

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Filogenia molecular, citotaxonomia e evolução cariotípica
da subfamília Gilliesioideae (Alliaceae)

Recife
2012

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Filogenia molecular, citotaxonomia e evolução cariotípica da subfamília Gilliesioideae (Alliaceae)

Tese apresentada por Luiz Gustavo Rodrigues Souza como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biologia Vegetal (área de concentração em Florística e Sistemática) pelo curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFPE.

Orientador: Profº Marcelo Guerra
(Depto. Botânica, UFPE)

Recife
2012

Souza, Luiz Gustavo Rodrigues

**Filogenia molecular, citotaxonomia e evolução cariotípica
subfamília Gilliesioidae (Alliaceae)/ Luiz Gustavo Rodrigues Souza
Recife: O Autor, 2012.**

304 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marcelo Guerra

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas. Biologia Vegetal, 2012.**

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Genética Vegetal 2. Filogenia 3. Botânica- classificação l.
Título.**

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-060

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Filogenia molecular, citotaxonomia e evolução cariotípica da subfamília Gilliesioideae (Alliaceae)

COMISSÃO EXAMINADORA:

Membros titulares:

Prof^o Dr. Marcelo Guerra (orientador), Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Prof^o Dr. Pablo Speranza, Depto. Biologia Vegetal, Fac. Agronomía, UdelaR

Prof^a. Dra. Andrea Pedrosa-Harand, Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Prof^a. Dra. Ana Maria Benko Iseppon, Depto. de Genética, CCB, UFPE

Prof^o. Dr. Leonardo Pessoa Felix, Depto. de Fitotecnia, CCA, UFPB

Membro suplente:

Prof^o. Dr. Marccus Alves, Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Prof^a. Dra. Ana Emilia Barros-e-Silva, Depto. de Fitotecnia, CCA, UFPB

*Ao amigo e exemplo de paixão pela
ciência Orfeo Crosa dedico esse trabalho*

Agradecimentos

A principal epopéia dos nossos dias é a busca pela felicidade. A minha, em grande parte, passa por estudar cromossomos e respirar ciência. Agradeço a todos que compartilharam dessa caminhada comigo, em especial àqueles que diretamente contribuíram para a minha formação:

Ao meu orientador Marcelo Guerra por sua incansável batalha em fazer de mim um cientista melhor. Por sua amizade, senso crítico, entusiasmo, humildade e dedicação ao trabalho que me inspira muito e certamente a todos que estão ou estiveram no Laboratório de Citogenética Vegetal da UFPE.

Ao meu co-orientador Orfeo Crosa pela sua amizade e entusiasmo em sempre aprender mais sobre as Alliaceae. Agradeço pelos domingos em que ele fez da sua casa a “minha casa” em Montevideu e pelas intermináveis conversas diárias durante o tempo que estivemos juntos.

Ao grande amigo Leonardo Pessoa Felix e família, por todos os momentos felizes e pelas muitas ocasiões em que foram a “minha própria família” aqui em Pernambuco.

À sempre presente *co-orientadora informal* Andrea Pedrosa-Harand pelos valiosos conselhos, por toda a ajuda e amizade.

Aos atuais e ex-companheiros de laboratório Ana Emilia, Cicero Carlos, Ana Paula, Aretuza Souza, Artur Fonsêca, Andre Marques, Fernando Roa, Lidiane Feitosa, Liliane Dantas, Lucas, Magdalena Vaio, Mariana Baez, Sandra Mendes, Silvo, Tiago Esposito, Tiago Ribeiro e Nici, muitos dos quais levarei amizade para toda a vida.

Aos colaboradores que me receberam em terras distantes e que fizeram de simples estágios momentos fantásticos: Andre Vanzela (Londrina-PR) e Pablo Speranza (Montevideu, Uruguai). Um agradecimento especial pela hospitalidade e atenção aos grandes amigos e parceiros que fiz nessas viagens, em especial Fabíola Carvalho, Diego Michelini e Rodolfo Umaña.

Ao funcionário da Pós-Graduação em Biologia Vegetal Adriano e Hidelbrando pelo apoio prestado e aos vigilantes do Centro de Ciências Biológicas, pela atenção e paciência que possibilitou minha permanência no laboratório nos horários madrugada a fora.

Por fim, às agências CAPES, FACEPE e CNPq que deram o aporte financeiro, em especial a bolsa de doutorado, que me permitiram executar e concluir essa tese.

Sumário

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	22
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1. Introdução à citotaxonomia	24
2.1.1. Taxonomia e sistemática	24
2.1.2. Citotaxonomia	27
2.1.1.1. Abordagens clássicas	28
2.1.1.2. Técnicas de bandeamentos cromossômicos	30
2.1.1.3. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	32
2.1.1.4. Hibridização genômica <i>in situ</i> (GISH)	36
2.2. Principais mudanças cariotípicas em plantas	38
2.2.1. Translocações robertsonianas (TR)	41
2.2.1.1. DNA telomérico	45
2.3. A família Alliaceae	50
2.3.1. Citogenética da família Alliaceae	52
2.3.2. Citogenética da subfamília Gilliesioideae	54
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

Capítulos

- I - Karyological circumscription of *Ipheion* Rafinesque (Gilliesioideae, Alliaceae) 75
Publicado na revista Plant Systematics and Evolution
- II - Cytogenetic and molecular evidences suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Ailton) Stearn (Alliaceae) 99
Aceito na revista Annals of Botany
- III - A origem de *Nothoscordum bonariense* Beauverd e sua relação com as espécies do complexo *Bivalve* Guag: uma abordagem cariotípica e filogenética 137
A ser submetido à Annals of Botany
- IV - Variabilidade de sequências teloméricas em espécies de *Ipheion* e *Nothoscordum* (Alliaceae): o papel da dispersão equilocal de DNA repetitivo na origem de sítios teloméricos ectópicos 165
A ser submetido à revista Chromosome Research
- V - Evidências filogenéticas e cito-moleculares de uma recente diversificação cariotípica na secção *Nothoscordum* (*Nothoscordum*, *Ipheieae*, Gilliesioideae) 190
A ser submetido à American Journal of Botany
- VI - Evidências cito-moleculares revelam duas linhagens divergentes de espécies tetraplóides no gênero *Leucocoryne* Lindl (Gilliesioideae, Alliaceae) 223
A ser submetido à Plant Systematics and Evolution

VII - Validação do gênero <i>Zoellnerallium</i> Crosa (Gilliesioideae, Alliaceae)	241
com base em sequências de DNA e dados citológicos	
<i>A ser submetido à Plant Systematics and Evolution</i>	
VIII - O papel das fissões cêntricas na evolução cariotípica da tribo	257
Gilliesieae Lindl (Gilliesioideae, Alliaceae)	
<i>A ser submetido à Plant Systematics and Evolution</i>	
Conclusões	272
ANEXOS	274
<i>Normas das revistas</i>	

LISTA DE TABELAS

Fundamentação teórica

Tabela 1 Números cromossômicos ($2n$) e fórmulas cariotípicas de espécies da subfamília Gillisioideae (Alliaceae).....	56
---	----

Capítulo I

Table 1 Samples analyzed of <i>Ipheion</i> and <i>Nothoscordum</i> species with voucher number, provenance, number of individuals analyzed, diploid number ($2n$), karyotype formula, fundamental number (FN), chromosome size range, average chromosome size, haploid complement size, asymmetry index (A_1 and A_2), and number of rDNA sites.....	97
---	----

Capítulo II

Table 1 Species cytologically investigated with provenance, accession number in the living collection, number of individuals analyzed, chromosome number ($2n$), and number of acrocentric chromosomes without CMA bands (A^0) or with one band (A^1) or two (A^2) CMA bands.....	133
--	-----

Capítulo III

Tabela 1 Amostras analisadas do complexo <i>Bivalve</i> com suas respectivas procedências, números cromossômicos ($2n$), fórmula cariotípica e número fundamental (NF).....	139
--	------------

Tabela 2 Números cromossômico ($2n$) e estimativas de tamanho do genoma ($2C$) para as espécies do complexo <i>Bivalve</i>	162
---	------------

Capítulo IV

Tabela 1 Espécies analisadas dos gêneros <i>Nothoscordum</i> e <i>Ipheion</i> com respectivos números de Voucher, procedência, número cromossômico ($2n$), fórmula cariotípica, número fundamental (NF) e sítios teloméricos intersticial (ITS).....	188
---	------------

Capítulo V

Table 1 Espécies analisadas da secção <i>Nothoscordum</i> com locais de coleta, número cromossômico ($2n$), fórmula cariotípica, número fundamental (NF) e distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S por complemento cromossômico. Os dados cariotípicos dos grupos externos foram reproduzidos de publicações prévias (Souza et al., 2009; 2010; em preparação).....	218
---	------------

Tabela 2 Loci plastidiais e nucleares analisados para filogenia molecular da secção <i>Nothoscordum</i> e a variabilidade de sequências para cada região.....	222
--	------------

Capítulo VI

Table 1 Espécies analisadas do gênero <i>Leucocoryne</i> com suas respectivas procedências, número cromossômico ($2n$), fórmula cariotípica e número fundamental (FN).....	240
---	------------

Capítulo VII

Table 1 Espécies analisadas, locais de coleta, cariótipos e número de sítios de DNAr das espécies de <i>Zoellnerallium</i> e representantes de gêneros próximos.....	256
---	------------

Capítulo VIII

Tabela 1 Espécies analisadas da tribo Gilliesieae com número de voucher, procedência, número cromossômico ($2n$), fórmula cariotípica, número fundamental (NF) e número de sítios de DNAr.....	271
---	------------

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Fig. 1 Distribution of heterochromatin and 5S (red) and 45S (green) rDNA sites in the chromosome complement of *Ipheion* species. **a–c** *I. uniflorum* 2x showing C-bands (**a**),

CMA⁺ bands (**b**) and rDNA sites (**c**). **d** *I. uniflorum* 4x showing rDNA sites. **e–g**, *I. tweedieanum* interphase and prophase nuclei stained with CMA/DAPI (**e**), and metaphase displaying CMA⁺ bands (**f**) and rDNA sites (**g**). **h–i** *I. recurvifolium* with CMA⁺ bands (**h**) and rDNA sites (**i**). Inserts in **b** show the submetacentric pair with a proximal CMA⁺ band, in **c** show details of some small rDNA sites, at both higher magnification and contrast, and in **d** it shows a single chromosome of the same metaphase that was separated from the others. Arrowheads point to the smaller CMA⁺ bands colocalized with 45S rDNA sites. Arrows in **a**, **b**, and **d** point to the proximal heterochromatin of the submetacentric pair. Bar in **i** represents 10 µm.....93

Fig. 2 Distribution of CMA⁺ bands and rDNA sites in the chromosome complements of *Nothoscordum felipponei* (**a**, **b**), and rDNA sites in *N. hirtellum* (**c**). **a** CMA/DAPI-stained metaphase showing CMA⁺ band. **b**, **c** *In situ* hybridization with 5S (red) and 45S (green) rDNA probes. Inserts in **b** and **c** show some rDNA sites at higher magnification and contrast. Arrowheads point to the smaller CMA⁺ bands/45S rDNA sites. Bar in **c** represents 10 µm.....94

Fig. 3 Idiograms of *Ipheion* and *Nothoscordum* species showing chromosome size (S), arm ratio (AR), CMA⁺ bands (yellow), 5S (red), and CMA⁺ bands co-localized with 45S rDNA sites (green). Chromosomes were ordered (CO) by decreasing size, except for *I. uniflorum* 4x, where the metacentric chromosomes were conserved in the initial positions.....95

Fig. 4 Relationship among karyotypes of *Ipheion* and *Nothoscordum* species. **a** Dendrogram using the unweighted pair-group method and *Allium cepa* as outgroup. **b**

Ratio to asymmetry index (A_1 and A_2) and number of 45S rDNA sites on the short arms of acrocentrics. Symbols represent the species indicated in **a**.....96

Capítulo II

Fig. 1 Karyotype variability in *Nothoscordum gracile*. **a** $2n = 18$ ($14M + 4A^1$), **b** $2n = 19$ ($13M + 1A^0 + 4A^1 + 1A^2$), **c** $2n = 19$ ($13M + 3A^0 + 3A^1$), and **d** $2n = 19$ ($13M + 2A^0 + 4A^1$) with a reciprocal translocation between the long arms of chromosomes 3 and 5 (arrows). **a'-d'** Karyograms based on **a-d** metaphases. Observe the variable number of CMA bands on the proximal region of the long arms of acrocentrics. Arrowhead in **a** indicates an association between 45S rDNA sites of two acrocentric chromosomes. CMA = yellow, DAPI = blue, 5S rDNA = red, 45S rDNA = green. Bar in **a** corresponds to 10 μ m.....128

Fig. 2 Cytotypes of *Nothoscordum nudicaule*, *N. macrostemon* and *Nothoscordum* sp1. **a,b** *N. nudicaule* with $2n = 10$ ($6M + 4A^0$) (**a**) and $2n = 19$ ($13M + 6A^0$) (**b**). **c,e** *N. macrostemon* with $2n = 10$ ($6M + 4A^1$) (**c**) and $2n = 19$ ($13M + 6A^1$) (**e**). **d** *Nothoscordum* sp1 $2n = 15$ ($9M + 6A^1$). **a'-e'** Karyograms based on **a-e** metaphases. Arrow in **e** indicates an association between three 45S rDNA sites. CMA = yellow, DAPI = blue, 5S rDNA = red, 45S rDNA = green. Bar in **a** corresponds to 10 μ m.....129

Fig. 3 Meiosis in *Nothoscordum macrostemon* (**a,d**) and *N. nudicaule* (**b,c**) and first pollen grain mitosis in *N. gracile* (**e,f**). **a-c** Metaphase I with five bivalents in *N. macrostemon* $2n = 10$ (**a**) and with multivalents in *N. macrostemon* $2n = 19$ (**b**) and *N.*

nudicaule $2n = 19$ (**c**). **d** Anaphase II in *N. macrostemon* $2n = 19$ showing chromosome sets with $6M + 4A$ (above) and $7M + 2A$ (below). **e,f** First pollen grain mitosis of *N. gracile* with $n = 9$ ($5M + 4A$) (**e**) and $n = 10$ ($6M + 4A$) (**f**). Inset in **c** shows a heteromorphic trivalent of another cell oriented to the poles. Univalent, bivalent, trivalent, quadrivalent, and heptavalent are indicated by Roman numerals. Arrowheads in **d** point to CMA bands of the acrocentric short arms. Bar in **a** corresponds to 10 μm130

Fig. 4 GISH (**a, b**) and dot-blot hybridization (**c**) among species of the complex *Inodorum* and *Ipheion recurvifolium*. **a,b** Metaphase of *N. gracile* and prometaphase of *I. recurvifolium* (left below) stained with CMA/DAPI (**a**) and *in situ* hybridized with *N. nudicaule* genomic probe (**b**). **c** Labeled genomic DNA of *N. macrostemon* (*mac*) and *N. nudicaule* (*nud*) hybridized in membrane with non-labeled genomic DNA of *N. gracile* (*gra*), *N. macrostemon*, and *N. nudicaule*. Relative hybridization intensity based on the 100% value for homologous hybridization is indicated below. Bar in **a** corresponds to 10 μm131

Fig. 5 Network connecting *trnL-trnF* of section *Inodorum* (**a**) and their relationships with geographic and cytogenetic data (**b**). Each haplotype is indicated by a different color, both in **a** and **b**. Circle sizes at the network are proportional to the number of individuals observed for each haplotype. Idiograms of acrocentric chromosomes represent the predominant cytotype for each haplotype, with the same colors as in **a**. Diploid samples in **a** are indicate by asterisks. In **b**, circle indicates *N. gracile* (GRA), square *N. macrostemon* (MAC), triangle *N. nudicaule* (NUD), star *N. arenarium* (ARE) and empty circles *Nothoscordum* sp.1 and sp.2.....132

Fig. 1 Relações filogenéticas entre as espécies do complexo *Bivalve* baseadas na análise de Máxima Parcimônia da região nuclear ITS (**a**) e uma análise de Haplotype Network baseada em sequencias plastidiais *trnG* (**b**). Em **a** números abaixo dos ramos correspondem ao valor de *bootstrap* e cabeças de seta indicam mudanças de número básico de $x = 5$ ($3M + 2A$) para $x = 4$ ($4M$). Números cromossômicos são representados por $2n$ e conteúdo de DNA por valores $2C$158

Fig. 2 Número e morfologia cromossômica das três espécies do complexo *Bivalve*. **a**, *Nothoscordum gaudichaudianum* diploide com $2n = 8M$; **b-d** *N. montevidense* diploide com $2n = 8M$ (**b**), tetraploide com $2n = 16M$ (**c**) e octaploide com $2n = 32M$ (**d**); **e-f** *N. bivalve* diploide com $2n = 10$ ($6M + 4A$) (**e**) e tetraploide com $2n = 20$ ($12M + 8A$) (**f**). A = cromossomos acrocêntricos. Barra em **a** = 10 μm159

Fig. 3 Cromossomos de *Nothoscordum bonariense* hibridizados com a sonda genômica de *N. bivalve* (Cy3, laranja) e *N. gaudichaudianum* ou *N. montevidense* (FITC, verde). **a-a'** Metáfase e kariograma com $2n = 26$ ($22M + 4A$) mostrando 10 cromossomos ($6M + 4A$) marcados com a sonda de *N. bivalve* e 16 ($16M$) com a sonda de *N. gaudichaudianum*. **b-b'** Metáfase e kariograma com $2n = 26$ ($21M + 5A$) hibridizada com DNA genômico de *N. bivalve* (Cy3, laranja) e *N. gaudichaudianum* (FITC, verde). **c**, Metáfase com $2n = 26$ ($21M + 5A$) hibridizada com DNA genômico de *N. bivalve* (Cy3, laranja) e *N. montevidense* (FITC, verde) A = acrocêntricos. Setas em **c** apontam para cromossomos mais fracamente hibridizados com a sonda genômica de *N. montevidense*. Barra em **a** equivale a 10 μm160

Capítulo IV

Fig. 1 Distribuição do DNA telomérico HUSB (verde) nas espécies do gênero *Ipheion*. **a**, *I. uniflorum*; **b**, *I. tweedieanum*; **c**, *I. recurvifolium*. Cabeças de setas em **a** apontam para a região proximal do par de submetacêntrico em *I. uniflorum*. Barra em **a** representa 10 μ m.....183

Fig. 2 Distribuição de DNA telomérico HUSB (verde) e ATSB (azul) e dos sítios de DNAr 45S (laranja) em espécies da secção *Nothoscordum* do gênero *Nothoscordum*. Em **a** e **b**, *N. montevidense* 2x e 4x com um cromossomo B, respectivamente; **c**, *N. felipponei*; **d**, *N. bonariense*; **e-f**, *Nothoscordum* sp. hibridizada *in situ* sequencialmente com HUSB (**e**) e ATSB (**f**). Barra em **a** representa 10 μ m.....184

Fig. 3 Distribuição de DNA telomérico HUSB (verde) e ATSB (azul) e dos sítios de DNAr 45S (laranja) em espécies da secção *Inodorum* do gênero *Nothoscordum*. Em **a** e **d** *N. gracile* com $2n = 19$ e $2n = 18$, respectivamente. **b**, *N. arenarium*. Em **e** e **f** *N. nudicaule* com $2n = 19$ e $2n = 18$, respectivamente. Insertos em **f** mostram sinais teloméricos ectópicos. Barra em **a** representa 10 μ m.....185

Fig. 4. Distribuição de DNA telomérico HUSB (verde) em metáfase (**a**), anáfase (**b**) e interfase (**c**) de *Nothoscordum pulchellum*. **d** modelo de transferência equilocal de DNA telomérico baseado em Schweizer e Loild (1987). Em **d** regiões destacadas em laranja delimitam a região centromérica.....186

Fig. 5 Análises de sequência de cinco clones de *Nothoscordum gracile* mostrando ATSB e HUSB (cinza escuro). Nucleotídios distintos dos repeats teloméricos são destacados em cinza claro.....187

Capítulo V

Fig. 1 Relações filogenéticas entre as espécies da secção *Nothoscordum* (linhas mais espessas) baseadas em ITS e separação por eletroforese do produto de PCR da região plastidial *psbA-trnH*. *N. montevidense* (Nm), *N. gaudichaudianum* (Ng), *N. bivalve* (Nb), *N. hirtellum* (Nh), *N. dialystemon* (Nd), *N. arenarium* (Na), *Tristagma* sp. (T) e *Speea triloba* (S).....211

Fig. 2 Filogenia das espécies da secção *Nothoscordum* baseada em sequências ITS. Valores sob os clados indicam os índices de *Bootstrap*. Cabeças de seta indicam mudança do número cromossômico básico $x = 5$ ($3M + 2A$) para $x = 4M$. Retângulos em cinza delimitam as amostras de uma mesma espécie.....212

Fig. 3 Distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em complementos cromossômicos de espécies da secção *Nothoscordum*. Citótipos de *N. montevidense* diploide ($2n = 8M$) com diferentes números de sítios de DNAr 5S (**A-B**) e tetraploides com $2n = 16M$ (**D-F**). *Nothoscordum marchesii* ($2n = 10, 6M + 4A$) (**C**), *N. bivalve* ($2n = 18, 14M + 4A$) (**E**), *N. ostenii* ($2n = 16M + 2B$) (**G**), *N. bonariense* ($2n = 21M + 5A$) (**H**), *Nothoscordum* sp. 1. ($2n = 18, 14M + 4A$) (**I**). Insertos em **I** mostra um par de metacêntricos com sítios de DNAr 45S proximais e em **F** e **G** mostra cromossomos B. Barra em **A** representa 10 μm213

Fig. 4 Relações filogenéticas baseada em ITS e variabilidade cariotípica das espécies do clado *Bivalve* da secção *Nothoscordum*. Idiogramas esquemáticos à direita apresentam a distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) nas espécies analisadas. Cabeças de setas indicam pontos de mudança de número básico.....**215**

Fig. 5 Relações filogenéticas baseada em ITS e variabilidade cariotípica das espécies do clado *Hirtellum* da secção *Nothoscordum*. Idiogramas esquemáticos à direita apresentam a distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) nas espécies analisadas. Cabeça de seta indica ponto de mudança de número básico.....**216**

Fig. 6 Variação da cor da flor e tipo de inflorescência na secção *Nothoscordum*. As flores podem ser brancas (linhas brancas) ou amarelas (linhas amarelas). As flores estão separadas em “unifloras” (simples) ou multifloras (umbela).....**217**

Capítulo VI

Fig. 1 Distribuição de heterocromatina e sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em complementos cromossômicos das espécies de *Leucocoryne*. **a**, *L. coquimbensis* ($2n = 10$; 6M + 4A). **b**, *L. ixioides* ($2n = 18$; 14M + 4A). **c-d**, prometáfase (**c**) e núcleo interfásico (**d**) de *L. violascens* ($2n = 18$; 14M + 4A) corado com CMA (amarelo) e DAPI (azul). **e**, *L. coronata* ($2n = 18$; 14M + 4A). **f**, *L. talinensis* ($2n = 18$; 14M + 4A). **g**, *L. appendiculata* ($2n = 18$; 14M + 4A). **h**, *L. dimorphopetala* ($2n = 18$; 14M + 4A). **i**, *L. narcissoides* ($2n = 19$; 13M + 6A). Insertos em **a** mostram a co-localização entre o DNAr 45S e as bandas CMA e em **e** mostram sítios de DNAr 5S duplicados em um cromossomo acrocêntrico. Setas apontam para os sítios de DNAr 5S nos cromossomos

acrocêntricos e cabeças-de-setas para os menores sítios de DNAr 45S. Barra em **a** representa 10 µm.237

Fig. 2 Idiogramas esquemáticos das espécies analisadas de *Leucocoryne* e suas respectivas distribuições geográficas. Linha vermelha nos idiogramas e mapa circunda as espécies diplóides, verde as tetraploides com poucos sítios de DNAr 5S e a azul as tetraplóides com maior número de sítios de DNAr 5S. As espécies de “seis estames” são indicadas com um asterisco. Nos idiogramas os sítios de DNAr 5S são indicados em vermelho, o DNAr 45S em verde e as bandas DAPI em azul escuro. Pares heteromórficos são identificados por uma barra abaixo dos cromossomos. Em *L. narcisoides* três cromossomos (1M + 2A) não puderam ser agrupados em pares e foram representados numa caixa cinza. Mapa com a distribuição das espécies modificado de Muñoz and Moreira (2000).....238

Fig. 3 Esquema de rearranjo cromossômico promovendo mudanças na posição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e manutenção do DNAr 45S (verde). **a**, condição ancestral em cromossomos de *Leucocoryne* com sítios de DNAr 5S em cromossomos metacêntricos; **b**, translocação recíproca promovendo a troca entre braços cromossômicos não homólogos; **c**, condição derivada de sítios de DNAr 5S em um cromossomo acrocêntrico. Note que o rearranjo cromossômico não alterou a posição do sítio de DNAr 45S.....239

Capítulo VII

Fig. 1 Relações filogenéticas entre as espécies de *Zoellnerallium* e gêneros afins da tribo Ipheieae baseadas em máxima parcimônia. À esquerda árvore gerada com a análise da sequência nuclear ITS e à direita com a sequência plastidial do intron de *trnG*. Números abaixo dos ramos indicam os valores de *bootstrap* para 10.000 réplicas.....254

Fig. 2 Análise cariotípica das espécies do gênero *Zoellnerallium*. **a**, impregnação com nitrato de prata em metáfase de *Z. andinum*. **b-c**, coloração CMA e DAPI em metáfase (**b**) e hibridização *in situ* com DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em prometáfase (**c**) de *Z. serenense*. Em **d** idiograma de *Z. serenense*. Setas em **a** apontam as menores RONS.....255

Capítulo VIII

Fig. 1 Metáfases mitóticas mostrando a distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em espécies da tribo Gilliesieae. **a-c** espécies com $2n = 14$ (4M + 4SM + 6A): *Gilliesia graminea* (**a**), *Gethyum artropurpureum* (**b**) e *Solaria miersioide* (**c**). **d**, *Speea humilis* $2n = 12$ (8M + 2SM + 2A). **e-f**, indivíduos de *Miersia chilensis* com $2n = 20$ (2SM + 18A) (**e**) e $2n = 12$ (8M + 2SM + 2A) (**f**). Barra em **a** equivale a 10 μm269

Fig. 2 Árvore filogenética e idiogramas mostrando os possíveis eventos de fissão cêntrica (retângulos amarelos no cladograma) envolvidos na evolução cariotípica da tribo Gilliesieae. Nos idiogramas está apresentada a distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde). Cladograma modificado de Escobar et al. (em preparação).....**270**

Resumo - A subfamília Gilliesioideae (Alliaceae) está dividida em duas tribos, Ipheieae e Gilliesieae, que apresentam fortes diferenças morfológicas, biogeográficas e filogenéticas. O presente trabalho objetivou realizar uma análise citotaxonômica e filogenética nessa subfamília, por meio da comparação de número e morfologia cromossômica, dupla coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), localização do DNA telomérico e dos sítios de DNAr 5S e 45S por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) juntamente com uma análise filogenética de alguns gêneros a partir de sequências de DNA nuclear ITS e DNA plastidiais *trnG*, *trnL-trnF*, entre outras. A tribo Ipheieae é formada pelos gêneros *Ipheion*, *Leucocoryne*, *Nothoscordum*, *Tristagma* e *Zoellnerallium*. Desses, *Nothoscordum* é cariotipicamente mais diversificado, com dois números cromossômicos básicos, $x = 4$ e $x = 5$, recorrentes eventos de translocações Robertsonianas e poliploidia. Nesse gênero foram analisados dois complexos taxonômicos, *Inodorum* e *Bivalve*, onde as análises de hibridização genômica *in situ* (GISH) e filogenia molecular permitiram caracterizar a origem híbrida de *N. gracile* e *N. bonariense*, respectivamente, bem como de suas relações com as espécies afins. A análise das espécies de *Leucocoryne*, também com $x = 5$, trouxe novas evidências sobre a relação evolutiva entre as espécies que possuem três estames funcionais e aquelas que conservam os seis estames férteis, comum nas demais Alliaceae. As análises filogenéticas permitiram validar o gênero *Zoellnerallium*, que apresenta um cariótipo único na tribo com $2n = 24$ (8M + 16A) e cromossomos menores do que as demais espécies da tribo. No caso das três espécies de *Ipheion* as análises citogenéticas mostraram cromossomos menores que os demais da tribo, cariótipos predominantemente formados por acrocêntricos e um número cromossômico único para cada espécie do gênero ($2n = 12, 14$ e 20). A tribo Gilliesieae é formada pelos gêneros *Gethyum*, *Gilliesia*, *Miersia*, *Speea* e *Solaria*, todos com o mesmo número fundamental $NF = 11$ mas com diferentes números cromossômicos. A evolução cariotípica da tribo foi moldada principalmente por disploidia ascendente, partindo do cariótipo ancestral $2n = 12$, presente em *Miersia* e *Speea*, e em linhagens independentes dando origem a $2n = 14$, presente em *Gethyum*, *Gilliesia* e *Solaria*, e $2n = 20$ presente em *Miersia*. De uma maneira geral, todas as espécies da subfamília Gilliesioideae apresentaram um par de sítios de DNAr 5S por conjunto monoploide, exceto a secção *Nothoscordum* do gênero *Nothoscordum* que apresentou uma amplificação desses sítios. Os sítios de DNAr 45S foram localizados preferencialmente nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos, sugerindo uma correlação entre as fissões cêntricas e este tipo de DNAr. Embora os dados sugiram que as fusões/fissões cêntricas tenham sido a principal mudança cromossômica envolvida na evolução da subfamília Gilliesioideae, as análises do DNA telomérico em *Nothoscordum* e *Ipheion* não revelaram nenhuma relação aparente entre fusões cêntricas e sítios ectópicos de DNA telomérico.

Palavras-chave: tribo Ipheieae, tribo Gilliesieae, evolução cariotípica, citogenética, translocações Robertsonianas

Abstract – The subfamily Gilliesioideae (Alliaceae) is traditionally subdivided into two tribes, Ipheieae and Gilliesieae which show morphological, biogeographical, and phylogenetic differences. In this study a cytotaxonomic and phylogenetic analysis of this subfamily was performed based on the comparison of chromosome number and morphology, double staining with the fluorochromes chromomycin A3 (CMA) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), distribution of the telomeric DNA, 5S and 45S rDNA sites by fluorescent *in situ* hybridization (FISH), together with a phylogenetic analysis of some genera using nuclear ITS and plastidial DNA sequences (*trnG* and *trnL-trnF*), among others. The tribe Ipheieae is formed by the genera *Ipheion*, *Leucocoryne*, *Nothoscordum*, *Tristagma*, and *Zoellnerallium*. Among these, *Nothoscordum* is karyotypically the more diversified, with two basic chromosome numbers, $x = 4$ (4M) and $x = 5$ (3M + 2A), due to recurrent events of Robertsonian translocation and polyploidy. In this genus two taxonomic species complex, *Inodorum* and *Bivalve*, were analyzed. Genomic *in situ* hybridization (GISH) and molecular phylogeny were used to characterize the hybrid origin of *N. gracile* and *N. bonariensis* and their relationship with related species. The *Leucocoryne* analysis also showed $x = 5$ (3M + 2A), and provided new evidences about the evolutionary relationships between the species with three functional stamens and those that retained the original six stamens, a condition that is characteristic of other Alliaceae. In *Zoellnerallium* the cytogenetic and phylogenetic analyses helped to validated the genus, which presented $2n = 24$ (8M + 16A) and chromosomes smaller than those of other species of the tribe. The three *Ipheion* species showed chromosomes similar in size to those found in *Zoellnerallium*, karyotypes formed predominantly by acrocentrics, and chromosome numbers $2n = 12$, 14 and 20. The tribe Gilliesieae is composed by the genera *Gethyum*, *Gilliesia*, *Miersia*, *Speea*, and *Solaria*, all of them with the same fundamental number $NF = 11$ but with different chromosome numbers. The karyotype evolution of this tribe was shaped mainly by ascendent dispoloidy, with the putative ancestral karyotype $2n = 12$ present in *Miersia* and *Speea*, giving origin to two independent lineages: $2n = 14$ in *Gethyum*, *Gilliesia* and *Solaria*, and $2n = 20$ in *Miersia*. In general, all species of the subfamily Gilliesioideae had one 5S rDNA per monoploid chromosome set, except those from the section *Nothoscordum*, genus *Nothoscordum*, who presented an increment of these sites. In the subfamily the 45S rDNA sites were located preferentially in the short arm of the acrocentric chromosomes, suggesting a correlation between centric fission and the occurrence of this rDNA type. Although all data suggested that centric fusion/fission have been the main mechanism of chromosome evolution of the subfamily Gilliesioideae, the telomeric DNA analysis in *Nothoscordum* and *Ipheion* did not reveal any clear relationship between centric fusion and ectopic telomeric sites.

Key-words: tribe Ipheieae, tribe Gilliesieae, chromosome evolution, cytogenetics, Robertsonian translocation

1. INTRODUÇÃO

A subfamília Gilliesioideae (Alliaceae) é composta por 13 gêneros e ~82 espécies distribuídas quase exclusivamente em regiões subtropicais no sul da América do Sul. A subfamília está dividida em duas tribos, Gilliesieae e Ipheieae, separadas por fortes diferenças morfológicas, biogeográficas e filogenéticas. A tribo Gilliesieae é formada por sete gêneros (*Gethyum*, *Gilliesia*, *Miersia*, *Solaria*, *Speea*, *Trichlora* e *Schickendantziella*) e 17 espécies que apresentam centro de diversidade no Chile. Por outro lado, a tribo Ipheieae é composta por cinco gêneros (*Ipheion*, *Leucocoryne*, *Nothoscordum*, *Tristagma* e *Zoellnerallium*) e ~65 espécies com centro de diversidade no Uruguai, na Argentina e no sul do Brasil.

As relações evolutivas inter- e intragenéricas dentro de cada tribo e entre as duas tribos ainda são imprecisas devido principalmente aos poucos estudos realizados nessa subfamília e à taxonomia complexa do grupo. Análises histológicas, filogenéticas e cariotípicas se mostraram fundamentais para uma melhor compreensão da sistemática do grupo. As espécies de Gilliesioideae se destacam por apresentarem cromossomos grandes e pouco numerosos, o que as torna excelentes modelos para análises citotaxonômicas. Além disso, a subfamília também apresenta a peculiaridade de possuir duas variantes da sequência telomérica, uma típica de plantas em geral e outra típica de vertebrados, cuja origem, organização e significado evolutivo ainda são incertos. A maioria das análises citogenéticas do grupo se resume ao uso da coloração convencional, sendo conhecidos números e morfologia cromossômica de todos os gêneros da tribo Ipheieae e de algumas espécies da tribo Gilliesieae. Essas análises prévias têm revelado uma grande variabilidade cariotípica, principalmente devido à ocorrência de translocações Robertsonianas e poliploidia.

O presente trabalho tem como objetivo realizar uma análise citotaxonômica da

subfamília Gilliesioideae, incluindo representantes de todos os gêneros das tribos Ipheieae e Gilliesieae (exceto *Trichlora* e *Schickendantziella*), por meio de número e morfologia cromossômica, dupla coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e localização dos sítios de DNAr 5S e 45S por hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Com o objetivo de analisar os resultados num contexto filogenético e assim conseguir entender melhor as relações evolutivas no grupo foi realizada uma filogenia molecular baseada em sequências plastidiais e nucleares para as duas tribos (no caso da tribo Gilliesieae, ver Escobar et al. 2010). Além disso, no gênero *Nothoscordum*, foram analisadas as relações evolutivas em dois complexos de espécies, *Bivalve* e *Inodorum* (Guaglianone 1972), por meio de uma ampla amostragem populacional, hibridização genômica *in situ* (GISH) e análise de rede de haplótipos. Adicionalmente foi investigada a distribuição e variabilidade do DNA telomérico em espécies de *Ipheion* e *Nothoscordum*, buscando identificar a relação entre os eventos de translocação Robertsoniana e a presença de sítos teloméricos ectópicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Introdução à citotaxonomia

2.1.1. Taxonomia e sistemática

Sistemática é a ciência que estuda a diversidade dos organismos, incluindo a descoberta, descrição e interpretação da diversidade biológica, bem como a síntese da informação sobre a diversidade na forma de sistemas de classificação preditivos (Judd et al. 2009). Nesse sentido, o propósito fundamental da sistemática é esclarecer as relações evolutivas entre os grupos de espécies, documentar as modificações que ocorreram durante o processo de diversificação das espécies e, até onde for possível, descrever todas as espécies. Além da diversidade biológica atual, a sistemática se propõe a estudar a história evolutiva das espécies e grupos de espécies incluindo, por exemplo, a análise de linhagens extintas a partir de fósseis (ver por exemplo Sun et al. 2002) como uma forma de auxiliar na compreensão da diversidade atual.

A sistemática abrange a disciplina taxonomia, na qual grupos de organismos são descritos e nomes científicos lhes são designados. A identificação envolve determinar se uma determinada espécie pertence a um grupo já conhecido de organismos (Judd et al. 2009). Além do nível específico, os organismos são organizados em agrupamentos taxonômicos hierárquicos, como gêneros, tribos, famílias, ordens etc, baseados no compartilhamento de similaridades entre grupos de espécies afins. Tradicionalmente a identificação de um organismo e seu enquadramento em uma hierarquia taxonômica é feito com base em caracteres morfológicos, sendo esses, em geral, de fácil observação e grande utilidade em chaves de identificação e descrições de espécies.

Entretanto, identificar uma planta e/ou estabelecer sua relação com espécies relacionadas nem sempre é uma tarefa simples, especialmente na região neotropical, quer seja porque essa região contém mais espécies do que as regiões temperadas, ou porque em geral, floras tropicais são menos estudadas (Antonelli e Sanmartín 2011). Alguns grupos de plantas apresentam uma taxonomia clara e precisa como, por exemplo, a família Passifloraceae onde a análise morfológica das flores, hábito das plantas e biogeografia, permitiu identificar com segurança a maioria das espécies e estabelecer claramente os agrupamentos infrafamiliares (Muschner et al. 2003). Por outro lado, alguns grupos taxonômicos apresentam uma variabilidade morfológica tão grande, que embora seja simples identificar as espécies, compreender as relações entre os níveis taxonômicos mais elevados é muito complexo. Caddick et al. (2002) revisando o gênero *Dioscorea* L. (Dioscoreaceae) observou que, embora as espécies sejam claramente reconhecíveis, o número de seções taxonômicas descritas varia de 28 a 70 dependendo do autor, o que mostra a complexidade na classificação infragenérica. Alguns grupos de plantas, como por exemplo, no gênero *Nothoscordum*, apresentam uma situação inversa, com uma diversificação morfológica tão baixa, que torna difícil identificar os espécimes e eventualmente a taxonomia exclusivamente morfológica leva à uma subestimação da biodiversidade do grupo (ver por exemplo Guaglianone et al. 1972).

As estimativas mais recentes de relações entre as espécies vêm sendo estabelecidas com base em análises filogenéticas. A principal inovação dessa abordagem em relação à taxonomia tradicional é a interpretação dos caracteres num contexto evolutivo, o que proporciona uma estimativa mais real da relação entre os grupos de plantas. Hennig (1965) argumentou que para uma clara compreensão das relações filogenéticas três questões fundamentais devem ser respondidas: i) qual a

relação filogenética entre os taxa em estudo? ii) como essas relações foram estabelecidas? e iii) como reconhecer e excluir caracteres que não refletem relações evolutivas? Esses caracteres, na definição de Hennig (1965), são aqueles que surgem mais de uma vez em grupos não-diretamente relacionados, na atualidade denominados de caracteres homoplásicos ou recorrentes. Uma série de termos novos surgiram para explicar/descrever as relações filogenéticas entre os grupos de taxa. Termos amplamente utilizados em análise filogenéticas são plesiomorfia e apomorfia, que dizem respeito a caracteres antigos, também ditos “primitivos” e caracteres derivados, respectivamente. Ambos podem ser precedidos pelo prefixo “*sin*”, quando o determinado caráter é compartilhado por um conjunto de taxa. A autapomorfia, definida como o conjunto de caracteres exclusivos de uma espécie, e útil, portanto, para a taxonomia (identificar espécies).

A sistemática moderna, baseada nas idéias de Hennig, busca agrupamentos taxonômicos naturais ou taxa monofiléticos, definidos como aqueles grupos de organismos que contém um único ancestral em comum, ou seja, que descendem de uma única linhagem. Os caracteres compartilhados que sustentam estes agrupamentos são chamados de sinapomorfias (Hennig 1965), as quais constituem o conjunto de caracteres usados em análises filogenéticas e incluem entre outros aqueles caracteres utilizados na descrição das espécies ou de níveis infra-específicos. Estes caracteres são obtidos a partir de fontes diversas como, por exemplo, morfológicas, anatômicas, embriológicas, cromossômicas, palinológicas, químicas, ecológicas, biogeográficas e na atualidade também referem-se às sequência de DNA ou RNA ou de proteínas (Judd et al. 2009).

A partir de 1998, com a publicação da primeira árvore filogenética abordando os grandes grupos de Angiospermas, baseados principalmente em sequências de DNA de genes plastidiais *rbcL* e *atpB*, foi proposto pelo *Angiosperm Phylogeny Group*, ou APG, uma classificação filogenética de Angiospermas, ora produzindo informações e árvores filogenéticas próprias, ora compilando informações produzidas por diferentes autores.

2.1.2. Citotaxonomia

A utilização de dados citogenéticos na sistemática vegetal, também chamada de citotaxonomia ou cariosistemática, é um importante instrumento para a compreensão das relações de parentesco e dos mecanismos genéticos de evolução, tanto dentro de pequenas taxa como em nível de espécie e de gênero, quanto em níveis superiores como família e ordem (Guerra 2000a). Número e tamanho cromossômico, posição do centrômero, padrões de bandamento e outros caracteres são usados como dados para a descrição do cariótipo e, nesse caso, contribuem para a análise sistemática (Judd et al. 1999).

Um grande número de espécies, como aquelas das famílias Bombacaceae (Baum et al. 1994), alguns gêneros de Moraceae (Ragone 2001), Cyperaceae (Sousa et al. 2011) e Orchidaceae (Guerra e Felix 2010) apresentam cariótipos difíceis de serem analisados, formados por cromossomos muito pequenos, numerosos e muito similares entre si. Nesses casos, a única informação cariotípica disponível com base na citogenética clássica é o número cromossômico. Por outro lado, algumas espécies apresentam cromossomos grandes, pouco numerosos e com morfologia claramente

reconhecível, como nas famílias Liliaceae (Ambrožová et al. 2010), Alismataceae, Limnocharitaceae (Feitoza et al. 2009) e Amaryllidaceae (Ran et al. 2001). Nesse contexto, se destaca a família Alliaceae, na qual todos os gêneros apresentam cromossomos grandes, o que as torna importantes modelos para o estudo de evolução cariotípica e citotaxonomia.

2.1.1.1. Abordagens clássicas

Uma análise citotaxonômica clássica, de maneira geral, consiste em comparar o número, a morfologia e o tamanho cromossômico e, quando possível, a posição da constrição secundária em um determinado táxon. Com o conhecimento dos números cromossômicos, é frequentemente possível reconhecer o número cromossômico ancestral do grupo (x) e as diferentes linhas evolutivas que se estabeleceram a partir deste (Guerra 2000a).

Um grande número de trabalhos citotaxonômicos utilizaram ferramentas de citogenética clássica, caracterizada pela observação de cromossomos ou núcleos interfásicos corados indistintamente, ou seja, sem nenhuma preferência por determinado tipo de cromatina, composição do DNA ou proteínas. Apesar de ser o parâmetro cariotípico mais simples, o número de cromossomos ($2n$) tem merecido atenção especial por parte dos citotaxonomistas. Esse caráter representa a forma mais rápida, barata e fácil para obter qualquer informação substancial sobre o genoma de uma espécie (Guerra 2008). Para que a abordagem citotaxonômica baseada em números cromossômicos seja compreensiva e conclusiva é preciso a análise segura de um grande número de espécies, sem a qual passa a ser simplesmente um jogo de números (Guerra 1986). Números cromossômicos similares podem indicar estreita relação, enquanto

números cromossômicos diferentes geralmente sugerem maior isolamento reprodutivo com perda de fertilidade no caso da formação de híbridos. Existem apenas dois tipos de variação no número cromossômico relacionadas à filogenia e evolução cariotípica: poliploidia e disploidia. Outras causas de variação no número de cromossomos, como haploidias, aneuploidias e cromossomos B, não apresentam nenhuma implicação evolutiva clara (Guerra 2008).

Na análise de espécies com cromossomos muito pequenos, a análise de número cromossômico ganha ainda mais importância, por ser o único parâmetro cariotípico possível de ser analisado pela citogenética clássica. Um exemplo disso é a análise da família Malpighiaceae, que apresenta cromossomos muito pequenos ($\sim 2 \mu\text{m}$), cuja contagem auxiliou na circunscrição da subfamília Byrsonimoideae, que apresenta número básico $x = 6$, em contraste com o restante da família que apresenta $x = 10$ (Anderson 1993). Posteriormente, uma filogenia molecular da família revelou que Byrsonimoideae é monofilética e, portanto, que o número cromossômico revela uma sinapomorfia importante do grupo (Davis et al. 2001).

No caso de espécies com cromossomos maiores é possível explorar além do número outros parâmetros cariotípicos como tamanho e morfologia cromossômica, posição da constrição secundária, índices de assimetria cromossômica etc. Baeza et al. (2008) revisaram a citotaxonomia de *Alstroemeria presliana* Kunth (Alstroemeriaceae), que apresenta cromossomos grandes ($\sim 10 \mu\text{m}$). Essa espécie estava dividida em duas subespécies: *A. presliana* com distribuição restrita a altitudes de 1.500 a 2.000 m na Cordilheira dos Andes entre o Chile e a Argentina e *Alstroemeria presliana* Kunth subsp. *Australis* Ehr. Bayer distribuída no sul do Chile em altitudes entre 200 e 1.500 m. Ambas apresentam flores de cor rosa muito vistosas e são diferenciadas basicamente pelo tamanho das flores, intensidade da colocação e distribuição geográfica. A análise

citogenética revelou em ambas cariótipos assimétricos com $2n = 16$, mas com fórmulas cariotípicas diferentes, $4M + 1SM + 3A$ e $3M + 1SM + 4A$, respectivamente. Esse resultado sugere que, além do isolamento geográfico, essas espécies apresentam mudanças cariotípicas, o que indica que *A. presliana* subsp. *australis* pode ser uma nova espécie.

Atualmente a citogenética alia as técnicas clássicas a um conjunto de técnicas citogenéticas e moleculares desenvolvidas ou melhoradas nos últimos anos. Os principais parâmetros utilizados na citogenética moderna são a análise de quantidade de DNA, bandeamento cromossômico, hibridização *in situ* e análise comparativa de uma determinada fração do DNA repetitivo (por exemplo, o DNA satélite) ou de cópia única (por exemplo, genes ou marcadores moleculares clonados em BACs, do inglês *Bacterial Artificial Chromosomes*).

2.1.1.2. Técnicas de bandeamento cromossômico

De maneira geral, a cromatina pode ser dividida em eucromatina, que apresenta um ciclo de condensação-descondensação paralelo ao ciclo celular, e heterocromatina, que se mantém condensada durante todo o ciclo celular. Uma série de características importantes está associada à heterocromatina, como a quase ausência de atividade gênica, replicação tardia na fase S do ciclo celular e presença de DNA repetitivo. Classicamente a heterocromatina está dividida em heterocromatina facultativa e constitutiva, sendo a última um componente cromossomal amplamente estudado pelos citogeneticistas (Sumner 2003).

A identificação e visualização das porções heterocromáticas nos cromossomos só se tornaram possíveis em um grande número de espécies com o advento das técnicas

de bandeamento C (Guerra et al. 2000b). Isso possibilitou um refinamento das análises citogenéticas e consequentemente uma maior riqueza na comparação cariotípica entre grupos relacionados (Guerra 2000b). Vários exemplos tratam da caracterização cariotípica e da citotaxonomia utilizando bandeamento C, como por exemplo nos gêneros *Allium* (Loild 1982), *Scilla* (Greilhuber e Speta 1989), *Capsicum* (Moscone et al. 1993) e *Astroemeria* (Buitendijk et al. 1998).

Embora possa ser bastante informativa, a técnica de bandeamento C apresenta a desvantagem de ser muito laboriosa e de apresentar uma baixa reprodutibilidade. As técnicas de bandeamentos com fluorocromos foram inicialmente pouco difundidas, porque utilizavam equipamentos na época muito “sofisticados” (microscópio de fluorescência), mas logo se tornaram mais difundidas e atualmente são amplamente utilizadas em análises citogenéticas de plantas. Não somente cromossomos ou regiões cromossômicas têm sido identificados com o uso dessas técnicas, mas também características estruturais e/ou citoquímicas podem ser determinadas (She et al. 2005). Entre os fluorocromos mais utilizados atualmente na citogenética estão o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e o Hoechst 33258, usados para a identificação de regiões do genoma ricas em pares de base adenina e timina (AT), e a cromomicina A3 (CMA) usada para distinguir regiões no cromossomo ricas em guanina e citosina (GC).

O bandeamento cromossômico usando simultaneamente os fluorocromos CMA e DAPI (dupla coloração CMA/DAPI) tem contribuído para a compreensão das relações evolutivas, por exemplo, no gênero *Citrus* L. (Moraes et al. 2007). As espécies desse gênero apresentam grandes segmentos de heterocromatina ricos em CG, portanto, CMA⁺, que permite classificar os cromossomos em tipos claramente definidos. Com esse nível de reconhecimento dos cromossomos foi possível compreender muitos aspectos da história dos cultivares de *Citrus*, incluindo a origem de cultivares híbridos e

a relação entre as espécies cítricas e gêneros relacionados (ver Guerra et al. 2000c; Cornélio et al. 2003; Yamamoto et al. 2007; Moraes et al. 2007). Uma abordagem muito similar foi utilizada por Hizume et al. (1989), também utilizando o bandejamento CMA/DAPI em espécies do gênero *Pinus* L. Nesses dois gêneros, além da identificação dos cromossomos, o uso da dupla coloração possibilitou o reconhecimento de híbridos interespecíficos.

Greilhuber (1984), revisando a utilização de dados citogenéticos na taxonomia, indicou a heterocromatina, visualizada através dos bandeamentos cromossômicos, tanto o bandejamento C como o uso de fluorocromos, como a principal ferramenta citotaxonômica. Porém, embora o uso de bandejamento cromossômico tenha proporcionado um maior detalhamento das análises citogenéticas e uma melhor resolução de problemas sistemáticos, alguns grupos apresentam baixa quantidade de heterocromatina, como em *Nothoscordum pulchellum* Kunth (Guerra e Felix 2000), tendo esta pouco valor citotaxonômico. Em outros casos, como em algumas espécies de *Costus* L. (Guerra 1988), a heterocromatina apresenta um padrão monomórfico ocupando a região pericentromérica de todo o complemento cromossômico e nesse caso não permite a identificação de pares cromossômicos ou a compreensão das relações de parentesco entre espécies próximas.

2.1.1.3. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica de hibridização *in situ* consiste basicamente no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA (sonda) com uma sequência de nucleotídeos complementar situada dentro da célula (alvo), visando verificar se a célula possui essa sequência e qual sua localização (Guerra 2004). Para visualizar o segmento de DNA ou RNA hibridizado é necessário que ele esteja marcado com alguma molécula que permita

a sua identificação. As primeiras análises utilizavam sondas com marcação radioativa, o que apresentava a desvantagem de gerar muitos sinais inespecíficos de fundo (*background*), além dos problemas de manipulação e descarte dos isótopos radioativos. Mas recentemente, essa marcação passou a ser realizada com moléculas fluorescentes, o que originou a hibridização *in situ* fluorescente ou FISH (sigla do inglês *Fluorescent In Situ Hybridization*).

Nos últimos anos, a FISH tem ampliado consideravelmente o nível de análise e o campo de atuação da citogenética vegetal (Jiang e Gill 2006). As sequências mais utilizadas para a identificação cromossômica em plantas são os DNAs ribossomais (DNAr) 5S e 45S (Guerra 2004). Essas sequências apresentam a vantagem de serem repetidas centenas ou milhares de vezes e estarem organizadas em *tandem* em um ou mais blocos, o que facilita sua detecção. Além disso, os DNAs ribossomais são altamente conservados, podendo a sonda isolada em uma determinada espécie ser usada em quase todas as plantas. Existe muita controvérsia em relação ao uso dessas sondas ribossomais para a citotaxonomia. Em muitos casos tem sido observada extensa variabilidade dessas marcas, inclusive intraespecífica (Pedrosa-Harand et al. 2006) ou em grupos muito próximos (Ran et al. 2001), o que sugere que esses genes tenham um padrão de diversificação e evolução extremamente rápida. Em *Clivia* Lindl., por exemplo, observou-se que eventos de amplificação e desamplificação de sítios de DNAr 45S ocorreram ao longo da evolução do gênero, sendo observados de dois a seis sítios por espécie (Ran et al. 2001). Porém, em outros casos, o número e a posição de sítios de DNAr foram extremamente úteis para caracterizar espécies, gêneros ou clados (Liu et al. 2003).

Mais recentemente, novas análises têm aliado a informação do número e posição de sítios de DNAr a filogenias moleculares. Essa abordagem permite interpretar com

maior precisão as relações entre as espécies e identificar como se deu a evolução do DNAr nesse contexto. Vaio et al. (2005) investigaram a origem de alotetraploides do grupo Quadrifaria de *Paspalum* L. (Poaceae), que é formado por espécies nativas das regiões temperadas da América do Sul. Os autores observaram um sítio de DNAr 5S por conjunto monoplóide localizado sempre na região intersticial dos cromossomos. Por outro lado, a localização dos sítios de DNAr 45S variaram em número, mas principalmente quanto à posição, sendo encontradas espécies com sítios intersticiais e espécies com sítios terminais. Essa abordagem permitiu identificar que o alotetraploide *P. quadrifarium* Lam. apresentava sítios de DNAr 45S intersticiais em dois pares cromossômicos e terminais em outros dois, enquanto a forma diploide dessa espécie apresentava apenas sítios terminais. A única espécie desse grupo a apresentar sítios intersticiais foi o diplóide *P. haumanii* Parodi., o que sugeriu fortemente que esse seria um dos parentais do alopoliploide. Quando esses dados foram comparados com a filogenia molecular, se observou que *P. quadrifarium* 4x e *P. haumanii* 2x eram mais próximas entre si e que *P. quadrifarium* 2x estava posicionada em um outro clado, corroborando a hipótese sugerida com base na posição dos sítios de DNAr 45S (Vaio et al. 2005).

Mais recentemente, tem sido desenvolvida uma estratégia que refina ainda mais a análise citogenética, utilizando sondas clonadas em vetores BAC como sonda para a hibridização *in situ*, chamada BAC-FISH (Jenkins e Hasterok 2007). Os BACs são vetores que apresentam insertos de até 300 kb e são altamente estáveis, sendo poderosas ferramentas para a análise detalhada de genomas complexos (Monaco e Larin 1994). Em muitos casos, a BAC-FISH possibilitou o reconhecimento individual de todos os cromossomos de uma espécie, como em *Phaseolus vulgaris* L. (Fonsêca et al. 2011) e *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Kim et al. 2004). Esses marcadores cromossomo-

específicos podem ser mapeados em espécies ou gêneros próximos, o que permite explorar com mais detalhes a evolução cariotípica através da identificação de mudanças de sintenia (presença de dois ou mais loci gênicos no mesmo cromossomo) ou colinearidade (manutenção da ordem de loci marcadores). Mendes et al. (2011) com base no padrão de bandas CMA de *Citrus medica* L. e hibridação de 25 BACs de uma biblioteca genômica de *Poncirus trifoliata* L. (Raf) (Moraes et al. 2008; Silva et al. 2011), uma espécie relacionada ao gênero *Citrus*, identificaram cada par de cromossomos e construíram um mapa citogenético comparativo para *C. medica*. Essa análise revelou um alto grau de conservação de sequência entre esses gêneros, permitindo a hibridação heteróloga de BACs, e o estabelecimento de homeologias cromossômicas. Nesse caso, foram observadas poucas mudanças na posição dos BACs e maior variabilidade nas bandas CMA. Uma importante variante da BAC-FISH foi desenvolvida para a análise de pintura cromossômica (Lysak et al. 2006). Essa variação consistiu no uso de BACs contíguos, ou seja, posicionados de forma adjacente, o que resultava num sinal de hibridização “pintando” um cromossomo, segmento ou braço cromossômico inteiro. Essa abordagem foi empregada na análise da evolução cariotípica da família Brassicaceae, onde foram observados múltiplos rearranjos envolvidos na redução a partir de um cariótipo ancestral $n = 8$ para $n = 5$ em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., incluindo cariótipos intermediários com $n = 6$ e $n = 7$.

Uma limitação do uso da BAC-FISH em plantas é que poucas espécies (a maioria delas cultivadas e/ou modelo) apresentam bibliotecas de BACs disponíveis. Em outros casos, o fator limitante para a utilização dessas bibliotecas é o tamanho do genoma (valor 1C). Quanto maior o conteúdo de DNA nuclear, maior o número de clones necessário para uma cobertura satisfatória de todo o genoma. Por exemplo, em *A. thaliana* (1C = 157 Mb; Johnston et al. 2005) a análise de 9.000 clones levaram a uma

cobertura de 4,5× do genoma dessa espécie (Wang et al. 1996). Por outro lado, *Allium cepa* L. (1C = 15.000 Mb) uma biblioteca com 48.000 clones, apresentou uma cobertura do genoma de apenas 0,32× (Suzuki et al. 2001), o que significa uma baixa representatividade e consequentemente uma sub-representação desse genoma.

2.1.1.4. Hibridização genômica *in situ* (GISH)

Schwarzacher et al. (1989), analisando híbridos de *Hordeum* L. × *Secale* L. desenvolveram uma modificação da técnica de FISH em plantas, criando uma nova metodologia chamada GISH (do inglês *Genomic In Situ Hybridization*). Nesta, o DNA genômico total de uma espécie parental é hibridizado *in situ* nos cromossomos de um híbrido, o que permite discriminar a presença deste subgenoma no mesmo. Markova e Vyskot (2009), revisando esse tema, concluíram que a eficiência da técnica em discriminar genomas depende do nível de divergência filogenética entre os parentais (principalmente da fração repetitiva do genoma) e do tamanho do genoma dessas espécies, sendo mais eficiente naquelas com elevada quantidade de DNA (ver, por exemplo, Brasileiro-Vidal e Guerra 2002). Em espécies com genomas pequenos, a GISH tende a marcar somente a região heterocromática, como por exemplo, em *A. thaliana* (Markova e Vyskot 2009). Ali et al. (2004) propuseram uma variante metodológica para melhorar a eficiência da GISH em espécies com genomas pequenos, que consistia em aumentar muito a concentração de sonda no *mix* de hibridização e o tempo de incubação. Essas modificações da técnica permitiram investigar a relação entre os genomas de *Cardaminopsis carpatica* Mesicek (genoma TT), *A. thaliana* (genoma AA) e híbridos que apresentam diferentes combinações dos genomas destas espécies.

Em um trabalho posterior, foi investigada com a GISH a proporção de genomas parentais em cultivares híbridos de *Lolium* L. × *Festuca* L. (*Festulolium*). Neste

trabalho a GISH permitiu não somente identificar nesses híbridos a contribuição de cada parental no cariótipo, senão também a taxa de cromossomos recombinantes (Kopecký et al. 2006). Essa distinção entre genomas parentais foi uma contribuição importante para o melhoramento, pois uma alta proporção de cromossomos de *Lolium* estava correlacionada a cultivares com mais produtividade, enquanto o predomínio de cromossomos oriundos de *Festuca* está relacionado a cultivares mais rústicos. Além dos híbridos de *Festulolium*, diferentes proporções de genomas parentais em híbridos artificiais foram demonstradas em várias plantas cultivadas como por exemplo em trigo (Brasileiro-Vidal et al. 2002) e cana-de-açúcar (Piperidis et al. 2010).

O uso da GISH tem sido demonstrado também em estudos de evolução em espécies de eudicotiledôneas com cromossomos menores. O gênero *Dahlia* Cav. (Asteraceae) compreende espécies nativas da América do Norte utilizadas como plantas ornamentais, que apresentam facilidade de cruzamentos interespecíficos, apresentam os números básicos $x = 18$, $x = 17$ e $x = 16$. Mediante a GISH foi analisado o comportamento meiótico dos distintos genomas em híbridos de *Dahlia*. Nessas análises foi observada a presença de univalentes, bivalentes e trivalentes na metáfase I, na qual os bivalentes estavam formados por cromossomos de genomas distintos e os trivalentes conformados por diferentes combinações de cromossomos de cada um dos parentais. O pareamento meiótico de cromossomos de genomas distintos na metáfase I sugere uma alta conservação nos cromossomos homeólogos. Além disso, esses resultados indicaram uma origem alotetraploide para as espécies de *Dahlia* com $2n = 32$ e provavelmente também para as espécies com $2n = 34$ e 36 (Gatt et al. 1999).

Poucos trabalhos utilizaram a GISH na análise em híbridos naturais. Moraes e Guerra (2010) analisaram a relação entre o diploide *Emilia sonchifolia* L. (DC) ($2n = 10$) e o tetraploide *E. fosbergii* Nicolson ($2n = 20$) (Asteraceae), as duas únicas espécies

do gênero que ocorrem no Brasil. Em *E. fosbergii* são observados duas séries de dez cromossomos, uma delas com cromossomos maiores e outra com cromossomos menores. O conjunto de cromossomos menores é semelhante ao cariótipo de *E. sonchifolia*, o que sugeriu que esta espécie poderia estar envolvida na origem do tetraploide *E. fosbergii* (Guerra e Nogueira 1990). Essa hipótese foi testada por GISH e revelou alta similaridade entre o genoma de *E. sonchifolia* e o menor conjunto cromossômico de *E. fosbergii*, sugerindo que esta espécie seja mesmo um alotetraploide (Moraes e Guerra 2010).

2.2. Principais mudanças cariotípicas em plantas

Um polimorfismo cromossômico é definido como uma variação cariotípica natural que pode ocorrer ao nível de espécie (intra-específica) ou em hierarquias taxonômicas mais elevadas, como tribos, gêneros, famílias, etc. Em geral, os polimorfismos cromossômicos se dividem em dois tipos principais, numéricos (quando há uma alteração no número cromossômico) e estruturais (quando ocorre perda, ganho ou rearranjo de segmentos sem alteração no número cromossômicos). A variabilidade cromossômica, ou cariotípica intra-específica pode ocorrer em: (1) diferentes células/tecidos do indivíduo, (2) diferentes fases do ciclo de vida de uma planta, podendo esta ser ou não ser geneticamente controlada ou (3) entre diferentes citótipos. Um exemplo do primeiro caso é observado na formação do endosperma, um tecido de nutrição do embrião formado pela fusão dos núcleos centrais polares do saco embrionário ($2n$) com um núcleo reprodutivo do grão (n), o que resulta num tecido triploide e, portanto, com um conjunto cromossômico a mais que os demais tecidos da planta (Guerra et al. 1988). O segundo caso pode ser exemplificado pela alternância de

gerações entre as fases esporofíticas e gametofíticas das Angiospermas, que são diploides e haploides, respectivamente.

Em relação à variação cariotípica numérica, a principal e que merece maior destaque entre as plantas é a poliploidia, que é a condição herdável de possuir mais de dois conjuntos cromossômicos. A julgar pela alta incidência em muitos grupos de plantas, a poliploidia teve uma função importante na evolução destas. A adição de conjuntos cromossômicos fornece material genético redundante que pode mutar originando novos genes. Assim, os poliploides com frequência apresentam maior diversidade bioquímica, sob a qual a seleção natural pode atuar. Como resultado, os poliploides tendem a ter uma distribuição geográfica mais ampla e habitats mais extremos do que seus parentais diploides. A formação de um poliploide é frequentemente acompanhada por mudanças no seu genoma (Soltis e Soltis 1999) e às vezes pela perda da auto-incompatibilidade e sexualidade. A poliploidia é também o principal facilitador de um processo rápido de especiação, denominado especiação poliploide (revisado por Levin 2002).

A poliploidia é de interesse fundamental para o melhoramento vegetal, tendo em vista que os poliploides tendem a ser mais vigorosos. Por isso, grande parte das plantas cultivadas são poliploides. Entre plantas silvestres, também existem vários exemplos de poliploides naturais com adaptabilidade igual ou superior à dos diploides. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (também conhecida como *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul.) é uma leguminosa arbórea nativa do Brasil que apresenta populações diploides ($2n = 24$) e tetraploides ($2n = 48$) que ocupam áreas mais úmidas e secas da Mata Atlântica, respectivamente. Comparando a fenologia, morfologia e visitantes florais, sistema de cruzamento e sucesso reprodutivo em ambos citótipos observou-se que além da separação geográfica os distintos citótipos apresentam uma série de atributos florais

distintos, como o sistema de compatibilidade e a morfologia floral, distintas, o que sugere que os dois níveis de ploidia de *L. ferrea* poderiam ser considerados como taxa distintos (Borges et al. 2012, submetido). O citótipo tetraploide deve ter surgido bem recentemente, uma vez que em relação ao diploide não apresenta diferenças cariotípicas, possuindo uma exata duplicação dos cromossomos e dos sítios de DNAr 5S e 45S (Souza et al. 2008).

Esse caso de *L. ferrea* trata de um exemplo de autoploidia, ou seja, cujas cópias extras do genoma são oriundas do próprio genoma da espécie. Embora antigamente a autoploidia fosse considerada como um evento raro, estudos genéticos têm demonstrado que a autoploidia é mais frequente do que tradicionalmente se pensava (Levin 2002; Soltis et al. 2004). O outro tipo de poliploidia é aquele formado pela união de dois genomas distintos, chamado aloploidia. Esta se relaciona com a hibridização interespecífica e a duplicação dos genomas para formar o aloploide e pode ocorrer antes ou mais provavelmente depois da formação do híbrido. Esse tipo de poliploidia é mais tolerável do que a autoploidia, pois em geral, garante uma meiose regular com formação de bivalentes e segregação normal. Por outro lado, os autopoliploides tendem a formar multivalentes complexos na meiose o que pode gerar segregação anormal e gametas desbalanceados. A diferença entre auto- e aloploide é também relativa ao grau de similaridade filogenética entre os genomas envolvidos no cruzamento, podendo haver condições intermediárias com genomas parcialmente similares (Soltis e Soltis 2009).

Embora existam poucos casos de correlação direta entre polimorfismos cariotípicos e adaptação (*Drosophila wistonii* Sturtevant, 1916 - Pavan et al. 1950; *Nucella lapillus* Linnaeus, 1758 - Bantock e Cockayne 1975), sabe-se que mudanças no cariótipo podem levar ao isolamento de populações, através da interrupção do fluxo

gênico, e consequentemente influenciar no processo de especiação. Quando populações/grupos de indivíduos compartilham uma variante cariotípica esses são chamados citótipos. Em alguns casos, essas variantes cariotípicas ocorrem em baixa frequência e parecem surgir ao acaso, sem grandes implicações evolutivas para a espécie, como no caso do indivíduo com uma translocação recíproca de *Nothoscordum arenarium* Herter (Souza et al. 2009). Por outro lado, algumas espécies apresentam citótipos com diferenças ecológicas, biogeográficas, morfológicas etc., tão marcantes que sugerem um isolamento entre elas. É o caso de *Libidibia ferrea* na qual os citótipos diploide e tetraploide além das diferenças morfológicas apresentam distribuição geográfica alopátrica, com diploides em regiões mais úmidas e tetraploides em florestas mais secas do nordeste brasileiro (Borges et al. 2012, submetido).

2.2.1. Translocações Robertsonianas (TR)

Os rearranjos cromossômicos envolvendo fusão cêntrica de dois cromossomos acro- ou telocêntricos para formar um único cromossomo metacêntrico ou o contrário são genericamente chamados de fusão-fissão cêntrica ou translocações Robertsonianas (TR). Um aspecto interessante nos eventos de TR é que eles podem causar mudança no número cromossômico (disploidia) e portanto no pareamento meiótico e também por consequência na recombinação, podendo ainda levar ao isolamento reprodutivo de populações (Levin 2002). Em geral a evolução cariotípica de um grupo de espécies está relacionada às TRs, quando são observados nas mesmas números cromossômicos diferentes, mas conservação no número de braços cromossômicos ou número fundamental (NF) (Guerra 2008).

Slijepcevic et al. (1997) indicaram três tipos básicos de TR. O primeiro tipo envolve um encurtamento gradativo dos telômeros do braço curto de dois acrocêntricos envolvidos na translocação. Com essa perda dos telômeros, a extremidade dos braços curtos se torna instável, propiciando uma fusão cêntrica. O segundo tipo, envolve inicialmente uma quebra cromossômica na região centromérica de dois cromossomos acro- ou telocêntricos. Posteriormente haveria fusão cêntrica dos braços longos, resultando em um metacêntrico e um pequeno fragmento formado pela união dos dois braços curtos, o qual seria posteriormente perdido. O terceiro tipo é uma simples fusão cêntrica de dois cromossomos acro- ou telocêntricos, resultando em um metacêntrico dicêntrico e com DNA telomérico intercalar entre os dois centrômeros. Schubert e Lysak (2011), baseados nas mais recentes análises de pintura cromossômica, concluíram que o evento conhecido como “fusão cêntrica” é sempre resultado de uma translocação recíproca, sendo que fusões verdadeiras *end-to-end* são restritas a alguns poucos casos onde se observam cromossomos telocêntricos, sendo provavelmente o segundo modelo proposto por Slijepcevic et al. (1997) o mais frequente nas plantas analisadas (Schubert e Lysak, 2011). Zhang et al. (2001) estudaram em híbridos de trigo com centeio os mecanismos de quebras no centrômero envolvidas em TR. Para analisar a estrutura centromérica foi utilizada para hibridização *in situ* uma sonda centromérica específica de centeio (pAWRC1) e outra (pRCS1) comum a todas as gramíneas, incluindo o trigo. Nessas análises foram observados cromossomos resultantes de translocações entre os dois taxa. Nos cromossomos translocados foi observado que os centrômeros apresentavam diferentes pontos de quebras, desde centrômeros inteiramente de trigo, inteiramente de centeio ou uma situação intermediária com metade do centrômero de trigo e a outra metade de centeio. Os autores concluíram que as quebras centroméricas e fusões podem ocorrer em várias posições na constrição primária e a posição da quebra

parece não afetar a função do centrômero nem a segregação cromossômica durante as divisões celulares.

