

ADRIANA BUARQUE MARCON

CITOTAXONOMIA DE PTERIDÓFITAS
HETEROSPORADAS OCORRENTES NO NORDESTE
BRASILEIRO

RECIFE

SETEMBRO / 2004

ADRIANA BUARQUE MARCON

CITOTAXONOMIA DE PTERIDÓFITAS
HETEROSPORADAS OCORRENTES NO NORDESTE
BRASILEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Vegetal da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos necessários
para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Vegetal

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Guerra

CO-ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Iva Carneiro Leão Barros

Recife

Setembro / 2004

ATA DA PROVA PÚBLICA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA **ADRIANA BUARQUE MARCON** DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Às quatorze horas e vinte minutos, do dia três de setembro de dois mil e quatro, na sala de aula teórica do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, realizou-se a prova pública da defesa de tese da Doutoranda **ADRIANA BUARQUE MARCON**, intitulada: **"CITOTAXONOMIA DE PTERIDÓFITAS HETEROSPORADAS OCORRENTES NO NORDESTE BRASILEIRO"**. Presentes professores, alunos e convidados. A Banca Examinadora teve como membros titulares os professores: Dr. **MARCELO GUERRA**, Professor do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, Doutor em Botânica pela Universidade de Viena, e orientador da aluna; Dra. **ANA CHRISTINA BRASILEIRO VIDAL**, Pesquisadora do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco, Dra. **ANA MARIA BENKO ISEPPON**, Professora do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Ciências Naturais, pela Universidade de Viena. Dr. **MARCCUS ALVES** Professor do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Pernambuco, Doutor Botânica, pela Universidade Estadual de São Paulo, e o Dr. **NATONIEL FRANKLIN DE MELO**, Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Doutor em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco. A Banca Examinadora teve como Membros Suplentes o Dr. **REGINALDO DE CARVALHO**, Professor da Universidade Federal Rural de Pernambuco, e a Dra. **IVA CARNEIRO LEÃO BARROS**, da Universidade Federal de Pernambuco. A Doutora **IVA CARNEIRO LEÃO BARROS**, na qualidade de Coordenadora do Programa, iniciou a sessão apresentando a Banca Examinadora, e em seguida passou a palavra para a aluna para fazer a exposição do seu trabalho. A seguir passou a palavra para o Dr. **MARCELO GUERRA**, que, na qualidade de orientador da aluna, dirigiu os trabalhos. Após a apresentação da aluna, o Dr. **MARCELO GUERRA** convidou a Banca para fazer a arguição na forma de diálogo, na seguinte ordem: Dra. **ANA CHRISTINA BRASILEIRO VIDAL** (1º EXAMINADOR), Dr. **NATONIEL FRANKLIN DE MELO** (2º EXAMINADOR); Dra. **ANA MARIA BENKO ISEPPON** (3º EXAMINADOR), e Dr. **MARCCUS ALVES** (4º EXAMINADOR). Logo após o término das arguições, o Dr. **MARCELO GUERRA** teceu agradecimentos aos membros da banca pelas sugestões, fez alguns comentários sobre o trabalho de sua orientanda e em seguida solicitou aos presentes que se retirassem por alguns instantes para que se procedesse a avaliação da Doutoranda. Retomando os trabalhos, o Professor **MARCELO GUERRA** comunicou que a Banca Examinadora atribuiu a Doutoranda **ADRIANA BUARQUE MARCON**, a seguinte menção: **"APROVADA"**, por unanimidade, e face a este resultado a mesma está apta a receber o grau de Doutora em Biologia Vegetal pela Universidade Federal de Pernambuco. Em seguida o Professor **MARCELO GUERRA** passou a palavra a Doutoranda que fez comentários sobre seu trabalho, agradeceu ao Curso e aos presentes. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada, às dezoito horas e quinze minutos, e para constar como Secretária, EU, **GIOVANNA DE LIMA GUTERRES**, lavrei, datei e assinei esta ATA, que também assinam os demais presentes.

Recife, 03 de setembro de 2004.

