



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

JÉSSICA NASCIMENTO DE AGUIAR

**VARIAÇÃO CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DE *OXALIS*  
SUBGÊNERO *THAMNOXYS* (OXALIDACEAE)**

RECIFE  
2016

JÉSSICA NASCIMENTO DE AGUIAR

**VARIAÇÃO CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DE *OXALIS*  
SUBGÊNERO *THAMNOXYS* (OXALIDACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestra em Biologia Vegetal.  
Área de concentração: Sistemática e Evolução

Orientador (a): Dr. MARCELO DOS SANTOS GUERRA FILHO

Coorientador (a): Magdalena Vaio

RECIFE

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Nascimento de Aguiar, Jéssica .

Variação cromossômica em espécies de Oxalis subgênero Thamnoxys  
(oxalidaceae) / Jéssica Nascimento de Aguiar. - Recife, 2016.

51 : il., tab.

Orientador(a): MARCELO DOS SANTOS GUERRA FILHO

Coorientador(a): Magdalena Vaio

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de  
Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, 2016.

Inclui referências.

1. Citogenética vegetal. 2. Citogenética molecular. 3. Citotaxonomia. I.  
DOS SANTOS GUERRA FILHO , MARCELO . (Orientação). II. Vaio,  
Magdalena . (Coorientação). IV. Título.

580 CDD (22.ed.)

JÉSSICA NASCIMENTO DE AGUIAR

**VARIAÇÃO CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DE *OXALIS* SUBGÊNERO  
*THAMNOXYS* (OXALIDACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal. Área de concentração: Sistemática e Evolução.

Aprovado em: 31/08/2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Dr<sup>a</sup>. Lania Ísis Ferreira Alves (Examinador externo)  
Instituto Nacional do Semiárido- INSA[

Dedico esta Dissertação às minhas mães Edilene e Nizelda, à minha irmã Jénnyfer, à prima e companheira Maria Clara e aos professores Ana Emília e Marcelo Guerra. Grata eu sou pelo incentivo e apoio, e por nunca desistirem de mim

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcelo guerra, pela oportunidade e confiança a mim concedidas, pelo acolhimento, pela paciência, pelos grandes ensinamentos, compreensão e amizade; e principalmente por não ter desistido de mim.

À minha mãe Edilene pelo amor e dedicação.

Às minhas tias Nizelda, Carminha, Penha, Simony e Ana Paula, por todo amor e suporte durante toda a minha caminhada.

À toda a minha família por amor e consideração, paciência e suporte em todos os momentos de minha vida.

À minha irmã Jénnyfer, ao meu cunhado José Carlos, a prima Maria Clara, aos amigos Pablo, Edson, e amiga Socorro pelas verdades a mim direcionadas, pelo apoio, e por todos os momentos de alegria e descontração.

À professora e amiga Ana Emília, pela amizade, pelos conselhos, por toda a ajuda e suporte durante minha jornada científica.

À Magdalena Vaio pela ajuda e suporte, pelos esclarecimentos de minhas dúvidas e por todo o apoio ao trabalho.

Aos professores Andrea Pedrosa e Gustavo Souza pelos ensinamentos compartilhados e pela ajuda diária.

A Leonardo Félix e Pedro Fiaschi pela coleta e identificação das *Oxalis*.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Evolução vegetal, pela vivência e por todos os momentos compartilhados, tanto nas vitórias como nas derrotas.

A Tiago Ribeiro pela paciência, pela valiosíssima ajuda e pelos ensinamentos obtidos nos dia-a-dia.

Às minhas “divas do laboratório” Dani, Thallitha e Brena, pelo amor, carinho, ajuda, por todos os momentos maravilhosos compartilhados e por terem feito essa caminhada muito mais prazerosa. Amo vocês.

À Sandra Mendes pelo apoio, incentivo e inspiração para que eu pudesse prosseguir.

Ao meu querido amigo Felipe Nollet pela amizade e paciência, por todo o apoio e incentivo e ajuda preciosa nesta etapa final do trabalho.

Aos amigos de longa data, Rayssa, Jucélia e Camilo, por todo o amor e apoio necessário.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) por todo o apoio e ajuda.

A CAPES pelo apoio à pesquisa e pela concessão da bolsademestrado. A todos vocês o

meu muito obrigada!

## RESUMO

O subgênero *Thamnoxys* apresenta os maiores cromossomos do gênero e uma das maiores variações na quantidade de DNA entre as angiospermas. Neste trabalho, foi analisada a variação cariotípica em 12 espécies de *Thamnoxys* com base nas bandas CMA/DAPI, sítios de DNAr e quantidade de DNA. Em *O. psoraleoides*, a espécie com maior conteúdo de DNA, foi analisada também a distribuição de um retrotransposon e do DNA telomérico. Todos os parâmetros cariológicos foram bastante variáveis, apresentando números cromossômicos  $2n = 10$  a 24, cromossomos meta, submetata e acrocêntricos, 4 a 16 bandas CMA+, 2 a 4 de sítios de DNAr 5S e 4 a 14 de DNAr 45S co-localizados com bandas CMA+. Cada espécie diferiu das demais principalmente pelo tamanho e morfologia dos cromossomos e pela quantidade de DNA. *Oxalis psoraleoides* e *O. rhombo-ovata* foram as únicas com uma banda DAPI+ e sítio de DNAr 5S co-localizado com banda CMA+, confirmando a proximidade filogenética entre elas. Não foi detectado DNA telomérico associado à aparente fusão cêntrica em *O. psoraleoides*. Apesar da extensa variação em tamanho genômico, não foram encontrados blocos de heterocromatina além dos sítios de DNAr e da banda DAPI+. Por outro lado, a hibridização *in situ* de um retrotransposon revelou marcação intensa e homogênea nos cromossomos. O motivo da intensa diversidade cariotípica desse grupo permanece desconhecido mas a evolução cariotípica se deu principalmente por amplificação/deleção de elementos de transposição.

**Palavras-chave:** Citogenética, CMA/DAPI, DNAr 5S e 45S, DNA nuclear, evolução cariotípica.

## ABSTRACT

The subgenus *Thamnoxys* has the largest chromosomes of the genus and one of the largest variations in the amount of DNA between angiosperms. In this work, the karyotype change was analyzed in 12 species of *Thamnoxys* based on CMA/DAPI bands rDNA site and amount of DNA. *O. psoraleoides* the species with the highest DNA content was also analyzed the distribution of a retrotransposon and telomeric DNA. All the karyological parameters were quite variable, with chromosome numbers  $2n = 10$  to 24, target chromosomes, submetacentric and acrocentric, 4-16 CMA + bands, 2-4 5S rDNA sites and 4-14 rDNA 45S co-located with bands CMA +. Each species differed from the others mainly by the size and morphology of the chromosomes and the amount of DNA. *Oxalis psoraleoides* and *O. rhombo-ovata* were the only ones with a DAPI + band and 5S rDNA site co-located with CMA + band, confirming the close phylogenetic relationship between them. It was not detected telomeric DNA associated with apparent fusion centric *O. psoraleoides*. Despite the extensive variation in genome size, were found heterochromatin blocks in addition to the sites of rDNA and DAPI + band. Moreover, in situ hybridization of a retrotransposon revealed an intense and homogeneous mark on chromosomes. The reason for the intense karyotype diversity of this group remains unknown but the karyotype evolution was mainly amplification / deletion of transposable elements.

**Keywords:** Cytogenetics, CMA / DAPI, 5S rDNA and 45S, nuclear DNA, evolution karyotype

## Sumário

1. APRESENTAÇÃO .....	7
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	8
2.1. CITOGENÉTICA CLÁSSICA E CITOTAXONOMIA.....	8
2.2. COLORAÇÃO DIFERENCIAL: BANDAS CMA E DAPI.....	9
2.3. QUANTIFICAÇÃO DE DNA NUCLEAR EM PLANTAS.....	10
2.4. HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH) .....	10
2.4.1. A utilização da FISH para o mapeamento de diferentes sequências. ....	11
2.4.2. Sítios de DNAr 5S e 45S. ....	12
2.4.3. Sítios de DNA telomérico.....	12
2.4.4. Distribuição de retrotransposons nos cromossomos de plantas.....	13
2.5. RETROTRANSPOSONS .....	13
2.5.1. Ty1-cópia e ty3-gypsy.....	14
2.6. O gênero <i>Oxalis</i> L (Oxalidaceae). ....	14
2.6.1. Subgênero <i>Thamnoxys</i> .....	16
2.6.2. Citogenética do subgênero <i>Thamnoxys</i> .....	17
2.6.3. Quantidade de DNA nuclear em espécies de <i>Thamnoxys</i> .....	17
3. Resultados.....	18
3.1. VARIAÇÃO CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DE <i>OXALIS</i> SUBGÊNERO <i>THAMNOXYS</i> (OXALIDACEAE).....	14
4. CONCLUSÕES .....	40
5. REFERÊNCIAS.....	40

## 1. APRESENTAÇÃO

*Oxalis* é o maior gênero na família Oxalidaceae, com cerca de 500 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas do globo, sendo conhecidas popularmente como azedinhas. O gênero encontra-se dividido em quatro subgêneros: *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Oxalis* L., *Trifidus* Lourteig, Reiche e *Thamnoxys* (Endl.). Composto por 71 espécies divididas em nove seções, *Thamnoxys* comporta plantas de hábito arbustivo ou subarbustivo, caracterizadas por apresentarem folhas tri-foliadas, pinadas e raques semelhantes às presentes em Leguminosae.

Do ponto de vista citogenético, o subgênero *Thamnoxys* destaca-se por apresentar as espécies com os maiores cromossomos do gênero. Os cariótipos das espécies variam bastante quanto aos números básicos ( $x= 5, 6, 7, 8$  e  $9$ ) e tamanhos dos cromossomos, variando de  $1$  a  $11 \mu\text{m}$ . Para exemplificar a variação entre essas espécies, podem ser citadas *O. cratensis*, *O. psoraleoides* e *O. neuwiedii*, onde as duas primeiras possuem  $2n = 12$  e a última  $2n = 10$ , com cromossomos que vão desde acrocêntricos a metacêntricos; e números de bandas CMA+ indo de  $2$  para *O. cratensis*,  $6$  em *O. neuwiedii* e  $14$  para *O. psoraleoides*. Além da variação morfológica e numérica há uma considerável diferença no conteúdo de DNA dessas espécies.

A maioria das sequências de DNA repetitivo pode ser detectada nos cromossomos por hibridização *in situ* fluorescente (FISH), como por exemplo, o DNAr 5S e 45S e o DNA telomérico. Essas três sequências são universais, facilmente detectadas e podem variar em quantidade e posição entre espécies contribuindo para uma melhor caracterização do cariótipo e seus rearranjos cromossômicos. A FISH utilizando sequências de retroelementos tem também detectado a distribuição e a organização dessas sequências no genoma. As técnicas de coloração com fluorocromos cromomicina A<sub>3</sub> (CMA) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), tem também contribuído para localizar ao menos parte das sequências repetidas em tandem, classificando-as em regiões ricas em GC e AT, respectivamente.

No presente trabalho, espécies pertencentes ao subgênero *Thamnoxys* de *Oxalis* foram analisadas citogeneticamente, utilizando características como padrão de distribuição das bandas heterocromáticas (CMA/DAPI), padrões de sítios de DNA ribossomal 5S e 45S e quantidade de DNA nuclear para uma comparação com dados

filogenéticos obtidos previamente, a fim de ter um melhor entendimento das relações entre as espécies do grupo.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 CITOGENÉTICA CLÁSSICA E CITOTAXONOMIA**

A citogenética é o domínio da genética que compreende todo e qualquer estudo relacionado ao cromossomo, esteja ele isolado ou em conjunto, distendido ou condensado. Esta ciência aborda aspectos da organização, função e morfologia cromossômica, de modo a auxiliar na caracterização dos cariótipos e na melhor compreensão de questões relacionadas a estes (Guerra, 1988).

A citogenética encontra-se subdividida em citogenética clássica e molecular. A citogenética clássica tem como base a análise dos cromossomos mitóticos e meióticos, por meio de técnicas de coloração convencional, a fim de ser obter registros de contagens cromossômicas e análise da morfologia cromossômica. A citogenética molecular é focada em técnicas de análise estrutural, relacionadas à localização de sequências, composição de bandas, e identificação de genomas, como, por exemplo, a hibridização genômica e hibridização *in situ* fluorescente (Chauffaille, 2005).

O uso de dados citogenéticos na taxonomia vegetal, bem como em estudos de evolução e filogenia, é uma prática bastante conhecida, sendo esta união conhecida comumente como citotaxonomia (Stuessy, 1990). A análise citotaxonomica mais comum consiste na determinação e comparação dos números cromossômicos de um grupo de espécies em qualquer nível hierárquico, com técnicas simples de citogenética convencional. A simples contagem cromossômica é a abordagem mais utilizada para a caracterização citológica inicial de uma determinada espécie, e pode ser usado como caráter delimitante na taxonômica das espécies (Pedrosa et al., 1999). Por meio da análise da variação cromossômica numérica já se é possível, na maioria dos casos, determinar o número cromossômico ancestral do grupo, bem como inferir eventos envolvidos na evolução deste, como disploidias e poliploidias (Guerra, 1990).