Os eventos de TR parecem ser mais importantes em mamíferos, onde extensos rearranjos desse tipo têm sido frequentemente reportados e constituem um dos pilares centrais da evolução cariotípica desse grupo (Ferguson-Smith e Trifonov 2007). Diferentemente, em plantas apenas em uns poucos taxa a evolução cariotípica tem sido claramente relacionada a esse mecanismo. Jones (1998) revisou os principais grupos de plantas cuja evolução está associada a TR, destacando as famílias Alliaceae, Orchidaceae, Podorcapaceae, a tribo Tradescantieae (Commelinaceae) e os gêneros *Crocus* L. (Iridaceae) e *Lycoris* Herb. (Amaryllidaceae). *Allium* L. apresenta um caso particular, pois em geral, não é possível associar as diferenças de números básicos do gênero ($x = 6, 7, 8$ e 10) à TR. Cromossomos acrocêntricos são raros nesse gênero e quando eles aparecem, por exemplo em *A. roseum* L. $x = 8$ ($7M + 1A$), parecem estar mais relacionados a uma mudança na posição do centrômero (inversão pericêntrica) a partir de um cromossomo submetacêntrico. Uma das poucas exceções é o grupo de *A. erdeii* encontrados em Negev, Israel (Kollman 1970). Nesse grupo *A. qasynense* com $2n = 14M$, *A. erdeii* $2n = 16$ ($12M + 4A$) e *A. negevense* $2n = 20$ ($8M + 12A$) apresentam uma relação Robertsoniana e sugerem uma série de fissões a partir de $2n = 14M$. *Allium zebadense* com $2n = 18$ ($14M + 4A$) também parece se tratar de um caso de múltiplas fissões a partir de $2n = 16M$. Hongguan et al. (2005) realizaram uma análise comparativa entre *Allium* e *Milula* Prain., um pequeno gênero endêmico do Tibet (Ásia). Embora esses gêneros apresentem grandes diferenças morfológicas as análises filogenéticas posicionaram *Milula* próximo a *A. cyathophorum*. A análise cariotípica revelou $2n = 20$ ($4M + 2SM + 12A$) em *M. spicata* e $2n = 16$ ($14M + 2SM$) na maioria das espécies de *Allium*. Os autores argumentaram que na origem do gênero *Milula* deve

ter ocorrido uma rápida diversificação tanto cariotípica (provavelmente relacionada a translocações Robertsonianas) como morfológica (possivelmente relacionada a um habitat muito específico na cadeia montanhosa do Himalaia).

Poucos estudos investigaram a importância e dinâmica dos eventos de fissão cêntrica, que aparentemente são mais raros que os eventos de fusão (Guerra 2008). Hall e Parker (1995) observaram que um indivíduo mutante de *Hypochaeris radicata* ($2n = 8M$) apresentava cromossomos acrocêntricos extras, provavelmente derivados de fissão cêntrica, o que gerou $2n = 6M + 2A$ (homozigoto) e $2n = 7M + 1A$ (heterozigoto). Esses cromossomos fissionados apresentavam sítios de DNAr 45S extras nas extremidades livres geradas pela quebra. Aparentemente a transferência do DNAr para os terminais cromossômicos teriam contribuído para a estabilização dessa região, desempenhando a função telomérica. Pich et al. (1996) investigando os terminais cromossômicos do gênero *Allium* observaram que os mesmos não apresentavam DNA telomérico e sugeriu que sequências repetitivas localizadas nessa região, incluindo um DNA satélite e o DNAr 45S, poderiam estabilizar os terminais cromossômicos e desempenhar a função telomérica. O ITS (do inglês *Internal Transcribed Spacer*) do DNAr 45S de *Vicia faba* L. apresentou unidades de repetição semelhantes ao DNA telomérico e quando esse DNA era usado como sonda hibridizava nos terminais cromossômicos, suportando uma associação entre telômeros e RONS (Maggini et al. 1991). Roa (2011) revisaram a distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S em plantas e observaram uma frequência maior do que a esperada ao acaso de sítios de DNAr 45S nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos, corroborando a hipótese de correlação entre fissões cêntricas e aparecimento de novos sítios de DNAr 45S.

2.2.2. DNA telomérico

Uma estratégia amplamente utilizada para estudar os eventos de fusões Robertsonianas é analisar por FISH a distribuição do DNA telomérico. Em tese, esperar-se-ia sítios intersticiais nos pontos de fusões cêntricas, resultados de fusões *end-to-end* (Cox et al. 1993; Fuchs et al. 2005). A porção final do cromossomo eucarioto frequentemente, mas não sempre, é formada por microssatélites ricos em T_nG_n organizados em *tandem* e arranjados em muitas centenas ou milhares de repetições. Essa região é denominada telômero e, além de uma constituição de DNA característica, apresenta um conjunto de proteínas específicas e estrutura tridimensional em *t-loop* que estão relacionadas com sua função (revisado por McKnight e Shippen 2004). Os *repeats* teloméricos são predominantemente mantidos pela enzima telomerase, uma transcriptase reversa que adiciona esses *repeats* no final da fita 3', o que compensa o encurtamento dos telômeros a cada ciclo celular. Essa enzima contém um molde de sequência de RNA para o tipo de *repeat* a ser adicionado no terminal dos cromossomos (Weiss e Scherthan 2002). Acredita-se que os telômeros desempenhem as seguintes funções: 1) prevenir a fusão *end-to-end* dos cromossomos; 2) estabilizar o filamento de DNA e interação com proteínas telomero-associadas específicas de ligação com o envelope nuclear, atuando na disposição do cromossomo no núcleo interfásico; e 3) evitar o encurtamento da molécula linear de DNA causado pela replicação incompleta da extremidade 5' feita pela DNA polimerase durante a fase S do ciclo celular (Price 1999; Sýkorová et al. 2003a; McKnight e Shippen 2004).

A sequência de DNA que forma os telômeros, denominada sequência telomérica ou DNA telomérico, é altamente conservada nos eucariotos, sendo conhecidas sequências teloméricas típicas para vertebrados, isolada de humanos $(T_2.A.G_3)_n$ insetos,

isolada de *Bombyx mori* (T₂.A.G₂)_n, algas, isolada de *Chlamydomonas reinhardtii* (T₄.A.G₃)_n, e de plantas, isolada de *Arabidopsis thaliana* (T₃.A.G₃)_n (ver Adams et al. 2001). Richards e Ausubel (1988) analisaram inicialmente o DNA telomérico de plantas construindo uma biblioteca genômica de *Arabidopsis thaliana* enriquecida em oligonucleotídeos (T₄. G₃)_n, a única sequência telomérica descrita até então isolada do ciliado *Tetrahymena*. O sequenciamento de clones isolados revelou a presença de *repeats* (T₃.A.G₃)_n dispostos em *tandem*. Para checar se essa sequência era o DNA telomérico, foi realizada uma digestão com exonuclease (uma enzima que degrada a porção terminal dos cromossomos) que revelou uma alta sensibilidade desses oligonucleotídeo à ação dessa enzima. Uma outra abordagem foi investigar por *Southern blot* um mutante telotrissômico de *A. thaliana*. Nesse caso, foi observada uma banda adicional na hibridização do mutante, correspondendo ao telômero do cromossomo telocêntrico extra. Por fim, a sequência (T₃.A.G₃)_n foi hibridizada por *Southern blot* em outras plantas, que também apresentaram marcação positiva, e em milho (*Zea mays*), foi realizada digestão com exonuclease, que revelou que essa sequência também estava nos telômeros dessa espécie.

Diversos trabalhos subsequentes demonstraram a ocorrência da sequência telomérica de *Arabidopsis* em outras plantas incluindo tomate (Ganal et al. 1991) e cevada (Röder et al. 1992). Cox et al. (1993) através de PCR construíram uma sonda para hibridização *in situ* com a sequência telomérica (T₃.A.G₃)_n, e investigaram a ocorrência desse DNA telomérico em 11 espécies de seis famílias de angiospermas, incluindo mono e eudicotiledôneas. Os autores observam marcação nos telômeros em todas as espécies analisadas, sugerindo que a sequência tipo-*Arabidopsis* seja comum a todas as angiospermas. Entretanto, outras análises começaram a trazer evidências de que a sequência consenso das plantas (T₃.A.G₃)_n foi perdida em alguns clados.

Fuchs et al. (1995) investigaram a distribuição da sequência telomérica de *Arabidopsis* em 44 espécies de 14 famílias de plantas. Os autores mostraram a presença do DNA telomérico tipo *Arabidopsis* em todas as espécies analisadas, com exceção dos gêneros *Allium*, *Nothoscordum* e *Tulbaghia*, monocotiledôneas da família Alliaceae. Análises posteriores na família Alliaceae sugeriram que, ao menos em *Allium*, essa sequência poderia ter sido substituída pelo DNAr, sequências satélite (heterocromatina) ou elementos transponíveis nos terminais dos cromossomos, embora não existisse uma demonstração clara desse mecanismo (Pich et al. 1996). Adams et al. (2000) mostraram que *Aloe* (Asphodelaceae) também perdeu a sequência $(T_3.A.G_3)_n$. Além desses gêneros também foi observada a perda da sequência telomérica de *Arabidopsis* em outras 16 espécies de 12 famílias de Asparagales (Adams et al. 2001). Nesses casos foi observado que essas espécies que perderam a repetição telomérica tipo-*Arabidopsis* formavam um clado monofilético dentro da ordem Asparagales, sugerindo que essa perda do DNA telomérico teria ocorrido em um único evento há cerca de 80-90 milhões de anos durante a evolução dessa ordem (Adams et al. 2001). A primeira mudança telomérica ocorreu depois da divergência de *Doryanthes* (com telômero tipo-*Arabidopsis*) no ancestral de todas as espécies de Asparagales, com o surgimento da sequência telomérica de vertebrados (Sýkorová et al. 2006b).

Surpreendentemente, Weiss e Scherthan (2002) demonstraram através de *southern blot* e hibridização *in situ* que a sequência telomérica que ocorre em *Aloe* é idêntica a dos vertebrados $(T_2.A.G_3)_n$. Sýkorová et al. (2003) caracterizaram então o DNA telomérico de outras Asparagales, checando qual das sequências teloméricas conhecidas até então (*Arabidopsis*, humano, *Bombyx*, *Chlamydomonas*, *Oxytricha*, *Tetrahymena* e *Ascaris*) estava presente nessas espécies. Os autores observaram que a sequência telomérica típica da maioria das plantas (*Arabidopsis*) foi parcialmente ou

totalmente substituída pela sequência de vertebrados $(T_2.A.G_3)_n$ e que posteriormente as espécies de *Allium* perderam essa sequência alternativa, sendo o *repeat* telomérico desse gênero ainda desconhecido. Em muitos casos ocorrem concomitantemente no mesmo telômero diferentes variantes teloméricas como as de *Arabidopsis*, *Bombyx* $(T_2.A.G_2)_n$ e *Tetrahymena* $(T_4.G_3)_n$, inclusive na FISH, que mostrou que essas sequências alternativas podem aparecer misturadas no mesmo telômero (Sýkorová et al. 2003). Trabalhos subsequentes revelaram um grupo muito maior de espécies de Asparagales com a sequência telomérica de vertebrados (Rotková et al. 2004; Sýkorová et al. 2006a). Sýkorová et al. (2006b) resumiu então que de maneira geral, na ordem Asparagales são encontrados três tipos de sequências teloméricas: $(T_3.A.G_3)_n$ (*Arabidopsis*), $(T_2.A.G_3)_n$ (vertebrados) e uma sequência desconhecida presente no gênero *Allium*.

Buscando investigar melhor a variabilidade no *repeat* telomérico nas espécies de Asparagales, Weiss-Scheeweiss et al. (2004) analisaram minuciosamente o DNA telomérico em *Othocallis siberica* (Hyacinthaceae). Esse trabalho revelou através de *Southern blot* e FISH que essa espécie perdeu a sequência telomérica de *Arabidopsis*, que foi substituída pela sequência dos vertebrados. Além disso, a digestão com a exonuclease *Bal31* revelou sensibilidade desse oligonucleotídeo, indício de que essa sequência correspondia aos telômeros. Adicionalmente foi investigada a atividade *in vitro* da enzima telomerase nessa espécie (Fitzgerald et al. 1996; 2001). Essa análise revelou que a telomerase de *O. siberica* sintetizava o DNA telomérico de vertebrados, o que indicou que possivelmente uma mutação no gene da telomerase tenha sido responsável pela mudança da sequência telomérica.

Para investigar a causa dessa variabilidade em Asparagales, Sýkorová et al. (2006b) estudaram o gene da enzima telomerase, mais especificamente da subunidade TERT (*telomerase reverse transcriptase*), em representantes dessa ordem.

Alinhamentos múltiplos de sequências de Asparagales junto com a sequência TERT de outras espécies que possuíam telômeros tipo *Arabidopsis*, revelaram uma substituição de aminoácidos no TERT de Asparagales (terminal-N), o que pode estar relacionado com a síntese do *repeat* telomérico de vertebrados e consequentemente com a mudança na sequência telomérica. Além disso, mutações foram observadas no motivo C, que é de especial importância na unidade TERT. Uma outra possibilidade é uma mudança no molde de RNA usado como iniciador pela transcriptase reversa. A mudança na síntese do motivo telomérico de TTTAGGG para TTAGGG pode se dever à uma deleção dentro da região molde, que poderia ter sido gerada por uma mutação nos nucleotídeos adjacentes a região molde, que resultaria num *template* diferente. Entretanto, não há consenso sobre qual ou quais mutações no gene da telomerase levaram à substituição da sequência telomérica tipo *Arabidopsis* pela dos vertebrados em Asparagales.

Além desse grupo de Asparagales, a perda do DNA telomérico tipo-*Arabidopsis* têm sido reportada em outros grupos de plantas. Sýkorová et al. (2003) usando *slot blot* e FISH analisando a sequência telomérica em espécies de Solanaceae observaram que um clado formado pelos gêneros *Cestrum*, *Sessea* e *Vestia* não possuía o *repeat* telomérico $(T_3.A.G_3)_n$ típico da maioria das plantas. Por outro lado, também não foi observada a sequência de vertebrados, como em Asparagales. Esse dado é interessante, pois nessa família estão gêneros ou grupos cuja sequência telomérica tipo *Arabidopsis* já foi encontrada, como *Nicotiana* e *Solanum*. A ausência de DNA telomérico tipo $(T_3.A.G_3)_n$ nessas espécies é o primeiro registro de perda do *repeat* tipo *Arabidopsis* em eudicotiledôneas.

2.3. A família Alliaceae

A família Alliaceae está inserida no clado das monocotiledôneas, na ordem Asparagales (APG II 2003). O grupo inclui plantas perenes ou anuais, herbáceas, geralmente tóxicas, com caule subterrâneo do tipo bulbo tunicado, simples (cebola) ou composto (alho). A família é amplamente distribuída sendo, porém, mais abundante em locais secos de regiões temperadas, subtropicais e tropicais. São descritas para Alliaceae três subfamílias: Allioideae Herbert, Gilliesioideae (Lindley) Arnott e Tulbaghioidea (Meisner) M. F. Fay & M. W. Chase (Fay e Chase 1996).

A subfamília Allioideae apresenta distribuição em regiões temperadas do hemisfério norte e zonas secas da Ásia central e do norte da África. Esta é a maior subfamília de Alliaceae, com dois gêneros e aproximadamente 690 espécies. A subfamília Gilliesioideae apresenta distribuição nas Américas, com maior diversidade na América do Sul, sendo composta por dez gêneros e cerca de 80 espécies. A subfamília Tulbaghioidea é a menor de Alliaceae, com distribuição restrita ao sudoeste da África. É formada por apenas dois gêneros e 23 espécies (APG II 2003; Vosa 2007).

Existem divergências entre os autores no que se refere ao reconhecimento de Alliaceae. Utilizando sequências plastidiais (*matK* e *rbcL*), Tamura et al. (2004) propuseram uma filogenia para as monocotiledôneas e definiram Alliaceae como um grupo monofilético independente de Liliaceae. Nesse trabalho ficou evidente a estreita relação de Alliaceae e Amaryllidaceae, que aparecem como grupos irmãos. Trabalhos mais recentes sugerem que a família Alliaceae deveria ser inserida em Amaryllidaceae (APG III 2009).

A subfamília Gilliesioidea está dividida em duas tribos, Gilliesieae e Ipheieae, que apresentam fortes diferenças morfológicas e biogeográficas, sendo que alguns

autores consideram que as Gilliesieae deveriam ser classificadas como uma família à parte (Ravenna, 2000). As espécies dessa tribo apresentam centro de diversidade no Chile, com sete gêneros (*Gethyum*, *Gilliesia*, *Miersia*, *Solaria*, *Speea*, *Trichlora* e *Schickendantziella*) e 17 espécies que se destacam por apresentar flores fortemente zigomorfas, em alguns casos mimetizando insetos, com coloração de verde a púrpura. Esse grupo se caracteriza ainda pela conação de peças florais e redução no número de tépalas e estames (Rudall et al. 2006; Escobar et al. 2010). Por outro lado, a tribo Ipheieae apresenta centro de diversidade do Uruguai, argentina e sul do Brasil com cinco gêneros (*Ipheion*, *Leucocoryne*, *Nothoscordum*, *Tristagma* e *Zoellnerallium*) e ~ 65 espécies que apresentam flores actinomorfas assim como a maioria das Alliaceae (Guaglianone 1972; Zoellner 1972; Crosa 2004).

Fay et al. (2006) analisando sequências plastidiais e ITS do DNA ribossomal observaram uma relação filogenética complexa entre os gêneros da subfamília Gilliesioideae. Dentro da tribo Ipheieae os resultados mostraram *Ipheion* como um grupo parafilético, aparecendo em um clado como gênero irmão de *Tristagma* e em outro clado independente relacionado a *Nothoscordum*. O gênero *Nothoscordum* aparece na análise como um grupo monofilético dividido em dois clados que devem corresponder às seções *Nothoscordum* e *Inodorum*, na qual o gênero está dividido. Não se observa estreita relação morfológica entre *Leucocoryne* e *Nothoscordum*, embora dados citológicos indiquem o contrário. As duas espécies da tribo Gilliesieae, *Gilliesia graminifolia* e *Solaria artropurpurea*, utilizadas como grupo externo formaram um clado que foi grupo irmão da tribo Ipheieae.

Escobar et al. (2010) analisando sequências *trnL-F*, gene *rbcL* e a região nuclear ITS observaram que a tribo Gilliesieae é um grupo monofilético dividida em dois clados bem suportados. O primeiro clado foi formado por *Gilliesia*, *Gethyum*, *Solaria* e

Trichlora, sendo caracterizado por uma redução no número de estames, variação no número de tépalas (3–6), presença de estaminódios, alta complexidade nos apêndices florais e o número cromossômico $2n = 14$. O outro clado foi formado por *Miersia* e *Speea*, que correspondem às espécies mais basais da tribo, caracterizadas por possuir seis estames, seis tépalas e ausência de estaminódios. Nesse clado, o número cromossômico observado foi $2n = 12$, embora em algumas populações de *Miersia chilense* tenha sido observado $2n = 20$. As espécies de *Schickendantziella* e *Trichlora* não foram incluídas nessas análises e pouco se conhece sobre seus relacionamentos filogenéticos ou citogenéticos. A baixa divergência de sequências ITS e plastidiais indica que a tribo é relativamente recente dentro da família, com uma alta especialização morfológica.

A principal dificuldade na compreensão das relações sistemáticas do grupo está na dificuldade das delimitações taxonômicas, principalmente na tribo Ipheieae. Essa dificuldade é causada pela falta de caracteres diagnósticos das plantas, que apresentam morfologia extremamente simples e polimorfismos intraespecíficos, bem como pela ocorrência de caracteres morfológicos convergentes em grupos não-relacionados. Um exemplo disto é a presença de flores isoladas (plantas unifloras), caráter que agrupou artificialmente algumas espécies de *Nothoscordum* e *Ipheion*. A análise citogenética revelou que as espécies de *Ipheion* apresentam número, morfologia e tamanho cromossômico completamente distinto do observado nas espécies de *Nothoscordum*, indicando que os gêneros se tratam de grupos distintos (Crosa 1975b).

2.3.1. Citogenética da família Alliaceae

Na família são observados números cromossômicos que vão de $2n = 8$ em *Nothoscordum montevidense* até $2n = 64$ em *A. rotundum*. A família se caracteriza por

apresentar cromossomos grandes, com até 23 μm (Guerra e Felix 2000), com cariótipo tipicamente variando de simétrico em Allioideae e Tulbaghioideae a assimétrico em Gilliesioideae, formado por cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM) e acrocêntricos (A). A maior parte dos trabalhos citológicos está concentrada no gênero *Allium*, sendo *A. cepa* ($2n = 16$) um organismo modelo para a citologia.

O gênero *Allium*, o maior da família Alliaceae com 690 espécies, apresenta quatro números básicos, $x = 6, 7, 8$ e 10 , sendo o $x = 8$, predominante do grupo. Os números cromossômicos descritos para o gênero variam de $2n = 12$ em *A. sativum* a $2n = 64$ em *A. rotundum*, ocorrendo variação no número de ploidia (diploide a octaploide). Além disso, cromossomos B são frequentemente descritos em espécies de *Allium* (Johnson e Özhatay 1996).

A subfamília Tulbagioideae, formada apenas pelos gêneros *Tulbaghia* e *Prototulbaghia*, apresenta exclusivamente espécies diploides com $2n = 12$, formados predominantemente por cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos. Em algumas poucas espécies tem sido encontrados cromossomos B (Vosa 1975; 2000; 2007). Essas espécies apresentam uma ampla variabilidade na posição das constrições secundárias, o que permite reconhecer tipos cromossômicos e propor relações entre as espécies, sendo essa a principal evidência citotaxonômica desse gênero (Vosa 2000). Várias dessas espécies apresentam uma grande quantidade de heterocromatina, distribuída preferencialmente na região proximal e/ou distal. Essas bandas heterocromáticas das espécies de *Tulbaghia* em geral são sensíveis ao frio e coram positivamente com os fluorocromos base-específicos para regiões ricas em GC (Vosa 2000).

2.3.2. Citogenética da subfamília Gilliesioideae

As espécies da subfamília Gilliesioideae com números cromossômicos reportados na literatura são apresentados na Tabela 1. Dentro da tribo Ipheieae, *Nothoscordum* apresenta dois números básicos, $x = 4$ (4M) e $x = 5$ (3M+2A). São conhecidas espécies diploides com $2n = 8$ ou $2n = 10$, tetraploides com $2n = 16$, 18, 19 e 20, hexaploides com $2n = 24$ e 26 e uma octaploide com $2n = 32$ (Crosa et al. 1972). O gênero apresenta uma evolução claramente relacionada à poliploidia e às translocações Robertsonianas (Jones 1978). Especula-se que o número básico $x = 4$ de *Nothoscordum* poderia ter originado o $x = 8$ de *Allium* (Jones 1978). Crosa (1988) descreveu um cariótipo básico $x = 5$ (3M + 2A) para *Leucocoryne*, similar ao $x = 5$ de *Nothoscordum*, diferindo apenas na morfologia de um dos pares de cromossomos acrocêntricos. Foram observadas em *Leucocoryne* espécies diploides com $2n = 10$ (6M+4A) e tetraploides com $2n = 18$ (14M + 4A).

Em *Tristagma* foi observado o número básico $x = 4$ (3M+1A), com espécies diploides $2n = 8$ (6M+2A) e poliploides, $2n = 4x = 16$ (12M + 4A) e $2n = 6x = 24$ (18M + 6A) (Crosa 1981). Cada uma das três espécies que formam o gênero *Ipheion* apresenta um cariótipo único, sendo $2n = 12$ (2SM + 10A) em *I. uniflorum*, $2n = 20$ (20A) em *I. recurvifolium* e $2n = 14$ (14A) em *I. tweedieanum* (Crosa 1975b). O gênero *Zoellnerallium*, descrito mais recentemente (Crosa 1975a), é formado por apenas duas espécies, *Z. andinum* e *Z. serenense*, sendo que ambas apresentam $2n = 24$ (10M + 4A) (Crosa 1975; 2004).

Apenas algumas poucas espécies da tribo Gilliesieae foram cariotipicamente analisadas, todas com coloração convencional. Goldblatt (1976) reportou o número

cromossômico $2n = 20$ (2M + 18A) para *Miersia chilensis* e $2n = 14$ (4M + 6A) para *Gethyum artropurpureum*. O autor argumentou que a comparação entre esses cariótipos demonstrou claramente uma relação Robertsoniana, com múltiplas fissões ou fusões cêntricas. A direção das mudanças nesses representantes da tribo Gilliesieae provavelmente seria por fusões e redução do número cromossômico em *Gethyum*, claramente mais especializado do que *Miersia*.

Com exceção dos numerosos trabalhos com o gênero *Allium*, poucas análises citogenéticas detalhadas foram realizadas em Alliaceae, sendo a citogenética da subfamília Gilliesioideae ainda menos conhecida. A exceção dentre as espécies de Gilliesioideae é o gênero *Nothoscordum*, que já teve algumas espécies analisadas com diferentes metodologias. Nesse sentido, destacam-se as análises de heterocromatina com *Nothoscordum gracile*, evidenciada por bandeamento C (Canelada e Fernandez 1985) e fluorocromos (Sato et al. 1982; Sato e Yoshioka 1984) e a análise com CMA/DAPI e localização dos sítios de DNAr 5S e 45S em *N. pulchellum* e *N. arenarium* (Guerra e Felix 2000; Souza et al. 2009). A única espécie de *Nothoscordum* que teve o DNA telomérico (TTAGGG)_n localizado, *N. striatum* ($2n = 18$), apresentou marcação exclusivamente nos terminais cromossômicos (Sýkorová et al. 2006). Recentemente uma dissertação de mestrado analisou cariotipicamente as espécies da secção *Inodorum* do gênero *Nothoscordum* (Souza et al. 2008). Esse estudo foi concentrado na análise de *N. gracile*, a única espécie invasora do gênero e que apresenta um cariótipo incomum ($2n = 19$, 13M + 6A). Para tentar entender a origem do cariótipo dessa espécie foram analisadas diferentes espécies afins da secção *Inodorum*, empregando a técnica de coloração com fluorocromos (CMA/DAPI) e FISH (DNAr 5S e 45S). As espécies apresentaram uma baixa quantidade de heterocromatina CMA⁺, distribuída no braço curto de todos os acrocêntricos e em uma ou duas bandas intersticiais de alguns destes

cromossomos. Entre os diplóides, *N. nudicaule* foi caracterizado pela ausência de bandas CMA⁺ intersticiais enquanto *N. macrostemon* e *N. gracile* apresentavam bandas intersticiais em ambos os pares de acrocêntricos. Com base nesses padrões o heteromorfismo de bandas CMA⁺ encontrado em *N. gracile* sugere que essas poderiam ter se originado por aloploidia, possivelmente derivadas do cruzamento de *N. macrostemon* e *N. nudicaule*. Os autores concluíram que translocações robertsonianas e poliploidia, com formação de híbridos aloploidos, são os principais mecanismos envolvidos na evolução cariotípica das espécies da secção *Inodorum*.

Tabela 1 – Números cromossômicos (2n) e fórmulas cariotípicas de espécies da subfamília Gillisioideae (Alliaceae).

Taxon	2n	Fórmula cariotípica	NF	Fonte
Tribo Ipheieae				
<i>Ipheion</i> Raf				
<i>I. recurvifolium</i> (Wright) Traub	20	4SM + 16A	24	Crosa (1975); Souza <i>et al.</i> (2010)
<i>I. tweedieanum</i> (Baker) Traub	14	14A	14	Crosa (2002); Souza <i>et al.</i> (2010)
<i>I. uniflorum</i> (Lindl) Raf	12	2SM + 10A	14	Crosa (1975); Souza <i>et al.</i> (2010)
<i>Nothoscordum</i> Kunth				
<i>N. arenarium</i> Heter	10	6M + 4A	8	Souza <i>et al.</i> (2009)
<i>N. andicolum</i> Kunth	18	14M + 4A	16	Nuñez <i>et al.</i> (1972)
<i>N. bivalve</i> Britton	18	14M + 4A	16	Nuñez <i>et al.</i> (1972)
<i>N. bonariense</i> Beauverd	26	22M + 4A	24	Nuñez <i>et al.</i> (1972)
<i>N. felipponei</i> Beauverd	10	6M + 4A	8	Crosa (1975) ; Souza <i>et al.</i> (2010)
<i>N. gaudichaudianum</i> Kunth	16	16 ^a	16	Nuñez <i>et al.</i> (1972)
<i>N. gracile</i> (Aiton) Stearn	18	14M + 4A	16	Nuñez <i>et al.</i> (1974)
	19	13M + 6A	16	Nuñez <i>et al.</i> (1974)
	20	12M + 8A	16	Nuñez <i>et al.</i> (1974)
<i>N. hirtellum</i> (Kunth) Herter	10	6M + 4A	8	Crosa (1975) ; Souza <i>et al.</i>

				(2010)
<i>N. izaguirrae</i> Crosa	24	24M	24	Crosa (2006)
<i>N. macrostemon</i> Kunth	10	6M + 4A	8	Crosa (1996)
	18	14M + 4A	16	Crosa (1996)
	19	13M + 6A	16	Crosa (1996)
<i>N. marchesii</i> Crosa	10	6M + 4A	8	Crosa (2005)
<i>N. montevidense</i> Beauverd	16	16M	16	Nuñez <i>et al.</i> (1972)
<i>N. nudicaule</i> (Lehm) Guagl	10	6M + 4A	8	Crosa (1996)
	18	14M + 4A	16	Crosa (1996)
	19	13M + 6A	16	Crosa (1996)
<i>N. nudum</i> Beauverd	10	6M + 4A	8	Nuñez <i>et al.</i> (1972)
<i>N. puchellum</i> Kunh	10	6M + 4A	8	Guerra & Felix (2000)
<i>N. vittatum</i> (Griseb.) Ravenna	10	6M + 4A	8	Crosa (1975)
<i>Leucocoryne</i> Lindl				
<i>L. alliacea</i> Lindl	10	6M + 4A	8	Crosa (1988)
<i>L. angustipetala</i> Gay	10	6M + 4A	8	Crosa (1988)
<i>L. conferta</i> Zoellner	10	6M + 4A	8	Crosa (1988)
<i>L. coquimbensis</i> F. Phil	10	6M + 4A	8	Arenada <i>et al.</i> (2004)
<i>L. ixioides</i> Lindl	18	14M + 4A	16	Crosa (1988)
<i>L. narcissoides</i> Phil	18	14M + 4A	16	Arenada <i>et al.</i> (2004)
<i>L. odorata</i> Lindl	10	6M + 4A	8	Crosa (1988)
<i>L. pauciflora</i> Phil	10	6M + 4A	8	Crosa (1988)
<i>L. purpurea</i> Gay	10	6M + 4A	8	Crosa (1988)
<i>L. violasceces</i> Phil	18	14M + 4A	16	Crosa (1988)
<i>Tristagma</i> Poepp				
<i>T. berterii</i> Traub	8	6M + 2A	7	Crosa (1981)
<i>T. bivalve</i> (Lindl) Traub	8	6M + 2A	7	Crosa (1981)
<i>T. nivale</i> Poepp	16	12M + 4A	14	Crosa (1981)
<i>T. patagonicum</i> (Baker) Traub	8	6M + 2A	7	Crosa (1981)
<i>Tristagma</i> sp.	24	18M + 6A	21	Crosa (1981)
<i>Zoellnerallium</i> Crosa				
<i>Z. andinum</i> (Peopp) Crosa	24	8M + 16A	16	Crosa (1975)
<i>Z. serenense</i> (Ravenna) Crosa	24	8M + 16A	16	Crosa (2004)

Tribo Gilliesiae Lindl

Gethyum Phil

<i>G. atropurpureum</i> Phil	14	4M + 4SM + 6A	11	Goldblatt (1976)
<i>Gilliesia</i> Lindl				
<i>G. graminea</i> Lindl	14	4M + 4SM + 6A	11	Escobar et al. (em preparação)
<i>G. montana</i> Poepp & Endl	14	4M + 4SM + 6A	11	Escobar et al. (em preparação)
<i>Miersia</i> Lindl				
<i>M. chilensis</i> Lindl	12	8M + 2SM + 2A	11	Escobar et al. (em preparação)
	20	2SM + 18A	11	Cave e Bradley (1943)
	21	1SM + 19A	11	Cave e Bradley (1943)
<i>Solaria</i> Phil				
<i>S. miersioides</i> Phil	14	4M + 4SM + 6A	11	Escobar et al. (em preparação)
<i>Speea</i> Loes				
<i>S. humilis</i> Loes	12	8M + 2SM + 2A	11	Escobar et al. (em preparação)

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams SP, Hartman TPV, Lim KY, Chase MW, Bennett MD, Leitch IJ, Leitch AR. 2001. Loss and recovery of *Arabidopsis*-type telomere *repeats* sequences 5'-(TTTAGGG)_n-3' in the evolution of a major radiation of flowering plants. *Proceedings of the Royal Society B* 268:1541-1546.
- Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Leitch AR. 2000. *Aloe* L. - a second plant family without (TTTAGGG)_n telomeres. *Chromosoma* 109:201-205.
- Ali HB, Lysak MA, Schubert I. 2004. Genomic *in situ* hybridization in plants with small genomes is feasible and elucidates the chromosomal parentage in interspecific *Arabidopsis* hybrids. *Genome* 47:954-60.
- Ambrožová K, Mandáková T, Bureš P, Neumann P, Leitch IJ, Koblížková A, Macas J, Lysak MA. 2010. Diverse retrotransposon families and an AT-rich satellite DNA revealed in giant genomes of *Fritillaria* lilies. *Annals of Botany* 107:255-268.
- Anderson WR. 1993. Chromosome numbers of Neotropical Malpighiaceae. *Contr Univ Michigan Herb* 19:341-354.
- Angiosperm Phylogeny Goup APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 336-436.
- Angiosperm Phylogeny Goup APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105-121.

- Antonelli A, Sanmartín I. 2011. Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* 60:403-414.
- Baeza, CM, Schrader O, Ruiz E, Negritto M. 2008. *Alstroemeria presliana* Herb. (Alstroemeriaceae) in Chile from a cytogenetic perspective. *Chilean Journal of Agricultural Research* 68:328-333.
- Bantock CR, Cockayne WC. 1975. Chromosomal polymorphism in *Nucella lapillus*. *Heredity* 34:231-245.
- Baum DA, Oginuma. 1994. A review of chromosome numbers in Bombacaceae with new counts of *Adansonia*. *Taxon* 43:11-20.
- Brasileiro-Vidal AC, Cuadrado A, Brammer SP, Benko-Iseppon AM, Guerra M. 2002. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*. *Genetics and Molecular Biology* 28:308-313.
- Buitendijk JH, Peters A, Quene RJ, Ramanna MS. 1998. Genome size variation and C-band polymorphism in *Alstroemeria aurea*, *A. ligtu* and *A. magnifica* (Alstroemeriaceae). *Plant Systematics and Evolution* 212:87-106.
- Caddick LR, Wilkin P, Rudall PJ, Hedderson TAJ, Chase1 MW. 2002. Yams reclassified: a recircumscription of Dioscoreaceae and Dioscoreales. *Taxon* 51:103-114.
- Canelada M, Fernandez AMF. 1985. Bando cromosómico en *Nothoscordum inodorum* (Soland. Ex Ailton) Nich. var. *Inodorum*. *Lilloa* 36: 181-186.

- Cornélio MTMN, Figueirôa ARS, Santos KGB, Carvalho R, Soares-Filho WS, Guerra M. 2003. Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Systematics and Evolution* 240:149-61.
- Cox AV, Bennett ST, Parokonny AS, Kenton A, Callimassia MA, Bennett MD. 1993. Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe. *Annals of Botany* 72:239-247.
- Crosa O. 1981. Los cromosomas de cinco especies del género *Tristagma* (Liliaceae). *Darwiniana* 23:361-366.
- Crosa O. 1972. Estudios cariología en el género *Nothoscordum* (Liliaceae). *Boletín de la Facultad de Agronomía de Uruguay* 122:3-8.
- Crosa O. 1975b. *Zoellnerallium*, un género nuevo para la tribu Allieae (Liliaceae). *Darwiniana* 19:331-334.
- Crosa O. 1975b. Las especies unifloras del género *Nothoscordum* Kunt y el género *Ipheion* Rafinesque de la tribu Allieae (Liliaceae) *Darwiniana* 23:361-344.
- Crosa O. 1988. Los cromosomas de nueve especies del genero chileno *Leucocoryne* Lindly, (Allieae-Alliaceae). *Boletín de investigación* n.º 17. Montevideo, Uruguay.
- Crosa O, Marchesi E. 2002. Presencia de *Ipheion tweedieanum* (Baker) Traub (Alliaceae) em Uruguay. *Agrociencia* 6:92-97.
- Crosa O. 2004. Segunda especie y justificación del género *Zoellnerallium* (Alliaceae). *Darwiniana* 42:165-168.

- Crosa O. 2005. Una nueva especie uniflora de *Nothoscordum* secc. *Nothoscordum* (Alliaceae) de Uruguay y sur de Brasil. *Hickenia* 58:253-256.
- Crosa O. 2006. *Nothoscordum izaguirreae*, nueva especie uniflora de Alliaceae de Uruguay. *Hickenia* 61:271-275.
- Davis CC, Anderson WR, Donoghue MJ. 2001. Phylogeny of Malpighiaceae: evidence from chloroplast *ndhF* and *trnL-F* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 88:1830-1846.
- Escobar I, Ruiz E, Rudall P, Fay M, Negritto M, Baeza C. 2010. Filogenia de Gilliesieae Lindley (Alliaceae), basada en evidencias morfológicas, citológicas y moleculares. Resumen presentado no X Congreso Latinoamericano de Botánica. La Serena, Chile.
- Fay MF, Rudall PJ, Chase M. 2006. Molecular studies of subfamily Gilliesioideae (Alliaceae). *Aliso* 22:367-371.
- Feitoza LL, Felix LP, Castro AAJF, Carvalho R. 2009. Cytogenetics of Alismatales s.s.: chromosomal evolution and C-banding. *Plant Systematics and Evolution* 280:119-131.
- Ferguson-Smith MA, Trifonov V. 2007. Mammalian karyotype evolution. *Nature Review* 8:950-962.
- Fitzgerald MS, McKnight TD, Shippen DE. 1996. Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93:14422-14427.

- Fitzgerald MS, Shakirov EV, Hood EE, McKnight TD, Shippen DE. 2001. Different models of de novo telomere formation by plant telomerase. *Plant Journal* 26:77-87.
- Fonsêca A, Ferreira J, Santos TRB, Mosiolek M, Bellucci E, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D, dos Santos KGB, Pedrosa-Harand A. 2010. Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Research* 18:487-502.
- Fuchs J, Brandes A, Schubert I. 1995. Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher-plants. *Plant Systematic and Evolution* 196:227-241.
- Ganal MW, Lapitan NLV and Tanksley SD. 1991. Macrostructure of the tomato telomeres. *The Plant Cell* 3:87-94.
- Gatt M, Hammett K, Murray B. 1999. Confirmation of ancient polyploidy in *Dahlia* (Asteraceae) species using genomic *in situ* hybridization. *Annals of Botany* 84:39-48.
- Goldblatt P. 1976. New or noteworthy chromosome records in the Angiosperms. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 63:889-895.
- Greilhubert J, Speta F. 1989. A giemsa C-banding and DNA content study in *Scilla cilicica* and *S. morrisii*, two little known sibling species of the *S. siberica* alliance (Hyacinthaceae). *Plant Systematics and Evolution* 165:71-83.
- Greilhubert J. 1984. Chromosomal evidence in taxonomy. *Systematics Association Special Volume 25 em Current Concepts in Plant Taxonomy*.

- Guaglianone E A. 1972. Sinopsis de las especies de *Ipheion* Raf. Y *Nothoscordum* Kunth (Liliáceae) de Entre Ríos y regiones vecinas. *Darwiniana* 17:159-240.
- Guerra M. 2000a. Chromosome number variation and evolution in monocots In: *Monocots – Systematics and Evolution*. CSIRO, Melbourne, Austrália.
- Guerra M. 2000b. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology* 23:1029-1041.
- Guerra M, Santos K G B, Silva A E B, Ehrendorfer F. 2000c. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantoideae – A case of parallel chromosomal evolution. *American Journal of Botany* 5:735-747.
- Guerra M e Felix LP. 2000d. O cariótipo de *Nothoscordum pulchellum* (Alliaceae) com ênfase na heterocromatina e sítios de DNAr. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 35:283-289.
- Guerra M, Felix LP. 2010. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 163:234-278.
- Guerra M. 1986. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco I. *Revista Brasileira de Genética* 9:21-40.
- Guerra M. 2004. Hibridização in situ: princípios básicos. Em: *FISH - Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.
- Guerra M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research* 120:339-350.

- Guerra MS. 1988. Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). *Plant Systematics and Evolution* 158:107-115.
- Guerra MS, Nogueira MTM. 1989. The cytotaxonomy of *Emilia* spp. (Asteraceae: Senecioneae) occurring in Brazil. *Plant Systematic and Evolution* 170:229-236.
- Guerra MS. 1988. Introdução à citogenética. Ed. Guanabara Koogan.
- Hall KJ, Parker JS. 1995. Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chromosome Research* 3:417-422.
- Hennig W. 1965. Phylogenetic systematics. *Annual Review of Entomology* 10:97-116.
- Hizume M, Ohgiku A, Tanaka A. 1989. Chromosome banding in the genus *Pinus* II. Interespecific variation of fluorescent banding patterns in *P. densiflora* and *P. thunbergii*. *The Botanical Magazine Tokyo* 102:25-36.
- Hongguan T, Meng L, Ao S, Liu J. 2005. Origin of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Milula* (Liliaceae): further insights from karyological comparisons with *Allium*. *Caryologia* 58:320-331.
- Jenkins G, Hasterok R. 2007. BAC 'landing' on chromosomes of *Brachypodium distachyon* for comparative genome alignment. *Nature Protocols* 2:88-98.
- Jiang J, Gill BS. 2006. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057-1068.
- Johnson MAT, Özhatay N. 1996. A review of *Allium* sect *Allium*. *Cytology* 17-40.

- Johnston JS, Pepper AE, Hall AE, Chen ZJ, Hodnett G, Drabek J, Lopez R, Price HJ. 2005. Evolution of Genome Size in Brassicaceae. *Annals of Botany* 95:229-235.
- Jones K. 1998. Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. *Botanical Review* 64:273-89.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2009. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- Kim JS, Klein PE, Klein RR, Price HJ, Mullet JE, Stelly DM. 2004. Chromosome identification and nomenclature of *Sorghum bicolor*. *Genetics* 169:1169-1173.
- Kollman F. 1970. Karyotypes of three *Allium* species of the *erdellii* group. *Caryologia* 23:647-655.
- Kopecký D, Loureiro J, Zwierzykowski Z, Ghesquière M, Doležel J. 2006. Genome constitution and evolution in *Lolium* x *Festuca* hybrid cultivars (Festulolium). *Theoretical and Applied Genetics* 113:731-742.
- Levin DA (2002) *The role of chromosomal change in plant evolution*. Oxford series in Ecology and Evolution. Ed. Oxford University, Nova Iorque, EUA.
- Liu ZL, Zhang D, Hong DY, Wang XR. 2003. Chromosomal localization of 5S and 18S–5.8S–25S ribosomal DNA sites in five Asian pines using fluorescence *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 106:198-204.
- Loild J. 1982. Some features of heterochromatin in wild *Allium* species. *Plant Systematics and Evolution* 143:117-131.

- Lysak MA, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K, Schubert I. 2006. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103:5224-5229.
- Maggini F, Cremonini R, Zolfino C, Tucci GF, D'Ovidio R, Delre V, DePace C, Scarascia Mugnozza GT, Cionini PG. 1991. Structure and chromosomal localization of DNA sequences related to ribosomal subrepeats in *Vicia faba*. *Chromosoma* 100:229–234.
- Markova M, Vyskot B. 2009. New Horizons of Genomic *in situ* Hybridization. *Cytogenetic and Genome Research* 126:368-375.
- McKnight TD, Shippen DE. 2004. Historical perspective essay: plant telomere. *The Plant Cell* 16:794-803.
- 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.
- Monaco AP, Larin Z. 1994. YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends in Biotechnology* 12:280-286.
- Moraes AP, Guerra M. 2010. Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 287:113-118.

- Moraes AP, Mirkov TE, Guerra M. 2008. Mapping the chromosomes of *Poncirus trifoliata* Raf. by BAC-FISH. *Cytogenetic and Genome Research* 121:277-281.
- Moraes AP, Soares-Filho WS, Guerra M. 2007. Karyotype diversity and origin of grapefruit. *Chromosome Research* 15:115-121.
- Moscone E A, Lambrou M, Hunziker A T and Ehrendorfer. 1993. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 186:213-229.
- Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chies TT, Salzano FM, Freitas LB. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 90:1229-1238.
- Núñez O, Frayssinet N, Rodríguez RH. 1972. Los cromosomas de *Nothoscordum* Kunth (Liliaceae). *Darwiniana* 17:243-245.
- Los cromosomas de *Nothoscordum* Kunth (Liliaceae). *Darwiniana* 17: 243-245.
- Núñez O, Frayssinet N, Rodriguez RH, Jones K. 1974. Cytogenetic studies in the genus *Nothoscordum* Kunt. I The *N. inodorum* polyploidy complex. *Caryologia* 27:403-441.
- Pavan C. 1950. A variabilidade genética e sua importância na evolução. *Ciência e Cultura* 2:170-183.

- Pedrosa-Harand A, de Almeida CC, 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* 112:924-933.
- Pich U, Fuchs J, Schubert I. 1996. How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosome Research* 4:207-213.
- Piperidis G, Piperidis N, D'Hont A. 2010. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. *Molecular Genetics and Genomics* 284:65-73.
- Price C M. 1999. Telomeres and telomerase: broad effects on cell growth. *Current Opinion in Genetics and Development* 9:218-224.
- Ragone, D. 2001. Chromosome numbers and pollen stainability of three species of Pacific Island breadfruit (*Artocarpus*, Moraceae). *American Journal of Botany* 88: 693-696.
- Ran Y, Hammett KRW, Murray BG. 2001. Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia* (Amaryllidaceae). *Annals of Botany* 87:823-830.
- Ravenna P. 2000. The family Gilliesiaceae. *Onira* 4:11-14.
- Richards EJ, Ausubel FM. 1988. Isolation of a higher eukaryote telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53:127-136.
- Roa F. 2011. Análise da distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S em cariótipos de espécies vegetais. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, Brasil.

- Röder MS, Lapitan NLV, Sorrells ME, Tanksley SD. 1993. Genetic and physical mapping of barley telomeres. *Molecular and General Genetics* 238:294-303.
- Rotková G, Skleničková M, Dvořáčková M, Sýrová E, Leitch AR, Fajkus J. 2004. An evolutionary change in telomerase sequence motif within the plant section Asparagales had significance for telomere nucleoprotein complexes. *Cytogenetic and Genome Research* 107:132-138.
- Rudall PJ, Bateman RM, Fay MF, Eastman A. 2002. Floral anatomy and systematics of Alliaceae with particular reference to *Gilliesia*, a presumed insect mimic with strongly zygomorphic flowers. *American Journal of Botany* 89:1867-1883.
- Sato M, Sato S and Matsumoto E. 1982. Chromosome banding produced by UV-light exposure in the presence of Hoechst 33258. *Caryologia* 35: 405-409.
- Sato S and Yoshioka T. 1984. Heterogeneity of heterochromatic segments in *Nothoscordum fragrans* chromosomes. *Caryologia* 37: 197-205.
- Schubert I, Lysak MA. 2011. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics* 27:207-16.
- Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS. 1989. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany* 64:315–324.
- She CW, Liu JY, Song YC. 2005. CPD staining: an effective technique for detection of NORs and other GC-rich chromosomal regions in plants. *Biotechnic and Histochemistry* 81:13-21.

- Silva SC, Marques A, Soares Filho WS, Mirkov TE, Pedrosa-Harand A, Guerra M. 2011. The cytogenetic map of the *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. - a nomenclature system for chromosomes of all citric species. *Tropical Plant Biology* 4:99-105.
- Slijepcevic P. 1998. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107:136-140.
- Soltis PS, Soltis DE. 2009. The role of hybridization in plant speciation. *Annu Rev Plant Biol* 60:561-588.
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA. 2004. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist* 161:173-191.
- Soltis DE, Soltis PS. 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Tree* 14:348-352.
- Sousa A, Barros e Silva AE, Cuadrado A, Loarce Y, Alves MV, Guerra M. 2011. Distribution of 5S and 45S rDNA sites in plants with holokinetic chromosomes and the "chromosome field" hypothesis. *Micron* 42:625-31.
- Souza LGR, Crosa O, Winge H, Guerra M. 2009. The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): A populational and cytomolecular analysis. *Genetics and Molecular Biology* 32:111-116.
- Souza LGR, Borges LA, Lopes AV, Guerra MS. 2008. Variabilidade cariotípica em *Caesalpinia ferrea* (Mert. Ex Tul.) Benth (Caesalpinoideae, Leguminosae). 59º Congresso Nacional de Botânica, Natal-RN.

- Sumner AT. 2003. Chromosomes: organization and function. Blackwell Publishing company, Berlin.
- Sun G, Ji Q, Dilcher DL, Zheng S, Nixon KC, Wang X. 2002. Archaeofractaceae, a new basal Angiosperm family. *Science* 296:899-904.
- Suzuki G, Ura A, Saito N, Do GS, Seo BG, Yamamoto M, Mukai Y. 2001. BAC FISH analysis in *Allium cepa*. *Genes and Genetic Systems* 76:251-255.
- Sýkorová E, Lim KY, Kunická Z, Chase MW, Bennett MD, Fajkus J, Leitch AR. 2003a. Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales. *Proceedings of the Royal Society B* 270:1893-1904.
- Sýkorová E, Lim KY, Chase MW, Knapp S, Leitch IJ, Leitch AR, Fajkus J. 2003b. The absence of *Arabidopsis*-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (Solanaceae): first evidence from eudicots. *The Plant Journal* 34:283-291.
- Sýkorová E, Fajkus J, Mezníková M, Lim K Y, Nepelchová K, Blattner F R, Chase M W and Leitch AR. 2006a. Minisatellite telomeres occur in the family Alliaceae but are lost in *Allium*. *American Journal of Botany* 93:814-823.
- Sýkorová E, Leitch AR, Fajkus J. 2006b. Asparagales telomerases which synthesize the human type of telomeres. *Plant Molecular Biology* 60:633-646.
- Tamura MN. 1995. A karyological review of the orders Asparagales and Liliales (Monocotyledonea). *Feddes Repertorium* 106: 83-111.

- Vaio M, Speranza P, Valls J F, Guerra M and Mazzella C. 2005. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria Group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany* 96:191-200.
- Vosa C. 1975. The cytotaxonomy of the genus *Tulbaghia*. *Annali di Botanica* 34: 47-121.
- Vosa CG (2007) *Prototulbaghia*, a new genus of the Alliaceae family from the Leolo Mountains in Sekhukhuneland, South Africa. *Caryologia* 60:273-278.
- Vosa CG. 2000. A revised cytotaxonomy of the genus *Tulbaghia* (Alliaceae). *Caryologia* 53:83-112.
- Wang GL, Warren R, Innes R, Osborne R, Baker B, Ronald PC. 2006. Construction of an *Arabidopsis* BAC library and isolation of clones hybridizing with disease-resistance, gene-like sequences. *Plant Molecular Biology Reporter* 14:107-114.
- Weiss H, Scherthan H. 2002. *Aloe* spp. - plants with vertebrate-like telomeric sequences. *Chromosome Research* 10:155-164.
- Weiss-Schneeweiss H, Riha K, Jang CG, Puizina J, Scherthan H, Schweizer D. 2004. Chromosome termini of the monocot plant *Othocallis siberica* are maintained by telomerase, which specifically synthesizes vertebrate-type telomere sequences. *The Plant Journal* 37:484-493.
- Yamamoto M, Abekenar A A, Matsumoto M, Nesumi H, Yoshida T, Kuniga T, Kubo T, Tominaga. 2007. CMA banding patterns of chromosomes in major citrus species. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 76:36-40.

- Zhang P, Friebe B, Lukaszewski A J and Gill B S (2001) The centromere structure in Robertsonian wheat-rye translocation chromosomes indicates that centric breakage-fusion can occur at different positions within the primary constriction. *Chromosoma* 110:335-344.
- Zoellner O. 1972. El género *Leucocoryne*. *Anales Museo Historia Natural Valparaíso* 5:9-83.

Capítulo I - **Karyological circumscription of *Ipheion* Rafinesque (Gilliesioideae, Alliaceae)**

Luiz Gustavo Rodrigues Souza • Orfeo Crosa • Marcelo Guerra

L. G. R. Souza

Laboratory of Plant Cytogenetics, Department of Botany, CCB, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

O. Crosa

Laboratory of Genetics, Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, University of the Republic, Montevideo, Uruguay

M. Guerra (*)

Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, S/N, Cidade Universitária, Recife, PE 50372-970, Brasil

e-mail: msfguerra@hotmail.com

Abstract *Ipheion* Rafinesque is a small genus formed by *I. uniflorum* ($2n = 12$, 2SM + 10A), *I. tweedieanum* ($2n = 14A$), and *I. recurvifolium* ($2n = 20$, 4SM + 16A). Three species of *Nothoscordum*, *N. felipponei*, *N. hirtellum*, and *N. vittatum* ($2n = 10$, 6M + 4A), were also later transferred to *Ipheion* based on the common presence of unifloral inflorescence. Karyotype analysis of the five former species was performed in this work, aiming to evaluate the circumscription of the genus. This analysis was based on chromosome size and morphology, asymmetry index, staining with chromomycin A₃ (CMA) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and in situ hybridization with 5S and 45S rDNA probes. Tetraploid populations of *I. uniflorum*, probably autopolyploids of recent origin, with karyotype similar to the diploids, are described herein for the first time. Grouping analyses of the several sets of characters analyzed show the former three *Ipheion* species clearly separated from the *Nothoscordum* ones, which were more proximally related to other *Nothoscordum* species. Chromosome size, asymmetry indices, and number and position of 5S and 45S rDNA sites were the most important karyotype characters to define the genus *Ipheion*. These data indicate that the unifloral species of *Nothoscordum* belong to *Nothoscordum* and not to *Ipheion*, and the “unifloral inflorescence” should be a homoplasy common to both genera.

Keywords Chromosomes • rDNA sites • CMA⁺ bands • *Ipheion* • *Nothoscordum* • Tribe Ipheieae

Introduction

Ipheion Rafinesque is a small genus of the tribe Ipheieae (Gilliesioideae-Alliaceae) whose distribution is restricted to Argentina, Uruguay, and southern Brazil (Crosa and Marchesi 2002). The tribe Ipheieae also includes the genera *Leucocoryne* Lindl., *Nothoscordum* Kunth, *Tristagma* Poeppig (Fay and Chase 1996), and *Zoellnerallium* Crosa, with which *Ipheion* has a close relationship and shares many morphological characteristics (Guaglianone 1972; Crosa 1975; Crosa and Marchesi 2002). However, the circumscription of *Ipheion* is controversial.

The species traditionally included in *Ipheion* [*I. uniflorum* (Raf.) Traub., *I. tweedieanum* (Griseb.) Traub., and *I. recurvifolium* (Wright) Traub.], as well as some others from *Nothoscordum*, have unifloral inflorescences (Guaglianone 1972). Based on the similarities in the form of the scapes and the unifloral inflorescences, Guaglianone (1972) transferred *N. hirtellum* (Kunth) Traub and *N. vittatum* (Griseb.) Ravenna to *Ipheion*, creating the section *Hirtellum* Guagl., and included a new unifloral species, *I. dialystemon* Guagl., later considered a synonym for *Nothoscordum felipponei* Beauverd (Crosa 1975). However, karyological (chromosome number and morphology) and morphological (histology of the testa and morphology of the flowers, bracts, and seeds) data strongly indicated that the species of the section *Hirtellum* should return to *Nothoscordum*, as the character “unifloral inflorescence” seems to represent a homoplasy common to both genera (Crosa 1975). Fay et al. (2006), based on the plastid sequences intron *trnL*, intron *rps16*, intergenic spacer *trnL-F* and *rbcL*, as well as the internal transcribed spacer (ITS) of the nuclear ribosomal DNA, proposed that *Ipheion* is paraphyletic, with *I. uniflorum* and *I. sessile* (Phil.) Traub (= *I. recurvifolium*) being a sister group of *Tristagma*, while *I. dialystemon* and *I. hirtellum* (Guaglianone 1972) were included into the *Nothoscordum* clade.

Karyologically, the unifloral species of *Nothoscordum* are distinct from those of *Ipheion*. All unifloral species of *Nothoscordum* have karyotype $2n = 10$ (6M + 4A), with the exception of *N. izaguirreae*, with $2n = 24$ (24M) (Crosa 1975, 2006), and all of them have large chromosomes (up to 20 μm). In contrast, the karyotypes observed in the species of *Ipheion* are formed by smaller chromosomes (up to 8.5 μm) which are predominantly acrocentric (Crosa 1975). The chromosome numbers and karyotype formulae previously described for species of *Ipheion* are: $2n = 12$ (2SM + 10A) for *I. uniflorum*, $2n = 20$ (4SM + 16A) for *I. recurvifolium*, and $2n = 14$ (14A) for *I. tweedieanum* (Crosa 1975; Crosa and Marchesi 2002; Meric and Dane 2005).

Phylogenetic analyses of closely related genera of the tribe Ipheieae, based on ITS and *rbcL* gene sequences, suggest that *Tristagma* is the sister group of *Ipheion* (Fay and Chase 1996). Actually, the genus *Tristagma* shares with the species *Ipheion uniflorum* and *I. tweedieanum* the same fundamental number (number of major chromosome arms in a diploid cell), FN = 14 or exact multiples of 14, but there are significant differences in their karyotype formulae, and chromosome numbers and sizes between the karyotypes of the two genera (Crosa 1975, 1981; Crosa and Marchesi 2002).

In the present study, detailed karyotype analysis was performed on five of the six species of the genus *Ipheion*, as recognized by Guaglianone (1972), aiming to evaluate the circumscription of the genus. The analysis was based on chromosome size and morphology, heterochromatin patterns revealed by the fluorochromes chromomycin A₃ (CMA) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and distribution of 5S and 45S rDNA sites detected by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). The results were compared with the available data for other *Nothoscordum* species.

Materials and methods

Plant material

Samples of *Ipheion uniflorum*, *I. tweedieanum*, and *I. recurvifolium* and two species included by Guaglianone (1972) into *Ipheion*, *I. dialystemon* and *I. hirtellum*, were analyzed. The two latter species will be here treated as *N. felipponei* and *N. hirtellum*, respectively. The collection sites and the number of individuals examined are presented in Table 1. The vouchers were deposited in the herbarium of the Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (MUFA).

Chromosome banding

Root tips obtained from bulbs were pretreated with 0.05% colchicine during 24 h at 12 °C, fixed in ethanol:acetic acid (3:1, v/v) for 2–24 h at room temperature, and stored at –20 °C. Afterwards, fixed root tips were washed in distilled water and digested in a 2% (w/v) cellulase (Onozuka)–20% (v/v) pectinase (Sigma) solution at 37 °C for 90 min. The meristem was macerated in a drop of 45% acetic acid, and the coverslip removed in liquid nitrogen.

The C-banding technique was based on Schwarzacher et al. (1980). After 2 days aging, the preparations were hydrolyzed in 45% acetic acid for 10 min at 60 °C, denatured in a saturated solution of barium hydroxide for 10 min at room temperature, renatured in 2×SSC for 80 min at 60 °C, and stained with 2% Giemsa for 30 s. For CMA/DAPI double staining, the slides were aged for 3 days, stained with 10 µl 0.1 mg/ml CMA for 30 min, and restained with 10 µl 2 µg/ml DAPI for 60 min (Barros e Silva and Guerra 2010). The slides were mounted in glycerol:McIlvaine buffer pH 7.0 (1:1) and aged for 3 days before analysis using an epifluorescence Leica DMLB

microscope. Images were captured using a Cohu charge coupled device (CCD) video camera using Leica QFISH *software* and later edited using Adobe Photoshop CS3 version 10.0.

Fluorescent in situ hybridization (FISH)

To localize the rDNA sites, a 500-bp 5S rDNA clone (D2) of *Lotus japonicus*, labeled with Cy3-dUTP (Amersham), and a 6.5-kb 18S-5.8S-25S clone (R2) of *Arabidopsis thaliana*, labeled with digoxigenin-11-dUTP, were used as probes (Pedrosa et al. 2002). Both labelings were done by nick translation. The 45S rDNA probe was detected with sheep anti-digoxigenin fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (Roche) and amplified with rabbit anti-sheep FITC conjugate (Dako). FISH was performed as described by Pedrosa et al. (2002) with small modifications. The hybridization mix contained formamide 50% (v/v), dextran sulfate 10% (w/v), 29 SSC, and 5 ng/l of each probe. The slides were denaturated at 75 °C for 3 min, and the final stringency of hybridization was ca. 76%. Images of the best cells were captured as described before.

Chromosome measures and cluster analysis

For each species, 5–7 metaphases with clear chromosome morphology were measured using *software* Adobe Photoshop CS3 version 10.0. Chromosome arm ratio (AR = length of the long arm/length of the short arm) was used to classify chromosomes as metacentric (AR = 1–1.4), submetacentric (AR = 1.5–2.9), or acrocentric (AR $\geq$ 3.0), according to Guerra (1986). Mean lengths of the whole chromosome complement, shortest and longest chromosome of the complement, and chromosome pairs bearing CMA bands and rDNA sites were compared. The karyotype symmetry was calculated

according to the formula proposed by Romero Zarco (1986), to estimate the intrachromosomal asymmetry [$A_1 = 1 - (\Sigma b/B)/n$; b = average length for short arms in every chromosome pair, B = average length for long arms in every chromosome pair, n = chromosome number] and the interchromosomal asymmetry ($A_2 = S/X$; S = standard deviation, X = mean chromosome length).

A phenetic analysis was performed based on the following characters: (a) chromosome number, (b) fundamental number, (c) karyotype asymmetry indices A_1 and A_2 , (d) average chromosome size, (e) percentage of acrocentric chromosomes in the karyotype, (f) number of 5S rDNA sites in the proximal, interstitial, and terminal position, (g) number of 45S rDNA sites on metacentric chromosomes, (h) number of 45S rDNA sites on the short arms of acrocentric chromosomes, and (i) number and position of CMA⁺ bands (except the bands colocalized with 45S rDNA sites). *Allium cepa* was used to compare the grouping of *Ipheion* and *Nothoscordum* species in relation to another species of the family that has already been investigated for the same set of cytological parameters. Karyotype parameters of *Allium cepa* were based on Do et al. (2001) for the cultivar “Cheonjudaego.” CMA banding for *A. cepa* was based on Kim et al. (2002) and on our own results using a commercial onion (unpublished results). For *N. arenarium* and *N. pulchellum*, the data were based on Souza et al. (2009) and Guerra and Felix (2000), respectively. The data were analyzed using Multi-Variate Statistical Package-MVSP version 3.13p (<http://www.kovcomp.com/>). Clustering was performed using the unweighted pair-group method (UPGMA).

Results

The three *Ipheion* species displayed karyotypes formed by submetacentric and acrocentric chromosomes, whose sizes varied from 5.5 to 12.1 μm . The chromosome numbers were identical to those previously reported: $2n = 12$ for *I. uniflorum*, $2n = 14$ for *I. tweedieanum*, and $2n = 20$ for *I. recurvifolium*. However, most populations of *I. uniflorum* analyzed were tetraploid with $2n = 24$, whereas all other samples previously counted were diploid. C-banding analysis of *I. uniflorum* revealed heterochromatin on the short arms of all acrocentric chromosomes, and on the proximal region of the submetacentric pair (Fig. 1a). Double staining with CMA and DAPI fluorochromes revealed CMA⁺ bands in the same position as the C-banding technique (Fig. 1b). Because CMA/DAPI staining produces results very similar to C-banding and has the advantage of being a more simple and rapid technique, for the remaining species only this technique was performed.

The diploid sample of *I. uniflorum* ($2n = 12$, 2SM + 10A) had chromosome sizes varying from 7.1 to 10.0 μm and a haploid chromosome complement length of 52.5 μm . The arm ratio (AR) for the submetacentric pair was 1.5, whereas for the acrocentric pairs it varied from 6.2 to 8.5. The 45S rDNA sites were colocalized with the CMA⁺ bands of the short arms of the acrocentric chromosomes, while the 5S rDNA sites were located in the interstitial region of a pair of acrocentric chromosomes (Fig. 1c). The tetraploid samples of *I. uniflorum* had $2n = 24$ (4SM + 20A) and an exact duplication of the number of CMA⁺ bands and rDNA sites in relation to the diploid form (Fig. 1d). The length of the haploid chromosome complement was 97.7 μm , which was only slightly smaller than that expected based on the diploid cytotype. Arm ratios and chromosome sizes were also only slightly different from those of the diploid cytotype

(Fig. 3a, b). After FISH, the proximal bands of the submetacentric chromosomes of both cytotypes were observed as DAPI⁺ bands (Fig. 1d).

Ipheion tweedieanum had $2n = 14$ (14A), with similarly sized short arms of the acrocentric chromosomes (ca. 1 μm), and gradual size variation in the long arms (4.5–9.4 μm). The total chromosome complement length was 59.6 μm . CMA⁺ bands were observed on the short arms of all acrocentric chromosomes and were always co-localized with 45S rDNA sites (Fig. 1f, g). During interphase, all the CMA⁺ bands of the acrocentric chromosomes were associated with the nucleolus (Fig. 1e), suggesting that they were active nucleolar organizing regions (NORs). At prophase, the CMA bands were often oriented towards a single large area, corresponding to the nucleolus (Fig. 1e). Sometimes, fine secondary constrictions were observed at the end of these bands. The only 5S rDNA site observed was localized in the interstitial region of the long arm of the smallest chromosome pair (Figs. 1g, 3c).

Ipheion recurviflorum had $2n = 20$ (4SM + 16A), with FN = 24 (considering only chromosome arms clearly larger than the short arms containing rDNA sites), and a chromosome complement length of 89.5 μm , with chromosome sizes varying from 5.8 to 12.1 μm . Two chromosome pairs were conspicuously smaller than the others, one being submetacentric (pair IX) and the other acrocentric (pair X) (Fig. 3d). CMA⁺ bands were observed only on the short arms of the acrocentric pairs IV and V (Fig. 1h), being colocalized with 45S rDNA sites. The 5S rDNA sites were localized on the proximal regions of two acrocentric pairs (Fig. 1i).

Nothoscordum felipponei and *N. hirtellum* showed $2n = 10$ (6M + 4A), haploid chromosome length of 60.7 and 71.2 μm , respectively, and individual chromosome sizes varying between 9.2 and 15.3 μm and between 9.9 and 17.4 μm , respectively. The heterochromatin was CMA⁺/DAPI[−] and co-localized with 45S rDNA sites, although

some CMA⁺ bands were very small and not always visible (Fig. 2a–b). Small 45S rDNA sites were found on the telomeric region of most arms of the metacentric chromosomes, mainly in *N. hirtellum*.

Nothoscordum felipponei had 45S rDNA sites on the long arms of two pairs of metacentric chromosomes (pairs I and II) and on the chromosome termini of two acrocentric pairs (Fig. 2b). The 5S rDNA sites were located in the proximal and terminal region of the short arm of pair I, and in the proximal region of both the short and the long arms of pair III (Fig. 2b). *Nothoscordum hirtellum* had 45S rDNA sites on the terminal regions of the long and short arms of pairs I and II, on the terminal region of the short arm of pair III, and probably on the short arms of the two pairs of acrocentric chromosomes (pairs IV and V). On the other hand, 5S rDNA sites were located only in the proximal region of pair II (Figs. 2c, 3e, f).

Cluster analysis using the indicated karyotype features as variables separated the *Ipheion* and *Nothoscordum* species into two groups (Fig. 4), whereas *A. cepa* was separated to another cluster. *Nothoscordum hirtellum* and *N. felipponei* were grouped together with the other two species of *Nothoscordum* for which similar karyotype parameters are known (Guerra and Felix 2000; Souza et al. 2009). Within the clade of *Ipheion* species, *I. uniflorum* 2x and 4x showed reduced percentage similarity because the haploid chromosome number and the fundamental number were used to calculate the distance between these samples.

Discussion

The karyotype formulae, chromosome numbers, and chromosome sizes of the species of *Ipheion* and *Nothoscordum* examined here were similar to those described earlier (Crosa 1975; Crosa and Marchesi 2002; Meric and Dane 2005), while the analysis of heterochromatic bands, asymmetry index, and rDNA sites furnished new information about the karyotypes of these species. The tetraploid samples of *I. uniflorum*, with $2n = 24$, described here for the first time, showed an almost exact duplication of chromosome morphology, CMA⁺ bands, and rDNA sites, in relation to the diploid cytotype, probably representing an autopolyploidy of recent origin. Recent autopolyploids frequently conserve most karyotype features, such as the chromosome morphology, heterochromatic bands, DNA amount, and number and position of rDNA sites, while older polyploids tend to lose some of these sequences and become less similar to their diploid relatives (Weiss and Maluszynska 2000; Bennett and Leitch 2005; Kovarik et al. 2008).

