. 1988. Introdução à Citogenética Geral. Editora Guanabara. 142p.
- Guerra, M. 1983. O uso de Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandamento. **Ciência e Cultura 35:** 190-193.
- Hueck, K. 1972. As regiões de matas do Chaco e áreas marginais. In: **As florestas da América do Sul: Ecologia, Composição e Importância Econômica.** Editora Polígono. 240-275.

- Husaini, SWH & Gill, LS. 1986. Cytology of the tribe Dalbergieae (Leguminosae) from Nigeria. **Fedd. Rep.** **97**: 469-473.
- Joseph, LS & Bouwkamp, JC. 1978. Karyomorphology of several species of *Phaseolus* and *Vigna*. **Cytologia** **43**: 595-600.
- Kawakami, L. 1930. Chromosome numbers in Leguminosae. **Botanical Magazine** **44**(522): 319-328.
- Klamt, A & Schifino-Wittmann, MT. 2000. Karyotype morphology and evolution in some *Lathyrus* (Fabaceae) species of Southern Brasil. **Genetics and Molecular Biology** **23**(2): 463-467.
- Klitgaard, BB & Lavin, M. 2005. Dalbergieae *sensu lato*. In: Lewis, GP; Schire, B; Mackinder, B & Lock, M. 2005. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew. p.309-335.
- Krapovickas, A & Krapovickas, AMF. 1951. Notas citológicas sobre Leguminosas. **Darwiniana** **9**(3-4): 612-613.
- Kumari, MG & Kuriachan, PI. 1990. Plant Chromosome Number Reports—IX. **The Journal of Cytology & Genetics** **25**: 145–147.
- Kumari, S & Bir, SS. 1990. Karyomorphological evolution in Papilionaceae **The Journal of Cytology & Genetics** **25**: 173–219.
- Lavin, M; Pennington, RT; Klitgaard, BB; Sprent, JI; Lima, HC & Gasson, PE. 2001. The dalbergioid legumes (Fabaceae) delimitation of a pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany** **88**(3): 503-533.
- Levin, DA. 2002. **The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution**. Oxford University Press. 230p.
- Lewis, GP; Schire, B; Mackinder, B & Lock, M. 2005. **Legumes of the world**. Royal Botanic Gardens, Kew. 577p.
- Maciel, HS & Schifino-Wittmann, MT. 2002. First chromosome number determinations in South-Eastern South American species of *Lupinus* L. (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **139**: 395-400.
- Mangenot, S & Mangenot, G. 1958. Deuxieme liste de nombres chromosomiques nouveaux chez diverses Dicotylédones et Monocotylédones d’Afrique occidentale. **Bulletin du Jardin Botanique** **28**(4): 315-329.
- Mangenot, S & Mangenot, G. 1962. Enquête sur les nombres chromosomiques dans une collection d’espèces tropicales. **Revue de Cytologie et Biologie** **25**(3-4): 411-447.

- Maxted, N; Callimassia, MA & Bennett, MD. 1991. Cytotaxonomic studies of Eastern Mediterranean *Vicia* species (Fabaceae). **Plant Systematics and Evolution** **177**: 221-234.
- Mendonça-Filho, CV; Forni-Martins, ER & Tozzi, AMGA. 2002. New chromosome counts in neotropical *Machaerium* Pers. species (Fabaceae) and their taxonomic significance. **Caryologia** **55**: 111-114.
- Mercado-Ruaro, P & Delgado-Salinas, A. 2000. Cytogenetic studies in *Phaseolus* L. (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology** **23**(4): 985-987.
- Mercado-Ruaro, P & Delgado-Salinas, A. 1998. Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). **American Journal of Botany** **85**(1): 1-9.
- Miêge, J. 1960. Troisième liste de nombres chromosomiques d'espèces d'Afrique Occidentale. **Ann. Fac. Sci. Univ. Dakar** **5**: 75-85.
- Moore, RJ. 1973. Index to Plant Chromosome Numbers for 1967-1971 (editor). **Regnum Vegetabile** **90**: 1-539.
- Moore, RJ. 1974. Index to Plant Chromosome Numbers for 1972 (editor). **Regnum Vegetabile** **91**: 1-108.
- Moore, RJ. 1977. Index to Plant Chromosome Numbers for 1973-1974 (editor). **Regnum Vegetabile** **96**: 1-257.
- Nanda, PC. 1962. Chromosome number of some trees and shrubs. **The Journal of the Indian Botany Society** **41**(2): 271-277.
- Oliveira, V.M.; Semir, J.; Forni-Martins, E.R. 2010. Chromosome numbers in the old genus *Vernonia* (Asteraceae) and their taxonomic significance. **Current Topics in Plant Biology** **11**: 29-37.
- Patil, RP. 1958. Chromosome numbers of some Dicotyledons. **Current Science** **27**(4): 140-141.
- Poggio, L; Espert, SM & Fortunato, RH. 2008. Citogenética evolutiva en leguminosas americanas. **Rodriguésia** **59**(3): 423-433.
- Polhill, RM & Raven, PH. 1981. **Advances in Legume Systematics**. Royal Botanic Gardens, Kew. Part I. xvi. 425p.
- Ramsey, J & Schemske, DW. 1998. Pathways, Mechanisms, and Rate of Polyploid Formation in Flowering Plants. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics** **29**: 467-501.

- Renard, R; Lambinon, J; Reekmans, M; Veken, PV & Govaert M. 1983. Nombres chromosomiques de quelques Angiospermes du Rwanda, du Burundi et du Kenya. **Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique** **53**: 342–371.
- Ribeiro, RA; Lavin, M; Lemos-Filho, JP; Mendonça-Filho, CV; Santos, FR & Lovato, MB. 2007. The genus *Machaerium* (Leguminosae) is more closely related to *Aeschynomene* sect. *Ochopodium* than to *Dalbergia*: inferences from combined sequence data. **Systematic Botany** **32**(4): 762-771.
- Rieseberg, LH & Willis, JH. 2007. Plant Speciation. **Science** **317**: 910-914.
- Rodrigues, RS Corrêa, AM; Forni-Martins, ER & Tozzi, AMGA. 2009. Números cromossômicos em espécies de *Acosmium* Schott e *Leptolobium* Vogel (Leguminosae, Papilionoideae). **Acta Botanica Brasilica** **23**(3): 902-906.
- Sharma, A & Sen, S. 2002. **Chromosome Botany**. Science Publishes. 155pp.
- Sampathkumar, R. & Navaneetham, N. 1983. On the karyomorphology of two South Indian littoral taxa. **Indian Science Congress Association** **70**(3–VI): 88.
- Sandhu, PS & Mann, SK. 1988. SOCGI plant chromosome number reports – VII. **The Journal of Cytology and Genetics** **23**: 219–228.
- Sanjappa, M. 1979. In IOPB chromosome number reports LXIV. **Taxon** **28**: 393–395.
- Sanjappa, M. & Dasgupta, A. 1977. In IOPB chromosome number reports LVI. **Taxon** **26**: 257-274.
- Sanjappa, M & Dasgupta, A. 1981. In IOPB Chromosome number reports LXXI. **Taxon** **30**: 508–509.
- Sarbhoj, RK. 1980. Karyological Studies in the Genus *Phaseolus*, Linn. **Cytologia** **43**: 363-373.
- Sarbhoj, RK. 1977. Cytogenetical Studies in the Genus *Phaseolus* Linn. III. Evolution in the genus *Phaseolus*. **Cytologia** **42**: 401-413.
- Sarkar, AK; Datta, N & Chatterjee, U. 1972. Chromosome survey of certain Angiosperms. I. **Bulletin of the Botanical Survey of India** **14**: 170.
- Sarkar, AK; Datta, R; Raychodhury M & Das, S. 1975. In IOPB chromosome reports L. **Taxon** **24**: 671–678.
- Sarkar, AK; Datta, N; Chatterjee, U & Hazra, D. 1982. In: IOPB chromosome number reports LXXVI. **Taxon** **31**: 576-579.

- Sede, SM; Fortunato, RH & Poggio, L. 2006. Chromosome evaluation of southern South American species of *Camptosema* and allied genera (Diocleinae – Phaseoleae – Papilionoideae – Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **152**: 235-243.
- Seijo, JG & Fernandez, A. 2003. Karyotype analysis and chromosome evolution in South American species of *Lathyrus* (Leguminosae). **American Journal of Botany** **90**(7): 980-987.
- Seijo, G & Vanni, R. 1999. Números cromossômicos em leguminosae de Paraguay. **Bulletin of the Botanical Society of Argentina** **34**(1-2): 119-122.
- Shibata, K. 1962. Estudios citologicos de plantas colombianas silvestres y cultivadas. **Journal of Agricultural Science** **8**: 49–62.
- Sidhu, M & Bir, SS. 1983. Karyological studies on weeds on cultivable lands in Punjab, India. **Tropical Plant Science Research** **1**: 1-13.
- Sinha, SS & Kumar, P. 1978. Meiotic analysis in four lac host plants. **The Journal of Cytology & Genetics** **13**: 82–86.
- Souza, VC & Lorenzi, H. 2005. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 640p.
- Stace, CA. 1989. **Plant Taxonomy and Biosystematics**. 2 edition. Cambridge University Press, New York. 264p.
- Stebbins, GL. 1971. **Chromosomal evolution in higher plants**. Reading: Addison-Wesley. 216p.
- Schubert, I & Lysak, MA. 2011. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. **Trends in Genetics** **27**: 207-216.
- Tedesco SB; Schifino-Wittmann MT & Dall’Agnol, M. 2002. Meiotic behaviour and pollen fertility in the seventeen Brazilian species of *Adesmia* DC. (Leguminosae). **Caryologia** **55** (4): 341-347.
- Trenchard, LJ; Harris, PJC; Smith, SJ & Pasiecznik. 2008. A review of ploidy in the genus *Prosopis* (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **156**: 425-438.
- Turner, BL & Fearing, OS. 1960. Chromosome numbers in the Leguminosae. III. Species of the southwestern United States and Mexico. **American Journal of Botany** **47**(7): 603-608.

- Vanni, R. 1983. Recuentos cromosómicos en Hedysareae (Leguminosae-Papilionoideae). **Bonplandia** **5**: 227–233.
- Vieira, MLC; Aguiar-Perecin, MLR & Martins, PS. 1993. A cytotaxonomic study in twelve brazilian taxa of *Stylosanthes* Sw., Leguminosae. **Cytologia** **58**: 305-311.
- Yeh, MS; Yuasa, H & Maekawa, F. 1986. Chromosome numbers in the Leguminosae. **Science Report of the Institute of Evolutionary Biology** **3**: 57–71.
- Weber, LH & Schifino-Wittmann, MT. 1999. The *Vicia sativa* L. aggregate (Fabaceae) in Southern Brazil. **Genetic Research Crop Evolution** **46**: 207-211.

Tabela 01. Espécies analisadas no presente estudo. (*) Contagens inéditas. (†) Contagens diferentes das apresentadas na literatura. CTC – Comprimento Total da Cromatina.

Gênero	Espécie	Local de Coleta	Vegetação	2n	Tamanho (µm)	CTC	Voucher
<i>Aeschynomene</i> L. (subg. <i>Aeschynomene</i>)	<i>Aeschynomene ciliata</i> Vogel	Porto Murtinho/MS	Chaco	22*	0,99-4,1	45,32	CGMS
	<i>A. sensitiva</i> Sw.	Linhares/ES	Mata Atlântica	22†	1,08-2,92	48,78	UEC
<i>Aeschynomene</i> L. (subg. <i>Ochopodium</i>)	<i>A. elaphroxylon</i> (Guil. & Perr.) Taub.	Rio de Janeiro	Mata Atlântica	20†	1,43-3,12	42,19	JBRJ
	<i>A. falcata</i> (Poir) DC.	Porto Murtinho/MS	Chaco	40	1,34-3,32	80,88	CGMS
	<i>A. histrix</i> Poir.	Barreiras/BA	Cerrado	20	0,84-2,88	23,05	JBRJ
	<i>A. paniculata</i> Willd. ex Vogel	Porto Murtinho/MS	Chaco	22†	0,36-1,14	15,22	CGMS
<i>Dalbergia</i> L.f.	<i>D. miscolobium</i> Benth.	Transição Cerrado/Floresta Estacional	Cerrado	20	0,77-2,55	23,60	CGMS
		Bonito/MS		20	0,68-2,73	23,90	UEC
		Itirapina/SP		20	0,80-2,78	24,01	UEC
		São Roque de Minas/MG		20	0,82-2,46	23,17	CGMS
		Porto Murtinho/MS		22†	0,60-2,77	24,05	
		Feira de Santana/BA		20	1,14-2,44	32,73	JBRJ
<i>Machaerium</i> Pers.	<i>M. acutifolium</i> Vogel	Quexadá/CE	Caatinga	20	1,11-2,36	34,17	EAC
		Florianópolis/SC	Restinga	20	1,25-2,13	32,63	UEC
		Águas de Lindóia/SP	Mata Atlântica	20*	1,27-3,83	58,20	UEC
		São Roque de Minas/MG	Cerrado	20*	1,23-3,77	57,12	UEC
		Diamantina	Cerrado	20*	1,20-2,31	33,10	HDJF
		São Roque de Minas/MG	Cerrado	20*	1,18-2,35	31,88	UEC
		Campinas/SP	Cerrado	20	1,29-2,06	32,50	UEC
		Linhares/ES	Mata Atlântica	20	1,23-2,13	30,97	CVRD
		Pinheiros/ES	Mata Atlântica	20	1,19-2,18	31,23	UEC
		Rio de Janeiro/RJ	Mata Atlântica	20	1,26-2,15	32,04	JBRJ
<i>Machaerium</i> Pers.	<i>M. hirtum</i> (Vell.) Stellfeld	Jundiá/SP	Mata Atlântica	20	0,89-2,27	29,67	UEC
		Porto Ferreira/SP	Cerrado	20	0,98-2,24	28,80	UEC
		Campinas/SP	Cerrado	20†	0,96-2,03	29,30	UEC
		Linhares/ES	Mata Atlântica	20	1,01-2,32	29,85	CVRD
		Castilho/SP	Cerrado	34†	1,35-2,77	37,98	CEUL
		Jundiá/SP	Mata Atlântica	20†	0,95-2,45	30,49	UEC
		Campinas/SP	Cerrado	20*	0,86-1,92	29,47	UEC
Jundiá/SP	Mata Atlântica	20	0,96-2,02	29,38	UEC		

Tabela 02. Contagens efetuadas para representantes do clado Dalbergia s. str. disponíveis na literatura e apresentados no presente estudo.