O número de cromossomos pode variar muito ou pouco, mesmo entre espécies proximamente relacionadas, como também pode ser constante dentro de um determinado grupo. Diversos trabalhos envolvendo contagens cromossômicas para fins citotaxonomicos exemplificam diferentes níveis de variação cromossômica numérica; Félix & Guerra (2000), Melo et al., (2001) e Assis et al., (2013). A partir da variação cromossômica em cada grupo, informações importantes sobre os mecanismos evolutivos

envolvidos na diversificação das espécies podem ser obtidos de maneira eficiente, destacando desse modo a importância dos estudos citotaxonômicos para a compreensão da evolução cariológica das espécies.

Por si só, o número cromossômico pode ser considerado um caractere importante para a sistemática. Contudo, o tamanho dos cromossomos, a posição dos centrômeros, e os padrões de bandeamento também podem ter valor do ponto de vista sistemático (Judd et al., 2009).

## 2.2 COLORAÇÃO DIFERENCIAL: BANDAS CMA E DAPI

Com os avanços no desenvolvimento de técnicas de coloração, principalmente em decorrência do aprimoramento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a realização de análises mais detalhadas do cariótipo das espécies. Os fluorocromos mais comumente utilizados na citogenética vegetal são a Cromomicina A3 (CMA) e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que permitem a detecção de regiões heterocromáticas ricas em Guanina/Citosina e em Adenina/Timina, respectivamente. Desse modo, análises mais detalhadas das regiões cromossômicas tornaram-se rotineiras, possibilitando a obtenção de caracteres mais informativos e específicos (Guerra & Souza, 2002; Barros e Silva et al., 2010).

O padrão de distribuição da heterocromatina pode variar entre as espécies, de modo que a utilização das técnicas de coloração CMA/DAPI é ampla, auxiliando em estudos taxonômicos, evolutivos e de sistemática. A identificação de marcadores úteis na delimitação de espécies pode ser ilustrado no gênero *Citrus* L. cujo padrão de bandas ricas em CG é suficiente para a identificação das espécies do gênero (Cornélio et al., 2005, Moraes et al., 2007; Barros e Silva & Guerra 2009; Barros e Silva et al., 2010). A possibilidade de distinguir espécies selvagens de espécies híbridas por meio desta técnica pode ser exemplificado em um estudo realizado com o umbu-cajá. Os padrões de bandas heterocromáticas forneceram dados incontestes para refutar a hipótese de origem híbrida do umbu-cajá entre *Spondias mombin* L. (cajá) e *S. tuberosa* L. (umbu) (Almeida et al., 2007). As bandas CMA/DAPI, além de auxiliar na diferenciação citológica entre espécies, também são úteis na detecção do grau de conservação cariológica entre espécies próximas, como observado entre o cacau e o cupuaçu, cujos cariótipos se mantiveram bastante conservados durante a evolução (Dantas & Guerra, 2010).

### 2.3 QUANTIFICAÇÃO DE DNA NUCLEAR EM PLANTAS

O tamanho do genoma é uma das informações mais importantes na caracterização de uma espécie. A disponibilidade de dados acerca do tamanho do genoma é crítico para muitos campos de pesquisa, incluindo a taxonomia e evolução (Dolezel et al. 2007).

O conteúdo de DNA de uma determinada espécie é referente ao número de pares de bases de DNA encontrada em seu núcleo. Atualmente a citometria de fluxo é a técnica mais utilizada para se realizar a quantificação do conteúdo de DNA das espécies. Por ser uma técnica mais recente, pode-se observar diferenças nos valores de tamanho do genoma entre trabalhos mais antigos com trabalhos mais atuais.

Anteriormente a estimativa do conteúdo de DNA nuclear era obtida por meio de microdensitometria de Feulgen, técnica na qual os núcleos encontravam-se corados com o reativo de Schiff e fixados em uma lamina, cujo conteúdo de DNA era mensurado com base na quantidade de energia absorvida, isso com a ajuda de um microscópio de luz, como observado no trabalho de Azkue & Martínez (1987).

Por outro lado, a técnica de citometria de fluxo é realizada a partir de uma solução contendo núcleos em suspensão, os quais são corados com fluorocromos como o DAPI ou iodeto de propídeo. Ao serem excitados por um laser, os fluorocromos emitem uma intensidade de energia a qual é medida. A técnica permite ainda ter o valor C em unidades absolutas (pg de DNA ou Mpb), uma vez que se pode medir simultaneamente a amostra desejada com o do padrão de referência, que tem seu conteúdo de DNA já determinado (Loureiro & Santos, 2004).

Diversas são as utilizações da citometria de fluxo, como a detecção de plantas haplóides e de linhas dihaplóides, verificação de novos níveis de ploidia, identificação de híbridos inter-específicos, detecção de aneuploidias, controle da estabilidade do nível de ploidia, entre outras (Dolezel, 1997)

A citometria de fluxo também pode ser utilizada em estudos que visem a estimativa do número de ploidia de uma determinada espécie, por exemplo, em trabalhos com *Oxalis tuberosa*, uma planta bulbosa muito comum na Região Africana do Cabo, foi possível detectar até sete níveis de ploidia, sendo esses confirmados através de contagem cromossômica prévia (Krejčíková et al., 2013).

### 2.4 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma técnica mais acurada, que se baseia nas propriedades de desnaturação e renaturação da dupla-fita de DNA. A técnica é utilizada para localizar sequências específicas nos cromossomos. Segmentos de DNA são marcados por fluorescência para a elaboração de sondas, as quais são hibridizadas nos cromossomos com sua sequência-alvo e vistas com a ajuda de um microscópio de fluorescência. Diversos tipos de sequências podem ser utilizados para a marcação de sondas, desde sequências repetitivas em tandem (DNAr 5S e 45S, sequências teloméricas) a sequências repetitivas que se encontram de forma dispersa no DNA (sequências de retrotransposons e transposons) (Guerra, 2004).

A FISH auxilia na pesquisa de marcadores moleculares que podem ser importantes para análises citogenéticas e citotaxonômicas. Em um estudo com *Thinopyrum ponticum*, por meio da utilização de diferentes sequências de DNA, foi possível mapear importantes marcadores para a caracterização e identificação dos cromossomos dessa espécie (Brasileiro-Vidal et al., 2003). A técnica também é importante na investigação de espécies híbridas, como observado em um estudo envolvendo espécies de *Citrus* (Moraes et al., 2007). Por possibilitar a caracterização mais completa de cariótipos, a FISH tem sido muito utilizada na análise dos mecanismos evolutivos envolvidos na diversificação de muitos grupos vegetais. A variação observada no número de sítios de DNAr 5S e 45S no gênero *Passiflora* ajudaram a corroborar a hipótese para o número básico do grupo, bem como detectar indivíduos tetraploides e eventos de disploidia na evolução do gênero (Melo & Guerra, 2003).

#### **2.4.1 A utilização da FISH para o mapeamento de diferentes sequências**

Estudos comparativos utilizando em conjunto sondas de DNAr 5s e 45s, sondas de DNA telomérico e sondas de retrotransposons também são feitos com o auxílio desta técnica. A principal importância desse tipo associado de análise é descobrir se estas sequências co-localizam no mesmo local do cromossomo e como elas se distribuem nos cariótipos das espécies. No trabalho de Murray et al., (2002) foram comparadas todas essas sequências em *Podocarpus* e em outras espécies de gimnospermas, por exemplo, observou-se que ao contrário de outras coníferas, as espécies de *Podocarpus* analisadas apresentam apenas um par de sítios de DNAr 45S, sendo estas co-localizadas com os sítios de DNAr 5S. Os principais tipos de sequências utilizadas dessa forma associada serão apresentados no tópico seguinte.

### 2.4.2 Sítios de DNAr 5S e 45S

Os DNAs ribossomais (DNAr) 5S e 45S são sequências altamente conservadas no genoma, do ponto de vista evolutivo. Esses sítios de DNAr são os mais utilizados como marcadores para identificação cromossômica em plantas, uma vez que tem a vantagem de serem repetidos em tandem até milhares de vezes. Outro aspecto importante é grau de conservação dessas sequências, o que possibilita a preparação de uma sonda com o DNAr de qualquer espécie vegetal e sua posterior aplicação em quase todas as outras espécies vegetais (Guerra, 2004).

Geralmente os sítios de DNAr 45S são bastante numerosos e correspondem às chamadas regiões organizadoras de nucléolo (RONs), as quais podem ser detectadas por meio da dupla coloração com CMA/DAPI, correspondendo as bandas CMA positivas (Neves et al., 2005). Por outro lado, o DNAr 5S é uma sequência mais variável, sendo representada nas espécies, na maioria das vezes, em apenas um par cromossômico e menos frequentemente em dois ou mais pares (Guerra, 2004).

### 2.4.3 Sítios de DNA telomérico

A região dos terminais cromossômicos (telômeros) dos eucariotos é formada, frequentemente, por sequências de microssatélites ricos em  $T_nAG_n$ , os quais estão organizados em arranjos com até milhares de cópias. O DNA telomérico é bastante conservado e, apesar de ser comum nos terminais dos cromossomos, também pode ser encontrado em outras regiões, principalmente próximo ao centrômero. A análise dessa sequência *in situ* é de grande importância uma vez que assim é possível de detectar determinados eventos evolutivos como fusões e fissões cromossômicas (Sykorova et al., 2003).

Inicialmente, o DNA telomérico isolado de *Arabidopsis thaliana* foi utilizado para investigar a presença dessa sequência em outras espécies de plantas. Foi observado então que em muitos grupos essa mesma sequência estava presente e em outros não (Fuchs et al., 1995). Posteriormente outros trabalhos também revelaram a ausência da sequência de *Arabidopsis* nos terminais teloméricos de plantas (Adms et al., 2001; Sykorova et al., 2003), sendo provado depois que tais sequências foram substituídas pela repetição telomérica de vertebrados.

#### 2.4.4 Distribuição de retrotransposons nos cromossomos de plantas

Os retrotransposons podem ocupar diferentes porções e regiões nos cromossomos das espécies, podendo ser mais bem representados em algumas áreas do cromossomo que em outras. A FISH vem sendo utilizada extensivamente para obter a localização de uma gama dessas sequências de DNA móvel (Friesen et al., 2001; Renny-Byfield et al., 2012; Begum et al., 2013) tanto nos cromossomos de angiospermas como nos de gimnopermas (Greilhuber et al., 2014).

Em espécies de *Coffea* um retroelemento do tipo Ty3-Gypsy foi isolado e localizado por FISH. Tal elemento encontrava-se conservado entre as sete espécies analisadas, variando na sua distribuição (formando blocos em algumas espécies e dispersos em outras) e na intensidade dos sinais (Yuyama et al., 2012).

O retroelemento Athilla, também Ty3-Gypsy, encontra-se altamente concentrado enriquecendo a heterocromatina pericentromérica de *Arabidopsis thaliana*. Esse retroelemento foi descoberto ao caracterizar as regiões flanqueadoras do centrômero de *A. thaliana*, sendo então encontrado em torno dos cinco pares cromossômicos dessa espécie e bem mais abundante que qualquer outro tipo de TE (Slotkin, 2010).

Ao analisar sequências do retrotransposons Ty1-Copia em espécies do gênero *Hypochaeris* da família Asteraceae, foi observado uma distribuição dispersa por todos os cromossomos. Observou-se também que *Hypochaeris angustifolia* e *H. maculata* apresentavam o mesmo padrão de distribuição quanto ao retroelemento, o qual é disperso ao longo de todo o comprimento dos braços cromossômicos, com exceção dos sites de DNAr e alguns centrômeros (Ruas et al., 2008).

Geralmente os retrotransposons apresentam sinais bastantes dispersos, mas podem também ser vistos formando pequenos blocos, como observado em um estudo com *Chenopodium quinoa*, onde observou-se sinais nas regiões pericentromérica e centromérica de todos os cromossomos, apenas variando na intensidade destes (Kolano et al., 2013).

### 2.5 RETROTRANSPOSONS

O genoma de um indivíduo é constituído por diferentes tipos de sequências de DNA de cópia única e de DNA repetitivo. O DNA repetitivo pode estar disperso ou repetido em tandem (Rao et al., 2010). Muitas dessas sequências repetitivas tratam-se de elementos de transposição.