The distribution of the 45S rDNA sites, restricted to the short arms of the acrocentric chromosomes, is a common characteristic of the three species traditionally included in *Ipheion*. The two other species analyzed here, *N. felipponei* and *N. hirtellum*, had 45S rDNA sites on most chromosome termini of the acrocentrics and on terminal region of some metacentric chromosomes. The meaning of the diffusion of 45S rRNA genes throughout all or almost all acrocentric chromosomes, observed in *I. uniflorum* and *I. tweedieanum*, is unknown, but it has also been found in some other genera with similar karyotype, as for example, *Zamia* and *Alstroemeria* (Tagashira and Kondo 2001; Baeza et al. 2007). In another species of the tribe Ipheieae, *Zoellnerallium andinum* ($2n = 24$, 8M + 16A), the short arms of all acrocentric chromosomes reacted positively with silver nitrate and hybridized with the 45S rDNA probe (unpublished

data). The localization of nucleolar organizer regions (NORs) on the short arms of the acrocentric chromosomes, identified either by silver nitrate impregnation or by FISH with 45S rDNA probe, was also observed in the three other species of *Nothoscordum* analyzed previously (Sato et al. 1979; Guerra and Felix 2000; Souza et al. 2009).

Within the genus *Ipheion* there is great karyotypic similarity between *I. uniflorum* and *I. tweedieanum*, as they share the same fundamental number (FN = 14), similar chromosome morphology, and high number of 45S rDNA sites. The haploid karyotype formulae of *I. uniflorum* (1SM + 5A) and *I. tweedieanum* (7A) suggest that the submetacentric chromosome of *I. uniflorum* corresponds to two acrocentric chromosomes of *I. tweedieanum*. Therefore, Robertsonian translocation may have played an important role in the karyotype evolution of *Ipheion*, as has been suggested for *Nothoscordum* (Crosa 1972; Jones 1998; Guerra 2008).

Among the three *Ipheion* species, *I. recurvifolium*, is the only one that does not show a clear relationship with the fundamental number, diploid numbers, or karyotype formulae observed in the others. Its relatively high chromosome number and duplicate number of 5S rDNA sites suggest that it is tetraploid (Crosa 1975; Crosa 2004). In this case, different types of chromosomal rearrangements should have contributed to modifying the karyotype of this species after the polyploidization event, as observed in other polyploid genera (see, e.g., Dierschke et al. 2009). Nevertheless, the three species of *Ipheion* share several karyotype similarities in the chromosome size, high percentage of acrocentric chromosomes, 45S rDNA sites restricted to the short arms of acrocentrics, and absence of duplicated sites of 5S rDNA. Multiple sites of 5S rDNA were also observed in *N. felipponei*, *Allium cepa*, and several other species of *Allium* (Lee et al. 1999). Besides, they also share other morphological characteristics such as

the spathe formed by single bracts, and the complex structure of its flower and of the testa (Crosa 1975).

Differently from *Ipheion*, the phylogenetically related genera *Nothoscordum*, *Leucocoryne*, and *Tristagma* have chromosomes that are predominantly metacentric and larger (Crosa 1972, 1981, 1988), and a fundamental number of $FN = 16$ for the diploid species of the former two genera and $FN = 14$ for the diploid species of the latter. The closely related genus *Zoellnerallium*, with only two species known (Crosa 2004), has a karyotype more similar to *Ipheion*, with predominance of relatively small acrocentric chromosomes ($2n = 24$; $8M + 16A$). However, *Zoellnerallium* species have the same fundamental number ($FN = 32$) found in tetraploid species of *Nothoscordum* and *Leucocoryne* (Crosa 1972, 1988). Assuming that increasing number of acrocentric chromosomes is a derived characteristic (Schubert 2007), the evolution of *Ipheion* may have been accompanied by successive centric fissions followed by formation of rDNA sites on the short arms of the acrocentric chromosomes. Hall and Parker (1995) found that, in *Hypochaeris radicata*, the formation of acrocentric chromosomes with 45S rDNA sites on the short arms was associated with centric fission. A similar mechanism may have been involved in the origin of *I. uniflorum* and *I. tweedieanum* karyotypes.

Nothoscordum felipponei and *N. hirtellum*, included into *Ipheion* by Guaglianone (1972), were karyotypically very distinct from the other three *Ipheion* species. On the other hand, these two species were quite similar to the species with $x = 5$ of *Nothoscordum* section *Nothoscordum*, both in chromosome number, size, and morphology, as in their patterns of CMA^+ bands and 5S and 45S rDNA distribution (unpublished data). Additionally, uniflorum and plurifloral species of *Nothoscordum* share the presence of spathes with two bracts, tepals free at their base, stamen filaments adnate to perigonium basis, black and smooth seeds, and undifferentiated parenchymatic

tissue in the testa (Crosa 1975). Phenetic distance analysis showed that the karyotypes of *Ipheion* and *Nothoscordum* species investigated here can be grouped into two main clusters, separating the three *Ipheion* species from the *Nothoscordum* ones and also from the outgroup (*Allium cepa*). The main karyotype parameters that circumscribe the genus *Ipheion* are the asymmetry indices A_1 and A_2 and the number of 45S rDNA sites on short arms of acrocentric chromosomes. Therefore, the unifloral species of *Nothoscordum* should be excluded from *Ipheion*, which is a monophyletic group.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) for financial support and a grant to L.G.R.S. by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Baeza C, Schrader O, Budahn H (2007) Characterization of geographically isolated accessions in five *Alstroemeria* L. species (Chile) using FISH of tandemly repeated DNA sequences and RAPD analysis. *Plant Syst Evol* 269:1–14
- Barros e Silva AE, Guerra M (2010) The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotech Histochem* 85:115–125
- Bennett MD, Leitch IJ (2005) Plant genome size research: a field in focus. *Ann Bot* 95:1–6
- Crosa O (1972) Estudios cariología en el género *Nothoscordum* (Liliaceae). *Bol Fac Agr Uruguay* 122:3–8
- Crosa O (1975) Las especies unifloras del género *Nothoscordum* Kunth y el género *Ipheion* Rafinesque de la tribu Allieae (Liliaceae). *Darwiniana* 19:335–344
- Crosa O (1981) Los cromosomas de cinco especies del género *Tristagma* (Liliaceae). *Darwiniana* 23:361–366
- Crosa O (1988) Los cromosomas de nueve especies del género chileno *Leucocoryne* Lindly, (Allieae-Alliaceae). *Bol Fac de Agronomía Uruguay Invest* 17:1–12
- Crosa O (2004) Segunda especie y justificación del género *Zoellnerallium* (Alliaceae). *Darwiniana* 42:165–168
- Crosa O (2006) *Nothoscordum izaguirrae*, nueva especie uniflora de Alliaceae de Uruguay. *Hickenia* 61:271–275

- Crosa O, Marchesi E (2002) Presencia de *Ipheion tweedieanum* (Baker) Traub (Alliaceae) em Uruguay. *Agrociencia* 6:92–97
- Dierschke T, Manda'kova' T, Lysak MA, Mummenhoff K (2009) A bicontinental origin of polyploid Australian/New Zealand *Lepidium* species (Brassicaceae)-Evidence from genomic *in situ* hybridization. *Ann Bot* 104:681–688
- Do GS, Seo BB, Yamamoto M, Mukai Y (2001) Identification and chromosomal location of *tandemly repeated* DNA sequences in *Allium cepa*. *Genes Genet Syst* 76:53–60
- Fay MF, Chase M (1996) Resurrection of Themidaceae for the Brodiaea alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. *Taxon* 45:441–451
- Fay MF, Rudall PJ, Chase M (2006) Molecular studies of subfamily Gilliesioideae (Alliaceae). *Aliso* 22:367–371
- Guaglianone EA (1972) Sinopsis de las especies de *Ipheion* Raf. y *Nothoscordum* Kunth (Liliáceas) de Entre Rios y regiones vecinas. *Darwiniana* 17:159–240
- Guerra M (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Braz J Genet* 9:21–40
- Guerra M (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Gen Res* 120:339–350

- Guerra M, Felix LP (2000) O cariótipo de *Nothoscordum pulchellum* (Alliaceae) com ênfase na heterocromatina e sítios de DNAr. Bol Soc Argentina Bot 35:283–289
- Hall KJ, Parker JS (1995) Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. Chromosome Res 3:417–422
- Jones K (1998) Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. Bot Rev 64:273–289
- Kim ES, Punina EO, Rodionov AV (2002) Chromosome CPD (PI/DAPI)- and CMA/DAPI-banding patterns in *Allium cepa* L. Russ J Genet 38:392–398
- Kovarik A, Devejova M, Lim YK, Chase MW, Clarkson JJ, Knapp S, Leitch AR (2008) Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: a potential link between rDNA homogenization and epigenetics. Ann Bot 101:815–823
- Lee SH, Do GS, Seo BB (1999) Chromosomal localization of 5S rRNA gene loci and the implications for relationships within the *Allium* complex. Chromosome Res 7:89–93
- Meric C, Dane F (2005) Determination of ploidy levels in *Ipheion uniflorum* (R. C. Graham) Rafin (Liliaceae). Acta Biol Hung 56:129–136
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. Genetics 161:1661–1672
- Romero Zarco C (1986) A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon 35:526–530

- Sato S, Kuroki Y, Ohta S (1979) Two types of color-differentiated C-banding positive segments in chromosomes of *Nothoscordum fragrans*, Liliaceae. *Cytologia* 44:715–725
- Schubert I (2007) Chromosome evolution. *Curr Opin Plant Biol* 10:109–115
- Schwarzacher T, Ambros P, Schweizer D (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst Evol* 134:293–297
- Souza LGR, Crosa O, Guerra M (2009) The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): a populational and cytomolecular analysis. *Genet Mol Biol* 32:111–116
- Tagashira N, Kondo K (2001) Chromosome phylogeny of *Zamia* and *Ceratozamia* by means of Robertsonian changes detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique of rDNA. *Plant Syst Evol* 227:145–155
- Weiss H, Maluszynska J (2000) Chromosomal rearrangement in autotetraploid plants of *Arabidopsis thaliana*. *Hereditas* 133:255–261

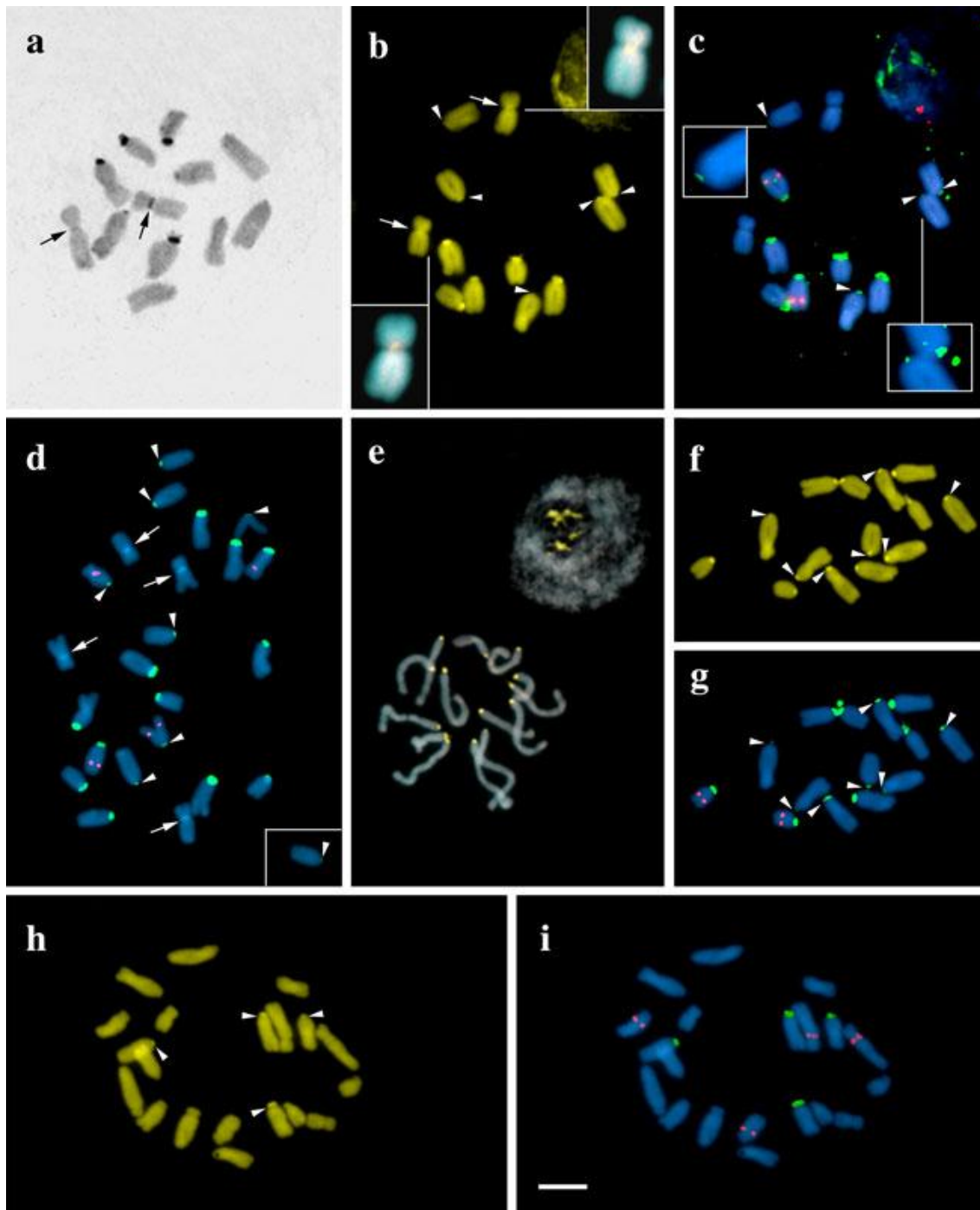


Fig. 1 Distribution of heterochromatin and 5S (red) and 45S (green) rDNA sites in the chromosome complement of *Ipheion* species. **a–c** *I. uniflorum* 2x showing C-bands (**a**), CMA⁺ bands (**b**) and rDNA sites (**c**). **d** *I. uniflorum* 4x showing rDNA sites. **e–g**, *I. tweedieanum* interphase and prophase nuclei stained with CMA/DAPI (**e**), and metaphase displaying CMA⁺ bands (**f**) and rDNA sites (**g**). **h–i** *I. recurvifolium* with

CMA⁺ bands (**h**) and rDNA sites (**i**). Inserts in **b** show the submetacentric pair with a proximal CMA⁺ band, in **c** show details of some small rDNA sites, at both higher magnification and contrast, and in **d** it shows a single chromosome of the same metaphase that was separated from the others. Arrowheads point to the smaller CMA⁺ bands colocalized with 45S rDNA sites. Arrows in **a**, **b**, and **d** point to the proximal heterochromatin of the submetacentric pair. Bar in **i** represents 10 μ m.

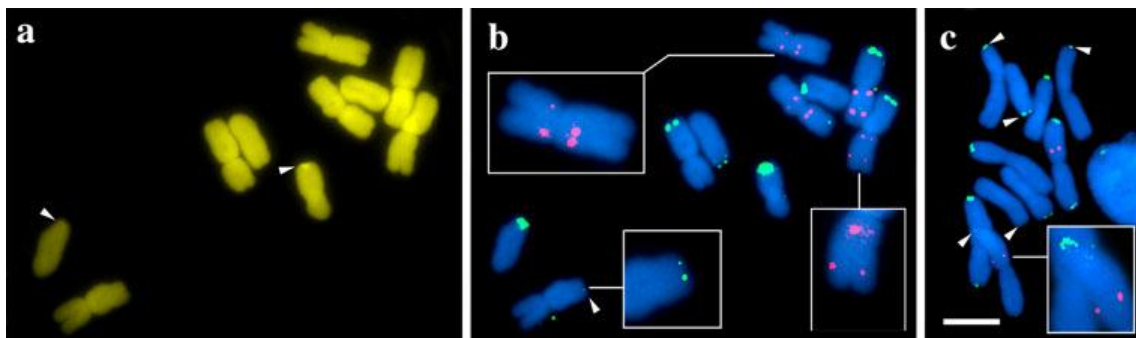


Fig. 2 Distribution of CMA⁺ bands and rDNA sites in the chromosome complements of *Nothoscordum felipponei* (**a**, **b**), and rDNA sites in *N. hirtellum* (**c**). **a** CMA/DAPI-stained metaphase showing CMA⁺ band. **b**, **c** *In situ* hybridization with 5S (red) and 45S (green) rDNA probes. Inserts in **b** and **c** show some rDNA sites at higher magnification and contrast. Arrowheads point to the smaller CMA⁺ bands/45S rDNA sites. Bar in **c** represents 10 μ m.

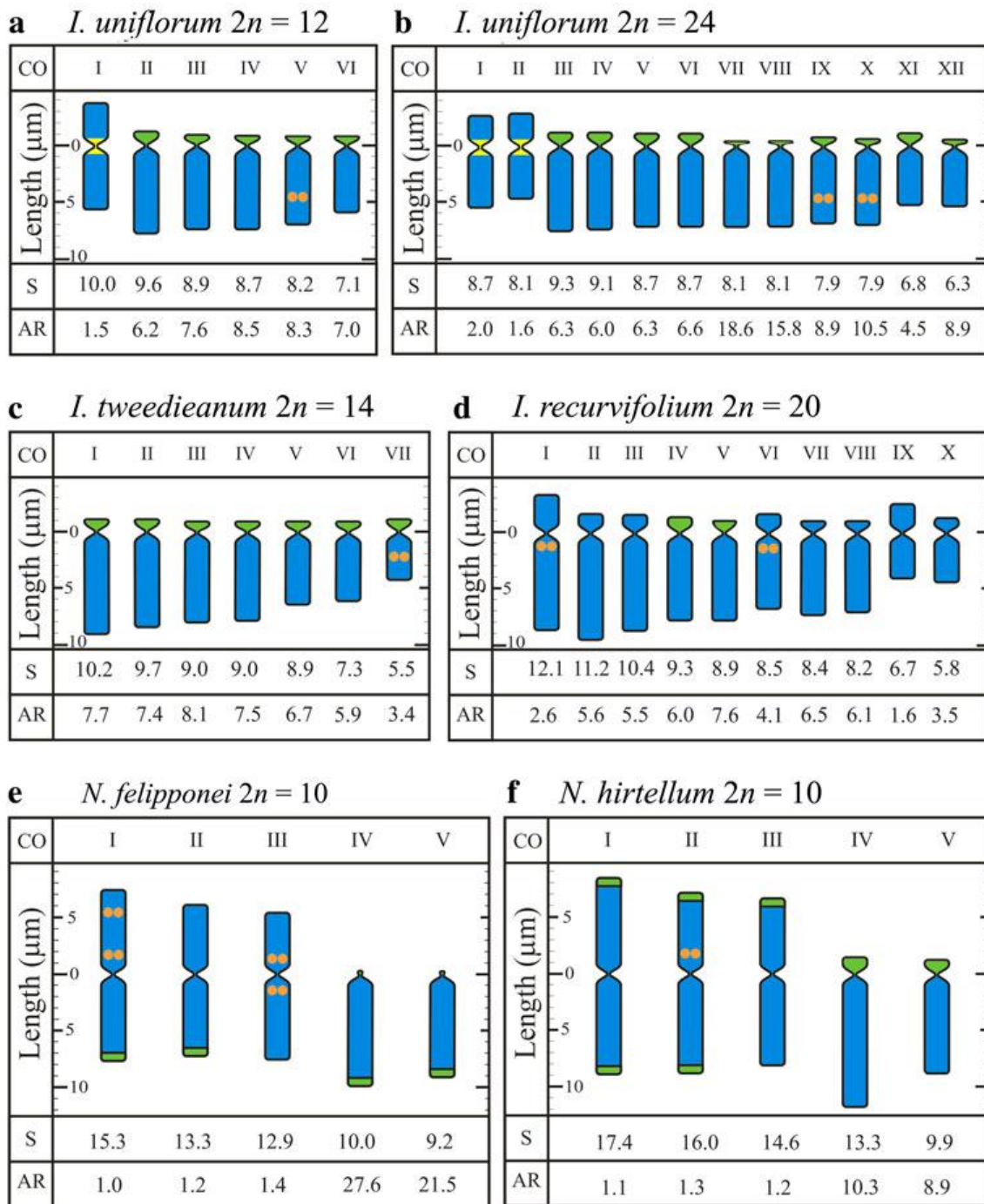


Fig. 3 Idiograms of *Ipheion* and *Nothoscordum* species showing chromosome size (S), arm ratio (AR), CMA⁺ bands (yellow), 5S (red), and CMA⁺ bands co-localized with 45S rDNA sites (green). Chromosomes were ordered (CO) by decreasing size, except for *I. uniflorum* 4x, where the metacentric chromosomes were conserved in the initial positions.

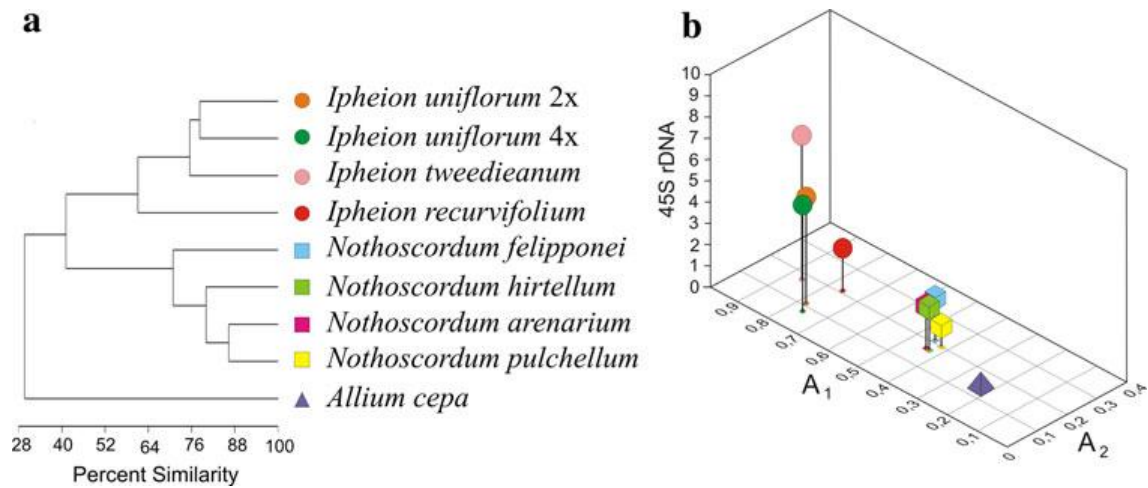


Fig. 4 Relationship among karyotypes of *Ipheion* and *Nothoscordum* species. **a** Dendrogram using the unweighted pair-group method and *Allium cepa* as outgroup. **b** Ratio to asymmetry index (A_1 and A_2) and number of 45S rDNA sites on the short arms of acrocentrics. Symbols represent the species indicated in **a**.

Table 1 Samples analyzed of *Ipheion* and *Nothoscordum* species with voucher number, provenance, number of individuals analyzed, diploid number ($2n$), karyotype formula, fundamental number (FN), chromosome size range, average chromosome size, haploid complement size, asymmetry index (A_1 and A_2), and number of rDNA sites

Species	Voucher	Provenance	Number of individuals	$2n$	Karyotype formula	FN	Chromosome size range (μm)	Average chromosome size (μm)	Haploid complement size (μm)	A_1	A_2	rDNA sites	
												5S	45S
<i>Ipheion recurvifolium</i> (Wright) Traub.	MVFA 33781	Paso Roldán, Depto. Florida, Uruguay	4	20	4SM + 16A	24	5.8-12.1	4.48	89.5	0.76	0.21	4	4
<i>I. tweedieanum</i> (Baker) Traub.	MVFA 21953	Ruta 24, km. 45.5, Depto. Río Negro, Uruguay	2	14	14A	14	5.5-10.2	4.26	59.6	0.86	0.18	2	14
<i>I. uniflorum</i> (Lindl.) Raf.	MVFA 33773	Ruta 26, km. 191, Depto. Tacuarembó, Uruguay	6	12	2SM + 10A	14	7.1-10.0	4.38	52.5	0.78	0.11	2	10
	MVFA 33774	Abra de Perdomo, Depto. Maldonado, Uruguay	1	24	4SM + 20A	28	6.3-9.3	4.07	97.7	0.76	0.07	4	20
	MVFA 33775	Laguna del Sauce, Depto. Maldonado, Uruguay	5	24	4SM + 20A	28	-	-	-	-	-	4	20

	MVFA 33776	Fuerte San Miguel, Depto. Rocha, Uruguay	1	24	4SM + 20A	28	-	-	-	-	-	4	20
<i>Nothoscordum felipponei</i> Beauverd	MVFA 33777	Minas, Depto. Lavalleja, Uruguay	2	10	6M + 4A	16	9.2-15.3	12.14	60.7	0.43	0.18	8	8
	MVFA 33778	Cerro Verdú, Depto. Lavalleja, Uruguay	1	10	6M + 4A	16	-	-	-	-	-	8	8
	MVFA 33779	Ruta 6, km. 152, Depto. Florida, Uruguay	1	10	6M + 4A	16	-	-	-	-	-	8	8
	MVFA 33780	Minas, Depto. Lavalleja, Uruguay	1	10	6M + 4A	16	-	-	-	-	-	8	8
<i>N. hirtellum</i> (Kunth) Herter	MVFA 33782	Sierra de las Ánimas, Depto. Maldonado, Uruguay	3	10	6M + 4A	16	9.9-17.4	14.24	71.2	0.45	0.21	2	14

Capítulo II - Cytogenetic and molecular evidences suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Ailton) Stearn (Alliaceae)

Luiz Gustavo Rodrigues Souza¹, Orfeo Crosa², Pablo Speranza² and Marcelo Guerra^{1*}

¹ Laboratório de Citogenética Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, s/nº, Cidade Universitária, 50372-970, Recife, PE, Brasil

² Laboratorio de Genética, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

* For correspondence. E-mail: msfguerra@hotmail.com.

Abstract

- *Background and Aims* *Nothoscordum gracile* is an apomictic tetraploid widely distributed throughout the Americas. It has been suggested to form a species complex with sexual and apomictic *N. nudicaule* and *N. macrostemon*. In this work, the origin of *N. gracile* and its relationships with its related species was investigated based on cytological and molecular data.
- *Methods* Cytogenetic analyses were based on meiotic behavior, chromomycin A₃ (CMA) bands, localization of 5S and 45S rDNA sites, and genomic *in situ* hybridization. Nuclear ITS and plastidial *trnL-trnF* sequences were also obtained for most individuals.
- *Key Results* Proximal CMA bands were observed in the long arms of all acrocentrics of 2x and 4x *N. macrostemon* but not in diploid and some tetraploid cytotypes of *N. nudicaule*, while *N. gracile* showed a variable number of these bands. The *trnL-trnF* cpDNA showed variation with a trend to geographical structuring irrespective of morphospecies and was fully congruent with karyotype variation. All other analyses did not differentiate the three species.
- *Conclusion* Diploids of *N. nudicaule* and *N. macrostemon* appeared as consistent recently diverged species, whereas tetraploid apomicts seem to have been originated from multiple independent hybridization events between them, part of which are morphologically recognizable as *N. gracile*.

Key words: *Nothoscordum*, CMA bands, rDNA sites, haplotype network, geographical parthenogenesis

Introduction

The genus *Nothoscordum* Kunth (Gilliesioideae, Alliaceae) is native to South America and comprises more than twenty described species (Guaglianone, 1972; Crosa, 1996). *Nothoscordum gracile* (Ailton) Stearn, also referred to as *N. inodorum* (Solander ex-Ailton) or *N. fragrans* (Ventenant) Kunth (Stearn, 1986), is the only *Nothoscordum* species which is widely distributed throughout the Americas and naturalized in many temperate regions of other continents. It belongs to the section *Inodorum* Guag. and it is closely related morphologically and cytologically to *N. nudicaule* (Lehm) Guag. and *N. macrostemon* Kunth (Guaglianone, 1972; Nuñez *et al.*, 1974), which had previously been classified as varieties of *N. gracile* (Guaglianone, 1972). Nuñez *et al.* (1974), based mainly in mitotic and meiotic chromosome analyses concluded that these three species constitute a closely related group forming the *Inodorum* complex.

Taxonomical decisions in apomictic complexes may particularly affect the outcome of evolutionary and phylogenetic studies. The level of intraspecific variability is dependent on the circumscription of the entity under study which in extreme cases may constitute a monoclinal apomictic microspecies (Gornall, 1999). The generally distribution of some asexual taxa relative to their sexual relatives is referred to as *geographic parthenogenesis* (Vandel, 1928). The success of widely distributed clones is attributed to their ability to colonize new environments where homogenous abiotic conditions limit the spread of sexuals, efficiently establish new populations from a single propagule, or the indefinite propagation of a particular genotype that is able to adapt to a wide range of environmental conditions which is maintained due to the absence of recombination (reviewed in Bierzychudek, 1985; Verduijn *et al.*, 2004). Range expansions are also attributed to the effect of polyploidy irrespective of breeding systems (Lowry & Lester, 2006). In polyploid/agamic complexes, the effects of asexual reproduction, hybridity and polyploidy on range expansion are confounded given that it is frequently the polyploid components which in turn are of hybrid origin that reproduce by apomixis (Bierzychudek, 1985; Hörandl, 2006).

The chromosomes of *Nothoscordum* as well as those of other Alliaceae are easily amenable to detailed cytogenetic analysis and may provide a wealth of information in evolutionary studies. All representatives of the section *Inodorum* have large metacentric (M) or acrocentric (A) chromosomes, some more than 20 μ m long (Nuñez *et al.*, 1974). The basic number of the section is $x = 5$ (3M + 2A) and the number of chromosome arms, or fundamental number (FN), is always eight or a multiple of eight. Diploids have $2n = 10$ (6M + 4A) and FN = 16, and tetraploids display $2n = 19$ (13M + 6A) or rarely $2n = 18$ (14M + 4A), both with FN = 32 (Crosa, 1972, 1996). Dyer (1967) and Nuñez *et al.* (1974) observed seedlings with $2n = 20$ obtained from seeds of individuals of *N. gracile* with $2n = 19$, suggesting that the perfectly doubled karyotype is occasionally formed. This variation in chromosome numbers among tetraploids ($2n = 18, 19$ and 20) seems to be due to centric fission/fusion events, which frequently occur in the genus *Nothoscordum* (Crosa, 1996; Jones, 1998; Souza *et al.*, 2009).

The finding of diploid cytotypes in *N. macrostemon* and *N. nudicaule* provided some insight into the evolutionary history of the complex *Inodorum*. Meiotic, morphological and reproductive biology studies have confirmed that both diploid taxa are allogamous and self-incompatibles (Crosa, 1972, 1996). They are easily distinguishable from one another due to their morphological and phenological differences. Both display a more restricted geographical distribution than their respective tetraploid cytotypes, having *N. nudicaule* 2x a relictual distribution along the river banks of Eastern Uruguay. On the other hand, tetraploids of *N. macrostemon* and *N. nudicaule* are facultatively apomictic and autogamous and more widespread, being the former the dominant species in the south of Uruguay, colonizing roadside lands and cultivated areas (Crosa, 1996).

Nothoscordum gracile is an invasive species found exclusively in disturbed habitats. It is a strictly tetraploid, facultative apomictic, which shows great variability in the shapes of its ovaries, staminate filaments and tepals (Guaglianone, 1972). Some of these variant forms are intermediate between *N. nudicaule* and *N. macrostemon*, which led Ravenna (1978) to propose a

hybrid origin for this species. The fourth named species included in section *Inodorum*, *N. arenarium* Herter, is strictly diploid (Crosa, 1972; Souza *et al.*, 2009).

Cytologically, *N. gracile* is the most studied species of the genus, although the origin of the number $2n = 19$ is still controversial. Nuñez *et al.* (1974) suggested that $2n = 19$ arose from the union of a non-reduced gamete of a species with $2n = 10$ with a reduced gamete of a species with $2n = 18$. Alternatively, $2n = 19$ could have arisen from the fusion of two acrocentric chromosomes of a normal tetraploid with $2n = 20$ (12M + 8A) (Crosa, 1996). Nuñez *et al.* (1974) and Jones (1998) suggested that *N. gracile* could be an allotetraploid involving the two basic numbers of the genus, $x = 4$ (4M) and $x = 5$ (3M + 2A), with three sets of $n = 5$ and one of $n = 4$. Whatever its origin, the maintenance of this singular chromosome number is ensured by adventitious nucellar embryony and bulb offsets, as well as by sexual reproduction (Dyer, 1967).

Karyotypic analyses of *N. gracile* using chromosome C-banding techniques have shown small bands on the short arms of the six acrocentric chromosomes and in the proximal regions of the long arms of five of them, one of the proximal bands being duplicated. This same heterozygotic banding pattern was observed in plants from Japan (Kurita & Kuroki, 1963; Sato *et al.*, 1979) and from Argentina (Canelada & Fernandez, 1985), suggesting the occurrence of a single widespread apomictic clone. The heterochromatin on the short arms of acrocentric chromosomes is associated with NORs, as first reported in *N. gracile* by Levan & Emsweller (1938) and later confirmed by a number of other authors (see also Kurita & Kuroki, 1963; Sato *et al.*, 1982; Canelada & Fernandez, 1985). The presence of 45S rDNA sequences on these short arms was first demonstrated by Crosa (1996) in *N. nudicaule* using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). 45S rDNA sites were also observed on the short arms of the acrocentric chromosomes of *N. arenarium*, *N. hirtellum* (Kunth) Herter, *N. felipponei* Beauverd, and *N. pulchellum* Kunth (Guerra & Felix, 2000; Souza *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2010).

C-banding in chromosomes of *N. arenarium* and *N. pulchellum* revealed exactly the same banding pattern observed after double staining with the fluorochromes chromomycin A3 (CMA) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Guerra & Felix, 2000; Souza *et al.*, 2009). The heterochromatic bands, including the 45S rDNA sites, were always positively stained with CMA and negatively stained with DAPI (CMA bands). As the CMA/DAPI technique is simpler than C-banding, does not alter the chromatin structure, and the best slides can be reutilized for FISH analyses, it became the most suitable method for sequential banding and FISH analyses in these species.

The relationships between *N. gracile* and the other species of the *Inodorum* complex may be further investigated by the comparison of DNA sequences. Analyses of the ITS (*Intergenic Transcribed Spacer*) nuclear region of the 45S rDNA of *Allium* species revealed divergences among species greater than those detected with other DNA sequences, suggesting that this region could be adequate for the evolutionary studies of other members in the family Alliaceae (Friesen *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). Sequences of plastid DNA (cpDNA) are also important in phylogenetic analyses as they show uniparental inheritance. As a consequence, taxa of different ploidy levels can be included in the analyses irrespectively of the auto- or allopolyploid nature of the species involved, and their phylogenies can be directly inferred by conventional methods (Rua *et al.*, 2010). The combined use of nuclear ITS and plastid sequences has allowed to analyze the relationships among some of the representatives of Gilliesioideae (Fay *et al.*, 2006).

The present work investigated the origin of *N. gracile* and its relationships with *N. macrostemon* and *N. nudicaule* based on cytological data including chromosome number variability, meiotic behavior, CMA bands, 5S and 45S rDNA sites, and genomic *in situ* hybridization (GISH). Additionally, evolutionary relationships between species and cytotypes were compared using ITS and *trnL-trnF* sequences and the *N. gracile* intraespecific variability was investigated searching for clonal diversification.

Materials and Methods

Plant material

Eighty five plants of *Nothoscordum gracile*, *N. macrostemon* and *N. nudicaule* collected from natural populations were analyzed. A sample of *N. arenarium* was also used for comparison in the sequence analysis. The collection sites and numbers of all examined individuals are shown in Table 1. Vouchers were deposited in the Bernardo Rosengurtt Herbarium at the Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (MVFA). Plants of *Ipheion recurvifolium* (C.H.Wright) Traub with $2n = 20$ (Souza *et al.*, 2010), collected in Paso Roldán, Florida, Uruguay, were used as controls in GISH and slot blot experiments.

Diagnostic characters to identify species followed Guaglianone (1972). The principal traits defined by this author to separate these three species were as follows: *N. gracile* and *N. macrostemon* show turbinate-evident perianth; stamens upright and closely spaced, sometimes forming a cylinder around the gynoecium during anthesis, and staminate filaments curved at their apices. *Nothoscordum gracile* differs from *N. macrostemon* by the former having an ellipsoidal to obovate sessile ovary, while the latter has an oblong and stipulate ovary. On the other hand, *N. nudicaule* has a cupuliform-subrotate perianth and lanceolate-subulate staminate filaments joined at their bases. In general, the flowers of *N. macrostemon* are nocturnal and those of *N. nudicaule* are diurnal, while those of *N. gracile* are morphologically and phenologically intermediate between these two types.

Meiotic analyses, pollen grain mitosis and pollen grain germination

For meiotic analysis, young inflorescences from *N. gracile*, *N. macrostemon* and *N. nudicaule* were directly fixed in ethanol:acetic acid (3:1; v/v) for 2 to 24 h at room temperature and stored

at -20°C . Prior to slide preparation, young flower buds were washed in distilled water, anthers were squashed in a drop of 45% acetic acid, coverslip was removed after freezing in liquid nitrogen, and the chromosomes were stained with CMA/DAPI as indicated below. For pollen grain mitosis fixed anthers were directly squashed in 2% acetocarmine. For pollen tube germination, anthers of opened flowers were gently squeezed in a drop of 15% sucrose solution and maintained during 12-24 hours in a wet chamber.

CMA/DAPI banding and FISH

Root tips obtained from bulbs were pretreated with 0.05% colchicine for 24 h at 10°C and fixed and stored as describe before. CMA/DAPI banding and FISH procedures were performed according to Souza *et al.* (2009). Fixed root tips were washed in distilled water and digested in a 2% (w/v) cellulase (Onozuka)-20% (v/v) pectinase (Sigma) solution, at 37°C , for 90 min. Meristem was macerated in a drop of 45% acetic acid and the coverslip was later removed in liquid nitrogen.

The CMA/DAPI double staining technique was used for fluorochrome banding. Slides were aged for three days, stained with CMA (0.1 mg/ml) for 60 min and re-stained with DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$) for 30 min. Slides were mounted in glycerol:McIlvaine buffer pH 7.0 (1:1) and aged for three days before analysis in an epifluorescence Leica DMLB microscope. Images were captured with a Cohu CCD video camera using the Leica QFISH software and later edited in Adobe Photoshop CS3 version 10.0.

In order to localize the rDNA sites, 5S rDNA from *Lotus japonicus* labeled with Cy3-dUTP (Amersham) and 45S rDNA from *Arabidopsis thaliana* labeled with digoxigenin-11-dUTP were used as probes (Souza *et al.*, 2009, 2010). Both labelings were done by nick translation. The 45S rDNA probe was detected with sheep anti-digoxigenin FITC conjugate (Roche) and amplified with rabbit anti-sheep FITC conjugate (Dako). The hybridization mix

contained formamide 50% (v/v), dextran sulphate 10% (w/v), 2× SSC and 5 ng/μl of each probe. The slides were denaturated at 75 °C for 3 min. Stringent washes were performed reaching a final stringency of ca. 76%. Images of the best cells were captured as previously described.

Genomic *in situ* hybridization (GISH) and dot-blot hybridization

Total nuclear DNA was extracted following the CTAB method of Doyle & Doyle (1987). Genomic DNA utilized as probe or blocking was broken into fragments of approximately 500 bp by incubation at 100 °C for approximately 30 min. In the two first experiments, the genomic DNA of *N. gracile* labeled with Cy3-dUTP (Amersham) by nick translation was used as a probe, while non-labeled genomic DNA of *N. nudicaule* or *N. macrostemon* was separately utilized as blocking DNA in concentrations of 1×, 25×, 50× and 75×. The hybridization mixture containing the genomic probe and the blocking DNA was tested on metaphases of *N. gracile* or a control species, following the same protocol used for FISH.

In other experiments, the genomic DNA of *N. macrostemon* labeled with digoxigenin-11-dUTP was used as probe and non-labeled genomic DNA of *N. nudicaule* was used as blocking DNA. Inverse labeling was also tested using *N. nudicaule* DNA as probe and *N. macrostemon* as blocking DNA. As an internal control of hybridization efficiency, in some cases, root tips of *Ipheion recurvifolium*, *N. macrostemon* 2x or *N. nudicaule* 4x (without CMA bands) were macerated together with root tips of *N. gracile* or *N. nudicaule* 4x on the same slide for *in situ* hybridization. The different combinations of genomic DNA used as probes and blocks are presented in Table 2.

Dot-blot hybridization was performed using whole-genome DNA (500 ng) from *N. gracile*, *N. macrostemon* and *N. nudicaule* loaded manually onto a nylon membrane (Hybond N⁺; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). *Ipheion recurvifolium* DNA was used as

negative control. DNA of *N. macrostemon* and *N. nudicaule* used as probes were labeled with digoxigenin-11-dUTP as described above. The membranes were hybridized at 37°C overnight. The genomic DNA was added before to the hybridization buffer [1% blocking reagent (Roche), 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5% dextran sulfate, in 5×SSC, pH 7.0], according to Sambrook & Russell (2001). After hybridization, membranes were washed twice in 2×SSC, 0.1% SDS for 5 min and in 0.5×SSC, 0.1% SDS for 15 min, at 45°C and 68°C for low and high stringency, respectively. The satellite DNA probe was detected using anti-DIG alkaline phosphatase conjugate (Roche) and CDP-Star (Roche). Hybridization signals were captured on x-ray ECL film (Amersham Biosciences) and intensity of probe signals were measured in the digital image using software QFISH version 2.1 (Leica). The highest relative signal intensity (100%) was obtained when labeled genomic DNA of one species was hybridized with genomic DNA of this same species.

Sequence analyses

The non-coding DNA plastid region *trnL-trnF* was analyzed in 33 samples, including representatives from *N. macrostemon* (2x), *N. nudicaule* (2x and 4x), *N. gracile* (4x), and *N. arenarium* (2x). The samples analyzed, collection localities, and the parsimony-informative loci are presented in Supplementary Table 1. Universal primers (primers C and F) described by Taberlet *et al.* (1991) were used to amplify *trnL*(UAA) and *trnL*(UAA)-*trnF*(GAA) regions. Also the nuclear ITS1-5.8S-ITS2 region of 16 samples of *N. gracile*, *N. macrostemon*, *N. nudicaule*, and *N. arenarium* were amplified and sequenced using ITS4 and ITS5 universal primers (White *et al.*, 1990) and analyzed.

All PCR amplifications were carried out in 50 µL reactions containing 5 U of Taq polymerase, 1.75 mM MgCl₂, 0.5 µM of each primer and 0.1mM of each dNTP in the manufacturer's buffer. The PCR program for cpDNA consisted of an initial step of 5 min at 95 °C, followed by one cycle of 1 min at 94 °C, 1 min at 58 °C and 2 min 30 sec at 72 °C. For ITS

sequences the PCR program consisted of an initial denaturing step of 95 °C for 2 min, five cycles of 95 °C for 1 min, 53 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min, with a decrease of 1 °C per cycle in the annealing temperature, 35 cycles with an annealing temperature of 48 °C, and a final extension step of 72 °C for 12 min. All amplified fragments were sequenced in both directions at the Institut Pasteur de Montevideo (Uruguay) or by Macrogen Inc. (Korea).

The sequences were edited manually using Sequencher[™] (V4.1.4, Genecodes, AnnArbor, MI, USA) and all ambiguous end regions were removed. The resulting partial sequences were pre-aligned with the Clustal-W (Thompson *et al.*, 1994) algorithm included in BioEdit version 5.0.6 (Hall, 2001) and manually adjusted. All sequences and alignments were submitted to Genbank for *trnL-trnF* (Accession nos. JN591627–JN591651) and ITS (Accession nos. JN591597–JN591618). A haplotype network was constructed based on this matrix using the software NETWORK version 4.5.1.6 based on the standard function of Maximum Parsimony (MP) (Fluxus Technology Ltd. 2009).

Results

Mitotic analyses

Chromosome counts of 85 individuals from different localities revealed the occurrence of diploid ($2n = 10$: 6M + 4A) and tetraploid ($2n = 18$: 14M + 4A or $2n = 19$: 13M + 6A) cytotypes of both *N. macrostemon* and *N. nudicaule* while *N. gracile* showed exclusively tetraploid cytotypes ($2n = 18$ or $2n = 19$). Tetraploids with $2n = 18$ were only rarely found in any of these species (13.0%, Table 1). Diploid and tetraploid plants of the same species were very similar morphologically, and could only be distinguished by cytological analyses. *Nothoscordum nudicaule* was typically found in wet areas along river banks, while *N. macrostemon* and *N. gracile* were collected along roadsides. Plants with B chromosomes or mosaics with $2n = 18/19$ were never observed. However, metaphases with two acrocentric chromosomes associated by the extremities of their short arms, resembling a single metacentric chromosome, were often found (Fig. 1a). Multiple associations including three or more 45S rDNA sites were also common (Figs. 1d, 2e)

CMA⁺/DAPI⁻ banding (CMA bands) revealed the presence of heterochromatin on the short arms of the acrocentric chromosomes, and one or two CMA bands on the proximal region of the long arms of most acrocentrics (Fig. 1, 2). No DAPI⁺ heterochromatic blocks were observed. According to the number of CMA bands on the long arms, the acrocentric chromosomes were classified as A⁰ (without bands), A¹ (with one band), and A² (with two bands). Sequential analyses with CMA/DAPI and FISH using 5S and 45S rDNA probes revealed a single 5S rDNA site per monoploid complement, always located on the terminal region of a metacentric chromosome, and 45S rDNA sites on the short arms of all acrocentric chromosomes co-localized with CMA bands. No variation in the number or position of these sites was detected.

The most frequent karyotype of *N. gracile* was $2n = 19$ ($13M + 1A^0 + 4A^1 + 1A^2$), observed in 57.7% of the individuals and considered the standard karyotype of this species. This karyotype was found in most Brazilian populations and in the samples from Lima (Peru), Buenos Aires (Argentina), and Montevideo (Uruguay) (Fig. 1b). Other populations from Brazil (Lavras, Londrina, and Gramado) and Argentina (Tucumán), totalizing 34.6% of the individuals, showed $2n = 19$ ($13M + 3A^0 + 3A^1$) (Fig. 1c) whereas a single sample, from Uruguay (Canelones) had $2n = 18$ ($14M + 4A^1$) (Fig. 1a). Four out of six individuals from Santa Maria (Brazil) displayed an aberrant $2n = 19$ karyotype ($13M + 2A^0 + 4A^1$) bearing a CMA band on the long arm of a metacentric chromosome, in the same position as that of the long arm of A^1 acrocentrics. Noteworthy, this karyotype also had one A^0 chromosome without a 45S rDNA site (Fig. 1d), suggesting a reciprocal translocation between an M and an A^1 chromosome. The other two individuals from this locality showed the standard karyotype. The distribution of the different cytotypes of *N. gracile* is presented in Fig. 5.

Diploid samples of *N. nudicaule* always had acrocentric chromosomes without proximal CMA bands ($6M + 4A^0$) (Fig. 2a). Likewise, tetraploid plants from northern (Departamentos de Artigas and Salto) and southeastern (Departamento de Flores) Uruguay (Fig. 2b), always had ($13M + 6A^0$). A mixed populations with $2n = 19$ ($13M + 4A^0 + 2A^1$) and $2n = 18$ ($14M + 2A^0 + 2A^1$) was found in southern Uruguay (Departamento de Canelones). The diploid and tetraploid samples of *N. macrostemon* examined had exclusively A^1 chromosomes, with karyotype formulae $2n = 10$ ($6M + 4A^1$) (Fig. 2c) or $2n = 19$ ($13M + 6A^1$) (Fig. 2e). Vigorous triploid individuals bearing many bulbils, referred to as *Nothoscordum* sp.1 ($2n = 15$; $9M + 6A^1$ - Fig. 2d), were only found in Punta Ballena, Southern Uruguay, together with the closely related tetraploid *Nothoscordum* sp.2 ($2n = 19$, $13M + 6A^1$).

Meiotic Analyses

Meiosis was regular in the diploid samples of *N. macrostemon* and *N. nudicaule*, with five bivalents and a predominance of interstitial chiasmata (Fig. 3a). On the other hand, the tetraploid cytotypes showed irregular meiotic pairing, with univalents, bivalents and multivalents, but only rare anaphase bridges or lagging chromosomes. A predominance of tetravalents formed by metacentric chromosomes was observed in tetraploid *N. macrostemon* ($2n = 19$) (Fig. 3b). In addition, one heteromorphic trivalent and multivalents with up to six acrocentric and one metacentric chromosomes, were often observed (Fig. 3b). The heteromorphic trivalent was formed by one metacentric paired with two acrocentric chromosomes by their the long arms (Fig. 3c). In *N. nudicaule* 4x the most common meiotic arrangement was $2^I + 3^{II} + 1^{III} + 2^{IV}$ (Fig. 3c), with an identical heteromorphic trivalent. The meiotic pairing of *N. gracile* was similar to that of the other tetraploid species, with the heteromorphic trivalent being particularly noticeable (Fig. 3e).

In spite of their meiotic irregularities, the tetraploids of the *Inodorum* complex had apparently normal and viable pollen grains. When pollen grains of any tetraploid sample were immersed in a drop of 15% sucrose solution, all or almost all of the grains germinated within 24h. Chromosome counts in 38 cells in anaphase II (Fig. 3d) and 96 first pollen grains mitosis (Fig. 3e) revealed a predominance of haploid chromosome complements of $n = 9$ (46.8%) or $n = 10$ (45.7%) with different combinations of metacentric and acrocentric chromosomes. Cells with $n = 8$ and $n = 11$ were also observed (7.4%).

GISH and dot-blot experiments

None of the GISH experiments using *N. gracile* metaphases and total nuclear DNA of *N. macrostemon* or *N. nudicaule* as probe with or without blocking DNA could differentiate between the diploid genomes of *N. gracile* (Table 2). All of the experiments showed uniform labeling of the chromosomes, while the chromosomes of the internal control (*Ipheion recurvifolium*) were consistently weakly labeled (Fig. 4a,b). Moreover, after subsequent

increments in the concentration of blocking DNA (25x, 50x, and 75x) in the hybridization mix, the labeling intensity of all chromosomes remained uniform. In the dot-blot analyses, the *N. macrostemon* probe hybridized with equal intensity on both *N. gracile* and *N. nudicaule* DNA, as well as on its own DNA. Similar results were observed when genomic DNA of *N. nudicaule* was used as probe (Fig. 4c). Only when DNA of *N. macrostemon* or *N. nudicaule* were hybridized with genomic DNA of an external group (*Ipheion recurvifolium*) a much lower value (~17%) was obtained.

Sequence analyses

The ITS1-5.8S-ITS2 nuclear region was highly conserved among the species here analyzed, including *N. arenarium*. The aligned ITS matrix was 655 bp long, with only three parsimony-informative loci. All samples investigated were quite similar to each other, with the exception of two plants of *N. nudicaule* (JN591604 and JN591605) collected near Rio Quaraí, Bella Unión (Uruguay), which exhibited eight variable sites in relation to the remaining samples of the *Inodorum* complex. The samples of *N. macrostemon* JN591608 and JN591609, both from North Uruguay, share the same A → G transition which distinguish them from the remaining *N. macrostemon* sample from South Uruguay.

The plastid DNA sequence *trnL-trnF* showed greater variability. When aligned, the *trnL-trnF* matrix was 849 bp long, with 831 constant and 17 parsimony-informative characters. Sequence variation included two substitutions (one autoapomorphic), one single base pair insertion, and sequence length variations in repetitive regions of one AT microsatellite and in two poly T regions. The analysis of haplotypes resulted in an incompletely resolved network. Plastid lineages did not appear clearly diverging and some haplotypes were shared by different morphospecies. The network separated most diploids of *N. macrostemon* (haplotypes in green, Fig. 5) from diploids of *N. nudicaule* (in orange) but the same did not occur with tetraploid

accessions of those species or *N. gracile*. The triploid *Nothoscordum* sp. 1 and the tetraploid *Nothoscordum* sp. 2 (represented as empty circles) were more closely related to a less common haplotype of *N. gracile* (black) and to *N. arenarium* (yellow). Three distinct haplotypes of *N. gracile* were detected: two widely distributed (red and black haplotypes) and one restricted to Uruguay (orange). The latter was also found in some diploid samples of *N. macrostemon* and *N. nudicaule*. The red and black haplotypes corresponded to the two most frequent cytotypes of *N. gracile*, $2n = 19$ ($13M + 1A^0 + 4A^1 + 1A^2$) and $2n = 19$ ($13M + 3A^0 + 3A^1$), respectively (Fig. 5).

Tetraploid apomicts do not show a strict correspondence between morphospecies and cpDNA haplotypes. A trend to geographical structuring is apparent instead with tetraploid samples of both morphospecies showing the same haplotype (orange in Fig. 5) towards southwestern Uruguay and another haplotype (blue) towards the North East. This trend is also apparent in Rio Grande do Sul (Brazil) where one haplotype (red) of *N. gracile* is found along the Atlantic coast and a different haplotype (black) is distributed further inland (Fig 5).

Discussion

Karyotype variability of the *Inodorum* complex

The chromosome numbers and morphologies of the species here analyzed were similar to those previously described (Crosa, 1972, 1996; Nuñez *et al.*, 1974). Intra-individual variation with $2n = 18$ and 19 was not observed here, although several cells displayed two acrocentric chromosomes associated by the NORs on their short arms, resembling a metacentric chromosome. Associations between acrocentric chromosomes with terminal NORs have been described in a number of species, including *Nothoscordum gracile* (Nuñez *et al.*, 1974) and *Allium sativum* (Sato & Kawamura, 1981) and may be the cause of the apparent mosaicism ($2n = 18/19$) reported by Nassar & Aguiar (1978) for *N. gracile*.

The presence of CMA bands in the proximal region of the long arms of the acrocentric chromosomes of $2x$ and $4x$ *N. macrostemon*, and their absence in the diploids of *N. nudicaule* and in most of its tetraploids, appears to be the most prominent cytological difference between these two species. The occurrence of acrocentric chromosomes with and without CMA bands in all of the samples of *N. gracile* constitutes a strong indication of their hybrid origin and the probable independent formation of different cytotypes. In spite of the high variability observed in the CMA banding pattern in the tetraploids of the *Inodorum* complex little intrapopulational variation was observed, which coupled with the occurrence of karyotypic heterozygosity suggests that propagation of tetraploids is predominantly asexual.

The diversity of banding patterns and chromosome numbers was higher in localities in Uruguay where different cytotypes of the *Inodorum* complex occur. New apomictic hybrids and the greatest variability occurs at the contact zone between tetraploid apomictics and related sexual diploids, while only some fixed genotypes may show considerably expanded geographic ranges (Hörandl, 2006; Daurelio *et al.*, 2004). Consequently, our data confirm that the centre of

diversity of the *Inodorum* complex is located in Uruguay (Crosa, 1996) based on the occurrence of the greatest karyotypic and haplotypic variability in that area, and the only area where diploid cytotypes of *N. macrostemon* and *N. nudicaule* were found. Throughout its range, *N. gracile* was found in disturbed roadside environments, a pattern that has been found for apomictic hybrids in other complexes (Bierzychudek, 1985; Hörandl, 2006)

The production of viable pollen and effective pollination are necessary for endosperm formation in *N. gracile* since it is pseudogamous (Tandom & Kapoor, 1963). In the case of the tetraploids of the *Inodorum* complex, in spite of irregularities observed in their meiotic pairing the pollen grains were generally viable, with a high frequency of microspores with $n = 10$ and $n = 9$, thus indicating that sexual reproduction is also possible (see also Dyer, 1967; Nuñez *et al.*, 1974). The occurrence of facultative sexually reproducing individuals in apomictic complexes is not rare (Akins & Dijk, 2007). Residual female sexuality or the production of functional male gametes seems to be sufficient to allow cross-fertilization between apomictic tetraploids as well as between tetraploids and diploids, which can account for the karyotype variability observed and the formation of triploids and individuals with rare translocations. The karyotype variability of the *Inodorum* complex, as in other apomictic complexes, may have been generated by multiple *de novo* origins of the apomictic polyploids, backcrossing to sexual related species or by somatic mutations (Hörandl *et al.*, 2009). On the other hand, extensive asexual reproduction ensured by apomixis and the abundant production of bulbils may explain the stabilization and dissemination of a few cytotypes (Akins & Dijk, 2007).

Origin of the $2n = 19$ karyotype

Considering the stability of the diploid chromosome number of the section *Inodorum* ($2n = 10$; $6M + 4A$), the number $2n = 20$ ($12M + 8A$) should be expected in the tetraploids. Indeed, tetraploids with $2n = 20$ may have been formed a number of times in the wild, as pollen grains of *N. gracile* with $n = 10$ and $n = 9$ are very frequent. Nuñez *et al.* (1974) reported $n = 10$ in

22% of the pollen grains and meiotic dyad cells of *N. gracile*, most of them having 6M + 4A, as in the present sample. Seedlings with $2n = 20$ (14M + 6A) descendents of clones of *N. gracile* with $2n = 19$ were reported by Dyer (1967) and Nuñez *et al.* (1974).

The $2n = 19$ (13M + 6A) karyotype seems to be derived from a centric fusion in the ancestral karyotype with $2n = 20$ (Crosa, 1996). This assumption is supported by the maintenance of the FN expected for $2n = 20$ (FN = 16) and by the presence of a heteromorphic trivalent formed by a metacentric and two acrocentric chromosomes during meiosis (see also Levan & Emsweller, 1938; Dyer, 1967; Nuñez *et al.*, 1974). This fusion should have occurred between the centromeres of two acrocentric chromosomes and resulted in the loss of their short arms, since no 45S DNA_r signal were observed in the extra metacentric chromosomes. Fusion of acrocentric chromosomes bearing nucleolar organizer regions on their short arms, with the loss of ribosomal sites, has been reported in several other genera such as *Lillium* (Muratović *et al.*, 2005) and *Rumex* (Koo *et al.*, 2004). In *Nothoscordum*, robertsonian translocations seems to be a common phenomenon and may also have occurred between acrocentric and metacentric chromosomes, as in *N. arenarium* (Souza *et al.*, 2009) and in four individuals of *N. gracile* from Santa Maria (Brazil) which have a metacentric chromosome with a proximal CMA band on one of its arms.

The occurrence of $2n = 19$ in tetraploid cytotypes of three closely related species suggests that the fusion probably occurred in a tetraploid plant with $2n = 20$, and the extra metacentric chromosome was later transmitted to the other tetraploids of the complex *Inodorum* through interspecific hybridization. The absence of CMA band in the proximal region of the extra metacentric chromosome suggests that this fusion may have initially occurred in *N. nudicaule*, as it is the only species in this complex without proximal CMA bands in their acrocentric chromosomes.

The union of a balanced gamete with $n = 9$ (7M + 2A⁰) from a $2n = 19$ *N. nudicaule* and a non-reduced gamete of *N. macrostemon* 2x, with $n = 10$ (6M + 4A¹), could have originated the

$2n = 19$ tetraploid hybrid *N. nudicaule* $\times$ *N. macrostemon*, which by self-fertilization or further introgression generated the diversity of banding patterns observed in the tetraploids of this complex. Analysis of *trnL-trnF* sequences showed that each tetraploid cytotype exhibited a single and exclusive haplotype, with a few exceptions, suggesting that each tetraploid lineage had an independent origin. A non-reduced gamete of *N. macrostemon* $2x$ or *N. arenarium* may also have contributed to form the triploid plants (*Nothoscordum* sp. 1) with $2n = 15$ ($9M + 6A^1$) without the extra metacentric. Dyer (1967) proposed that the maintenance of this fusion in heterozygosis was due to the presence of a balanced lethal system, as has been observed in other species with permanent heterozygotic translocations (reviewed by Levin, 2002; Crosa, 1996). However, some homozygous samples of *N. gracile* ($2n = 18$; $14M + 4A^1$) and *N. nudicaule* ($2n = 18$; $14M + 2A^0 + 2A^1$) were observed here, suggesting that they did not have a lethal allele system. It is interesting to observe that the combination $7M + 2A$ is by far the most frequent one both, in dyad cells of meiosis and in pollen grain mitosis (Levan & Emsweller, 1938; Dyer, 1967; Nuñez *et al.*, 1974), and it could have allowed the formation of eventual tetraploids ($14M + 4A$) bearing two copies of the extra metacentric chromosome.

The origin of *Nothoscordum gracile* and its relationships with *N. macrostemon* and *N. nudicaule*

The ability of GISH to differentiate among parental genomes in a hybrid depends mainly on the size of the genomes, on the degree of divergence of the principal families of repetitive DNA sequences, and on the phylogenetic distance between the ancestral species (Markova & Vyskot, 2009). The fact that GISH and dot-blot could not differentiate between genomes of the species of the complex *Inodorum* and that artificial hybrids between *N. nudicaule* $2x$ and *N. macrostemon* $2x$ are viable (O. Crosa, unpublished) suggest that this complex is very young. A recent origin is also compatible with the lack of differentiation of the ITS sequences among

members of this complex and the morphological and cytogenetic similarities between their tetraploids.

The variation among *trnL-trnF* haplotypes was consistent with the CMA banding patterns. Most populations with the same haplotype share the same cytotype and all *N. gracile* samples with the dominant or standard cytotype had the same haplotype. Despite the low level of variation among plastid sequences, the strict correspondence between them and the cytological complements supports the interpretation that haplotype similarity is not due to homoplasmy but rather inherited from the progenitors of each lineage together with karyotypic features.

At least three distinct lineages can be recognized in *N. gracile* both by sequence and karyotypic data. The plastid sequences of the polyploids are related to different degrees to distinct putative sexual sources and their cytological constitution can be explained by different contributions from the different diploid sources. In addition, the presence of shared plastid sequences among different morphospecies and the lack of distinct lineages suggest both recent diversification and ongoing gene flow. The karyotypes of asexual polyploids can be explained by a combination but not the simple addition of those of the diploid sources. Mechanisms explaining such combinations and variability may include recombination at the polyploid level following multiple origins of the tetraploids (Soltis *et al.*, 2003) and/or repeated introgression from sexuals in a reticulate pattern (Lo *et al.*, 2010) including unilateral sexual polyploidization involving triploid bridges (Ramsey & Schemske, 1998).

In the *Inodorum* complex, polyploid apomicts appear more widespread than their sexual progenitors, which is congruent with the concept of geographic parthenogenesis. Each of the lineages identified by an individual cytotype/haplotype may represent a single apomictic clone. When individual clones can be identified, their geographic distributions can be asymmetrical, some clones being far more widespread than others (Richards, 2003). The most widespread cytotype/haplotype of *N. gracile* in South America is a structural heterozygote ($2n = 19: 13M +$

$1A^0 + 4A^1 + 1A^2$), also found in Japan (Sato *et al.*, 1979). The maintenance of structural heterozygosity and the occurrence of this lineage in areas far removed from the distributional ranges of either diploid or tetraploid sexual partners, supports the interpretation that it possibly represents the most vigorous and successful apomictic clone generated within the *Inodorum* complex. Because other apomictic lineages of the tetraploid *N. gracile* are reported here, its comparatively greater success cannot be attributed to the advantages of apomixis or polyploidy but must be explained by some inherent property of this individual clone. It has been proposed that some clones represent *general purpose genotypes* (Lynch, 1984) that possess wide adaptation capabilities to a variety of environmental conditions. Further evidence of the exclusively clonal nature of this karyotype/cytotype may be needed to support this interpretation.

The diploid cytotypes of *N. nudicaule* and *N. macrostemon* represent the extremes of morphological and cytogenetic (CMA bands) variability within this complex and appear to constitute closely related true biological species in spite of the putative occurrence of chloroplast capture causing the incongruent distribution of cpDNA haplotypes. At the tetraploid level, a greater trend towards geographical structuring of chloroplast haplotypes and a close correspondence between chloroplast sequences and karyotypes irrespective of morphological variation was found. Cytological evidence is highly congruent with a hybrid origin of not only *N. gracile* but also polyploid cytotypes assigned to *N. macrostemon* and *N. nudicaule*. This pattern strongly suggests that the sexual diploid components of the *Inodorum* complex hybridize frequently, producing apomictic clones spanning the morphological extremes represented by their parental species. Some of those clones are morphologically recognizable as *N. gracile*.

In this work we have shown that cytological and sequence information is congruent with the pattern suggested by morphological evidence that the *Inodorum* section is a species complex and that *N. gracile* is likely an assemblage of hybrids involving at least *N. macrostemon* and *N. nudicaule*. We have also shown that differentiation at the sequence level is incipient, suggesting a recent divergence among the sexual species of the complex. Analysis of ITS sequences points

to possible gene flow constrains between the northern and southern populations of Uruguay, although no differences were observed in karyotype or *trnL-trnF* plastidial sequences between these populations. Further support for the evolutionary hypotheses and processes in this complex will likely emerge from more intensive sampling and sensitive molecular markers (Álvarez & Wendel, 2003).

Acknowledgements

We are grateful to Dr. María Eva Lozzia de Canelada, Ana Christina Brasileiro Vidal, Leonardo Felix and other colleagues who provided *N. gracile* samples for this study, and the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) for financial support and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for a grant to L.G.R.S.

References

- Álvarez I, Wendel JF. 2003.** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 417–434.
- Akins PO, Dijk PJ. 2007.** Mendelian genetics of apomixis in plant. *Annual Review of Genetics* **41**: 509–537.
- Bierzychudek P. 1985.** Patterns in plant parthenogenesis. *Experientia* **41**: 1255–1264.
- Canelada MEL, Fernandez AMF. 1985.** Bando cromosomico en *Nothoscordum inodorum* (Soland. Ex Ailton) Nich. var. *Inodorum*. *Lilloa* **36**: 181–186.
- Crosa O. 1972.** Estudios cariología en el género *Nothoscordum* (Liliaceae). *Boletín de la Facultad de Agronomía de Uruguay* **122**: 3–8.
- Crosa O. 1996.** Sistemática e evolução das espécies da seção *Inodorum* Guag. do gênero *Nothoscordum* Kunth (Allieae, Alliaceae). PhD Thesis *Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre*.
- Daurelio LD, Espinoza F, Quarín CL, Pessino SC. 2004.** Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant Systematics and Evolution* **244**: 189–199.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11–15.
- Dyer AE. 1967.** The maintenance of structural heterozygosity in *Nothoscordum fragans* Kunth. *Caryologia* **20**: 287–308.

- Fay MF, Rudall PJ, Chase M. 2006.** Molecular studies of subfamily Gilliesioideae (Alliaceae). *Aliso* 22:367–371.
- Friesen N, Fritsch RM, Blattner FR. 2006.** Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso* 22: 372–395.
- Gornall RJ. 1999.** Population genetic structure in agamosperous plants. **In:** Hollingsworth PM, Bateman RM, Gornall RJ, eds. *Molecular systematics and plant evolution*. London: Taylor & Francis, 118–138.
- Guaglianone EA. 1972.** Sinopsis de las especies de *Ipheion* Raf. y *Nothoscordum* Kunth (Liliáceae) de Entre Ríos y regiones vecinas. *Darwiniana* 17: 159–240.
- Guerra M, Felix LP. 2000.** O cariótipo de *Nothoscordum pulchellum* (Alliaceae) com ênfase na heterocromatina e sítios de DNAr. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 35: 283–289.
- Hall T. 2001.** Bioedit version 5.0.6. Department of Microbiology, North Carolina State University. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
- Hörandl E, Greilhuber J, Klimova K, Paun O, Temsch E, Emadzade K, Hodálová I. 2009.** Reticulate evolution and taxonomic concepts in the *Ranunculus auricomus* complex (Ranunculaceae): Insights from morphological, karyological and molecular data. *Taxon* 58: 1194–1215.
- Hörandl E (2006)** The complex causality of geographical parthenogenesis. *New Phytologist* 171: 525–538.
- Jones K. 1998.** Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. *Botanical Review* 64: 273–89.

- Koo DH, Yoonkang H, Bang JW. 2004.** Variability of rDNA loci in dioecious *Rumex acetosa* L. detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Korean Journal of Genetics* **26**: 9–13.
- Kurita M, Kuroki Y. 1963.** Heterochromaty in *Nothoscordum* chromosomes. *Memoirs of Ehime University Section II* **4**: 493–500.
- Levan A, Emsweller SL. 1938.** Structural hibridity in *Nothoscordum frangrans*. *Journal of Heredity* **29**: 291–294.
- Levin DA. 2002.** The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford Univ. Press, New York.
- Li QQ, Zhou SD, He XJ, Yu Y, Zhang YC, Wei XQ. 2010.** Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Allieae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *rps 16* sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. *Annals of Botany* **106**: 709–733.
- Lo EYY, Stefanović S, Dickinson TA. 2010.** Reconstructing reticulation history in a phylogenetic framework and the potential of allopatric speciation driven by polyploidy in an agamic complex in *Crataegus* (Rosaceae). *Evolution* **64**: 3593–608.
- Lowry E, Lester SE. 2006)** The biogeography of plant reproduction: potential determinants of species' range sizes. *Journal of Biogeography* **33**: 1975–1982.
- Lynch M. 1984.** Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. *Quarterly Review of Biology* **59**: 257–290.