Espécie	N	2n	Referências
subgênero <i>Aeschynomene</i>			
<i>Aeschynomene americana</i> L.	10	20	Vanni 1983; Bairiganjan & Patnaik 1989; Kumar & Kuriachan 1990; Seijo & Vanni 1999
<i>A. aspera</i> L.	19/20	38/40	Sarma 1970; Sanjapa 1979a; Sarkar <i>et al.</i> 1982; Bairiganjan & Patnaik 1989
<i>A. ciliata</i> Vogel	—	22	Presente estudo
<i>A. denticulata</i> Rudd	—	20	Fernandez 1977; Seijo & Vanni 1999
<i>A. indtea</i> L.	19/20	40	Kawakami 1930; Berger <i>et al.</i> 1958; Sarma 1970; Bir & Kumari 1977; Bir & Sidhu 1980; Sidhu & Bir 1983; Bairiganjan & Patnaik 1989; Kumari & Bir 1990
<i>A. montevidensis</i> Vogel	—	20	Krapovickas & Krapovickas 1957
<i>A. pratensis</i> Small	—	20	Berger. <i>et al.</i> 1958
<i>A. schimperii</i> Hochst. ex. A. Rich	—	20	Renard <i>et al.</i> 1983
<i>A. sensitiva</i> Sw.	—	20/22	Frahm-Leliveld 1957; Krapovickas & Krapovickas 1957; Berger <i>et al.</i> 1958; Miège 1960b; Shibata 1962; Vanni 1983; presente estudo
<i>A. viscidula</i> Michx	—	20	Turner & Fearing 1960; Seijo & Vanni 1999
subgênero <i>Ochopodium</i>			
<i>Aeschynomene afrapera</i> J. Léonard	—	80	Renard <i>et al.</i> 1983
<i>A. brasiliiana</i> (Poir.) DC.	—	20	Berger <i>et al.</i> 1958
<i>A. brevipes</i> Benth.	—	20	Alves & Custódio 1989
<i>A. elaphroxylon</i> (Guil. & Perr.) Taub	—	20/40	Auquier & Renard 1995; presente estudo
<i>A. elegans</i> Schltdl. & Cham.	—	20	Berger. <i>et al.</i> 1958; Turner & Irwin 1961
<i>A. falcata</i> (Poir) DC.	10	20	Coleman & Demenezes 1980; presente estudo
<i>A. histrix</i> Poir.	10	22	Coleman 1982, presente estudo
<i>A. leptophylla</i> Harms	—	20	Renard <i>et al.</i> 1983
<i>A. mollicula</i> Kunth.	—	20	Vanni 1983
<i>A. paniculata</i> Willd. ex Vogel	—	20/22	Vanni 1983; Seijo & Vanni 1999; presente estudo
<i>A. racemosa</i> Vogel	10	—	Coleman & Demenezes 1990
<i>A. virginica</i> (L.) Britton, Sterns & Poggenb.	—	40	Berger <i>et al.</i> 1958
<i>Dalbergia cearensis</i> Ducke	—	20	Bandel 1972; Presente estudo
<i>D. cochinchinensis</i> Pierre	—	20	Atchison 1951
<i>D. cultrata</i> Graham	10	—	Mehra 1976
<i>D. ecastaphyllum</i> (L.) Taub.	—	20	Mangenot S. & Mangenot 1962; presente estudo
<i>D. foliacea</i> Wall.	10	—	Sanjappa & Dasgupta 1981

<i>D. frutescens</i> (Vell.) Britto	—	20	Presente estudo
<i>D. hancei</i> Benth.	—	20	Yeh <i>et al.</i> 1986
<i>D. lanceolaria</i> L. f.	10	20	Atchison 1951; Bir & Kumari 1975; Bir & Kumari 1977; Sanjappa & Dasgupta 1977; Sinha & Kumar 1978; Bairiganjan & Patnaik 1989; Kumari & Bir 1990
<i>D. latifolia</i> Roxb.	10	20	Atchison 1951; Mehra 1976; Bairiganjan & Patnaik 1989; Kumari & Bir 1990; Sanjappa & Dasgupta 1981 Atchison 1951; Yeh 1986
<i>D. melanoxylon</i> Guill. & Perr.	—	20	Presente estudo
<i>D. miscolobium</i> Benth.	—	20	Bandel 1972; Presente estudo
<i>D. nigra</i> (Vell.) Alemão ex Benth.	—	20	Atchison 1951; Kumari & Bir 1990; Bir & Kumari 1977
<i>D. paniculata</i> Roxb.	10	20	Mehra 1976
<i>D. sericea</i> G. Don	10	—	
<i>D. sissoo</i> Roxb. Ex DC.	10	20	Patil 1958; Nanda 1962; Mehra 1976; Bir & Kumari 1977; IPCN 1981d; Sandhu & Mann 1988;
<i>D. spinosa</i> Roxb.	—	20	Bairiganjan & Patnaik 1989; Kumari & Bir 1990
<i>D. stipulacea</i> Roxb.	10	—	Sampathkumar & Navaneethan 1983
<i>D. stipulata</i> Wall.	10	—	Mehra 1976
<i>D. volubilis</i> Roxb.	—	20	Sarkar 1975a.
<i>Diphysa robinoides</i> Benth.	—	16	Sanjappa & Dasgupta 1977; Bairiganjan & Patnaik 1989
<i>Kotschy uguenensis</i> (Taub.) F. White	—	28	Atchison 1951
<i>Machaerium aculeatum</i> Raddi	—	20	IPCN 1981d
<i>M. acutifolium</i> Vogel	—	20	Coleman & Demenezes 1980; Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002
<i>M. brasiliense</i> Vogel	—	20	Bandel 1972; Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002; presente estudo
<i>M. fubovenosum</i> Lima	—	20	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002
<i>M. hirtum</i> (Vell.) Stehlfeld	—	20/40	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002; presente estudo
<i>M. lanceolatum</i> (Vell.) J.F. Macbr.	—	20	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002
<i>M. lunatum</i> (L.f.) Ducke	9	—	Gill & Husaini 1985; Husaini & Gill 1986
<i>M. micronulatum</i> Mart. ex Benth.	—	20	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002
<i>M. nycititans</i> (Vell.) Benth.	—	20/40	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002; presente estudo
<i>M. oblongifolium</i> Vogel	—	20	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002; presente estudo
<i>M. opacum</i> Vogel	10	34	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002; presente estudo
<i>M. pedicellatum</i> Vogel	—	20	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002
<i>M. punctatum</i> (Poir.) Pers.	—	20	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002
<i>M. scleroxylon</i> Tul.	—	20	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002
<i>M. sericiflorum</i> Vogel	—	40	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002

<i>M. stipitatum</i> (DC) Vogel	—	20	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002
<i>M. triste</i> Vogel	—	20	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002
<i>M. uncinatum</i> (Vell.) Benth.	—	20	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002
<i>M. vestitum</i> Vogel	—	20	Presente estudo
<i>M. villosum</i> Vogel	—	20	Mendonça-Filho <i>et al.</i> 2002; presente estudo
<i>Ormocarpum cochinchinense</i> (Lour.) Merr.	—	24	Yeh <i>et al.</i> 1986
<i>O. guineense</i> Hutch. <i>et</i> Dalz	—	26	Frahm-Leliveld 1960b
<i>O. megaphyllum</i> Harms	—	24	Mangenot & Mangenot 1958, 1962
<i>O. trichocarpum</i> (Taub.) Burtt-Davy	—	24	Atchison 1951
<i>Pictetia aculeata</i> (Vahl) Urb.	—	20	IPCN 1981d
<i>Smilthia bigemina</i> Dalzell	19	38	Bir & Kumari 1977; Kumari & Bir 1990; Kumar & Kuriachan 1990
<i>S. conferta</i> Sm.	—	38	Bir & Kumari 1977; Kumari & Bir 1990; Kumar & Kuriachan 1990
<i>S. racemosa</i> B. Heyne	19	—	Kumar & Kuriachan 1990
<i>S. sensitiva</i> Ailton	19	—	Sarkar <i>et al.</i> 1972

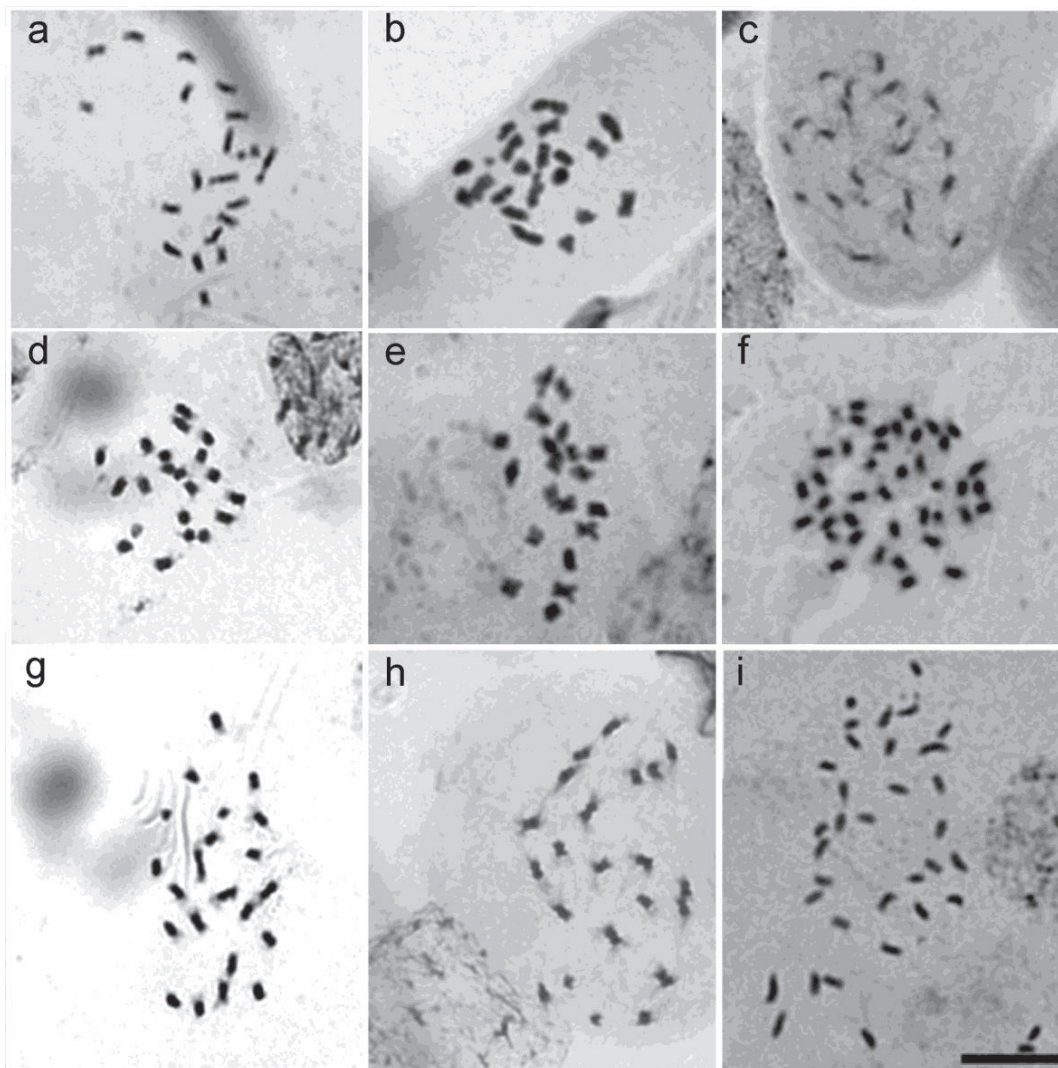


Figura 01. Números cromossômicos de espécies do clado *Dalbergia s. str.* **a)** *Aeschynomene paniculata* Willd. ex Vogel ($2n=20$); **b)** *Dalbergia miscolobium* Benth. ($2n=20$); **c)** *D. nigra* (Vell.) Alemão ex Benth. ($2n=20$); **d)** *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld ($2n=20$); **e)** *M. vestitum* Vogel ($2n=20$); **f)** *A. elaphroxylon* (Guil & Perr.) Taub. ($2n=40$); **g)** *A. ciliata* Vogel ($2n=22$); **h)** *A. paniculata* Willd. ex Vogel ($2n=22$); **i)** *M. opacum* Vogel ($2n=34$). Escala: $10\mu\text{m}$.

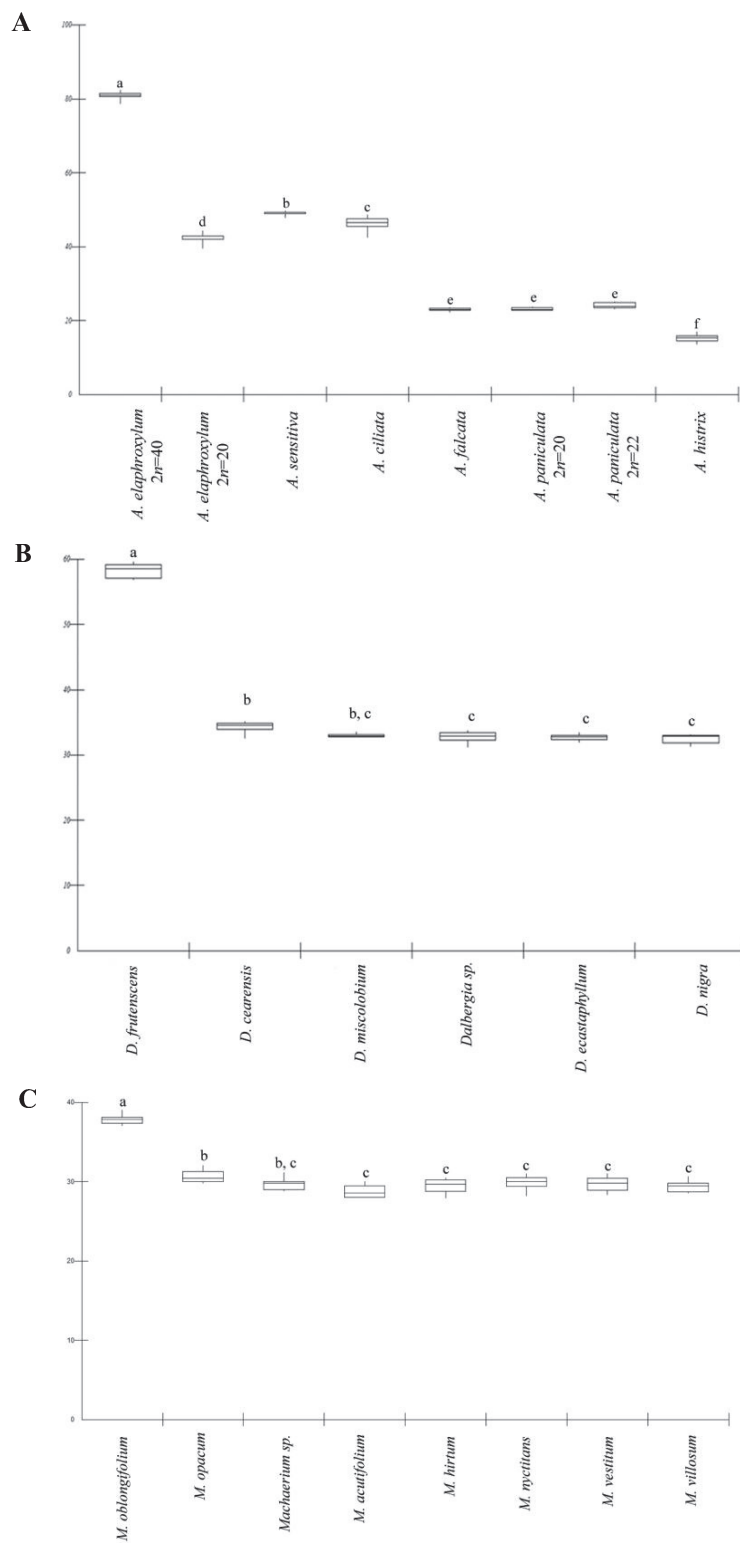


Figura 02. Comprimento Total da Cromatina (CTC) em *Aeschynemene* L. (A), *Dalbergia* L.f. (B) e *Machaerium* Pers. (C).