Os elementos de transposição (TE, do inglês *transposition elements*) foram originalmente descobertos por Barbara McClintock por meio de estudos com o milho. Inicialmente pensava-se que esses elementos eram associados a alelos recessivos instáveis. Atualmente sabe-se que os TEs são sequências móveis de DNA com capacidade de se replicar e se inserir no genoma independente da homologia de sequências, sendo encontrados geralmente dispersos por todo o genoma (Feschotte et al., 2002).

Esses elementos de transposição constituem uma grande parte do genoma total das plantas. Em coníferas, por exemplo, eles podem chegar a até 50% do genoma (Friesen et al., 2001) e em milho, estima-se que essas sequências alcancem de 64% a 73% do genoma total (Meyers et al., 2001).

Tais elementos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de transposição no genoma, por meio de uma transcrição reversa de RNA (classe I) ou pelo modo “cortar” a sequência e “colar” em outro lugar do genoma (classe II). Os elementos da classe I podem ser divididos em dois grupos: os que possuem região flanqueadora formada por terminais de cadeias longas (LTR) e os de repetições terminais de cadeias curtas (não LTR). Os retrotransposons são exemplos de elementos da classe I. Os elementos da classe II geralmente possuem uma estrutura simples, com o gene da transposase flanqueado por dois terminais curtos de repetição invertida. Os transposons são elementos típicos da classe II (Muñoz-López et al., 2010).

Entre os elementos móveis destacam-se os retrotransposons, os quais ocupam uma grande parte do genoma das plantas. Nas angiospermas, por exemplo, os TEs mais comuns e abundantes são os retrotransposons da classe I: Ty1-Copia e Ty3-Gypsy. Esses retroelementos LTR compõem a maior fração do genoma das plantas, sendo os principais responsáveis pela extensa variação na quantidade de DNA dos genomas. Eles podem variar bastante em relação a sua distribuição, ao número de cópias e aos tipos encontrados, sendo classificados em super-famílias e famílias (LTR, LINES, SINES, CACTA, MULE) de acordo com a homologia com outros elementos (Wessler, 2006). No milho (*Zea mays*) os elementos de transposição chegam a ocupar até 85% do genoma, sendo encontrados tanto nas regiões heterocromáticas, como nas eucromáticas (Schnable et al., 2009). Na banana (*Musa acuminata*), esses elementos também foram encontrados em abundância, destacando-se um elemento do tipo LINE específico do centrômeros dessa espécie (D’Hont1 et al., 2012). Em cevada, foi observado um total de 14 famílias de elementos transponíveis em 50% do genoma, sendo dez desses retrotransposons da

superfamília *Gypsy* e dois da superfamília *Copia*. Ainda outras 234 famílias além daquelas pertencentes à *Gypsy* e *Copia*, foram identificadas no genoma da cevada, tomando parte de 9,61% deste (Wicker et al., 2009). Em espécies da família Oxalidaceae foi observado que os genomas são compostos principalmente por retrotransposons do tipo *Gypsy* subtipos Chromo, Ogree e *Copia* subtipo Angela (Vaio, 2012).

### 2.5.1 Ty1-copia e Ty3-gypsy

Os retrotransposons LTR são abundantes em plantas que em animais. A família de retrotransposons Ty1-*Copia* e Ty3-*Gypsy* possuem uma organização genômica muito semelhante entre si. Segundo a literatura, a mecânica intracelular, a replicação e o modo de integração ao DNA são os mesmos tanto para Ty1-*Copia* e Ty3-*Gypsy*. Ambas famílias codificam um número de proteínas especificadas por três principais genes: gag, pol e int; diferindo apenas na ordem em que estes estão organizados. É válido lembrar também que análises filogenéticas feitas por meio de comparações de sequências da transcriptase reversa indicam que o Ty3-*Gypsy* e Ty1-*Copia* formam grupos bastante distintos, dando sentido a diferença de ordem dos genes (Kumar & Bennetzen, 1999).

## 2.6 O GÊNERO *OXALIS* L. (OXALIDACEAE)

Oxalidaceae é uma família botânica pertencente à subclasse Eurosíde I, incluída na ordem Oxalidales, apresentando indivíduos bastante diversos do ponto de vista morfológico, e agrupando cerca de 950 espécies distribuídas em cinco gêneros: *Averrhoa*, *Bryophytum*, *Dapania*, *Oxalis* e *Sarcotheca* (APG III, 2009; Souza & Lorenzi, 2012; Lourteig, 1983).

*Oxalis* L. é o maior e mais diverso gênero da família Oxalidaceae, composto por aproximadamente 500 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas do globo, mais especificamente o continente americano e o africano. São comumente conhecidas como azedinhas, devido à grande concentração de ácido oxálico presente em suas folhas (Lourteig 1983). São mais comumente utilizadas como plantas ornamentais, na medicina e até mesmo na culinária por meio de seu tubérculo, como é o caso de *Oxalis tuberosa*. O gênero *Oxalis* é um dos únicos gêneros dentro das eudicotiledoneas que apresentam bulbos verdadeiros (Lourteig, 1983; Eiten, 1963; Emshwiller & Doyle, 1998).

Devido à grande variação na morfologia e nos hábitos observados entre as espécies americanas, em contraste com as espécies africanas que são bulbosas perenes, a

hipótese mais provável é que o centro de origem dessas espécies seja a América (Lourteig 2000).

O gênero *Oxalis* encontra-se dividido em quatro subgêneros, sendo eles *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Oxalis* L., *Trifidus* Lourteig, Reiche e *Thamnoxys* (Endl.) Progel.

### 2.6.1 Subgênero *Thamnoxys*

Com 71 espécies distribuídas em nove seções, *Thamnoxys* engloba indivíduos com hábito herbáceo, arbustivo ou subarbustivo, caracterizados geralmente por apresentarem folhas tri-foliadas, pinadas e raques semelhantes às presentes em Leguminosae, podendo ocorrer também indivíduos unifoliolados (Lourteig 1994).

Possuem uma homogeneidade morfológica acentuada, com suas espécies localizadas principalmente nas América Central e América do Sul. Dessa forma, Lourteig (1994) propôs uma hipótese de provável origem nos cerrados e campos brasileiros, uma vez que lá elas se encontram mais diversificadas.

Análises filogenéticas por meio de dados morfológicos sugerem que *Thamnoxys* seja um subgênero monofilético, porém as relações entre as seções do subgênero não se encontram ainda bem resolvidas, carecendo assim de dados moleculares para uma maior robustez das hipóteses (Abreu et al., 2012).

### 2.6.2 Citogenética do subgênero *Thamnoxys*

Do ponto de vista citogenético, o gênero *Oxalis* é pouco estudado. Contudo, os dados disponíveis indicam uma elevada variação cariológica dentro do grupo, seja em relação aos números cromossômicos, quanto ao tamanho e morfologia cromossômica. Para esse grupo foi relatado até seis números básicos, sendo eles  $x = 5, 6, 7, 8, 9$  e  $11$  (de Azkue e Martínez 1983, 1984, 1990; de Azkue 2000).

Citogeneticamente, *Thamnoxys* destaca-se por agrupar as espécies que possuem os maiores cromossomos do *Oxalis*. Os cariótipos das espécies variam bastante quanto aos números básicos, contendo cinco dos seis propostos para *Oxalis* ( $x = 5, 6, 7, 8$  e  $9$ ) e tamanhos dos cromossomos, variando de  $1$  a  $11 \mu\text{m}$  (de Azkue 2000). Como exemplo da variação entre as espécies do subgênero, pode-se observar dois aspectos: a variação cromossômica numérica entre as espécies *O. neuwiedii* (com  $2n = 10$ ), *O. cratensis* e *O. psoraleoides* (com  $2n = 12$ ), com cromossomos variando de metacêntricos a

acrocêntricos; bem como variação no número de bandas CMA<sup>+</sup>, que variam desde 2 bandas CMA<sup>+</sup> para *O. cratensis*, 6 em *O. neuwiedii* e 14 para *O. psoraleoides* (M Vaio, dados não publicados).

### **2.6.3 Quantidade de DNA nuclear em espécies de *Thamnoxys***

Poucos trabalhos foram publicados acerca do conteúdo de DNA das espécies de *Oxalis* e do subgênero *Thamnoxys*. Contudo, sabe-se que há uma considerável diferença no conteúdo de DNA dessas espécies. Publicações mais antigas relatam valores do conteúdo de DNA para algumas espécies arbustivas que são encontradas pela América do Sul, variando de 1,76 picogramas em *Oxalis alstonii* até 33 pg em *Oxalis díspar* (Azkue & Martínez 1987). Existem também valores determinados para algumas espécies, tais como: *O. cratensis* com 2,98 pg, *O. neuwiedii* com 5,24 pg e *O. psoraleoides* com 41,14 pg, porém esses dados ainda não foram publicados (Vaio, 2012).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 VARIAÇÃO CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DE *OXALIS* SUBGÊNERO *THAMNOXYS* (OXALIDACEAE)

Jéssica Nascimento<sup>1</sup>, Magdalena Vaio<sup>2</sup> & Marcelo Guerra<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Citogenética Vegetal e Evolução, Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, S/N, Cidade Universitária, Recife, PE 50372-970, Brasil

<sup>2</sup> Universidade De la República - Departamento de biologia vegetal, - Montevideo Uruguay.

\*Autor para correspondência: Marcelo Guerra Departamento de Botânica, CCB Universidade Federal de Pernambuco 50.670-420 Recife, PE msfguerra@hotmail.com

#### Resumo

O subgênero *Thamnoxys* apresenta os maiores cromossomos do gênero e uma das maiores variações na quantidade de DNA entre as angiospermas. Neste trabalho, foi analisada a variação cariotípica em 12 espécies de *Thamnoxys* com base nas bandas CMA/DAPI, sítios de DNAr e quantidade de DNA. Em *O. psoraleoides*, a espécie com maior conteúdo de DNA, foi analisada também a distribuição de um retrotransposon e do DNA telomérico. Todos os parâmetros cariológicos foram bastante variáveis, apresentando números cromossômicos  $2n = 10$  a 24, cromossomos meta, submetata e acrocêntricos, 4 a 16 bandas CMA+, 2 a 4 de sítios de DNAr 5S e 4 a 14 de DNAr 45S co-localizados com bandas CMA+. Cada espécie diferiu das demais principalmente pelo tamanho e morfologia dos cromossomos e pela quantidade de DNA. *Oxalis psoraleoides* e *O. rhombeo-ovata* foram as únicas com uma banda DAPI+ e sítio de DNAr 5S co-localizado com banda CMA+, confirmando a proximidade filogenética entre elas. Não foi detectado DNA telomérico associado à aparente fusão cêntrica em *O. psoraleoides*.

Apesar da extensa variação em tamanho genômico, não foram encontrados blocos de heterocromatina além dos sítios de DNAr e da banda DAPI+. Por outro lado, a hibridização *in situ* de um retrotransposon revelou marcação intensa e homogênea nos cromossomos. O motivo da intensa diversidade cariotípica desse grupo permanece desconhecido mas a evolução cariotípica se deu principalmente por amplificação/deleção de elementos de transposição.

**Palavras-chave:** Citogenética, CMA/DAPI, DNAr 5S e 45S, DNA nuclear, evolução cariotípica.

## Introdução

*Oxalis* é o maior gênero na família Oxalidaceae, com cerca de 500 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas do globo, sendo conhecidas popularmente como azedinhas (Lourteig, 1983). O gênero encontra-se dividido em quatro subgêneros: *Oxalis* L., *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Trifidus* Lourteig, e *Thamnoxys* (Endl.) Reiche. Composto por 71 espécies divididas em nove seções, *Thamnoxys* comporta plantas de hábito arbustivo ou subarbustivo, caracterizadas por apresentarem folhas geralmente trifolioladas (em alguns casos com folhas simples), pinadas e raques semelhantes às presentes em Leguminosae (Lourteig, 1994). No nordeste brasileiro destaca-se o subgênero *Thamnoxys*, composto por espécies com hábito arbustivo ou subarbustivo. Estudos filogenéticos recentes indicam que o subgênero *Thamnoxys* (e algumas de suas seções) é parafilético (Vaio, 2012).

Do ponto de vista citogenético, o subgênero *Thamnoxys* apresenta ampla variação no cariótipo e na quantidade de DNA nuclear (Vaio, 2012). O grupo destaca-se por apresentar as espécies com os maiores cromossomos do gênero *Oxalis*, variando em tamanho de 1 a 11  $\mu\text{m}$  (de Azkue, 2000). Apresenta também uma grande variação de números cromossômicos, incluindo uma série dispoloide com  $n = 5, 6, 7, 8$  e  $9$ , frequentemente acompanhada de poliploidia para os diferentes números dessa série. O

número cromossômico básico mais provável para *Thamnoxyis* é  $x = 6$ , embora  $x = 5$  também seja bem representado entre as seções desse subgênero (Vaio, 2012). Os cromossomos apresentam elevada variação na morfologia, que vão desde acrocêntricos a metacêntricos, e no número de bandas CMA<sup>+</sup>, com pouca ou nenhuma banda DAPI<sup>+</sup>. Entre as espécies diploides do subgênero há uma extensa variação de conteúdo de DNA, que vai de 1,19 pg em *Oxalis glaucescens* até 41,14 pg em *O. psoraleoides* (De Azkue e Martínez, 1988; Vaio, 2012).