- Markova M, Vyskot B. 2009.** New horizons of genomic *in situ* hybridization. *Cytogenetic and Genome Research* **126**: 368–75.
- Muratović E, Bogunić F, Šoljan D, Siljak-Yakovlev. 2005.** Does *Lilium bosniacum* merit species rank? A classical and molecular-cytogenetic analysis. *Plant Systematics and Evolution* **252**: 97–109.
- Nassar NMA, Aguiar MLR. 1978.** Multiple karyotypes in individuals of *Nothoscordum fragans* (Liliaceae). *Caryologia* **31**: 7–14.
- Nguyen NH, Driscoll HE, Specht CD. 2008.** A molecular phylogeny of the wild onions (*Allium*; Alliaceae) with a focus on the western North American center of diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **47**: 1157–1172.
- Núñez O, Frayssinet N, Rodriguez RH, Jones K. 1974.** Cytogenetic studies in the genus *Nothoscordum* Kunt. I The *N. inodorum* polyploidy complex. *Caryologia* **27**: 403–441.
- Ramsey J, Schemske DW. 1998.** Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 467–501.
- Ravenna PF. 1978.** Studies in the Genus *Nothoscordum*. *Plant Life* **34**: 136–145.
- Richards AJ. 2003.** Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **358**: 1085–1093.
- Rua GH, Speranza PR, Vaio M, Arakaki M. 2010.** A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. *Plant Systematic and Evolution* **288**: 227–243.
- Sambrook J, Russell DW. 2001.** Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Sato M, Sato S, Matsumoto E. 1982.** Chromosome banding produced by UV-light exposure in the presence of Hoechst 33258. *Caryologia* **35**: 405–409.
- Sato S, Kawamura S. 1981.** Cytological studies on the nucleolus and the NOR-carrying segments of *Allium sativum*. *Cytologia* **46**: 781–790.
- Sato S, Kuroki Y, Ohta S. 1979.** Two types of color-differentiated C-banding positive segments in chromosomes of *Nothoscordum fragans*, Liliaceae. *Cytologia* **44**: 715–725.
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA. 2003.** Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist* **161**: 173–91.
- Souza LGR, Crosa O, Guerra M. 2009.** The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): a populational and cytomolecular analysis. *Genetics and Molecular Biology* **32**: 111–116.
- Souza LGR, Crosa O, Guerra M. 2010.** Karyological circumscription of *Ipheion* Rafinesque (Gilliesioideae, Alliaceae). *Plant Systematic and Evolution* **287**: 119–127.
- Stearn WT. 1986.** *Nothoscordum gracile*, the correct name of *N. fragans* and the *N. inodorum* of authors (Alliaceae). *Taxon* **35**: 335–338.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**: 1105–1109.
- Tandon SL, Kapoor BM. 1963.** Contributions to the cytology of endosperm in some Angiosperms II. *Nothoscordum fragans* Kunth. *Caryologia* **16**: 377–395.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673–4680.

- Vandel A. 1928.** La parthénogenese géographique. Contribution à l'étude biologique et cytologique de la parthénogenese naturelle. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique* **62**: 164–182.
- Verduijn MH, Van Dijk PJ, Van Damme JMM. 2004.** Distribution, phenology and demography of sympatric sexual and asexual dentelions (*Taraxacum officinale* s.l.): geographic parthenogenesis on a small scale. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 205–218.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Gelfand D, Smitsky J, White T. (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego, CA 315-322.

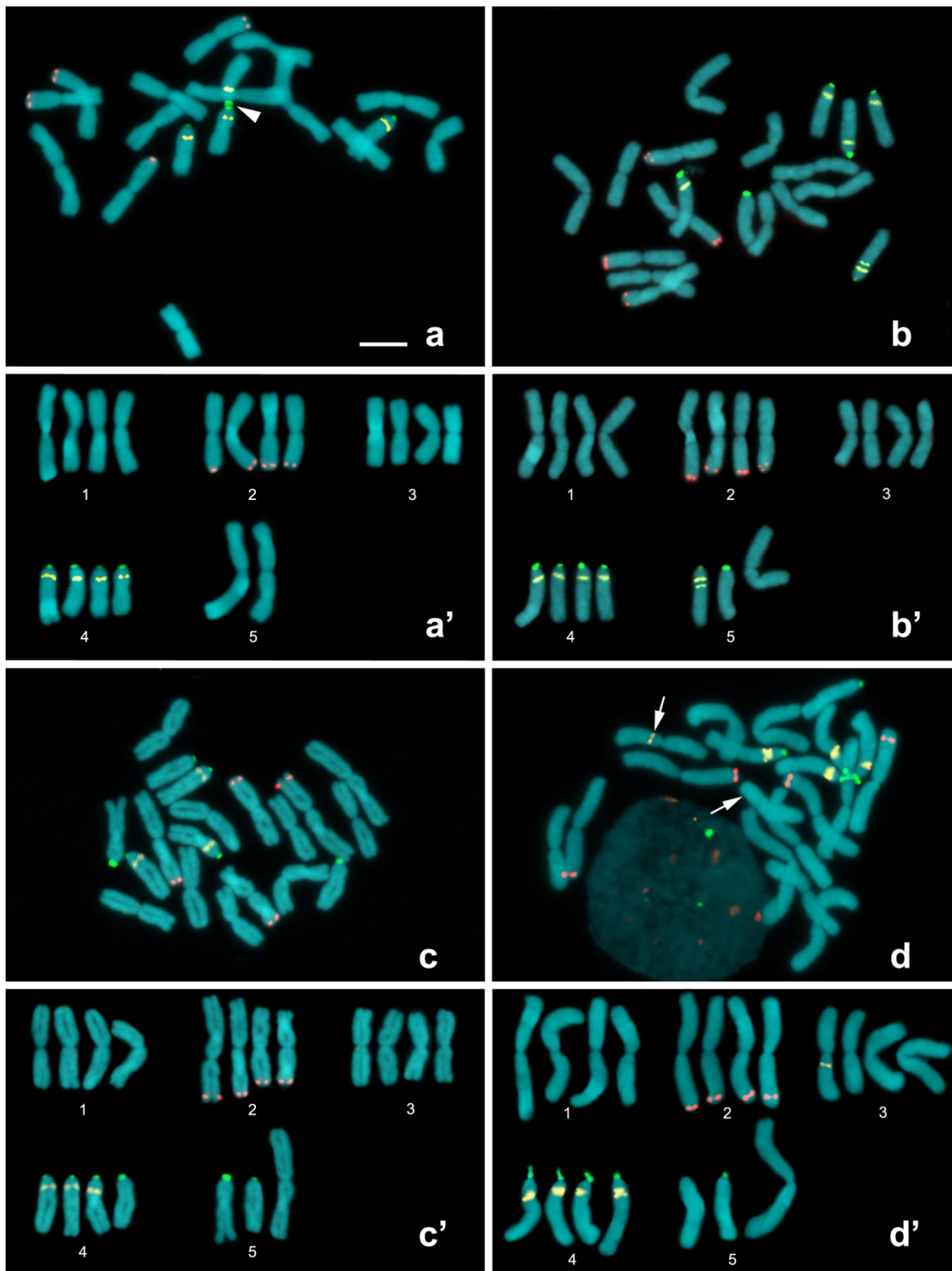


Fig. 1. Karyotype variability in *Nothoscordum gracile*. **a** $2n = 18$ ($14M + 4A^1$), **b** $2n = 19$ ($13M + 1A^0 + 4A^1 + 1A^2$), **c** $2n = 19$ ($13M + 3A^0 + 3A^1$), and **d** $2n = 19$ ($13M + 2A^0 + 4A^1$) with a reciprocal translocation between the long arms of chromosomes 3 and 5 (arrows). **a'-d'**

Karyograms based on **a-d** metaphases . Observe the variable number of CMA bands on the proximal region of the long arms of acrocentrics. Arrowhead in **a** indicates an association between 45S rDNA sites of two acrocentric chromosomes. CMA = yellow, DAPI = blue, 5S rDNA = red, 45S rDNA = green. Bar in **a** corresponds to 10 μ m.

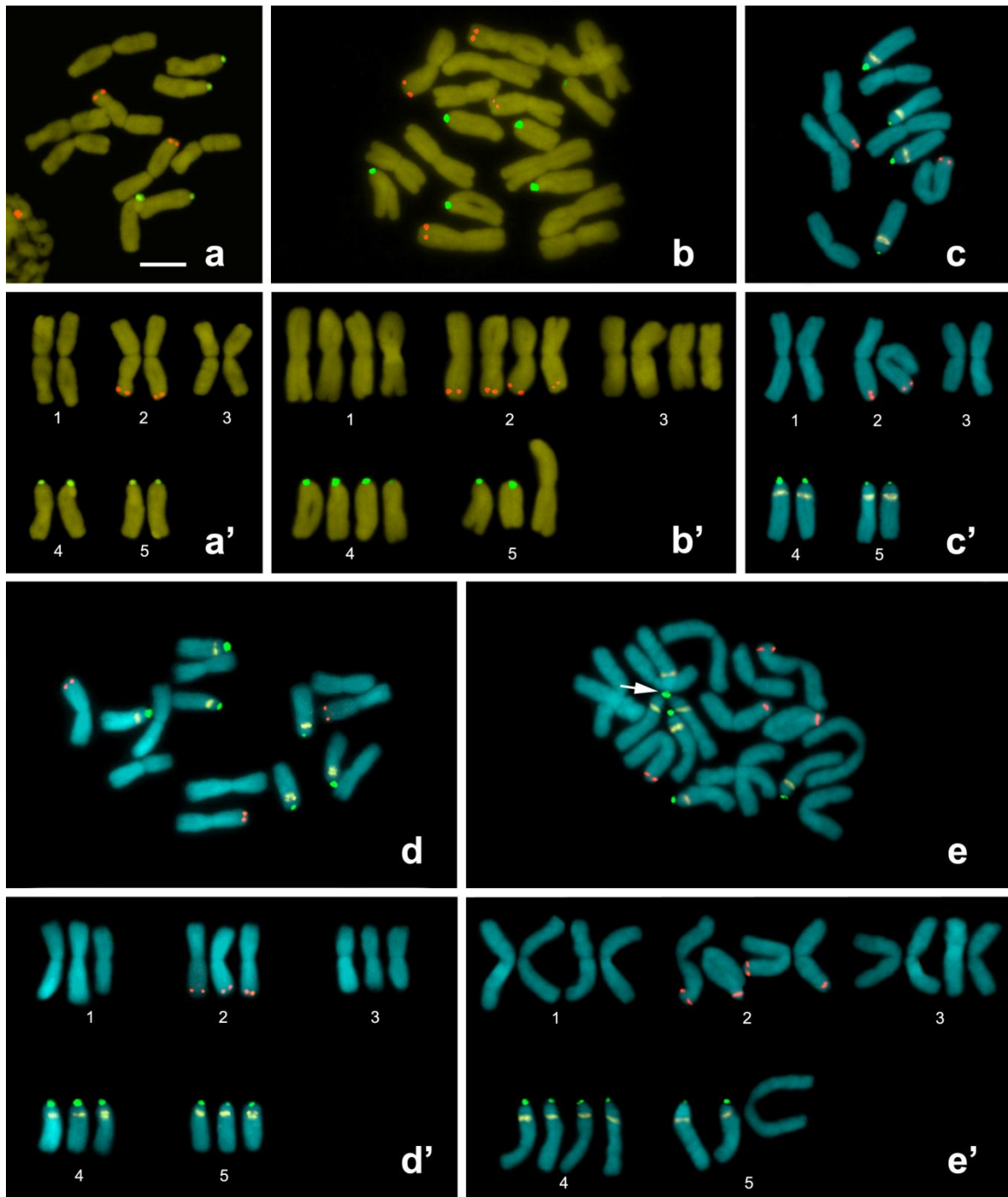


Fig. 2. Cytotypes of *Nothoscordum nudicaule*, *N. macrostemon* and *Nothoscordum* sp1. **a,b** *N. nudicaule* with $2n = 10$ ($6M + 4A^0$) (**a**) and $2n = 19$ ($13M + 6A^0$) (**b**). **c,e** *N. macrostemon* with

$2n = 10$ ($6M + 4A^1$) (c) and $2n = 19$ ($13M + 6A^1$) (e). **d** *Nothoscordum* sp1 $2n = 15$ ($9M + 6A^1$). **a'-e'** Karyograms based on **a-e** metaphases. Arrow in **e** indicates an association between three 45S rDNA sites. CMA = yellow, DAPI = blue, 5S rDNA = red, 45S rDNA = green. Bar in **a** corresponds to 10 μm .

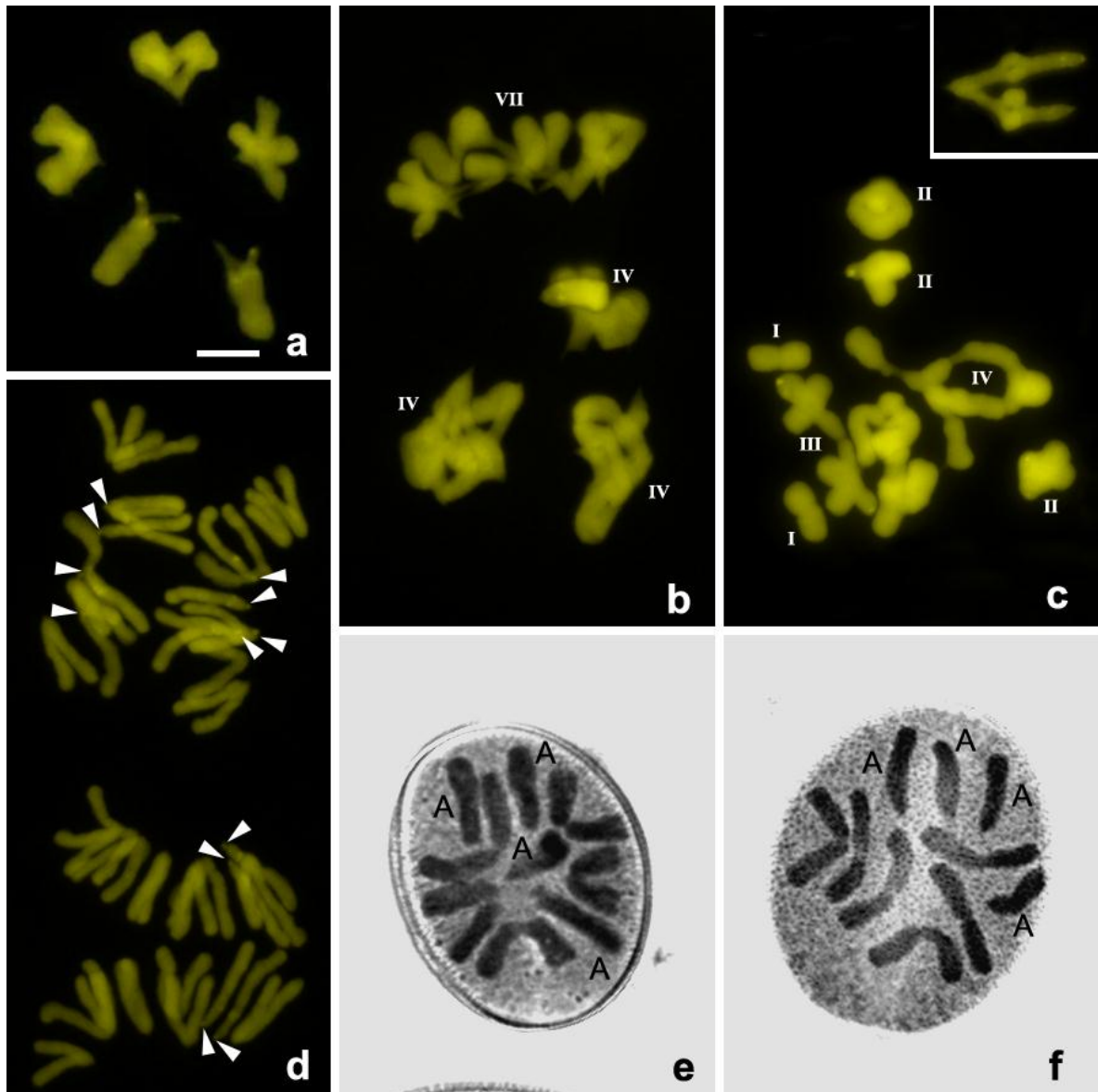


Fig. 3. Meiosis in *Nothoscordum macrostemon* (a,d) and *N. nudicaule* (b,c) and first pollen grain mitosis in *N. gracile* (e,f). **a-c** Metaphase I with five bivalents in *N. macrostemon* $2n = 10$ (a) and with multivalents in *N. macrostemon* $2n = 19$ (b) and *N. nudicaule* $2n = 19$ (c). **d** Anaphase II in *N. macrostemon* $2n = 19$ showing chromosome sets with $6M + 4A$ (above) and $7M + 2A$ (below). **e,f** First pollen grain mitosis of *N. gracile* with $n = 9$ ($5M + 4A$) (e) and $n = 7M + 2A$ (f).

10 (6M + 4A) (f). Inset in **c** shows a heteromorphic trivalent of another cell oriented to the poles. Univalent, bivalent, trivalent, quadrivalent, and heptavalent are indicated by Roman numerals. Arrowheads in **d** point to CMA bands of the acrocentric short arms. Bar in **a** corresponds to 10 μ m.

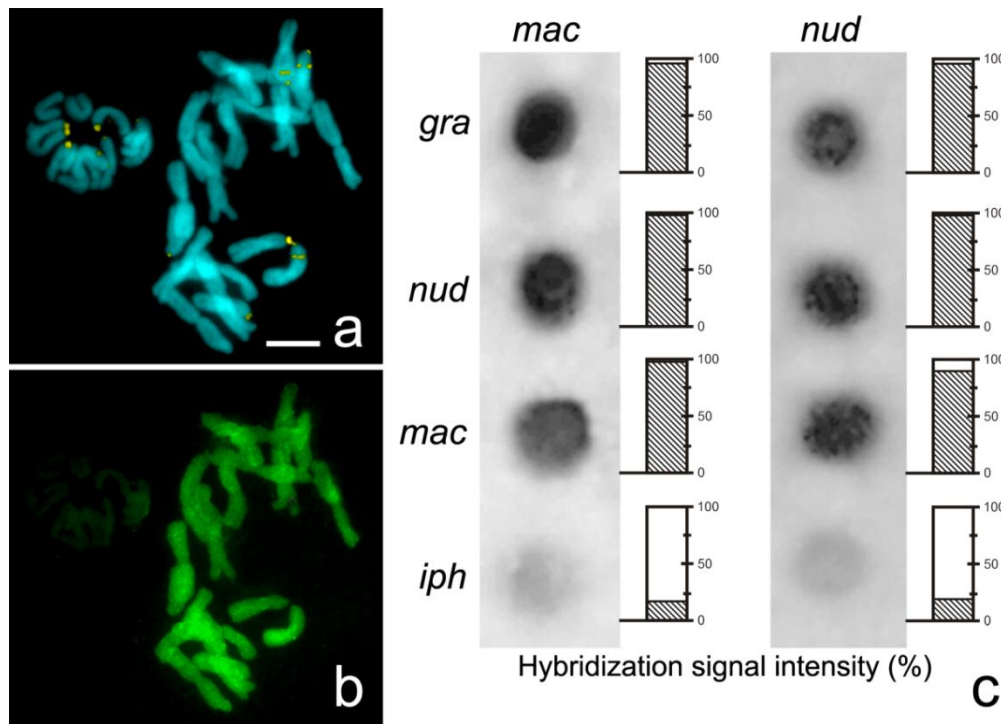


Fig. 4. GISH (**a**, **b**) and dot-blot hybridization (**c**) among species of the complex *Inodorum* and *Ipheion recurvifolium*. **a,b** Metaphase of *N. gracile* and prometaphase of *I. recurvifolium* (left below) stained with CMA/DAPI (**a**) and *in situ* hybridized with *N. nudicaule* genomic probe (**b**). **c** Labeled genomic DNA of *N. macrostemon* (*mac*) and *N. nudicaule* (*nud*) hybridized in membrane with non-labeled genomic DNA of *N. gracile* (*gra*), *N. macrostemon*, and *N. nudicaule*. Relative hybridization intensity based on the 100% value for homologous hybridization is indicated below. Bar in **a** corresponds to 10 μ m.

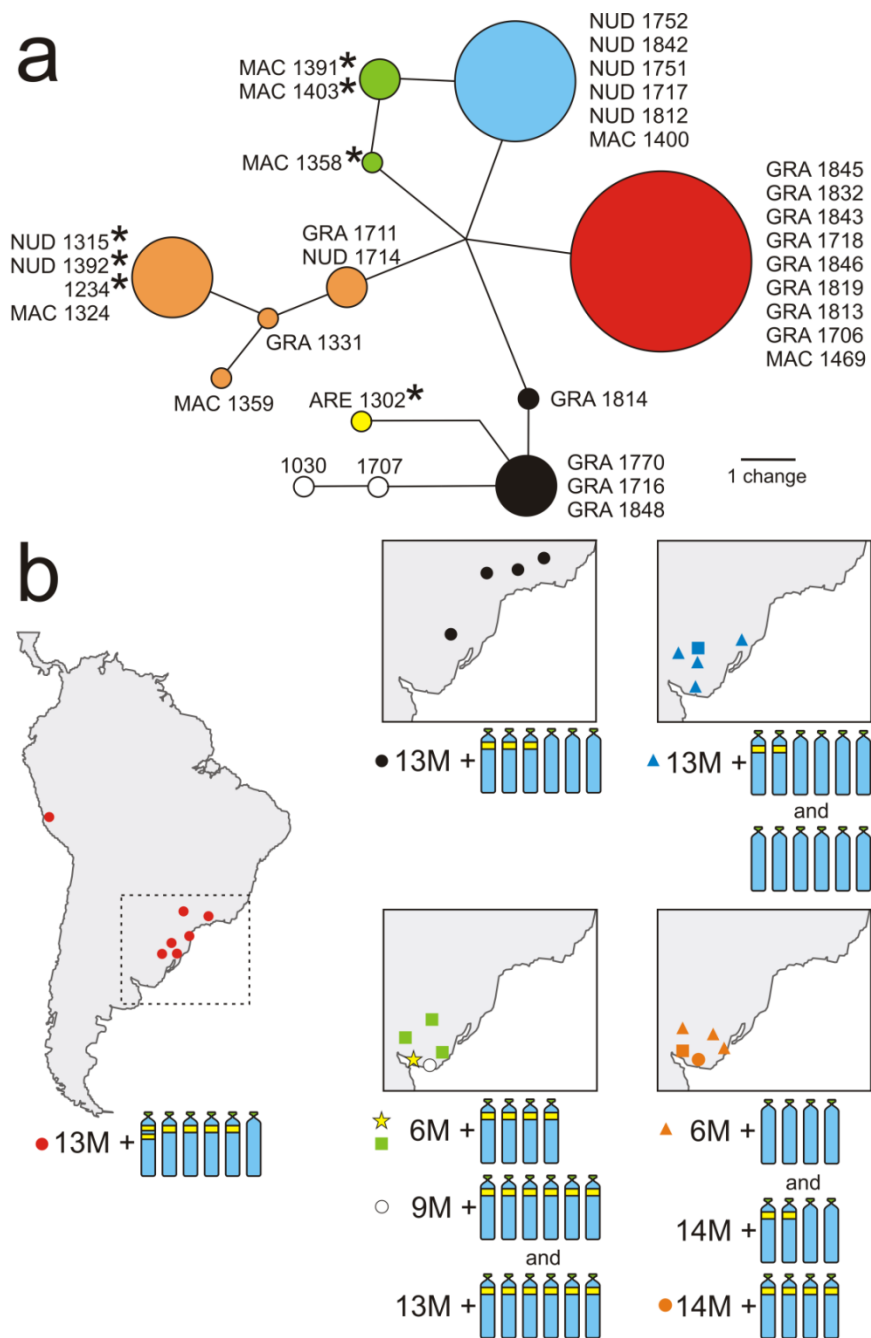


Fig. 5. Network connecting *trnL-trnF* of section *Inodorum* (**a**) and their relationships with geographic and cytogenetic data (**b**). Each haplotype is indicated by a different color, both in **a** and **b**. Circle sizes at the network are proportional to the number of individuals observed for each haplotype. Idiograms of acrocentric chromosomes represent the predominant cytotype for each haplotype, with the same colors as in **a**. Diploid samples in **a** are indicate by asterisks. In **b**, circle indicates *N. gracile* (GRA), square *N. macrostemon* (MAC), triangle *N. nudicaule* (NUD), star *N. arenarium* (ARE) and empty circles *Nothoscordum* sp.1 and sp.2.

Table 1. Species cytologically investigated with provenance, accession number in the living collection, number of individuals analyzed, chromosome number ($2n$), and number of acrocentric chromosomes without CMA bands (A^0) or with one band (A^1) or two (A^2) CMA bands.

Species	Provenance (locality, state/department/province, country)	Accession number	Number of individuals	$2n$	Karyotype formulae	CMA bands		
						A^0	A^1	A^2
<i>Nothoscordum gracile</i> (Ailton)								
Stearn								
	Blumenau, Santa Catarina, Brazil	GRA1832	2	19	13M + 6A	1	4	1
	Botucatu, São Paulo, Brazil	GRA1817	2	19	13M + 6A	1	4	1
	Buenos Aires, Argentina	GRA1849	3	19	13M + 6A	1	4	1
	Gramado, Rio Grande do Sul, Brazil	GRA1718	1	19	13M + 6A	1	4	1
	Lima, Peru	GRA1813	3	19	13M + 6A	1	4	1
	Londrina, Paraná, Brazil	GRA1846	3	19	13M + 6A	1	4	1
	Montevideo, Montevideo, Uruguay	GRA1851	1	19	13M + 6A	1	4	1

Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil	GRA1843	5	19	13M + 6A	1	4	1
Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil	GRA1845	6	19	13M + 6A	1	4	1
São Paulo, São Paulo, Brazil	GRA1706	4	19	13M + 6A	1	4	1
Lavras, Minas Gerais, Brazil	GRA1770	3	19	13M + 6A	3	3	-
Londrina, Paraná, Brazil	GRA1716	10	19	13M + 6A	3	3	-
Piracicaba, São Paulo, Brazil	GRA1848	2	19	13M + 6A	3	3	-
Tucumán, Tucumán, Argentina	GRA1847	3	19	13M + 6A	3	3	-
Maldonado, Uruguay	GRA1711	4	18	14M + 4A	-	4	-
<i>N. macrostemon</i> Kunth							
Ruta 5, Rivera, Uruguay	MAC1391	1	10	6M + 4A	-	4	-
Ruta 9, Arroyo Solís Grande, Canelones, Uruguay	MAC1358	4	10	6M + 4A	-	4	-
Ruta 9, Arroyo Solís Grande, Canelones,	MAC1712	2	19	13M + 6A	-	6	-

Uruguay								
<i>N. nudicaule</i> (Lehm.) Guagl.								
Uruguay	NUD1082	1	10	6M + 4A	4	-	-	
Ruta 7 Km 323, Durazno, Uruguay	NUD1392	1	10	6M + 4A	4	-	-	
Ruta 8, Arroyo Convoy, Treinta y Tres, Uruguay	NUD1363	1	10	6M + 4A	4	-	-	
Ruta 8, Arroyo Otazo, Treinta y Tres, Uruguay	NUD1361	1	10	6M + 4A	4	-	-	
Paso Aguiar, Rio Negro, Tacuarembó, Uruguay	NUD1386	1	10	6M + 4A	4	-	-	
Bella Unión, Artigas, Uruguay	NUD0104	2	10	6M + 4A	4	-	-	
Canelones, Uruguay	NUD1717	1	18	14M + 4A	2	2	-	

	Ruta 9, Solís Grande, Canelones, Uruguay	NUD1714	5	18	14M + 4A	2	2	-
	Artigas, Uruguay	NUD1751	2	19	13M + 6A	6	-	-
	Bella Unión, Artigas, Uruguay	NUD1750	1	19	13M + 6A	6	-	-
	Ruta 3, Arroyo Malo, Flores, Uruguay	NUD1752	1	19	13M + 6A	6	-	-
	Canelones, Uruguay	NUD1717	1	19	13M + 6A	4	2	-
	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil	NUD1842	4	19	13M + 6A	4	2	-
<i>Nothoscordum</i> sp.1								
	Punta Ballena, Maldonado, Uruguay	1707	3	15	9M + 6A	-	6	-
<i>Nothoscordum</i> sp.2								
	Punta Ballena, Maldonado, Uruguay	1030	1	19	13M + 6A	-	6	-

Capítulo III - A origem de *Nothoscordum bonariense* Beauverd e sua relação com as espécies do complexo *Bivalve* Guag: uma abordagem cariotípica e filogenética

Luiz Gustavo Rodrigues Souza¹, André Marques¹, Pablo Speranza², Orfeo Crosa² and Marcelo Guerra^{1*}

¹ Laboratório de Citogenética Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, s/nº, Cidade Universitária, 50372-970, Recife, PE, Brasil

² Laboratorio de Genética, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

* For correspondence. E-mail: msfguerra@hotmail.com.

Sumário

- O gênero *Nothoscordum* (Alliaceae) é composto por aproximadamente 25 espécies, que apresentam cromossomos grandes e números cromossômicos básicos hipotéticos $x = 4$ (4M) e $x = 5$ (3M + 2A). *Nothoscordum bonariense* apresenta o maior número cromossômico do gênero, $2n = 26$ (22M + 4A) e, morfológicamente, está proximamente relacionada a *N. bivalve* ($2n = 18$), *N. gaudichaudianum* ($2n = 16$) e *N. montevidense* ($2n = 8, 16$), formando com estas o complexo *Bivalve*.

- Para investigar a relação filogenética entre essas espécies e determinar a origem de *N. bonariense* foram analisadas sequências nucleares ITS e plastidiais *trnG* e foram feitas diversas análises cariotípicas, incluindo hibridização genômica *in situ* (GISH) e avaliação do conteúdo de DNA (2C) por citometria de fluxo.

- A análise filogenética baseada nas sequências ITS e *trnG* revelou que *N. bonariense* e *N. bivalve* estão proximamente relacionadas formando o clado irmão de *N. gaudichaudianum*, enquanto *N. montevidense* aparece em outro clado, demonstrando que o complexo não é monofilético. As análises cariotípicas revelaram $2n = 26$ (22M + 4A)/ $2n = 26$ (21M + 5A) em *N. bonariense*, $2n = 10$ (6M + 4A)/ $2n = 18$ (14M + 4A)/ $2n = 20$ (12M + 8A) para *N. bivalve* e $2n = 8$ (8M)/ $2n = 16$ para *N. gaudichaudianum* e *N. montevidense*. A análise de GISH revelou a existência de dois subgenomas em *N. bonariense*: 10 cromossomos marcados com a sonda do DNA genômico de *N. bivalve* e 16 com o DNA genômico de *N. gaudichaudianum*. Um indivíduo de *N. bonariense* apresentou um cariótipo rearranjado, com $2n = 26$ (21M + 5A) dos quais 11 cromossomos marcaram com o DNA genômico de *N. bivalve* e os demais com o DNA de *N. gaudichaudianum*. Os valores 2C de *N. bonariense*, *N. bivalve* e *N. gaudichaudianum* foram congruentes com o resultado da GISH.

- Esses resultados sugerem que *N. bonariense* é um alohexaploide, provavelmente derivado da fusão de um gameta com $n = 10$ de *N. bivalve* e um gameta não-reduzido com $n = 16$ de *N. gaudichaudianum*.

Palavras chave: *Nothoscordum bonariense*, complexo *Bivalve*, GISH, filogenia molecular, conteúdo de DNA

Introdução

Nothoscordum Kunth é o gênero mais diversificado dentre as Alliaceae sul-americanas, compreendendo ~25 espécies, com centro de diversidade localizado no Uruguai, norte da Argentina e sul do Brasil (Guaglianone, 1972; Fay and Chase, 1996). O gênero apresenta uma taxonomia complexa, com muitas sinônimas e difícil circunscrição de algumas espécies, causada principalmente pelo número reduzido de caracteres morfológicos diagnósticos, polimorfismos morfológicos intraespecíficos, caracteres morfológicos convergentes e hibridização interespecífica natural (Guaglianone, 1972; Crosa, 1974; Souza *et al.*, 2010).

O gênero *Nothoscordum* foi dividido por Guaglianone (1972) em duas secções, *Inodorum* e *Nothoscordum*, baseado em caracteres morfológicos. A secção *Nothoscordum* compreende a maioria das espécies do gênero, sendo morfológicamente mais diversificada e com distribuição geográfica mais ampla do que a secção *Inodorum* (Guaglianone, 1972). Um grupo particularmente interessante na secção *Nothoscordum* é o complexo *Bivalve*, formado por *N. bivalve* (L) Britton, *N. bonariense* Beauverd, *N. gaudichaudianum* Kunth, e *N. montevidense* Beauverd, que são morfológicamente afins e podem formar híbridos tanto na natureza quanto em cruzamentos artificiais (Guaglianone 1972; Crosa 1974).

A maioria dos caracteres morfológicos que delimitam as espécies desse complexo são de variação contínua, principalmente o tamanho de peças florais, e em muitos casos ocorre sobreposição nos gradientes de variação das diferentes espécies, o que torna difícil distingui-las (Guaglianone 1972). Nesse caso, é particularmente importante a utilização de informações adicionais, como por exemplo, dados filogenéticos, ecológicos, biogeográficos e citogenéticos para entender as relações entre essas taxa (Crosa, 1972). Inferências filogenéticas baseadas em uma análise combinada de regiões nucleares ITS e plastidiais

confirmaram a estreita relação entre *N. bivalve*, *N. gaudichaudianum* e *N. montevidense* sugerindo que o complexo *Bivalve* seria monofilético (Fay *et al.* 2006).

Do ponto de vista citológico, todas as espécies do gênero *Nothoscordum* se destacam por apresentarem cromossomos grandes (alguns maiores que 20 μm), o que torna o grupo favorável para análises citotaxonômicas (Souza *et al.* 2010). O gênero apresenta cariótipos formados por cromossomos metacêntricos (M) ou acrocêntricos (A) e números básicos $x = 4$ (4M) e $x = 5$ (3M + 2A), ambos com o mesmo número fundamental $NF = 8$, o que sugere que sejam relacionados entre si por fusão ou fissão cêntrica (Crosa, 1972). As espécies diploides apresentam $2n = 8$ (8M) ou $2n = 10$ (6M + 4A) e os poliploides apresentam uma extensa variação de números cromossômicos, indo de $2n = 18$ a $2n = 26$ com diferentes fórmulas cariotípicas (Guerra, 2008).

No complexo *Bivalve*, *N. gaudichaudianum* e *N. montevidense* apresentam citótipos diploides ($2n = 8$) e tetraploides ($2n = 16$) com $x = 4$, enquanto *N. bivalve* é um tetraploide com $2n = 18$ (14M + 4A) e $x = 5$ e *N. bonariense* é um hexaploide com $2n = 26$ (22M + 4A) (Crosa, 1972). A fórmula cariotípica de *N. bonariense* não se relaciona claramente a nenhum dos números básicos, mas o número de braços cromossômicos do cariótipo, ou número fundamental ($NF = 24$), sugere que poderia ter sido originada por uma fissão cêntrica em um hexaploide com $2n = 24M$ ou que seria um híbrido entre espécies com diferentes números básicos. Híbridos naturais parecem ocorrer com frequência no gênero *Nothoscordum*, como observado, por exemplo, em espécies do complexo *Inodorum* (Souza *et al.*, 2012) e em uma população de híbridos naturais entre *N. bonariense* ($2n = 26$, 22M + 4A) e *N. montevidense* ($2n = 16M$), com $2n = 21$ (19M + 3A) (Crosa 1974). Nesse último caso, a meiose dos híbridos apresentou oito bivalentes ($8M^{\text{II}}$) e cinco univalentes ($3M^{\text{I}} + 2A^{\text{I}}$), indicando a ocorrência de dois subgenomas em *N. bonariense*: um com $n = 8$ ($x = 4$), que pareou com oito

metacêntricos de *N. montevidense* formando os oito bivalentes, e outro com $n = 3M + 2A$ ($x = 5$), que originou os univalentes.

Hibridização entre espécies com diferentes números básicos é aparentemente mais raro do que entre espécies com o mesmo número cromossômico (Ramsey e Schemske 1998; Ali *et al.*, 2004; Wolny e Hasterok, 2009). Entre os alopoliplóides cultivados, por exemplo, a maioria são híbridos entre espécies de mesmo número cromossômico, como café, amendoim, tabaco, soja e algodão ou espécies com o mesmo número básico e diferentes níveis de ploidia, como trigo, aveia e algodão. Por hibridização genômica *in situ* (GISH) tem sido possível demonstrar citologicamente a origem híbrida dessas espécies. Híbridos entre espécies com diferentes números básicos como a gramínea *Millium montianum*, com um subgenoma $n = 4$ e outro $n = 7$ (Bennett *et al.* 1992) têm sido raramente demonstrados por GISH. Outras técnicas, como a citometria de fluxo (Sisko *et al.* 2003) ou análises moleculares de sequências de DNA (Vaio *et al.* 2005; Widmer e Baltisberger 1999) também auxiliam na resolução da origem de alopoliplóides. No presente trabalho, foi investigada a relação entre *N. bonariense* e as demais espécies do complexo *Bivalve* por análises cariotípicas, incluindo GISH, conteúdo de DNA nuclear usando citometria de fluxo e filogenia molecular baseada em sequências nucleares ITS1-5.8S-ITS2 e plastidial *trnG*.

Materiais e Métodos

Material

As amostras analisadas do complexo *Bivalve*, locais de coleta e dados cariotípicos são mostrados na Tabela 1. Todas as plantas investigadas foram cultivadas no jardim experimental do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco e os vouchers foram depositados no herbário Bernardo Rosengurt da Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideu, Urugui (MUFA).

Inferências filogenéticas

As análises filogenéticas do complexo *Bivalve* incluíram 27 amostras para a região ITS e 15 para o íntron plastidial *trnG*. Três outras espécies da secção *Nothoscordum* (*N. felipponei*, *N. hirtellum* e *N. pulchellum*) e uma da secção *Inodorum* (*N. arenarium*) foram incluídas como grupos externos, todas com análise cariotípica prévia (Guerra e Felix, 2000; Souza et al. 2009; 2010). A sequência ITS de *N. arenarium* foi obtida do GenBank (acesso n.º JN591624). As extrações de DNA foram realizadas de acordo com Doyle e Doyle (1987). A região ITS foi amplificada usando primers universais ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990) e a região plastidial *trnG* segundo Hamilton (1999). Todos os fragmentos amplificados foram sequenciados em ambas as direções usando o serviço de sequenciamento de DNA da Macrogen (Coreia do Sul). Os cromatogramas obtidos foram editados no *software* Sequencer versão 4.8 (GeneCodes Corp., USA). O alinhamento das sequências foi feito manualmente no Sequencer 4.8. Indels foram tratados como dados ausentes.

As análises foram realizadas com o PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003), usando uma busca heurística preliminar com *tree bisection-reconnection* (TBR) e a árvore com menor número de passos foi salva. A busca final foi conduzida a 5.000 *sequence addition replicates* (SAR) salvando somente árvores que tinham menos ou o mesmo número de passos encontrados na

busca preliminar. Uma análise de *bootstrap* foi também conduzida para 10.000 réplicas com 100 SAR dentro de cada réplica usando TBR. All sequences and alignments were submitted to Genbank for *trnG* (Accession nos. XXXX) and ITS (Accession nos. XXXX). A haplotype network was constructed based on the *trnG* matrix using the software NETWORK version 4.5.1.6 based on the standard function of Maximum Parsimony (MP) (Fluxus Technology Ltd. 2009).

Análise de GISH

Para a análise citogenética, pontas de raízes obtidas de bulbos foram pré-tratadas com colchicina 0,05% durante 24 horas a 10 °C, fixadas em etanol:ácido acético (3:1; v/v) por 2 a 24 horas a temperatura ambiente e armazenadas a –20 °C. As raízes fixadas foram lavadas em água destilada e digeridas em solução de celulase (Onozuka) 2%–pectinase (Sigma) 20% a 37 °C por 90 min. O meristema foi macerado em uma gota de ácido acético 45% e a lamínula foi removida em nitrogênio líquido.

Para a GISH, foi isolado o DNA genômico de *N. bivalve*, *N. gaudichaudianum* e *N. montevidense* (Doyle and Doyle, 1987). Entre 1 e 2 µg do DNA genômico de *N. bivalve* foi marcado por *nick translation* (Roche) com Cy3-dUTP (GE) enquanto o DNA genômico de *N. gaudichaudianum* e *N. montevidense* foram marcados com digoxigenina-11-dUTP (Life Technologies).

A GISH foi realizada como descrito por Mandakova e Lysak (2008) com pequenas modificações. A mistura de hibridização continha 50% de formamida (v/v), 10% dextran sulfato 10% (w/v), 2×SSC e 50 ng de cada sonda. As lâminas foram hibridizadas com um mix contendo DNA genômico de *N. bivalve* marcado com Cy3-dUTP e *N. gaudichaudianum*

ou *N. montevidense* marcado com digoxigenina 11-dUTP na proporção 1:1. O conjunto sonda e cromossomos foi desnaturado a 80 °C por 3 minutos e hibridizado por 18 h a 37 °C. As lavagens pós-hibridização foram realizadas em 2×SSC à temperatura ambiente por 5 min e 2×SSC a 57 °C por 20 min, chegando a uma estringência final de 76%. As sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas com anti-digoxigenina-FITC (Dako) desenvolvido em ovelha e amplificado com anti-ovelha-FITC (Roche) desenvolvida em camundongo. As lâminas foram montadas com DAPI (4 µg/mL) diluído em Vectashield (Vector) 1:1 (v/v). As lâminas foram analisadas em um microscópio de epifluorescência Leica DMLB. Imagens foram capturadas usando uma câmera Cohu CCD com o *software* Leica QFISH e depois editadas usando Adobe Photoshop CS3 versão 10.0.

Citometria de fluxo

Para a citometria de fluxo, foi preparada uma suspensão de núcleos usando folhas jovens. As amostras foram preparadas como descrito por Loureiro *et al.* (2007) usando tampão WPB. O tamanho do genoma das espécies do complexo *Bivalve* foi estimado usando um citômetro CyFlow SL flow (Partec, Görlitz, Germany). O conteúdo de DNA final para cada acesso foi calculado com base na análise de no mínimo três medições para cada indivíduo. Como controle interno foram utilizadas folhas jovens de *Vicia faba* ssp. *faba* ‘Inovec’ (2C = 26.9 pg/2C DNA; Dolezel *et al.*, 1992). O *software* FloMax (Partec) foi usado para o processamento dos dados.

Resultados e Discussão

Filogenia molecular do complexo Bivalve

O alinhamento da região ITS de 27 amostras de oito espécies do complexo mais o grupo externo da secção *Nothoscordum* compreendeu 686 pb, sendo 90 (13.1%) pare polimórficos. As espécies do complexo *Bivalve* apareceram divididas em dois subclados: um deles formado por *N. gaudichaudianum*, *N. felipponei*, *N. bonariense* e *N. bivalve* e o outro reunindo apenas *N. montevidense* e *N. pulchellum* (Fig. 1). No primeiro clado, *N. gaudichaudianum*, *N. bonariense* e *N. bivalve* formaram um agrupamento estritamente relacionado, sendo as duas últimas espécies morfologicamente muito similares, diferenciadas apenas pela presença em *N. bonariense* de rizomas, pilosidade na borda das folhas e um maior número de óvulos por lóculo (Guaglianone, 1972). No segundo clado, *N. montevidense* se agrupa junto com *N. pulchellum*, uma espécie de clima tropical, ocorrente no Nordeste brasileiro (Guerra e Felix, 2000).

Nothoscordum montevidense se diferencia das demais espécies do complexo *Bivalve* pelo número de lóculos no ovário, presença de filamentos estaminais subulados, ovário elipsoidal e, particularmente, por apresentar tépalas amarelas, ao contrário das demais que apresentam flores brancas (Guaglianone, 1972). Tépalas amarelas estão presentes ainda em *N. felipponei* e *N. hirtellum*, mas essas se diferenciam das espécies do complexo *Bivalve* por apresentar flores isoladas do tipo “uniflora” (Souza *et al.* 2010). A divergência de *N. montevidense* em relação ao clado *N. bivalve*/*N. bonariense*/*N. gaudichaudianum* sugere que o complexo *Bivalve* não seja monofilético, como proposto inicialmente por Guaglianone (1972). Todas as amostras de *N. bonariense* analisadas apresentaram exatamente a mesma sequência ITS. Similarmente, em algumas outras espécies alopoliplóides, ITS de diferentes populações revelaram pouca ou nenhuma divergência (Widmer e Baltisberger, 1999; Stappen

et al. 2002). A presença de um único tipo de sequência ITS em aloploidos é normalmente atribuído a um efeito da homogeneização da evolução em concerto (Hillis and Dixon 1991). Alternativamente, sequências ITS distintas podem não ter sido detectadas devido à estratégia de sequenciamento direto (Stappen *et al.* 2002).

As sequências do íntron plastidial *trnG* apresentou 652 bp, com somente 22 loci variáveis. As principais variações observadas foram indels (8), transições (11) e transversões T → C (3). A baixa variabilidade observada nessa região plastidial resultou em uma politomia com as análises de máxima parcimônia, mas a análise por Haplotype Network permitiu separar melhor essas espécies, embora a rede resultante ainda esteja incompletamente resolvida. As amostras de *N. bivalve* e *N. bonariense* apresentaram o mesmo haplótipo plastidial, enquanto as amostras de *N. montevidense* e *N. felipponei* apresentaram também um único haplótipo, distinto das primeiras (Fig. 1). A única amostra analisada de *N. gaudichaudianum* mostrou-se bem distinta das demais espécies, sendo mais similar ao haplótipo de *N. bonariense*/*N. bivalve*. Esses resultados sugerem uma maior proximidade filogenética entre *N. bonariense* e *N. bivalve*. Essa última, por ser diplóide, poderia ser o doador materno do aloploide *N. bonariense*.

Poliploidia, disploidias e translocações Robertsonianas recorrentes

A análise citológica de 26 amostras do complexo *Bivalve* (Tabela 1) revelou que todas possuíam cromossomos metacêntricos (M) ou acrocêntricos (A) grandes, com tamanhos variando de 21.0 µm nos metacêntricos a 7.6 µm nos acrocêntricos. As amostras de *N. bivalve* tiveram fórmula básica 3M + 2A, com diploides ($2n = 10$; 6M + 4A; NF = 8) e tetraploides ($2n = 18$; 14M + 4A e $2n = 20$; 12M + 8A; ambas com NF = 16) (Fig. 2a, f). Uma série disploide, com $2n = 18, 19, 20$, foi também demonstrada nas espécies do complexo

Inodorum (*N. gracile*, *N. nudicaule* e *N. macrostemon*), aparentemente associadas com fusões cêntricas em um tetraplóide com $2n = 20$ (Souza et al., 2012). Em ambos os casos, o número $2n = 20$ parece instável e menos bem sucedido que os citótipos com fusões cêntricas. Os números cromossômicos $2n = 10$ e $2n = 20$ não haviam sido reportados anteriormente para essa espécie (Nuñez 1972; Crosa 1972). Palomino *et al.* (1992) encontrou $2n = 18$ (14M + 4A) e $2n = 19$ (13M + 6A) em diferentes células de um mesmo indivíduo de *N. bivalve*, e atribuiu essa variação à ocorrência de fissões cêntricas, mas nenhuma variação intra-específica foi registrada na atual análise. Uma variação numérica similar intra-individual havia sido reportada para *N. gracile*, mas não foi confirmada após extensa amostragem (Souza et al., 2012). *Nothoscordum gaudichaudianum* e *N. montevidense* tiveram fórmula básica 4M, também com diploides ($2n = 8M$) e tetraploides ($2n = 16M$) (Fig. 2b-d). Além disso, em *N. montevidense* foi encontrado um pentaplóide com $2n = 20$ (20M) e um octoploide com $2n = 32$ (32M) (Fig. 2e). As amostras de *N. bonariense* foram sempre hexaploides com $2n = 26$, mas três apresentaram a fórmula cariotípica normal (22M + 4A) e uma teve fórmula cariotípica alterada (21M + 5A), com um cromossomo acrocêntrico extra do mesmo tamanho que os demais e falta de um metacêntrico (Fig. 2h).

A árvore filogenética da Fig. 1 revela não haver uma perfeita correlação entre números básicos e os agrupamentos cladísticos. *Nothoscordum montevidense*, com $x = 4$ ($2n = 8$ e 16), aparece como grupo irmão de *N. pulchellum*, com $x = 5$ ($2n = 10$, 18 e 20), enquanto as demais espécies do complexo Bivalve, incluindo *N. gaudichaudianum* com $x = 4$, aparecem com grupo irmão de *N. felipponei* com $x = 5$. Essa aparente incongruência, tem sido também observada em outros gêneros como *Nicotiana* (Aoki e Ito, 2000), *Melampodium* (Blösch *et al.* 2009) e *Aristolochia* (Ohitoma *et al.* 2006) e revela que, em alguns casos, o número cromossômico isoladamente pode confundir a reconstrução filogenética. No caso do complexo *Bivalve*, essa variabilidade de números cromossômicos pode se dever a uma

frequência relativamente alta de translocações Robertsonianas em espécies de *Nothoscordum* (ver Souza et al. 2009; 2012), sugerindo que a fórmula cariotípica 4M pode ter surgido mais de uma vez a partir do cariótipo básico $x = 5$ (3M + 2A) por fusão cêntrica.

A análise de GISH revela dois subgenomas em N. bonariense

Quando o cariótipo de *N. bonariense* foi investigado por GISH dois diferentes subgenomas foram reconhecidos (Fig. 3). Metáfase de *N. bonariense* hibridizadas com o DNA genômico de *N. bivalve* marcado com Cy3 mostraram todos os cromossomos uniformemente corados e com o DNA genômico de *N. gaudichaudianum* marcado em FITC apenas 16 cromossomos marcaram mais fortemente. A sobreposição dessas duas imagens revela bem essa diferenciação (Fig. 3a) e o kariograma da mesma célula mostra um subgenoma com 16M, provavelmente derivado de *N. gaudichaudianum*, e outro com 6M + 4A, provavelmente originário de *N. bivalve* (Fig. 3a, a').

O indivíduo de *N. bonariense* com o cariótipo 21M + 5A parecia ter uma deleção de um braço de um metacêntrico, transformando o cariótipo 22M + 4A em 21M + 5A. Entretanto, a análise de GISH revelou 15 cromossomos metacêntricos marcados com o DNA genômico de *N. gaudichaudianum* e 11 cromossomos marcados com a sonda de *N. bivalve*. Isso indica se tratar de um rearranjo mais complexo envolvendo uma trissomia de um acrocêntrico relacionado a *N. bivalve* e uma monossomia de um metacêntrico relacionado a *N. gaudichaudianum*. Monotrissômicos desse tipo são raros na natureza, mas indivíduos isolados com aneuploidias complexas têm sido observados em algumas outras espécies (Brighton, 1973; Soltis e Soltis, 2000), e parecem ser uma consequência do genomic shock causado em decorrência da hybrid speciation (Soltis e Soltis, 2009). Alternativamente, como a meiose de *N. bonariense* apresenta várias irregularidades (Crosa, 1975) esse cariótipo atípico pode ser resultante da fusão de um ou dois gametas aneuploides.

Para verificar se *N. montevidense*, com o mesmo número cromossômico e NF de *N. gaudichaudianum*, teria a mesma hibridização preferencial com o subconjunto cromossômico com 16M de *N. bonariense*, o DNA de *N. montevidense* marcado com FITC foi hibridizado *in situ* em metáfases de *N. bonariense* e contrastado com o DNA genômico de *N. bivalve* marcado com Cy3. Nesse caso, 16 cromossomos apresentaram marcação com DNA genômico de *N. montevidense*, mas com muito mais fraca intensidade (Fig. 3c). Curiosamente, vários desses 16 cromossomos apresentaram marcação mais intensa na metade ou no terço terminal de cada braço cromossômico, enquanto a marcação com DNA de *N. gaudichaudianum* apresentou marcação uniforme. Como em geral há uma correlação positiva entre a intensidade de hibridização de uma sonda genômica de uma determinada espécie e sua similaridade genética com o conjunto cromossômico marcado (Markova e Viskot, 2007; Chase *et al.*, 2003), é pouco provável que *N. montevidense* seja o parental envolvido na origem do subgenoma com $x = 4$ de *N. bonariense*.

O tamanho dos genomas corrobora a origem alopoliplóide de N. bonariense

A Tabela 2 mostra o conteúdo de DNA observado para cada uma das amostras investigadas nas quatro espécies, com coeficiente de variação. Os tamanhos dos genomas diploides de *N. gaudichaudianum* ($2n = 8M$) e *N. bivalve* ($2n = 10$; $6M + 4A$) foram muito similares ($2C = 29,73$ e $30,24$ pg, respectivamente) enquanto *N. montevidense* apresentou um genoma maior, de $35,54$ pg. Nos tetraploides dessas três espécies houve uma duplicação exata do conteúdo de DNA apenas em *N. gaudichaudianum* enquanto nas outras duas espécies, foi observada uma redução no conteúdo de DNA nos tetraploides em relação ao esperado baseado nos valores dos diplóides (ver Tabela 2). Redução no tamanho do genoma em poliploides é um fenômeno frequente e pode estar relacionado a mecanismos de “diploidização” e estabilização dos poliploides (Ozkan *et al.* 2003; Bennett e Leitch 2004).

Em *N. bonariense*, foi observado um conteúdo de DNA $2C = 83,84$ pg nos indivíduos com o cariótipo normal, enquanto o indivíduo com o cariótipo $21M + 5A$ apresentou um valor um pouco menor (81,49 pg). Essa diminuição no conteúdo de DNA de 2,4 pg foi bem próxima ao valor médio de um braço cromossômico dessa espécie (1,8 pg).

Tanto a análise filogenética quanto a GISH sugerem que *N. montevidense* é um genoma mais afastado das demais espécies do complexo *Bivalve*. Seu conteúdo de DNA nas amostras diplóides também revela uma maior diferenciação em relação aos genomas de *N. bivalve* e *N. gaudichaudianum*. O hexaploide *N. bonariense* apresentou um tamanho genômico um pouco mais alto em relação ao esperado para a fusão de *N. bivalve* e *N. gaudichaudianum*. Isso pode se dever a oscilações no tamanho do genoma em decorrência da poliploidia (Ozkan *et al.* 2003) ou a variação intraespecífica nos genomas das três espécies envolvidas (Jakob *et al.* 2004). Como a origem de poliploides está geralmente associada à formação de gametas não-reduzidos (Soltis e Soltis, 2009), a ocorrência de poliploides intraespecíficos em *N. bivalve*, *N. gaudichaudianum* e *N. montevidense* pode indicar que a formação de gametas não-reduzidos seja relativamente frequente nas espécies desse complexo o que poderia ter propiciado a formação do alopoliplóide *N. bonariense*.

Conclusões

As espécies *N. bonariense*, *N. bivalve* e *N. gaudichaudianum* são filogeneticamente muito próximas e compartilham uma série de caracteres morfológicos e citogenéticos, além de conteúdos de DNA por conjunto monoplóide similares. A suposta origem alopoliplóide de *N. bonariense* (ver Crosa 1974), foi plenamente confirmada, sugerindo *N. bivalve* com $x = 5$ e *N. gaudichaudianum* com $x = 4$ como prováveis ancestrais. Os dados de sequências de DNA plastidial sugerem que *N. bivalve* seria o parental materno mais provável desse híbrido, em conformidade com os dados morfológicos (Guaglianone 1972). Por outro lado, *N.*

montevidense foi filogeneticamente mais distante das demais espécies do complexo *Bivalve* em todas as análises, sugerindo que esta espécie deve ser excluída do complexo *Bivalve* e que sua posição filogenética dentro da secção *Nothoscordum* seja revista.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências brasileiras Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida a L.G.R.S.

Referências

- Aoki A, Ito M. 2000.** Molecular phylogeny of *Nicotiana* (Solanaceae) based on the nucleotide sequence of the *matK* Gene. *Plant Biology* **2**: 316-324.
- Blösch C, Weiss-Schneeweiss H, Schneeweiss GM, Barfuss MHJ, Rebernig CA, Villaseñor JL, Stuessy TF. 2009.** Molecular phylogenetic analyses of nuclear and plastid DNA sequences support dysploid and polyploid chromosome number changes and reticulate evolution in the diversification of *Melampodium* (Millerieae, Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **53**: 220-233.
- Brighton CA, Mathew B, Marchant CJ. 1973.** Chromosome counts in the genus *Crocus* (Iridaceae). *Kew Bulletin* **28**:451-464.

- Chase MW, Knapp S, Cox AV, Clarkson JJ, Butsko Y, Joseph J, Savolainen V, Parokonny AS. 2003.** Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany* **92**: 107-127.
- Chester N, Leitch AR, Soltis PS, Soltis DE. 2010.** Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (Polyploidy/Hybridisation). *Genes* **1**:166-192.
- Crosa O. 1972.** Estudios cariología en el género *Nothoscordum* (Liliaceae). *Boletín de la Facultad de Agronomía de Uruguay* **122**: 3-8.
- Crosa O. 1974.** Un híbrido natural en el género *Nothoscordum* (Liliaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **26**: 471-477.
- Crosa O. 2004.** Segunda especie y justificación del género *Zoellnerallium* (Alliaceae). *Darwiniana* **42**: 165-168.
- Datson PM, Murray BG. 2006.** Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Research* **14**: 845-857.
- Dolezel J, Sgorbati S, Lucretti S. 1992.** Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* **85**: 625-631.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin of Botanical Society of America* **19**: 11-15.

- Fay MF, Rudall PJ, Chase M. 2006.** Molecular studies of subfamily Gilliesioideae (Alliaceae). *Aliso* **22**: 367-371.
- Guaglianone EA. 1972.** Sinopsis de las especies de *Ipheion* Raf. y *Nothoscordum* Kunth (Liliáceas) de Entre Rios y regiones vecinas. *Darwiniana* **17**: 159-240.
- Guerra M, Felix LP. 2000.** O cariótipo de *Nothoscordum pulchellum* (Alliaceae) com ênfase na heterocromatina e sítios de DNAr. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **35**: 283-289.
- Guerra M. 2008.** Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research* **120**: 339-350.
- Hamilton MB. 1999.** Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic region with intraespecific variation. *Molecular Ecology* **8**: 513-525.
- Hillis D. M., Dixon M. T. 1991.** Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* **66**: 411-446.
- Jakob SS, Meister A, Blattner FR. 2004.** Considerable genome size variation of *Hordeum* species (Poaceae) is linked to phylogeny, life form, ecology, and speciation rates. *Molecular Biology and Evolution* **21**: 860-869.
- Kalendar R, Tanskanen J, Chang W, Antonius K, Sela H, Peleg O, Schulman AH. 2008.** *Cassandra* retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **105**: 5833-5838.

- Laureto PJ, Barkman TJ. 2011.** Nuclear and chloroplast DNA suggest a complex single origin for the threatened allopolyploid *Solidago houghtonii* (Asteraceae) involving reticulate evolution and introgression. *Systematic Botany* **36**: 209-226.
- Leitch IJ, Bennett MD. 2004.** Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 651-663.
- Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C. 2007.** Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Annals of Botany* **100**: 875-888.
- Mahelka V, Suda J, Jarolimova V, Travnicek P, Krahulec F. 2005.** Genome size discriminates between closely related taxa *Elytrigia repens* and *E. intermedia* (Poaceae : Triticeae) and their hybrid. *Folia Geobotanica* **40**: 367-384.
- Mandakova T, Lysak MA. 2008.** Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in $x = 7$ crucifer species (Brassicaceae). *Plant Cell* **20**: 2559-2570.
- Marasek A, Hasterok R, Wiejacha K, Orlikowska T. 2004.** Determination by GISH and FISH of hybrid status in *Lilium*. *Hereditas* **140**: 1-7.
- Markova M, Vyskot B. 2009.** New horizons of genomic *in situ* hybridization. *Cytogenetic and Genome Research* **126**: 368-375.
- Matoba H, Soejima A, Hoshi Y. 2007.** Identification of parental genomes and genomic organization in *Aster microcephalus* var. *ovatus*. *Journal of Plant Research* **120**: 585-593.

- Murad L, Lim KY, Christopodoulou V, Matyasek R, Lichtenstein CP, Kovarik A, Leitch AR. 2002.** The origin of tobacco's T genome is traced to a particular lineage within *Nicotiana tomentosiformis* (Solanaceae). *American Journal of Botany* **89**: 921-928.
- Nuñez O, Frayssinet N, Rodríguez RH. 1972.** Los cromosomas de *Nothoscordum* Kunth (Liliaceae). *Darwiniana* **17**: 243-245.
- Ohi-Toma T, Sugawara T, Murata H, Wanke S, Neinhuis C, Murata J. 2006.** Molecular phylogeny of *Aristolochia* sensu lato (Aristolochiaceae) based on sequences of *rbcL*, *matK*, and *phyA* genes, with special reference to differentiation of chromosome numbers. *Systematic Botany* **31**: 481-492.
- Ozkan H, Tuna M, Arumuganathan K. 2003.** Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops-Triticum*) Group. *Journal of Heredity* **94**: 260-264.
- Palomino G, Romo V, Ruenes R. 1992.** Fisiones céntricas en cromosomas metacéntricos de *Nothoscordum bivalve* (Alliaceae) do México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **52**: 121-124.
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A. 2002.** Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* **161**: 1661-1672.

- Rauscher JT, Doyle JJ, Brown AHD. 2004.** Multiple origins and nrDNA internal transcribed spacer homeologue evolution in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) allopolyploid complex. *Genetics* **166**: 987-998.
- Sisko M, Ivancic A, Bohanec B. 2003.** Genome size analysis in the genus *Cucurbita* and its use for determination of interspecific hybrids obtained using the embryo-rescue technique. *Plant Science* **165**: 663-669.
- Skalická K, Lim KY, Matyasek, Koukalová B, Leitch AR, Kovarik A. 2003.** Rapid evolution of parental rDNA in a synthetic tobacco allotetraploid line. *American Journal of Botany* **90**: 988-996.
- Soltis PS, Soltis DE. 2009.** The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 561-588.
- Souza LGR, Crosa O, Guerra M. 2010.** Karyological circumscription of *Ipheion* Rafinesque (Gilliesioideae, Alliaceae). *Plant Systematics and Evolution* **287**: 119-127.
- Souza LGR, Crosa O, Winge H, Guerra M. 2009.** The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): A populational and cytomolecular analysis. *Genetics and Molecular Biology* **32**: 111-116.
- Srisuwan S, Sihachakr D, Siljak-Yakovlev S. 2006.** The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Science* **171**: 424-433.
- Stappen JV, De Laet J, Gama-López S, Van Campenhout S, Volckaert G. 2002.** Phylogenetic analysis of *Stylosanthes* (Fabaceae) based on the internal transcribed

spacer region (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Plant Systematic and Evolution* **234**:27-51.

Swofford DL. 2003. PAUP*: Phylogenetic Analyses Using Parsimony (* and Other Methods), Version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts

Vaio M, Speranza P, Valls J F, Guerra M, Mazzella C. 2005. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany* **96**: 191-200.

Wanzenböck E M, 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* **11**: 1007-1016.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Gelfand D, Smitsky J, White T. (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego, CA 315-322.

Widmer A, Baltisberger M. 1999. Molecular evidence for allopolyploid speciation and a single origin of the narrow endemic *Draba ladina* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **86**: 1282-1289.

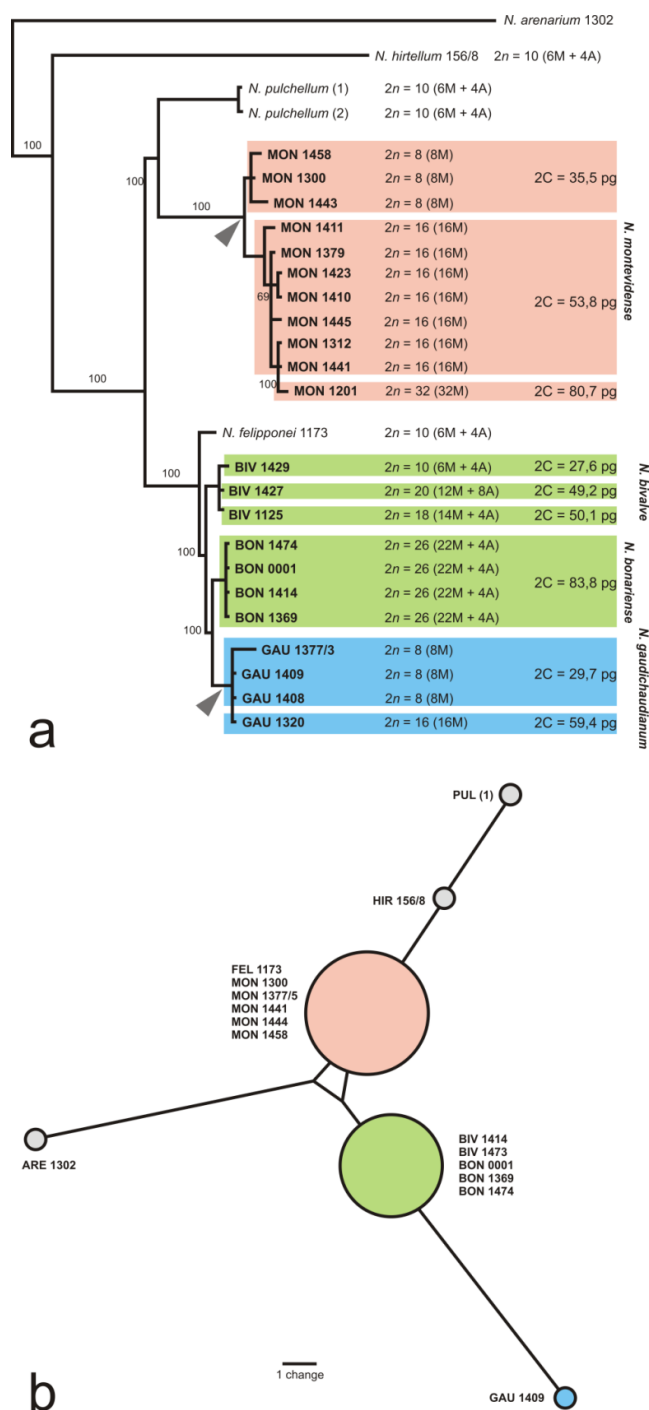


Fig. 1 – Relações filogenéticas entre as espécies do complexo *Bivalve* baseadas na análise de Máxima Parcimônia da região nuclear ITS (**a**) e uma análise de Haplotype Network baseada em sequências plastidiais *trnG* (**b**). Em **a** números acima dos ramos correspondem ao valor de *bootstrap* e cabeças de seta indicam mudanças de número básico de $x = 5$ (3M + 2A) para $x = 4$ (4M). Números cromossômicos são representados por $2n$ e conteúdo de DNA por valores $2C$.

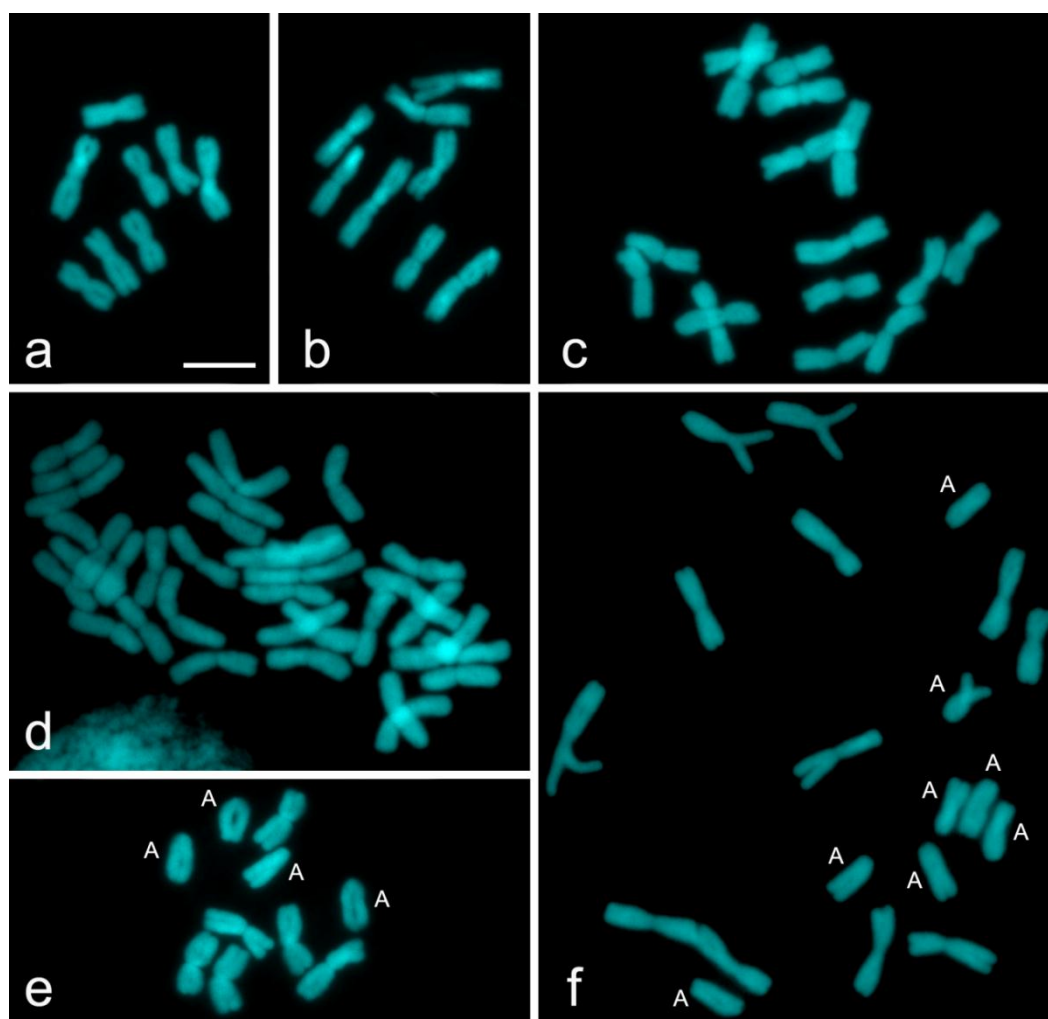


Fig. 2 – Número e morfologia cromossômica das três espécies do complexo *Bivalve*. **a**, *Nothoscordum gaudichaudianum* diploide com $2n = 8M$; **b-d** *N. montevidense* diploide com $2n = 8M$ (**b**), tetraploide com $2n = 16M$ (**c**) e octaploide com $2n = 32M$ (**d**); **e-f** *N. bivalve* diploide com $2n = 10$ ($6M + 4A$) (**e**) e tetraploide com $2n = 20$ ($12M + 8A$) (**f**). A = cromossomos acrocêntricos. Barra em **a** = $10\ \mu m$.