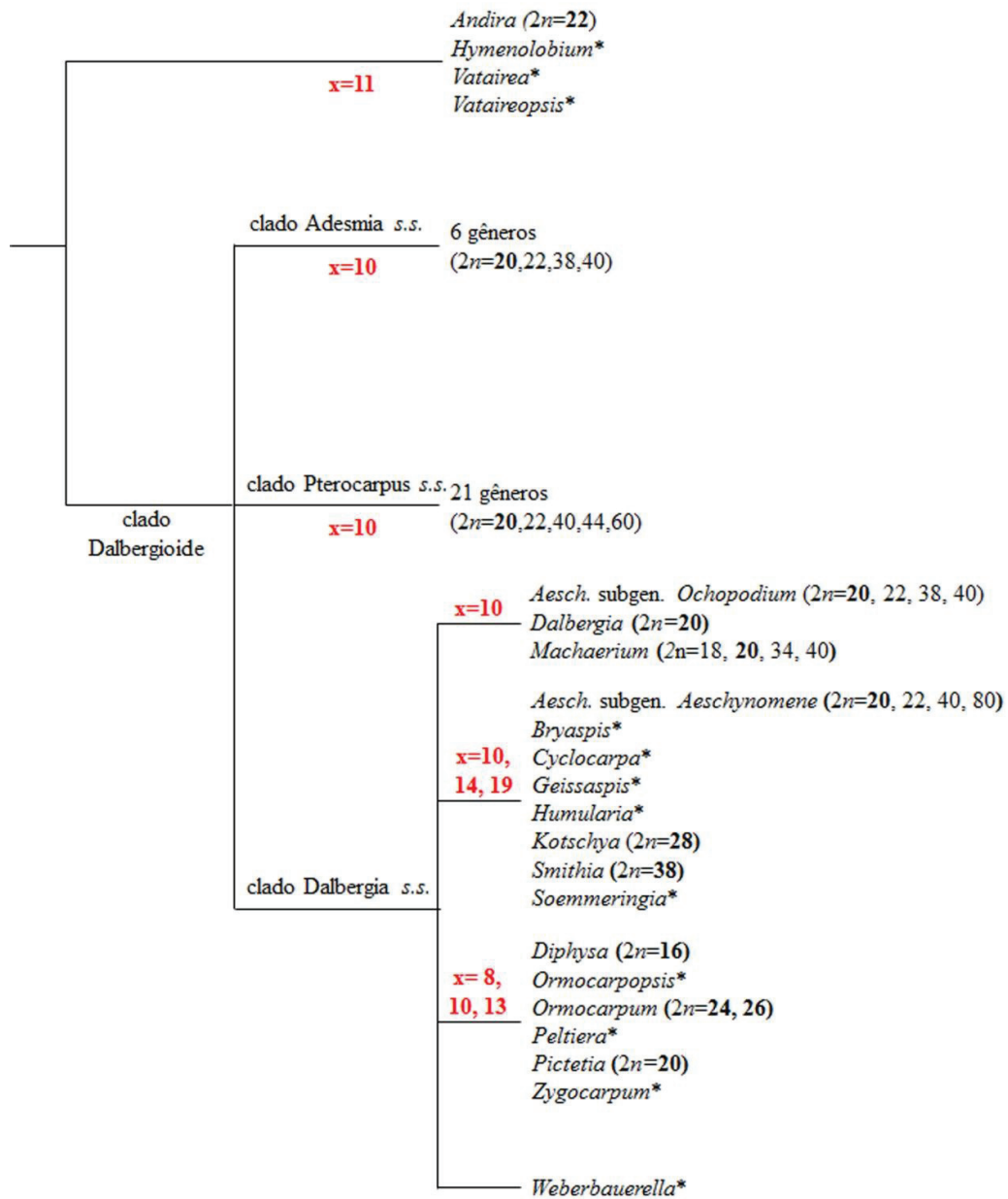


Figura 03. Prováveis números básicos (x) da tribo Dalbergieae s. l., com ênfase no clado Dalbergia s. str. $2n=$ contagem mitótica para os gêneros (em negrito estão os números predominantes por gênero). *= não há contagem cromossômica para o gênero.

CAPÍTULO 2

Caracterização cariotípica em espécies de *Dalbergieae s. l.* (Leguminosae, Papilionoideae)

RESUMO - Dalbergieae *s. l.* é uma das maiores tribos de Papilionoideae e não apresenta uma circunscrição bem definida. Nessa tribo, o gênero *Aeschynomene* está dividido em dois ramos. Estudos cromossômicos podem auxiliar na elucidação de relações evolutivas entre espécies/grupos de plantas em diferentes níveis hierárquicos, especialmente quando são aplicadas técnicas que promovem a diferenciação longitudinal nos cromossomos. Portanto, o objetivo desse estudo foi averiguar os padrões cariotípicos de 23 espécies de Dalbergieae, a partir de técnicas de bandamento CMA/DAPI e hibridização *in situ* de DNAr 5S e 45S, a fim de auxiliar no posicionamento de *Aeschynomene* e de gêneros relacionados dentro da tribo. A técnica de bandamento CMA/DAPI mostrou bandas CMA⁺/DAPI⁻ em 22 espécies, exceto para *Stylosanthes hamata* que apresentou bandas CMA⁻/DAPI⁺. Variações no número e posição das bandas CMA⁺/DAPI⁻ foram observadas. As espécies apresentaram um par de DNAr 5S e um par de DNAr 45S, localizados em cromossomos distintos. Os dois sítios de DNAr 5S foram proximais, enquanto que para o par de sítios de DNAr 45S foram proximais ou terminais, sempre co-localizados com duas bandas CMA⁺/DAPI. As mudanças de número de bandas e de posição de bandas e sítios podem estar associadas a translocações, duplicações ou transposições. Como os dados cariotípicos apresentados nesse estudo não permitiram agrupar as espécies, não foi possível contribuir para as discussões taxonômicas sobre o posicionamento de gêneros na tribo Dalbergieae ou a respeito da subdivisão do gênero *Aeschynomene*.

Palavras-chave: Fabaceae, relações evolutivas, diferenciação longitudinal, padrões cariotípicos

Introdução

Em Leguminosae uma das maiores e mais importantes tribos é Dalbergieae *s. l.*, pertencente a subfamília Papilionoideae, com 49 gêneros e cerca de 1.325 espécies, porém nos últimos anos sua circunscrição vem sofrendo alterações radicais e ainda não está bem definida (Klitgaard & Lavin 2005). O gênero *Aeschynomene* L., pertencente ao clado Dalbergia *s. str.*, está dividido em dois ramos, *Aeschynomene* subg. *Ochopodium* e *Aeschynomene* subg. *Aeschynomene* (Lavin *et al.* 2001; Ribeiro *et al.* 2002). Apesar das árvores filogenéticas estarem bem resolvidas, os autores sugerem novos estudos, especialmente em relação a *Aeschynomene* subgen. *Ochopodium*, com possibilidade deste grupo tornar-se um gênero.

Estudos cromossômicos associados a trabalhos taxonômicos podem auxiliar na elucidação de relações evolutivas entre espécies/grupos de plantas em diferentes níveis hierárquicos (Stebbins 1971; Levin 2002; Guerra 2008). Informações a respeito da diferenciação longitudinal dos cromossomos são importantes para o entendimento dos mecanismos evolutivos nas espécies, especialmente se estiverem relacionadas a características morfológicas e ecológicas das plantas (Schubert 2007; Guerra 2008).

Apesar do número considerável de pesquisas citogenéticas já reportadas para Leguminosae, esses dados não são suficientes para compor um panorama completo da evolução cromossômica da família. Estudos cromossômicos para Dalbergieae *s. l.* ainda são incipientes, sendo que a maioria restringe-se a contagens cromossômicas. Goldblatt (1981) sugeriu $x=11$ como o provável número básico da tribo, apesar de reconhecer que $n=10$ teria surgido cedo na evolução do grupo, sendo basal para a maioria dos gêneros. Bairiganjan & Patnaik (1989), em estudo realizado para diversos representantes de Papilionoideae, determinaram que gêneros pertencentes à tribo Dalbergieae *s. l.* apresentavam $x=10$. Polido *et al.* em preparação (capítulo 1) apoiaram a indicação de $x=10$ para o clado Dalbergia *s. str.* bem como para a tribo, com base na revisão de números cromossômicos disponíveis na literatura para o grupo.

Estudos cromossômicos baseados em técnicas de bandamento cromossômico e hibridização *in situ* (FISH) mostrando a diferenciação longitudinal dos cromossomos são pouco frequentes para Dalbergieae *s. l.* Na tribo, técnicas de bandamento CMA/DAPI e FISH foram utilizadas em *Arachis* L. (Seijo *et al.* 2004, 2007; Robledo & Seijo 2008, 2010; Robledo *et al.* 2009; Silva *et al.* 2010). Até o momento nenhum

trabalho baseado em bandamento cromossômico e hibridização *in situ* foi realizado para espécies do clado *Dalbergia s. str.*

Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi investigar os padrões cariotípicos de representantes de *Dalbergieae s. l.*, a partir das técnicas de bandamento CMA/DAPI e de hibridização *in situ* de DNAr 5S e 45S, de modo a encontrar marcadores cromossômicos que auxiliem o posicionamento das espécies dentro da tribo, bem como ampliar o conhecimento de dados citogenéticos em Leguminosae.

Metodologia

Material

Foram coletados frutos com sementes de 23 espécies de *Dalbergieae s. l.* de diferentes localidades e formações vegetacionais variadas (Tabela 01). Para algumas espécies foram analisadas mais de uma população, tais como *Aeschynomene histrix* Poir. (2), *A. paniculata* Willd. ex Vogel (4), *Dalbergia frutescens* (Vell.) Britto (2), *D. miscolobium* Benth. (2) e *D. nigra* (Vell.) Alemão ex Benth. (4). Materiais testemunha foram depositados nos Herbários CEUL, CGMS, CVRD, EAC, JBRJ, HDJF e UEC.

Germinação de sementes e tratamento das raízes

As sementes foram colocadas para germinar em Gerbox[®] com papel filtro umedecido em câmara incubadora BOD a 25°C. Radículas recém emergidas foram pré-tratadas em solução de 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) a 0.002M, por 20-24 horas a 10°C. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução de etanol absoluto: ácido acético glacial (3:1, v:v) por 20-24 horas à temperatura ambiente e estocadas a – 20°C até o preparo das lâminas.

Bandamento CMA/DAPI

As raízes foram lavadas em água destilada e digeridas em solução enzimática (1% macerozima, 2% celulase e 20% pectinase) por 30-50 minutos a 37°C. As pontas das raízes foram colocadas sobre lâminas e maceradas em ácido acético 60%, cobertas com lamínulas e congeladas em nitrogênio líquido para a remoção da lamínula. As lâminas selecionadas foram envelhecidas por três dias à temperatura ambiente e coradas com CMA por 1 hora e contracoradas com DAPI por 30 minutos (Moraes *et al.* 2007). As lâminas foram montadas com meio glicerol/McIlvaine. Após observação e registro dos

dados, as melhores lâminas foram descoradas e estocadas a -20°C para posterior aplicação da técnica de FISH.

Hibridização *in situ* (FISH)

A sonda D2, contendo o gene de DNA ribossomal 5S de *Lotus japonicus* (Pedrosa *et al.* 2002) e a sonda R2, contendo a região do DNAr 18S–5.8S–25S de *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck *et al.* 1997) foram utilizadas para localizar os genes de DNA ribossomais. As sondas foram marcadas por *nick translation* (Roche Biochemicals, UK) utilizando digoxigenina-11-dUTP (Roche Biochemicals, UK) e biotina-14-dATP (Roche Biochemicals, UK), respectivamente. A hibridização *in situ* foi realizada segundo Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000), com modificações. As lâminas foram tratadas com RNase por 1 hora a 37°C , com pronase-E por sete minutos a 37°C , fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos a TA e desidratadas em série alcoólica. A mistura de hibridização foi composta por formamida 50%, dextran 10%, SDS 10%, $2\times$ SSC, sondas DNAr 5S e 45S (ambas 3,33ng/uL) e água. As lavagens de estrigência (77%) foram realizadas em $0,1\times$ SSC a 42°C . As sondas foram detectadas por anticorpos ligados ao fluorocromo, sendo o DNAr 5S detectado por anti-digoxigenina-Rodamina (Roche Biochemicals, UK) e o DNAr 45S pela Avidina-FITC (Roche Biochemicals, UK). As lâminas foram montadas em DAPI-Vectashield (Vector).

Observação das lâminas e registro dos resultados

As lâminas obtidas a partir de bandamento CMA/DAPI e FISH foram examinadas em microscópio Leica DM2500, com câmera DFC360 FX acoplada e as imagens foram capturadas utilizando programa LAS 3.6 (Media Cybernetics, Inc.). O programa Adobe Photoshop CS4 PT-BR (Adobe Systems, Inc.) foi utilizado para auxiliar no balanceamento uniforme de cores, contraste e brilho.