A análise da variação no tamanho do genoma é importante para a compreensão dos fenômenos cariológicos que envolvem grupos relacionados de plantas, principalmente aqueles que apresentam diferenças cariotípicas muito acentuadas, envolvendo séries poliploides e disploides difíceis de interpretar (Weng et al., 2012; Huang et al., 2013). Aliada à variação cromossômica numérica, a quantificação do DNA nuclear é considerada um dos parâmetros citotaxonômicos mais simples e confiáveis (Guerra, 2012), podendo fornecer informações adicionais sobre variações relacionados à hibridização inter- e intraespecífica (Loureiro & Santos, 2004; Brasileiro-Vidal et al., 2005; Pranci et al., 2014; Pandit et al., 2014).

A maior parte do genoma dos eucariotas é constituída por DNA repetitivo, um importante componente do genoma em plantas. As sequências repetitivas podem estar organizadas de forma dispersa ou em tandem. A maioria dessas sequências são retrotransposons, elementos móveis capazes de se replicarem e se inserirem no genoma independente da homologia de sequências, apresentando abundância altamente variável. Esse tipo de DNA repetitivo se encontra geralmente disperso pelo genoma enquanto as sequências repetidas em tandem, denominadas de DNA satélite, formam blocos de DNA frequentemente visíveis como bandas heterocromáticas (Rao et al., 2010). Um tipo particular de DNA repetitivo em tandem é o DNA ribossomal (DNAr 5S e 45S), formados

por 150 a 26.000 unidades em plantas (Prokopowich et al., 2003).

A maioria das sequências de DNA repetitivo pode ser detectada nos cromossomos por hibridização *in situ* fluorescente (FISH), como por exemplo, o DNAr 5S e 45S e o DNA telomérico. Essas três sequências são bem conservadas em plantas e por isso são mais facilmente detectadas, podendo variar em quantidade e posição entre as espécies (Roa & Guerra, 2015). A localização destas sequências nos cromossomos auxilia na caracterização dos cariótipos e permite um melhor entendimento dos mecanismos evolutivos (Rosato et al., 2015; Souza et al., 2016). A FISH utilizando sequências de retroelementos tem se mostrado importante para entender a participação destas sequências na expansão do genoma em plantas (Renny-Byfield et al. 2012; Begum et al. 2013).

A localização de bandas heterocromáticas ricas em GC ou AT pode ser feita com os fluorocromos cromomicina A<sub>3</sub> (CMA) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), respectivamente. Essas bandas funcionam como marcadores cromossômicos, contribuindo, por exemplo, para o estabelecimento de um mapa físico comparado entre espécies próximas de *Citrus* (Silva et al., 2015) ou para refinar a análise filogenética de um grupo de espécies de orquídeas Pleurothallidinae (De Oliveira et al., 2015)

No presente trabalho foi feita uma análise comparada do número e morfologia cromossômica, distribuição das bandas CMA/DAPI e dos sítios de DNAr 5S e 45S e tamanho do genoma de 19 espécies de *Oxalis* subg. *Thamnoxys*, visando contribuir para o entendimento da evolução cromossômica do grupo. Além disso, foi feita a localização *in situ* do DNA telomérico e de três dos retroelementos mais abundantes de *O. psoraleoides*, a espécie com maior conteúdo de DNA conhecida no gênero. Esses dados foram analisados visando responder objetivamente as seguintes questões: (1) Qual a contribuição das bandas heterocromáticas para a extensa variação do tamanho genômico

em espécies do subgênero *Thamnoxys*? (2) Existe alguma relação entre aumento do conteúdo de DNA e do número de sítios de DNAr nesse grupo? (3) Teriam os retroelementos mais abundantes uma localização cromossômica preferencial ou seriam todos igualmente dispersos? (4) Existiria algum indício de fusão cêntrica envolvendo o DNA telomérico no par cromossômico sub-metacêntrico de *O. psoraleoides*?

## **Materiais e Métodos**

Para as análises mitóticas, pontas de raízes e botões florais jovens, foram pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) por 24 horas a 10° C, fixados em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial) por no mínimo 2 horas à temperatura ambiente e estocadas em freezer a -20°C para posterior utilização.

Para a preparação das lâminas, o material estocado foi lavado três vezes em água destilada e digerido a 37° C em uma solução contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma, Saint Louis, MO) (w/v). As raízes foram digeridas por 30 minutos e os botões florais por duas a 3 horas. As lâminas foram preparadas por esmagamento em ácido acético a 45%, com posterior remoção da lamínula em nitrogênio líquido. As lâminas foram secas ao ar e deixadas para envelhecer durante três dias.

Para a coloração com fluorocromos foi seguido o protocolo descrito por Barros e Silva & Guerra (2010). As lâminas foram coradas com CMA<sub>3</sub> (0,1 mg/ml) durante uma hora com DAPI (1 µg/ml) por 30 minutos, sendo em seguida lavadas, secas ao ar e montadas em glicerol e tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v).

As melhores metáfases foram fotografadas com microscópio de epifluorescência Leica utilizando o software QFISH (Leica). A edição das imagens foi realizada no programa Adobe Photoshop CS5. Após fotografadas as lâminas foram descoradas em Carnoy por 30 minutos, seguido por álcool etílico absoluto por 2 horas e guardadas para

uso posterior na FISH.

Para a detecção dos sítios de DNAr 5S, 45S, DNA telomérico e DNA de retrotransposons foi seguido o protocolo de Pedrosa et al., (2002). A mistura de hibridização continha 50% de formamida (v/v), 10% de dextran sulfato (w/v), 2× SSC e 1 ng/μl de cada sonda. As lâminas foram desnaturadas por 5 minutos a 75°C e hibridizadas por 1 dia a 37°C. Os banhos pós-hibridização foram feitos de modo a obter o nível de estringência final de 76%. A sonda de DNAr 45S foi detectada com anti-digoxigenina conjugada com FITC produzida em ovelha (Roche) e o sinal amplificado com anticorpo contra anticorpos de ovelha, produzido em coelho e conjugado com FITC (Sigma). Todas as preparações foram contra-coradas e montadas com 8μg/ml de DAPI em Vectashield (Vector) e as imagens das células foram capturadas como descrito acima para a coloração com fluorocromos.

A quantificação do DNA seguiu o protocolo de Loureiro et al., (2007), onde o tampão WPB foi utilizado para preparar uma suspensão de núcleos oriunda de folhas jovens. O tamanho do genoma foi estimado através de um citômetro de fluxo CyFlow SL de acordo com Dolezel et al., (2007). O conteúdo de DNA final para cada acesso foi estimado com base em três diferentes medições para cada planta individualmente. Como controle interno, foram utilizadas espécies com conteúdo de DNA nuclear recomendado e fornecidas pelo Prof. J. Dolezel (Institute of Experimental Botany – República Tcheca).

## **Resultados**

Na tabela 1 estão indicados os nomes das espécies analisadas, nomes dos coletores e os locais de procedência. Os dados das análises citogenéticas e da quantificação de DNA encontram-se reunidos na tabela 2.

A maioria das espécies teve  $2n = 12$ , com cromossomos metacêntricos,

submetacêntricos e acrocêntricos, possuindo um a sete pares de bandas CMA+ e nenhuma banda DAPI+, exceto *O. rhombo-ovata* que apresentou uma pequena banda DAPI+. No conjunto, cada espécie teve um cariótipo distinto.

*Oxalis psoraleoides*, com  $2n = 12$ , apresentou os maiores cromossomos, com um par de metacêntricos e cinco pares de acrocêntricos (1M + 5A), bandas CMA+ terminais nos braços longos de todos os cromossomos, inclusive nos dois braços do par metacêntrico, e um par de bandas intersticiais no braço curto do par metacêntrico (Fig. 1a). Foi observado um único par de sítios de DNAr 5S, coincidindo com bandas CMA+ intersticiais do metacêntrico e sítios de DNAr 45S coincidindo com todas as bandas terminais (Fig. 2a).

*Oxalis cratensis*, *O. divaricata*, *O. frutescens*, *Oxalis* sp1 e *O. hedysarifolia*, também com  $2n = 12$ , diferiram na fórmula cariotípica e no número de bandas CMA. *Oxalis cratensis* foi quase sempre diploide com fórmula cariotípica  $2M + 2SM + 2A$  e dois pares de bandas terminais CMA+, um no braço curto dos cromossomos acrocêntricos e outro no braço longo do maior par submetacêntrico (Fig. 1b). Foram também encontrados dois indivíduos triploides, no campus da UFPE, com  $2n = 18$  ( $3M + 3SM + 3A$ ) e seis bandas CMA+ nos braços curtos dos acrocêntricos (Fig. 1c). Nos dois indivíduos de *O. hedysarifolia* ( $2M + 3SM + 1A$ ) coletados em Garanhuns (PE) houve uma pequena variação no número de bandas CMA+: um deles (LPF 14420) apresentou um par de bandas CMA+ em um dos pares submetacêntricos e uma minúscula banda terminal pode ser observada no braço curto de um dos cromossomos dos outros pares de submetacêntricos (Fig. 1e) enquanto que o outro indivíduo apresentou dois pares de bandas bem visíveis (Fig. 1f). Em *O. frutescens* foram encontrados indivíduos diploides ( $3M + 3SM$ ) e tetraploides ( $6M + 6SM$ ), apresentando dois e quatro pares de bandas CMA+, respectivamente (Fig. 1h, 1i).

Em relação aos sítios de DNAr as espécies *O. cratensis*, *O. frutescens diploide*, *Oxalis* sp1 e *O. hedyarifolia* (LPF 14420), apresentaram apenas um par de sítios de DNAr 5S e dois pares de 45S (Fig. 2a, 2b, 2c e 2e). A posição do sítio de DNAr 5S foi intersticial em *O. cratensis* e proximal nas demais, enquanto os sítios de DNAr 45S foram sempre co-localizados com as bandas CMA+, exceto em *O. hedyarifolia*, na qual não foi feita a FISH com DNAr 45S.

*Oxalis physocalix*, *O. grisea*, *Oxalis ciliata* e *O. juruensis*, com  $2n = 12$  diferiram das demais por apresentarem apenas cromossomos acrocêntricos e um maior número de bandas CMA+: quatro pares em *O. grisea* e cinco pares nas demais (Fig. 1j, 1k, 1l, 1m). Sítios de DNAr 5S e 45S foram observados apenas em *O. juruensis*, tendo um par de sítios 5S intersticial e 5 pares de 45S co-localizados com as bandas CMA+ (Fig. 2f).

Uma outra espécie que apresentou todos os cromossomos acrocêntricos foi *O. rhombeo-ovata*, com  $2n = 14$  e um cariótipo muito semelhante ao de *O. psoraleoides*. Os cromossomos dessas duas espécies têm tamanho similar, bandas CMA+ co-localizadas com sítios de DNAr no terminal de todos os braços cromossômicos, exceto nos pequenos braços dos acrocêntricos, e a presença de uma banda CMA+ intersticial co-localizada com o único sítio de DNAr 5S. Contudo, *O. rhombeo-ovata* difere de *O. psoraleoides* pela presença de bandas CMA+/sítios de DNAr 45S nos braços curtos dos acrocêntricos e uma banda DAPI+ entre o sítio de DNAr 5S e o telômero desse braço, além da fissão-fusão cêntrica responsável pela diferença de número cromossômico (Fig. 2g, Fig. 3).

*Oxalis pyreneae* (16M + 4SM + 4A) e *O. sellowii* (20M + 4A) tiveram  $2n = 24$ , o maior número cromossômico encontrado nesta amostra. Os cariótipos dessas espécies apresentaram bandas CMA+ nos cromossomos acrocêntricos. Em *O. pyreneae* foram

observados dois pares de sítios de DNAr 5S e sítios de 45S co-localizados com todas as bandas CMA+ além de e sítios terminais menores em dois pares de submetacêntricos (Figs.1o-p e 2h-i).

No citotipo tetraploide de *O. frutescens* ( $2n = 24$ ;  $12M + 12SM$ ) foram encontradas 4 pares de bandas CMA+ terminais em cromossomos submetacêntricos (Fig. 1i). Dois pares de sítios de DNAr 5S e quatro pares de 45S foram localizados na região terminal dos braços curtos de 8 submetacêntricos distintos, sendo os últimos co-localizados com as bandas CMA+. Curiosamente, no citótipo diploide de *O. frutescens* o sítio de DNAr 5S está localizado na região intersticial do braço longo de um par submetacêntrico grande, ligado a um sitio de DNAr 45S no terminal do braço curto, enquanto no tetraploide os dois pares de DNAr 5S são terminais e não estão ligados ao 45S (compare Fig 2c e 2j).