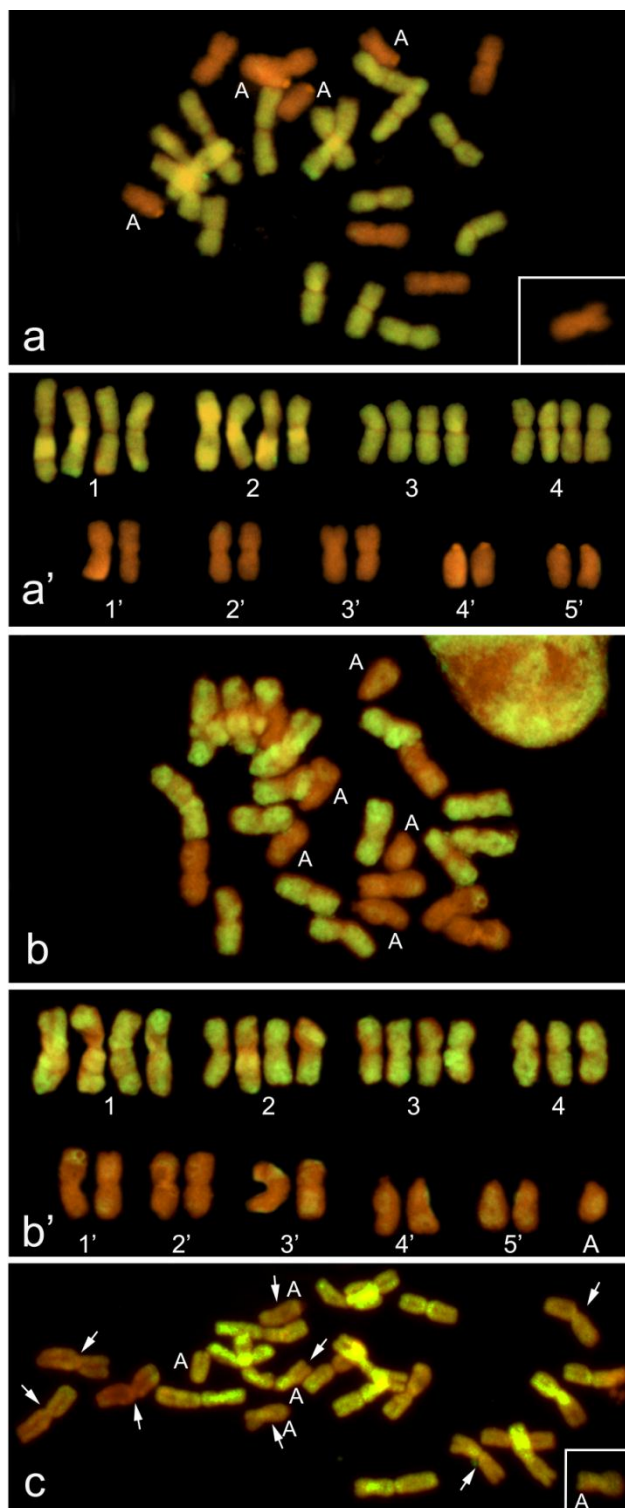


Fig. 3 – Cromossomos de *Nothoscordum bonariense* hibridizados com a sonda genômica de *N. bivalve* (Cy3, laranja) e *N. gaudichaudianum* ou *N. montevidense* (FITC, verde). **a-a'** Metáfase e cariograma com $2n = 26$ (22M + 4A) mostrando 10 cromossomos (6M + 4A) marcados com a sonda de *N. bivalve* e 16 (16M) com a sonda

de *N. gaudichaudianum*. **b-b'** Metáfase e kariograma com $2n = 26$ (21M + 5A) hibridizada com DNA genômico de *N. bivalve* (Cy3, laranja) e *N. gaudichaudianum* (FITC, verde). **c**, Metáfase com $2n = 26$ (21M + 5A) hibridizada com DNA genômico de *N. bivalve* (Cy3, laranja) e *N. montevidense* (FITC, verde) A = acrocêntricos. Setas em **c** apontam para cromossomos mais fracamente hibridizados com a sonda genômica de *N. montevidense*.

Tabela 1. Amostras analisadas do complexo Bivalve com suas respectivas procedências, números cromossômicos ($2n$), fórmula cariotípica e número fundamental (NF).

Espécie	Procedência	População	$2n$	Fórmula cariotípica	NF
<i>N. bonariense</i> Beauverd	Pajas Blancas,	BON 0001	26	22M + 4A	48
	Montevideu, Uruguai				
	Faculdade de Agronomia,	BON 0002	26	22M + 4A	48
	Montevideu, Uruguai				
	Ruta 8, arroyo Taquary,	BOM 1369	26	22M + 4A	48
	Uruguai				
	Ruta 13 km 230, arroyo	BON 1414	26	22M + 4A	48
	India Muerta, Rocha,				
	Uruguai				
	Soriano, Uruguai	BON 1474	26	22M + 4A	48
	Montevideu, Uruguai	BON 1715	26	21M + 5A	47
<i>N. bivalve</i> (L.) Britton	Sierra de Mahoma, San	BIV 1349	10	6M + 4A	16
	Jose, Uruguai				
	Bella Unión, Artigas,	BIV 1429	10	6M + 4A	16
	Uruguai				
	-	BIV 1125	18	14M + 4A	32
	Ruta 13, Km 230, Dept.	BIV 1414	18	14M + 4A	32
	Rocha, Uruguay				
	Texas, USA	BIV 1473	18	14M + 4A	32
	Arroyo Tira Poncho, Ruta	BIV 1427	20	12M + 8A	32
	30 km 38, Uruguay-				
<i>N. gaudichaudianum</i>	Ruta 8 km 358, Serro	GAU 1408	8	8M	16

Kunth	Largo, Uruguay				
	-	GAU 1409	8	8M	16
	Ruta 3 km 175, Uruguay	GAU	8	8M	16
		1377/3			
	Arrojo Comvoy, 33, Uruguay	GAU 1320	16	16M	32
<i>N. montevidense</i> Beauverd	Montevideu, Uruguay	MON 1300	8	8M	16
	-	MON 1458	8	8M	16
	Ruta 5, Florida, Uruguay	MON 1443	8	8M	16
	Cerro San Antonio, Maldonado, Uruguay	MON 1312	16	16M	32
	Ruta 3 km 175, Uruguay	MON		16M	32
		1377/5			
	Cerro Batoví, Rivera, Uruguay	MON 1441	16	16M	32
	Arroyo Quebracho, Paysandú, Uruguay	MON 1423	16	16M	32
	Arroyo Comvoy, 33, Uruguay	MON 1410	16	16M	32
	Rura 27 km 39, Uruguay	MON 1445	16	16M	32
	Ruta 16, Rocha, Uruguay	MON 1411	16	16M	32
	Ruta 30 km 220, Uruguay	MON 1444	16	16M	32
	Pandule, Rio Queguay, Uruguay	MON 1379	16	16M	32
	Ruta 3 km 175, Uruguay	MON	20	20M	40
		1377/8			
	Argentina	MON 1201	32	32M	64

Tabela 2. Números cromossômico ($2n$) e estimativas de tamanho do genoma ($2C$) para as espécies do complexo *Bivalve*.

Espécie ($2n$)	Procedência	Ploidy level	$2C$ (pg)	C.V. (%)
<i>N. bivalve</i> (10)	Bella Unión, Artigas, Uruguai	2x	$27,61 \pm 1,8$	3,80
(18)	-	4x	$50,10 \pm 1,2$	2,30
(20)	-	4x	$49,17 \pm 1,66$	3,39
<i>N. bonariense</i> (26)	Montevideu, Uruguai	6x	$83,84 \pm 2,8$	3,33
(26)	-	6x	$81,49 \pm 1,8$	2,23
<i>N. gaudichaudianum</i> (8)	Ruta 8 km 358, Serro Largo, Uruguai	2x	$29,73 \pm 1,14$	3,85
(16)	Arrojo Comvoy, 33, Uruguai	4x	$59,37 \pm 2,83$	4,77
<i>N. montevidense</i> (8)	Montevideu, Uruguai	2x	$35,54 \pm 1,42$	4,01
(16)	Ruta 30 km 94, Arroyo 3 cruces, Uruguai	4x	$53,80 \pm 2,37$	4,43
(32)	Argentina	8x	$80,70 \pm 1,58$	3,17

CV = Coeficiente de variação.

Capítulo IV - **Variabilidade de sequências teloméricas em espécies de *Ipheion* e *Nothoscordum* (Alliaceae): o papel da dispersão equilocal de DNA repetitivo na origem de sítios teloméricos ectópicos**

Luiz Gustavo R Souza · Andre L. L. Vanzela · Orfeo Crosa · Marcelo Guerra*

LGR Souza · M Guerra (*)

Laboratory of Plant Cytogenetics, Department of Botany, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

e-mail: msfguerra@hotmail.com

O Crosa

Laboratory of Genetics, Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, University of the Republic, Montevideo, Uruguay.

ALL Vanzela

Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

Abreviações

PNA	Peptide nucleic acid
ATSB	Telomere <i>Arabidopsis</i> -type
HUSB	Telomere human-type
TTSB	Telomere <i>Tetrahymena</i> -type
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
rDNA	Ribosomal DNA
FN	Fundamental number

Resumo Na subfamília Gilliesioideae os gêneros *Nothoscordum* e *Ipheion* se destacam por apresentarem dois extremos da variação disploide com predomínio de cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, respectivamente. Esta subfamília é a única dentre as Alliaceae que apresenta dois microssatélites teloméricos distintos (TTAGGG)_n e (TTTAGGG)_n e uma evolução cariotípica claramente relacionada a translocações Robertsonianas. No presente trabalho foi investigada a distribuição desses motivos teloméricos por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) nos dois gêneros citados visando estudar a relação entre sítios teloméricos ectópicos e fusões cêntricas. A análise por FISH revelou que as duas variantes da sequência telomérica marcaram igualmente nos terminais cromossômicos. As análises de diferentes clones contendo fragmentos teloméricos mostraram que essas variantes se encontram organizadas em blocos intercalados. Todas as espécies analisadas apresentaram sítios teloméricos exclusivamente nos terminais cromossômicos, exceto *N. arenarium*, *N. gracile* e *N. macrostemon*, que apresentaram sítios teloméricos intersticiais (ITS) na região proximal dos cromossomos. Esses ITSs podem ser indicativos de presença accidental de um DNA repetitivo semelhante ao DNA telomérico, transferência accidental de DNA telomérico dos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos para a região centromérica dos metacêntricos ou presença de remanescentes teloméricos de fusões cêntricas. Essas diferentes hipóteses são discutidas bem como sobre a existência das duas variantes teloméricas co-localizadas nos terminais cromossômicos dessas espécies.

Palavras chave: *Ipheion*, *Nothoscordum*, DNA telomérico, translocação Robertsoniana, sítios teloméricos ectópicos.

Introdução

Os telômeros são estruturas localizadas na região terminal do cromossomo eucariótico, sendo caracterizados por apresentar uma sequência de DNA própria, um conjunto de proteínas específicas e uma estrutura tridimensional em *t-loop* (revisado por McKnight e Shippen 2004). As principais funções atribuídas aos telômeros são: 1) prevenir a fusão *end-to-end* dos cromossomos; 2) interagir com proteínas do envelope nuclear, atuando na organização dos cromossomos no núcleo interfásico; 3) evitar o encurtamento da molécula de DNA, causada pela replicação incompleta do terminal 5' pela DNA polimerase durante a fase S do ciclo celular (Siroky 2008). Em várias espécies, a sequência de DNA telomérico é também encontrada em outras regiões cromossômicas além dos terminais, aparentemente não associada com funções teloméricas canônicas (Meyne 1990). Em *Vicia faba* e *Eleocharis subarticulata* sítios teloméricos ectópicos estavam aparentemente associados com fusão cromossômica (Schubert et al. 1992; Silva et al. 2006), todavia em muitas outras espécies esses não parecem associados com rearranjos cromossômicos (Cox et al. 1993; Meyne et al. 1990; Shubert et al. 1992).

A sequência de DNA telomérico é altamente conservada em diferentes grupos de eucariotos. Em plantas, o microsatélite (T3AG3)*n*, originalmente isolado de *Arabidopsis thaliana* (Richards e Ausubel 1988), está presente na maioria das espécies (Cox et al. 1993; Fuchs et al. 1995). Entretanto, a perda do telômero tipo-*Arabidopsis* (ATSB) foi demonstrada em 16 espécies de 12 famílias em um clado da ordem Asparagales (Adams et al. 2001). Um trabalho subsequente mostrou a ocorrência nesse subclado de uma sequência de DNA telomérico distinta, (T2AG3)*n* idêntica à previamente reportada em humanos (HUSB) e outros vertebrados (Sýkorová et al. 2003). Algumas espécies desse grupo, além do motivo HUSB, apresentaram

manutenção do ATSB, sugerindo que tenha ocorrido uma substituição apenas parcial da sequência original (Fajkus et al. 2005; Sýkorová et al. 2006a). Em poucas espécies, como por exemplo *Drosophila melanogaster* e *Allium cepa*, o DNA microssatélite que forma os telômeros foi substituído por outros tipos de sequências repetitivas, incluindo retrotransposons (Abad et al. 2004) e DNAr 45S (Pich et al. 1996; Pich e Shubert 1998), respectivamente.

A família Alliaceae se destaca por apresentar uma variabilidade de *repeats* teloméricos, que podem ser ATSB e/ou HUSB enquanto em *Allium* nenhum dos microssatélites teloméricos conhecidos foi observado (Sýkorová et al. 2006b). Dentro desse grupo a subfamília Gilliesioideae (Fay e Chase, 1996) se destaca por ser a única com evolução cariotípica claramente relacionada a translocações Robertsonianas (Jones 1998), o que a torna excelente modelo para verificar a relação entre DNA telomérico e fusões cêntricas. Nessa subfamília o gênero mais diversificado é *Nothoscordum*, com ~25 espécies (Guaglianone 1972). Essas espécies apresentam um número variável de cromossomos metacêntricos (M) ou acrocêntricos (A), dois números básicos, $x = 4$ (4M) e $x = 5$ (3M + 4A), e séries disploides com $2n = 8$ (8M) e $2n = 10$ (6M + 4A) nos diploides, $2n = 16$ (16M), $2n = 18$ (14M + 4A), $2n = 19$ (13M + 6A) e $2n = 20$ (12M + 8A) nos tetraploides e $2n = 24$ (24M) e $2n = 26$ (22M + 4A) nos hexaploides (Crosa 1972). Em todos o número de braços cromossômicos ou número fundamental (NF) é sempre oito ou seus múltiplos.

Poucas espécies da subfamília Gilliesioideae apresentam cariótipos com predomínio de cromossomos acrocêntricos, provavelmente originados por múltiplas fissões cêntricas (Souza et al. 2010). Diferentemente de *Nothoscordum*, *Ipheion*, um pequeno gênero proximamente relacionado, apresenta cromossomos menores, predominantemente acrocêntricos com duas espécies apresentando $NF = 7$ (*I.*

tweedieanum $2n = 14A$ e *I. uniflorum* $2n = 2SM + 10A$) e uma com $NF = 9$ (*I. recurvifolium*, $2n = 20$) (Souza et al. 2010). Os sítios de DNAr 45S em *Ipheion* e *Nothoscordum* são observados na maioria dos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos (Guerra e Felix 2000; Souza et al. 2009, 2010). A localização preferencial pode estar relacionada a eventos de fissão cêntrica (Hall e Parker 1995), tornando esses gêneros importantes alvos para a análise da relação entre translocação Robertsoniana e RONS.

No presente trabalho foram investigados a distribuição cromossômica dos sítios de DNA telomérico em espécies de *Nothoscordum* e *Ipheion* focando especialmente na relação entre os sítios pericêntricos e as hipóteses de evolução desse grupo por fissão-fusão cêntrica. Como as sequências teloméricas ATSB e HUSB têm sido reportadas nesse grupo (Fajkus et al. 2005; Sýkorová et al. 2006b) a distribuição cromossômica de ambos os *repeats* teloméricos e a organização dessas sequências em cinco clones contendo fragmentos teloméricos foram analisados. Por fim, foi investigada também a substituição do DNA telomérico por sequências de DNAr 45S nos terminais cromossômicos, como reportada em *Allium* (Pich et al. 1996).

Material e Métodos

Material

Foram analisadas nove diferentes espécies do gênero *Nothoscordum* e três do gênero *Ipheion*. As espécies analisadas, locais de coletas, dados cariotípicos e distribuição do DNA telomérico são apresentados na Tabela 1. Todas as espécies incluídas nessa análise tiveram seus cariótipos previamente analisados (Souza et al. 2009, 2010; em preparação). Vouchers foram depositados nos herbários MUFA (Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguai) e UFP (Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil).

Para a análise citogenética pontas de raízes obtidas de bulbos foram pré-tratadas com colchicina 0,05%, durante 24 horas a 10 °C, fixadas em etanol:ácido acético (3:1; v/v) por 2 a 24 horas a temperatura ambiente e armazenadas a –20 °C. As raízes fixadas foram lavadas em água destilada e digeridas em solução de celulase (Onozuka) 2% (w/v)–pectinase (Sigma) 20% (v/v) a 37 °C por 90 min. O meristema foi macerado em uma gota de ácido acético 45% e a lamínula foi removida em nitrogênio líquido.

Detecção por FISH dos telômeros e sítios de DNAr 45S

A sequência telomérica HUSB foi localizada usando uma sonda de PNA para $(T_2AG_3)_n$ marcada com FITC (Kit PNA/Telomere probe, Dako), seguindo instruções do

fabricante. As lâminas foram contrainformadas com DAPI/Vectashild® e depois analisadas em um microscópio de epifluorescência Leica DMLB. Imagens foram capturadas usando uma câmera Cohu CCD com o *software* Leica QFISH e depois editadas usando Adobe Photoshop CS3 versão 10.0.

O DNA telomérico ATSB (T₃AG₃)_n e os sítios de DNAr 45S foram detectados usando como sonda um clone de 400 bp (pAtT4) marcado com Cy3-dUTP (GE) e um clone de 6.5 kb 18S-5.8S-25S (R2) marcado com digoxigenina-11-dUTP, ambos de *Arabidopsis thaliana*, respectivamente. Ambas as marcações foram feitas por *nick translation* (Roche). A sonda do DNAr 45S foi detectada com anticorpo anti-digoxigenina conjugada com FITC (Roche) desenvolvido em ovelha e amplificada com anticorpo anti-ovelha conjugado com FITC (Dako) desenvolvido em camundongo. O mix de hibridização continha 50% de formamida, 10% de dextran sulfato, 2× SSC e 5 ng/μl de cada sonda. As lâminas foram desnaturadas a 75 °C por 3 min. As lavagens pós-hibridização foram realizadas para uma estringência final de 76%. As imagens das melhores células foram capturadas como descrito previamente.

Análise dos telômeros por PCR

A amplificação do DNA telomérico por PCR foi realizada segundo Ijdo et al. (1991), usando primers ATSB e HUSB. Para checar a co-localização desses diferentes *repeats* teloméricos foram realizadas PCRs alternando primers forward (*f*) and reverse (*r*) dos dois tipos (ATSB_f × HUSB_r ou HUSB_f × ATSB_r) usando como template o DNA genômico de *N. gracile*. A reação de PCR foram realizadas em volumes de 100 μl contendo KCl 50 mM, Tris-HCl (pH. 8.3) 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 200 μM de cada dNTP, 0.1 μM de cada primer e 2 unidades de *Taq* polimerase. A amplificação consistiu

de 10 ciclos iniciais de 1 min a 94 °C, 30 sec a 55 °C e 1 min a 72 °C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 sec a 60 °C e 90 sec a 72 °C com um passo final de 5 min a 72 °C. Depois da amplificação 5 µl de cada produto da PCR foi analisado em gel de agarose por eletroforese.

Clonagem e sequenciamento

O produto da amplificação usando primers ATSB e HUSB alternados foi um fragmento de ~500 pb, posteriormente clonado em vetor pMOSBlue usando pMOSBlue Blunt-Ended Cloning Kit (Amersham, Buckinghamshire, UK). Após a seleção com IPTG e X-gal, as colônias recombinantes foram diretamente amplificadas por PCR usando primers M13. Todos os fragmentos clonados foram sequenciados em ambas as direções pela Macrogen Inc. (Coreia do Sul). Os cromatogramas obtidos foram editados no *software* Sequencer version 4.8 (GeneCodes Corp., Ann Arbor, Michigan, USA) onde foi verificada a localização dos *repeats* teloméricos ATSB e HUSB. As sequências dos cinco clones analisados foram depositadas no genbank.

Resultados

Distribuição cromossômica das sequências teloméricas

Os números cromossômicos, fórmulas cariotípicas e número/posição de sítios de DNAr 45S de todas as espécies analisadas estão apresentadas na Tabela 1 e coincidem com os dados prévios (Souza et al. 2009, 2010). De uma maneira geral as espécies de *Nothoscordum* e *Ipheion*

apresentaram sítios de DNAr 45S nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos. Adicionalmente, nas espécies da secção *Nothoscordum* esses sítios foram localizados nas regiões terminais dos cromossomos metacêntricos e acrocêntricos. A exceção foi *Nothoscordum* sp. que além de sítios de DNAr 45S nos braços curtos dos acrocêntricos, apresentou sítios de DNAr 45S na região centromérica de um par de metacêntricos (Fig. 2e-f).

As espécies de *Ipheion*, *I. recurvifolium* ($2n = 20$; 2SM + 18A), *I. tweedieanum* ($2n = 14$; 14A) e *I. uniflorum* ($2n = 12$; 2SM + 10A), apresentaram sinais teloméricos com a sonda PNA HUSB exclusivamente nos terminais cromossômicos (Fig. 1). Em *I. uniflorum* foi testada a presença de sequências tipo *Arabidopsis* (TTTAGGG)_n e foram detectados sinais nas mesmas posições observadas com a sequência (TTAGGG)_n.

No gênero *Nothoscordum* foi observada uma diferença entre as espécies da secção *Nothoscordum* e aquelas da secção *Inodorum*. As espécies da secção *Nothoscordum* apresentaram sítios teloméricos de humanos e *Arabidopsis* exclusivamente nos terminais cromossômicos (Fig. 2). Sinais para ATSB ou HUSB não foram detectados apenas no braço curto de um par de metacêntrico de *N. bonariense* e de um único metacêntrico de *N. montevidense* ($2n = 8M$) (Fig. 2a e d). Para verificar se nesses terminais cromossômicos que não apresentavam sinais teloméricos havia presença de DNAr 45S (ver Pich et al. 1996) foi realizada uma FISH sequencial, que revelou ausência de sítios de DNAr nesses terminais. FISH com sondas de ATSB e DNAr 45S em *N. montevidense* (Fig. 2a-b) e *N. felipponei* (Fig. 2c) revelou sinais de DNA telomérico ligeiramente mais distais que os sinais de DNAr. Em um indivíduo tetraplóide de *N. montevidense* que apresentava um cromossomo B, os sinais teloméricos também foram restritos aos terminais cromossômicos (Fig. 2b). *Nothoscordum* sp. com $2n = 18$ (14M + 4A) apresentou sítios teloméricos apenas nos terminais cromossômicos (Fig. 2e-f).

Nas espécies da secção *Inodorum* foram observados sítios terminais em todos os cromossomos e sítios teloméricos ectópicos em algumas delas (Fig. 3). Os diplóides *N.*

arenarium e *N. macrostemon* ($2n = 10$, $6M + 4A$) apresentaram além dos sinais teloméricos terminais, sítios adicionais na região centromérica de três pares de metacêntricos em *N. arenarium* (Fig. 3b) e em um par de metacêntricos em *N. macrostemon* (Fig. 3c). Dentre os tetraplóides, em *N. gracile* ($2n = 18$, $14M + 4A$) foram observados sítios ectópicos em um par de metacêntricos (Fig. 3d) e em *N. nudicaule* ($2n = 19$, $13M + 6A$) sítios teloméricos ectópicos na região proximal de dois pares cromossômicos e na região subtelomérica de um par de metacêntricos e de um cromossomo acrocêntrico (Fig. 3f).

A análise do DNA telomérico em anáfase-interfase revelou núcleos polarizados seguindo a orientação de Rabl, com os telômeros dos braços longos voltados para um dos pólos e os telômeros dos braços curtos dos acrocêntricos voltados para o pólo oposto. A Fig. 4 mostra a distribuição desses sítios em *N. pulchellum*, com os sítios teloméricos dos acrocêntricos (setas) próximos das regiões centroméricas dos metacêntricos.

Distribuição das sequências teloméricas ATSB e HUSB

Utilizando as sondas para as sequências teloméricas HUSB e ATSB quase todos os terminais cromossômicos foram igualmente marcados por FISH. Esses resultados foram semelhantes tanto em hibridizações *in situ* sequenciais, como em *N. macrostemon* e *Nothoscordum* sp. (Fig. 3e-f), quanto em hibridizações em lâminas distintas, como em *N. bonairense*, *N. felipponei* e *N. gracile*. Em todas essas espécies investigadas os dois tipos teloméricos marcavam na mesma posição, inclusive nos sítios ectópicos, havendo em alguns telômeros diferenças sutis de intensidade entre os sinais com DNA telomérico tipo *Arabidopsis* e tipo humano.

A análise por PCR dessas variantes teloméricas revelou fragmentos de ~ 500 pb amplificados exclusivamente nas reações usando os primers ATSB e HUSB alternados. Na reação controle (sem adição de DNA) não foi observada amplificação, revelando que os *primers* dos dois tipos teloméricos não concatenam. O produto da PCR foi clonado e cinco clones foram

sequenciados (Fig. 5). Todos os clones apresentaram repeats ATSB e HUSB organizados de forma interespaçada, com insertos de 253 a 444 pb. Dois desses clones, pNg-tel3 e pNg-tel6, apresentaram segmentos não-teloméricos de 338 e 83 pb, respectivamente, intercalados entre os blocos teloméricos. Quando analisadas em conjunto, esses clones apresentaram um predomínio de repeats ATSB (77.9%), seguidos por repeats HUSB (14.8%) e sequências teloméricas degeneradas (7.3%). Os principais erros relacionados com as sequências degeneradas foram T- or G-slippage e substituições em regiões poli-T ou poli-G.

Discussão

Colocalização dos telômeros HUSB e ATSB

Os dados do presente trabalho confirmam por FISH a presença do DNA telomérico HUSB (TTAGGG)_n e ATSB (TTTAGGG)_n nos terminais cromossômicos em todas as 12 espécies analisadas dos gêneros *Ipheion* e *Nothoscordum*. Análises prévias com slot-blot e FISH haviam demonstrado que em espécies de um grande clado dentro da ordem Asparagales o telômero típico tipo-*Arabidopsis* foi parcialmente substituído pela sequência tipo-humanos (Adams et al 2001; Weiss and Scherthan 2002; Sýkorová et al 2003). Contudo, em algumas espécies desse clado a sonda ATSB não marca *in situ*, sugerindo que o processo de substituição da sequência telomérica típica de plantas pode ser completo (Weiss-Schneeweiss 2004).

Em *Nothoscordum gracile* ATSB foi a sequência dominante em cinco fragmentos de DNA telomérico examinados, sendo alternados com HUSB, repeats teloméricos degenerados ou sequências desconhecidas. O sequenciamento de clones contendo insertos teloméricos em outras espécies de Asparagales revelaram arranjos similares, com essas variantes teloméricas

organizadas em blocos alternados e uma baixa frequência de repeats degenerados (Sýkorová et al 2003; Weiss-Schneeweiss et al 2004). A presença de longos insertos não-teloméricos em fragmentos de DNA telomérico também foi observada em *Othocallis siberica*, e pode ser resultado da amplificação de uma porção da região subtelomérica (Weiss-Schneeweiss et al 2004). Repeats degenerados são comumente encontrados em motivos teloméricos típicos em diferentes organismos (Richards and Ausubel 1988; Moyzis et al 1988), sugerindo que a enzima telomerase apresente uma certa plasticidade na inserção dos *repeats* teloméricos.

A origem da variabilidade telomérica em Asparagales pode estar relacionada com uma mutação no gene codificante da subunidade catalítica da telomerase (TERT). O alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos do gene TERT de espécies de Asparagales e outras plantas com telômeros tipo Arabidopsis revelou uma substituição candidata no grupo com telômero alterado, que poderia estar envolvida com essa alteração (Sýkorová et al 2006b).

A aparente ausência de telômeros em alguns poucos cromossomos de *Nothoscordum* pode ser devida ao tamanho muito reduzido desses sinais. A hibridização *in situ* com o DNAr 45S revelou que esses terminais também não possuíam sítios ribossomiais. Além disso, todos os sítios terminais de DNAr apresentaram sítios teloméricos distais, indicando que clusters de sequências ribossomais não substituem as sequências teloméricas como observado em outra espécie de Alliaceae (Pich et al 1996). Isso sugere que a substituição de microssatélites teloméricos por sequências repetitivas mais longas como o DNA satélite e o DNAr 45S em *Allium cepa* ou por elementos transponíveis, como HeT-A e TART em *Drosophila melanogaster* (Abad et al 2004) são exceções.

Sítios teloméricos ectópicos × translocações Robertsonianas

Em plantas, sítios teloméricos intersticiais associados com fusões cêntricas foram só raramente documentados por FISH (Schubert et al 1992; Silva et al 2006), enquanto em mamíferos, sítios ectópicos são bastante frequentes, o que pode estar relacionado com o predomínio de fusões cêntricas na evolução cariotípica desse grupo ou o tipo de fusão cêntrica, que mais provavelmente seria do tipo *end to end* (Ruiz-Herrera et al 2008). Análises de pintura cromossômica em *Brassicaceae* indicaram que ‘chromosome fusion’ é sempre resultado de uma translocação recíproca, parecendo sempre haver perda dos braços curtos dos acrocêntricos e, portanto ausência de sítios teloméricos intersticiais (Shubert and Lysak 2011). Em *Nothoscordum*, os sítios ectópicos de DNA telomérico não se relacionam com variação diplóide, nem mesmo nos casos de variação interespecífica resultantes de fusão, o que sugere que esses sítios ectópicos não sejam remanescentes de fusões cêntricas.

Na grande maioria dos casos reportados em plantas os sítios teloméricos ectópicos foram gerados pela presença de DNAs satélites com motivos telomere-like degenerados (Hizume et al 1998; Kondo and Tagashira 1998; Shibata et al 2005). Nesses casos os sítios ectópicos foram localizados na maioria dos cromossomos formando grandes blocos pericentroméricos ou subteloméricos, regiões particularmente propícias ao acúmulo de sequências repetitivas diversas (Gill et al 2008). Nas espécies de *Nothoscordum* sítios teloméricos ectópicos foram restritos a pequenos dots na região centromérica e subtelomérica de alguns poucos cromossomos e hibridizados com as sondas HUSB e ATSB proporcionalmente aos sítios teloméricos, o que sugere que esses sítios tenham uma origem a partir dos telômeros verdadeiros.

Considerando que ambas as sequências HUSB e ATSB estão presentes nos sítios teloméricos ectópicos é possível que o DNA telomérico tenha sido equilocalmente dispersos a partir dos telômeros dos braços curtos dos acrocêntricos para a região proximal dos cromossomos metacêntricos. Isso seria facilitado pela proximidade espacial dessas regiões no núcleo interfásico mitótico mantido pela orientação de Rabl ou durante a formação de *bouquet* no início da meiose (Schweizer and Loild 1987). A distribuição equilocal de heterocromatina é

amplamente conhecida em plantas (König and Ebert 1997; Zhong et al 1998) e insetos (John et al 1985). Essa transferência seria propiciada por mecanismos como pareamento e recombinação ectópica de sequências repetitivas pericentroméricas ou transposição (Pedrosa et al 2001). A presença de sítios ectópicos subteloméricos em *N. nudicaule* pode também estar relacionada com a presença de motivos teloméricos degenerados nessa região (Flint et al. 2007).

References

- Abad JP, Pablos B, Osoegawa K, Jong PJ, Martín-Gallardo A, Villasante A (2004) Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: full-length copies of HeT-A and TART elements at telomeres. *Mol Biol Evol* 21:1613–1619.
- Adams SP, Hartman TPV, Lim KY, Chase MW, Bennett MD, Leitch IJ, Leitch AR (2001) Loss and recovery of *Arabidopsis*-type telomere repeat sequences 5'-(TTAGGG)_n-3' in the evolution of a major radiation of flowering plants. *Proc R Soc Lond* 268:1541–1546.
- Crosa O (1972) Estudios cariología en el género *Nothoscordum* (Liliaceae). *Bol Fac Agr Uruguay* 122:3–8.
- Fajkus J, Sýkorová E, Leitch AR (2005) Techniques in plant telomere biology. *Bio Techniques* 38:233–243.
- Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA, Miclen G, Higgs DR, Louis E. 1997. Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Human Molecular Genetics* 6: 1305-1314.

- Fuchs J, Brandes A, Schubert I (1995) Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher-plants. *Plant Syst Evol* 196:227–241.
- Gill N, Hans CS, Jackson S (2008) An overview of plant chromosome structure. *Cytogenet Genome Res* 120:194–201.
- Guerra M, Felix LP (2000) O cariótipo de *Nothoscordum pulchellum* (Alliaceae) com ênfase na heterocromatina e sítios de DNAr. *Bol Soc Argent Bot* 35:283–289.
- Hall KJ, Parker JS (1995) Stable chromosome fission associated with rDNA Mobility. *Chromosome Res* 3:417–422.
- Hizume M, Kurose N, Shibata F and Kondo K (1998) Molecular cytogenetics studies on sex chromosomes and proximal heterochromatin containing telomere-like sequence in *Cycas revolute*. *Chrom Sci* 2:63–72.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 13:17.
- John B, King M, Schweizer D, Mendelak M (1985) Equilocality of heterochromatin distribution and heterochromatin heterogeneity in acridid grasshoppers. *Chromosoma* 91:185–200.
- Jones K (1998) Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. *Bot Rev* 64:273–89.
- Kondo K, Tagashira N (1998) Regions in situ-hybridized by the *Arabidopsis*-type telomere sequence repeats in *Zamia* chromosomes. *Chromosome Sci* 2:87–89.
- König C, Ebert I (1997) Computer-aided quantitative analysis of banded karyotypes, exemplified in C-banded *Hyacinthoides italica* (Hyacinthaceae). *Caryologia* 50:105–116.

- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyzis RK (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99:3–10.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Crams LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci of USA* 85:6622–6626.
- Pedrosa A, Jantsch MF, Moscone EA, Ambros PF, Schweizer D (2001) Characterisation of pericentromeric and sticky intercalary heterochromatin in *Ornithogalum longibracteatum* (Hyacinthaceae). *Chromosoma* 110:203–213.
- Pich U, Fuchs J, Schubert I (1996) How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosome Research* 4:207–213.
- Richards EJ, Ausubel FM (1998) Isolation of a higher eukaryote telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53:127–136.
- Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostino M, Giulotto E (2008) Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res* 122:219–228.
- Schubert I, Schriever-Schwemmer C, Werner T, Adler ID (1992) Telomeric signals in Robertsonian fusion and fission chromosomes: implications for the origins of pseudoaneuploidy. *Cytogenet Genome Res* 59:6–9.
- Schweizer D, Loidl J (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosome today* 9: 61–74.

- Shibata F, Matsusaki Y, Hizume M (2005) AT-rich sequences containing *Arabidopsis* -type telomere sequence and their chromosomal distribution in *Pinus densiflora*. *Theor Appl Genet* 110:1253–1258.
- Shubert I, Lysak MA (2011) Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends Genet* 27:207–216.
- Silva CRM, González-Elizondo MS, Vanzela ALL (2006) Reduction of chromosome number in *Eleocharis subarticulata* (Cyperaceae) by multiple translocations. *Bot J Linean Soc* 149:457–464.
- Siroky J (2008) Cytogenetics for the study of telomere function in plants. *Cytogenet Genome Res* 122:374–379.
- Souza LGR, Crosa O, Guerra M (2010) Karyological circumscription of *Ipheion* Rafinesque (Gilliesioideae, Alliaceae). *Plant Syst Evol* 287:119–127.
- Souza LGR, Crosa O, Winge H, Guerra M (2009) The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): a populational and cytomolecular analysis. *Genet Mol Biol* 32:111–116.
- Sýkorová E, Fajkus J, Mezníková M, Lim KY, Nepelchová K, Blattner FR, Chase MW, Leitch AR (2006a) Minisatellite telomeres occur in the family Alliaceae but are lost in *Allium*. *Am J Bot* 93:814–823.
- Sýkorová E, Leitch AR, Fajkus J (2006b) Asparagales telomerases which synthesize the human type of telomeres. *Plant Molecular Biology* 60:633–646.
- Sýkorová E, Lim KY, Kunická Z, Chase MW, Bennett MD, Fajkus J, Leitch AR (2003) Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales. *Proc R Soc Lond B* 270:1893–1904.

Weiss H, Scherthan H (2002) *Aloe* spp. - plants with vertebrate-like telomeric sequences. Chromosome Res 10:155–164.

Weiss-Schneeweiss H, Riha K, Jang CG, Puizina J, Scherthan H, Schweizer D (2004) Chromosome termini of the monocot plant *Othocallis siberica* are maintained by telomerase, which specifically synthesises vertebrate-type telomere sequences. Plant J 37:484–493.

Zhong XB, Fransz PF, Eden JW, Kammen A, Zabel P, de Jong JH (1998) FISH studies reveal the molecular and chromosomal organization of individual telomere domains in tomato. Plant J 13:507–517.

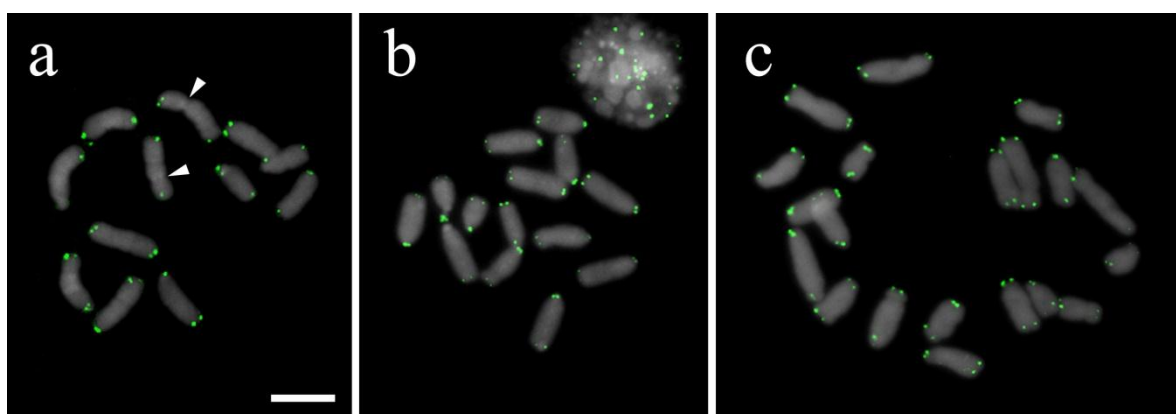


Fig. 1 – Distribuição do DNA telomérico HUSB (verde) nas espécies do gênero *Ipheion*. **a**, *I. uniflorum*; **b**, *I. tweedieanum*; **c**, *I. recurvifolium*. Cabeças de setas em **a** apontam para a região proximal do par de submetacêntrico em *I. uniflorum*. Barra em **a** representa 10 μ m.

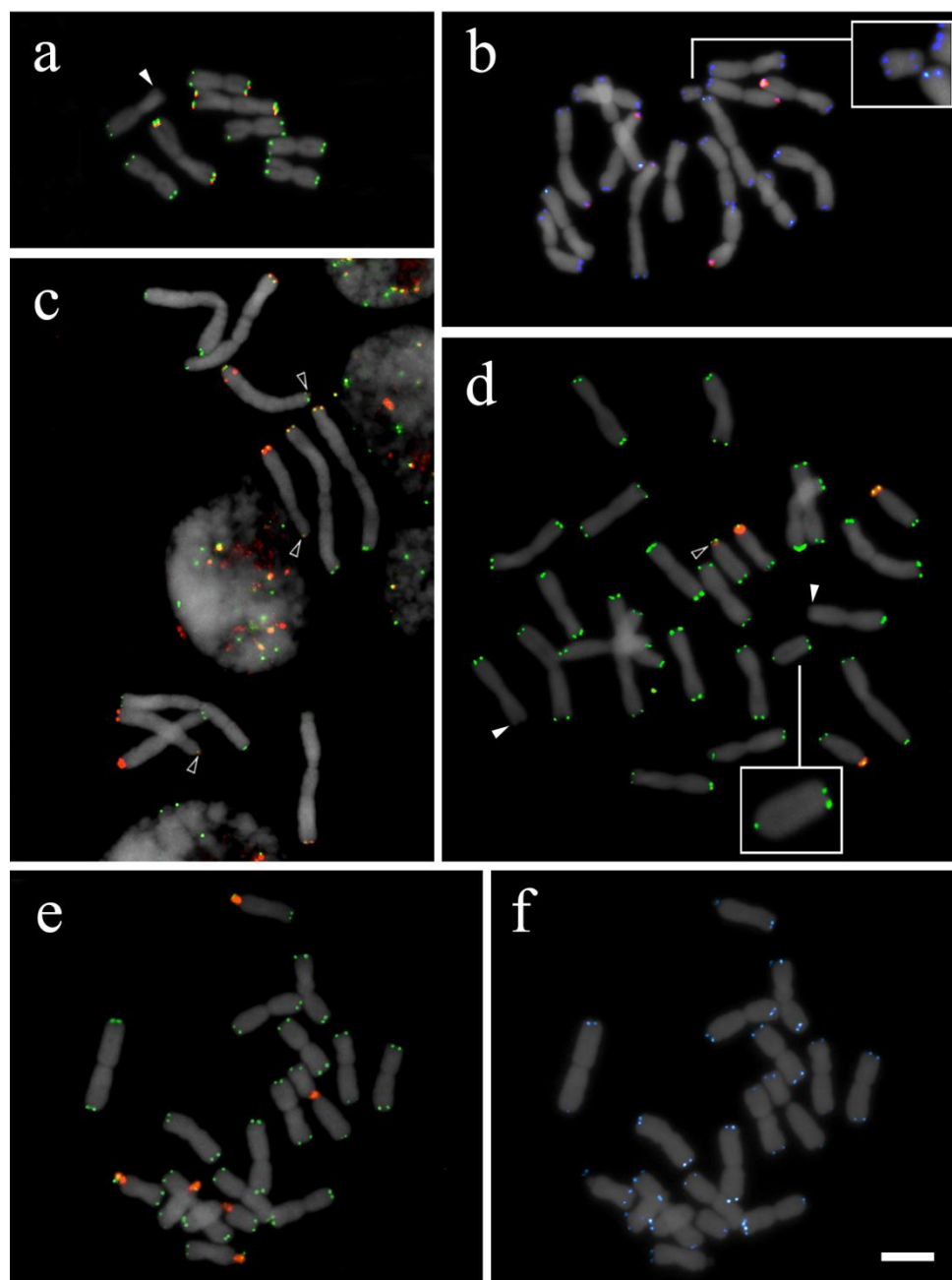


Fig. 2 – Distribuição de DNA telomérico HUSB (verde) e ATSB (azul) e dos sítios de DNAr 45S (laranja) em espécies da secção *Nothoscordum* do gênero *Nothoscordum*. Em **a** e **b**, *N. montevidense* 2x e 4x com um cromossomo B (inserto), respectivamente; **c**, *N. felipponei*; **d**, *N. bonariense*; **e-f**, *Nothoscordum* sp. hibridizada *in situ* sequencialmente com HUSB (**e**) e ATSB (**f**). Barra em **f** representa 10 μ m.

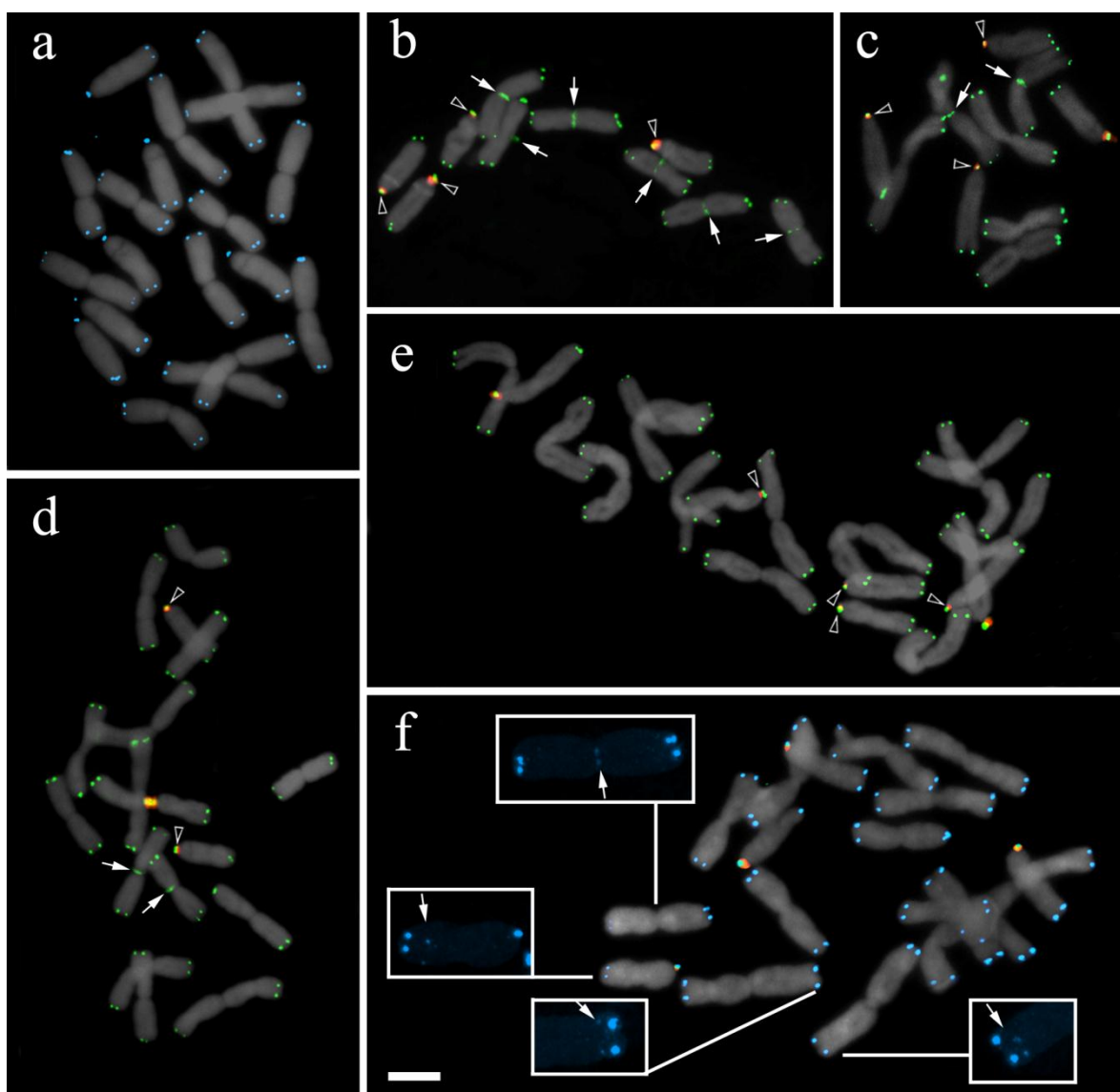


Fig. 3 – Distribuição de DNA telomérico HUSB (verde) e ATSB (azul) e dos sítios de DNAr 45S (laranja) em espécies da secção *Inodorum* do gênero *Nothoscordum*. Em **a** e **d** *N. gracile* com $2n = 19$ e $2n = 18$, respectivamente. **b**, *N. arenarium*. **c**, *N. macrostemon*. Em **e** e **f** *N. nudicaule* com $2n = 19$ e $2n = 18$, respectivamente. Insertos em **f** mostram sinais teloméricos ectópicos. Barra em **f** representa 10 μm .

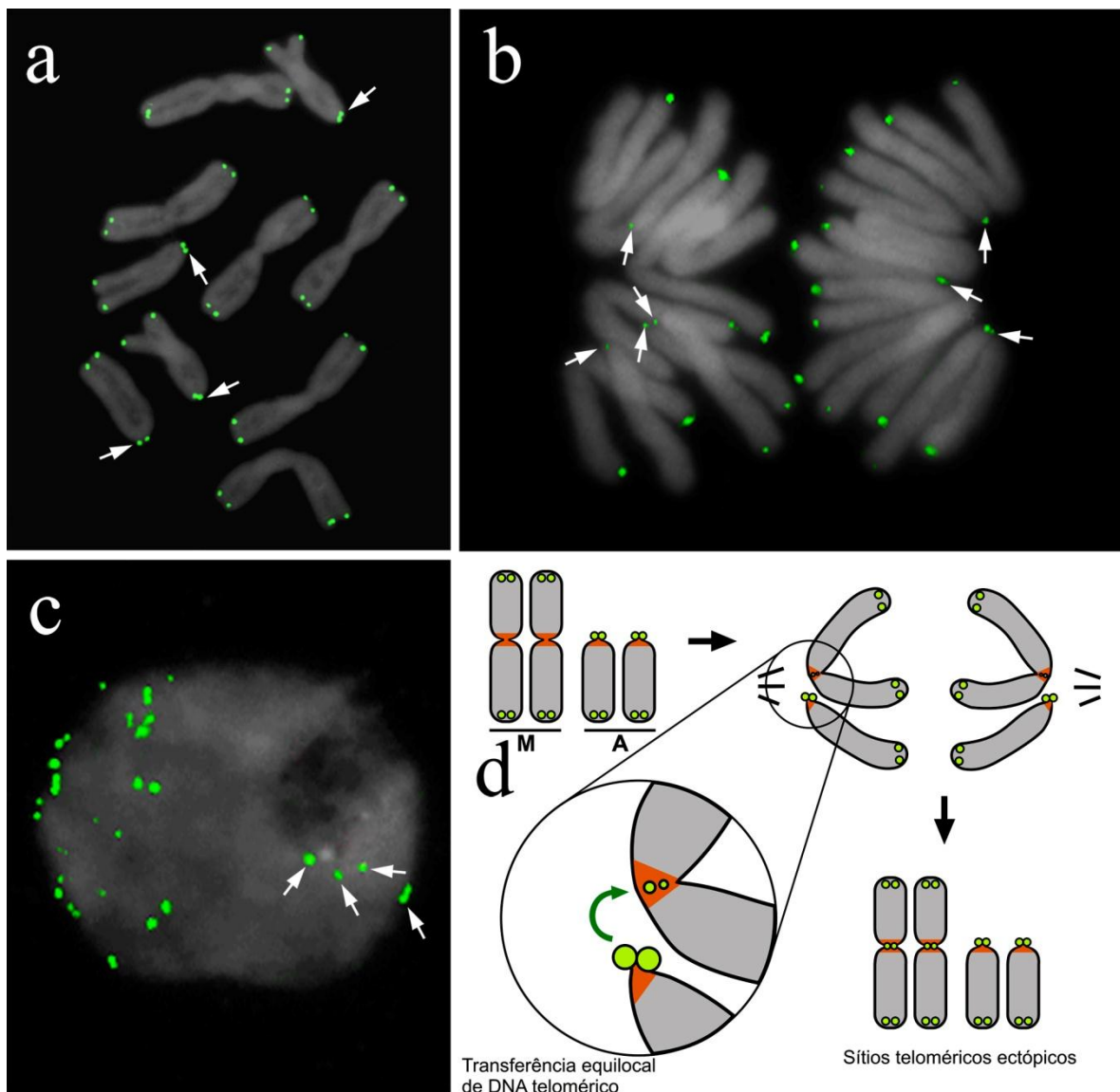


Fig. 4 – Distribuição de DNA telomérico HUSB (verde) em metáfase (a), anáfase (b) e intérfase (c) de *Nothoscordum pulchellum*. d modelo de transferência equilocal de DNA telomérico baseado em Schweizer e Loild (1987). Em d regiões destacadas em laranja delimitam a região centromérica.

pNg-tel2 (359bp length)

```

1.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....100
TTTAGGGTTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT
TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA
GGGTTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGG
GTTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
1.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....60

```

pNg-tel3 (444bp length)

```

1.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....100
TTTAGGGTTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAAGGTTTCGGGTATACGGTTGTCGGTG
TTTGACCAAGTCGAGCCATGGAACACTTAAGGGCGAACTGACATATTATATTTTTATATTGAAATTATTAGCACATTACATAAAATGAAAAATGAA
AAAAAAAAAAAAAATAAGTGGAACGGGGGGGCCAAAAAATTCATAAAATTTGGACCAAAATTTTTTCCCCCGGTTTCCATTTTTCGAAGGGGAAAAA
ATTTAAAAAATAAAAAAGGGAAAAGAAAAAGGGAGCCACCCGGGGGTTCCCGGGGGGTCCCCACCTGCGTTAACTCCCCACAACCTCTAACCATTTTC
CGCCAACCTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
1.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....45

```

pNg-tel4 (345bp length)

```

1.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....100
TTTAGGGTTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT
TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA
GGGTTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGG
GTATAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGG
1.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....46

```

pNg-tel5 (254bp length)

```

1.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....100
TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT
TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT
AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
1.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....54

```

pNg-tel6 (337bp length)

```

1.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....100
TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT
TCGGTACCCGGGGATCCGATTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA
GGGTTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGG
GTTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGG
1.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....37

```

Fig. 5 – Análises de sequência de cinco clones de *Nothoscordum gracile* mostrando ATSB (cinza claro) e HUSB (cinza escuro). Nucleotídios distintos dos repeats teloméricos são destacados em cinza claro.

Tabela 1 – Espécies analisadas dos gêneros *Nothoscordum* e *Ipheion* com respectivos números de Voucher, procedência, número cromossômico ($2n$), fórmula cariotípica, número fundamental (NF) e sítios teloméricos intersticial (ITS).

Taxon	Voucher	Procedência	$2n$	Fórmula cariotípica*	NF	ITS
<i>Ipheion</i> Rafinesque						
<i>I. recurvifolium</i> (Wright) Traub.	MVFA 33781	Paso Rondán, Depto. Florida, Uruguai	20	18A + 2SM	22	-
<i>I. tweedieanum</i> (Griseb.) Traub.	MVFA 21953	Ruta 24, km. 45.5, Depto. Río Negro, Uruguai	14	14A	14	-
<i>I. uniflorum</i> (Raf.) Traub.	MVFA 33773	Ruta 26, km. 191 Depto. Tacuarembó, Uruguai	12	10A + 2SM	14	-
<i>Nothoscordum</i> Kunth						
<i>N. arenarium</i> Herter	MVFA 7447	Colônia Winston, Depto. San José, Uruguai	10	6M + 4A	16	6
<i>N. felipponei</i> Beauverd	MVFA 33778	Cerro Verdún, Depto. Lavalleja, Uruguai	10	6M + 4A	16	-
<i>N. macrostemon</i> Kunth	MVFA 1391	Ruta 9, Arroyo Solís Grande, Depto.	10	6M + 4A	16	2

Canelones, Uruguai						
<i>N. pulchellum</i> Kunth	-	Caruarú-PE, Brasil	10	6M + 4A	16	-
<i>N. montevidense</i> Beauverd	MVFA 0004	Montevideo, Uruguai	8	8M	16	-
		Arroyo Quebracho, Depto. Paysandú, Uruguai	16 + 1B	16M	32	-
<i>N. gracile</i> (Ailton) Stearn	MVFA 2152	São Paulo-SP, Brasil	19	13M + 6A	32	-
		Punta Ballena, Depto. Maldonado, Uruguai	18	14M + 4A	32	2
<i>N. nudicaule</i> (Lehm.) Guagl.	MVFA 1310	Depto. Canelones, Uruguai	19	13M + 6A	32	-
			18	14M + 4A	32	7
<i>N. bonariense</i> Beauverd	MVFA 2730	Montevideo, Uruguai	26	22M + 4A	48	-
			26	21M + 5A	47	-
<i>Nothoscordum</i> sp.1	MVFA 1273	Chile	18	14M + 4A	32	-

* M = metacentric, SM = submetacentric, and A= acrocentric.

Capítulo V - Evidências filogenéticas e cito-moleculares de uma recente diversificação cariotípica na secção *Nothoscordum* (*Nothoscordum*, *Ipheieae*, *Gilliesioideae*)

Luiz Gustavo Rodrigues Souza^a, Liliane Gallindo Dantas de Oliveira^a, Pablo Speranza^b, Orfeo Crosa^b and Marcelo Guerra^a

^a Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, s/nº, Cidade Universitária, 50372-970, Recife, PE, Brasil

^b Laboratório de Genética, Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Agronomia, Universidade de la República, Uruguai.

* Autor para correspondência. E-mail: msfguerra@hotmail.com.

Premissa do estudo O gênero *Nothoscordum* compreende aproximadamente 25 espécies nativas da América do Sul e apresenta uma taxonomia complexa. O gênero foi dividido com base em análises morfológicas nas secções *Inodorum* e *Nothoscordum*, sendo que a última compreende a maioria das espécies, é morfológicamente mais diversificada e possui distribuição geográfica mais ampla.

Métodos Neste trabalho é apresentada uma análise citotaxonômica das espécies da secção *Nothoscordum* baseada no número e morfologia cromossômicos e na localização dos sítios de DNAr 5S e 45S. Além disso, foi construída uma filogenia molecular baseada em sequências nucleares ITS e plastidiais *trnL-trnF*, *atpB-rbcL*, íntron *trnG*, *trnS-trnG* e *psbA-trnH*, visando analisar a relação evolutiva entre as espécies dessa secção.

Resultados As análises filogenéticas revelaram a monofilia da secção *Nothoscordum*, grupo irmão da secção *Inodorum*. O grupo apresentou as sequências plastidiais bastante conservadas, enquanto as sequências nucleares ITS foram mais variáveis, permitindo estimar a idade da secção *Nothoscordum* em 3,5 MA. Citologicamente o grupo apresentou uma extensa diversificação, com dois números cromossômicos básicos, poliploidia intraespecífica e interespecífica e variabilidade no número e posição de sítios de DNAr 5S e 45S.

Conclusões Todas as evidências moleculares sugerem que a secção tenha uma origem recente, enquanto dados cariotípicos indicam que esse grupo tenha passado por um período de intensa diversificação cariotípica com ampla variação no número de sítios de DNAr.

Palavras chave: secção *Nothoscordum*, sítios de DNAr, evolução cariotípica, filogenia molecular.

INTRODUÇÃO

O gênero *Nothoscordum* Kunth (Gilliesioideae, Alliaceae) compreende ~ 25 espécies nativas da América do Sul, com centro de diversidade na região extra-tropical no Uruguai, norte da Argentina e sul do Brasil (Guaglianone, 1972; Howard, 1993). Esse gênero pertence à tribo Ipheieae, que inclui quatro outros gêneros *Leucocoryne* Lindl, *Ipheion* Rafinesque, *Tristagma* Poepp e *Zoellnerallium* Crosa todos proximamente relacionados (Crosa, 1975; Fay e Chase, 1996). As espécies de *Nothoscordum* apresentam em geral um baixo número de caracteres morfológicos diagnósticos, com polimorfismos morfológicos intraespecíficos, caracteres convergentes e formação de híbridos interespecíficos naturais (Guaglianone, 1972; Crosa, 1974; Souza et al., 2010; in press). Guaglianone (1972), com base nesses caracteres, propôs a separação do gênero em duas secções, *Inodorum* e *Nothoscordum*, posteriormente confirmada por Fay et al. (2006). Esta última secção compreende a maioria das espécies do gênero, sendo morfológicamente mais diversificada e com distribuição geográfica mais ampla.

Os principais caracteres morfológicos utilizados na taxonomia das espécies da secção *Nothoscordum* são a cor das tépalas (brancas ou amarelas), presença de rizomas e variações na forma e tamanho de peças florais e partes vegetativas das plantas (Guaglianone, 1972). No entanto, alguns desses caracteres são de difícil delimitação, sendo necessário usar informações adicionais, principalmente dados histológicos, filogenéticos e citogenéticos (Crosa, 1975; Fay et al., 2006; Souza et al., 2010). O grupo morfológicamente melhor caracterizado da secção *Nothoscordum* é formado por espécies “unifloras” que apresentam flores isoladas (Guaglianone, 1972), constituído por seis espécies *N. dialystemon* (Guagl.) Crosa, *N. felipponei* Beauverd, *N. hirtellum* (Kunth) Herter, *N. izaguirreae* Crosa, *N. marchesii* Crosa, e *N. vittatum* (Griseb.)

Ravenna. Algumas dessas espécies, como por exemplo *N. marchesii* e *N. vittatum*, se confundem morfológicamente com as três espécies do gênero *Ipheion*, que são também “unifloras” (Guaglianone, 1972). Análises histológicas e cariotípicas, concluíram que o caráter “uniflora” nos dois gêneros é homoplásico (Crosa, 1975; Souza et al., 2010). Contudo, uma análise filogenética da subfamília Gilliesioideae, baseada em sequências plastidiais (*rbcL*, íntron *trnL*, *trnL-F* e íntron *rps16*) e nuclear ITS agrupou *Ipheion dialystemon* Guagl e *I. hirtellum* (Kunth) Traub no clado das espécies de *Nothoscordum*, sugerindo que essas espécies precisam ser taxonomicamente reavaliadas (Fay et al. 2006).

O grupo taxonomicamente mais problemático da secção *Nothoscordum* é o complexo *Bivalve*, composto por *N. bivalve* (L) Britton, *N. bonariense* Beauverd, *N. gaudichaudianum* Kunth e *N. montevidense* Beauverd (Guaglianone, 1972). As espécies desse complexo apresentam múltiplos citótipos, com variação no nível de ploidia e ocorrência de híbridos naturais (Guaglianone, 1972; Crosa, 1974). Uma análise filogenética desse complexo baseada em marcadores moleculares plastidiais *trnG* e nucleares ITS revelou que *N. bivalve*, *N. bonariense* e *N. gaudichaudianum* formam um clado bem sustentado, enquanto *N. montevidense* aparece em um clado distinto, sugerindo que o complexo não seria monofilético (Souza et al. em preparação).

Citologicamente todas as espécies do gênero *Nothoscordum* se destacam por apresentarem cromossomos grandes (alguns maiores que 20 μm), com cariótipos formados por cromossomos metacêntricos (M) ou acrocêntricos (A). As espécies da secção *Inodorum* apresentam número cromossômico básico $x = 5$ ($3M + 2A$) enquanto as da secção *Nothoscordum* apresentam dois números básicos com diferentes fórmulas cariotípicas [$x = 4$ ($4M$) e $x = 5$ ($3M + 2A$)], com ocorrência de citótipos diploides, tetraploides, hexaploides e octaploides (Crosa, 1972; Nuñez et al., 1972; Souza et al.

2012). A análise da distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem revelado uma grande diversidade nas espécies da secção *Nothoscordum*, embora poucas espécies tenham sido analisadas (Guerra e Felix, 2000; Souza et al., 2010).

Neste trabalho foi analisada a filogenia molecular da secção *Nothoscordum*, baseada em sequências plastidiais, *trnL-trnF*, *atpB-rbcL*, intron *trnG*, *trnS-trnG* e *psbA-trnH*, e nucleares, ITS (ITS1-5.8S-ITS2), juntamente com uma análise cariotípica das espécies dessa secção baseada em número e morfologia cromossômica e na localização dos sítios de DNAr 5S e 45S. Análises similares, incluindo a distribuição desses sítios de DNAr, tem auxiliado na identificação dos cromossomos e detecção de alterações cariotípicas estruturais em uma série de gêneros (Moraes et al., 2007; Iovene et al., 2008).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal – As amostras analisadas da secção *Nothoscordum*, coletadas na Argentina, Brasil, Chile, Uruguai e EUA, são apresentadas na Tabela 1. Todas as exsicatas foram depositadas no herbário Bernardo Rosengurtt da Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideu, Uruguai (MVFA). As sequências ITS das espécies *N. arenarium*, *N. bivalve*, *N. bonariense*, *N. felipponei*, *N. gaudichaudianum*, *N. gracile*, *N. hirtellum*, *N. macrostemon*, *N. montevidense*, *N. nudicaule* e *N. pulchellum* e plastidial *trnG* para *N. arenarium*, *N. bivalve*, *N. gaudichaudianum*, *N. hirtellum* e *N. montevidense* foram disponibilizadas em uma análise filogenética prévia (Souza et al. 2012; em preparação) e obtidas do GenBank.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento – As extrações de DNA foram realizadas pelo método de CTAB segundo Doyle e Doyle (1987). Foram analisadas as regiões plastidiais *trnL-trnF* (Taberlet et al., 1991), *atpB-rbcL* (Chiang e Schaal 2000), *trnG* intron, *psbA-trnH* e *trnS-trnG* (Hamilton

1999). A amplificação da região nuclear ITS foi realizada segundo Lomáscolo et al. (2008). Todos os fragmentos amplificados foram sequenciados em ambas direções no Instituto Pasteur (Uruguai) ou pela MacroGen Inc. (Coreia do Sul). As sequências analisadas serão disponibilizadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Alinhamento – Os cromatogramas foram editados usando o *software* FinchTV versão 1.4.0. Os alinhamentos foram gerados e editados manualmente no BioEdit Sequence Alignment Editor. No alinhamento da região ITS, 12 gaps foram identificados e cada um foi considerado como um único caráter e codificado como presença/ausência e incluído na matriz consenso das sequências.

Inferência filogenética – Foram realizadas análises filogenéticas baseadas na região ITS para 43 amostras da secção *Nothoscordum*. A análise das regiões plastidiais foi realizada apenas em cinco espécies da secção, as mesmas incluídas em um trabalho prévio (Fay et al. 2006). Ambas análises incluíram como grupos externos *N. arenarium*, *N. gracile*, *N. macrostemon* e *N. nudicaule*, todas da secção *Inodorum*, *Tristagma graminifolia* e *Speea triloba*. As matrizes para cada conjunto de dados e a matriz combinada das sequências plastidiais foram analisadas com o *software* PAUP* 4.0b10 (Swofford 2003) usando uma busca heurística preliminar com *tree bisection-reconnection* (TBR). A árvore com menor número de passos foi salva e a partir dessa, foi realizada uma busca final a 5.000 *sequence addition replicates* (SAR), salvando somente árvores que tinham o número de passos menor ou igual ao encontrados na busca preliminar. A análise de *bootstrap* foi realizada para 10.000 réplicas, com 100 SAR dentro de cada réplica, usando TBR.

A análise *Bayesiana* da região ITS foi feita separadamente para as subregiões ITS1, 5.8S e ITS2, determinando os modelos evolutivos para cada uma delas independentemente por máxima verossimilhança usando o MrModelTest (v.1.1b). O melhor modelo evolutivo para as regiões ITS1 e ITS2 foi HKY+G, enquanto o modelo utilizado para a região 5.8S foi K80+I. A inferência Bayesiana foi realizada com ajuda do programa MrBayes versão 1.10.

Evolução de caracteres e relógio molecular – A análise de reconstrução ancestral de caracteres (RAC) foi realizada para caracteres morfológicos (**cor das tépalas e tipo de inflorescência**) e citogenéticos (**número cromossômico básico e número cromossômico**) usando o *software* Mesquite 2.74 (Meddison and Meddison, 2003). A RAC foi baseada na análise da região ITS de 32 amostras diploides, analisadas previamente por máxima parcimônia no PAUP*. A melhor árvore, salva no formato NEXUS, foi analisada no *software* Mesquite para a construção da matriz de dados.

Como não existem evidências fósseis de *Nothoscordum* que permitam estimar a idade do gênero, foi utilizada uma abordagem de *relaxed molecular clock* que se baseia na taxa de substituições ao longo de um ramo numa filogenia para datar a origem desse clado (Renner, 2005). Essa estimativa foi feita para o nó de origem da secção *Nothoscordum*, baseado na taxa de substituição das regiões ITS1 e ITS2 determinadas para plantas herbáceas (Kay et al., 2006). Foi utilizado o *software* DNAMLK versão 3.5c na função de máxima verossimilhança com relógio molecular. Como as medidas usando ITS1 e ITS2 apresentaram valores muito congruentes, a datação foi feita com base na média desses valores.

Análise cariotípica – A análise cariotípica foi realizada em 38 amostras da secção *Nothoscordum*. As amostras foram analisadas utilizando a dupla coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de acordo com Souza et al. (2010). As lâminas foram analisadas em um microscópio de epifluorescência Leica DMLB. As imagens foram capturadas com uma câmera de video Cohu CCD usando o *software* Leica QFISH e depois editadas no Adobe Photoshop CS3 versão 10.0. As melhores lâminas foram descoradas e utilizadas para FISH.

Foram utilizadas como sondas para localizar os sítios de DNAr um clone de DNAr 5S (D2) (Pedrosa et al. 2002) e marcado com Cy3-dUTP (GE) e um clone de DNAr 18S-5.8S-25S (R2) (Wanzenböck et al. 1997) e marcado com digoxigenina-11-dUTP. Ambas as marcações foram feitas por *nick translation* (Roche). A sonda do DNAr 45S foi detectada com anticorpo anti-digoxigenina conjugada com FITC (Roche) desenvolvido em ovelha e amplificada com anticorpo anti-ovelha conjugado com FITC (Dako) desenvolvido em camundongo. A mistura de hibridização conteve 50% formamida, 10% dextran sulfato, 2× SSC e 5 ng/μl de cada sonda. As lâminas foram desnaturadas a 75 °C por 3 min. As lavagens pós-hibridização foram realizadas para uma estringência final de 76%.