Resultados

A técnica de bandamento CMA/DAPI foi aplicada para as 23 espécies, enquanto a técnica de FISH não foi realizada para *Aeschynomene elaphroxylon* (Guil. & Perr.) Taub. (citótipo $2n=40$), *Dalbergia* sp., *Geoffroea striata* (Will.) Morong, *Stylosanthes hamata* (L.) Taub e *Zornia reticulata* Sm. Os números cromossômicos para as 23 espécies analisadas estão apresentados na Tabela 1.

Padrão de bandas CMA/DAPI

A técnica de bandamento CMA/DAPI mostrou bandas CMA⁺/DAPI⁻ (bandas brilhantes com CMA e negativas com DAPI) e bandas CMA⁻/DAPI⁺ (bandas negativas com CMA e brilhantes com DAPI). Foram observadas variações no número e posição das bandas CMA⁺/DAPI⁻, que permitiram caracterizar alguns táxons e citótipos (Tabela 01, Figuras 01 e 02).

Em *Aeschynomene* observaram-se quatro espécies com duas bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais (*A. ciliata*, *A. elaphroxylon*, *A. falcata* e *A. paniculata*; Figura 02A, E, F) e duas com quatro bandas CMA⁺/DAPI⁻: duas proximais e duas terminais (*A. histrix* e *A. sensitiva* Sw.; Figura 01C, I). No citótipo poliploide de *A. elaphroxylon*, com $2n=40$, foram encontradas quatro bandas CMA⁺/DAPI⁻, exatamente o dobro de bandas do citótipo diploide (Figura 1H). O par de bandas terminais CMA⁺/DAPI⁻ foram localizadas no par de cromossomos acrocêntricos, sendo que cromossomos desta morfologia são uma característica do gênero *Aeschynomene* à exceção de *A. falcata*, em que a banda CMA⁺/DAPI⁻ está localizada em um par de cromossomos metacêntrico com satélite (Figura 01E, I).

Os resultados para *Dalbergia* e *Machaerium* foram bastante homogêneos, 12 das 13 espécies analisadas destes dois gêneros apresentaram duas bandas CMA⁺/DAPI⁻, apenas variando a posição entre proximal ou terminal (Figuras 01K, M; 02A, C). Apenas *M. opacum* Vogel diferiu desses resultados, com oito bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais (Figura 02E).

Geoffroea striata apresentou duas e quatro bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais nos citótipos diploides e tetraploides, respectivamente (Figura 02G, H). Em *S. hamada* foram observadas bandas proximais CMA⁻/DAPI⁺ em quase todos os cromossomos do complemento (Figura 02I), enquanto em *Z. reticulata* foram observadas duas bandas CMA⁺/DAPI⁻ proximais (Figura 01J).

Distribuição de DNAr 5S e 45S

Em relação aos sítios de DNA ribossomal (DNAr), todas as espécies apresentaram um par de DNAr 5S e um par de DNAr 45S, localizados em pares de cromossomos distintos. Os resultados para DNAr 5S foi idêntico para as 19 espécies analisadas: dois sítios de DNAr 5S proximais, enquanto que para o par de sítios de DNAr 45S houve variação entre proximais e terminais, mas todos co-localizados com duas bandas CMA⁺/DAPI. Em *Aeschynomene* todos os sítios de DNAr 45S são

proximais (Tabela 01, Figuras 01 B, D, G, J). Porém tanto para *Dalbergia* quanto para *Machaerium*, essa posição variou, sendo proximal para *D. cearensis*, *D. nigra*, *M. hirtum*, *M. oblongifolium*, *M. vestitum* e *M. villosum* (Tabela 01, Figuras 01 N; 02 D) e terminal para *D. ecastaphyllum*, *D. frutescens*, *D. miscolobim*, *Machaerium* sp., *M. acutifolium*, *M. nyctitans* e *M. opacum* (Tabela 01, Figuras 01 L; 02 B, F).

Discussão

O número cromossômico predominante foi $2n=20$, ocorrendo em 18 espécies. Mais informações a respeito de número cromossômico ver capítulo 1. Das 23 espécies analisadas, 22 apresentaram bandas $CMA^+/DAPI^-$. Outros gêneros de Leguminosae demonstraram $CMA^+/DAPI^-$, tais como *Cicer* L. (Galasso *et al.* 1996), *Sesbania* Scop. (Forni-Martins 1999), *Senna* Mill. (Souza & Benko-Iseppon 2004) e *Crotalaria* L. (Mondin *et al.* 2007; Mondin & Aguiar-Perecin 2011). Porém algumas espécies destes gêneros - *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby (Souza & Benko-Iseppon 2004), *Crotalaria incana* L. (Mondin & Aguiar-Perecin 2011) - apresentaram bandas $CMA^-/DAPI^+$. Em representantes de *Arachis* L. (Robledo & Seijo 2008), foram encontradas bandas $CMA^-/DAPI^+$. Desse modo, confirma-se a variação no padrão de bandamento da família, sendo que os diferentes tipos de heterocromatina presentes em Leguminosae são importantes para demonstrar relações entre espécies, fornecendo evidências de mecanismos de reestruturação do genoma dentro de gêneros ou famílias (Mondin & Aguiar-Perecin 2011). A variação no número e na posição das bandas $CMA^+/DAPI^-$ observadas dentro de *Aeschynomene*, *Dalbergia* e *Machaerium* podem indicar rearranjos nas sequências de DNA repetitivo que ocorreram durante a diversificação das espécies, como translocações, relatado para algumas espécies de *Crotalaria* (Mondin *et al.* 2007; Mondin & Aguiar-Perecin 2011). Em *Aeschynomene* além da translocação, pode ter ocorrido duplicação, pois se observa um maior número de bandas para *A. sensitiva* e *A. histrix*.

Todas as espécies analisadas apresentaram dois sítios de DNAr 5S e dois sítios de DNAr 45S, sendo que este último sempre esteve co-localizado com bandas ricas em CG (CMA^+). Segundo Guerra (2000), em plantas, sítios ricos em CG são frequentemente associados com DNAr 45S. Essa co-localização já foi documentada para gêneros da família, tais como *Cicer* (Galasso *et al.* 1996), *Phaseolus* (Moscone *et al.* 1999) e *Crotalaria* (Mondin *et al.* 2007; Mondin & Aguiar-Perecin 2011; Morales *et*

al. 2012). Mesmo em espécies com mais de duas bandas CMA⁺/DAPI⁻ (*A. sensitiva*, *A. elaphroxylon* - $2n=40$, *A. histrix* e *M. opacum*) observou-se apenas dois sítios de DNAr, 45S, um indicativo que nem todas as regiões ricas em CG são co-localizadas com sítios de DNAr 45S. A posição terminal do DNAr 45S encontrada em 13 das 19 espécies analisadas não é comum em Leguminosae, uma vez que, em geral, nessa família encontra-se sítios de DNAr 45S intersticiais ou proximais (Roa & Guerra 2012). No entanto, sítios de DNAr 45S terminais já foram relatados para alguns representantes de Leguminosae, como por exemplo, em *Phaseolus* (Moscone *et al.* 1999). Nesse gênero a posição terminal dos sítios DNAr 45S permite a mobilidade do mesmo e conseqüentemente a sua dispersão para outros cromossomos (Pedrosa-Harand *et al.* 2006). Elementos transponíveis também devem ser considerados na movimentação das bandas, uma vez que já foi registrado em *Aegilopsis speltoides* Tausch. (Raskina *et al.* 2004; 2008).

A variação na posição dos sítios de DNAr 45S (terminal ou proximal) intragenérica em *Dalbergia* e *Machaerium* é uma novidade para Leguminosae, uma vez que até o presente momento os sítios são exclusivamente proximais, como em *Lens* (Galasso 2003) e *Arachis* (Robledo *et al.* 2009) ou restritamente terminais, tais como *Pisum* (Fuchs *et al.* 1998) e *Phaseolus* (Moscone *et al.* 1999). Mudanças de posição de sítios podem estar associadas a mudanças estruturais como inversões ou transposições por elementos móveis (Dubcovsky & Dvorak 1995; Raskina *et al.* 2008). A mesma transposição que pode estar atuando na posição das bandas, especialmente em *Dalbergia* e *Machaerium*, pode estar ocorrendo para os sítios de DNAr 45S, uma vez que foi observada esta mesma correlação para espécies de *Crotalaria* (Morales *et al.* 2012) e *Bifrenaria* (Moraes *et al.*, em preparação).

Os sítios de DNAr 5S foram observados na região proximal dos cromossomos em todas as espécies analisadas, condição frequente em angiospermas, estimado para 50% das espécies (Roa & Guerra 2012). Hanson *et al.* (1996) sugeriu que a localização de sítios de DNAr na posição intersticial e proximal poderia oferecer estabilidade no cariótipo durante a evolução das espécies. Essa sugestão foi confirmada no estudo efetuado por Ansari *et al.* (1999) com espécies de *Trifolium* L. e concorda com os dados observados aqui para 19 espécies.

Estudos efetuados a partir de hibridização *in situ* em Leguminosae indicam alta frequência de sítios DNAr 5S e 45S localizados no mesmo cromossomo, tal como observado em *Trifolium* (Ansari *et al.* 1999), *Phaseolus* (Pedrosa *et al.* 2006) e

Crotalaria (Mondin & Aguiar-Perecin 2011). Porém, para representantes de *Lens* Miller (Galasso 2003) e *Arachis* (Robledo & Seijo 2008, 2010) os sítios de DNAr 5S e 45S encontram-se em cromossomos distintos, como para todas as espécies analisadas nesse estudo.

Diante dos dados cariotípicos apresentados neste estudo, não foi possível fornecer uma diversidade cariotípica para subsidiar as discussões taxonômicas sobre o posicionamento dos gêneros na tribo Dalbergieae. Entretanto, os dados mostraram cariótipos dinâmicos, com os eventos de alterações cromossômicas numéricas e estruturais operando ativamente em todos os gêneros analisados – e por consequência não permitindo a separação das entidades taxonômicas. Variações em relação ao número e posição de bandas CMA/DAPI e sítios de DNAr 5S e 45S ocorreram devido rearranjos estruturais, tais como translocação e duplicação ou ainda movimentação mediada por elementos móveis.

Referências bibliográficas

- Ansari, HA; Ellison, NW; Reader, SM; Badaeva, ED; Friebe, B; Miller, TE & Willians, WM. 1999. Molecular cytogenetic organization of 5S and 18-26S rDNA loci in white clover (*Trifolium repens* L) and related species. **Annals of Botany** **83**: 199-206.
- Bairiganjan, GC & Patnaik, SN. 1989. Chromosomal evolution in Fabaceae. **Cytologia** **54**: 51-64.
- Dubcovsky J & Dvorak J. 1995. Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes. **Genetics** **140**: 1367–1377.
- Forni-Martins, ER & Guerra, M. 1999. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. Species (Fabaceae). **Caryologia** **52**: 97-103.
- Fuchs, J; Kühne, M & Schubert, I. 1998. Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent *in situ* hybridization. **Chromosoma** **107**(4): 272-276.
- Galasso I. 2003. Distribution of highly repeated DNA sequences in species of the genus *Lens* Miller. **Genome** **46**(6): 1118–1124.
- Galasso, I; Frediani, M; Maggiani, M; Cremonini, R & Pignone, D. 1996. Chromatin characterization by banding techniques *in situ* hybridization and nuclear DNA content in *Cicer* l. (Leguminosae). **Genome** **39**: 258-265.
- Gill, LS & Husaini, SWH. 1985. Cytology of some arborescent Papilionoideae (Leguminosae) of Southern Nigeria. **Boletim da Sociedade Broteriana** **58**(2): 187-200.

- Goldblatt, P. 1981b. Cytologia and the phylogeny of Leguminosae. In: Polhill, RM & Raven, PH. (Eds.). **Advances in Legume Systematics**. Kew: Royal Botanical Garden, p. 427 - 463.
- Guerra, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research** **120**: 339-350.
- Guerra, M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology** **23**: 1029–1041.
- Hanson, RE; Islam-Faridi, MN; Percival, EA; Crane, CF; Ji, Y; McKnight, TD; Stelly, D & Price, HJ. 1996. Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. **Chromosoma** **105**: 55-61.
- Klitgaard, BB & Lavin, M. 2005. Dalbergieae *sensu lato*. In: Lewis, GP; Schire, B; Mackinder, B & Lock, M. 2005. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew. p.309-335.
- Lavin, M; Pennington, RT; Klitgaard, BB; Sprent, JI; Lima, HC & Gasson, PE. 2001. The dalbergioid legumes (Fabaceae): delimitation of a Pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany** **88**: 503–533.
- Leitch AR & Leitch IJ. 2012. Ecological and genetic factors linked to contrasting genome dynamics in seed plants. **The New Phytologist** **194**: 629–646.
- Levin, DA. 2002. **The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution**. Oxford University Press. 230p.
- Mondin, M & Aguiar-Perecin, MLR. 2011. Heterochromatin patterns and ribosomal DNA loci distribution in diploid and polyploid *Crotalaria* species (Leguminosae, Papilionoideae) and inferences on karyotype evolution. **Genome** **54**: 718–726.
- Mondin, M; Santos-Serejo, JA & Aguiar-Perecin, MLR. 2007. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. **Genetics and Molecular Biology** **30**: 65-72.
- Moraes, AP; Soares-Filho, WS & Guerra, M. 2007. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. **Chromosome Research** **15**: 115-121.
- Morales, AG; Aguiar-Perecin, MLR & Mondin, M. 2012. Karyotype characterization reveals anup and down of 45S and 5S rDNA sites in *Crotalaria* (Leguminosae-Papilionoideae) species of the section Hedriocarpae subsection Macrostachyae. **Genetic Resources Crop Evolution** **59**: 277–288.
- Moscone, EA; Klein, F; Lambrou, M; Fuchs, J & Schweizer, D. 1999. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). **Genome** **42**: 1224-1233.