*Oxalis neuwiedii* e *Oxalis puberula* apresentaram  $2n = 10$  ( $2M + 2SM + 6A$ ) (Fig. 1 q-r). Em *O. neuwiedii* as bandas CMA+ co-localizaram com sítios de DNAr 45S nos braços curtos de quatro acrocêntricos. O único sítio de DNAr 5S foi localizado adjacente e proximal ao 45S do maior acrocêntrico (Fig. 2k). *Oxalis puberula* não foi analisada por meio de FISH.

A FISH com DNA telomérico foi realizada em apenas duas espécies, *O. psoraleoides* e *O. frutescens* (Fig. 4a e 4b). Nesses casos, os sítios foram exclusivamente terminais. Três tipos de retrotransposons foram testados em *O. psoraleiodes*, dois Ty3-gypsy (Chromovirus e OGRE) e um Ty1-copia (Angela), todos eles mostraram distribuição dispersa em todos os cromossomos (Fig. 4c, 4d e 4e).

O conteúdo de DNA das espécies analisadas foi bem heterogêneo, tendo como menor valor  $2C = 2,03$  pg para *Oxalis* sp 2 e o maior valor  $2C = 11,44$  pg em *Oxalis* sp 3 (Tabela 2).

## Discussão

Os números cromossômicos apresentados no presente trabalho para 17 espécies confirmam as contagens prévias para *Oxalis cratensis*, *O. divaricata*, *O. frutescens*, *O. physocalix*, *O. grisea*, *O. hedysarifolia*, *O. psoraleoides* e *O. juruensis*, todas diploides com  $2n = 12$ , e para *O. newwiedii* e *O. rhombeo-ovata*, com  $2n = 10$  e  $2n = 14$ , respectivamente (Marks, 1956; De Azkue e Martinez, 1983; De Azkue e Martínez, 1984; De Azkue e Martinez, 1987; De Azkue, 2000; Vaio, 2012). Além disso, foram feitas as primeiras contagens cromossômicas para *Oxalis ciliata*, *O. pyreneae* e *O. sellowii*, onde a primeira é diploide com  $2n=12$  e as demais poliploides com  $2n = 24$ , e identificado um citótipo tetraploide para *O. frutescens*, com  $2n = 24$ , e um triploide com  $2n = 18$  para *O. cratensis*. Esses dados revelam que a frequência de poliploides com  $x = 6$  é relativamente alta em *Thamnoxyis*, tanto no nível intra-específico quanto inter-específico. Entretanto, comparando com a frequência de poliploidia em outros subgêneros de *Oxalis* (Krejčíková et al., 2013; Vaio et al., 2013, 2016) essa variação é ainda incipiente. Curiosamente, a poliploidia parece restrita à seção *Thamnoxyis* enquanto a disploidia é mais frequente no clado B, a linhagem irmã de *Thamnoxyis* que teria originado as demais seções do gênero (Vaio, 2012).

Em relação à heterocromatina detectada por CMA/DAPI, exceto *O. rhombeo-ovata*, todas as demais espécies apresentaram apenas heterocromatina CMA+ associada aos sítios de DNAr 45S, exceto uma banda CMA+ intersticial co-localizada com o DNAr 5S em *O. psoraleoides* e de *O. rhombeo-ovata*. Isso sugere que ao menos as bandas CMA+ localizadas nos braços curtos dos acrocêntricos de *O. divaricata*, *O. grisea*, *O. newwiedii* e *O. sellowii* sejam também sítios de DNAr 45S. Essa restrição da heterocromatina aos sítios de DNAr 45S tem sido observada também nos representantes

de outros subgêneros de *Oxalis* (Vaio et al., 2013, 2016). Em *O. rhombeo-ovata*, foi observada uma banda DAPI+ fraca, ausente inclusive na espécie irmã, *O. psoraleoides*, sugerindo se tratar de um DNA satélite rico em AT nascente nessa espécie.

Gêneros cujas espécies possuem apenas heterocromatina CMA+ restrita aos sítios de DNAr não são raros (ver por ex. Melo et al., 2003; Souza et al., 2015). Entretanto, em *Oxalis* parece ter ocorrido extensa ampliação do tamanho do genoma repetidas vezes, criando um ambiente favorável à formação e manutenção de sequências em tandem formando blocos de heterocromatina. Embora nem toda heterocromatina seja necessariamente detectada com os fluorocromos CMA e DAPI, após a FISH é comum que outros tipos de heterocromatina também sejam revelados como blocos DAPI+ nos cromossomos (Barros e Silva & Guerra, 2010); Bogunic et al., 2011). A ausência de blocos DAPI+ após a FISH nas espécies de *Oxalis* analisadas sugere que a heterocromatina nessas espécies esteja realmente restrita aos sítios de DNAr. Nesse caso, a contribuição da heterocromatina para o aumento do tamanho do genoma de *Oxalis* seria mínima ou nenhuma.

Um dado importante para a caracterização dos cariótipos das espécies de *Thamnoxyis* foram os sítios de DNAr 5S e 45S. Cada espécie apresentou apenas um par de sítios de DNAr 5S por conjunto monoploide, não havendo diploidização do número de sítios nem nos tetraploides intraespecíficos nem nas espécies onde só são conhecidos tetraploides. Entretanto, como o número de cromossomos da maioria das espécies é baixo, esses sítios constituíram marcadores cromossômicos importantes para identificar homólogos e auxiliar no entendimento da evolução cariotípica. Por exemplo, o cariótipo de *O. psoraleoides* e *O. rhombeo-ovata* diferem entre si principalmente pela presença de um metacêntrico grande em *O. psoraleoides*, aparentemente correspondente a dois dos acrocêntricos de *O. rhombeo-ovata*. A ocorrência de um único sítio de DNAr 5S no braço

curto do metacêntrico de *O. psoraleoides* e em um dos menores acrocêntricos de *O. rhombeo-ovata* fortemente sugere uma homologia entre esses dois elementos.

A hipótese de que essas duas espécies diferiam por um evento de fusão ou fissão cêntrica havia sido proposta anteriormente com base no número e morfologia cromossômica (De Azkue & Martínez, 1983). A localização do DNAr 5S revelou o par de acrocêntricos mais provavelmente envolvido nesse evento, mas não indica se teria havido fusão ou fissão cêntrica. A FISH com DNA telomérico em *O. psoraleoides* não mostrou nenhum sítio de DNA telomérico interno (ITS) na região proximal desse metacêntrico que permitisse reforçar a hipótese de fusão cêntrica. Um cariótipo idêntico ao de *O. psoraleoides* é encontrado em duas outras espécies próximas, *O. erosa* e *O. phaseolifolia* (De Azkue, 2000), sugerindo que se houve uma fusão cêntrica essa pode ter ocorrido num passado mais remoto, o que explicaria o desaparecimento de algum pequeno sítio de sequências satélite formado durante a fusão cêntrica.

Diferentemente dos sítios de DNAr 5S, os sítios de DNAr 45S variaram amplamente em número: de 2 a 20 sítios por conjunto cromossômico diploide. A presença de numerosos sítios de DNAr 45S em *O. psoraleoides* (12 sítios/ $2n = 12$ ), *O. juruensis* (10 sítios/ $2n = 12$ ) e *O. newwiedii* (6 sítios/ $2n = 10$ ), todas diploides, indica que a dispersão dessas sequências mais provavelmente ocorreu por transposição ou por recombinação ectópica (Pedrosa-Harand et al., 2006).

A distribuição dos sítios de DNAr 45S foi sempre terminal, preferencialmente nos braços curtos dos acrocêntricos e co-localizados com bandas CMA+, como na maioria das angiospermas (Roa e Guerra, 2012). Por outro lado, a posição dos sítios de DNAr 5S foi mais variável, sendo preferencialmente intersticial. Um caso particularmente raro foi a presença de sítios intersticiais no citótipo diploide de *O. frutescens* e terminais no citótipo tetraploide. Essas mudanças de posição podem ser devidas a um polimorfismo para a posição desses sítios entre as populações diploides ou a inversões cromossômicas,

mas a possibilidade de que esses citótipos se tratem de espécies distintas não pode descartada.

A quantificação do conteúdo de DNA nuclear, feita aqui em oito espécies, confirma uma intensa variação inter-específica, sugerindo que o valor C é um parâmetro muito importante para a citotaxonomia do grupo (Krejčíková et al., 2013). Um aspecto que chama a atenção é a variação entre estimativas para uma mesma espécie feitas por nosso grupo e aquelas de De Azkue e Martínez (1988). Essa divergência pode se dever em parte a diferenças metodológicas, uma vez que a estimativa destes autores foi baseada em citofotometria com coloração Feulgen, podendo diferir um pouco dos dados obtidos por citometria de fluxo com iodeto de propídeo (Greilhuber, 2005).

A maior divergência entre diferentes estimativas de conteúdo de DNA foi encontrada em *O. psoraleoides*. O registro anterior para essa espécie de 41, 14 pg (Vaio, 2012) não deve ser considerado, porque ao menos um dos indivíduos incluídos nessa estimativa foi reavaliada por nosso grupo junto com mais outros dois de diferentes populações, sendo 35 picogramas a melhor estimativa para essa espécie. Esse valor é bem próximo do obtido por De Azkue e Martínez (1988).

Esses dados confirmam que o conteúdo de DNA em *Thamnoxys* deve ter evoluído principalmente por proliferação/eliminação de elementos de transposição, uma vez que a maior parte da variação conhecida está entre espécies diploides. Esta variação ocorre tanto entre espécies com  $2n = 10$  (*O. alstonii* Lourteig,  $2C = 1,76$  pg – *O. umbraticola* A. St.-Hil.,  $2C = 16,50$  pg) quanto naquelas com  $2n = 12$  (*O. divaricata* Mart. Ex Zucc.,  $2C = 1,88$  pg – *O. psoraleoides* Kunth,  $2C = 35,0$  pg) e em diferentes seções do subgênero, indicando flutuações do valor C repetidas e independentes. Essas variações são conhecidas também de outros gêneros, como em *Carex* (Lipnerová et al., 2012) e *Gossypium* (Hawkins et al., 2006), mas com tamanha amplitude e em diferentes

subgêneros é muito raro (MacNeil et al., 2007).

A hipótese de que a grande variação no conteúdo de DNA das espécies diploides seria devida a uma extraordinária expansão de retroelementos foi suportada pela identificação das principais sequências de DNA repetitivo em três espécies de *Thamnoxys* e duas de outros subgêneros (Vaio et al., 2014). Quando hibridizados *in situ*, os três principais retrotransposons LTR de *O. psoraleoides*, dois do tipo Gypsy (Chromovirus e Ogre) e um do tipo Copia (Angela), mostraram sinais dispersos por todo o genoma. Isso explica em parte a falta de blocos heterocromáticos em espécies com valor C tão elevado. A ampliação/deleção dessas sequências deve se dar de modo aleatório, uma vez que a morfologia cromossômica das espécies da seção Polymorpha e Psoraleoidea não parece substancialmente alterada. O aumento no tamanho do genoma causado pela expansão de apenas uma família de retrotransposons (tipo Ty3 gypgy) foi verificado em outras espécies, como por exemplo em *Gossypium* (Hawkins et al., 2009) e *Capsicum annum* (Park et al., 2012). Contudo, é necessário analisar um maior número de espécies diploides para entender a dinâmica de expansão e contração de cada uma dessas sequências.

## Referências

Barros e Silva AE, Guerra M (2010). The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotechnic & Histochemistry*. 85: 115-125.

Begum R, Zakrzewski F, Menzel G, Weber B, Alam SS, Schmidt T (2013) Comparative molecular cytogenetic analyses of a major tandemly repeated DNA family and retrotransposon sequences in cultivated jute *Corchorus* species (Malvaceae). *Annals of Botany* 112: 123–134.

Bogunić F, Siljak-Yakovlev S, Muratović E, Pustahija F, Medjedović S (2011). Molecular cytogenetics and flow cytometry reveal conserved genome organization in *Pinus mugo* and *P. uncinata*. *Annals of Forest Science* 68:179–187.

Brasileiro-Vidal AC, Cuadrado A, Brammer SP, Zanatta ACA, Prestes AM, Moraes-Fernandes MIB, Guerra M (2003). Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poaceae) using *in situ* hybridization with different DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology* 26-4, 505-510.

de Azkue D (2000). Chromosome diversity of South American *Oxalis* (Oxalidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 132: 143–152.

de Azkue D & Martínez A (1983). The chromosome complements of shrubby *Oxalis* species from South America. *Plant Systematics and Evolution* 141: 187–197.

de Azkue D. and Martinez, A., 1984. Variación del cariotipo, volumen nuclear y contenido de ADN en siete especies de *Oxalis*. *Darwiniana* 25 (1-4), 267-277.

de Azkue, D., Martínez, A (1988). DNA content and chromosome evolution in the shrubby *Oxalis*. *Genome*. 30, 52–57.

de Oliveira IG, Moraes AP, Almeida EM, Assis FNM, Cabral JS, Barros F, Félix LP (2015). Chromosomal evolution in Pleurothallidinae (Orchidaceae: Epidendroideae) with emphasis on the genus *Acianthera*: chromosome numbers and heterochromatin. *Bot. Journal. Linnean Society*. 178: 102-120.