RESULTADOS

Filogenia baseada nas regiões plastidiais – A matriz combinada das regiões *trnL-trnF*, *atpB-rbcL*, intron *trnG*, *trnS-trnG* e *psbA-trnH* compreendeu 3.280 caracteres. Foi observada uma deleção de 430 pb na região *psbA-trnH* exclusivamente nos representantes da secção *Nothoscordum* (Fig. 1). A análise de cada região plastidial isolada e a análise combinada das mesmas revelaram que a secção *Nothoscordum* é monofilética e grupo irmão da secção *Inodorum*. A matriz combinada das cinco regiões plastidiais, desconsiderando a deleção parcial de *psbA-trnH* na secção *Nothoscordum*, apresentou somente 34 sítios variáveis (1,03%), cuja análise por máxima parcimônia não permitiu revelar as relações entre as espécies da secção. A Tabela 2 resume o número de pares de bases e a porcentagem de variação de cada região plastidial individualmente.

Filogenia baseada na região ITS – A matriz ITS, analisada para 43 amostras da secção *Nothoscordum* e grupos externos, foi formada por 653 pb, sendo 90 pb (13,7%) polimórficos. A árvore comparativa incluindo as mesmas espécies analisadas com as regiões plastidiais é apresentada na Fig. 1. As análises Bayesianas e de máxima parcimônia apresentaram árvores com topologias muito similares, dividindo a secção *Nothoscordum* em dois grandes clados, denominados de *Bivalve* e *Hirtellum* (Fig. 3).

O clado *Bivalve* foi composto por sete espécies filogeneticamente bem definidas, *N. montevidense*, *N. izaguirrae*, *N. pulchellum*, *N. grossibulbum*, *N. gaudichaudianum*, *N. felipponei* e *N. bonariense* (Fig. 2). Além disso, *N. bivalve* não foi monofilética, aparecendo separada em dois clados. Duas morfoespécies chilenas, *Nothoscordum* sp.1 e sp.2 também formam parte deste clado e aparecem como um grupo relacionado a *N. felipponei*, *N. grossibulbum* e *N. gaudichaudianum*. Outra morfo-espécie procedente do

Uruguai, *Nothoscordum* sp.3, apareceu proximamente relacionada a *N. bonariense*. *Nothoscordum montevidense*, *N. izaguirrae* e *N. pulchellum* apareceram como um grupo à parte dentro do clado *Bivalve*.

O clado *Hirtellum* foi formado por *N. hirtellum*, *N. marchesii*, *N. ostenii*, *N. nudum*, *N. minarum*, *N. dialystemon* e *N. vittatum*. Dessas, *N. ostenii* não foi monofilética.

A estimativa de datação da secção *Nothoscordum* se baseou na taxa de substituições de $3,81 \times 10^{-9}$ substituições/sítios/ano para sequências ITS determinado em uma gramínea e condizente com outras monocotiledôneas (Verboom et al., 2003; Kay et al. 2006). As análises revelaram que a secção *Nothoscordum* teria se originado a 3,4 e 3,7 milhões de anos (MA), baseados em ITS1 e ITS2, respectivamente. Esses valores indicam que a secção teria se originado no Plioceno (5-2 MA) do período Quaternário.

Análise citogenética – Todas as 38 amostras da secção *Nothoscordum* apresentaram cromossomos meta (M) ou acrocêntricos (A) grandes (entre 4,26 e 26,91 μm) e números básicos $x = 4$ (4M) ou $x = 5$ (3M + 2A). Na Tabela 1 e Fig. 3 são apresentados os números cromossômicos e a distribuição dos sítios de DNAr nas espécies analisadas. Os sítios de DNAr 5S foram localizados sempre em cromossomos metacêntricos, predominantemente nas posições terminal e/ou proximal. Em algumas espécies foram observados sítios de DNAr 5S triplicados no mesmo cromossomo, em geral nas posições intersticial, proximal e terminal. Os sítios de DNAr 45S foram localizados preferencialmente na posição terminal de cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, podendo ocupar os dois terminais ou somente o terminal do braço curto. Em todas as

espécies da secção *Nothoscordum* foram observadas bandas CMA⁺/DAPI⁻ exclusivamente co-localizadas com os sítios de DNAr 45S. A distribuição dos sítios de DNAr em *N. pulchellum*, *N. felipponei* e *N. hirtellum* foi baseada em análises prévias (Guerra e Felix, 2000; Souza et al., 2010).

Nothoscordum montevidense apresentou amostras diploides ($2n = 8M$) e tetraploides ($2n = 16M$) (Fig 3). Uma amostra de um tetraploide de *N. montevidense* apresentou um cromossomo B, metacêntrico e menor que os demais, com um sítio de DNAr 5S na região centromérica (Fig. 3D). Em *N. izaguirrae*, foi observado o cariótipo $2n = 24M$ (Fig. 4E). O clado formado por *N. gaudichaudianum* ($2n = 8M$ e $2n = 16M$), *N. grossibulbum* ($2n = 20$; $12M + 8A$), *N. felipponei* ($2n = 10$; $6M + 4A$), *N. bonariense* ($2n = 26$; $22M + 4A$) e *N. bivalve* ($2n = 10$; $6M + 4A$, $2n = 18$; $14M + 4A$ e $2n = 20$; $12M + 8A$) apresentou sítios de DNAr 5S e de DNAr 45S em diferentes posições cromossômicas, sendo o único clado a apresentar sítios de DNAr 5S triplicados (Fig. 3E e H – Fig. 4). As duas morfo-espécies chilenas *Nothoscordum* sp. 1 e *Nothoscordum* sp. 2, ambas com $2n = 18$ ($14M + 4A$), apresentaram sítios de DNAr 45S adicionais na região centromérica de um e três pares de cromossomos metacêntricos, respectivamente (Fig. 3I - Fig. 4). As espécies do complexo *Bivalve* incluídas nesses clado, *N. bivalve*, *N. bonariense* e *N. gaudichaudianum*, apresentaram uma extensa variabilidade cariotípica, com ocorrência de diferentes citótipos (Fig. 7 e Tabela 1). Embora apareçam separadas em dois clados, as diferentes amostras de *N. bivalve* apresentaram distribuição similar de DNAr 5S e sítios de DNAr 45S nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos (Fig. 4). Dentre as amostras analisadas, o indivíduo de *N. bivalve* coletado no Texas-EUA se diferenciou dos materiais sul-americanos por apresentar blocos heterocromáticos DAPI⁺ fracos na região telomérica

de todos os cromossomos do complemento e sítios de DNAr 45S terminais no braço curto de um par de metacêntricos (Fig. 4).

No clado *Hirtellum* todas as espécies apresentaram $2n = 10$ (6M + 4A), exceto duas amostras de *N. ostenii* (NOT 1416 e NOT 1420) que apresentaram $2n = 16M$ (Fig. 3 - Fig. 4). As espécies desse clado possuem um menor número de sítios de DNAr 5S e um maior número de sítios de DNAr 45S, localizados nas regiões terminais e nos braços curtos dos acrocêntricos, respectivamente. Sítios de DNAr 45S também apareceram na região centromérica de todos os metacêntricos de *N. marcehesii* e em dois pares metacêntricos de *N. ostenii* (Fig. 3C). Embora a maioria das amostras de *N. ostenii* tenha apresentado $2n = 10$, duas delas apresentaram $2n = 16$ (16M). Uma das mostras com $2n = 16M$ apresentou um par de cromossomos B metacêntricos, com pequenos sítios de DNAr 5S e 45S na região proximal (Fig. 3G - Fig. 4).

Variação dos caracteres morfológicos – Devido à herança biparental das sequências ITS e possíveis incongruências em aloploidoides, o estudo da evolução dos caracteres morfológicos foi feito somente com as amostras diploides. Foram plotados sobre a filogenia dois caracteres morfológicos importantes na taxonomia do grupo, cor das tépalas e tipo de inflorescência (Guaglianone, 1972). A presença de rizomas não foi incluída nessa análise, pois todas as espécies que apresentaram essa característica (*N. izaguirrae*, *N. bonariense* e algumas amostras de *N. bivalve*) eram poliploides.

Dentre as espécies da secção *Nothoscordum*, foram observadas flores amarelas em *N. montevidense*, *N. izaguirrae*, *N. felipponei*, *N. hirtellum*, *N. minarum*, *N. ostenii* e *N. dialystemon* e flores brancas nas demais. Portanto, o caráter “flor amarela” ausente na secção *Inodorum* (Crosa 1996), ocorre tanto no clado *Bivalve* quanto no clado *Hirtellum*. Das cinco amostras de *N. ostenii* apenas uma delas (MVFA 1416) apresentou flores brancas (Fig. 6).

DISCUSSÃO

Filogenia molecular da secção *Nothoscordum* – A análise das sequências de DNA nuclear (ITS) e plastidiais (*trnL-trnF*, *atpB-rbcL*, *trnG*, *trnS-trnG* e *psbA-trnH*), principalmente a deleção de um fragmento da região não-codificante *psbA-trnH*, encontrada exclusivamente nas espécies da secção *Nothoscordum*, sugere que o grupo seja monofilético, como observado anteriormente (Fay et al. 2006). A divisão da secção *Nothoscordum* em dois clados, *Bivalve* e *Hirtellum*, foi correlacionada com o número de florações por ano, sendo observados duas e uma floração, respectivamente (Gualianone et al., 1972).

A variabilidade extremamente baixa das regiões plastidiais na secção *Nothoscordum* pode se dever a uma diversificação muito recente do grupo, uma vez que, em geral a taxa de evolução da região ITS nuclear é muito mais rápida do que das regiões plastídias (Kress et al., 2005). A estimativa de datação baseada nas sequências ITS também indica uma origem recente para a secção *Nothoscordum*, entre 3-4 milhões de anos atrás, no Plioceno. Trata-se de um período mais seco e frio, com retração das florestas tropicais e expansão das savanas e pastagens (Mercer, 1976), condições favoráveis para a diversificação e dispersão de ervas como as do gênero *Nothoscordum*. De fato, uma porção substancial da diversidade de plantas atual na região Neotropical resultou da rápida diversificação e dispersão no período do Plioceno (Richardson et al., 2001; Erkens et al., 2007).

Além da distribuição descontínua na América do Norte, as amostras sul-americanas de *N. bivalve* apresentaram separadas em distintos clados. Outra espécie filogeneticamente problemática foi *N. ostenii*, cujas análises moleculares, morfológicas

e citogenéticas revelaram se tratar de uma espécie de delimitação complexa. Nessa, são observadas amostras com flores brancas ou amarelas e variação de número cromossômico $2n = 10$ ou $2n = 16$. Esses dados sugerem que *N. bivalve* e *N. ostenii* necessitam de análises populacionais mais amplas (usando marcadores moleculares mais polimórficos) para se compreender melhor a diversidade e delimitação das mesmas.

Embora na secção *Nothoscordum* exista dificuldade na circunscrição de algumas espécies (ver Guaglianone, 1972), a maioria dessas se mostrou filogeneticamente bem suportada. O grupo dos *Nothoscordum* com flores isoladas que havia sido transferido para o gênero *Ipheion* (Guaglianone, 1972), foi claramente relacionado às demais espécies do gênero *Nothoscordum* (Souza et al. 2010), dispersos em diferentes clados. Igualmente a característica cor da flor, também se mostrou homoplásica na secção, contribuindo para confundir as relações filogenéticas entre essas espécies. A proximidade filogenética da maioria das espécies com flores isoladas (*N. hirtellum*, *N. marchesii*, *N. dialystemon* e *N. vittatum*) no clado *Hirtellum*, que compartilham ainda o número cromossômico $2n = 10$, sugere que nessas espécies a presença de flores isoladas seja monofilético. Entretanto, o posicionamento de *N. izaguirrae* e *N. felipponei* no clado *Bivalve* sugere que esse caráter surgiu independentemente mais de uma vez na secção *Nothoscordum*, indicando que o mesmo é homoplásico.

Análises citogenéticas: distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S - Os números cromossômicos e fórmulas cariotípicas analisadas das espécies da secção *Nothoscordum* no presente trabalho estão de acordo com os descritos anteriormente na literatura (Crosa, 1974; Nuñez et al., 1974; Crosa, 2006). As árvores filogenéticas obtidas com

dados moleculares indicam que o número cromossômico básico $x = 4$ é recorrente no gênero e deve ter se formado pelo menos três vezes na secção *Nothoscordum*, enquanto $x = 5$ ($3M + 2A$) parece ser uma caráter plesiomórfico, encontrado também em todas as espécies da secção *Inodorum* e do gênero *Leucocoryne* (Crosa, 1988; Souza, et al. 2012). Portanto, considerando que cada grupo monofilético só pode ter um número básico na sua origem (Guerra, 2008), apenas $x = 5$ deve ser considerado como número básico da secção *Nothoscordum* e do gênero. Portanto, a aparente correlação entre o número básico $x = 4$ da secção *Nothoscordum* e $x = 8$ observado em *Allium* (Jones et al., 1998), seria apenas uma coincidência. A recorrência do $x = 4$ e seus poliplóides deve-se provavelmente às frequentes translocações Robertsonianas, observadas inclusive em indivíduos isolados de *N. arenarium* (Souza et al., 2009) e *N. gracile* (Souza et al., 2012).

Poliploidia intraespecífica foi encontrada aqui tanto em espécies com $2n = 8$ quanto naquelas com $2n = 10$. Além disso, poliploidia interespecífica e intraespecífica são acompanhadas por fusões de acrocêntricos, reduzindo os números cromossômicos tetraploide de $2n = 10$ ($6M + 4A$) para $2n = 18$ e $2n = 19$, assim como observado na secção *Inodorum* (Souza et al., 2012) e no gênero *Leucocoryne* (Crosa 1988). O tetraploide perfeito com $2n = 20$ ($12M + 8A$) foi encontrado somente em *N. bivalve*, *N. grossibulbum* e *Nothoscordum* sp. 3. *Nothoscordum bonariense* com o mais alto $2n$ do grupo, é um alohexaploide derivado provavelmente do cruzamento de *N. bivalve* e *N. gaudichaudianum* (Souza et al. em preparação).

A distribuição de sítios de DNAr 45S nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos de ambas as secções do gênero *Nothoscordum* sugere que essa região de distribuição original desses sítios no gênero (Guerra e Felix, 2000; Souza et al., 2009; 2010; 2012). Sítios de DNAr 45S foram também encontrados na região proximal ou

terminal de cromossomos metacêntricos em várias espécies da secção *Nothoscordum*, mas em nenhuma das espécies analisadas da secção *Inodorum* (Souza et al. 2009; 2012). A distribuição muito variável dos sítios de DNAr 45S com manutenção das fórmulas cariotípicas se deve mais provavelmente a mecanismos de dispersão da sequência de DNAr do que a translocações envolvendo segmentos cromossômicos maiores, provavelmente facilitada pela posição terminal desse sítios (Schubert e Wobus, 1985; Raskina et al., 2004; Pedrosa et al., 2006).

A secção *Nothoscordum* também se destaca por apresentar a maior diversidade no número e posição de sítios de DNAr 5S dentre as espécies da tribo Ipheieae (Souza et al., 2009; 2010; 2012). O incremento de diversidade em sítios de DNAr 5S pode estar associado à amplificação e reinserção dos genes via *extra chromosomal circles* (eccDNA) (Cohen et al., 2010), associação com retrotransposons (Raskina et al., 2004), bem como eventos mais gerais como duplicações, transposições e amplificações/desamplificações (Datson e Murray, 2006). Entretanto, a dispersão dos sítios de DNAr 5S exclusivamente equilocal sugere que eles tenham se dispersado por recombinação não-homóloga entre sítios vizinhos no espaço nuclear em meiose ou mitose. Uma variação similar, com múltiplos sítios equilocais foi observado na secção *Cepa* do gênero *Allium* (Lee et al., 1999).

Conclusões – Evidências morfológicas, moleculares e citológicas sugerem que a secção *Nothoscordum* seja monofilética e bem distinta da secção *Inodorum*. Embora as duas secções do gênero *Nothoscordum* sejam recentes, poderiam ser alçadas a categorias taxonômicas mais altas, como subgêneros.

A taxa de mudanças cariotípicas em função do tempo é extremamente variável em plantas, podendo ser relativamente rápida, como a redução de $2n = 8$ em *Arabidopsis lyrata* para $2n = 5$ em *A. thaliana*, separadas há ~5 MA (Lysak et al. 2006) ou muito lenta, como em espécies do gênero *Hepatica* (Weiss-Schneeweiss et al., 2007). Particularmente, a taxa de mudanças na distribuição dos sítios de DNAr 45S costuma ser elevada, gerando homoplasias, como observada em diferentes acessos de *P. vulgaris* (Pedrosa et al., 2006). Nesse último caso, a origem recente dessa espécie (~1MA; Delgado-Salinas et al., 2006), sugere que esses sítios de DNAr podem evoluir e se dispersar muito rapidamente pelo genoma. Curiosamente, em *P. lunatus*, os sítios de DNAr se mostram notavelmente estáveis, embora com cariótipo, distribuição geográfica e história de cultivo similares (Almeida e Pedrosa-Harand, 2011). Na tribo Ipheieae, essa diversidade no número e posição de sítios de DNAr 5S e 45S é exclusiva da secção *Nothoscordum*, sugerindo que os mecanismos que limitam a variabilidade cariotípica, como a reprodução estritamente sexuada, tenham sido relaxadas, permitindo a manutenção de diferentes fusões cêntricas e dispersão de sítios de DNAr.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências brasileiras Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida a L.G.R.S.

LITERTURA CITADA

- Almeida C, Pedrosa-Harand A. 2011. Contrasting rDNA evolution in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and common bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). *Cytogenet Genome Res* 132:212-217.
- Chiang, T. Y., e Schal, B. A. 2000. Molecular evolution of the atpB-rbcL noncoding spacer of chloroplast DNA in the moss family Hylocomiaceae. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41:85-92.
- Cohen, S., Agmon, N., Sobol, O., e Segal, D. 2010. Extra chromosomal circles of satellite *repeats* and 5S ribosomal DNA in human cells. *Mobile DNA* 1:11.
- Crosa, O. 1972. Estudios cariología en el género *Nothoscordum* (Liliaceae). *Boletin de la Facultad de Agronomia de Uruguay* 122:3-8.
- Crosa, O. 1974. Un híbrido natural en el género *Nothoscordum* (Liliaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 26:471-477.
- Crosa, O. 1975. *Zoellnerallium*, un género nuevo para la tribu Allieae (Liliaceae). *Darwiniana* 19:331-334.
- Crosa, O. 2006. *Nothoscordum izaguirrae*, nueva especie uniflora de Alliaceae de Uruguay. *Hickenia* 61:271-275.
- Datson, P. M., e Murray, B. G. 2006. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Research* 14:845-857.

- Doyle, J. J., e Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Erkens, R. H. J., Chatroub, L. W. , Maasa, J. W., van der Nietc, T., e Savolainen, V. 2007. A rapid diversification of rainforest trees (*Guatteria*; Annonaceae) following dispersal from Central into South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44:399-411.
- Fay, M. F., e Chase, M. W. 1996. Resurrection of Themidaceae for the *Brodiaea* alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. *Taxon* 45:441-451.
- Fay, M. F., Rudall, P. J., e Chase, M. 2006. Molecular studies of subfamily Gilliesioideae (Alliaceae). *Aliso* 22:367-371.
- Guaglianone, E. A. 1972. Sinopsis de las especies de *Ipheion* Raf. Y *Nothoscordum* Kunth (Liliáceae) de Entre Ríos y regiones vecinas. *Darwiniana* 17:159-240.
- Guerra, M., e Felix, L. P. 2000. O cariótipo de *Nothoscordum pulchellum* (Alliaceae) com ênfase na heterocromatina e sítios de DNAr. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 35:283-289.
- Guerra, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research* 120:339-350.
- Hall, K. J., e Parker, J. S. 1995. Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chromosome Research* 3:417-422.

- Hamilton, M. B. 1999. Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraespecific variation. *Molecular Ecology* 8:513-525.
- Howard, T. M. 1993. A review of the genus *Nothoscordum* in cultivation. *Garlic* 2:2-13.
- Iovene, M., Grzebelus, E., Carputo, D., Jiang, J., e Simon, P. W. 2008. Major cytogenetic landmarks and karyotype analysis in *Daucus carota* and other Apiaceae. *American Journal of Botany* 95: 793-804.
- Jones, K. 1998. Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. *Botanical Review* 64:273-89.
- Kay KM, Whittall JB, Hodges SA (2006) A survey of nuclear ribosomal internal transcribed spacer substitution rates across angiosperms: an approximate molecular clock with life history effects. *BMC Evolutionary Biology* 6:1-9.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., e Janzen, D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8369-8374.
- Lee, S. H., Do G. S., e Seo, B. B. 1999. Chromosomal localization of 5S rRNA gene loci and the implications for relationships within the Allium complex. *Chromosome Research* 7:89-93.
- Lomáscolo, S. B., Speranza, P., e Kimball, R. T. 2008. Correlated evolution of fig size and color supports the dispersal syndromes hypothesis. *Oecologia* DOI 10.1007/s00442-008-1023-0.

- Mercer, J. H. 1976. Glacial history of southernmost South America. *Quaternary Research* 6:125-166.
- Moraes, A.P., Soares Filho, W.S., e Guerra, M. 2007. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Research* 15:115-121
- Núñez, O., Frayssinet, N., e Rodriguez, R. H. 1972. Los cromossomos de *Nothoscordum* Kunth (*Liliaceae*). *Darwiniana* 17:243-245.
- Pedrosa-Harand, A., Almeida, C. C. S., Mosiolek, M., Blair, M. W., Schweizer, D., e Guerra, M. 2006. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor Appl Genet* 112:924-933.
- Raskina, O., Belyayev, A., e Nevo, E. 2004. Quantum speciation in *Aegilops*: Molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14818-14823.
- Renner, S. S. 2005. Relaxed molecular clocks for dating historical plant dispersal events. *Trends in Plant Science* 10:1360-1385.
- Richardson, J. E., Pennington, R. T., Pennington, T. D., e Hollingsworth, P. M. 2001. Rapid diversification of a species-rich genus of Neotropical rain forest trees. *Science* 293:2242-2245.
- Schubert, I., e Wobus, U. 1985. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92:143-148.

- Souza, L. G. R., Crosa, O., e Guerra, M. 2009. The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): a populational and cytomolecular analysis. *Genetics and Molecular Biology* 32:111-116.
- Souza, L. G. R., Crosa, O., e Guerra, M. 2010. Karyological circumscription of *Ipheion Rafinesque* (Gilliesioideae, Alliaceae). *Plant Systematic and Evolution* 287:119-127.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., e Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17:1105-1109.
- Verboom, G.A., Linder, H.P., e Stock, W.D. 2003. Phylogenetics of the grass genus *Ehrharta* : evidence for radiation in the summer-arid zone of the South African Cape. *Evolution* 57:1008-1021.
- Weiss-Schneeweiss, H., Schneeweiss, G.M., Stuessy, T.F., Mabuchi, T., Park, J.M., Jang, C.G., e Sun, B.Y. 2007. Chromosomal stasis in diploids contrasts with genome restructuring in auto- and allopolyploid taxa of *Hepatica* (Ranunculaceae). *New Phytologist* 174:669-682.

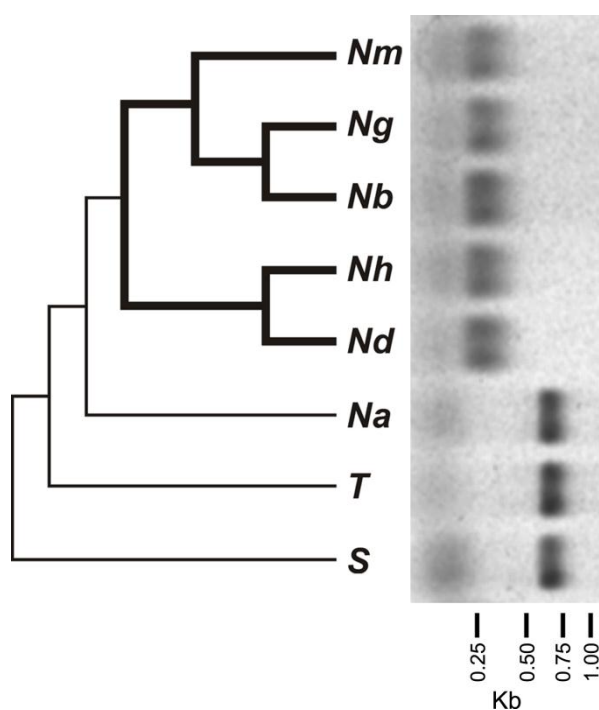


Fig. 1 – Relações filogenéticas entre as espécies da secção *Nothoscordum* (linhas mais espessas) baseadas em ITS e separação por eletroforese do produto de PCR da região plastidial *psbA-trnH*. *N. montevidense* (*Nm*), *N. gaudichaudianum* (*Ng*), *N. bivalve* (*Nb*), *N. hirtellum* (*Nh*), *N. dialystemon* (*Nd*), *N. arenarium* (*Na*), *Tristagma* sp. (*T*) e *Speea triloba* (*S*).

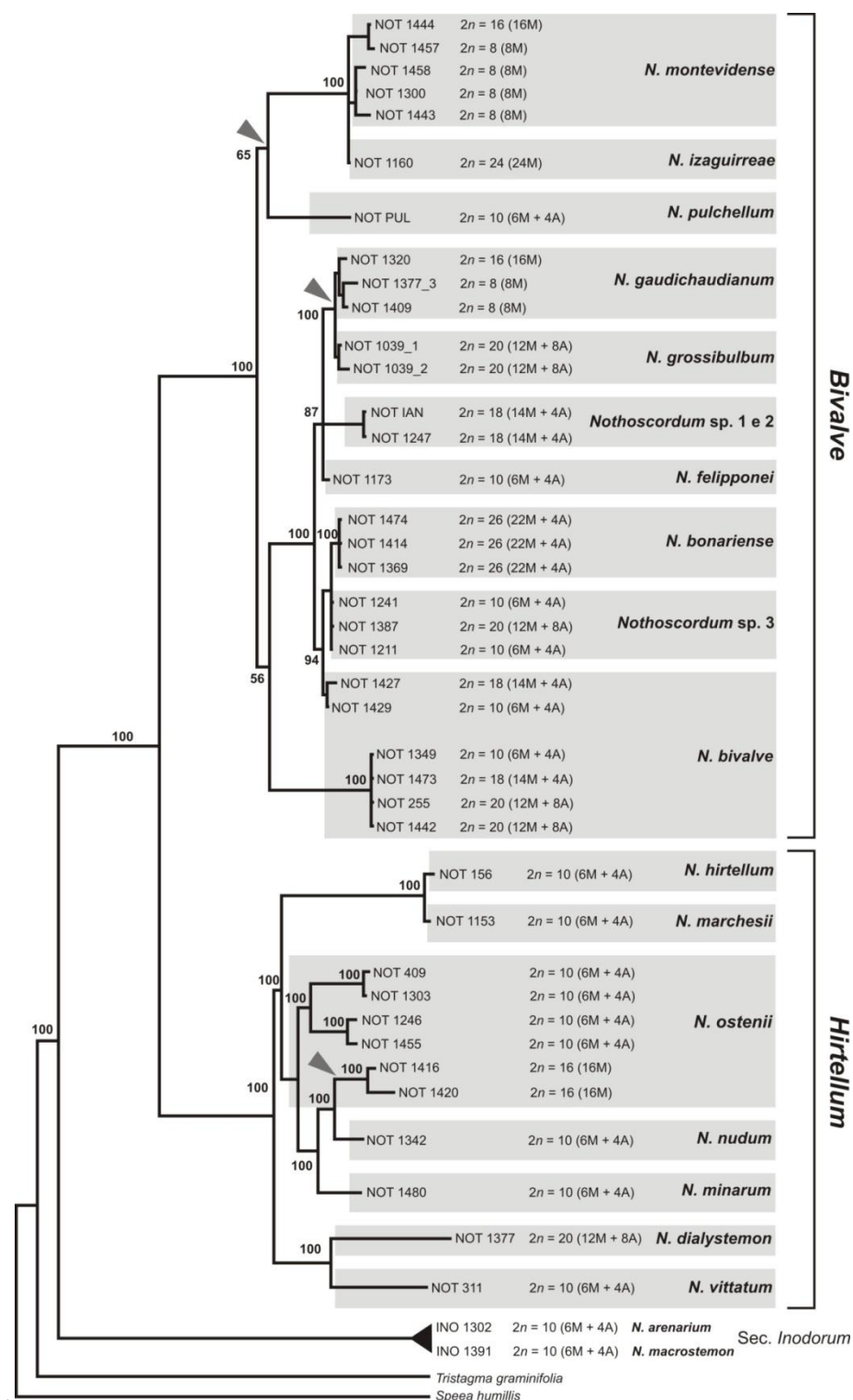


Fig. 2 – Filogenia das espécies da secção *Nothoscordum* baseada em sequências ITS.

Valores sobre os clados indicam os índices de *bootstrap*. Cabeças de seta indicam

mudança do número cromossômico básico $x = 5$ ($3M + 2A$) para $x = 4M$. Retângulos em cinza delimitam as amostras de uma mesma espécie.

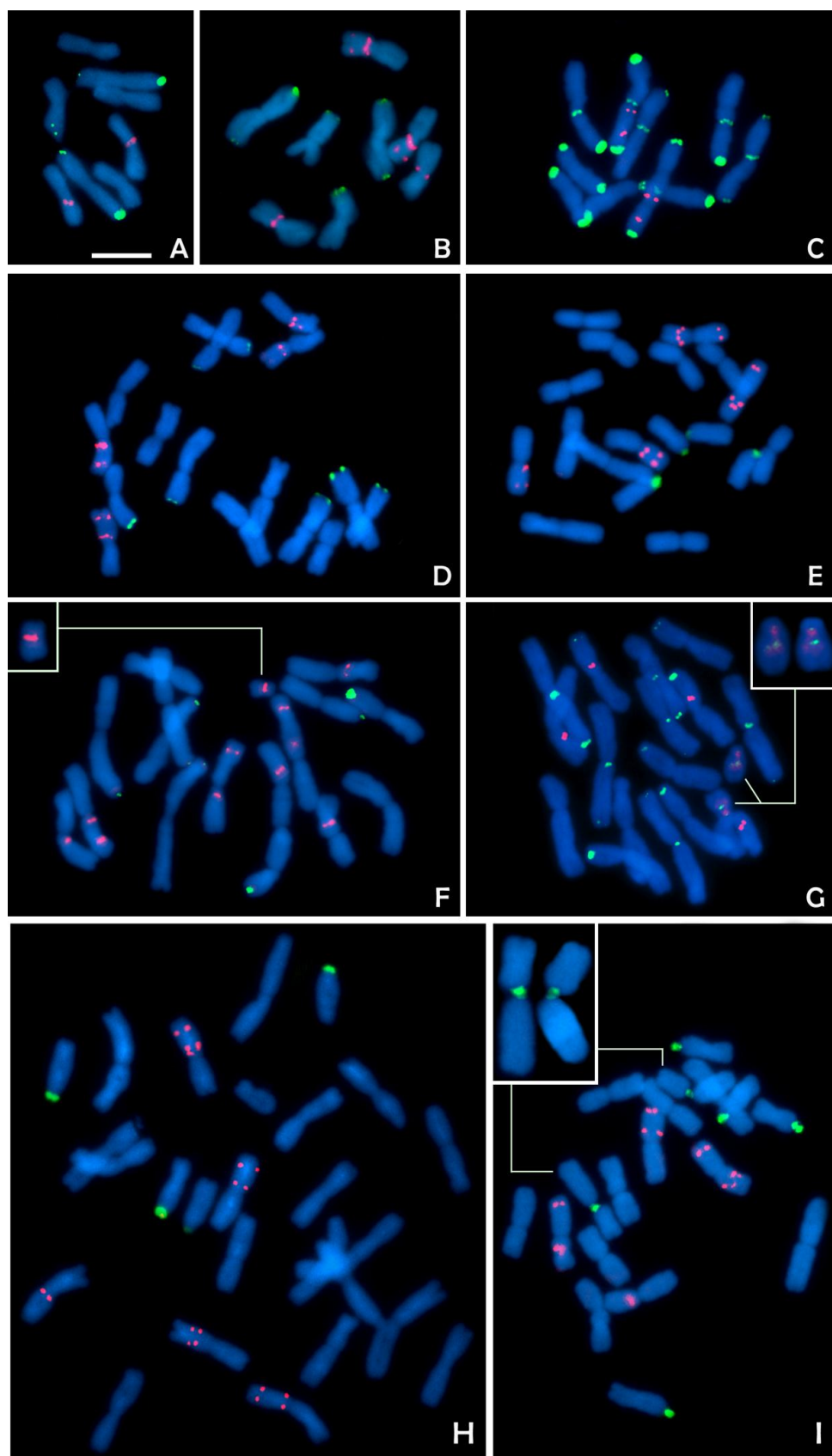


Fig. 3 – Distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em complementos cromossômicos de espécies da secção *Nothoscordum*. Citótipos de *N. montevidense* diploide ($2n = 8M$) (**A-B**) e tetraploides com $2n = 16M$ (**D e F**) com diferentes números de sítios de DNAr 5S. *Nothoscordum marchesii* ($2n = 10, 6M + 4A$) (**C**), *N. bivalve* ($2n = 18, 14M + 4A$) (**E**), *N. ostenii* ($2n = 16M + 2B$) (**G**), *N. bonariense* ($2n = 21M + 5A$) (**H**), *Nothoscordum* sp. 1. ($2n = 18, 14M + 4A$) (**I**). Insertos em **I** mostra um par de metacêntricos com sítios de DNAr 45S proximais e em **F e G** mostra cromossomos B. Barra em **A** representa 10 μm .

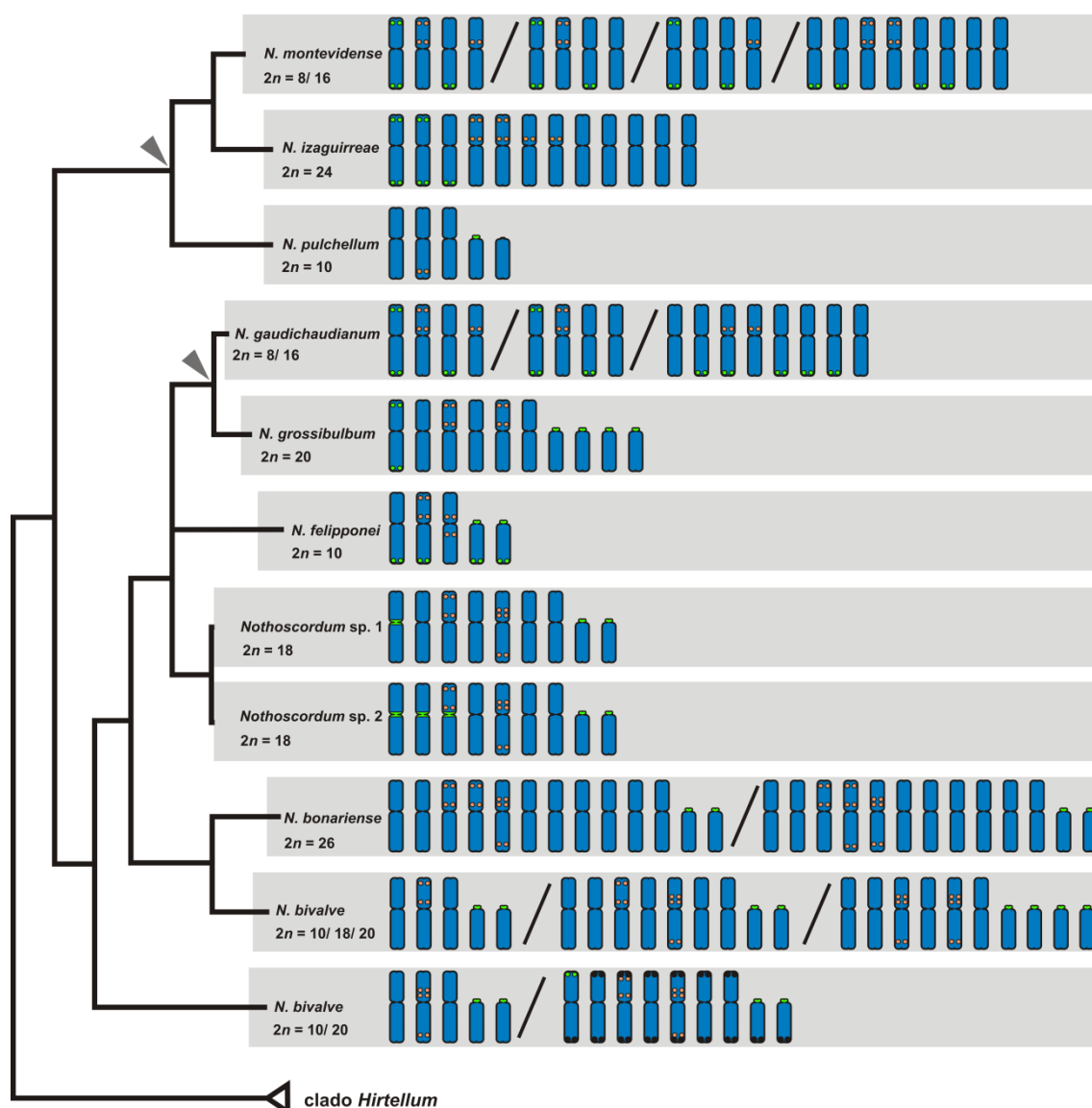


Fig. 4 – Relações filogenéticas baseada em ITS e variabilidade cariotípica das espécies do clado *Bivalve* da secção *Nothoscordum*. Idiogramas esquemáticos à direita apresentam a distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) nas espécies analisadas. Cabeças de setas indicam pontos de mudança de número básico.

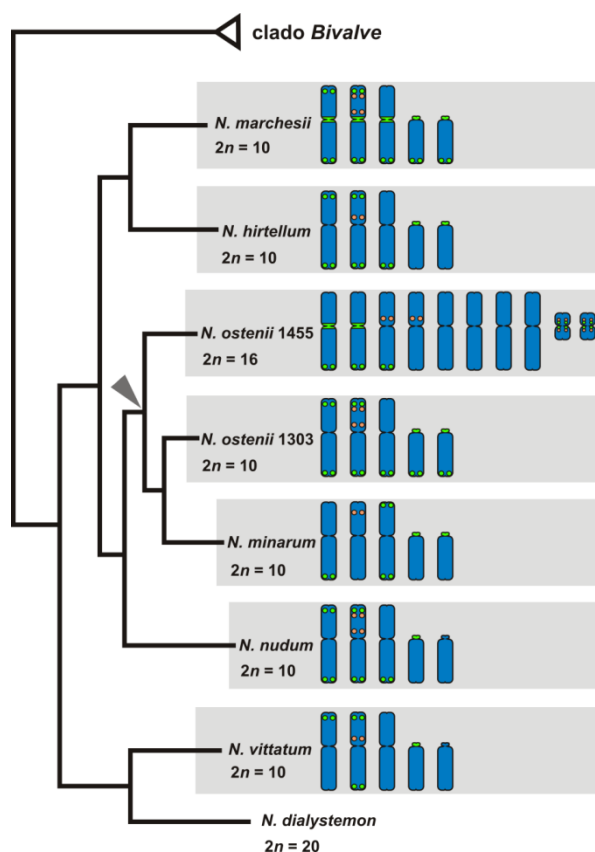


Fig. 5 – Relações filogenéticas baseada em ITS e variabilidade cariotípica das espécies do clado *Hirtellum* da secção *Nothoscordum*. Idiogramas esquemáticos à direita apresentam a distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) nas espécies analisadas. Cabeça de seta indica ponto de mudança de número básico.

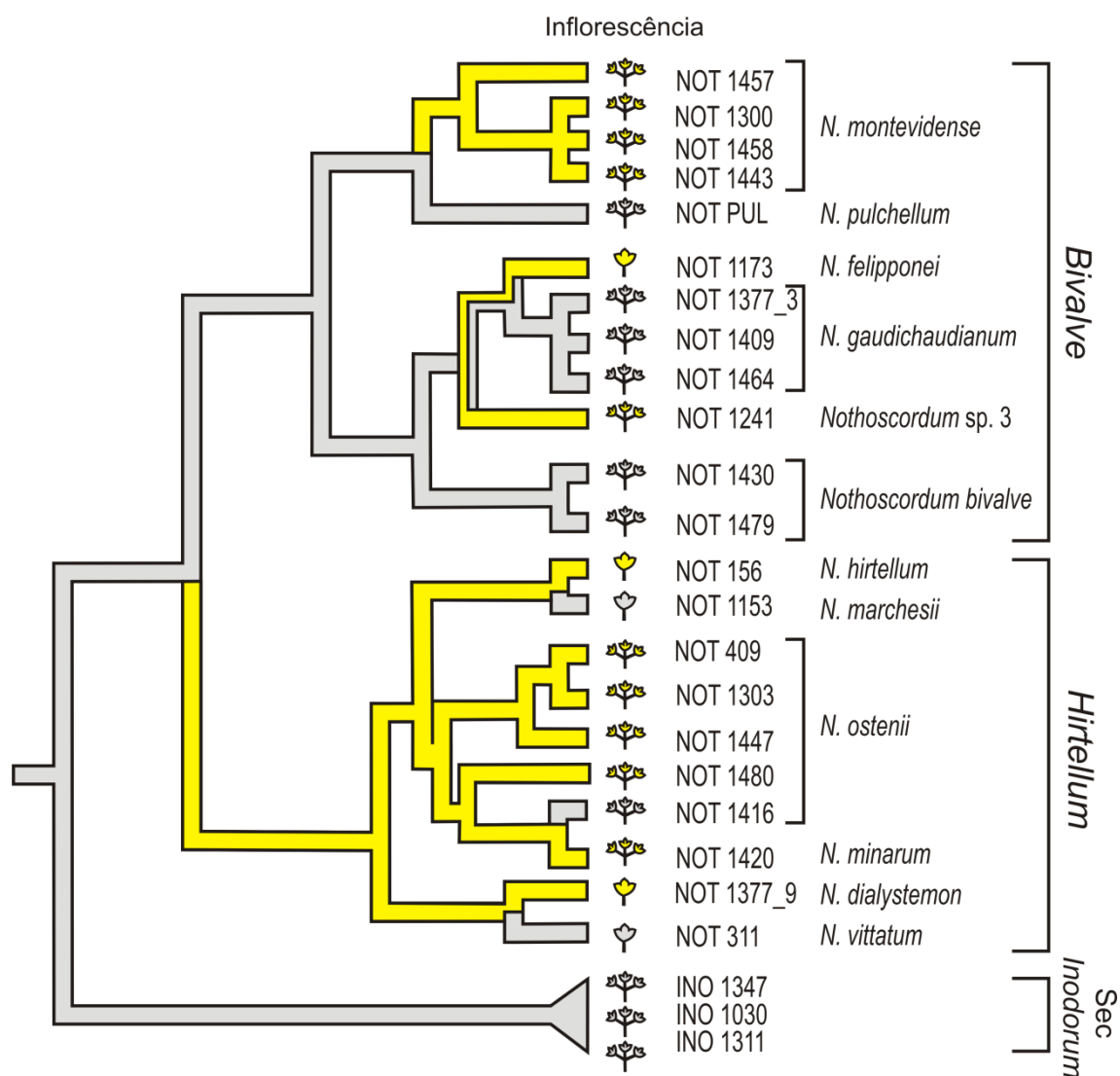


Fig. 6 – Variação da cor da flor e tipo de inflorescência na secção *Nothoscordum*. As flores podem ser brancas (linhas brancas) ou amarelas (linhas amarelas). As flores estão separadas em “unifloras” (simples) ou multifloras (umbela).

Tabela 1 – Espécies analisadas da secção *Nothoscordum* com locais de coleta, número cromossômico ($2n$), fórmula cariotípica, número fundamental (NF) e distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S por complemento cromossômico. Os dados cariotípicos dos grupos externos foram reproduzidos de publicações prévias (Souza et al., 2009; 2010; em preparação).

Clado	Espécie	Procedência	Código da amostra	$2n$	Fórmula cariotípica	NF	Sítios de DNAr	
							5S	45S
Bivalve	<i>N. montevidense</i> Beauverd	Montevidéu, Uruguai	NOT 1300	8	8M	16	2	6
		Montevidéu, Uruguai	NOT 1458	8	8M	16	6	6
		Ruta 5, Florida, Uruguai	NOT 1443	8	8M	16	4	6
		Montevidéu, Uruguai	NOT 1457	8	8M	16	6	6
		Montevidéu, Uruguai	NOT 1444	16	16M	32	8	8
		Montevidéu, Uruguai	NOT 1443	16 + 1B	16M	32	10	8
	<i>N. izaguirrae</i> Crosa	Rio Santa Lucía, Lavalleja, Uruguai	NOT 1160	24	24M	48	14	10
	<i>N. pulchellum</i> Kunth	Caruarú-PE, Brasil	NOT PUL	10	6M + 4A	16	2	2

Bivalve	<i>N. grossibulbum</i> Beauverd	Cerro Pan de Azucar, Maldonado, Uruguay	NOT 1039	20	12M + 8A	32	8	12
	<i>N. gaudichaudianum</i> Kunth	Uruguay	NOT 1408	8	8M	16	4	6
		Uruguay	NOT 1327	8	8M	16	6	6
		Arrojo Comvoy, 33, Uruguay	NOT 1320	16	16M	32	4	10
	<i>N. felipponei</i> Beauverd	Minas, Lavalleja, Uruguay	NOT 1173	10	6M + 4A	16	8	12
	<i>N. bonariense</i> Beauverd	Montevideú, Uruguay	NOT FAG	26	22M + 4A	48	16	4
		Pajas Blancas, Montevideú, Uruguay	NOT PB	26	22M + 4A	48	14	4
		Arroyo Taquiary, Serro Largo, Uruguay	NOT 1369	26	22M + 4A	48	14	4
		Montevideú, Uruguay	NOT 1715	26	21M + 5A	47	11	4
	<i>N. bivalve</i> (L.) Britton	Sierra de Mahoma, Depto. San José, Uruguay	NOT 1349	10	6M + 4A	16	6	4
		Bella Union, Artigas, Uruguay	NOT 1428	10	6M + 4A	16	4	4

<i>Hirtellum</i>		Ruta 30 km 38, arroyo Tira Poncho	NOT 1427	18	14M + 4A	32	10	4
			NOT 1442	20	12M + 8A	32	12	8
		Bella Union, Artigas, Uruguai	NOT 1429	20	12M + 8A	32	12	8
		Texas, EUA	NOT 1473	18	14M + 4A	32	10	6
	<i>Nothoscordum</i> sp. 1	Chile	NOT IAN	18	14M + 4A	32	10	6
	<i>Nothoscordum</i> sp. 2	Chile	NOT 1247	18	14M + 4A	32	10	10
	<i>Nothoscordum</i> sp. 3	Algorta Ruta 90, Paysandú, Uruguai	NOT 1241	10	6M + 4A	16	?	4
			NOT 1387	20	12M + 8A	32	?	?
			NOT 1211	10	6M + 4A	12	?	8
	<i>N. hirtellum</i> (Kunth) Herter	Sierra de las Ánimas, Maldonado, Uruguai	NOT 156	10	6M + 4A	16	2	14
	<i>N. marchesii</i> Crosa	Sierra de San Miguel, Rocha, Uruguai	NOT 1153	10	6M + 4A	16	4	24

<i>N. ostenii</i> Beauverd	Uruguai	NOT 409	10	6M + 4A	16	2	10
	Cuidad de Melo, Taquarembó, Uruguai	NOT 1303	10	6M + 4A	16	4	18
	Arroyo del Perdido, Minas, Uruguai	NOT 1420	10	6M + 4A	16	2	10
	San Carlos, Maldonado, Uruguai	NOT 1455	16 +2B	16M	16	4	10
	Argentina	NOT1246	16	16M	16	4	10
<i>N. nudum</i> Beauverd	Lavalleja, Uruguai	NOT 1342	10	6M + 4A	16	4	12
<i>N. minarum</i> Beauverd	Minas, Uruguai	NOT 1480	10	6M + 4A	16	2	10
<i>N. vittatum</i> (Griseb) Ravenna	Uruguai	NOT 311	10	6M + 4A	16	2	12
<i>N. dialystemon</i> (Guagl) Crosa	Ruta 3 km 175, Uruguai	NOT 1377_9	20	12M + 8A	32	?	?

Tabela 2 – Loci plastidiais e nucleares analisados para filogenia molecular da secção *Nothoscordum* e a variabilidade de sequências para cada região.

Locus	Comprimento da sequência (pb)	Sítios informativos para parcimônia (pb)	Divergência das sequências (%)
<i>atpB-rbcL</i>	775	4	0,51
<i>trnL-trnF</i>	914	6	0,65
<i>psbA-trnH</i>	155*	5	3,22
<i>trnG</i>	706	9	1,27
<i>trnS-trnG</i>	730	10	1,36
ITS	653	90	13,78

* Considerando a deleção de 430 bp

Capítulo VI - Evidências cito-moleculares revelam duas linhagens divergentes de espécies tetraplóides no gênero *Leucocoryne* Lindl (Gilliesioideae, Alliaceae)

Luiz Gustavo Rodrigues Souza · Orfeo Crosa · Marcelo Guerra

L. G. R. Souza

Laboratory of Plant Cytogenetics, Department of Botany, CCB, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

O. Crosa

Laboratory of Genetics, Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, University of the Republic, Montevideo, Uruguai

M. Guerra (*)

Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, S/N, Cidade Universitária, Recife, PE 50372-970, Brasil

e-mail: msfguerra@hotmail.com

Resumo *Leucocoryne* é um gênero endêmico do Chile, formado por aprox. 14 espécies. A maioria das espécies desse gênero apresenta uma redução de seis para três estames férteis quando comparado às demais espécies da tribo Ipheieae (Gilliesioideae, Alliaceae). Entretanto, algumas espécies conservam todos os estames férteis, o que levou alguns autores a agrupar-las num gênero à parte, *Pabellonia*. Considerando que os gêneros da tribo *Ipheieae* diferem geralmente entre si por mudanças no número cromossômico básico e em outros caracteres cariotípicos, foi feita uma análise citotaxonômica detalhada de espécies de *Leucocoryne*, com “três estames” (*L. appendiculata*, *L. coquimbensis*, *L. ixioides*, *L. talinensis*, *L. vitatta* e *L. violascens*) e “seis estames” (*L. dimorphopetala* e *L. narcisoides*). As espécies com “três estames” foram diploides com $2n = 10$ (6M + 4A) ou tetraploides com $2n = 18$ (14M + 4A), enquanto as espécies com “seis estames” foram tetraploides com $2n = 18$ (14M + 4A) ou $2n = 19$ (13M + 6A). Os sítios de DNAr 45S foram sempre localizados em todos os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos dos diploides e tetraploides. Entre as espécies com “três estames” se observaram sítios de DNAr 5S em um e dois ou quatro pares de cromossomos metacêntricos nos diploides e tetraploides, respectivamente. As duas espécies de “seis estames” também apresentaram quatro pares de sítios de DNAr 5S, porém distribuídos em metacêntricos e acrocêntricos. Somados às diferenças morfológicas e dados de distribuição geográfica, principalmente o número de estames, esses dados sugerem que essas espécies formem um clado a parte, embora as diferenças citológicas encontradas sejam de baixa magnitude e por si só não justifiquem a formação de um gênero a parte.

Palavras-chave Citotaxonomia • sítios de DNAr • bandas CMA⁺ • *Leucocoryne* • *Pabellonia* • Tribo Ipheieae

Introdução

Leucocoryne Lindl é um gênero endêmico do Chile, formado por aprox. 14 espécies distribuídas entre as latitudes 20° e 37°S com maior diversidade na zona mediterrânea árida/semi-árida no norte do país (Zoellner 1972; Mansur and Cisternas 2005). O gênero apresenta uma grande variabilidade na morfologia floral, especialmente na cor, forma e tamanho das tépalas (Zoellner 1972). Essa diversidade fenotípica aliada à presença de flores vistosas, hábito perene e fácil cultivo em jarros tornam o gênero particularmente interessante do ponto de vista ornamental (Mansur 2002).

Uma das características morfológicas que distingue *Leucocoryne* dos demais gêneros da tribo Ipheieae é presença de um tubo floral formado por seis tépalas conchadas em sua parte inferior com seis lacínias em duas séries, três interiores formados por três estames funcionais e três exteriores em forma de estaminódios vistosos e de cor/tamanho variável (Zoellner 1972). Zoellner (1973) excluiu do gênero *Leucocoryne* as espécies *L. oxypetala* Phil e *L. incompressa* Phil, por possuírem seis estames férteis no tubo floral, criando um novo gênero, *Chrysocoryne* Zoellner. Entretanto, como esse nome já era utilizado para um gênero de Asteraceae, o mesmo foi renomeado *Pabellonia* Quezada & Martic (Quezada e Marticorena 1976). Crosa (1988) considerou essa variação no número de estames funcionais insuficiente para criar um novo gênero. Outros autores reconheceram esse grupo de espécies com “seis estames” como subgênero *Stemmatium* (Phil) Ravenna ou seção *Stemmatium* (Phil) Grau (Ravenna 1978, 2003; Grau, 1991). Uma análise filogenética baseada em regiões plastidiais *rbcL*, íntron *trnL*, *trnL-F* e íntron *rps16* e nuclear ITS concluíram que o gênero *Leucocoryne sensu lato* (sl) é monofilético e que as espécies de “seis estames”

formavam um clado irmão das espécies com “três estames”, embora tenha amostrado poucas espécies (Fay et al. 2006).

Considerando que os gêneros da tribo *Ipheieae* diferem geralmente entre si por mudanças no número cromossômico básico e em outros caracteres cariotípicos (Souza et al. 2010), uma análise citotaxonômica poderia esclarecer as relações entre *Leucocoryne* e *Pabellonia*. Essas espécies, assim como nas demais Gilliesioideae, apresentam cromossomos grandes (alguns maiores que 20 μm), predominantemente metacêntricos (M) ou acrocêntricos (A) com diplóides apresentando $2n = 10$ (6M + 4A) e tetraplóides $2n = 18$ (14M + 4A) provavelmente devido a uma fusão cêntrica em um cariótipo com $2n = 20$ (12M + 8A) (Crosa 1988; Araneda et al. 2004). Na zona de contato entre populações naturais de *L. purpurea* Gay ($2n = 10$) e *L. coquimbensis* F Phil ($2n = 18$) foram observadas plantas com o fenótipo intermediário e $2n = 14$ (10M + 4A) ou $2n = 22$ (17M + 5A) sugerindo a ocorrência de hibridação interespecífica natural (Salas e Mansur 2004). Embora todas as espécies de “seis estames” sejam tetraplóides, algumas espécies com “três estames” também são, o que revela que apenas a análise de número e morfologia cromossômica não permite distinguir esses grupos (Crosa 1988). Em outros gêneros da tribo *Ipheieae*, a análise da distribuição de bandas heterocromáticas reveladas pelos fluorocromos cromomicina A_3 (CMA) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e dos sítios de DNAr 5S e 45S por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem contribuído para um melhor entendimento da citotaxonomia desses grupos (Souza et al. 2009; 2010). Nesse trabalho foi feita uma análise citotaxonômica das espécies do gênero *Leucocoryne sensu lato* baseada em número e morfologia cromossômica, dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI e distribuição de sítios de DNAr 5S e 45S.

Material e Métodos

Material vegetal

Foram analisadas nove espécies do gênero *Leucocoryne sensu lato* sendo sete de “três estames” (*L. appendiculata* Phil, *L. coronata* Ravenna, *L. coquimbensis*, *L. ixioides* Lindl, *L. talinensis* Mansur & Cisternas, *L. vitatta* Ravenna e *L. violascens* Phil) e duas de “seis estames” (*L. dimorphopetala* e *L. narcissoides*). As amostras de *L. talinensis*, *L. ixioides*, *L. narcissoides* e *L. appendiculata* foram coletadas no Chile (Tabela 1), enquanto as demais foram obtidas de um fornecedor comercial de plantas ornamentais chilenas (www.chileflora.com) e tiveram sua identificação confirmada com base em análise morfológica dessas plantas em cultivo. Os locais de coleta e espécies analisadas são apresentados na Tabela 1. Os vouchers foram depositados no Herbário da Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideu, Uruguai (MUFA).

Bandeamento com fluorocromos e FISH

Pontas de raízes obtidas de bulbos foram pré-tratadas com colchicina 0,05%, durante 24 horas a 10 °C, fixadas em etanol:ácido acético (3:1; v/v) por 2 a 24 horas a temperatura ambiente e armazenadas a –20 °C. As raízes fixadas foram lavadas em água destilada e digeridas em solução de celulase (Onozuka) 2% (w/v)–pectinase (Sigma) 20% (v/v) a 37 °C por 90 min. O meristema foi macerado em uma gota de ácido acético 45% e a lamínula foi removida em nitrogênio líquido. O bandejamento CMA e a FISH foram realizados de acordo com Souza et al. (2009).

Para a técnica de dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI, lâminas envelhecidas por três dias foram coradas com CMA (0,1 mg/ml) por 60 min e

subsequentemente com DAPI (1 µg/ml) por 30 min. As lâminas foram montadas em tampão McIlvaine pH 7.0: glicerol (1:1) e envelhecidas por três dias antes da análise em um microscópio de epifluorescência Leica DMLB. As imagens foram capturadas com uma camera de video Cohu CCD usando o *software* Leica QFISH e depois editadas no Adobe Photoshop CS3 versão 10.0.

Foram utilizadas como sondas para localizar os sítios de DNAr, um clone DNAr 5S (D2) com 500 pb obtido de *Lotus japonicus* e marcado com Cy3-dUTP (GE) e um clone 18S-5.8S-25S (R2) com 6.5 kb obtido de *Arabidopsis thaliana* e marcado com digoxigenina-11-dUTP. Ambas as marcações foram feitas por *nick translation* (Roche). A sonda do DNAr 45S foi detectada com anticorpo anti-digoxigenina conjugado com FITC (Roche) desenvolvido em ovelha e o sinal foi amplificado com anticorpo anti-ovelha conjugado com FITC (Dako) desenvolvido em camundongo. A mistura de hibridização conteve 50% formamida, 10% dextran sulfato, 2× SSC e 5 ng/µl de cada sonda. As lâminas foram desnaturadas a 75 °C por 3 min. As lavagens pós-hibridização foram realizadas para uma estringência final de 76%. As imagens das melhores células foram capturadas como descrito previamente.

Resultados

As espécies de *Leucocoryne* apresentaram cariótipos formados por cromossomos metacêntricos (M) e acrocêntricos (A), com o número cromossômico básico $x = 5$ ($3M + 2A$). Os números cromossômicos e as fórmulas cariotípicas dessas espécies foram idênticos ao previamente reportado para complementos diploides e tetraploides (Crosa, 1988), exceto o cariótipo de *L. narcisoides* ($2n = 19$; $13M + 6A$) que não havia sido descrito anteriormente. A dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI revelou bandas $CMA^+/DAPI^-$ localizadas nos braços curtos de todos os cromossomos acrocêntricos (Fig. 1a). Adicionalmente foram observados blocos $CMA^-/DAPI^+$ adjacentes à banda CMA^+ no braço curto de um e dois cromossomos acrocêntricos de *L. ixiioides* (Fig. 1b) e *L. violascens* (Fig. 1c), respectivamente. Essas bandas $DAPI^+$ pareceram corresponder aos blocos de cromatina condensados localizados nos núcleos interfásicos próximos ao nucléolo (Fig. 1d). Os sítios de DNAr 45S foram co-localizados com as bandas CMA^+ dos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos em todas as espécies analisadas (Fig. 1-2).

Três espécies com “três estames” foram diplóides, *L. coquimbensis*, *L. purpurea* e *L. vittata*, com $2n = 10$ ($6M + 4A$) e distribuição de DNAr muito similares (Fig. 1a). Nessas, os sítios de DNAr 5S foram localizados na região terminal de um par de cromossomos metacêntricos (Fig. 1a). Em um indivíduo de *L. coquimbensis* foi observada a presença de sítios de DNAr 5S duplicados em um dos cromossomos do par de homólogos (Fig. 1a). *Leucocoryne coquimbensis* apresentou um citótipo tetraploide com $2n = 18$ ($14M + 4A$) e uma duplicação exata no número de sítios de rDNA 5S.

Dentre os tetraplóides, *L. appendiculata*, *L. coronata*, *L. dimorphopetala*, *L. ixiioides*, *L. talinensis* e *L. violascens* apresentaram $2n = 18$ ($14M + 4A$) e *L. narcisoides*

apresentou $2n = 19$ (13M + 6A). Apenas *L. ixioides* e *L. violascens* apresentaram sítios de rDNA 5S na região terminal de dois pares de cromossomos metacêntricos, portanto uma exata duplicação em relação às espécies diploides (Fig. 1b). *Leucocoryne coronata* apresentou um par de metacêntricos com sítios de DNAr 5S intersticiais e um par de acrocêntricos com sítios de DNAr 5S duplicados, localizados na região intersticial do braço longo e no braço curto (Fig. 1e).

Nos tetraplóides com “três estames” *L. talinensis* e *L. appendiculata*, bem como nos tetraploides com “seis estames”, *L. dimorphopetala* e *L. narcisoides*, foi observada uma duplicação no número de sítios de DNAr 5S em relação aos demais tetraplóides. Em *L. talinensis* e *L. appendiculata* apresentaram o sítios de DNAr 5S na região terminal de dois pares de cromossomos metacêntricos e na região intersticial de outros dois pares de metacêntricos (Fig. 1f-g). As espécies de “seis estames” *L. dimorphopetala* e *L. narcisoides* apresentaram o mesmo número de sítios de DNAr 5S das demais, porém distribuídos em cromossomos metacêntricos e acrocêntricos. Nessas foram observados um e três cromossomos acrocêntricos portadores de sítios de DNAr 5S, respectivamente (Fig. 1h-i). *Leucocoryne narcisoides* ($2n = 19$; 13M + 6A), que apresentou o cariótipo alterado em relação aos demais tetraplóides, com sítios de DNAr 45S nos braços curtos dos acrocêntricos extras.

Esses dados sugerem três grupos citologicamente distintos dentro de *Leucocoryne*: diplóides com um par de sítios de DNAr 5S (*L. coquimbensis*, *L. purpurea* e *L. vittata*), tetraplóides com quatro pares de sítios de DNAr 5S (*L. coronata*, *L. ixioides* e *L. violascens*) e tetraplóides com oito pares de sítios de DNAr 5S (*L. appendiculata*, *L. dimorphopetala*, *L. narcisoides* e *L. talinensis*) (Fig. 2). Os diplóides se encontram distribuídos na Região IV do Chile, os tetraplóides mais ao sul entre as Regiões IV e VIII e os tetraplóides com sítios de 5S duplicados mais ao norte entre as

Regiões I e IV (Fig. 3). Idiogramas e principais mudanças de número e posição de sítios de DNAr nas espécies de *Leucocoryne* são apresentados na Fig. 2.

Discussão

As espécies de *Leucocoryne* apresentam número e morfologia cromossômica muito semelhante ao observado nas espécies do gênero *Nothoscordum* da secção *Inodorum*, com diploides apresentando $2n = 10$ (6M + 4A) e tetraploides $2n = 18$ (14M + 4A) (Crosa 1988; Souza et al. 2012). O cariótipo $2n = 18$ dos tetraploides dos dois gêneros parece representar uma redução dispoloide do cariótipo esperado $2n = 20$ (12M + 8A), devida a uma fusão cêntrica. Em algumas espécies do complexo *Inodorum* do gênero *Nothoscordum* parece haver uma seleção a favor dos cariótipos com $2n = 19$ (13M + 6A), recorrente e amplamente distribuído pela América do Sul com poucas populações apresentando $2n = 18$ (14M + 4A) (Souza et al. 2012). A ocorrência de $2n = 19$ em *N. narcissoides*, ao invés de $2n = 18$ (Arenada et al. 1988), sugere um caso similar de vantagem do heterozigoto estrutural para fusão/fissão cêntrica. O cariótipo $2n = 19$ (13M + 6A) em *Leucocoryne* e *Nothoscordum* constitui uma homoplasia rara na evolução desses gêneros separados por diversas características morfológicas, filogenéticas e biogeográficas. Em *Leucocoryne* como em outros grupos de plantas foi observada uma maior variabilidade na distribuição de sítios de DNAr nos tetraploides que nos diploides relacionados, o que pode ser promovido pelo estresse genômico decorrentes da poliploidização ou pela progressiva inativação e eliminação de alguns sítios de DNAr durante o processo de diploidização dos poliploides (Hasterok et al. 2006; Lim et al. 2007; Pellicer et al. 2010).

Nos tetraplóides de “três estames” *L. ixioides* e *L. violascens* a presença exclusiva de bandas DAPI⁺ em um par de acrocêntricos sugere que essas espécies que compartilham o mesmo número e posição de sítios de DNAr 5S e a mesma distribuição geográfica (Muñoz and Moreira 2000) sejam mais proximamente relacionadas. De

forma semelhante, os tetraploides *L. appendiculata*, *L. dimorphopetala*, *L. narcisoides* e *L. talinensis*, que apresentam o mesmo número de sítios de DNAr 5S, compartilham distribuição geográfica similar (Muñoz and Moreira 2000) e formam um grupo mais relacionado entre si. Dessas, as espécies com “seis estames” *L. dimorphopetala* e *L. narcisoides* foram as únicas a apresentar sítios de DNAr 5S em cromossomos acrocêntricos. Tendo em vista que elas conservam o número e posição dos sítios de DNAr em relação a *L. appendiculata* e *L. talinensis*, a transferência desses sítios para cromossomos acrocêntricos deve ter se dado por translocações recíprocas envolvendo braços cromossômicos inteiros (Fig. 3). Em populações naturais de *Nothoscordum arenarium* foi observado um indivíduo com uma translocação recíproca que transferiu o sítio de DNAr 5S de um cromossomo metacêntrico para um acrocêntrico (Souza et al. 2009). Uma translocação semelhante foi observada em um indivíduo de *N. gracile*, nesse caso caracterizada por uma banda CMA⁺, presente no braço longo dos acrocêntricos transferida para um cromossomo metacêntrico (Souza et al. 2012). Outras possibilidades para explicar a mudança na posição de sítios de DNAr 5S são sua associação com *chromosomal circles* (eccDNA) (Cohen et al. 2010) ou retrotransposons (Raskina et al. 2004), mas a conservação da sua posição em todos os casos reforça a primeira hipótese.

A grande maioria das espécies de *Leucocoryne* está distribuída entre as Regiões IV e V do Chile (Muñoz e Moreira 2000), que deve corresponder ao centro de origem do gênero. Nessa região são encontrados todos os diploides analisados, enquanto os tetraploides se distribuem mais ao sul, chegando até a Região VIII (*L. ixioides*, *L. violascens* e *L. coronata*) ou mais ao norte, se aproximando do deserto do Atacama (*L. dimorphopetala*, *L. narcisoides*, *L. talinensis* e *L. appendiculata*). As espécies tetraplóides distribuídas mais ao norte compartilham o número mais elevado de sítios de

DNAr 5S que os tetraplóides do sul, sugerindo que existam duas linhagens distintas de tetraplóides no gênero *Leucocoryne*.

As espécies da família Alliaceae apresentam caracteristicamente seis estames funcionais (Rudall et al. 2006), com exceção da maioria das espécies de *Leucocoryne* que apresenta três estames funcionais e três convertidos em estaminódios (Zoellner 1972). A conservação dos seis estames funcionais em *L. narcissoides*, *L. oxypetala*, *L. incompressa* e *L. dimorphopetala* sugere que essas espécies sejam mais basais no gênero (Zoellner 1973). Diferentes análises filogenéticas revelaram que as espécies de seis estames formam um grupo monofilético, mas não deixa clara a posição mais plesiomórfica dessas espécies (Fay et al. 2006). Uma série de características citológicas aproximam as espécies de “seis estames” de espécies de “três estames”, principalmente *L. talinensis* e *L. appendiculata*, como o número e posição de sítios de DNAr 45S e a duplicação no número de sítios de DNAr 5S. Esses dados, somados às evidências filogenéticas (Fay et al. 2006), morfológicas (Zoellner 1973) e biogeográficas, sugerem que as espécies de “seis estames” pertençam a um subgrupo que divergiu dentro do gênero *Leucocoryne*, podendo ser enquadrado em uma categoria taxonômica infragenérica, como o subgênero ou secção *Stemmatium* (Ravenna 1978; Grau 1991).

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências brasileiras Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida a L.G.R.S.

Referências

- Araneda L, Salas P, Mansur L (2004) Chromosome numbers in the Chilean endemic genus *Leucocoryne* (Huilli). J Amer Soc Hort Sci 129:77-80.
- Cohen S, Agmon N, Sobol O, Segal D (2010) Extrachromosomal circles of satellite repeats and 5S ribosomal DNA in human cells. Mobile DNA 1:11.
- Crosa O (1988) Los cromosomas de nueve especies del género chileno *Leucocoryne* Lindley (Alliae – Alliaceae). Bol Investigación 17:1-12.
- Fay MF, Rudall PJ, Chase M (2006) Molecular studies of subfamily Gilliesioideae (Alliaceae). Aliso 22:367-371.
- Grau J (1991) Eine neue Art der Gattung *Leucocoryne* (Alliaceae) aus Mittelchile; Mitt Bot Staatssaml 30:431-437.
- Jara PA, Arancio G (2010) ¿Cómo definimos una especie vegetal? X Congreso Latinoamericano de Botánica, La Serena, Chile.
- Mansur L (2002) Ciclo de vida, autoincompatibilidad y plasticidad genética en diseño y color de sus flores. In: *Leucocoryne*, un género nativo y su uso como planta de jardín. 1st Ed. REIMCO Ltda. Viña de Mar, Chile.
- Mansur LM, Cisternas MA (2005) *Leucocoryne talinensis* (Alliaceae), a new species from Chile. Novon 15:324-326.
- Muñoz M, Moreira A (2000) Géneros endémicos de monocotiledóneas de Chile Continental. 09/2001. <http://www.mnhn.cl/apuntes/botanica/leucocoryne.htm>.