- Pedrosa-Harand, A; De Almeida, CCS; Mosiolek, M; Blair, MW; Schweizer, D & Guerra, M. 2006. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. **Theoretical and Applied Genetics** **112**(5): 924-933.
- Pedrosa, A; Sandal, N; Stougaard, J; Schweizer, D & Bachmair, A. 2002. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. **Genetics** **161**(4): 1661-1672.
- Raskina, O; Barber, JC; Nevo, E & Belyayev, A. 2008. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: Speciation-related events in plant genomes. **Cytogenetic and Genome Research** **120**(3-4): 351-357.
- Raskina, O; Belyayev, A. & Nevo, E. 2004. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. **Chromosome Research** **12**: 153-161.
- Ribeiro, RA; Lavin, M; Lemos-Filho, JP; Mendonça-Filho, CV; Santos, FR & Lovato, MB. 2007. The genus *Machaerium* (Leguminosae) is more closely related to *Aeschynomene* sect. *Ochopodium* than to *Dalbergia*: inferences from combined sequence data. **Systematic Botany** **32**(4): 762-771.
- Roa, F & Guerra, M. 2012. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. **BMC Evolutionary Biology** **12**: 225.
- Robledo, G & Seijo, G. 2010. Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: A new proposal for genome arrangement. **Theoretical and Applied Genetics** **121**(6): 1033-1046.
- Robledo, G & Seijo, G. 2008. Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using fluorescence in situ hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. **Genetics and Molecular Biology** **31**(3): 717-724.
- Robledo, G; Lavia, GI & Seijo, G. 2009. Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. **Theoretical and Applied Genetics** **118**(7): 1295-1307.
- Schubert, I. 2007. Chromosome evolution. **Current Opinion in Plant Biology** **10**: 109-115.
- Schwarzacher, TP & Heslop-Harrison, P. 2000. **Practical in situ hybridization**. Bios, Oxford. 203p.
- Seijo, JG; Lavia, GI; Fernández, A; Krapovickas, A; Ducasse, D & Moscone, EA. 2004. Physical mapping of the 5S and 18S-25S rDNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany** **91**(9): 1294-1303.
- Seijo, JG; Lavia, GI; Fernández, A; Krapovickas, A; Ducasse, D; Bertoli, DJ & Moscone, EA. 2007. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis*

hypogaea, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. **American Journal of Botany** **94**(12): 1963-1971.

Silva, SC; Martins, MIG; Santos, RC; Peñaloza, APS; Melo-Filho, PA; Benko-Iseppon, AM; Valls, JFM & Carvalho, R. 2010. Karyological features and banding patterns in *Arachis* species belonging to the Heteranthae section. **Plant Systematics and Evolution** **285**(3-4): 201-207.

Souza, MGC & Benko-Iseppon, AM. 2004. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionioideae species of Pará, Amazonas, Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** **144**: 181-191.

Stebbins GL. 1971. **Chromosomal evolution in higher plants**. Addison Wesley, Reading. 216p.

Wanzenböck, EM; Schöfer, C; Schweizer, D & Bachmair, A. 1997. Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal of Botany** **11**: 1007-101.

Tabela 01. Caracterização cromossômica de espécies da tribo Dalbergieae s. l.

Espécie	Local de Coleta	Formação Vegetacional	Número cromossômico	Bandamento CMA/DAPI		Hibridização <i>in situ</i>	
				CMA ⁺ /DAPI ⁺	CMA ⁺ /DAPI ⁻	DNAr 5S	DNAr 45S
subg. Aeschynomene							
<i>Aeschynomene ciliata</i> Vogel	Porto Murтинho/MS	Chaco	22	-	2term	2prox	2term
<i>A. sensitiva</i> Sw.	Linhares/ES	Mata Atlântica	22	-	2term/4prox	2prox	2term
subg. Ochopodium							
<i>Aeschynomene elaphroxyton</i> (Guil. & Perr.) Taub.	Rio de Janeiro/RJ	Mata Atlântica	20 40	-	2term 4term	2prox -	2term -
<i>A. falcata</i> (Poir.) DC	Porto Murтинho/MS	Chaco	20	-	2term	2prox	2term
<i>A. histrix</i> Poir.	Barreiras/BA	Cerrado	22	-	2term/4prox	2prox	2term
	Porto Murтинho/MS	Chaco	22	-	2term/4prox	2prox	2term
<i>A. paniculata</i> Willd. ex Vogel	Bonito/MS	Cerrado/ Floresta Estacional	20	-	2term	prox	2term
	Itirapina/SP	Cerrado	20	-	2term	2prox	2term
	São Roque de Minas/MG	Cerrado	20	-	2term	2prox	2term
	Porto Murтинho/MS	Chaco	20 22	-	2term 2term	2prox 2prox	2term 2term
Dalbergia sp.							
<i>D. cearensis</i> Ducke	Feira de Santana/BA	Cerrado	20	-	2term	-	-
<i>D. ecastaphyllum</i> (L.) Taub.	Queixadá/CE	Caatinga	20	-	2prox	2prox	2prox
<i>D. frutescens</i> (Vell.) Britto	Florianópolis/SC	Restinga	20	-	2term	2prox	2term
	Águas de Lindóia/SP	Mata Atlântica	20	-	2term	2prox	2term
	São Roque de Minas/MG	Cerrado	20	-	2term	2prox	2term
<i>D. miscolobium</i> Benth.	Diamantina	Cerrado	20	-	2term	2prox	2term
	São Roque de Minas/MG	Cerrado	20	-	2term	2prox	2term
<i>D. nigra</i> (Vell.) Alemão ex Benth.	Campinas/SP	Cerrado	20	-	2prox	2prox	2prox
	Linhares/ES	Mata Atlântica	20	-	2prox	2prox	2prox
	Pinheiros/ES	Mata Atlântica	20	-	2prox	2prox	2prox
	Rio de Janeiro/RJ	Mata Atlântica	20	-	2prox	2prox	2prox
<i>Geoffroea striata</i> (Will.) Morong	Porto Murтинho/MS	Chaco	20 40	-	2term 4term	- -	- -
Machaerium sp.							
<i>M. acutifolium</i> Vogel	Jundiá/SP	Mata Atlântica	20	-	2term	2prox	2term
	Porto Ferreira/SP	Cerrado	20	-	2term	2prox	2term

<i>M. hirtum</i> (Vell.) Stellfeld	Campinas/SP	Cerrado	20	–	2prox	2prox	2prox
<i>M. nyctitans</i> (Vell.) Benth.	Linhares/ES	Mata Atlântica	20	–	2term	2prox	2term
<i>M. oblongifolium</i> Vogel	Castilho/SP	Cerrado	20	–	2prox	2prox	2prox
<i>M. opacum</i> Vogel	Jundiá/SP	Mata Atlântica	34	–	8term	2prox	2term
<i>M. vestitum</i> Vogel	Campinas/SP	Cerrado	20	–	2prox	2prox	2prox
<i>M. villosum</i> Vogel	Jundiá/SP	Mata Atlântica	20	–	2prox	2prox	2prox
<i>Stylosanthes hamata</i> (L.) Taub.	Porto Murtinho/MS	Chaco	40	ca. 30prox	–	–	–
<i>Zornia reticulata</i> Sm.	Porto Murtinho/MS	Chaco	20	–	2prox	–	–

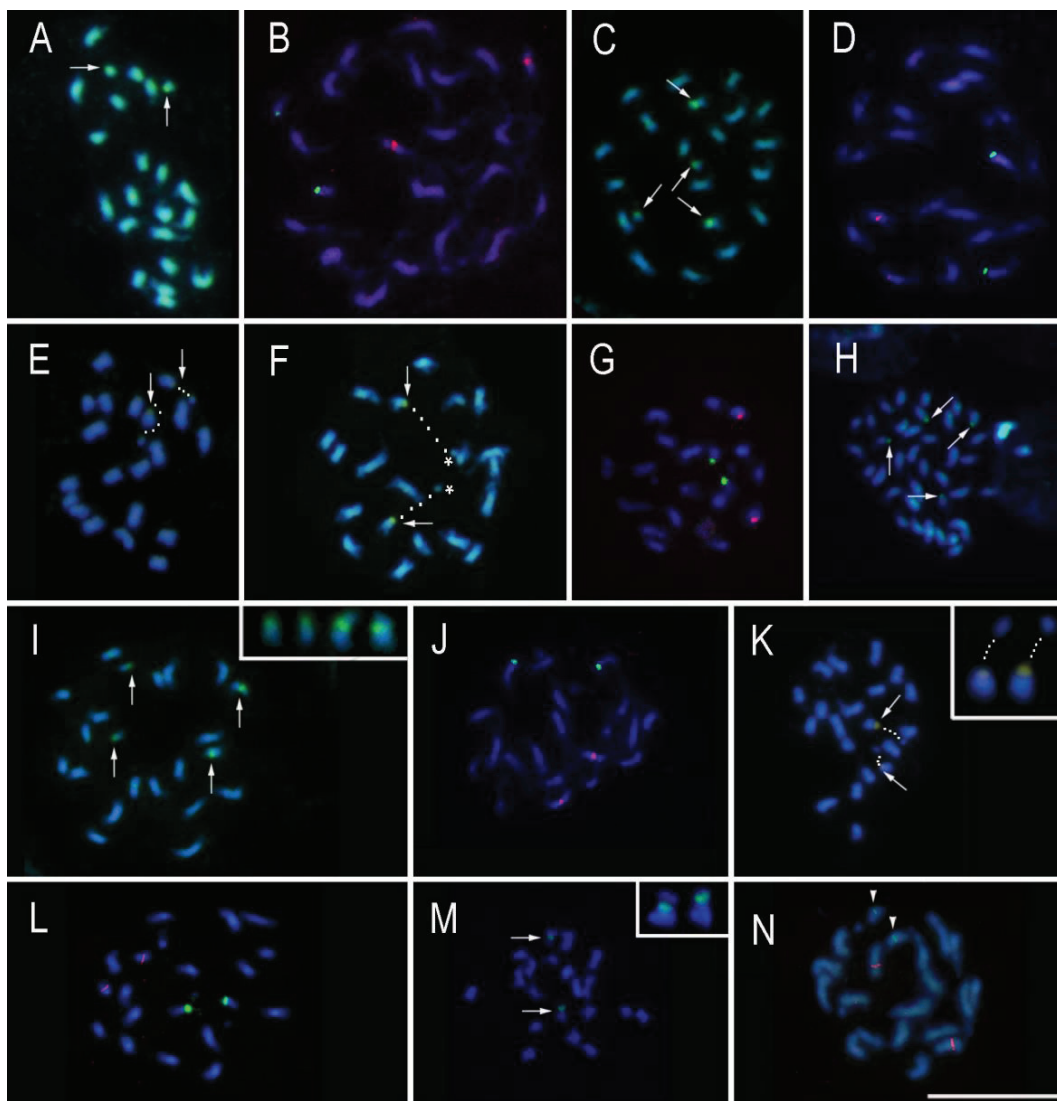


Figura 01. Bandamento CMA/DAPI e FISH em metáfases de integrantes do clado Dalbergioidé. **A, B;** *Aeschynomene ciliata*; **C, D.** *A. sensitiva*, **E.** *A. falcata*; **F, G.** *A. elaphroxylon* ($2n=20$), **H.** *A. elaphorylon* ($2n=40$), **I, J.** *A. histrix*, **K,L.** *Dalbergia miscolobium*, **M, N.** *D. nigra*. Sinais vermelhos e verdes em B, C, F, I, K e M indicam sítios de DNAr 5S e 45S, respectivamente. Setas indicam banda CMA⁺/DAPI, cabeças de setas indicam sítios de DNAr 45S, pontilhados indicam DNAr 45S distendido ligando o cromossomo ao satélite (asterisco). Detalhe em I indica cromossomos acrocêntricos com bandas terminais e cromossomo metacêntrico com banda proximal; detalhe em K indica cromossomos satelitados com bandas CMA e detalhe em M indica par cromossômico com banda CMA⁺/DAPI proximal em cromossomo submetacêntrico. Barra em N indica 10 μ m.

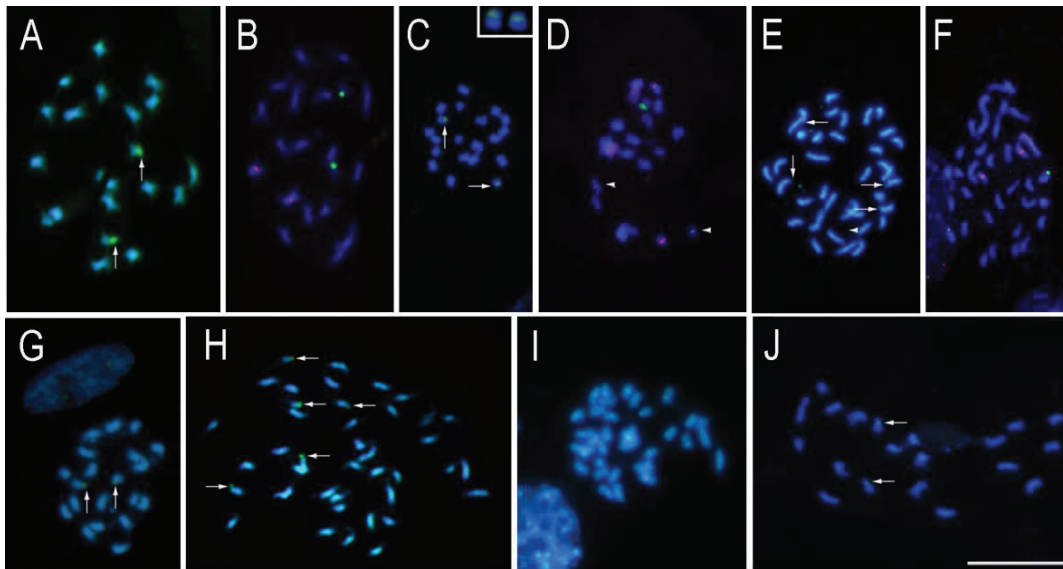


Figura 02. Bandamento CMA/DAPI e FISH em metáfases de integrantes do clado Dalbergióide. **A, B.** *Machaerium nycitans*, **C, D.** *M. hirtum*, **E, F.** *M. opacum*, **G.** *Geoffroea striata* ($2n=20$); **H.** *G. striata* ($2n=40$); **I.** *Stylosanthes hamata*, **J.** *Zornia reticulata*. Sinais vermelhos e verdes em A, C e E indicam sítios de DNAr 5S e 45S, respectivamente. Setas indicam banda CMA⁺/DAPI⁻, cabeças de setas indicam sítios de DNAr 45S. Barra em J indica 10 μ m.

CAPÍTULO 3

Characterization of 11 microsatellite loci for *Aeschynomene falcata* (Leguminosae) and cross-amplification in related species

Este capítulo foi redigido de acordo com as normas para a publicação no periódico American Journal of Botany.

Polido et al. - Aeschynomene microsattellites

**CHARACTERIZATION OF 11 MICROSATELLITE LOCI FOR *AESCHYNOMENE FALCATA*
(LEGUMINOSAE) AND CROSS-AMPLIFICATION IN RELATED SPECIES¹**

CAROLINE A. POLIDO^{2,5}, CAMILA C. MANTELLO³, ANA P. MORAES⁴, ANETE P. SOUZA^{2,3}, AND
ELIANA R. FORNI-MARTINS²

²Departamento de Biologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil; ³Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), CP 6110, Universidade Estadual de Campinas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil; ⁴Centro de Ciências Naturais e Humanas, Programa de Pós-Graduação em Evolução e Diversidade, Universidade Federal do ABC – UFABC, CEP 09201-580, Santo André, SP, Brazil.