Doležel, J, Greilhuber J, Suda J (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*, 2 (9): 2233-2244.

Guerra M. 2012. Cytotaxonomy: The end of childhood. *Plant Biosystems*. 146: 703- 710.

Greilhuber J. 2005. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Annals of Botany* 95: 91–98.

Hawkins JS, Proulx SR, Rapp RA, Wendel JF (2009). Rapid DNA loss as a counterbalance to genome expansion through retrotransposon proliferation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 17811-17816.

Huang Z, Chen K, Zhang J, Li Y, Wang H, Cui D, Tang J, Liu Y, Shi X, Li W, Liu D, Chen R, Sugang RS, Pan X (2013). A functional variomics tool for discovering drug-resistance genes and drug targets. *Cell Rep* 3(2):577-85.

Krejčíková J, Sudová R, Lucanová M, Trávníček P, Urfus T, Vít P, Weiss-Schneeweiss H, Kolano B, Oberlander K, Dreyer LL, Suda J (2013). High ploidy diversity and distinct patterns of cytotype distribution in a widespread species of *Oxalis* in the Greater Cape Floristic Region. *Annals of botany* 111: 641-649.

Lipnerová I, Bureš P, Horová L, Šmarda P (2012). Evolution of genome size in *Carex* (Cyperaceae) in relation to chromosome number and genomic base composition. *Ann Bot.* 111(1):79-94.

- Loureiro J & Santos C (2004). Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Boletim de biotecnologia*, 18-29.
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C (2007). Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. *Ann Bot.*100(4): 875– 888
- Lourteig A (1983) Oxalidaceae. In: Reitz Revista editora Flora Ilustrada Caterinense 3–174.
- Lourteig A (1994) *Oxalis* L. subgenus *Thamnoxys* (Endl.) Reiche emend. Lourteig. *Bradea*. 7:1-199.
- McNeal JR, Arumugunathan K, Kuehl JV, Boore JL, Depamphilis CW (2007). Systematics and plastid genome evolution of the cryptically photosynthetic parasitic plant genus *Cuscuta* (Convolvulaceae). *BMC Biol.* 13;5:55.
- Marks GE. 1956. Chromosome numbers in the genus *Oxalis*. *New Phytologist*. 55: 120–126.
- Melo NF, Guerra M (2003). Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* 92:309-316.
- Prančl J, Kaplan Z, Trávníček P, Jarolímová V (2014). Genome Size as a Key to Evolutionary Complex Aquatic Plants: Polyploidy and Hybridization in *Callitriche* (Plantaginaceae). *Plos one* vol 9:9.
- Park M, Park J, Kim S, Kwon JK, Park HM, Bae IK, Yang TJ, Lee YH, Kang BC, Choi D (2012). Evolution of the large genome in *Capsicum annuum* occurred through accumulation of single-type long terminal repeat retrotransposons and their derivatives. *The Plant Journal* 69: 1018-1029.
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002). Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161(4):1661-72.
- Pedrosa-Harand A, Almeida CCS, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M (2006). Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor Appl Genet.*112(5):924-33.
- Prokopowich CD, Gregory TR, Crease TJ (2003). The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome* 46:48–50.
- Rao SR, Trivedi S, Emmanuel D, Merita K, Hynniewta M (2010). DNA repetitive sequences-types, distribution and function: A review. *Journal of Cell and Molecular Biology* 8: 1-11.
- Renny-Byfield S, Kovarík A, Chester M, Nichols RA, Macas J, Novák P (2012). Independent, rapid and targeted loss of highly repetitive DNA in natural and synthetic allopolyploids of *Nicotiana tabacum*. *PLOS ONE* 7:5.

Roa F & Guerra M (2015). Non-Random Distribution of 5S rDNA Sites and Its Association with 45S rDNA in Plant Chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 2015;146(3):243-9.

Souza G, Crosa O, Guerra M (2015). Karyological morphological, and phylogenetic diversification in *Leucocoryne* Lindl (Allioidea, Amaryllidaceae). *Plant syst. Evol* 301:2013-2023.

Silva SC, Mendes S, Filho WSS, Pedrosa-Harand (2015). Chromosome homologies between *Citrus* and *Poncirus* – the comparative cytogenetic map of mandarin (*Citrus reticulata*). *Tree Genetics & Genomes* 11:811).

Vaio M, Gardner A, Emshwiller E, Guerra M (2013). Molecular phylogeny and chromosome evolution among the creeping herbaceous *Oxalis* species of sections Corniculatae and Ripariae (Oxalidaceae). *Mol Phylogenet Evol.* 68(2):199-211.

Vaio M (2012). Relações filogenéticas e evolução cromossômica em espécies do gênero *Oxalis* (oxalidaceae). Tese (Doutorado em Biologia vegetal) – Programa de Pós-graduação em Biologia vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

**Tabela 1.** Nome das espécies, número de coleta, informação do coletor e procedência para as espécies de *Thamnoxys* do presente estudo.

<b>Espécie</b>	<b>Seção</b>	<b>Nº de coleta</b>	<b>Procedência</b>
<i>Oxalis cratensis</i> Hook.	<i>Thamnoxys</i>	MG 1898	Recife, Campus da UFPE, PE
<i>Oxalis divaricata</i> Mart. ex Zucc.		LPF 12839	-
<i>Oxalis frutescens</i> L.		JN 01	Capela, Refúgio de Vida Silvestre, Mata do Junco, SE
<i>Oxalis frutescens</i> L.		JMPC 307	Serra do Morcego, Sítio Morcego, Salgadinho, PB
<i>Oxalis frutescens</i> L.		JMPC 433	Buíque, Vale do Catimbau, PE
<i>Oxalis hedysarifolia</i> Raddi		LPF 14420	Garanhuns, PE
<i>Oxalis hedysarifolia</i> Raddi		MV 415	Garanhuns, PE
<i>Oxalis sellowii</i> R. Knuth		JMPC 786	Teresina de Goiás , GO
<i>Oxalis pyreneae</i> Taub.		JMPC 799	Teresina de Goiás , GO
<i>Oxalis pyreneae</i> Taub.		JMPC 800	Teresina de Goiás , GO
<i>Oxalis nigrescens</i> A. St.-Hil		LPF 15365	Diamantina, estrada para Inhaí, MG

<i>Oxalis grisea</i> A. St.-Hil. & Naudin	<i>Robustae</i>	MV 512	CE
<i>Oxalis juruensis</i> Diels		LPF 15093	Pacoti, CE
<i>Oxalis ciliata</i> Sprengel		JMPC 912	Cristalina, GO
<i>Oxalis physocalyx</i> Zucc. ex Progel		JMPC 763	Monte Alegre de Goiás, GO
<i>Oxalis neuwiedii</i> Zucc.	<i>Polymorphae</i>	EMA 1336	Sooretama-REBIO, ES
<i>Oxalis puberula</i> Phil		-	BA
<i>Oxalis</i> cf. <i>polymorpha</i>		JMPC 642	Caem, BA
<i>Oxalis rhombeo-ovata</i>		PF 4464	Florianópolis. Parque Municipal da Lagoa do Peri. Caminho da Gurita, ca, SC
<i>Oxalis psoraleoides</i> Kunth.	<i>Psoraleoideae</i>	-	Triunfo, PE
<i>Oxalis psoraleoides</i> Kunth.		-	Areia, PB
<i>Oxalis</i> sp 1		MV 417	-
<i>Oxalis</i> sp 2		MG 1901	Campus UFC, CE
<i>Oxalis</i> sp 3		LPF	

**Tabela 2.** Número cromossômico ( $2n$ ), registros anteriores para valor  $2n$ , contagens prévias para registro  $2n$ , fórmula cariotípica, número de bandas CMA, número de sítios de DNAr 5S e número de sítios de DNAr 45S e localização no cromossomo, conteúdo de DNA 2C para as espécies de *Thamnoxyis*.

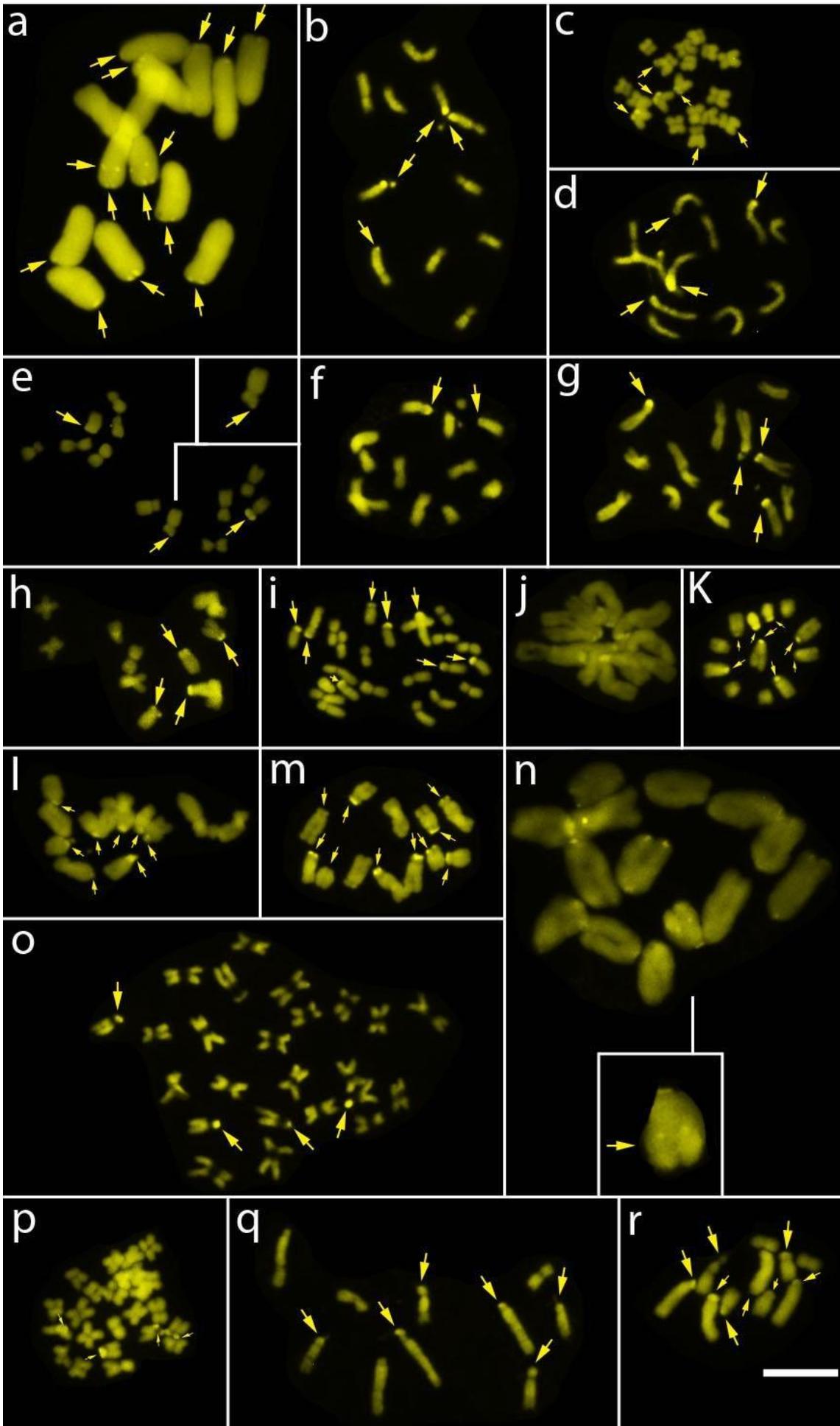
Espécie	$2n$	Contagens prévias ( $2n$ )	Fórmula cariotípica	Nº de bandas CMA	Nº e posição de sítios de DNAr 5S	Nº e posição de sítios de DNAr 45S	Conteúdo de DNA (2C)
<i>Oxalis ciliata</i> (JMPC 912)	12	*	12A	8	-	-	*
<i>Oxalis cratensis</i> (MG 1898)	12	12 a, f	4 M + 4 SM + 4 A	4	2 I	4 T	2,98 f
<i>Oxalis cratensis</i> (MG 1898/7)	18	12 a, f	6 M + 6 SM + 6 A	6	-	-	-
<i>Oxalis divaricata</i> (LPF 12839)	12	12 a, f	4 M + 6 SM + 2 A	4	-	-	1,88 f
<i>Oxalis frutescens</i> (JN01)	12	12 a, c, f; 36 f	6 M + 6 SM	4	2 P	4 T	2,78 f
<i>Oxalis frutescens</i> (JMPC 307)	24	12 a, c, f; 36 f	12 M + 12 SM	8	4 T	8 T	-
<i>Oxalis frutescens</i>	24	-	12 M + 12	8	4 T	8 T	-