- Quezada M, Marticorena C (1976) *Pabellonia*, nombre nuevo para *Chrysocoryne* Zoellner (Alliaceae). Bol Soc Biol Concepción 50:219.
- Raskina O, Belyayev A, Nevo E (2004) Quantum speciation in *Aegilops*: Molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. PNAS 101:14818-14823.
- Ravenna P (1978) Studies in the Alliaceae-II (error tip. "Alliae"). Pl Life 34:3-10.
- Ravenna PF (2003) Los subgéneros de *Leucocoryne* y la ilegitimidad de *Pabellonia* (Alliaceae). Chloris Chilensis 6:2.
- Rudall PJ, Bateman RM, Fay MF, Eastman A (2002) Floral anatomy and systematics of Alliaceae with particular reference to *Gilliesia*, a presumed insect mimic with strongly zygomorphic flowers. Amer J Bot 89:1867-1883.
- Salas P, Mansur L (2004) Gene flow between parents with different ploidy levels in a natural population of *Leucocoryne* Lindley. J Amer Soc Hort Sci 129:833-835.
- Souza LGR, Crosa O, Guerra M (2009) The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): a populational and cytomolecular analysis. Genet Mol Biol 32: 111-116.
- Souza LGR, Crosa O, Guerra M (2010) Karyological circumscription of *Ipheion* Rafinesque (Gilliesioideae, Alliaceae). Pl Syst Evol 287:119-127.
- Zoellner O (1972) El género *Leucocoryne*. Anales del Museo de Historia Natural 5:9-83.

Zoellner O (1973) *Chrysocoryne*, genero nuevo de Amaryllidaceas de Chile. An Mus
Hist Nat Valparaiso 6:17-26.

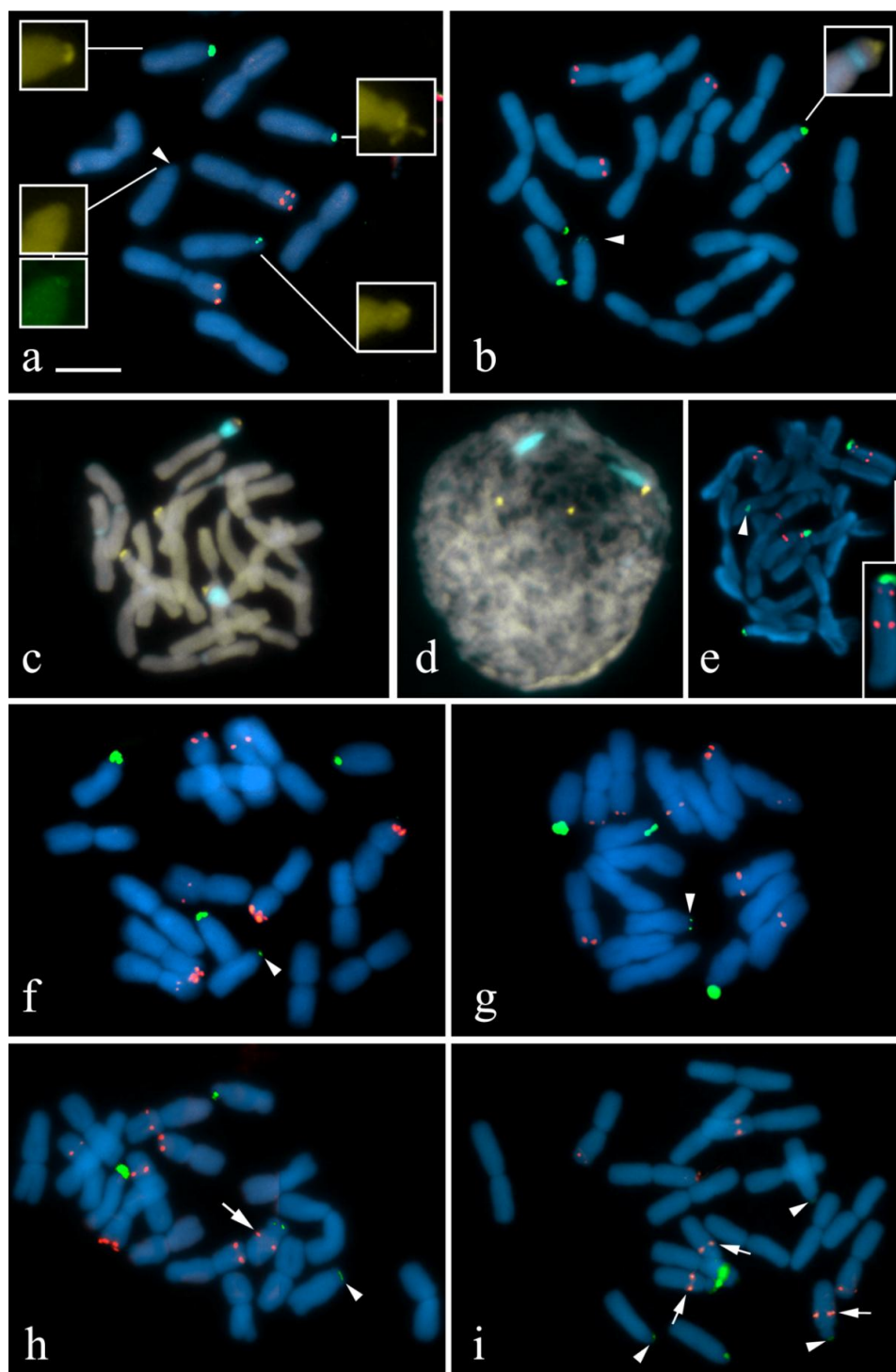


Fig. 1 – Distribuição de heterocromatina e sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em complementos cromossômicos das espécies de *Leucocoryne*. **a**, *L. coquimbensis* (2n = 10; 6M +

4A). **b**, *L. ixioides* ($2n = 18$; $14M + 4A$). **c-d**, prometáfase (**c**) e núcleo interfásico (**d**) de *L. violascens* ($2n = 18$; $14M + 4A$) corado com CMA (amarelo) e DAPI (azul). **e**, *L. coronata* ($2n = 18$; $14M + 4A$). **f**, *L. talinensis* ($2n = 18$; $14M + 4A$). **g**, *L. appendiculata* ($2n = 18$; $14M + 4A$). **h**, *L. dimorphopetala* ($2n = 18$; $14M + 4A$). **i**, *L. narcissoides* ($2n = 19$; $13M + 6A$). Insertos em **a** mostram a co-localização entre o DNAr 45S e as bandas CMA e em **e** mostram sítios de DNAr 5S duplicados em um cromossomo acrocêntrico. Setas apontam para os sítios de DNAr 5S nos cromossomos acrocêntricos e cabeças-de-setas para os menores sítios de DNAr 45S. Barra em **a** representa $10\ \mu\text{m}$.

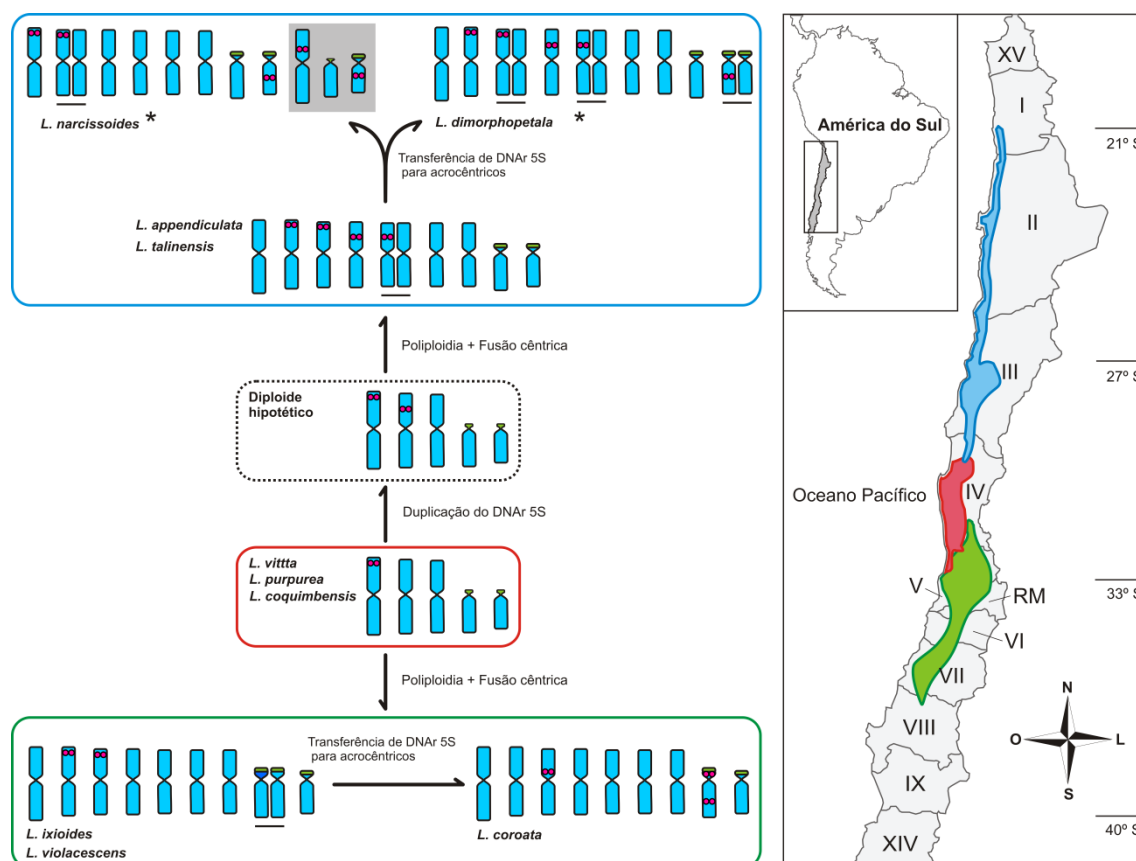


Fig. 2 – Idiogramas esquemáticos das espécies analisadas de *Leucocoryne* e suas respectivas distribuições geográficas. Linha vermelha nos idiogramas e mapa circunda as espécies diplóides, verde as tetraploides com poucos sítios de DNAr 5S e a azul as

tetraplóides com maior número de sítios de DNAr 5S. As espécies de “seis estames” são indicadas com um asterisco. Nos idiogramas os sítios de DNAr 5S são indicados em vermelho, o DNAr 45S em verde e as bandas DAPI em azul escuro. Pares heteromórficos são identificados por uma barra abaixo dos cromossomos. Em *L. narcisoides* três cromossomos (1M + 2A) não puderam ser agrupados em pares e foram representados numa caixa cinza. Mapa com a distribuição das espécies modificado de Muñoz and Moreira (2000).

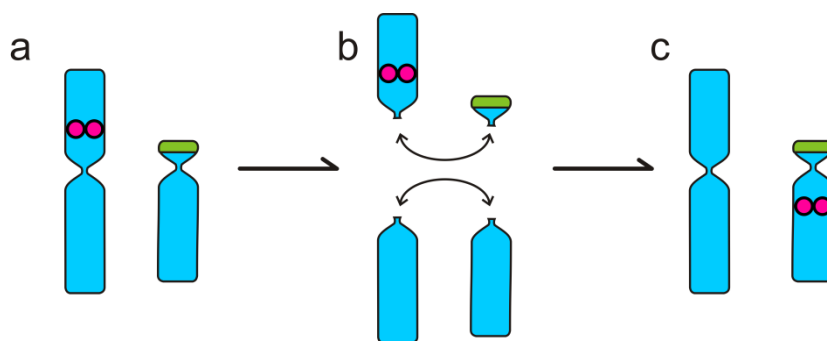


Fig. 3 – Esquema de rearranjo cromossômico promovendo mudanças na posição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e manutenção do DNAr 45S (verde). **a**, condição ancestral em cromossomos de *Leucocoryne* com sítios de DNAr 5S em cromossomos metacêntricos; **b**, translocação recíproca promovendo a troca entre braços cromossômicos não homólogos; **c**, condição derivada de sítios de DNAr 5S em um cromossomo acrocêntrico. Note que o rearranjo cromossômico não alterou a posição do sítio de DNAr 45S.

Tabela 1- Espécies analisadas do gênero *Leucocoryne* com suas respectivas procedências, número cromossômico ($2n$), fórmula cariotípica e número fundamental (FN).

Espécie	Procedência	$2n$	Fórmula cariotípica	FN
“três estames”				
<i>L. coquimbensis</i> F Phil	Ruta 5 Norte km. 78, V Region, Chile	10	6M + 4A	8
<i>L. purpurea</i> Gay	Mineral de Talca, IV Region, Chile	10	6M + 4A	8
<i>L. vittata</i> Ravenna	Los Vilos, IV Region, Chile	10	6M + 4A	8
<i>L. ixioides</i> Lindl.	Cuesta Chada, VI Region, Chile	18	14M + 4A	16
<i>L. violascens</i> Phil	Calavera, V Region, Chile	18	14M + 4A	16
<i>L. coronata</i> Ravenna	Carizalillo, IV Region, Chile	18	14M + 4A	16
<i>L. appendiculata</i> Phil	Canto de Agua, III Region, Chile	18	14M + 4 ^a	16
<i>L. talinensis</i> Mansur & Cisternas	Ovalle, Região IV, Chile	18	14M + 4A	16
“Seis estames”				
<i>L. dimorphopetala</i> (Gay) Ravenna	Llanuras de Tofo, IV Region, Chile	18	14M + 4A	16
<i>L. narcissoides</i> (Phil.) Ravenna	Santiago, Chile	19	13M + 6A	16

Capítulo VII - Validação do gênero *Zoellnerallium* Crosa (Gilliesioideae, Alliaceae) com base em sequências de DNA e dados citológicos

Luiz Gustavo Rodrigues Souza¹, Orfeo Crosa², Pablo Speranza² and Marcelo Guerra^{1*}

L. G. R. Souza

Laboratory of Plant Cytogenetics, Department of Botany, CCB, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

O. Crosa e P. Speranza

Laboratory of Genetics, Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, University of the Republic, Montevideo, Uruguai

M. Guerra (*)

Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, S/N, Cidade Universitária, Recife, PE 50372-970, Brasil

e-mail: msfguerra@hotmail.com

*E-mail: msfguerra@hotmail.com.

Resumo A tribo Ipheieae é composta pelos gêneros *Leucocoryne*, *Ipheion*, *Nothoscordum* e *Tristagma*. Recentemente foi descrito um novo gênero, *Zoellnerallium*, cujas relações com os demais gêneros da tribo é incerta. As espécies dessa tribo apresentam uma grande diversidade cariotípica, principalmente gerada por translocações Robertsonianas e poliploidia. Esse trabalho teve por objetivo determinar as relações filogenéticas das espécies do gênero *Zoellnerallium* com os demais gêneros da tribo Ipheieae com base em sequências plastidiais *trnG* e nucleares ITS. Além disso, foi feita uma análise cariotípica baseada em número cromossômico, fórmula cariotípica, distribuição de bandas CMA e DAPI e sítios de DNAr 5S e 45S. As análises filogenéticas revelaram que todos os gêneros da tribo Ipheieae são monofiléticos, inclusive *Zoellnerallium* que é grupo irmão de *Leucocoryne*. Esses gêneros compartilham o mesmo número fundamental $NF = 16$, o que sugere que uma divergência cariotípica por translocações Robertsonianas com surgimento de sítios de DNAr 45S no braço curto dos cromossomos acrocêntricos. Uma diversificação cariotípica similar ocorreu na origem do gênero *Ipheion*, sugerindo que as múltiplas fissões podem ter levado ao isolamento de linhagens e, provavelmente, à formação de novos gêneros na tribo Ipheieae.

Palavras chave: tribo Ipheieae, translocações Robertsonianas, *Zoellnerallium*, sítios de DNAr, evolução cariotípica

Introdução

Zoellnerallium Crosa é um pequeno gênero da tribo Ipheieae (Gilliesioideae, Alliaceae) formado por apenas duas espécies, *Z. andinum* (Poepp) Crosa e *Z. serenense* (Ravenna) Crosa, distribuídas em regiões montanhosas do Chile e Argentina (Crosa, 1975; 2004). A tribo inclui ainda os gêneros *Leucocoryne* Lindl, *Ipheion* Rafinesque, *Nothoscordum* Kunth e *Tristagma* Poepp (Fay e Chase, 1996), com os quais *Zoellnerallium* apresenta estreita relação e compartilha muitos caracteres morfológicos (Crosa, 1975).

As duas espécies de *Zoellnerallium* estavam anteriormente incluídas no gênero *Nothoscordum*, *N. andinum* e *N. serenense*. Os principais caracteres que levaram à criação desse novo gênero foram a presença em *Z. andinum* e *Z. serenense* de catafilos violáceos e um cariótipo único na tribo. Essas espécies apresentam o número cromossômico $2n = 24$, com quatro pares de cromossomos metacêntricos (M) maiores ($\sim 14 \mu\text{m}$), oito pares de acrocêntricos (A) menores ($\sim 4 \mu\text{m}$) e número fundamental (número de braços cromossômicos por conjunto monoploide) $NF = 16$ (Crosa, 1975; 2004). As espécies de *Nothoscordum* apresentam cromossomos maiores (até $\sim 22 \mu\text{m}$), com números cromossômicos $2n = 8$ (8M), $2n = 10$ (6M + 4A) ou poliploides desses e número fundamental $NF = 8$ ou múltiplos de 8 (Crosa 1972). Contudo, Ravena (1978, 2000) considerou que esses caracteres eram insuficientes para a criação de um novo gênero e que *Z. andinum* e *Z. serenense* deveriam permanecer no gênero *Nothoscordum*. O número fundamental $NF = 16$ de *Zoellnerallium* é encontrado apenas nos tetraploides de *Nothoscordum* e *Leucocoryne*, o que sugere que *Zoellnerallium* seria um tetraploide e esses três gêneros poderiam estar cariotipicamente relacionados (Crosa 2004).

Análises filogenéticas, baseadas em sequências nucleares e plastidiais, associadas com dados cariotípicos estruturais, como a distribuição de heterocromatina e de sítios de DNAr, têm se mostrado importantes para esclarecer relações taxonômicas dentro de diversos gêneros, como em *Paphiopedilum* (Lan e Albert, 2012), *Hypochaeris* (Ruas et al. 2005) e vários outros. Na tribo Ipheieae a separação entre os gêneros *Ipheion* e *Nothoscordum* foi melhor evidenciada por uma combinação de dados morfológicos e citogenéticos (Crosa 1975; Souza et al. 2010). O presente trabalho teve por objetivo determinar as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Zoellnerallium* e os demais gêneros mais proximamente relacionados *Nothoscordum* e *Leucocoryne*. Para isso foram comparadas as sequências plastidiais *trnG* e nucleares ITS1-5.8S-ITS2, combinadas com dados cariotípicos, incluindo número, morfologia e tamanho cromossômico, distribuição de bandas heterocromáticas e sítios de DNAr 5S e 45S.

Material e Metodos

Material vegetal

Os locais de coleta e espécies analisadas são apresentados na Tabela 1. Os vouchers de herbário foram depositados no Herbário da Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideu, Uruguai (MVFA). Para as análises filogenéticas foram incluídos representantes dos gêneros *Nothoscordum* (3), *Leucocoryne* (2) e *Zoellnerallium* (2). Como grupo externo foi incluído na análise *Ipheion recurvifolium* (ver Tabela 1).

Análises filogenéticas

As extrações de DNA foram realizadas pelo método CTAB segundo Doyle e Doyle (1987). A amplificação do íntron plastidial *trnG* foi baseada em Hamilton (1999) e da região nuclear ITS baseada em Lomáscolo et al. (2008). Todos os fragmentos amplificados foram sequenciados em ambas as direções no serviço de sequenciamento do Institut Pasteur de Montevideú (Uruguai). As sequências obtidas foram editadas no *software* Sequencher versão 4.8 (GeneCodes Corp., Ann Arbor, Michigan, USA). Os alinhamentos foram realizados usando Clustal-W implementado no programa BioEdit versão 6.0.5 e melhorados manualmente. As regiões plastidial e nuclear foram analisadas separadamente e em combinação. Todas as sequências analisadas foram disponibilizadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

As análises de máxima parcimônia para cada conjunto de dados foram realizadas no *software* PAUP* 4.0b10 (Swofford 2003). Foi usada uma busca heurística preliminar incluindo 10.000 réplicas de random sequence addition, *tree bisection-reconnection* (TBR) e somente a árvore com menor comprimento foi salva. A busca final foi conduzida a 5.000 *sequence addition replicates* (SAR) salvando somente árvores que tinham menos ou o mesmo número de passos encontrados na busca preliminar. Uma análise de *bootstrap* foi também conduzida para 10.000 réplicas com 100 SAR dentro de cada réplica usando TBR.

Impregnação com nitrato de prata, bandeamento CMA/DAPI e FISH

Pontas de raízes obtidas de bulbos foram pré-tratadas com colchicina 0,05%, durante 24 horas a 10 °C, fixadas em etanol:ácido acético (3:1; v/v) por 2 a 24 horas a temperatura ambiente e armazenadas a –20 °C. As raízes fixadas foram lavadas em água destilada e digeridas em solução de celulase (Onozuka) 2% (w/v)–pectinase (Sigma) 20% (v/v) a

37 °C por 90 min. O meristema foi macerado em uma gota de ácido acético 45% e a lamínula foi removida em nitrogênio líquido. Para localizar a heterocromatina constitutiva foram utilizados os fluorocromos base-específicos cromomicina A₃ (CMA) e 4'-6 diamidino fenilindol (DAPI), e para detectar os sítios de DNAr 5S e 45S foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), seguindo os mesmos protocolos descritos anteriormente (Souza et al. 2009).

A técnica de impregnação com nitrato de prata para a visualização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foi realizada de acordo com Hall e Parker (1995). Para a técnica de dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI lâminas envelhecidas por três dias foram coradas com CMA (0,1 mg/ml) por 60 min e recoradas com DAPI (1 µg/ml) por 30 min. As lâminas foram montadas em tampão glicerol:McIlvaine pH 7.0 (1:1) e envelhecidas por três dias antes da análise em um microscópio de epifluorescência Leica DMLB. As imagens foram capturadas com uma camera de video Cohu CCD usando o *software* Leica QFISH e depois editadas no Adobe Photoshop CS3 versão 10.0.

Para localizar os sítios de DNAr por hibridização *in situ* fluorescente, foram utilizadas como sondas um clone DNAr 5S (D2) com 500 pb obtido de *Lotus japonicus* e marcado com Cy3-dUTP (GE) e um clone 18S-5.8S-25S (R2) com 6.5 kb obtido de *Arabidopsis thaliana* e marcado com digoxigenina-11-dUTP. Ambas as marcações foram feitas por *nick translation* (Roche). A sonda do DNAr 45S foi detectada com anticorpo anti-digoxigenina conjugado com FITC (Roche) desenvolvido em ovelha e amplificado com anticorpo anti-ovelha conjugado com FITC (Dako) desenvolvido em camundongo. O mix de hibridização continha 50% formamida, 10% dextran sulfato, 2× SSC e 5 ng/µl de cada sonda. As lâminas foram desnaturadas a 75 °C por 3 min. As

lavagens pós-hibridização foram realizadas para uma estringência final de 76%. As imagens das melhores células foram capturadas como descrito previamente.

Resultados

Filogenia molecular

As análises filogenéticas baseadas na sequência do íntron plastidial *trnG* e da região nuclear ITS foram conduzidas para cada região isoladamente ou com uma matriz combinada. As árvores de consenso estrito para as duas análises separadamente são apresentadas na Fig. 1. Foram observadas diferenças significativas no número de sítios polimórficos entre as regiões analisadas, sendo 57 loci (de um total de 685 pb *trnG*) e 232 loci (de um total de 672 pb ITS). As análises de parcimônia para a região plastidial e nuclear produziram topologias com 31 passos (CI= 0,96 RI= 0,94) e 303 passos (CI= 0,89 RI= 0,85), respectivamente. Ambas revelaram que as espécies de *Zoellnerallium*, *Leucocoryne* e *Nothoscordum* agrupam separadamente (Fig. 1). Na análise combinada (ITS + *trnG*) as duas espécies de *Zoellnerallium* também formaram um grupo monofilético com um alto índice de suporte (100). Nessa análise, assim como em separado, *Leucocoryne* e *Zoellnerallium* aparecem como gêneros irmãos (Fig. 1).

Análise cariotípica

As duas espécies de *Zoellnerallium*, *Z. andinum* e *Z. serenense*, apresentaram $2n = 24$ (8M + 16A), com metacêntricos maiores (~ 11 μm) e acrocêntricos menores (~ 4.5 μm). A impregnação com nitrato de prata em *Z. andinum* revelou forte marcação no braço curto de todos os cromossomos acrocêntricos sendo, portanto, 16 RONS (Fig. 2a). A dupla-coloração com os fluorocromos CMA e DAPI em *Z. serenense* revelou que

todos os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos eram CMA⁺/DAPI⁻ (Fig. 2b). A hibridização *in situ* fluorescente com a sonda para o DNAr 45S revelou marcações nesses braços curtos, portanto, co-localizadas com as bandas CMA⁺/DAPI⁻ (Fig. 2c). Os sítios de DNAr 5S foram localizados na região intersticial do braço curto de dois pares de cromossomos metacêntricos.

Discussão

A origem do gênero *Zoellnerallium*

Os dados moleculares, cariotípicos e morfológicos indicam que o gênero *Zoellnerallium* é um grupo natural e deve ser validado como um gênero da tribo Ipheieae (Crosa 1975). As árvores filogenéticas obtidas tanto com base em uma sequência de DNA plastidial quanto na sequência ITS nuclear mostram que *Zoellnerallium* é monofilético e irmão do gênero *Leucocoryne*.

A análise estritamente morfológica sugeriam que as espécies *Z. andinum* e *Z. serenense* pertenciam ao gênero *Nothoscordum* (Ravenna, 1978; 2000) o que provavelmente se deve a uma baixa diferenciação morfológica da maioria das espécies da tribo Ipheieae (Guaglianone 1972; Crosa 1975). Contudo, a distribuição geográfica das espécies de *Zoellnerallium*, restritas a regiões mais altas na Cordilheira dos Andes chilena e argentina (Crosa, 1975; 2004), é bem distinta da distribuição conhecida das espécies de *Nothoscordum*, no sul do Brasil, Uruguai e Argentina (Guaglianone 1972). Por outro lado, *Zoellnerallium* aparece na árvore filogenética como gênero irmão de *Leucocoryne*, um gênero ocorrente apenas nos Andes chilenos entre 20° e 37°S (Zoellner 1972; Mansur and Cisternas 2005). Isso sugere que *Zoellnerallium* tenha surgido a partir de um ancestral comum com o gênero *Leucocoryne*.

Evolução cariotípica do gênero *Zoellnerallium*

Citologicamente, as espécies de *Zoellnerallium* se caracterizam por possuir números cromossômicos diferentes de qualquer outra espécie da tribo Ipheieae (Crosa 1975; 2004). As espécies de *Leucocoryne* apresentam tamanhos cromossômicos bem maiores, mais semelhantes às de *Nothoscordum*, podendo ser diploides com $2n = 10$ ou mais raramente tetraploides com $2n = 18$ (Crosa 1972; 1988). As espécies diplóides de *Leucocoryne* possuem fórmula cariotípica $2n = 6M + 4A$ idêntica à encontrada na secção *Inodorum* e muitas espécies da secção *Nothoscordum* do gênero *Nothoscordum*, confirmando a estreita relação entre esses dois gêneros. Por outro lado, os tetraplóides de *Leucocoryne* apresentam em geral $2n = 18$ ($14M + 4A$) e possuem o mesmo número de braços cromossômicos ou número fundamental ($FN = 16$) que as espécies de *Zoellnerallium* (Crosa, 1975; 1988; 2004).

A presença de sítios de DNAr 5S em dois pares cromossômicos em *Zoellnerallium* também aponta para uma origem tetraploide (ver Crosa, 2004), uma vez que em geral as espécies da tribo Ipheieae apresentam números de sítios de DNAr proporcional ao nível de ploidia, sendo dois sítios nos diplóides e quatro nos tetraplóides (Guerra e Felix, 2000; Souza et al. 2009; 2010; 2012). Isso significa que o cariótipo $2n = 24$ ($8M + 16A$) difere daquele das espécies tetraplóides de *Leucocoryne* por seis fissões cêntricas. Assumindo que o incremento no número de cromossomos acrocêntricos é uma característica derivada (Schubert 2007; Guerra 2008), o cariótipo de *Zoellnerallium* pode ter sido gerado por sucessivas fissões cêntricas em uma espécie com cariótipo semelhante aos tetraplóides de *Leucocoryne*. Essas fissões cêntricas devem ter sido acompanhadas pelo surgimento de novos sítios de DNAr 45S nos braços curtos dos acrocêntricos, como parece ter ocorrido em espécies de *Nothoscordum* e *Ipheion* (Souza et al. 2010; 2012).

Levando em consideração as análises filogenéticas e cariotípicas apresentadas, é razoável supor que eventos de translocações Robertsonianas tenham tido um papel fundamental na evolução do gênero *Zoellnerallium*. Translocações Robertsonianas são particularmente frequentes nas espécies da tribo Ipheieae, tendo sido observadas inclusive em diversas espécies de *Nothoscordum* (Crosa 1972; Souza et al. 2010; 2012), tornando este último um exemplo clássico de evolução cariotípica por translocações Robertsonianas (Jones 1998). É possível que uma linhagem tetraplóide do ancestral de *Leucocoryne/Zoellnerellium* tenha se diferenciado cariotipicamente por múltiplas fissões cêntricas acompanhadas pelo incremento no número de sítios de DNAr 45S no braço curto dos acrocêntricos, dando origem ao gênero *Zoellnerallium*. Um mecanismo similar pode estar relacionado à origem do gênero *Ipheion* (Souza et al. 2010).

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências brasileiras Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida a L.G.R.S.

Referências

- Crosa O (1972) Estudios cariología en el género *Nothoscordum* (Liliaceae). *Boletín de la Facultad de Agronomía de Uruguay* 122: 3-8.
- Crosa O (1975) *Zoellnerallium*, un género nuevo para la tribu Allieae (Liliaceae). *Darwiniana* 19:331-334.
- Crosa O (1981) Los cromosomas de cinco especies del género *Tristagma* (Liliaceae). *Darwiniana* 23:361-366.
- Crosa O (1988) Los cromosomas de nueve especies del genero chileno *Leucocoryne* Lindly, (Allieae-Alliaceae). *Boletín de investigación n.º 17. Montevideo, Uruguay*.
- Crosa O (2004) Segunda especie y justificación del género *Zoellnerallium* (Alliaceae). *Darwiniana* 42:165-168.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Fay MF, Chase MW (1996) Resurrection of Themidaceae for the *Brodiaea* alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. *Taxon* 45:441-451.
- Fay MF, Rudall PJ, Chase MW (2006) Molecular studies of subfamily Gilliesioideae (Alliaceae). *Aliso* 22: 367-371.
- Guerra (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Genome Res* 120:339-350.

- Hall KJ, Parker JS (1995) Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chromosome Res* 3:417-422.
- Hamilton MB (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraespecific variation. *Molecular Ecology* 8:513-525.
- Johnson MAT, Özhatay N. 1996. A review of *Allium* sect *Allium*. *Cytology* 17-40.
- Jones K (1998) Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. *Botanical Review* 64:273-89.
- Lan T, Alberts VA. 2012. Dynamic distribution patterns of ribosomal DNA and chromosomal evolution in *Paphiopedilum*, a lady's slipper orchid. *Acta Horticulturae*.
- Linder CR, Rieseberg LH (2004) Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants. *American Journal of Botany* 91:1700-1708.
- Lomáscolo SB, Speranza P, Kimball RT (2008) Correlated evolution of fig size and color supports the dispersal syndromes hypothesis. *Oecologia* DOI 10.1007/s00442-008-1023-0.
- Muir G, Filatov D (2007) A selective sweep in the chloroplast DNA of dioecious *Silene* (Section *Elisanthe*). *Genetics* 177:1239-1247.
- Ravenna P (1978) Studies in the Alliaceae II. *Plant Life* 34:131-151.
- Ravenna P (2000) *Nothoscordum* subgen. *Latace* and the illegitimacy of *Zoellnerallium* (Alliaceae). *Onira* 4:15-18.

- Rieseberg HL (1990) Homoploid reticulate evolution in *Helianthus* (Asteraceae): evidence from ribosomal genes. *American Journal of Botany* 78:1218-1237.
- Rieseberg LH, Sinervo B, Linder CR, Ungerer MC, Arias DM (1996) Role of gene interactions in hybrid speciation: evidence from ancient and experimental hybrids. *Science* 272: 741–745.
- Rokas A, Ladoukakis E, Zouros E (2003) Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution* 18:411-417.
- Ruas CF, Vanzela ALL, Santos MO, Fregonezi JN, Ruas PM, Matzenbacher NI, Aguiar-Perecin MLR. 2005. Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 28:129-139.
- Sang T (2002) Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37:121-147.
- Souza LGR, Crosa O, Guerra M (2009) The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): a populational and cytomolecular analysis. *Genetics and Molecular Biology* 32:111-116.
- Souza LGR, Crosa O, Guerra M (2010) Karyological circumscription of *Ipheion* Rafinesque (Gilliesioideae, Alliaceae). *Plant Systematic and Evolution* 287:119-127.
- Sytsma KJ (1990) DNA and morphology: Inference of plant phylogeny. *Trends in Ecology and Evolution* 5:104-110.

Tsitrone A, Kirkpatrick M, Levina DA (2003) Model for chloroplast capture. *Evolution* 57:1776-1782.

Vosa C (1975) The cytotaxonomy of the genus *Tulbaghia*. *Annali di Botanica* 34: 47-121.

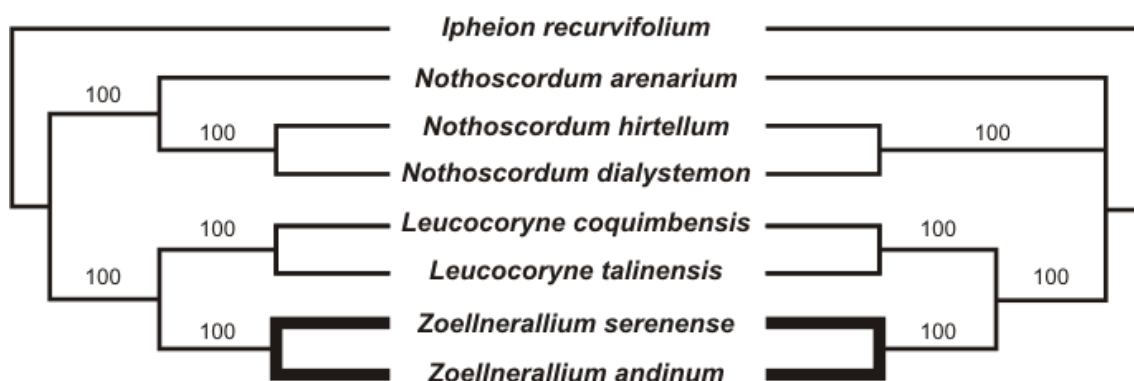


Fig. 1 Relações filogenéticas entre as espécies de *Zoellnerallium* e gêneros afins da tribo Ipheieae baseadas em máxima parcimônia. À esquerda árvore gerada com a análise da sequência nuclear ITS e à direita com a sequência plastidial do intron de *trnG*. Números abaixo dos ramos indicam os valores de *bootstrap* para 10.000 réplicas

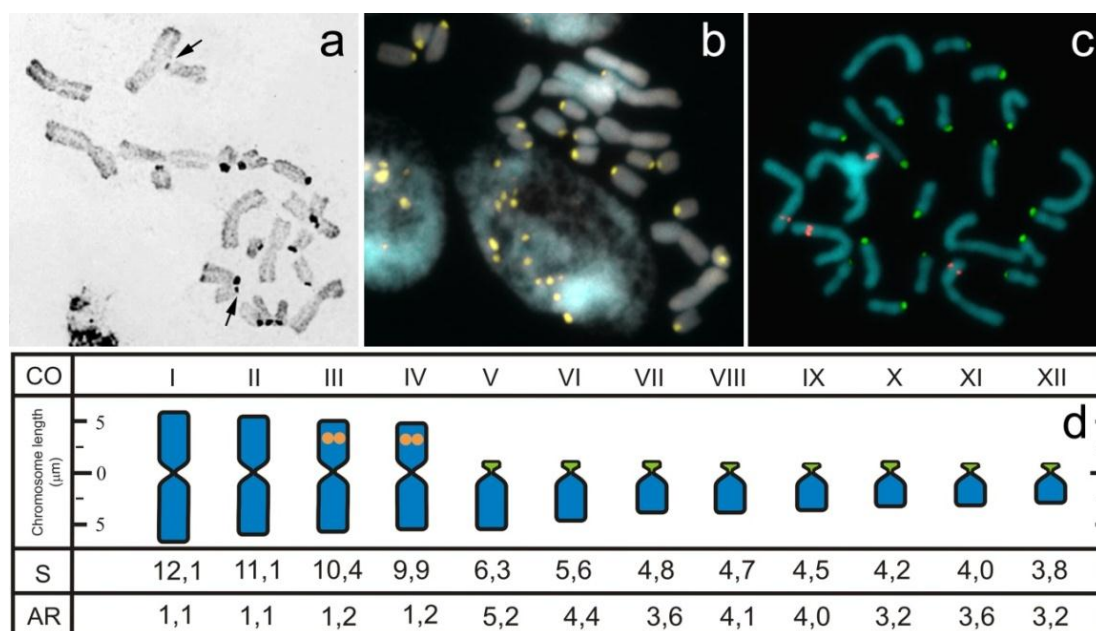


Fig. 2 Análise cariotípica das espécies do gênero *Zoellnerallium*. **a**, impregnação com nitrato de prata em metáfase de *Z. andinum*. **b-c**, coloração CMA e DAPI em metáfase (**b**) e hibridização *in situ* com DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em prometáfase (**c**) de *Z. serenense*. Em **d** idiograma de *Z. serenense*. Setas em **a** apontam as menores RONS.

Tabela 1 Espécies analisadas, locais de coleta, cariótipos e número de sítios de DNAr das espécies de *Zoellnerallium* e representantes de gêneros próximos.

Taxa	Amostra	Local de coleta	2n	Fórmula cariotípica	NF	DNAr	
						5S	45S
<i>Zoellnerallium</i> Crosa							
<i>Z. andinum</i> (Ravenna) Crosa	Chileflora	Parque Nacional el Morado, Santiago, Chile	24	8M + 16A	16	?	16*
<i>Z. serenense</i> (Poepp.) Crosa	MVFA 1253/18	La Serena, Chile	24	8M + 16A	16	4	16
<i>Leucocoryne</i> Lindl.							
<i>L. coquimbensis</i> F.Phil.	MVFA Lcoq	Ruta 5, km 78, V Região, Chile	10	6M + 4A	8	2	4
<i>L. talinenis</i> Mansur & Cisternas	MVFA Ls10	Ruta 5, km 355, I Região, Chile	18	14M + 4A	16	8	4
<i>Nothoscordum</i> Kunth							
<i>N. arenarium</i> Herter	MVFA 1302	Colonia Wilson, Depto. San José, Uruguai	10	6M + 4A	8	2	4
<i>N. hirtellum</i> (Kunth) Herter	MVFA 156/8	Sierra de las Ánimas, Depto. Maldonado, Uruguai	10	6M + 4A	8	2	14
<i>N. felipponei</i> Beauverd	MVFA 1193	Minas, Depto. Lavalleja, Uruguai	10	6M + 4A	8	8	12
<i>Ipheion</i> Raf.							
<i>I. recurvifolium</i> (C.H.Wright) Traub	MVFA Irec	Paso Roldán, Depto. Florida, Uruguai	20	4SM + 16A	24	4	4

* Detecção da RON por meio de impregnação com nitrato de prata.

Capítulo VIII - O papel das fissões cêntricas na evolução cariotípica da tribo Gilliesieae Lindl (Gilliesioideae, Alliaceae)

Souza LGR¹, Escobar I², Crosa O³, Guerra M¹

¹ Laboratory of Plant Cytogenetics, Department of Botany, CCB, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

² Department of Botany, University of Concepción, Chile

³ Laboratory of Genetics, Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, University of the Republic, Montevideo, Uruguay

msfguerra@hotmail.com

Resumo

A tribo Gilliesieae é formada por espécies andinas distribuídas na Argentina, Bolívia e Chile que se diferenciam morfológicamente das demais Alliaceae por apresentar graus variáveis de simetria bilateral, com número variável de tépalas, estames e apêndices florais. As espécies dessa tribo apresentam três complementos cromossômicos diferentes, $2n = 12$ (8M + 2SM + 2A), $2n = 14$ (4M + 4 SM + 6A) e $2n = 20$ (2SM + 18A), todas com o mesmo número fundamental $NF = 11$, o que sugere uma evolução cariotípica relacionada a translocações Robertsonianas. Com a finalidade de compreender o papel das fissões/fusões cêntricas na evolução da tribo Gilliesieae foram comparadas citologicamente sete espécies pertencentes aos gêneros, *Gethyum*, *Gilliesia* e *Solaria* ($2n = 14$), *Miersia* ($2n = 12$ e $2n = 20$) e *Speea* ($2n = 12$). Foram comparados o número, morfologia e tamanho cromossômico, a distribuição de bandas heterocromáticas e dos sítios de DNAr 5S e 45S. Em todas as espécies foram localizados sítios de DNAr 45S nos braços curtos de todos os cromossomos acrocêntricos. As espécies com $2n = 12$ e 14 apresentaram um par de sítios de DNAr 5S, enquanto *M. chilensis* ($2n = 20$) apresentou sítios adicionais de DNAr 5S e 45S, sendo em dois e três pares, respectivamente. O gênero tido como o mais basal, *Speea*, apresentou o maior número de metacêntricos, uma condição plesiomórfica nas Alliaceae. Isso sugere que a evolução cariotípica do grupo tenha sido moldada principalmente por fissões cêntricas com transferência de sítios de DNAr 45S para os braços curtos dos acrocêntricos. Essas mesmas alterações cariotípicas foram também detectadas na tribo Ipheieae sugerindo um padrão de mudanças cariotípicas comum à todos os gêneros da subfamília Gilliesioideae, diferentemente do observado nas demais subfamílias de Alliaceae.

Introdução

A família Alliaceae se encontra representada na América do Sul unicamente pela subfamília Gilliesioideae, formada por uma tribo mais amplamente distribuída e diversificada, Ipheieae, e outra predominantemente em regiões andinas com centro de diversidade no Chile, Gilliesieae (Fay e Chase 1996). A tribo Gilliesieae, é formada pelos gêneros *Gethyum* Phil, *Gilliesia* Lindl, *Miersia* Lindl, *Speea* Loes e *Solaria* Phil distribuídos na zona mediterrânea do Chile, *Schickendantziella* Speg na Argentina e Bolívia e *Trichlora* Baker no Peru (León 2006; Escobar et al. 2010; Negritto et al. 2010; Escobar et al. em preparação). Diferentemente dos demais representantes da família Alliaceae, caracterizados por flores actinomorfas com seis estames (exceto *Leucocoryne* Lindl) e seis tépalas, os representantes da tribo Gilliesieae apresentam grande diversificação na morfologia floral (Rudall et al. 2002).

A análise de sequências *trnL-F*, gene *rbcL* e a região nuclear ITS revelou que a tribo Gilliesieae é um grupo monofilético, dividido em dois clados (Escobar et al. em preparação). O primeiro clado, formado por *Gilliesia*, *Gethyum*, *Solaria* e *Trichlora*, é caracterizado por uma redução no número de estames, variação no número de tépalas (3–6), presença de estaminódios e alta complexidade nos apêndices florais. O segundo clado, formado por *Miersia* e *Speea*, agrupa as espécies mais basais da tribo, caracterizadas por possuir seis estames, seis tépalas e ausência de estaminódios (Escobar et al. em preparação). Essas análises revelaram ainda uma baixa divergência de sequências ITS e plastidiais (ver também Fay et al. 2006), o que sugere que a tribo é relativamente recente dentro da família Alliaceae.

Citologicamente as espécies da tribo Gilliesieae se destacam por apresentarem cromossomos grandes, pouco numerosos e predominantemente metacêntricos/submetacêntricos (M/SM) ou acrocêntricos (A) (Goldblatt 1976). Em uma análise citopopulacional de *Miersia chilensis* Lindl foram encontrados indivíduos com $2n = 20$ (2SM + 18A) ou $2n = 21$ (1SM + 19A), ambos com o mesmo número de braços cromossômicos por conjunto monoplóide ou número fundamental $NF = 11$ (Cave e Bradley, 1943). Posteriormente foram encontrados indivíduos afins a *M. chilensis* com $2n = 12$ (8M + 2SM + 2A), também com $NF = 11$ (Escobar em preparação). Os cariótipos de *Gethyum atropurpureum* Phil, $2n = 14$ (8M + 6A) (Goldblatt 1976) e *Speea humilis* Loes $2n = 12$ (8M + 2SM + 2A) (Escobar em preparação), também apresentaram $NF = 11$, o que sugere que translocações Robertsonianas tenham tido um papel importante na evolução dessa tribo.

Translocações Robertsonianas ou fusões/fissões cêntricas também tiveram papel fundamental na diversificação dos gêneros da tribo Ipheieae, mas com NF bem mais variáveis ($NF = 7, 8, 12$ e 16) (Crosa 2004; Souza et al. 2010). A análise de distribuição de sítios de bandas heterocromáticas e DNAr por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem contribuído para um melhor entendimento das variações cromossômicas em representantes da tribo Ipheieae (Souza et al. 2010; Souza et al. em preparação). Nessas espécies, a ocorrência de fissões cêntricas parece ter sido acompanhada pelo aparecimento de sítios de DNAr 45S nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos, sugerindo uma associação entre fissões cêntricas e DNAr (Hall e Parker 1995; Souza et al. 2010).

O presente trabalho teve como objetivo investigar o papel dos eventos de fissão/fusão cêntrica na evolução cariotípica da tribo Gilliesieae baseado na análise dos gêneros *Gethyum*, *Gilliesia* e *Solaria* ($2n = 14$), *Miersia* ($2n = 12$ e $2n = 20$) e *Speea* ($2n$

= 12). A análise cariotípica compreendeu, número, morfologia e tamanho cromossômico e distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S e esses dados foram interpretados de acordo com a filogenia molecular proposta por Escobar (em preparação).

Material e Métodos

Material vegetal

Foram analisadas sete espécies da tribo Gilliesieae: *Gethyum atropurpureum* Phil, *Gethyum cuspidatum* (Harv. ex Baker) Muñoz-Schick, *Gilliesia graminea* Lindl, *Gilliesia montana* Poepp & Endl, *Miersia chilensis* Lindl, *Solaria miersioides* Phil e *Speea humilis* Loes. Os locais de coleta, números de voucher e dados cariotípicos são apresentados na Tabela 1. Os vouchers foram depositados no Herbário da Universidad de Concepción (Chile).

Bandeamento com fluorocromos e FISH

Pontas de raízes obtidas de bulbos foram pré-tratadas com colchicina 0,05%, durante 24 horas a 10 °C, fixadas em etanol:ácido acético (3:1; v/v) por 2 a 24 horas à temperatura ambiente e armazenadas a –20 °C. As raízes fixadas foram lavadas em água destilada e digeridas em solução de celulase (Onozuka) 2% (p/v)–pectinase (Sigma) 20% (v/v) a 37 °C por 90 min. O meristema foi macerado em uma gota de ácido acético 45% e a lamínula foi removida em nitrogênio líquido. O bandejamento CMA e a FISH foram realizadas de acordo com Souza et al. (2009).

Para a técnica de dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI lâminas envelhecidas por três dias foram coradas com CMA (0,1 mg/ml) por 60 min e recoradas com DAPI (1 µg/ml) por 30 min. As lâminas foram montadas em tampão glicerol:McIlvaine pH 7.0 (1:1) e envelhecidas por três dias antes da análise em um microscópio de epifluorescência Leica DMLB. As imagens foram capturadas com uma câmera de vídeo Cohu CCD usando o *software* Leica QFISH e depois editadas no Adobe Photoshop CS3 versão 10.0.

Foram utilizadas como sondas para localizar os sítios de DNAr, um clone DNAr 5S (D2) de 500 pb obtido de *Lotus japonicus* e marcado com Cy3-dUTP (GE) e um clone 18S-5.8S-25S (R2) de 6.5 kb obtido de *Arabidopsis thaliana* e marcado com digoxigenina-11-dUTP. Ambas as marcações foram feitas por *nick translation* (Roche). A sonda do DNAr 45S foi detectada com anticorpo anti-digoxigenina conjugada com FITC (Roche) desenvolvido em ovelha e amplificada com anticorpo anti-ovelha conjugado com FITC (Dako) desenvolvido em camundongo. A mistura de hibridização continha 50% formamida, 10% dextran sulfato, 2× SSC e 5 ng/µl de cada sonda. As lâminas foram desnaturadas a 75 °C por 3 min. As lavagens pós-hibridização foram realizadas para uma estringência final de 76%. As imagens das melhores células foram capturadas como descrito previamente.

Resultados

A análise de representantes da tribo Gilliesieae revelou cromossomos grandes (entre 5,5 e 14,9 µm) com morfologia variando entre metacêntrico (M), submetacêntrico

(SM) ou acrocêntrico (A). Foram observados três distintos complementos cromossômicos $2n = 12$ (8M + 2SM + 2A), $2n = 14$ (4M + 4SM + 6A) e $2n = 20$ (2SM + 18A), todos com mesmo número fundamental $NF = 11$. A dupla-coloração com os fluorocromos CMA e DAPI revelou que todos os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos nas espécies analisadas eram CMA⁺/DAPI⁻ (Fig. 1a). Adicionalmente, em *Miersia chilensis* foram observadas CMA⁺/DAPI⁻ na região intersticial de dois pares de acrocêntricos (Fig. 1a) e na região terminal do braço longo de um par de metacêntricos (Fig. 1b). A hibridização *in situ* fluorescente com a sonda para o DNAr 45S revelou marcações co-localizadas com todas as bandas CMA⁺/DAPI⁻ (Fig. 1a).

Foram observados dois diferentes citótipos para *Miersia chilensis* (Fig. 1a-b). O indivíduo coletado em Santiago-Chile apresentou $2n = 20$ (2SM + 18A) com um sítio de DNAr 5S maior na região intersticial de um par de acrocêntricos e sítios de DNAr 5S extras de menor tamanho na posição proximal de outros dois pares de acrocêntricos (Fig. 1a). Por outro lado, o indivíduo coletado em Valparaíso-Chile apresentou $2n = 12$ (8M + 2SM + 2A) com sítios de DNAr 5S na região intersticial do braço longo do maior par de metacêntricos (Fig. 1b), um cariótipo muito similar ao observado em *Speea humilis* (Fig. 1c), exceto pelo sítio de DNAr 45S no metacêntrico. As demais espécies analisadas, *Gethyum atropurpureum*, *Gethyum cuspidatum*, *Gilliesia graminea*, *Gilliesia montana* e *Solaria miersioides*, apresentaram $2n = 14$ (4M + 4SM + 6A) e cariótipos muito similares com sítios de DNAr 5S na região intersticial próxima ao centrômero de um par de metacêntricos (Fig. 1c).

O cladograma da Figura 2 mostra dois clados bem distintos: um formado por *Gethyum*, *Gilliesia* e *Solaria*, com maior estabilidade cariotípica, tanto no número e morfologia cromossômica quanto no número de sítios de DNAr, e o outro formado por

Speea e *Miersia*, com maior diversificação no número de sítios de DNAr 5S e 45S e variação cariotípica intraespecífica em *M. chilense*.

Discussão

A constância no número fundamental acompanhada de mudanças de número cromossômico nas espécies da tribo Gilliesieae sugere claramente uma evolução cariotípica por translocações Robertsonianas. Esse tipo de variação cariotípica foi também observada na tribo Ipheieae (Crosa 1972; 1975; 1981; 1988; 2004; Jones 1998; Souza et al. 2010), todavia é raro nas outras subfamílias de Alliaceae (Johnson e Özhatay 1996.; Vosa 2000). Diferentemente da tribo Ipheieae a tribo Gilliesieae não apresentou poliploidia interpopulacional ou interespecífica (ver Cave e Bradley, 1943; Goldblatt 1976; Escobar em preparação) embora o número de amostras analisadas seja pequeno.

Análises morfoanatômicas e filogenéticas sugerem que *Miersia* e *Speea* sejam as espécies mais basais dentro da tribo Gilliesieae (Rudall et al. 2002; Escobar et al. em preparação). Igualmente, o cariótipo $2n = 12$ presente nessas espécies pode representar uma condição plesiomórfica na tribo. Todas as espécies da subfamília Tulbaghiodeae, que estão na base do clado das espécies Sul-americanas de Alliaceae (Fay et al. 2006), apresentam $2n = 12$. Algumas delas como *Tulbagia coddii*, apresentando inclusive a mesma fórmula cariotípica de *Miersia* e *Speea*, sugerem que esse seja o cariótipo mais basal da subfamília Gilliesioideae. Na tribo Ipheieae os cariótipos são predominantemente formados por metacêntricos, como em *Leucocoryne* (Crosa 1988), *Nothoscordum* (Souza et al. 2010) e *Tristagma* (Crosa et al. 1981). Os poucos gêneros

onde predominam cromossomos acrocêntricos, como em *Ipheion* (Souza et al. 2010) e *Zoellnerallium* (Crosa 2004), parecem ter uma condição derivada. Nesse sentido a amostra de *Miersia chilensis* com $2n = 20$ e $2n = 21$ (Cave e Bradley, 1943 e presente trabalho) pode representar um evento recente de múltiplas fissões cêntricas.

A manutenção de número cromossômico e fórmula cariotípica em *Gethyum*, *Gilliesia* e *Solaria* corroboram as análises filogenéticas que agruparam esses gêneros em um único clado (Escobar et al. em preparação). As espécies desse clado, que são morfologicamente as mais especializadas da tribo Gilliesieae, particularmente *Gilliesia* (Rudall et al. 2002), não apresentam mudanças cariotípicas importantes. Partindo do cariótipo basal das Gilliesieae $2n = 12$ presente em *Speea* e *Miersia*, o número cromossômico $2n = 14$ deve ter se formado pela ocorrência de três eventos de fissão cêntricas no ancestral das espécies do clado *Gethyum*, *Gilliesia* e *Solaria*. Uma outra possibilidade é que o cariótipo basal da tribo Gilliesieae seja $2n = 14$ e nesse caso, o número cromossômico $2n = 12$ teria surgido por um evento de fusão cêntrica.

As mudanças de números cromossômicos dentro da tribo Gilliesieae não afetaram o número de sítios de DNAr 5S, sendo observada um sítio por conjunto monoplóide em todas as espécies, exceto no citótipo mais rearranjado de *Miersia chilensis* com $2n = 20$. Por outro lado, o número e a posição dos sítios de DNAr 45S foram diretamente afetados pelas translocações Robertsonianas. Aparentemente as fissões cêntricas foram acompanhadas pelo surgimento de novos sítios de DNAr 45S nos braços curtos dos acrocêntricos (ver Hall e Parker 1995). Na tribo Ipheieae são observadas situações similares, por exemplo, nas espécies do complexo *Inodorum* onde o número de cromossomos acrocêntricos varia de quatro a seis e o número de sítios de DNAr 45S também varia de quatro a seis (Souza et al. em preparação). Em *Ipheion tweedieanum*, todos os cromossomos são acrocêntricos e todos possuem sítios de DNAr

45S nos braços curtos (Souza et al. 2010). Essa correlação entre fissões cêntricas e aumento no número de sítios de DNAr 45S nos braços curtos dos acrocêntricos também foi reportada em outros gêneros de plantas (Tagashira e Kondo, 2001) e animais, como em moluscos (Pascoe et al. 1996) e insetos (Nguyen et al. 2010), o que sugere que possa se tratar de uma característica inerente ao mecanismo de fissão cêntrica em eucariotos.

A manutenção do mesmo número fundamental $NF = 11$ em todas as espécies da tribo Gilliesieae com diversificação de números cromossômicos sugere que não tenham ocorrido grandes rearranjos estruturais nos cromossomos dessas espécies e que as translocações Robertsonianas sejam o principal mecanismo envolvido na evolução do grupo. As diferentes evidências morfológicas e filogenéticas que sugerem que *Miersia* e *Speea* (Rudall et al. 2002; Escobar et al. em preparação) sejam mais basais dentro da tribo auxiliam a polarizar as variações Robertsonianas, sugerindo que os cariótipos com predomínio de cromossomos metacêntricos sejam mais basais e, portanto, que na evolução cariotípica da tribo tenham predominado as fissões cêntricas, sempre acompanhadas por transferência de sítios de DNAr 45S para os braços curtos dos acrocêntricos. Essas mesmas alterações cariotípicas foram também detectadas na tribo Ipheieae sugerindo um padrão de mudanças cariotípicas comum a todos os gêneros da subfamília Gilliesioideae, diferentemente do observado nas demais subfamílias de Alliaceae (Johnson e Özhatay 1996; Vosa 2000).

Referências

- Cave MS, Bradley MV (1943) Alterations of chromosome numbers in *Miersia chilensis*. American Journal of Botany 30:142-149.

- Crosa O (1972) Estudios cariología en el género *Nothoscordum* (Liliaceae). Boletín de la Facultad de Agronomía de Uruguay 122:3-8.
- Crosa O (1975) *Zoellnerallium*, un género nuevo para la tribu Allieae (Liliaceae). Darwiniana 19:331-334.
- Crosa O (1981) Los cromosomas de cinco especies del género *Tristagma* (Liliaceae). Darwiniana 23:361-366.
- Crosa O (1988) Los cromosomas de nueve especies del genero chileno *Leucocoryne* Lindly, (Allieae-Alliaceae). Boletín de investigación n.º 17. Montevideo, Uruguay.
- Crosa O. 2004. Segunda especie y justificación del género *Zoellnerallium* (Alliaceae). Darwiniana 42:165-168.
- Escobar I, Novoa P, Ruiz E, Negritto M, Baeza C (2010) Nuevo hallazgo de *Miersia cornuta* Phil. (Gilliesieae-Alliaceae). Gayana Bot 67:130-134.
- Fay MF, Chase MW (1996) Resurrection of Themidaceae for the Brodiaea alliance, and Recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. Taxon 45:441-451.
- Fay MF, Rudall PJ, Chase MW (2006) Molecular studies of subfamily Gilliesioideae (Alliaceae). Aliso 22:367-371.
- Goldblatt P (1976) New or noteworthy chromosome records in the Angiosperms. Ann Missouri Bot Gard 63:889-895.
- Hall KJ, Parker JS (1995) Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. Chromosome Research 3:417-422.

- Jones K (1998) Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. *The Botanical Review* 64:273-289.
- Johnson MAT, Özhatay N. 1996. A review of *Allium* sect *Allium*. *Cytology* 17-40.
- León B (2006) Liliaceae endémicas del Perú. *Rev peru biol* 13:755-756.
- Negritto MA, Ruiz E, Beck S, Escobar I, Baeza CM (2010) *Schickendantziella trichosepala* (Alliaceae), nueva cita para Bolivia. *Gayana Bot* 67:135-137.
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F (2010) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138:343-354.
- Pascoe PL, Patton SJ, Critcher R, Dixon DR (1996) Robertsonian polymorphism in the marine gastropod, *Nucella lapillus*: advances in karyology using rDNA loci and NORs. *Chromosoma* 104:455-460.
- Rudall PJ, Bateman RM, Fay MF, Eastman A (2002) Floral anatomy and systematics of Alliaceae with particular reference to *Gilliesia*, a presumed insect mimic with strongly zygomorphic flowers. *American Journal of Botany* 89:1867-1883.
- Schubert I (2007) Chromosome evolution. *Curr Opin Plant Biol* 10:109-115.
- Souza LGR, Crosa O, Guerra M (2010) Karyological circumscription of *Ipheion Rafinesque* (Gilliesioideae, Alliaceae). *Plant Syst Evol* 287:119-127.
- Tagashira N, Kondo K (2001) Chromosome phylogeny of *Zamia* and *Ceratozamia* by means of Robertsonian changes detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique of rDNA. *Plant Syst Evol* 227:145-155.

Vosa CG (2000) A revised cytotaxonomy of the genus *Tulbaghia* (Alliaceae).
Caryologia 53:83-112.

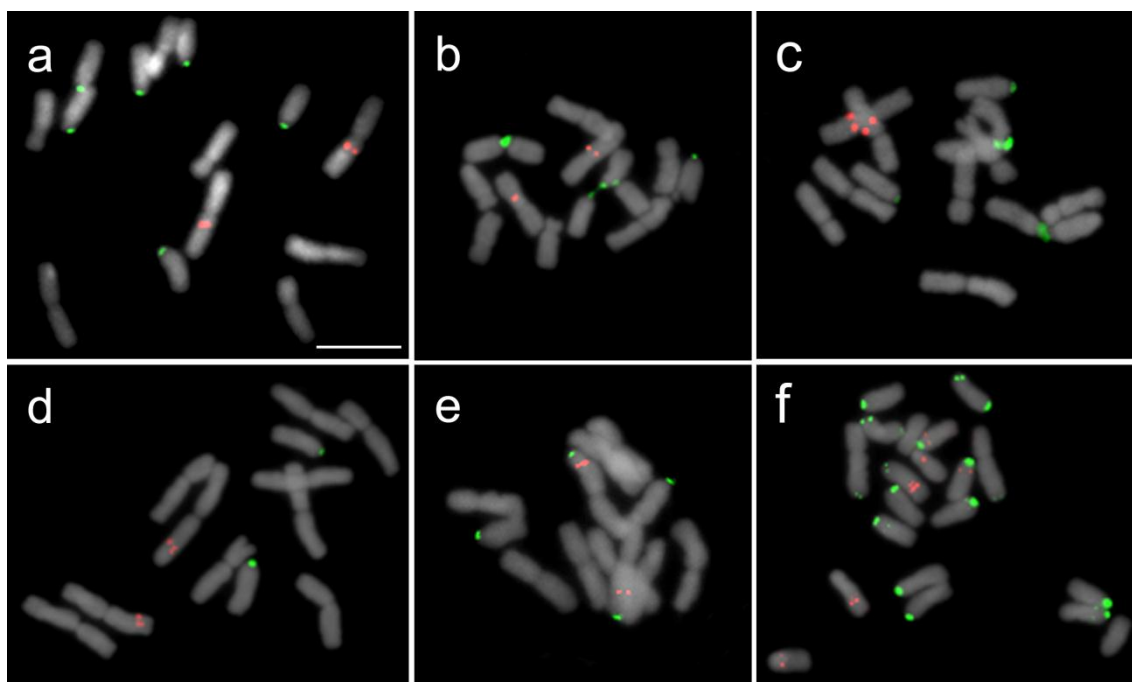


Fig. 1 Metáfases mitóticas mostrando a distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em espécies da tribo Gilliesieae. **a-c** espécies com $2n = 14$ (4M + 4SM + 6A): *Gilliesia graminea* (**a**), *Gethyum artropurpureum* (**b**) e *Solaria miersioide* (**c**). **d**, *Speea humilis* $2n = 12$ (8M + 2SM + 2A). **e-f**, indivíduos de *Miersia chilensis* com $2n = 20$ (2SM + 18A) (**e**) e $2n = 12$ (8M + 2SM + 2A) (**f**). Barra em **a** equivale a 10 μm .

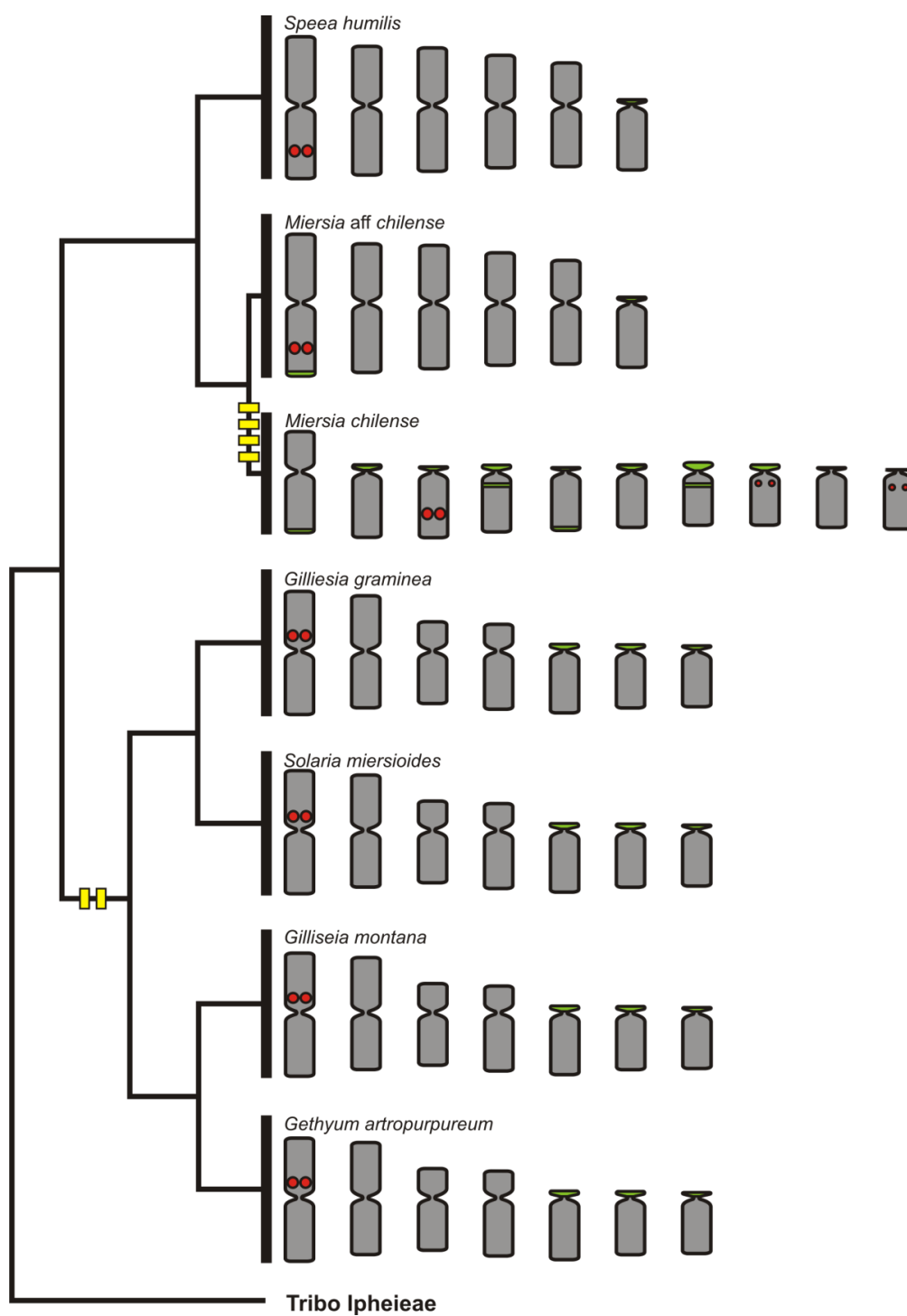


Fig. 2 Árvore filogenética e idiogramas mostrando os possíveis eventos de fissão cêntrica (retângulos amarelos no cladograma) envolvidos na evolução cariotípica da tribo Gilliesieae. Nos idiogramas está apresentada a distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde). Cladograma modificado de Escobar et al. (em preparação).

Tabela 1 Espécies analisadas da tribo Gilliesieae com número de voucher, procedência, número cromossômico ($2n$), fórmula cariotípica, número fundamental (NF) e número de sítios de DNAr.

Espécie	Voucher	Procedência	$2n$	Fórmula cariotípica	NF	Sítios de DNAr	
						5S	45S
<i>Miersia chilensis</i> Lindl	CONC 27	Parque Nacional La Campana, Región de Valparaíso, Chile	12	8M + 2SM + 2A	11	2	4
<i>Speea humilis</i> Loes	CONC 95	Alhué, Región Metropolitana, Chile	20	2SM + 18A	11	6	26
	CONC 30	Parque Nacional La Campana, Región de Valparaíso, Chile	12	8M + 2SM + 2A	11	2	2
<i>Gethyum atropurpureum</i> Phil	CONC 4160	Quebrada Nido de Águila, Región Metropolitana, Chile	14	4M + 4SM + 6A	11	2	6
<i>Gethyum cuspidatum</i> (Harv. ex Baker) Muñoz-Schick	CONC 12	Parque Nacional Fray Jorge, Región de Coquimbo	14	4M + 4SM + 6A	11	2	6
<i>Gilliesia graminea</i> Lindl	CONC 18	Parque Nacional La Campana, Región de Valparaíso, Chile	14	4M + 4SM + 6A	11	2	6
<i>Gilliesia montana</i> Poepp & Endl	CONC 56	Reserva Los Ruiles de Empedrado, Región del Maule, Chile	14	4M + 4SM + 6A	11	2	6
<i>Solaria miersioides</i> Phil	CONC 137	Los Álamos-Cipreses, Región del Maule, Chile	14	4M + 4SM + 6A	11	2	6

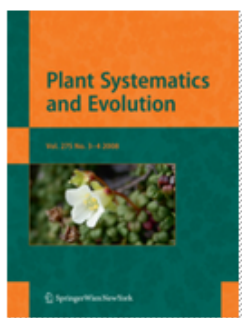
M = metacêntrico, SM = submetacêntrico e A = acrocêntrico.