Number of words: 1,083

¹Manuscript received _____; revision accepted _____.

The work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP, Project N° 2011/22215-3 to APM and 2010/19132-6) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Project N° 471708/2010-0). The authors thank FM Alves and RT Queiroz for sample collection.

⁵Corresponding author: carol.bioveg@gmail.com

ABSTRACT

- *Premise of the study:* *Aeschynomene falcata*, a native Leguminosae forage, was employed to develop and characterize a microsatellite library. The transferability of loci was also tested using four related species.
- *Methods and Results:* Leaf samples were collected from *A. falcata*, *A. brevipes*, *A. paniculata*, *Dalbergia nigra* and *Machaerium vestitum*. A total of 23 microsatellite loci were developed, 11 amplified and 7 were polymorphic. The observed and expected heterozygosities ranged from 0.0000 to 0.7143 and from 0.1287 to 0.8360, respectively. The polymorphism information content varied from 0.1167 to 0.7786. Nine microsatellite loci were cross-amplified in *A. brevipes* and *A. paniculata* and seven in *D. nigra* and *M. vestitum*.
- *Conclusions:* These microsatellite loci are the first microsatellite markers developed for the genus, and may be used in population and diversity studies for the conservation and germoplasma management.

Keywords: *Aeschynomene*; cross-amplification; forage; Fabaceae; microsatellite.

INTRODUCTION

Aeschynomene falcata (Poir.) DC. (Leguminosae) is an important forage species because of its high persistence, resistance to intensive grazing and tolerance to soils of low fertility. However, the seeds of this species are not produced in sufficient quantities for marketing, because of their low fertility (Jones et al. 2000), and productivity must be increased by plant breeding techniques. Microsatellite or simple sequence repeats (SSRs) markers are considered optimal for planning crosses in breeding programs (Rocha et al. 2002), since they provide a measure of the genetic distance among strains. Moreover, microsatellite cross-amplification represents a potential source of variation in evolutionary conservation and taxonomic studies.

The present microsatellite library was developed and characterized in *A. falcata* (subg. *Ochopodium*), and cross-amplification of the SSRs was tested in *A. brevipes* Benth., *A. paniculata* Willd. ex Vogel, *Dalbergia nigra* (Vell.) German ex Benth., and *Machaerium vestitum* Vogel.

METHODS AND RESULTS

A microsatellite-enriched genomic library was obtained for *A. falcata*, according to Billote et al. (1999). Leaf samples were collected from two populations of *A. falcata* (Minas Gerais State – 12 individuals; Mato Grosso do Sul State – three individuals). Transferability tests employed samples of *A. brevipes* (Mato Grosso do Sul State – five individuals), *A. paniculata* (São Paulo State – five individuals), *D. nigra* and *M. vestitum* (São Paulo State – two individuals, for both species). Additional information on the populations and specimen vouchers are provided in Appendix 1. The genomic DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

The DNA samples were digested with *Afa I* (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and ligated to the adapters 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' and 5'-TAGTCCACGGTAAGCAAGAGCACA-3'. Enrichment was performed using a hybridization-based capture with (GT)₈ and (CT)₈, biotin-linked probes and streptavidin magnetic-coated beads (Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles; Promega, Madison, Wisconsin, USA). The enriched fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR), ligated to the pGEM-T easy vector (Promega) and transformed into *Escherichia coli* XL1-Blue competent cells (Stratagene, Carlsbad, California, USA). Recombinant colonies were selected by White/Blue screening. A total of 56 selected recombinant colonies were bidirectionally sequenced using an automated ABI PRISM 377 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) with T7 and SP6 primers and the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The sequences were aligned and edited with the Seqman program (DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA). MICROSAT software (CIRAD) was used to eliminate the adaptors and restriction sites of the sequences. The microsatellite regions were identified and characterized using the program Gramene (Temnykh et al. 2001). As a criterion for the SSR selection, the sequences that showed at least five dinucleotide repeats; four trinucleotide repeats; and three tetra-, penta- and hexanucleotide repeats were selected. A total of twenty-three primer pairs were designed using the software PrimerSelect (DNASTAR). The microsatellite loci were amplified using PCR performed in a 20 µL total volume containing 15 ng template DNA, 1x PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 8 mM dNTPs, 0.04% BSA, 0.5 mM each forward and reverse primer and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). A Biorad C1000™ Thermal Cycler (Biorad, Hercules, California, USA) was used for the PCR with the following program: an initial denaturation at 94°C for 2 min; 2x 10 cycles (-1°C per cycle) for three different temperature of touchdown, 65°C-55°C, 60°C-50°C and 55°C-45°C (94°C for 1 min, 65°C, 60°C or 55°C for 1 min and 72°C for 2 min), followed by 18 cycles (94°C for 1 min, 55°C, 50°C or 45°C for 1 min and 72°C for 2 min) and a final extension of 72°C for 5 min. The amplification products were analyzed by electrophoresis through 3% agarose gels stained with

ethidium bromide and were genotyped using a 6% denaturing polyacrylamide gel stained with silver nitrate (Creste et al. 2001) and the genotyper Advance FS96 (Advanced Analytical Technologies, Inc, Ames, Iowa, USA). The product sizes were determined by comparison to a DNA ladder. A 10 bp ladder (Invitrogen) was included on the polyacrylamide gel, and a ladder supplied with the Advance FS96 genotyping kit was used with the genotyper. Due to the low number of individuals of two populations of *A. falcata*, for the statistical analysis they were analyzed together, not as two different populations. Analysis of the expected and observed heterozygosity were performed using TFPGA software (Miller 1997), and the Polymorphism Information Content was determined using Pic Calculator (Kemp 2002).

Among the 23 microsatellite loci developed, 11 were amplified in *A. falcata* (Table 1), seven of which were polymorphic. A total of 34 different alleles were identified, with a mean of 4.85 alleles per locus, ranging from two to seven. The observed and expected heterozygosities ranged from 0.0000 to 0.7143 and from 0.1287 to 0.8360, respectively. The polymorphism information content varied from 0.1167 to 0.7786 (Table 1). From these 11 amplified loci, nine amplified in *A. brevipes* and *A. paniculata* samples and from these loci, six amplified both in *D. nigra* and *M. vestitum*, plus another unique loci in each species (Table 2). Two microsatellite loci (Aesfal8 and Aesfal10) showed more than one region of amplification. The Aesfal8 locus presented a monomorphic region (size estimated as 147 bp) for all the species, whereas a polymorphic region was present only in the *A. falcata* sample. The Aesfal10 locus presented two polymorphic regions, one exclusive for *A. falcata* and the other observed only in related species.

CONCLUSIONS

Here we report the first microsatellite markers developed for the genus *Aeschynomene*. The 11 markers and the cross-amplification for the other two genera, *Dalbergia* e *Machaerium*, confirmed that all are useful for future studies of genetic diversity, conservation and in breeding programs. Furthermore these developed markers can be used, in a new approach, as additional marker on cytotaxonomy, by *in situ* hybridization.

LITERATURE CITED

- BILLOTTE, N., P. J. R. LAGODA, A. M. RISTERUCCI, AND F. C. BAURENS. 1999. Microsatellite-enriched libraries: Applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277 – 288.
- BEGUM, R., ALAM, S. S., MENZEL, G. & SCHMIDT, T. 2009. Comparative molecular cytogenetics of major repetitive sequence families of three *Dendrobium* species (Orchidaceae) from Bangladesh. *Annals of botany* 104: 863–72.

- CRESTE, S., A. TULMANN NETO, AND A. FIGUEIRA. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299 – 306.
- JONES, R. M., C. K. MCDONALD, R. J. CLEMENTS, AND G. A. BUNCH. 2000. Sown pastures in subcostal south-eastern Queensland: pasture composition, legume persistence and cattle liveweight gain over 10 years. *Tropical Grasslands* 34: 21-37.
- KEMP, S. 2002. PIC Calculator Extra. Website <http://www.genomics.liv.ac.uk/animal/pic.html> [accessed 4 September 2012].
- KLITGAARD, B.B. & M. LAVIN. 2005. Dalbergieae *sensu lato*. In: Lewis, GP; Schire, B; Mackinder, B & Lock, M. 2005. Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew. 577p.
- MILLER, M. P. 2000. TFPGA – Tools for populations genetics analyses. V 1.3 A Window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.
- RIBEIRO, R. A., M. LAVIN, J. P. LEMOS-FILHO, C. V. MENDONÇA-FILHO, F, R, SANTOS, AND M. B. LOVATO. 2007. The genus *Machaerium* (Leguminosae) is more closely related to *Aeschynomene* Sect. *Ochopodium* than to *Dalbergia*: inferences from combined sequence data. *Systematic Botany* 32(4): 762-771.
- ROCHA, R. B., J. I. M. ABAD, I.E., PIRES, AND E. F. ARAÚJO. 2002. Fingerprint and genetic diversity analysis of *Eucalyptus* ssp. genotypes using RAPD and SSR markers. *Scientia Florestalis* 62: 24-31.
- TEMNYKH, S., G. DECLERCK, A. LUKASHOVA, L. LIPOVICH, S. CARTINHO, AND S. MCCOUCH. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research* 11: 1441 – 1452.
- WILSON, G. P. M. 1980. Bargoo jointvetch: tough legume for tough country. *Agricultural Gazette of New South Wales* 91: 51-53.

TABLE 1. Genetic characterization of 11 microsatellite loci amplified for *Aeschynomene falcata* (Poir.) DC. ($n = 15$).

Primer	Primer sequences (5'-3')	Repeat motif	T _a (°C)	Allele sizes (bp)	A	H ₀	H _e	PIC	GenBank accession number
Aesfal1	F: GGCCGCAC TAGT GATTCCTTG R: TTGTTACAGTCATGGCAGGTG	(TGG) ₅	TD55-45	172	01	—	—	—	JX870529
Aesfal3	F: TGCAGGCAAAACATAGAGC R: TTCGTCACCTTCATTCAC	(AAAAC) ₃	TD55-45	205-211	02	0.2000	0.5080	0.3705	JX870530
Aesfal5	F: AGGGAAGGGAGGGAATGGAGAG R: CCCGCAAAAACAACACAGAGT	(GT) ₁₅	TD65-55	196-206	07	0.3846	0.8031	0.7406	JX870531
Aesfal7	F: CAACAGCCTCCTCCACACC R: AGGCCTCCACGCATCAG	(AC) ₉	TD55-45	300	01	—	—	—	JX870532
Aesfal8	F: AGAAGAACGGATGATGGAGAA R: CTGTTGAAAAGTGCCTAGG	(GAA) ₄	TD60-50	249-261	05	0.2667	0.7448	0.6739	JX870533
Aesfal10	F: TTATACAGCTGGAGCAAAACAT R: GCAAGTAAAAGTCGAGAAAAGAG	(GAA) ₆	TD65-55	154-157	02	0.0000	0.1287	0.1167	JX870534
Aesfal11	F: CTTCCCTCATGTTTGTGCTAC R: GAGTGTGGCGGTGAGTCT	(GT) ₈	TD60-50	198-220	07	0.3333	0.7862	0.7245	JX870535
Aesfal13	F: ATTGCTGGCTATGGTTATT R: GATGAGGTCGCCAAAAGA	(GT) ₅	TD60-50	305	01	—	—	—	JX870536
Aesfal14	F: CGGACTTCATGGGGTTCTA R: CCGGATAAATGAGGGTGAG	(AC) ₁₀	TD60-50	254-266	05	0.0000	0.6805	0.6005	JX870537
Aesfal16	F: CTGCGCCCTCTCCCTCATT R: ACTCTAGTCCTGGCGTGGTTGC	(CA) ₅	TD65-55	150-193	06	0.7143	0.8360	0.7786	JX870538
Aesfal20	F: CGCCAAATGAGAGAACTGAGA R: AACATGCTTATGATTGATGAAA	(CT) ₅	TD55-45	240	01	—	—	—	JX870539

Note: n = number of individuals tested; A = number of alleles per locus; T_a = annealing temperature; TD = touchdown; H_0 = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity; — = not applicable; PIC = polymorphism information content.

TABLE 2. The microsatellite loci of *A. falcata* tested for cross-amplification in 14 individuals of four species.

Primer	<i>Aeschynomene brevipes</i> Benth. (n=5)	<i>Aeschynomene paniculata</i> Willd. ex Vogel (n=5)	<i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Alemão ex Benth. (n=2)	<i>Machaerium vestitum</i> Vogel (n=2)
Aesfal1	+	+	+	+
Aesfal3	-	-	-	-
Aesfal5	+	+	-	-
Aesfal7	+	+	+	+
Aesfal8	+	+	+	+
Aesfal10	+	+	+	+
Aesfal11	-	-	-	-
Aesfal13	+	+	+	+
Aesfal14	+	+	-	+
Aesfal16	+	+	+	+
Aesfal20	+	+	+	-

Note: n = number of individuals tested; + = successful amplification; - = failed amplification.

APPENDIX 1. Taxa used in this study.

Species	Geographical location	Latitude	Longitude	Voucher Number
<i>A. falcata</i>	Passos, Minas Gerais State, Brazil	20°49'17"S	46°37'01"W	UEC 148660
	Porto Murtinho, Mato Grosso do Sul State, Brazil	21°41'50"S	57°41'17"W	CGMS 19860
<i>A. brevipes</i>	Porto Murtinho, Mato Grosso do Sul State, Brazil	21°41'50"S	57°41'17"W	CGMS 19828
<i>A. paniculata</i>	Campinas, São Paulo State, Brazil	22°48'53"S	47° 05'46"W	UEC 169750
<i>D. nigra</i>	Campinas, São Paulo State, Brazil	22°48'53"S	47° 04'02"W	UEC 169748
<i>M. vestitum</i>	Campinas, São Paulo State, Brazil	22°48'53"S	47° 04'02"W	UEC 169749

CGMS = Herbarium of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; UEC = Herbarium of the Universidade Estadual de Campinas

CAPÍTULO 4

A utilização de novas sequências de DNA como sondas para hibridização *in situ* em representantes de Dalbergieae s. l. (Leguminosae, Papilionoideae)

RESUMO - A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) localiza sequências de DNA diretamente nos cromossomos, ampliando o número de marcadores passíveis de análise e auxiliando na resolução de complexos taxonômicos e no entendimento da evolução cariotípica. Portanto, novas sequências de DNA são altamente desejáveis para uma melhor caracterização cromossômica. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi aprofundar as análises cromossômicas de seis espécies da tribo Dalbergieae *s. l.* a partir de sondas de bibliotecas genômicas de BACs de *Phaseolus vulgaris* e de bibliotecas de microssatélites (SSR) de *Aeschynomene falcata*. Foram testadas 10 sondas de BACs de *P. vulgaris* e cinco de SSR de *A. falcata*. Das sondas BACs testadas, apenas uma foi mapeada em um par cromossômico de *A. sensitiva*, sendo que a falta de marcação das demais sequências e nas demais espécies deve estar relacionadas com a distância filogenética de *P. vulgaris* e espécies do clado Dalbergioidae. Em relação ao SSR, das cinco sondas, três funcionaram em *A. falcata*, o que pode indicar que a falta de sinais possa estar associado ao não agrupamento das sequências de tamanho reduzido.