(JMPC 433)			SM					
<i>Oxalis grisea</i> (MV 512)	12	12 a, b, c	12 A	8	-	-	-	-
<i>Oxalis hedysarifolia</i> (MV 14420)	12	12 a, b, f	6 M + 6 SM	4	2 P	-	-	-
<i>Oxalis hedysarifolia</i> (MV 415)	12	12 a, b, f	6 M + 6 SM	2	-	-	-	-
<i>Oxalis juruensis</i> (LPF 15093)	12	12 c	12 A	10	2I	10 T	-	-
<i>Oxalis neuwiedii</i> (EMA 1336)	10	12 a, b; 10 f	2 M + 2 SM + 6 A	6	2 T	6 T	5,24 f, 3,9 g**	
<i>Oxalis nigrescens</i> (LPF 15365)	-	-	-	-	-	-	5,43 g	
<i>Oxalis physocalix</i> (JMPC 763)	12	*	12 A	10	-	-	-	
<i>Oxalis cf. polymorpha</i> (JMPC 642)	-	*	-	-	-	-	10,4 g	
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	41,14 f ;	
<i>Oxalis puberula</i>	10	*	2 M + 2 SM + 6 A	6			5,45g	
<i>Oxalis pyreneae</i> (JMPC 799)	24	*	16 M + 4 SM + 4 A	4	4 (2 P, 2 I)	8 T	7,60g	
<i>Oxalis rhombo-ovata</i>	14	14 a	14 A	6	-	-	-	
<i>Oxalis sellowii</i> (JMPC 786)	24	12 a, b; 36, 36+2B b; 72 b	20 M + 4 A	4	-	-	8,37g	
<i>Oxalis sp 1</i> (MV 417)	12	-	6 M + 4 SM + 2A	8	2	4	-	
<i>Oxalis sp 2</i> (MG 1901)	-	-	-	-	-	-	2,03g	
<i>Oxalis sp 3</i>	-	-	-	-	-	-	11,4g	

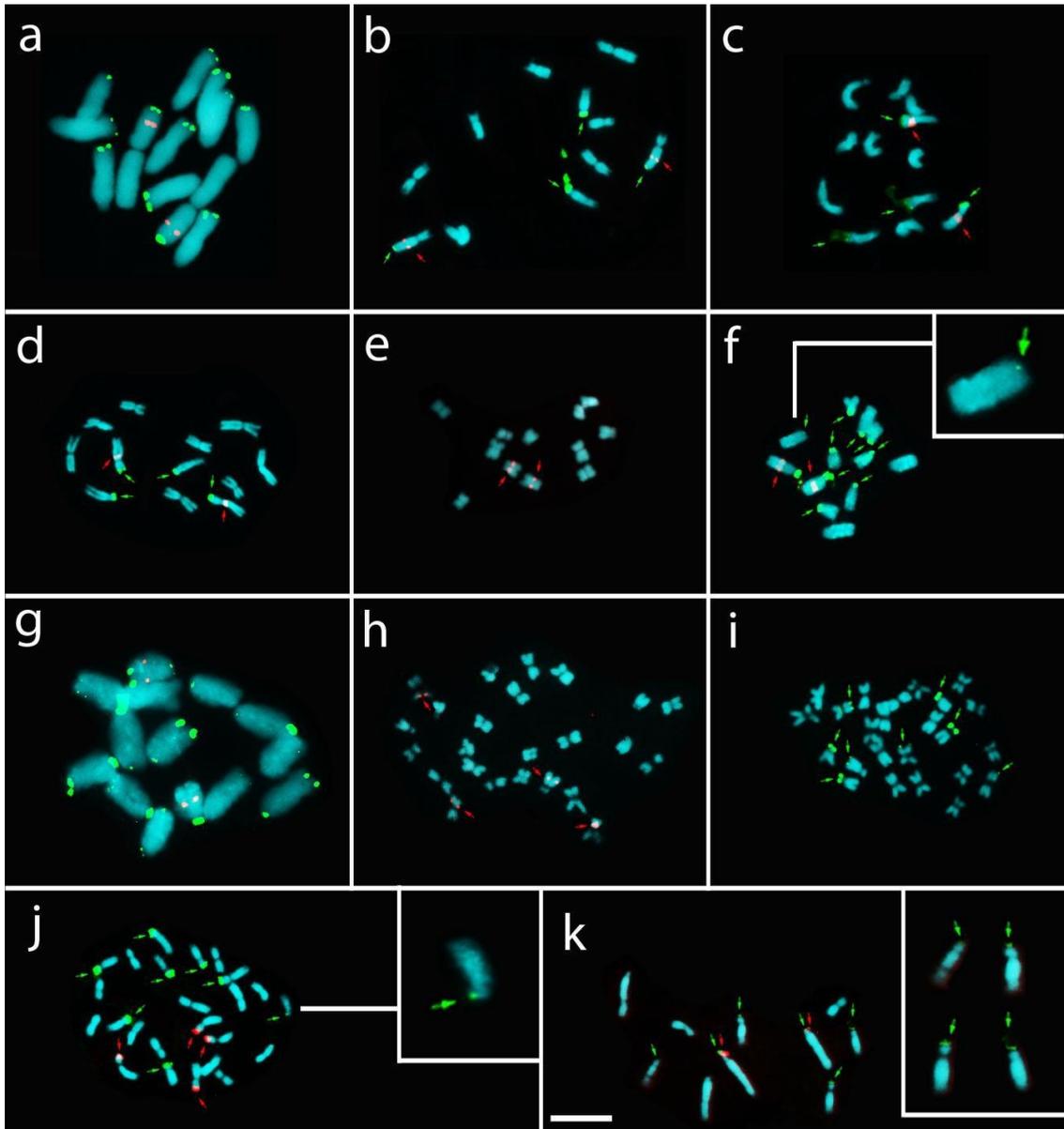
**Referências:** a- De Azkue e Martinez, 1983; b- De Azkue e Martinez, 1987; c- De Azkue, 2000; d- De Azkue e Martínez, 1984; e- Marks, 1956; f- Vaio M, 2012; g- dados obtidos no presente trabalho.

\* não consta na literatura.

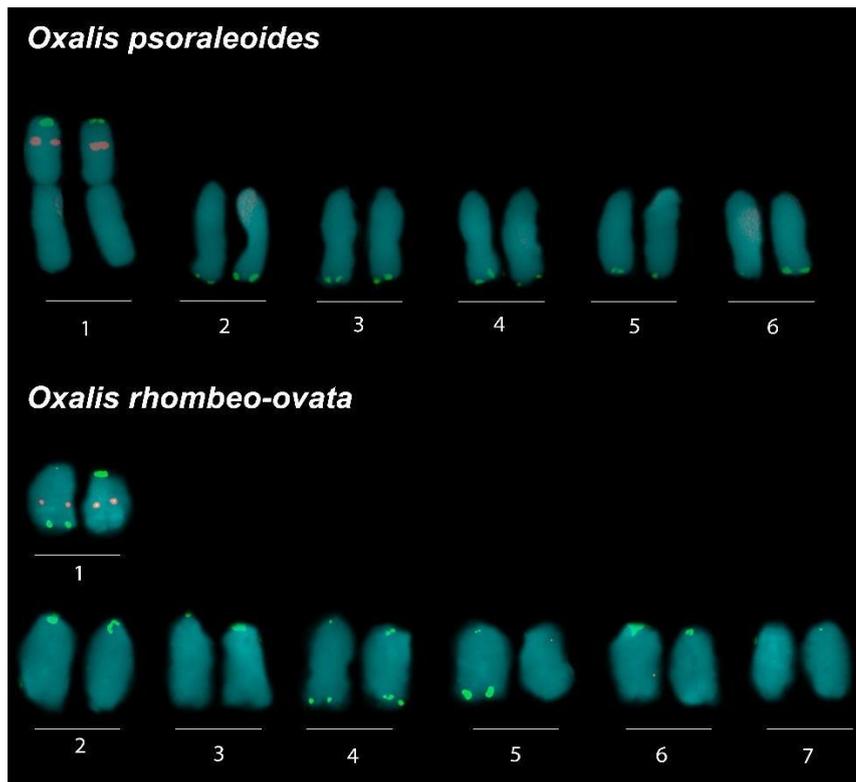
\*\*Uma espécie identificada anteriormente como *O. neuwiedii* foi visto se tratar de *O. puberula*. Essas duas espécies foram também reavaliadas por nosso grupo.



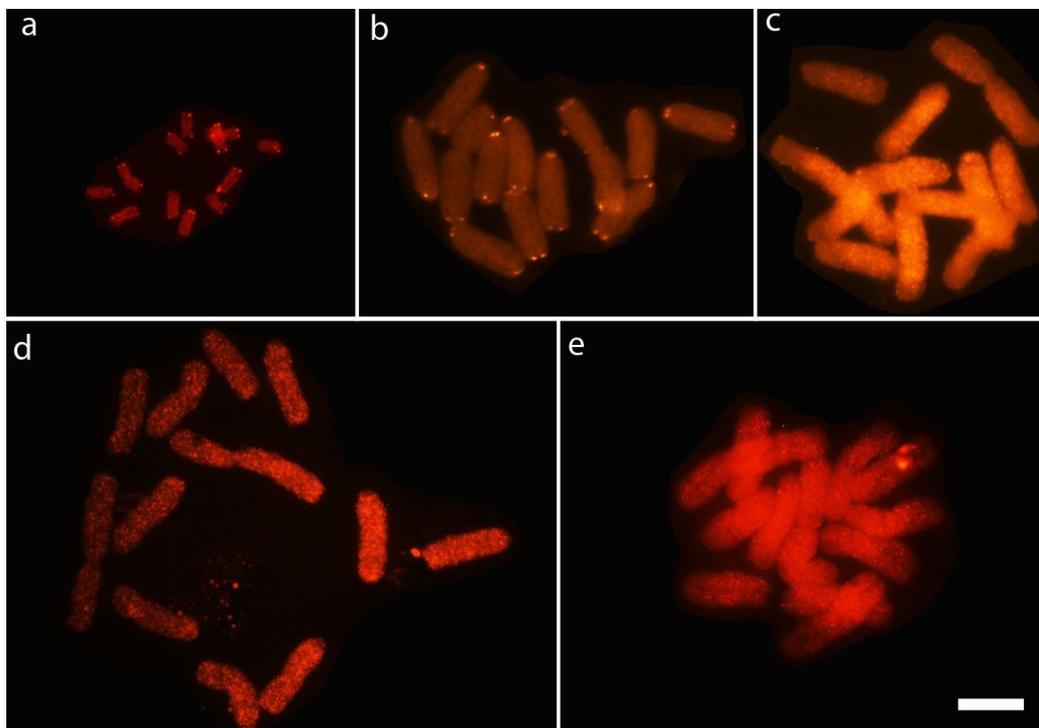
**Figura 1** – CMA em espécies de *Thamnoxyis*: *Oxalis psoraleoides* (a), *O. cratensis* diploide (b), *O. cratensis* triploide (c), *O. divaricata* (d), *O. hedyarifolia* (LPF 14420) (e), *O. hedyarifolia* (MV 415) (f), *Oxalis* sp.1 (g), *O. frutescens* diploide (h), *O. frutescens* tetraploide (i), *O. physocalix* (j), *O. grisea* (k), *O. ciliata* (l), *O. juruensis* (m), *O. rhombeo-ovata* (n), *O. pyreneia* (o), *O. sellowi* (p), *O. neuwiedii* (q) e *O. puberula* (r). Barra de escala = 10 $\mu$ . Bandas CMA+ setas amarelas.



**Figura 2** – FISH em espécies de *Thamnoxyis*: *Oxalis psoraleoides* (a), *O. cratensis*(b), *O. frutescens* diploide (c), *Oxalis* sp.1(d), *O. hedyarifolia* (e), *O. juruensis* (f), *O. rhombeo-ovata* (g), *O. pyreneia* (h,i), *O. frutescens* tetraploide (j) e *O. neuwiedii* (k). Barra de escala = 10 $\mu$ . DNAr 5S em vermelho e em setas vermelhas; DNAr 45S em verde e em setas verdes.



**Figura 3** – Cariograma de *Oxalis psoraleoides* e *Oxalis rhombeo-ovata* mostrando a semelhança dos cariótipos dessas duas espécies.



**Figura 4** – FISH com sonda de DNA telomérico em a (*Oxalis frutescens*) e b (*O. psoraleoides*). FISH utilizando retrotransposons em *O. psoraleoides*: c- Chromovirus; d- Ogre; e- Angela. Barra de escala = 10 $\mu$ .