Conclusões

- A evolução cariotípica da subfamília Gilliesioideae foi moldada principalmente por poliploidia e fissões cêntricas com surgimento de novos sítios de DNAr 45S nos braços curtos dos acrocêntricos, diferentemente do observado nas demais subfamílias de Alliaceae.
- A presença de sítios teloméricos ectópicos proximais em algumas espécies de *Nothoscordum* aparentemente não está associada a fusões cêntricas, mas sim a transferência equilocal de DNA telomérico.
- As espécies dos gêneros *Ipheion* e *Nothoscordum*, assim como algumas espécies da ordem Asparagales, apresentam nos terminais cromossômicos de dois motivos teloméricos TTAGGG e TTTAGGG.
- As evidências filogenéticas e cariotípicas permitiram distinguir as três espécies de *Ipheion* das espécies morfologicamente relacionadas do gênero *Nothoscordum*, suportando a manutenção dessas espécies em um gênero à parte.
- No complexo *Inodorum*, os diploides *N. nudicaule* e *N. macrostemon* apareceram como espécies consistentes, porém de divergência recente. Os tetraploides apomíticos devem ter se formado por múltiplos eventos independentes de hibridação entre esses diploides e entre diploides e tetraploides, com recorrente formação do cariótipo $2n = 19$ (13M + 6A). Parte desses tetraplóides é morfologicamente reconhecível como *N. gracile*.
- O complexo *Bivalve* não é monofilético, embora *N. bivalve*, *N. bonariense* e *N. gaudichaudianum* formem um clado único dentro da secção *Nothoscordum*. *Nothoscordum bonariense* é uma espécie de origem híbrida, assimétrica, formada por um genoma de *N. bivalve* ($x = 5$) e dois genomas de *N. gaudichaudianum* ($x = 4$).

- A secção *Nothoscordum* forma um grupo monofilético dentro do gênero *Nothoscordum*. Esse grupo apresenta como número cromossômico básico $x = 5$ ($3M + 2A$), embora algumas espécies apresentem $2n = 8$, provavelmente devido a um evento de fusão cêntrica. Citologicamente essa secção difere da secção *Inodorum* pela presença de sítios de DNAr 45S em cromossomos metacêntricos e um maior número de sítios de DNAr 5S em várias espécies.
- A secção *Nothoscordum* é o grupo cariotipicamente mais diversificado da família Alliaceae, principalmente quanto ao número e posição de sítios de DNAr 5S e 45S. Evidências moleculares sugerem que essa extrema diversificação cariotípica tenha se dado num intervalo de tempo muito curto.
- Os dados cito-moleculares permitem distinguir duas linhagens entre os tetraplóides do gênero *Leucocoryne*, diferenciadas citologicamente pelo número de sítios de DNAr 5S.
- Os dados moleculares, cariotípicos e morfológicos indicam que o gênero *Zoellnerallium* é um grupo natural e deve ser validado como um gênero da tribo Ipheieae.
- A evolução cariotípica da tribo Gilliesieae foi moldada principalmente por disploidia ascendente, partindo do cariótipo ancestral $2n = 12$ presente em *Miersia* e *Speea*, e em linhagens independentes dando origem a $2n = 14$, presente em *Gethyum*, *Gilliesia* e *Solaria*, e $2n = 20$ presente em *Miersia*.

Anexos – Normas das revistas



Plant Systematics and Evolution

Editor-in-Chief: Frank H. Hellwig

ISSN: 0378-2697 (print version)

ISSN: 1615-6110 (electronic version)

Journal no. 606



Instructions for Authors

Editorial Procedure

Authors are kindly asked to provide a list of reviewers including their scientific relations. Furthermore a short explanation (two sentences) of their findings should be given.

Manuscript submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title page

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

- Save your file in doc format. Do not submit docx files.

- » Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- » LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

- ✦ Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.
- ✦ Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- ✦ Genus and species names should be in italics.
- ✦ Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.
- ✦ Details must be given about origin and determination of each organism studied. Scientific (Latin) names should conform to the international rules of nomenclature. Authors of species and infraspecific taxa investigated must be given either when first mentioned in text or included all in one of the tables. In principal, voucher specimens are to be deposited in a large public herbarium quoted using the abbreviation given in the "Index Herbariorum".
- ✦ Data matrices including sequence alignments must be made available to the public. There must be a sentence included in the Materials and methods section that such information is available from the corresponding author. "DNA or proteine sequences must be deposited in public data bases (GenBank, EMBL, etc.) before the revised version is sent to the editor."

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- ✦ Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- ✦ This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- ✦ This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

✦ Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

- Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329
- ✱ Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
 - ✱ Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
 - ✱ Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230–257
 - ✱ Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
 - ✱ Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

✉ www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

» EndNote style (zip, 3 kB)

Tables

- ✱ All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- ✱ Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ✱ For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- ✱ Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- ✱ Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

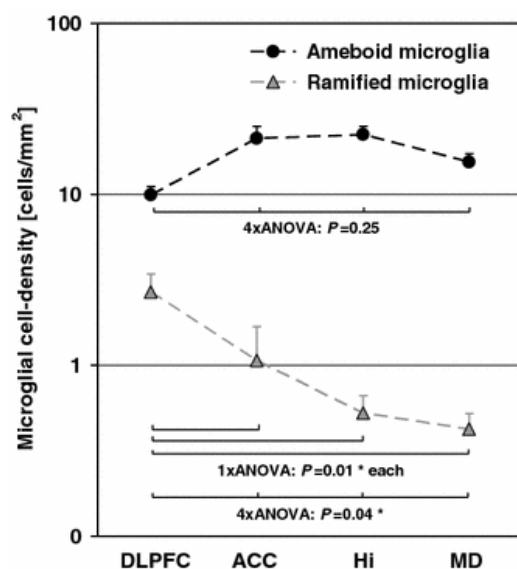
Artwork

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- ✱ Supply all figures electronically.
- ✱ Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- ✱ For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- ✱ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- ✱ Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

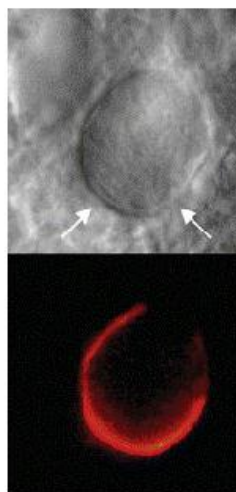
Line Art



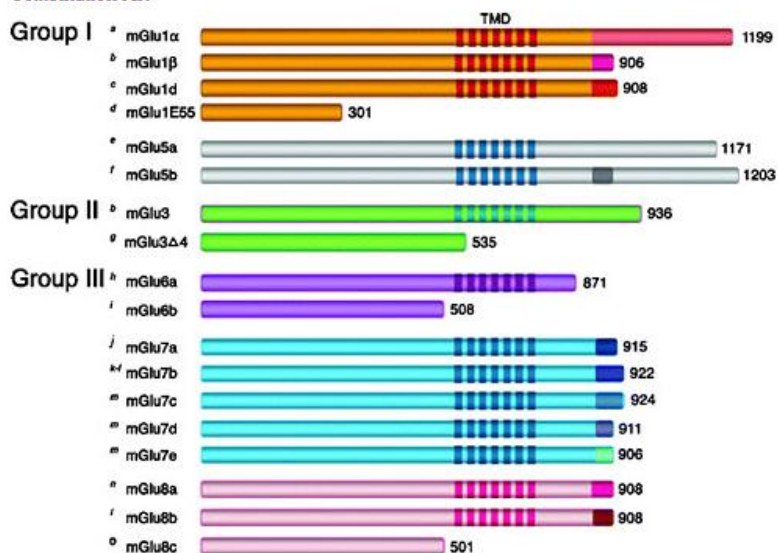
- ⌘ Definition: Black and white graphic with no shading.
- ⌘ Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- ⌘ All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- ⌘ Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- ⌘ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- ⌘ Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- ⌘ If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- ⌘ Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- ✦ All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- ✦ Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ✦ Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- ✦ If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- ✦ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- ✦ Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- ✦ No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- ✦ Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- ✦ Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- ✦ When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- ✦ For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- ✦ For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- ✦ All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- ✦ Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- ✦ Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.



INFORMATION FOR AUTHORS

[INTRODUCTION](#)

[PREPARING THE ARTICLE FILE](#)

[PREPARING TABLE FILES, FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES and VIDEO FILES](#)

[THE REVIEW PROCESS](#)

[FORMATTING AND SUBMITTING A REVISED PAPER](#)

[ACCEPTANCE, PROOFS, PRODUCTION AND PUBLICATION](#)

[FORMAL STATEMENT](#)

New for 2010 – Please note that the journal now encourages authors to complete their copyright licence to publish form online

INTRODUCTION

Scope of the journal

Annals of Botany is published for the Annals of Botany Company by Oxford University Press. Experimental, theoretical and applied papers on all aspects of plant science are welcome. The submitted manuscript or its essential content must not have been published previously or be under consideration for publication elsewhere. To merit publication in *Annals of Botany*, contributions should be substantial, written in clear English and combine originality of content with potential general interest. Submission of manuscripts that report small incremental advances or are of geographically local interest only is discouraged unless the implications of the findings are wide-reaching. Agronomic papers are expected to contain a substantial amount of basic plant biology. In general, a paper is unlikely to be accepted unless the referees and editors involved in its evaluation are enthusiastic about the science. The Covering Letter is an essential part of all submissions. It should include an ~60 word summary of the scientific strengths of the paper that the author(s) believe qualify it for consideration by *Annals of Botany*.

Authors whose first language is not English are well advised to have the manuscript, including Abstract, and the Covering Letter, checked by a native English speaker prior to submission. Many professional language-editing services are available on the internet. One such service is provided by Rescript Co of New Zealand, which includes help with manuscript revisions. It is contactable on <http://www.rescript.co.nz>. Other services are smart English, which can be contacted via <http://www.smartenglish.co.uk/>, and proofproper at www.proofproper.co.uk. The *Annals of Botany* takes no responsibility for the quality of the service offered by these companies and use of such a service does not guarantee that any manuscript will be accepted for publication. We welcome feedback about these services, and suggestions for any others.

Charges

Authors pay no fees or page charges unless electing for our Open Access scheme (see below for details). The corresponding author receives a free copy of the issue of the Journal in which their paper appears and a unique URL that gives access to a PDF (Portable Document Format) file of their article. In addition, 25 offprints of the article will be supplied without charge. Additional offprints can be ordered using the [offprint order form](#) sent out with the proofs. Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from elsewhere in the EU you or your institution should account for VAT by way of a reverse charge. Please provide us with your or your institution's VAT number. Colour photographs and graphics are also printed without charge where their use enhances scientific content or clarity.

Open Access

Annals of Botany authors have the option to publish their paper under the [Oxford Open](#) initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. *Annals of Botany* offers extremely competitive rates for Open Access publication, supported by its not-for-profit status aiming to promote botanical science. Corresponding authors/institutions can choose to pay a subsidized rate of 1000 GBP/1615 USD/1160 EUR, approximately 40% below the previous normal charge, and open access is further discounted or free for developing countries (click [here](#) for a list of qualifying countries). After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory licence to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

You can pay Open Access charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

Types of article

Standard research papers ('ORIGINAL ARTICLES') and 'TECHNICAL ARTICLES' should not normally exceed ten printed pages. A 'REVIEW' submitted speculatively should generally have fewer than 25 printed pages. Opinion papers ('VIEWPOINT') and 'RESEARCH IN CONTEXT' articles are also welcome: the latter category is for papers that combine a review/overview of a subject area with original research that moves the topic forward. 'INVITED REVIEWS' (generally up to 25 pages) and 'BOTANICAL BRIEFINGS' (up to 6 pages) are published by invitation only. Note that with the exception of Botanical Briefings, which are intended as short reviews, the number of pages suggested here is a guideline: in all cases the length of an article should be appropriate to its scientific content. The journal also publishes book reviews, but these are by invitation only (see [Publishers' Books for Review](#)).

Summary of submission processes

Submission management and evaluation of submitted manuscripts will involve the Journal's online manuscript submission system. The manuscript text should be prepared in English (see **PREPARING THE ARTICLE FILE** below for details) and submitted online starting from our login page. Figures, tables and other types of content should be organized into separate files for submission (see **PREPARING TABLE and FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES and VIDEO FILES** below for details). If you are using the online submission system for the first time please go to the login page and generate a login name and password after clicking on the "**First time authors only should register here**" link. If you are already registered but need to be reminded of your login name or password please go to the login page and click on "**Unknown/Forgotten password?**". There is extensive guidance available throughout the submission process. To make use of this guidance please click on the "Author Instructions" link or the "Tips" link situated at the top of every screen. In addition, there are frequent context-sensitive help points throughout the site that can be opened by clicking on the following symbol ?.

If you are unable to access our web-based submission system, please contact the Editorial Office (e-mail: annalsbotany@le.ac.uk) for alternative methods of submitting your paper. The postal address is Annals of Botany Editorial Office, Department of Biology, University of Leicester, University Road, Leicester LE1 7RH, UK.

[Back to Start](#)

Preparing a covering letter

Preparing a covering letter

Each submission should be accompanied by a **Covering Letter** formatted in MS Word (file type DOC) or in Rich Text Format (file type RTF). The letter should include contact details of the corresponding author, the title and authorship of the paper, and should state if the paper is a first submission, revision or a resubmission. It must also include an ~60 word summary of the scientific strengths of the paper that the author(s) believe qualify it for consideration by *Annals of Botany*. The manuscript reference number must be given if the paper is a revision or resubmission. If the paper is a revised or resubmitted manuscript, the letter should explain what changes have been made to the manuscript and where changes requested by the Handling Editor and referees have not been carried out. Any other information to which authors wish to draw the Chief Editor's attention should also be included in this letter.

PREPARING THE ARTICLE FILE

(Always consult a recent issue of *Annals of Botany* for layout and style)

Text should be typed using size 12 Times New Roman or Courier, double-spaced throughout and with an approx. 25 mm margin. All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. The article file should be in PC-compatible Microsoft Word - file type DOC [please make sure the "Language" is "English (U.K)" via Tools → Language → Set Language]. RTF files are also acceptable. Please do not use the Windows Vista DOCX format: if you have created the text in this format, please save the files as RTF before submitting them. Please do not submit PDFs, desktop publishing files or LaTeX files. The article file should *include* a list of any figure legends but *exclude* any figures themselves – these should be submitted separately, with each figure in a separate file. Tables should be included at the end of the article file, in a Word format and *not* embedded as an image/picture. For more details see below under **PREPARING TABLE and FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES AND VIDEO FILES**.

It is NOT journal style to have footnotes within articles. Any such notes must be incorporated into the main text, for example within brackets or as a separate paragraph.

The **first page** should state the type of article (e.g. Original Article, Technical Article) and provide a concise and informative full **title** followed by the names of all authors. Where necessary, each name should be followed by an identifying superscript number (1, 2, 3 etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. For papers with more than one author, the corresponding author's name should be followed by a superscript asterisk*. The institutional address(es) of each author should be listed next, each address being preceded by the relevant superscript number where appropriate. A running title of not more than 75 characters, including spaces, should also be provided, followed by the e-mail address of the corresponding author. Please follow the layout used for the first page of papers published in *Annals of Botany*.

The **second page** should contain a structured **Abstract** not exceeding 300 words made up of bulleted headings. For 'ORIGINAL ARTICLES' these heading will normally be as follows:

- *Background and Aims*
- *Methods*
- *Key Results*
- *Conclusions*

Alternative bulleted headings, such as 'Background', 'Scope' and 'Conclusions', are also acceptable for 'REVIEWS', 'INVITED REVIEWS', 'BOTANICAL BRIEFINGS', 'TECHNICAL ARTICLES' papers and 'VIEWPOINT' papers.

The Abstract should be followed by between three and 12 **Key words** that include the complete botanical name(s) of any relevant plant material. If many species are involved, species groups should be listed instead. Note that essential words in the title should be repeated in the key words since these, rather than the title, are used in some electronic searches. **Title, Abstract and Key words** should be self-explanatory without reference to the remainder of the paper.

The **third and subsequent pages** should comprise the remaining contents of the article text. 'ORIGINAL ARTICLES' and 'SHORT COMMUNICATIONS' will usually have the structure INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS and LITERATURE CITED followed by a list of captions to any figures.

The RESULTS section should not include extensive discussion and data should not be repeated in both graphical and tabular form. The DISCUSSION section should avoid extensive repetition of the RESULTS and *must* finish with some conclusions.

Abbreviations are discouraged *except* for units of measurement, standard chemical symbols (e.g. S, Na), names of chemicals (e.g. ATP, Mes, Hepes, NaCl, O₂), procedures (e.g. PCR, PAGE, RFLP), molecular terminology (e.g. bp, SDS) or statistical terms (e.g. ANOVA, s.d., s.e., *n*, *F*, *t*-test and *r*²) where *these are in general use*. Other abbreviations should be spelled out at first mention and all terms must be written out in full when used to start a sentence. Abbreviations of scientific terms should not be followed by a full stop. Use the minus index to indicate 'per' (e.g. m⁻³, L⁻¹, h⁻¹) except in such cases as 'per plant' or 'per pot'. If you decide that a list of abbreviations would help the reader, this should be included as an Appendix.

Units of Measurement. Use the *Système international d'unités* (SI) wherever possible. If non-SI units have to be used, the SI equivalent should be added in parentheses at first mention. For units of volume, expressions based on the cubic metre (e.g. 5 × 10⁻⁹ m³, 5 × 10⁻⁶ m³ or 5 × 10⁻³ m³) or the litre (e.g. 5 µL, 5 mL, 5 L) are acceptable, but one or other system should be used consistently throughout the manuscript. Typical expressions of concentrations might be 5 mmol m⁻³, 5 µM (for 5 µmol L⁻¹), or 25 mg L⁻¹. The Dalton (Da), or more conveniently the kDa, is a permitted non-SI unit of protein mass.

Names of plants must be written out in full (Genus, species) in the abstract and again in the main text for every organism at first mention (but the genus is only needed for the first species in a list within the same genus, e.g. *Lolium annuum*, *L. arenarium*). The authority (e.g. L., Mill., Benth.) is not required unless it is controversial. Guidance for naming plants correctly is given in [The International Plant Names Index](#) and in *The Plant Book: a Portable Dictionary of the Vascular Plants* (1997) by D.J. Mabberley (Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0521-414210-0). After first mention, the generic name may be abbreviated to its initial (e.g. *A. thaliana*) except where its use causes confusion.

Any cultivar or variety should be added to the full scientific name e.g. *Solanum lycopersicum* 'MoneyMaker' following the appropriate international code of practice. For guidance, refer to the ISHS [International Code of Nomenclature for Cultivated Plants](#) (2004) edited by C.D. Brickell, B. R. Baum, W. L. A. Hetterscheid, A. C. Leslie, J. McNeill, P. Treharne, F. Vrugtman, J. H. Wiersema (ISBN 3-906166-16-3).

Once defined in full, plants may also be referred to using vernacular or quasi-scientific names without italics or uppercase letters (e.g. *arabidopsis*, *dahlia*, *chrysanthemum*, *rumex*, *soybean*, *tomato*). This is often more convenient.

Items of **Specialized Equipment** mentioned in MATERIALS AND METHODS should be accompanied by details of the model, manufacturer, and city and country of origin.

Numbers up to and including ten should be written out unless they are measurements. All numbers above ten should be in numerals except at the start of sentences. **Dates** should be in the form of 10 Jan. 1999, and **Clock Time** in the form of 1600 h.

Mathematical equations must be in proper symbolic form; word equations are not acceptable. Each quantity should be defined with a unique *single character* or symbol together with a descriptive subscript if necessary. Each subscript should also be a *single character* if possible, but a short word is permissible. For example, a relationship between plant dry mass and fresh mass should appear as $M_d = 0.006M_f^{1.461}$, where M_d is plant dry mass and M_f is plant fresh mass; and not as $DM = 0.006FM^{1.461}$.

The meaning of terms used in equations should be explained when they first appear. Standard conventions for use of *italics* only for variables should be followed: normal (Roman) font should be used for letters that are identifiers. Thus in the above example, M is the *variable quantity* of mass, the subscripts d and f are identifiers for dry and fresh respectively.

Special note regarding 'Equation Editor' and other software for presentation of mathematics. Symbols and equations that are imported into Word documents as embedded objects from other software packages are generally incompatible with typesetting software and have to be re-keyed as part of the proof-making process. It is therefore **strongly advisable** to type symbols and equations directly into MS Word wherever possible. Importing from other software should ideally be confined to situations where it is essential, such as two-line equations (i.e. where numerators and denominators cannot be set clearly on a single line using '/') and to symbols that are not available in Word fonts. This will minimize the risk of errors associated with rekeying by copyeditors.

Summary statistics should be accompanied by the number of replicates and a measure of variation such as standard error or least significance difference. Analysis of variance is often appropriate where several treatments are involved. Presentation of an abridged ANOVA table is permissible when its use illustrates critical features of the experiment.

Chemical, biochemical and molecular biological nomenclature should be based on rules of the [International Union of Pure and Applied Chemistry \(IUPAC\)](#) and the [International Union of Biochemistry and Molecular Biology \(IUBMB\)](#). Chapter 16 of *Scientific Style and Format. The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers 6th edn.*, by Edward J. Huth (Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0-521-47154-0) gives guidelines.

Sequence information. Before novel sequences for proteins or nucleotides can be published, authors are required to deposit their data with one of the principal databases comprising the International Nucleotide Sequence Database Collaboration: [EMBL Nucleotide Sequence Database](#), [GenBank](#), or the [DNA Data Bank of Japan](#) and to include an accession number in the paper. Sequence matrices should only be included if alignment information is critical to the message of the paper. Such matrices can be in colour but should not occupy more than one printed page. Larger matrices will only be printed by special agreement but may more readily be published electronically as **Supplementary Information** (see below).

Gene nomenclature. Species-specific rules on plant gene nomenclature are available for:

[maize](#);
[rice](#);
[wheat](#) and
[arabidopsis](#).

Otherwise, *Annals of Botany* adopts the following conventions for abbreviations: each gene abbreviation is preceded by letters identifying the species of origin. Lower-case italics should be used for mutant genes (e.g. *Rp-etr1*); upper-case italics (e.g. *Le-ACO1*) for wild-type genes; upright lower-case for proteins of mutated genes (e.g. *Le-adh1*); and upright upper-case for proteins of wild-type genes (e.g. *At-MYB2*). It may often be helpful to readers if the names of genes or gene families are spelled out in full at first mention.

Citations in the text. These should take the form of Felle (2005) or Jacobsen and Forbes (1999) or (Williamson and Watanabe, 1987; Rodrigues, 2002a, b) and be ordered chronologically. Papers by three or more authors, even on first mention, should be abbreviated to the name of the first author followed by *et al.* (e.g. Zhang *et al.*, 2005). If two different authors have the same last name, give their initials (e.g. NH Kawano, 2003) to avoid confusion. Only refer to papers as 'in press' if they have been accepted for publication in a named journal, otherwise use the terms 'unpubl. res.', giving the initials and location of the person concerned. (e.g. H Gautier, INRA, Lusignan, France, unpubl. res.) or 'pers. comm.' (e.g. WT Jones, University of Oxford, UK, 'pers. comm.')

The **LITERATURE CITED** should be arranged alphabetically based on the surname of the first or sole author. Where the same sole author or same first author has two or more papers listed, these papers should be grouped in year order. Where such an author has more than one paper *in the same year*, these should be ordered with single authored papers first followed by two-author papers (ordered first alphabetically based on the second author's surname, then by year), and then any three-or-more-author papers (in year order only). Italicized letters 'a', 'b', 'c', etc., should be added to the date of papers with the same first authorship and year.

For papers with *six* authors or fewer, please give the names of *all* the authors. For papers with *seven* authors or more, please give the names of the *first three* authors only, followed by *et al.*

Each entry must conform to one of the following styles according to the type of publication.

Books

Öpik H, Rolfe S. 2005. *The physiology of flowering plants. Physicochemical and environmental plant physiology*, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press.

Chapters in books

Scandalios JG. 2001. Molecular responses to oxidative stress. In: Hawkesford MJ, Buchner P, eds. *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*. Dordrecht: Kluwer, 181-208.

Research papers

Popper ZA, Fry SC. 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Annals of Botany* **91**: 1-12.

Papers published online ahead of print

Forster MA, Ladd B, Bonser SP. 2011. Optimal allocation of resources in response to shading and neighbours in the heteroblastic species, *Acacia implexa*. *Annals of Botany*, in press. doi:10.1093/aob/mcq228.

NB include the doi number: a search for the doi will always be directed to the most recent version, so the reader will be able to find the final published paper as soon as it appears.

Online-only journals

Aizen MA, Morales C, Morales JM. 2008. Invasive mutualists erode native pollination webs. *PLoS Biology* **6**: e31. doi:10.1371/journal.pbio.0060031.

NB include the doi number after the volume and article number.

Theses

Tholen D. 2005. *Growth and photosynthesis in ethylene-insensitive plants*. PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands.

Anonymous sources

Anonymous. Year. Title of booklet, leaflet, report, etc. City: Publisher or other source, Country.

References to websites should be structured as: **Author(s) name, author(s) initial(s), year.** Full title of article. Full URL. Date of last successful access (e.g. 12 Jan. 2003)

Acknowledgements. In the ACKNOWLEDGEMENTS, please be brief. 'We thank . . .' (not 'The present authors would like to express their thanks to . . .').

Funding information. Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section.

The following rules should be followed:

- The sentence should begin: 'This work was supported by ...'
- The full official funding agency name should be given, i.e. 'the National Cancer Institute at the National Institutes of Health' or simply 'National Institutes of Health' not 'NCI' (one of the 27 subinstitutions) or 'NCI at NIH' ([full RIN-approved list of UK funding agencies](#))
- Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: '[grant number ABX CDXXXXXX]'
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: '[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]'
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency)
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'

An example is given here: 'This work was supported by the National Institutes of Health [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.] and the Alcohol & Education Research Council [HFY GR667789].

Oxford Journals will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central. See http://www.oxfordjournals.org/for_authors/repositories.html for details. Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above.

Appendix.

If elaborate use is made of units, symbols and abbreviations, or a detailed explanation of one facet of the paper seems in order, further details may be included in a separate APPENDIX placed after the LITERATURE CITED.

For more detail and information on types of files required for text, graphics and tables etc., please see the next section.

[Back to Start](#)

PREPARING TABLE FILES, FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES AND VIDEO FILES

Each table, figure, video and set of supplementary information should be prepared as a separate file on your computer in preparation for online submission. Towards the bottom of the first submission screen of the online submission system, you should enter the appropriate number of files you have in each category. This creates the spaces (boxes) that will accommodate the files when they are uploaded later. The files are categorized as 'Colour Figures', 'Black and White Figures', 'Tables', 'Supplemental Material' and 'Video'.

Tables. The best guide for laying out tables and diagrams are papers in a recent issue of *Annals of Botany*. Tables should be placed at the end of the main text file after the Literature Cited, and include a complete caption above the table and be numbered Table 1, Table 2 etc. according to the order in which they are first mentioned in the text. When preparing tables, adopt the 'Tables' set-up in MS Word, using one cell for each datum cluster (e.g. 12.2 ± 1.65) and avoid the use of the 'return' key. If the tables have been prepared in MS Excel, please paste them into the Word document as text, not as an object: i.e. it should be possible in Word to select and edit the text within the table.

Figures. All images (e.g. line diagrams, drawings, graphs, photographs, plates) are considered to be 'Figures'. Each figure should be in a separate file and be numbered (Fig. 1, Fig. 2 etc.) according to the order in which they are first mentioned in the text. Electron and light **photomicrographs** should have internal scale markers. **Colour images** are encouraged and printed without charge where they enhance significantly the clarity of the scientific information. **Line diagrams** will normally be black on white and boxed with inward scale markings. Use of colour in line diagrams may sometimes be agreed where this enhances clarity significantly. Use open and/or closed circles, squares and triangles for symbols in line graphs. Height and width should be chosen for either single (8.4 cm wide) or double (up to 17.3 cm wide) column reproduction. Grouping of related graphics into a single figure is strongly encouraged. When a block of illustrative material consists of several parts, each part should be labelled A, B, C, etc. and not treated as separate figures. Note that graphs and diagrams of finally accepted papers are normally redrawn by the publisher to ensure a consistent house style and should be inspected carefully by authors at the proof stage.

Simple black and white **line drawings and graphs** should be supplied as approx. 300 dpi JPG files or MS PowerPoint files. The publisher will almost always redraw all such material if the paper is accepted. More complicated drawings, such as detailed botanical illustrations will not be redrawn and should be supplied as 600 dpi JPG files. For continuous tone images (e.g. **photographs**), please supply JPG files at 300 dpi (or 600 dpi if the image is a mix of pictures and text and/or has thin lines). Keeping total files sizes down will lessen up- and downloading times. To help achieve this *all images should be submitted at approximately the physical size they would appear in the Journal*. Scaling, sizing and cropping are best carried out within image handling programs such as Adobe PhotoShop or Corel PhotoPaint. Please do not supply photographic images as PowerPoint files as these are generally of poor resolution. Note that PDF files are not acceptable. Also, please ensure that images that do NOT contain colour are saved as 'grayscale' and that any layers have been flattened – taking these steps can make the file size up to 10 times smaller. Note that a JPG file should not be repeatedly saved as this reduces quality.

Large amounts of additional information can be submitted for publication electronically as **Supplementary Information** provided that it is not essential for a basic understanding of the main paper. Supplementary material will be refereed along with the core paper. At appropriate positions in the main text authors should indicate what details are being made available, followed by the words [**Supplementary Information**] in bold and between square brackets. The online submission system provides space for supplementary information to be uploaded in "Supplemental Material" files. The appropriate number of these types of file can be selected towards the bottom of the first submission screen. Similarly, if you are including a **video** you should enter [**Supplementary Information - Video**] in bold and between square brackets at the appropriate place(s) in the text. A video can be uploaded after selecting a "Video" file on the first submission screen. The movie should be created in a widely available program such as Windows MediaPlayer. A short paragraph describing the contents of any Supplementary Information or Video should also be inserted in the main text immediately before ACKNOWLEDGEMENTS.

Reproducing material from other published work. If material from work already published elsewhere is included in the article (for example, a figure used to illustrate a review) then permission must be obtained in advance from the copyright holder. Even before you submit your article to the journal, please ensure you that you explore the copyright situation for the material you wish to use, identify any relevant copyright holders, and establish whether you are likely to be able to obtain permissions from them. When seeking permission to reproduce any kind of third party material, please request the following: (1) non-exclusive rights to reproduce the material in the specified article and journal published by Oxford Journals, a division of Oxford University Press; (2) print and electronic rights, ideally for use in any form or medium. If not possible to secure such broad-ranging rights, we do need the right to make the content available online; (3) the right to use the material for the life of the work (no time-restrictions such as one year etc on the licence granted); (4) world-wide English-language rights; if rights for all languages can be secured, this is preferable; and (5) the right to use images with a resolution of 300 dpi in the PDF version of the journal, or 72 dpi in the HTML version. Please contact the Annals of Botany Editorial Office if you have any queries regarding obtaining permission to reproduce material that may be under copyright.

[Back to Start](#)

THE REVIEW PROCESS

The corresponding author and all co-authors receive an acknowledgment of receipt of the manuscript and a manuscript reference number by e-mail. The corresponding author is informed when a Handling Editor has been assigned to the paper. Manuscripts considered suitable for peer review are sent to at least two outside referees. We give referees a target of two weeks for the return of their reports. Currently less than 25 % of submitted papers are accepted. Authors are asked to revise provisionally accepted articles within four weeks. To view the make-up of the Editorial Board click on [View full editorial board](#).

[Back to Start](#)

FORMATTING AND SUBMITTING A REVISED PAPER

The technical requirements for the Article, Table and Figure Files etc. are as described above for the first submission. If the technical requirements are not met, the paper will be sent back to the author until satisfactory files are provided. Revised papers are checked by a member of the Editorial Board and may be subject to a further round of refereeing.

[Back to Start](#)

ACCEPTANCE, PROOFS, PRODUCTION AND PUBLICATION

When a paper is finally accepted you will be asked to supply some additional material for our **ContentSnapshot** feature. Each **ContentSnapshot** comprises a thumbnail image relevant to the paper and a short summary of its principal findings. For this, you will be asked to prepare a suitable Snapshot Image file (in colour) for the thumbnail illustration and also a short summary title and text (up to 60 words) to associate with the image.

Examples of **ContentSnapshots** can be found at <http://agb.oxfordjournals.org/content/106/4/i.full.pdf+html>.

You will also be invited to submit an eye-catching front **cover picture** and about 60 words of text for possible printing on the inside cover of the issue in which your article would appear. The technical requirements are similar to those for manuscript photographs. The picture should be sharp, of good contrast and be related to the content of the submitted paper; however, it need not be duplicated in the paper itself. The image should be sent as a TIFF, JPG or GIF file at 300 dpi, size approx. 10 × 10 cm. Authors of selected material will receive a copy of the cover illustration and a complimentary copy of the relevant issue of the Journal.

After acceptance you will also be asked to complete the online Licence to Publish form. This form also offers the opportunity to choose to have the full text and PDF versions of the paper made available to non-subscribers online from the time of first publication (**Open Access**). There is a charge for this, which varies depending on circumstances (see <http://www.oxfordjournals.org/oxfordopen/charges.html>) but it is considerably cheaper for authors whose university or institution subscribes to the Journal, and for authors in developing countries. If you do not select the Open Access option, your paper will be published with standard subscription-based access and no charge will be made.

Information about the **New Creative Commons licence** can be found [here](#).

Once a satisfactorily revised version has been received and accepted, the title of the paper, authorship and hyperlinked e-mail address of the corresponding author will be posted on the *Annals of Botany* website under **AOBFirstAlert**. This feature is accessible by subscribers and non-subscribers from the [Journal's home page](#). Corresponding authors will receive PDF **proofs** by e-mail attachment approximately 4–6 weeks after acceptance. Corrected proofs should be returned within 24 h. Adobe Acrobat Reader will be needed to read the PDF proof and is downloadable without charge from: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Authors should pay special attention to **diagrams, figures** and to **equations** since these items are usually re-keyed or redrawn by the publisher. At this stage, authors will also be invited to order offprints and extra single copies of the issue in which the article will appear.

Publication and printing process

Once corrected proofs have been received and checked, the paper is posted on the website approximately six weeks ahead of print under **AOBPreview**. Each article is identified by a unique DOI (Digital Object Identifier), a code that can be used in bibliographic referencing and searching. The DOI and date of electronic publication in **AOBPreview** are also printed in the normal fully paginated monthly issue that is published about six weeks later. The paper will appear online and in print during the week preceding the start of the month of issue. The dates of submission, first return for revision, final acceptance and date of electronic publication of each article are printed on each paper.

The corresponding author will receive a free copy of the printed issue in which their paper appears and a free URL that gives access to the article online and to a downloadable PDF. In addition, 25 free printed copies of the article will be supplied. These items are normally dispatched within seven days of publication of the printed journal. The corresponding author is responsible for distributing this URL to any co-authors.

Post-publication services

Monthly alerts that supply the Journal's current **Table of Contents** can be requested by clicking on [Email table of contents](#) or by using an RSS feed. For more details on the latter click on [XML RSS feed](#). Readers can also be alerted to related papers in *Annals of Botany* and a wide range of other journals using the High Wire 'CiteTrack' alerting system. To access this click on [CiteTrack](#).

[Back to Start](#)

FORMAL STATEMENT

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be invited to complete an online copyright licence to publish form. Please note that by submitting an article for publication you confirm that you are the corresponding/submitting author and that Oxford University Press ("OUP") may retain your email address for the purpose of communicating with you about the article. You agree to notify OUP immediately if your details change. If your article is accepted for publication OUP will contact you using the email address you have used in the registration process. Please note that OUP does not retain copies of rejected articles.

Authors or their employers retain copyright on articles published in *Annals of Botany*. However, it is a condition of publication in the Journal that authors or their employers grant an exclusive licence to the Annals of Botany Company by completing and signing the Licence to Publish. This ensures that requests from third parties to reproduce articles are handled efficiently and consistently and allows the article to be disseminated as widely as possible. The Licence permits authors to use their own material in other publications provided that the Journal is acknowledged as the original place of publication and that the Annals of Botany Company is notified in writing.

Papers are published on the understanding that the work is free of plagiarism, that all authors have agreed to publication in *Annals of Botany* and that those contributing substantially to the work have been appropriately acknowledged or given co-authorship. The official publication date is the date on which the paper is first posted electronically on the website. This date will normally be when the paper appears in *AOBPreview*. If a paper is not posted in *AOBPreview*, the date of publication is the date of first appearance in a fully paginated print or electronic monthly issue. For more about rights and permissions click on this link [Rights](#).

Author Self-Archiving/Public Access policy

For information about this journal's policy, please visit our [Author Self-Archiving policy page](#).

[Back to Start](#)

Online ISSN 1095-8290 - Print ISSN 0305-7364

[Copyright © 2011](#)

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

[Site Map](#) [Privacy Policy](#)

American Journal of Botany

[HOME](#) | [ABOUT](#) | [PAST ISSUES](#) | [SUBSCRIPTIONS](#) | [ALERTS](#) | [FEEDBACK](#) | [HELP](#)



Instructions for Authors:

[Scope and Aims of the Journal](#) | [Review Procedure and Policy](#) | [General Instructions and Requirements](#) | [Article Types](#) |

[Manuscript Preparation](#) | [Cover/Response Letter](#) | [Author Agreement Form](#) |

[Manuscript Content](#) | [Title Page](#) | [Footnote Page](#) | [Abstract Page](#) | [Text](#) | [Literature Cited](#) |
[Tables](#) | [Appendices](#) | [Figure Legends](#) | [Figures/Illustrations](#) |
[Online Supplemental Materials](#) | [Abbreviations, Units, and Symbols](#) |

[Copyright and Color Agreement](#) | [Contact the Editorial Office](#) |

For *AJB* Primer Notes & Protocols in the Plant Sciences Instructions for Authors,
 go to http://www.botany.org/ajb/PNP_Online_instructions.html.

Scope and Aims of the Journal

The *American Journal of Botany* (*AJB*) publishes peer-reviewed, innovative, significant research of interest to a wide audience of plant scientists in all areas of plant biology (structure, function, development, diversity, genetics, evolution, systematics), all levels of organization (molecular to ecosystem), and all plant groups and allied organisms (cyanobacteria, algae, fungi, and lichens). *AJB* requires authors to frame their research questions and discuss their results in terms of major questions of plant biology. In general, papers that are too narrowly focused, purely descriptive, natural history, broad surveys, or that contain only preliminary data will not be considered.

The *AJB* also includes *AJB* Primer Notes & Protocols in the Plant Sciences, an online-only section for papers intended to promote rapid dissemination of protocols used in genetic analyses of plants. Subjects appropriate for this section include: (1) *marker notes* providing primer sequences for microsatellite or other markers in particular taxa, and (2) *protocol notes* describing new methods for isolating, visualizing, or scoring genetic markers. For complete instructions for this section, see http://www.botany.org/ajb/PNP_Online_instructions.html.

Review Procedure and Policy

Manuscripts are reviewed by scholars with expertise in the research area. Reviewers, Associate Editors, and the Editor-in-Chief evaluate manuscripts for innovations in, significant contributions to, and noteworthy advances in the theoretical or conceptual bases of the subdisciplines of plant biology, and/or novel insights of general relevance to fundamental questions of biology (see http://www.botany.org/ajb/AJB_Reviewer_Instructions.pdf for details on the content of reviews).

Manuscripts may be returned without review if the English needs significant improvement. Typically, authors have two opportunities to produce an acceptable manuscript: the original submission and one revision in which to address the criticisms and concerns of the reviewers and Associate Editors.

Correspondence and notifications regarding manuscripts will be through e-mail. All reviewer comments and author revisions are handled electronically using Editorial Manager (<http://ajb.edmgr.com>). Copyediting queries and page proofs (or e-galleys) are also provided electronically.

Final acceptance of a manuscript is contingent upon strict compliance with Journal requirements. Manuscripts other than Special Invited Papers are generally published in the order of receipt, within subject areas, of the final, accepted version or of the corrected proof. With the Journal's online **AJB Advance Access** feature, articles that have undergone complete peer review and copyediting, as well as full review by the authors, will be posted as soon as possible.

The Journal editors expect authors to follow the ethics guidelines of the Botanical Society of America (BSA) (www.botany.org/governance/ethics.php).

- **Copyrighted material**—If copyrighted material is reproduced in the manuscript, full attribution must be provided in the text; proof of permission must be sent to the Editorial Office. It is the responsibility of the authors, not the BSA or the editors or reviewers, to ensure that proper attribution is given to material previously published elsewhere. If suspicion is raised about the originality of the material (unattributed to source), the Editorial Office may check the manuscript for plagiarism.
- **Conflict of interest**—Authors are responsible for recognizing and disclosing any duality of interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other personal connections. All funding sources, including the research funder and grant number, must be given in the acknowledgements section.

Data—When using unpublished data owned or created by a researcher who is not the author or a co-author, a formal statement from the owner of the data must be sent to the Editorial Office acknowledging the use of the data and granting formal permission.

Nomenclature—*AJB* requires that nomenclature for all extant and extinct species conform to the current International Code of Botanical Nomenclature. Taxonomic authorities are given at first mention in the text (not in the manuscript title).

Use conventions adopted by the scientific community for genetic symbols and nomenclature.

Genetic Analyses—*AJB* requires that supporting genetic information, such as DNA, RNA, or protein sequences, be submitted to an appropriate data bank, such as GenBank/EMBL. Alignments used to produce phylogenies must be submitted to TreeBase or to *AJB* to be published as an online supplement with the paper.

The data matrices must be in an editable format (i.e., text files) for reanalysis by anyone interested. Phylogenetic analyses will generally only be considered if the phylogeny is used to test explicit evolutionary and/or ecological hypotheses or morphological associations—essentially a significant discussion of the impact and/or use of the phylogeny.

Vouchers—At the time of submission, *AJB* requires supporting genetic and voucher specimen information be provided (see Appendices section under "Manuscript Content"). In discussions of morphological character states, access to the data must be provided.

General Instructions and Requirements

Before submitting manuscripts, please review all instructions and refer to recent issues of *AJB*.

To take advantage of the free–page–charge policy, at least one author must be a member of the BSA when the manuscript is submitted for review as well as during the year of publication (except for Special Invited Papers). Authors who are not members of the BSA may also submit manuscripts for consideration: a mandatory page charge of \$150 per printed (or equivalent PDF) page is assessed. Page charges must be paid prior to a manuscript going into production, based on the estimated number of printed (or PDF) pages.

AJB requires that at least one colleague whose first language is English critically read and edit the manuscript before submission. Manuscripts may be returned without review if the English needs significant improvement.

Open Access

Starting in January 2010 *AJB* authors have the **option** to make their accepted paper freely available online immediately upon publication. The fee for Open Access is \$1500 (discounted to \$500 if the author's institution subscribes to the Journal). Contact the Editorial Office at ajb@botany.org for more information.

Submission process

Submit your manuscript via the online submission and review system, Editorial Manager, at <http://ajb.edmgr.com>. First-time users need to register for an account at this URL using their active e-mail addresses. The same Username and Password created on Editorial Manager are used to log in as an author or as a reviewer. [If there are any difficulties in the login or submission process, contact the Editorial Office at ajb@botany.org for assistance.]

Each BSA member is entitled to a set number of free pages per year dependent upon length of membership: 12 pages for members of 1–4 years, 16 for members of 5–9 years, and 20 for members longer than 10 years. If more than one author is a member, up to 14 free pages may be used per paper. **Each printed page in excess of the free pages is assessed a mandatory page charge of \$150 per page.** Authors are asked to pay voluntary publication costs if they have funds.

There is a mandatory charge for more than five changes made on proofs resulting from mistakes made by the author(s). Author(s) who require a figure replacement in the e-galleys stage, unless the error was caused by the *AJB* editorial staff or the compositor, will be charged \$25 for each figure replacement or correction.

Authors are encouraged to submit figures in color when doing so enhances the presentation of the scientific information. Due to the cost of printing color, however, the editor may recommend using black and white if the information is just as clear when presented this way.

Article Types

In addition to Research Papers, *AJB* publishes the following:

Special Invited Papers—These are mostly reviews of limited scope on timely subjects written for a general, albeit well-informed, audience. Special Invited Papers are typically solicited by the Editor-in-Chief, the Special Papers Editor, or an Associate Editor. Discuss ideas for unsolicited Special Papers with the Editor-in-Chief or the Special Papers Editor. Manuscripts are subject to the usual review process. Benefits for Special Invited Papers include rapid publication, no page charges, and free membership in the BSA for one year. In the introduction, succinctly explain why your paper is of interest to the general biological community.

Brief Communications—These are short papers (2–5 printed pages) reporting significant new findings that do not warrant standard full-length treatment with the usual main headings, or that provide scholarly commentaries, corrections, criticisms, or alternative interpretations of results presented in published papers. "Opinion" papers that are unsupported by new data or reanalysis of published data are unacceptable. Brief Communications are subject to normal review. Publication will be expedited. Membership requirements and page charges are not waived.

***AJB* Primer Notes & Protocols in the Plant Sciences**—Papers in this online-only section are focused on protocols used in genetic analyses of plants. Subjects appropriate for this section include: (1) *marker notes* providing primer sequences for microsatellite or other markers in particular taxa, and (2) *protocol notes* describing new methods for isolating, visualizing, or scoring genetic markers. Papers for this section must follow the template and specialized instructions at http://www.botany.org/ajb/PNP_Online_instructions.html.

Invited Commentary—All invited commentaries are paired with a forthcoming paper, usually on the suggestion of an Associate Editor or the Editor-in-Chief. These 3- to 5-page articles discuss the contributions and significance of the research paper relative to accepted or emerging paradigms in the subject. Membership requirements and page charges are waived.

Book Reviews—All book reviews are by invitation, and publication is expedited. Direct communication and manuscripts to the Book Review Editor. Membership requirements and page charges are waived. An alternative outlet for book reviews is the *Plant Science Bulletin*. [Contact the editor at psb@botany.org.]

Manuscript Preparation

A cover letter, an author agreement form, a manuscript file, and separate files for figures should be uploaded at <http://ajb.edmgr.com>. The manuscript file includes in the following order: Title Page, Footnote Page, Abstract Page, Text, Literature Cited, Tables, Appendices, and Figure Legends.

For manuscript files, MS Word (.doc) format is preferred, but Rich Text Format (.rtf) files are acceptable for review as well.

The Editorial Manager online submission system automatically inserts line numbers to facilitate review comments, so line numbers are not required in the manuscript file.

Double-space and left justify the margin of the entire manuscript, including Literature Cited, Appendices, Figure Legends, and Tables, using continuous pagination.

Leave at least a 2.5-cm margin on all sides. Place a header with last name(s) of author(s) and page number in upper right corner.

Number figures and tables in the order discussed in the text.

Cover/Response Letter

Include a cover letter that describes the questions addressed or hypotheses tested, the major contribution of your paper to your discipline, and how this contribution is of interest to a broad audience. List any papers on related topics by any of the authors that have been published within the past year or that are in review or in press. For a revision, include a letter detailing your response to all the review comments.

Author Agreement Form

Upon initial submission of a manuscript, the corresponding author must fill out an author agreement form and either upload an electronic version at the online submission site or mail or fax a hard copy to the Editorial Office in St. Louis, Missouri (**American Journal of Botany**, P.O. Box 299, St. Louis, MO 63166-0299, USA; 1-314-577-9515). The author agreement form is available online at http://www.botany.org/ajb/AJB_Author_Agreement_Form.doc; on the Editorial Manager website at the "Attach Files" screen; and from the Editorial Office.

Manuscript Content

1. Title Page

Place a running head 2.5 cm (1 in) below the top of the page with the surname of the FIRST author (followed, as appropriate, with the surname of a sole co-author, or with et al. if there are three or more authors) and a short title. The manuscript title for research papers should be specific and informative, conveying the key findings of the research in an active voice. Center boldfaced title written with sentence-style capitalization, followed by superscript 1 (for footnote 1, to appear on footnote page). In most cases, Latin binomials in a title should be followed by the name of the family in parentheses.

Below the title, list authors: each author's first name, middle initial, surname. On the next line, give affiliation and unabbreviated address. If authors have different affiliations and addresses, add a superscript number after each author's name to indicate the footnoted address. Include another footnote superscript number to indicate the author for correspondence.

2. Footnote Page

Include the following footnote:

¹Manuscript received _____; revision accepted _____.

Place brief acknowledgments, if desired, as a separate paragraph, using the following style: "The author(s) thank(s) ...". For brevity, do not use first names. Include grant acknowledgments here.

Other footnotes (e.g., e-mail for correspondence) are permitted: match footnote numbers with those on the title page.

3. Abstract Page

AJB requires structured abstracts for manuscript submission. The abstract is 250 words or less, written in the following structured format:

- *Premise of the study* (why the work was done, what major questions of plant biology are addressed, and why it is important to the broad *AJB* readership)
- *Methods*
- *Key results*
- *Conclusions* (what major points should the reader take from this article)

Note that the abstract will be used in an RSS feed and thus should capture the interest of the general botanical community as well as the specialists and include the most important contribution of this paper. Avoid references; if essential, cite parenthetically with journal name, volume number, pages, and year.

Provide a list of 3–10 “**Key words**” that will be used for the volume index. Capitalize proper nouns, place in alphabetical order, and separate by semicolons.

4. Text

In the first paragraph of the introduction, include the theoretical or conceptual basis for your work in a context accessible to the diverse botanical readership that *AJB* attracts. Include a summary of conclusions and a take-home message for the generally informed reader in the DISCUSSION.

Center main headings and capitalize all letters: MATERIALS AND METHODS, RESULTS, and DISCUSSION.

Indent subheadings at the start of a paragraph; capitalize only the first word and proper nouns and adjectives.

Second-level headings—(boldface italic followed by an em dash)

Third-level headings—(italic followed by an em dash) Fourth-level headings—(regular text followed by an em dash)

In MATERIALS AND METHODS add name, city, spelled-out state (if in USA), and country of manufacturers/suppliers after brand names.

after brand names.

If statistical analyses are used, include statistical values in the RESULTS either in the text or within tables. Include the statistic value, degrees of freedom, and p-value for each result reported (e.g., for a *t*-test report “*t* = 32.41, *df* = 1, *P* = 0.03”; for an ANOVA report “*F*_{5, 23} = 26.45, *P* < 0.001 note = “note” two = “two” *df* = “*df*” _-values = “_-values” as = “as” subscripts = “subscripts” with = “with” em = “em” > F]). Use *P* for significance, *p* for probability.

Common Latin words (e.g., *in vivo*, *sensu lato*) are not italicized.

Footnotes are not used in the text.

5. Literature Cited

Verify all entries against original sources. Double check that all references in the manuscript text are in the Literature Cited and vice-versa and that they agree in spelling and year.

Literature citations in text—Cite references in chronological order (oldest first); within a given year, order them alphabetically (e.g., Jones and Gil, 1999, 2006; Ashton et al., 2007; Brown, 2007; Jackson, 2005, 2008).

Single author: Jones (2008) or (Jones, 2008). Two authors: Jones and Gil (2008) or (Jones and Gil, 2008). More than two authors: Jones et al. (2008) or (Jones et al., 2008).

Manuscripts accepted for publication but not yet published: Jones (in press) or (Jones, in press). Include “In press” citations in LITERATURE CITED (shown later).

Unpublished data and manuscripts (e.g., submitted, in prep.) and personal communication: (F. Jones, Institution, unpublished data [or unpublished manuscript or personal observation]). These are not included in LITERATURE CITED.

References listed in LITERATURE CITED—List citations in alphabetical order by author. Single-author titles precede multi-authored titles by the same senior author, regardless of date.

List works by the same author(s) chronologically, beginning with earliest date of publication. Spell out all author(s)' names. Use "a", "b" (determined alphabetically) for works with the same author(s) and year citation.

For multi-authored works, list the first seven authors and then "et al."— unless there are only eight authors and then list all eight.

Type author names in citations in upper and lower case or in large and small caps, *not* in all caps. For formatting examples (note spacing, capitalization, italics, etc.), go to http://www.botany.org/ajb/ajb_Lit_Cited_Instructions.pdf.

6. Tables – include in manuscript file and place immediately after Literature Cited

Tables need to be formatted using the Table feature in Word or in a spreadsheet such as Excel.

Number tables with Arabic numerals followed by a period. Capitalize first word of title; all others, except proper nouns, are lowercase; spell out names of genera and abbreviations on first mention; place period at end. Include study organism (species or group) and geographic location in each caption when appropriate. Place explanatory notes and define all abbreviations below the table after the heading "Note:" or "Notes:". Place footnotes after the Notes.

Every column must have an appropriately placed heading (esp. the first at left—the stub head), with appropriate subheadings. In the body of the table, capitalize the first word of each entry (and proper nouns); do not use vertical lines between columns; indicate footnotes by lowercase superscript letters.

If the use of color in a table is essential, please contact the Editorial Office at ajb@botany.org.

7. Appendices – include in manuscript file and place immediately after the tables

If voucher and gene accession information support the study, list these in Appendix 1, which will be published in the print and online versions. Provide an appendix title, and a sentence-style row of headings for the data. For each taxon sampled, include specimen voucher information and/or gene accession numbers, separated by commas. To save space, the taxa can be run together in a paragraph. See a current issue or <http://www.amjbot.org/content/98/6/1049.full> for an example.

<http://www.amjbot.org/content/98/6/1049.full> for an example.

Additional appendices may be included. *AJB* encourages online-only publication of extensive appendices, as well as other supplemental materials that support the article but are best presented electronically (see "Online Supplemental Materials" below).

8. Figure Legends – include in manuscript file and place immediately after the Appendices (or after the tables if there are no appendices)

Each figure legend must be complete and informative so that reference to the text is not necessary to understand the content of the figure. Abbreviations should be defined unless they are standard convention. Place legends as separate paragraphs following the appendices. For figures with multiple lettered panels, a general title for the figure should be followed by a description of each panel (e.g., "Fig. 5. Relationship between... (A) All fruits. (B) Fruits <0.5 mm."). When applicable, include study organism (species or group) or geographic location, and define scale bar (e.g., Bar = 0.1 μ m). For micrographs, include pertinent information such as magnification and type of section, stain, optics, or special techniques. Any nonlinear adjustment to photographs must be detailed.

Define all symbols and abbreviations either in a key within the figure or in the legend; if defined in an earlier legend, the appropriate figure or table may be cited.

Place figure abbreviations in alphabetical order and format as follows: c, cell; n, nucleus.

9. Figures/Illustrations – upload as separate files (do not include in the manuscript file)

For details and illustrated examples, see http://www.botany.org/ajb/AJB_Digital_Art_Guidelines.pdf. A figure checklist is also available at http://www.botany.org/ajb/AJB_Figure_Checklist.pdf.

TIFF or EPS formats are preferred for color and black and white photographs, drawings, and graphs.

Prepare figures at the final size desired: 1 column (8.9 cm [3.5 in]), 1.5 column (12.7–15.3 cm [5–6 in]), or 2 columns (18.4 cm [7.25 in]) wide and less than the length of the page (23 cm [9 in]).

Low-resolution files may be initially uploaded/submitted for the review process. Once your manuscript has been tentatively accepted, printer-quality (high-resolution) figures are required. See "Tips for Large Files" below.

Figure Manipulations

Certain types of electronic manipulations of micrographs and other digital images may not be ethically acceptable. Images that will be compared with each other must be acquired and processed under the same conditions. Manipulations such as background subtraction or white-balancing should be explained in the Materials and Methods section. Note that a selected area within an image may not be altered or enhanced; the entire image must be treated the same. Linear adjustments to contrast, brightness, or color must be applied to an entire image or plate equally (or explained). Detail nonlinear adjustments in the legend. Always keep original raw data files for documentation upon request.

Resolution for Final Figures

Line art (black lines and text, including phylogenetic trees): 1000–1200 dpi.

Halftone/grayscale (images with shades of gray, such as black and white photographs): a minimum of 300 dpi.

Color: a minimum of 300 dpi. Use RGB mode (not Indexed Color Mode). [Note: Do not send color files if images are to be printed in black and white.]

Combination art (grayscale image with type): 600–900 dpi.

Grayscale images should have the whitest area of the image set at a 2% highlight value, while the blackest area of the image should be set to a 98% shadow value.

Include the screen and printer font files for any text that has been added to the figure. Use PC or Mac versions of Adobe Postscript fonts. To avoid font problems, convert all type to curves or paths.

Check figure quality online using Digital Expert at <http://dx.sheridan.com/onl/rgb/>.

Format and Style

Use consistent style, font, and font size (between 6 and 10 pt.) for all figures. Use of standard fonts (Times New Roman, Helvetica) gives better results.

For figures with multiple elements (photos, drawings, or graphs), group elements in a rectangle or square and label the top left corner of each element with a capital letter (e.g., A, B). Keep elements close together for best use of space. Photographs in a composite plate should each be numbered and separated by a thin line or blank space.

Label axes; include Standard International (SI) Units of measure in parentheses; capitalize only the first letter of the first word (e.g., "Stem growth (%)"). Axis label should be c. 0.2 cm from units on axis, but no more than 0.5 cm; x- and y-axis labels should be equidistant from axes.

Use abbreviations consistently in the text and figures.

For magnified illustrations, provide a scale bar defined in either the figure itself or at the end of the legend.

Cover image and caption

You are invited to submit one or more color photographs (or artificially colorized photomicrographs) to be considered for a cover illustration. The image must be at least 300 ppi and in portrait format slightly larger than 21.6 cm wide × 28 cm high (8.5 × 11 in). Submit the file(s) online with your original submission or revised manuscript. Also include a brief caption that describes the image, scientific name and authority of any organism, photographic technique, image manipulation, and the major result of the research. For micrographs, include pertinent information such as magnification and type of section, stain, optics, or special techniques.

The legend should do more than just describe the image itself: it should "tell a story" by explaining why the image is important to entice the reader to search for the full article. See <http://www.amjbot.org/content/vol95/issue4/cover.shtml> for an example.

Tips for Large Files

Files >5 MB may be slow (or impossible) to upload on most servers. When saving graphics, LZW compression (Save As/Option) may be used to reduce file size. If your image is line-art and all pixels are either black or white, first convert the image to grayscale mode, then convert to bitmap mode at 1200 dpi, then save with LZW compression. If your image is black and white with gray portions, convert the image to grayscale mode, then save with LZW compression. (If you have any confusion about bitmap mode for line-art, your Digital Art Guidelines contain examples of image types with suggested resolutions. Alternatively, the Editorial Office may direct you to upload the files to an FTP site or send them via e-mail through <http://www.YouSendIt.com>.)

Online Supplemental Materials

Authors may wish to augment their manuscripts with online supplemental materials (e.g., large data sets, three-dimensional reconstructions, simulations, real-time movies, color photographs). Upload these appendices as separate files with the initial manuscript submission. Include a header on each file using this format: Smith et al.—American Journal of Botany 97(#): ###–###. 2010. – Data Supplement S1 – Page 1". Name online supplements Appendix S1, Appendix S2, etc, in the order in which they appear in the text, regardless of whether they are tables, figures, text, other media, or a combination thereof. In the manuscript, after the mention of an online appendix, include the following: "(see Supplemental Data with the online version of this article)".

Note that if authors wish to submit long DNA sequence appendices as supplemental material, they should select the "DNA sequences (online-only supplemental)" option on Editorial Manager. This ensures that lengthy appendices are not built into the reviewers' PDF, but are still accessible to the reviewers.

Abbreviations, Units, and Symbols

See a recent Table of Contents page for commonly used abbreviations.

Do not begin a sentence, heading, or title with an abbreviation.

Abbreviate figure as "Fig." or "Figs."

Use the following abbreviations with numerals without spelling out at first use: h, min, s, yr, mo, wk, d, cm, mm, DNA, cpDNA, RNA, dNTP. Designate temperature as in 30°C (use the degree sign, not zero or the letter o).

Numbers: write out one through nine unless a measurement, a designator, or in a range (e.g., four petals, 3 mm, 6 yr, 5–11 species, day 2). Use % instead of percent with numerals; 1000 instead of 1,000; 10 000 instead of 10,000; 0.13 instead of .13.

Use Standard International (SI) units throughout the text, figures, and tables. Use the word mass (kg, g, mg) correctly; weight is reported in newtons (N). Use either a solidus for one unit in the denominator (e.g., kg/m²) or a negative exponent with multiplier dot (e.g., kg·m⁻²·d⁻¹) for two or more units in the denominator. Use L for liter (mL for milliliter).

(mL for milliliter).

Include a space before and after all operation signs (e.g., =, +) with equations and definitions; use an en dash (width of two hyphens) for minus sign.

Copyright and Color Agreement Forms

Once your manuscript has been accepted for publication, return signed copyright forms for the article, and any color plates, to the Editorial Office in St. Louis, Missouri. All authors must sign off on the copyright form or contact the Editorial Office to confirm their participation in the work.

Copyright Assignment – <http://www.botany.org/ajb/AJBcopyright.pdf>

Color agreement form – http://www.botany.org/ajb/AJBcolor_agr.pdf

If you have reproduced copyrighted material in your manuscript, send proof of permission to the Editorial Office.

If you would like to reproduce copyrighted material previously published in the *American Journal of Botany*, return the completed permission request form available online at <http://www.botany.org/ajb/BSAPermission.pdf>.

Questions? Contact the Editorial Office

American Journal of Botany

Amy McPherson, Managing Editor

Editorial Office

P.O. Box 299

St. Louis, MO 63166–0299

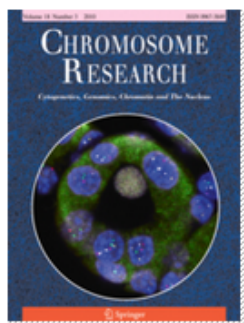
phone: 314–577–5112; FAX: 314–577–9515

E-MAIL: ajb@botany.org

[Last updated 20 October 2011]

Copyright © 2011 by Botanical Society of America, Inc.

For an alternate route to American Journal of Botany Online use this URL: <http://intl.amjbot.org> (More Information)



Chromosome Research

The Biology of Chromatin and Chromosomes

Editor-in-Chief: Herbert C. Macgregor; Conly L. Rieder

ISSN: 0967-3849 (print version)

ISSN: 1573-6849 (electronic version)

Journal no. 10577



Instructions for authors

Manuscript Submission

There are no page charges or charges for the publication of colour illustrations or administration charges for papers published in Chromosome Research.

It is understood that papers submitted for publication have not been published previously and are not simultaneously offered to any other journal. Before submission, the submitting author must ensure that the manuscript has been seen and approved by all other named authors.

How to Submit your Manuscript

Authors should submit their manuscripts online. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right of the [Chromosome Research web page](http://www.editorialmanager.com/chromres/), or follow this link:

<http://www.editorialmanager.com/chromres/>

Upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen. A decision with regard to acceptance for publication will normally be given within 21 days of receipt of the manuscript.

When submitting your manuscript, please choose one of the Associate Editors as your preferred handling editor. If you do not have a preference, or leave this option open, your submission will be handled by the Editor-in-Chief.

Editors-in-Chief:

Professor Herbert Macgregor
School of Biosciences
University of Exeter, UK

Professor Conly L. Rieder
Wadsworth Center, Biggs Laboratory
New York State Department of Health
Albany, NY, USA

Associate Editors:

Professor Wendy Bickmore
MRC Human Genetics Unit
Western General Hospital NHS Trust
Edinburgh, Scotland, UK

Professor Job Dekker
Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology
University of Massachusetts
Worcester, MA, USA

Dr. Jiming Jiang
 Department of Horticulture
 University of Wisconsin-Madison
 Madison, WI, USA

Dr. Hans de Jong
 Laboratory of Genetics
 Wageningen Universiteit
 Wageningen, the Netherlands

Dr. Irina Solovei
 School of Biosciences
 University of Exeter
 Exeter, UK

Dr. Beth A Sullivan
 Duke University
 Durham, NC, USA

Dr. Mary E. Delany
 Department of Animal Science
 University of California
 Davis, CA USA

Dr. Tatsuo Fukagawa
 National Institute of Genetics
 Mishima, Japan

Professor. J.S. (Pat) Heslop-Harrison
 Department of Biology
 University of Leicester
 Leicester, UK

Dr. Dean Jackson
 Faculty of Life Sciences
 The University of Manchester
 Manchester, UK

Dr. Beth A Sullivan
 Duke University
 Durham, NC, USA

Dr. Walther Traut
 Institut fuer Biologie
 Universitaet Luebeck
 Luebeck, Germany

Dr. Fengtang Yang
 The Wellcome Trust Sanger Institute
 Wellcome Trust Genome Campus
 Hinxton, Cambridge, UK

Style and Presentation

The manuscript should be typed with double spacing throughout, allowing for ample margins. The title page should show the paper title, names and addresses of all authors, a short running title, and fax and telephone numbers and the e-mail address for the corresponding author. The text of the paper should be arranged in the following sequence: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References. Informative legends should be provided for all illustrations and should be grouped together at the end of the paper, along with all tables. Subheadings may be inserted in the main text, but should not be numbered or lettered. Manuscripts should be written in clear, grammatical, idiomatic English. Spelling should conform to Webster's International Dictionary or The Concise Oxford English Dictionary and data should be presented simply and concisely, using Systeme International (SI) units.

Abbreviations

All abbreviations not obvious to the general reader should be defined the first time they are used. A complete alphabetically arranged list of all abbreviations used, including the definitions, should be included in the manuscript.

References

References should be cited in the text using the Harvard (name–date) system. Where there are three or more authors, only the first author's name should appear, followed by et al. Where several references are cited at the same point in the text, these should be arranged in chronological order. The reference list should be typed with double spacing and arranged in alphabetical order. References should include: names and initials of all authors (unless there are more than six authors, when only the first three authors should be given, followed by et al.); year of publication; full title of the article; source using abbreviations for journals as shown in Index Medicus; volume number; and first and last page numbers. Abstracts should be identified as such. For citations from books, the chapter title should be followed by the names and initials of all editors, the title of the book, edition, place of publication, publisher and first and last page numbers.

Examples:

Thomas HM, Harper JA, Morgan WG (2001) Gross chromosome rearrangements are occurring in an accession of the grass *Lolium rigidum*. *Chromosome Res* 9: 585–590.

Ohno S (2001) The one–to–four rule and paralogues of sex determining genes. In: Scherer G, Schmid M, eds. *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*. Birkhauser Verlag, pp 1–10.

Engel E, Antonarakis SE (2002) *Genomic Imprinting and Uniparental Disomy in Medicine*. New York: Wiley–Liss.

Only accepted papers should be referenced; all other material should be referred to in the text as 'in preparation', 'personal communication' 'unpublished observations' and should not be included in the reference list.

Citing Internet References

World Wide Web: All references should include the same information that would be provided for a printed source (or as much of that information as possible). The Web information is then placed at the end of the reference. It is important to use "Retrieved from" and the date because documents on the Web may change in content, move, or be removed from a site altogether. To cite a Web site in text (but not a specific document), it is sufficient to give the address (e.g., <http://www.apa.org>) there and no reference entry is needed. However, when citing a particular web page a citation in the text (e.g. Gaten 2000) and an entry in the reference list will be required.

For example:

Gaten E. (2000) Internet references. Retrieved from
<http://www.le.ac.uk/biology/teach/mod300/ecitations.html> 19/9/2000

E-mail: E-mail communications from individuals should be cited as personal communications. The format in the text (personal communications are not cited in the reference list) is as follows:

(E. Gaten personal communication, March 28, 2001).

It is possible to send an e-mail note disguised as someone else. Authors – not journal editors or copy editors – are responsible for the accuracy of all references, which includes verifying the source of e-mail communications before citing them as personal communications in manuscripts.

One of the most comprehensive guides to citing internet references is provided by the American Psychological Association: <http://www.apastyle.org/electref.html>

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes. Key words should be chosen carefully, they are essential to electronic search tools.

Tables and Illustrations

All tables and illustrations should be referred to in the text, with appropriate locations indicated in the text margin. Tables should present new information and not duplicate data included in the text. Every table should have a descriptive title and, if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Line drawings should be supplied in a form suitable for high-quality reproduction. Axes should be labelled clearly; other lettering should be kept to a minimum. Avoid the use of fine tints, especially as background to text.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel) TIFF.

Photographs and photomicrographs should be cropped as close as possible to the area of interest and should be submitted as high resolution (>300dpi) as electronic files together with the manuscript. All photomicrographs must be accompanied by a scale bar with the equivalent measurement stated in the figure legend.

Colour figures

There are no charges for the publication of colour illustrations, either in the online or in the printed version of *Chromosome Research*.

Electronic Supplementary Material

Electronic Supplementary Material (ESM) for a paper will be published in the electronic edition of this journal provided the material is submitted in electronic form together with the manuscript and accepted after peer review. Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting. After acceptance for publication, ESM will be published as received from the author in the online version only. Reference will be given in the printed version.

ESM may consist of:

- Information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (use PDF, QuickTime, .avi, .mpeg, animated GIFs, or any other common file format) Submit your text or presentation material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term storage.
- Information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.
- Large quantities of original data that relate to the paper, e.g. additional tables, large numbers of illustrations (colour and black & white), etc.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables (e.g., "... as shown in supplement S3").

Legends

Legends must be brief, self-sufficient explanations of the ESM. ESM is to be numbered and referred to as S1, S2, etc.

Permission and Copyright

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures or tables from unpublished or copyrighted material. Copyright in articles published in this journal is the property of Springer to the extent transferable. Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources. There are no page charges or administration charges for papers published in this journal.

Open access publishing: Springer Open Choice™

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a

subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice™. A Springer Open Choice™ article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly (free of charge) through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice™, upon acceptance please visit www.springer.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice™ cannot be ordered for published articles.

Please note that funding agencies with mandatory open access or public access (i.e. USA NIH and the UK Wellcome Trust) and several other institutes (The Max Planck in Germany, the Dutch UKB and others) have special arrangements for Open Access publishing with Springer. Please consult your funding agency's representative for specific details.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by email. Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours.

Off-prints

Authors may order additional off-prints on the form which accompanies the proofs.

Additional Information

Max Haring, PhD
Publishing editor for Chromosome Research
Springer Science & Business Media
P.O. Box 17
3300 AA Dordrecht
The Netherlands
E-mail: Max.Haring@springer.com

<http://www.springer.com/journal/10577>



<http://www.springer.com/journal/10577>

Chromosome Research
The Biology of Chromatin and Chromosomes
Editor-in-Chief: H.C. Macgregor; C.L. Rieder
ISSN: 0967-3849 (print version)
ISSN: 1573-6849 (electronic version)
Journal no. 10577