Palavras-chave: Leguminosae, Dalbergieae *s. l.*, cromossomos artificiais de bactérias, microssatélites

Introdução

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) permite localizar sequências de DNA diretamente nos cromossomos ou em núcleos interfásicos, baseando-se na complementaridade de bases entre o DNA do cromossomo - alvo - e o fragmento de DNA marcado - sonda (Guerra 2004). O desenvolvimento da técnica determinou a transição da era da citogenética clássica para a era da citogenética molecular (Jiang & Gill 2006). Essa técnica amplia o número de marcadores passíveis de análise, e assim, quando comparados entre grupos taxonômicos, pode auxiliar na resolução de complexos taxonômicos e até mesmo no entendimento da evolução cariotípica.

As sequências repetitivas em tandem, tais como os genes ribossomais (DNAr 5S e 45S), sequências centroméricas e teloméricas, além das famílias de DNA satélite, são mais facilmente visualizadas nos cromossomos e representam os principais tipos de sonda. As sondas historicamente mais utilizadas na citogenética vegetal são as correspondentes aos DNAr 5S e 45S, principalmente devido ao alto grau de conservação e tamanho de sítio grande o suficiente para permitir a sua visualização (Guerra 2004).

Contudo, essas sequências são altamente conservadas, variando apenas quanto ao número e/ou posição e mais raramente quanto à sequência das regiões não transcritas, entre espécies relacionadas. Desse modo, a busca por novas sequências de DNA para serem utilizadas na caracterização cromossômica é bastante desejável, ampliando o número de marcadores. Essas sequências podem ser tanto de cópia simples ou repetitivas, como as de DNA satélite e microssatélites.

As bibliotecas genômicas de BACs (Cromossomos Artificiais de Bactérias) oferecem uma fonte inestimável de sequências de DNA que podem ser utilizadas como sonda (Hasterok *et al.* 2006). Estes vetores permitem localizar sequências de cópia única ou poucas cópias e, se ancoradas no mapa genético, podem fornecer relações entre mapas cromossômico e genético. Bibliotecas genômicas construídas em BACs foram elaboradas para várias espécies de interesse econômico, sendo que em parte delas os BACs foram localizados nos cromossomos, tais como *Solanum tuberosum* L. (Dong *et al.* 2000), *Oryza sativa* L. (Cheng *et al.* 2002), *Brassica oleraceae* L. (Howell *et al.* 2002), *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Islam-Farid *et al.* 2002), *Musa balbisiana* Colla (Safár *et al.* 2004), *Gossypium barbadense* L. (Wang *et al.* 2006) e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (Moraes *et al.* 2008), além das leguminosas *Medicago truncatula* Gaertn. (Kulikova *et*

al. 2001), *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (Pedrosa *et al.* 2002) e *Phaseolus vulgaris* L. (Pedrosa-Harand *et al.* 2009; FôNSECA *et al.* 2010).

As sequências de microssatélite (SSR) são constituídas de monômeros de 1 a 6 nucleotídeos organizados em tandem (Schmidt & Heslop-Harrison 1996). São raramente utilizados como sondas cromossômicas, apesar de formarem blocos de nucleotídeos passíveis de serem mapeados por FISH. Uma biblioteca de SSR apresenta diversas sequências características de uma espécie, ou ainda, apenas de populações de uma espécie (Li *et al.* 2004). Desta forma, essas sequências podem ser mapeadas diretamente nos cromossomos, servindo como indicação de separação/união entre espécies, ou ainda servir como marcador espécie-específico como recentemente demonstrado em *Dendrobium* (Begum *et al.* 2009).

Desse modo, o presente estudo tem como objetivos aprofundar as análises cromossômicas de seis espécies de Dalbergieae *s. l.*, a partir de sondas provenientes de bibliotecas genômicas de BACs de *Phaseolus vulgaris* e de bibliotecas de microssatélites de *Aeschynomene falcata* (Poir) DC.

Metodologia

Material

Seis espécies da tribo Dalbergieae *s. l.* foram utilizadas neste estudo: *Aeschynomene falcata*, *A. sensitiva* Sw, *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub., *D. nigra* (Vell.) Allemão ex Benth., *Machaerium nyctitans* (Vell.) Benth. e *M. vestitum* Vogel.

Preparação cromossômica

As pontas de raízes obtidas a partir de sementes recém-germinadas foram pré-tratadas em solução de 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) a 0,002M, por 20-24 horas a 10°C, fixadas em solução de etanol absoluto: ácido acético glacial (3:1, v:v) por 20-24 horas à temperatura ambiente e estocadas a – 20°C. Para o preparo das lâminas as raízes foram lavadas em água destilada e digeridas em solução enzimática (1% macerozima, 2% celulase e 20% pectinase) por 30-50 minutos a 37°C. As pontas de raízes foram maceradas em ácido acético 60%, cobertas com lamínula e congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula. Para seleção das melhores metáfases, as lâminas foram observadas através de contraste de fase.

Isolamento de novas sequências

Extração de DNA genômico

O DNA genômico de *Aeschynomene brevipes* Benth., *A. falcata*, *A. paniculata* Willd ex Vogel, *D. nigra* e *M. vestitum* foi extraído e utilizado na construção da biblioteca de microssatélites, na amplificação dos *locus* de SSR e para a hibridização de BACs em membrana. A extração do DNA foi efetuada a partir de folhas secas em sílica gel ou de material fresco, utilizando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose 1%.

Preparação de sondas a partir de BACs de *Phaseolus vulgaris*

Os BACs de *Phaseolus* pertencem a uma biblioteca genômica de *Phaseolus vulgaris* “BAT93” (Kami *et al.* 2006). Os clones foram pré-selecionados a partir de Fonsêca *et al.* (2010): 18B15 (cópia única), 38C24 (cópia única), 225P10 (cópia única), 21N14 (disperso), 25D1 (disperso), 169G16 (disperso), 36H21 (disperso), 163I7 (cópia única + fracamente disperso), 127J2 (única + fracamente disperso) e 92I7 (pericentromérico). Os BACs foram purificados através da técnica de miniprep utilizando o Mini Plasmid Kit (Qiagen).

As sondas BACs foram marcadas diretamente com Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP (Life technologies), através de *nick-translation* (Roche).

Preparação de sondas a partir de SSRs de *Aeschynomene falcata*

A biblioteca de microssatélites de *Aeschynomene falcata* foi construída em parceria com pesquisadores do Laboratório de Análise de Genética Molecular do CEBMEG/UNICAMP. O protocolo utilizado para construção da biblioteca foi Billotte *et al.* (1999). O procedimento completo está em Polido *et al.* (Capítulo 3).

Dos 23 loci de SSR, 11 amplificaram em *A. falcata*, nove em *A. brevipes* e *A. paniculata* e sete amplificaram em *D. nigra* e *M. vestitum*. Foram escolhidos cinco SSR aleatoriamente para serem utilizados como sondas: Aesfal1 (monomórfico), Aesfal8 (monomórfico em uma região e polimórfico em outra), Aesfal10 (duas regiões polimórficas), Aesfal11 (polimórfico), Aesfal13 (duas regiões monomórficas). As sondas foram marcadas diretamente com Cy3-dUTP (Life Technologies) por *nick translation* (Roche).

Hibridização fluorescente *in situ*

A hibridização *in situ* foi realizada segundo Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000), com pequenas modificações. A hibridização foi realizada com nível de estrigência de 73%. As lâminas foram tratadas com RNase 1% por 1 hora a 37°C e com pronase-E por 10 minutos a 37°C. A seguir, foram fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos a TA, seguido de desidratação alcoólica. A mistura de hibridização foi composta por formamida 50%, dextran 10%, SDS 10%, 2xSSC, sondas BACs ou SSR (ambas 3,33ng/uL), e água. As lavagens de estrigência foram realizadas em 0,1xSSC a 42°C. As lâminas foram montadas em DAPI-Vectashield. As lâminas foram examinadas em microscópio Leica DM2500, com câmera DFC360 FX acoplada e as imagens foram capturadas utilizando programa LAS 3.6 (Media Cybernetics, Inc.).

Resultados e discussão

Em relação às 10 sondas BACs de *P. vulgaris* testadas apenas 18B15 foi mapeada na região proximal de um par cromossômico de *A. sensitiva* (Figura 01B). Em *P. vulgaris* esta sequência 18B15 também foi identificada como apresentou sinal único (Fonseca *et al.* 2010), à semelhança do observado em *A. sensitiva*. A não marcação dos demais nove BAC nas outras cinco espécies testadas pode estar relacionado com a distância filogenética entre *Phaseolus* (tribo Phaseoleae) e as espécies aqui estudadas (tribo Dalbergieae), uma vez que as tribos não são relacionadas filogeneticamente (Lewis *et al.* 2005) e sequências encontradas em um gênero, ou até mesmo em uma espécie, podem ser exclusivas.

Entretanto, isso não explica totalmente a marcação seletiva de uma única sequência (18B15) apenas em *A. sensitiva*. A outra espécie do gênero, *A. falcata*, mostrou resultado semelhante ao das espécies de *Dalbergia* e *Machaerium*. Seguindo a classificação de Klitgaard & Lavin (2005), *A. sensitiva* (subgen. *Aeschynomene*) está separada filogeneticamente de *A. falcata* (subgen. *Ochopodium*), o que pode ser um indicativo de que apenas espécies do subgen. *Aeschynomene* possam apresentar tal sequência. Há a sugestão de que a separação entre os dois subgêneros seja grande o suficiente para a separação de subgen. *Ochopodium* em um outro gênero e a utilização desta sequência em um maior número de espécies de ambos os subgêneros poderá confirmar se esta sequência será útil na resolução deste complexo.

Almeida & Pedrosa-Harand (2011) utilizaram sequências de *P. vulgaris* em *P. lunatus* L. (Bng-G, Bng-K e SJ19.12) e as mesmas foram detectadas na segunda espécie, inclusive localizadas no mesmo braço dos cromossomos 6, 9 e 10, respectivamente. Posteriormente, a partir de 16 BACs de *P. vulgaris*, Bonifácio *et al.* (2012) elaboraram um mapa citogenético para *P. lunatus*, demonstrando uma estabilidade cariotípica do gênero.

Estudos realizados por Mendes *et al.* (2011) a partir da construção do mapa citogenético de *Citrus medica* L. com BACs de *Poncirus trifoliata* Raf. demonstraram que essas sequências apresentaram-se conservadas entre *Citrus* e *Poncirus*, estabelecendo homeologias entre os gêneros proximamente relacionados. Assim, uma solução para utilizar sondas-BACs em espécies de Dalbergieae seria a construção de bibliotecas genômicas e seleção de sequências a partir de espécies da própria tribo. Entretanto, até o presente momento, nenhuma biblioteca referente à Dalbergieae foi construída.

Para as sondas SSR de *A. falcata*, foram observados sinais apenas na própria espécie usada para construção da biblioteca. Das cinco sequências testadas como sonda, três foram mapeadas (Aesfal.1, Aesfal.8 e Aesfal.11), cada uma em um par de cromossomos na região proximal (Figura 01D; Figuras 02B, D). A falta de marcação das outras duas sequências via FISH deve-se, provavelmente, ao tamanho do sítio destas sequências nos cromossomos, os quais devem estar abaixo do limite de sensibilidade da técnica. O mesmo deve se aplicar para as demais espécies testadas, uma vez que o teste de transferenciabilidade por PCR mostrou amplificação de todas as cinco sequências de SSR testadas também em *A. brevipes*, *A. paniculata*, *D. nigra* e *M. vestitum* (Polido *et al.*, in preparação).

Entretanto, em *Dendrobium* foi possível detectar sinais de SSR obtidas de *D. moschatum* (Buch.-Ham.) Sw (DmoF11, DmoF14 e DmoB22) em espécies próximas, além de SSR DmoF11 ter sido observado inclusive em espécies de outros gêneros analisados [*Nageliella angustifolia* (Booth ex Lindl.) Ames *et* Correl, *Oncidium sphacelatum* L. and *Phalaenopsis lueddemanniana* var. *purpurea* (Rchb.f.) Sweet.] (Begum *et al.* 2009). Sendo assim, em *Dendrobium*, diferentemente do observado em *Aeschynomene*, as sequências podem estar presentes no ancestral das espécies analisadas, não sendo consideradas exclusivas para um grupo de espécies.

A conservação de loci de SSR em espécies de Leguminosae estreitamente relacionadas já foi documentada. Dayanandan *et al.* (1997) documentou o sucesso na

transferenciabilidade de SSR de *Pithecellobium elegans* Ducke em outras espécies da tribo Ingeae. Para a tribo Dalbergieae, estudos realizados com *Arachis* (Koppolu *et al.* 2010; Palmieri *et al.* 2010) mostraram grande índice de transferenciabilidade, inclusive entre espécies de secções diferentes. Porém, trabalhos utilizando SSR da família como sondas para a técnica de FISH são inexistentes.

Diante da utilização de sondas de BACs de *Phaseolus vulgaris* e de SSR de *Aeschynomene falcata*, foi observada uma baixa frequência dessas sequências nas espécies analisadas. No caso de sondas de BACs, isso pode estar relacionado ao fato das sequências serem provenientes de uma espécie com distância filogenética significativa da tribo Dalbergieae. Já para sondas de SSR, apesar do pequeno tamanho que essas sequências ocupam nos cromossomos, muitas vezes abaixo do limite de sensibilidade da técnica, três sequências foram mapeadas em um única espécie, novamente indicando uma separação entre os dois subgêneros de *Aeschynomene*. Porém, é necessário aplicar tais sequências em um maior número de espécies para comprovar tal segregação.