#### 4. CONCLUSÕES

Até então a poliploidia é a um evento restrito à seção *Thamnoxys*, uma vez que apenas espécies encontradas nessa se mostraram poliploides.

No subgênero *Thamnoxys* as bandas heterocromáticas são restritas aos sítios de DNAr 45S e possivelmente não tem participação no tamanho do genoma dessas espécies.

Não houve diploidização dos sítios de DNAr 5S e 45S, mostrando que esses eventos de poliploidia em determinadas espécies do grupo são bem recentes.

*Oxalis rhombeo-ovata* parece ter surgido da fissão do par metacêntrico de *Oxalis psoraleoides*, sendo essas espécies irmãs, o que é mostrado pela FISH de DNAr 45S e de DNA telomérico.

Através dos dados de FISH com retroelementos observou-se que a diferença gritante entre os genomas das espécies de *Oxalis* se deu pela proliferação e/ou eliminação dos retrotransposons nessas espécies.

#### 5. REFERÊNCIAS

Abreu MC, Silva MJ, Sales MF (2012). Análise cladística de *Oxalis* sect. *Thamnoxys* (Oxalidaceae) baseada em dados morfológicos. *Rodriguésia* 63(4): 755-761.

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)<sub>n</sub>-3' in the evolution of a major radiation of flowering plants. *Proceedings of the Royal Society B* 268:1541-1546.

Almeida CCS, Carvalho PCL, Guerra M (2007). Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 155, 541–547.

Angiosperm Phylogeny Website. APG. Version 9, June 2008.  
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

Assis FNM, Souza BCQ, Medeiros-Neto E, Pinheiro F, Barros e Silva AE, Félix LP (2013). Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 172, 329–344.

Barros e Silva AE & Guerra M (2010). The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotechnic & Histochemistry* 85: 115-125.

Begum R, Zakrzewski F, Menzel G, Weber B, Alam SS, Schmidt T (2013) Comparative molecular cytogenetic analyses of a major tandemly repeated DNA family and retrotransposon sequences in cultivated jute *Corchorus* species (Malvaceae). *Annals of*

*Botany* 112: 123–134.

Brasileiro-Vidal AC, Cuadrado A, Brammer SP, Zanatta ACA, Prestes AM, Moraes-Fernandes MIB, Guerra M (2003). Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poaceae) using *in situ* hybridization with different DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology* 26-4, 505-510.

Chauffaille LLF (2005). Citogenética e biologia molecular em leucemia linfocítica crônica. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 27(4):247-252.

Cornélio MTMN, Figueirôa ARS, Santos KGB, Carvalho R, Soares Filho WS, Guerra M (2005). Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Syst Evol* 240: 149-161.

Dantas LG & Guerra M (2010). Chromatin differentiation between *Theobroma cacao* L. and *T. grandiflorum* Schum. *Genetics and Molecular Biology*, 33, 1, 94-98.

de Azkue D & Martínez A (1987). DNA content and chromosome evolution in the shrubby *Oxalis*. *Genome*, vol.30.

de Azkue D & Martínez A (1983). The chromosome complements of shrubby *Oxalis* species from South America. *Plant Systematics and Evolution* 141: 187–197.

de Azkue D & Martínez A (1984). Variación del cariotipo, volumen nuclear y contenido de ADN en siete especies de *Oxalis*. *Darwiniana* 25: 267–277.

de Azkue D (2000). Chromosome diversity of South American *Oxalis* (Oxalidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 132: 143–152.

D'Hont A<sup>1</sup>, Denoeud F, Aury JM, Baurens FC, Carreel F, Garsmeur O, Noel B, Bocs S, Droc G, Rouard M, Da Silva C, Jabbari K, Cardi C, Poulain J, Souquet M, Labadie K, Jourda C, Lengellé J, Rodier-Goud M, Alberti A, Bernard M, Correa M, Ayyampalayam S, Mckain MR, Leebens-Mack J, Burgess D, Freeling M, Mbéguié- A-Mbéguié D, Chabannes M, Wicker T, Panaud O, Barbosa J, Hribova E, Heslop-Harrison P, Habas R, Rivallan R, Francois P, Poirion C, Kilian A, Burthia D, Jenny C, Bakry F, Brown S, Guignon V, Kema G, Dita M, Waalwijk C, Joseph S, Dievert A, Jaillon O, Leclercq J, Argout X, Lyons E, Almeida A, Jeridi M, Dolezel J, Roux N, Risterucci AM, Weissenbach J, Ruiz M, Glaszmann JC, Quétier F, Yahiaoui N, Wincker P (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* 9;488(7410):213-7.

Doležel, J, Greilhuber J, Suda J (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*, 2 (9): 2233-2244.

Eiten G (1963). Taxonomy and regional variation of *Oxalis* section *Corniculatae*. I. Introduction, Keys, and Synopsis of the Species. *The American Midland Naturalist* 69:257-309.

Emshwiller E, Doyle JJ (1998). Origins of domestication and polyploidy in oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae): NRDNA ITS data. *American Journal of Botany* 85 (7): 975– 985.

Félix LP & Guerra M (2000). Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4, 957-978.

Feschotte C, Jiang N, Wessler SR (2002). Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature reviews – Genetics* vol. III: 329-341.

Fuchs J, Brandes A, Schubert I (1995). Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher-plants. *Plant Systematic and Evolution* 196:227-241.

Friesen N, Brandes A, (Pat) Heslop-Harrison JS (2001) Diversity, origin, and distribution of retrotransposons (*gypsy* and *copia*) in conifers. *Molecular Biology Evolution* 18:1176-88.

Guerra M (1988). Introdução à Citogenética Geral. *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro. RJ.

Guerra M (1990). A situação da citotaxonomia de angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. *Acta botânica Brasil* 4(2): 1990.

Guerra M & Souza MJ (2002). Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Editora FUNPEC, Ribeirão Preto – SP, 131 p.

Guerra M (2004). FISH, conceitos e aplicações na citogenética. Editado pela *Sociedade Brasileira de Genética*, 176 p.

Greilhuber J, Dolezel J, Wendel J, Leitch IJ (2014). Plant genome diversity: Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes. *Editora Springer*. Vol. II: 220,237.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ (2009). Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético. 3. ed. Porto Alegre: *Artmed*, 2009.

Kolano B, Bednara E, Weiss-Schneeweiss H (2013). Isolation and characterization of reverse transcriptase fragments of LTR retrotransposons from the genome of

*Chenopodium quinoa* (Amaranthaceae). *Plant Cell Rep* 32:1575–1588.

Krejčíková J, Sudová R, Lucanová M, Trávníček P, Urfus T, Vít P, Weiss-Schneeweiss H, Kolano B, Oberlander K, Dreyer LL, Suda J (2013). High ploidy diversity and distinct patterns of cytotype distribution in a widespread species of *Oxalis* in the Greater Cape Floristic Region. *Annals of botany* 111: 641-649.

Kumar A & Bennetzen JL (1999). Plant retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* . 33:479– 532.

Loureiro J & Santos C (2004). Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Boletim de biotecnologia*, 18-29.

Lourteig A (1983). Oxalidaceae. In: Reitz *Revista editora Flora Ilustrada Catarinense* 3–174.

Lourteig A (1994). *Oxalis* L. subgenus *Thamnoxys* (Endl.) Reiche emend. Lourteig. *Bradea*. 7:1-199.

Lourteig A (2000). *Oxalis* L. Subgénero *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Oxalis* y *Trifidus* Lourteig. *Bradea* 7: 201-629.

Moraes AP, Lemos RR, Brasileiro-Vidal AC, Soares Filho WS, Guerra M (2007). Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. *Cytogenetics Genome Research* 119: 275-281.

Melo NF, Cervi AC, Guerra M (2001). Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant. syst. evol.* 226: 68-84.

Melo NF, Guerra M (2003). Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* 92:309-316.

Meyers BC, Tingey SV, Morgante M (2001). Abundance, distribution and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Research* 11:1660-76.

Moraes AP, Lemos RR, Brasileiro-Vidal AC, dos Santos Soares Filho W, Guerra M (2007). Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. *Cytogenet Genome Res* 119:275–281.

Muñoz-López M & García-Pérez JL (2010). DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current genomic* 11(2): 115-128.

Murray BG, Friesen N, Heslop-Harrison JS (2002). Molecular cytogenetic analysis

of *Podocarpus* and comparison with other gymnosperm species. *Annals of Botany* 89: 483- 489.

Neves N, Delgado M, Silva M, Caperta A, Morais-Cecílio L, Viegas W (2005). Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenet Genome Res.* 10 (1-3), 104-111.

Pedrosa A, Gitaí J, Barros e Silva AE, Félix LP, Guerra M (1999). Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. *Acta botânica. Brasil.* 13(1):49-60.

Rao SR, Trivedi S, Emmanuel D, Merita K, Hynniewta M (2010). DNA repetitive sequences-types, distribution and function: A review. *Journal of Cell and Molecular Biology* 8: 1-11.

Renny-Byfield S, Kovarik A, Chester M, Nichols RA, Macas J, Novák P (2012). Independent, rapid and targeted loss of highly repetitive DNA in natural and synthetic allopolyploids of *Nicotiana tabacum*. *PLOS ONE* 7:5.

Ruas CF, Weiss-Schneeweiss H, Stuessy TF, Samuel MR, Pedrosa-Harand A, Tremetsberger K, Ruas PM, Schlister PM, Herrera MAO, König C, Matzenbacher NI (2008). Characterization, genomic organization and chromosomal distribution of Ty1-  *copia* retrotransposons in species of *Hypochaeris* (Asteraceae). *Gene* 412 (2008) 39–49.

Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reily AD, Courtney L, Kruchowski SS, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock SM, Belter E, Du F, Kim K, Abbott RM, Cotton M, Levy A, Marchetto P, Ochoa K, Jackson SM, Gillam B, Chen W, Yan L, Higginbotham J, Cardenas M, Waligorski J, Applebaum E, Phelps L, Falcone J, Kanchi K, Thane T, Scimone A, Thane N, Henke J, Wang T, Ruppert J, Shah N, Rotter K, Hodges J, Ingenthron E, Cordes M, Kohlberg S, Sgro J, Delgado B, Mead K, Chinwalla A, Leonard S, Crouse K, Collura K, Kudrna D, Currie J, He R, Angelova A, Rajasekar S, Mueller T, Lomeli R, Scara G, Ko A, Delaney K, Wissotski M, Lopez G, Campos D, Braidotti M, Ashley E, Golser W, Kim H, Lee S, Lin J, Dujmic Z, Kim W, Talag J, Zuccolo A, Fan C, Sebastian A, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, Miller B, Ambroise C, Muller S, Spooner W, Narechania A, Ren L, Wei S, Kumari S, Faga B, Levy MJ, McMahan L, Van Buren P, Vaughn MW, Ying K, Yeh CT, Emrich SJ, Jia Y, Kalyanaraman A, Hsia AP, Barbazuk WB, Baucom RS, Brutnell TP, Carpita NC, Chaparro C, Chia JM, Deragon JM, Estill JC, Fu Y, Jeddelloh JA, Han Y, Lee H, Li P, Lisch DR, Liu S, Liu Z, Nagel DH, McCann MC, SanMiguel P, Myers AM, Nettleton D, Nguyen J, Penning BW, Ponnala L, Schneider KL, Schwartz DC, Sharma A, Soderlund C, Springer NM, Sun Q, Wang H, Waterman M, Westerman R, Wolfgruber TK, Yang L, Yu Y, Zhang L, Zhou S, Zhu Q, Bennetzen JL, Dawe RK, Jiang J, Jiang N, Presting GG, Wessler SR, Aluru S, Martienssen RA, Clifton SW, McCombie WR, Wing RA, Wilson RK (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science.* 20;326(5956):1112-5.

Slotkin RK (2010). The epigenetic control of the Athila family of retrotransposons in *Arabidopsis*. *Epigenetics* 5:6, 483-490.

Souza VC, Lorenzi H (2012). Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG III. 3:193.

Stuessy TF (1990). Plant taxonomy, the systematic evaluation of comparative data. *Columbia University Press*, 539 pp.

Sykorova E, Lim KY, Chase MW, Knapp S, Leitch LJ, Leitch AR, Fajkus J (2003). 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.

Vaio M (2012). Relações filogenéticas e evolução cromossômica em espécies do gênero *Oxalis* (oxalidaceae). Tese (Doutorado em Biologia vegetal) – Programa de Pós-graduação em Biologia vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Wessler SR (2006). Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes  
*PNAS* 103 (47): 17600-17601.

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet.* 8(12):973- 82.

Yuyama PM, Pereira LF, dos Santos TB, Sera T, Vilas-Boas LA, Lopes FR, Carareto CM, Vanzela AL (2012). FISH using a gag-like fragment probe reveals a common Ty3- gypsy-like retrotransposon in genome of *Coffea* species. *Genome* 55(12):825-833.