Referências Bibliográficas

- Almeida, C & Pedrosa-Harand, A. 2011. Contrasting rDNA evolution in Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) and Common Bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). **Cytogenetic and Genome Research** **132**: 212-217.
- Billotte, N; Lagoda, PJR; Risterucci, AM & Baurens, FC. 1999. Microsatellite-enriched libraries: Applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits** **54**: 277 – 288.
- Begum, R; Alam, SS; Menzel, G & Schmidt, T. 2009. Comparative molecular cytogenetics of major repetitive sequence families of three *Dendrobium* (Orchidaceae) from Bangladesh. **Annals of Botany** **104**: 863-872.
- Bonifácio, EM; Fonsêca, A; Almeida, C; Santos, KGB & Pedrosa-Harand, A. 2012. Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics** **124**: 1513-1520.
- Cheng, Z; Presting, GG; Buell, CR; Wing, A & Jiang, J. 2001. High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. **Genetics** **157**: 1749-1757.
- Dayanandan, S; Bawa, KS & Kesseli, R. 1997. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). **American Journal of Botany** **84**(12): 1658-1663.
- Dong, F; Song, J; Naess, SK; Helgeson, JP; Gebhardt, C & Jiang, J. 2000. Development

- and application of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. **Theoretical and Applied Genetic** **101**: 1001-1007.
- Fonsêca, A; Ferreira, J; Santos, TRB; Mosiolek, M; Bellucci, E; Kami, J; Gepts, P; Geffroy, V; Schweizer, D; Santos, Karla GB & Pedrosa-Harand, A. 2010. Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Chromosome Research** **18**(4): 487-502.
- Guerra, M. 2004. Hibridização *in situ*: princípios básicos. In: Guerra, M. (Org.) **FISH- Conceitos e aplicações na citogenética**. 1^a ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2004. 1-32p.
- Howell, EC; Barker, GC; Jones, GH; Kearsley, MJ; King, GJ; Kop, EP; Ryder, CD; Teakle, GR; Vicente, JG & Armstrong, SJ. 2002. Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of *Brassica oleracea*. **Genetics** **161**: 1225-1234.
- Islam-Faridi, MN; Childs, KL; Klein, PE; Hodnett, G; Menz, MA; Klein, RR; Rooney, WL; Mullet, JE; Stelly, DM & Price, HJ. (2002) A molecular cytogenetic map of sorghum chromosome: 1. Fluorescence *in situ* hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes. **Genetics** **161**: 345–353.
- Jiang, J & Gill, BS. 2006. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. **Genome** **49**: 1057-1068.
- Kami, J; Poncet, V; Geffroy, V & Gepts, P. 2006. Development of four phylogenetically-arrayed BAC libraries and sequence of the APA locus in *Phaseolus vulgaris*. **Theoretical and Applied Genetics** **112**: 987-998.
- Koppolu, R; Upadhyaya, HD; Dwivedi, SL; Hoisington, DA & Varshney, RK. 2010. Genetic relationships among seven sections of genus *Arachis* studied by using SSR markers. **BMC Plant Biology** **10**(15): 1-12.
- Kulikova, O; Gualtieri, G; Geurts, R; Kim, DJ; Cook, D; Huguet, T; Jong, JH; Frans, PF & Bisseling, T. 2001. Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. **The Plant Journal** **27**: 49–58.
- Li, YC; Korol, AB; Fahima, T & Nevo, E. Microsatellites within genes: structure, function and evolution. 2004. **Molecular Biology and Evolution** **21**: 991-1007.
- Mendes, S; Moraes, AP; Mirkov, TE & Pedrosa-Harand, A. 2011. Chromosome homeologies and high variation in heterochromatin distribution between *Citrus* L. and *Poncirus* Raf. As evidenced by comparative cytogenetic mapping. **Chromosome Research** **19**: 521-530.
- Moraes, AP; Mirkov, TE & Guerra, M. 2008. Mapping the chromosomes of *Poncirus trifoliata* Raf. By BAC-FISH. **Cytogenetic and Genome**: 277-281.
- Palmieri, DA; Bechara, MD; Curi, RA; Monteiro, JP; Valente, SES; Gimenes, MA & Lopes, CR. 2010. Genetic diversity analysis in the section *Caulorrhizae* (genus *Arachis*) using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology** **33**(1):

109-118.

- Pedrosa-Harand, A; Kami, J; Gepts, P; Geffroy, V. & Schweizer, D. 2009. Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. **Chromosome Research** **17**: 405-417.
- Pedrosa-Harand, A; Porch, T & Gepts, P. 2008. Standard nomenclature for common bean chromosomes and linkage groups. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative** **51**: 106-107.
- Pedrosa, A; Sandal, N; Stougaard, J; Schweizer, D & Bachmair, A. 2002. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. **Genetics** **161**(4): 1661-1672.
- Safár, J; Noa-Carrazana, JC; Vrána, J; Bartons, J; Alkhimova, O; Sabau, X; Simková, H; Lheureux, F; Caruana, ML; Dole, J & Piffanelli, P. 2004. Creation of a BAC Resource to study the Structure and Evolution of the Banana (*Musa balbisiana*). **Genome** **47**: 1182–1191.
- Sambrook, J; Fritsch, EF & Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2 end Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt, T & Heslop-Harrison, JS. 1996. The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **93**: 8761–8765.
- Temnykh, S; Declerck, G; Lukashova, A.; Lipovich, L; Cartinhour, S & McCouch, S. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome Research** **11**: 1441 – 1452.
- Wang, XF; Ma, J; Wang, WS; Zheng, YM; Zhang, GY; Liu, CJ & Ma ZY. 2006. Construction and Characterization of the First Bacterial Artificial Chromosome Library for the Cotton Species *Gossypium barbadense* L. **Genome** **49**(11):1393-8.

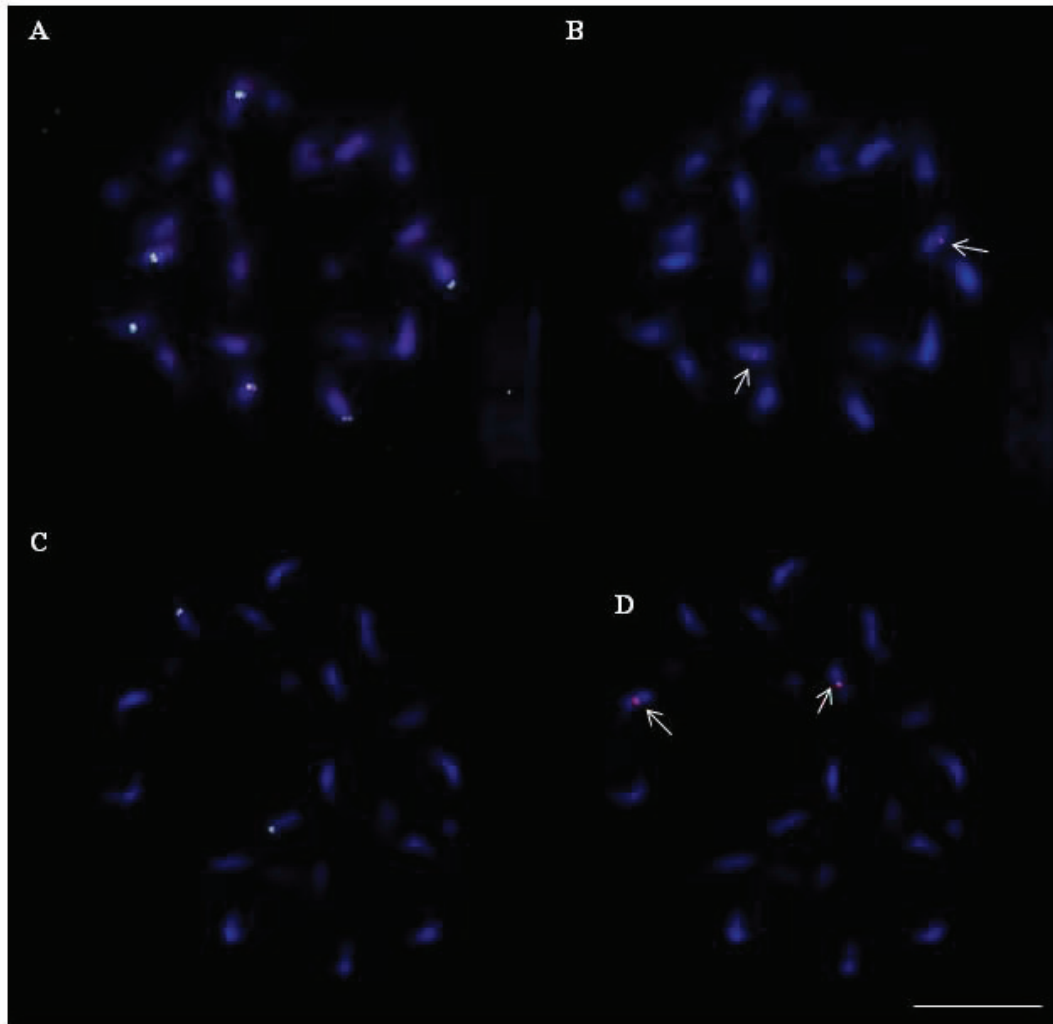


Figura 01. Hibridização *in situ* a partir de sondas de BACs e SSR: **A, B.** *Aeschynomene sensitive*; **A.** Bandas CMA⁺; **B.** BAC 18B15. **C, D.** *A. falcata*; **C.** Bandas CMA⁺; **D.** SSR Aesfal.1. As setas indicam as marcações nos cromossomos. Escala: 10µm.

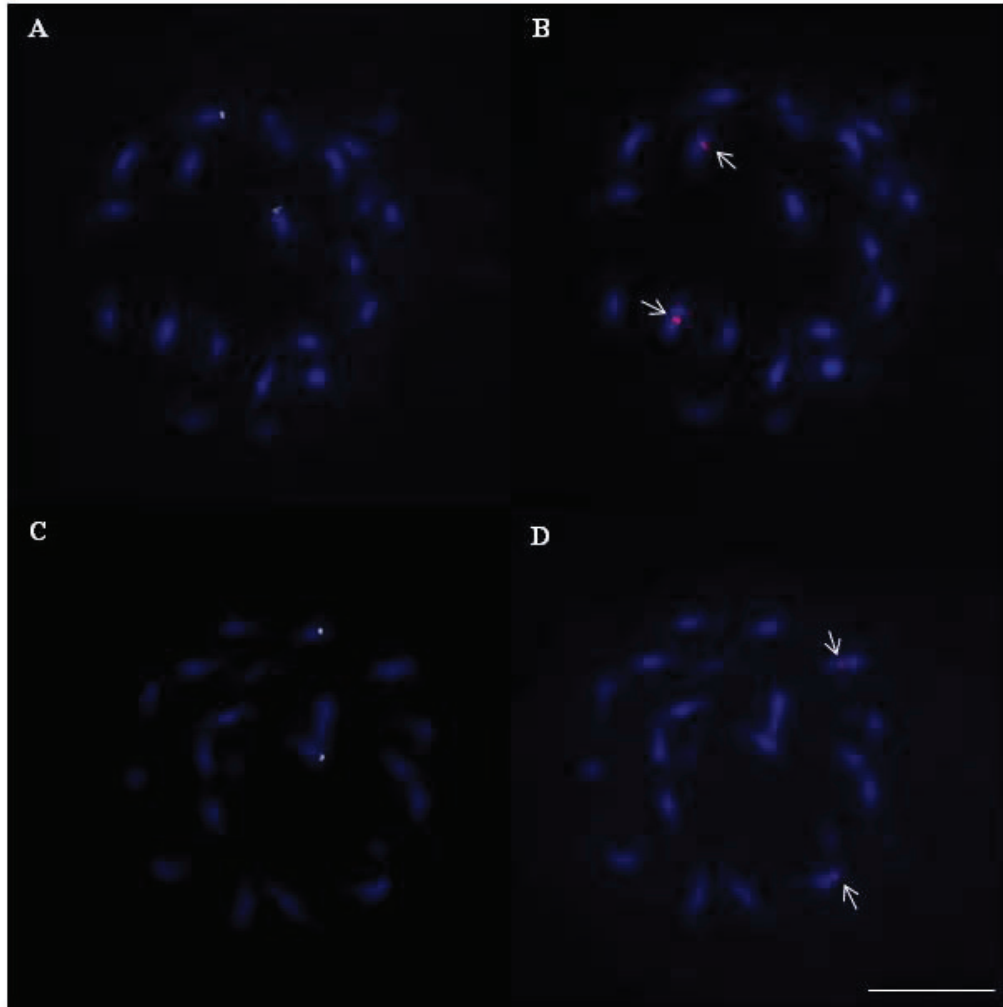


Figura 02. Hibridização *in situ* a partir de sondas SSR em *A. falcata*. **A.** Bandas CMA⁺; **B.** SSR Aesfal.8; **C.** Bandas CMA⁺; **D.** SSR Aesfal.11. As setas indicam as marcações nos cromossomos. Escala: 10µm.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Este estudo contribuiu para um melhor conhecimento cromossômico de representantes da tribo Dalbergieae *s. l.*. Foram estudadas 23 espécies de *Aeschynomene* (seis), *Dalbergia* (seis), *Machaerium* (oito), além das espécies *Geoffroea striata*, *Stylosanthes hamata* e *Zornia reticulata*. Para quatro espécies a contagem cromossômica foi efetuada pela primeira vez. Para outras cinco, as contagens divergiram de dados já publicados.
- ✓ O número cromossômico mais frequente foi $2n=20$, sendo que variações intraespecíficas para algumas espécies e variações interespecíficas constatadas são decorrentes de dois eventos evolutivos, a aneuploidia e a poliploidia.
- ✓ Foi sugerido $x=10$ como número básico do clado *Dalbergia s. str.* e o mesmo número básico foi proposto para a tribo Dalbergieae *s. l.*, sendo que os gêneros recém-agrupados *Diphysa*, *Kotschya*, *Ormocarpum* e *Smithia* devem ser melhor discutidos, já que apresentam número básico diferente de $x=10$.
- ✓ Apesar das variações encontradas entre tamanho e morfologia cromossômica, não foi possível definir características específicas para definir grupos de espécies.
- ✓ Foram descritos os padrões bandamento cromossômico CMA/DAPI em 23 espécies, assim como a distribuição de DNAr em 19.
- ✓ Observou-se homogeneidade quanto às bandas CMA/DAPI e aos sítios de DNAr 5S e 45S na maioria das espécies, sendo que as mudanças de número e posição podem estar associadas a rearranjos estruturais, tais como translocação e duplicação ou ainda com transposições.
- ✓ A utilização de sequências BACs e de microssatélites mostrou-se promissora, uma vez que foram detectados sinais em algumas das espécies testadas.