Giovanna de Lima Guterres

Marcelo Guerra

Ana Iseppon

Marccus Alves

Nataniel Franklin de Melo

Ana Christina Brasileiro Vidal

Iva Carneiro Leão Barros

Socor Souza da Mota

Roberta Rodrigues de Sousa

Adriana Buarque Marcon

Juliana Araújo

Iva Carneiro Leão Barros

Marcelo Guerra

Raquel A. Pedrosa

Roberta Rodrigues de Sousa

Socor Souza da Mota

Roberta Rodrigues de Sousa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Vegetal

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA VEGETAL
Portaria nº 2.530/02-MEC
UFPE em 04/09/02 - DOU em 06/09/02

Hildebrando Manoel da Silva
Assistente em Administração do Programa
De Pós-Graduação em Biologia Vegetal
SIAPE 1131683

CONFERE COM O ORIGINAL
Em 03/09/05

Aos meus pais, Gothardo e Vera e aos
meus irmãos, Juliana e Cristiano,

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, pela permissão do uso de suas dependências.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, nas pessoas de Kátia Porto, Iva Carneiro Leão Barros e Marccus Alves, ex-coordenadora, coordenadora e vice-coordenador, respectivamente, e aos secretários Hildebrando e Giovanna.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão de minha bolsa de estudo (CNPq) e pelo suporte financeiro concedido para o desenvolvimento do projeto.

Ao Herbário UFP, nas pessoas de Marlene Barbosa e João Paulo de Almeida, pela atenção e ajuda que recebi.

Ao meu orientador, Marcelo Guerra, pelos ensinamentos passados ao longo destes seis anos, tempo em que concluí meu mestrado e doutorado. Neste período tive a oportunidade não só de adquirir conhecimentos, mas também um amadurecimento pessoal. Recebi ensinamentos que certamente levarei como exemplo e que farão parte do meu futuro profissional.

A Iva Carneiro Leão Barros, minha co-orientadora, pela sua disponibilidade em nos ajudar e pelo reconhecimento da importância de nossa pesquisa, que foram muito importantes ao longo destes anos.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética Vegetal, aqueles que apenas “passaram” pelo laboratório, que já saíram, e aqueles que ainda estão junto comigo todos os dias, Ana Christina, Ana Emília, Ana Paula, André Vanzela, André Ferraz, Andrea, Andreza, Ane, Maria Betânia, Cícero, Ivan, Ivanildo, Jarbas, Juliano, Leonardo, Lia, Luzia, Magdalena, Nataniel, Paulo, Regina, Reginaldo e Roberta, eu gostaria de agradecer a ajuda que recebi diretamente e indiretamente no desenvolvimento do meu projeto e os momentos de descontração que tivemos dentro e fora do laboratório.

Agradeço a todos do Laboratório de Pteridófitas, em especial a Augusto, Marcelo, Sérgio e Márcio, com quem viajei algumas vezes para fazer coletas e que outras vezes tiveram a gentileza de trazer do campo, espécies que foram utilizadas no meu trabalho.

A André Vanzela, pela orientação, atenção e ajuda constantes que recebi no início de meu trabalho com citogenética de pteridófitas.

A Leonardo Pessoa Felix, Juliano Cabral e Reginaldo de Carvalho, pela presteza em me trazer material do campo.

A Andrea Pedrosa-Harand, de quem recebi um direcionamento muito importante para o andamento do trabalho, a Ana Christina Brasileiro Vidal, com quem várias vezes pude conversar para tirar minhas dúvidas e pedir opiniões e a Nataniel Franklin de Melo, que gentilmente me acompanhou em algumas etapas iniciais do projeto.

Agradeço a todos os colegas da pós-graduação, em especial a Lia, Beta, Luciana, Valdeline, Shirley, Flávia, Jaciane e Tatiana, pelos poucos, mas divertidos e descontraídos momentos de conversa.

Quero também deixar meus agradecimentos a Flávia Carolina Lins da Silva, Tatiana Gibertoni e Ariadna Lopes, com quem pude contar em determinadas fases do projeto.

A Carlos Eduardo Everton Machado (UFMA) e Carlos Rodrigo Lehn (UNISINOS), que tiveram a gentileza de enviar material para meu trabalho.

Aos meus pais Gothardo e Vera, que nunca mediram esforços para investir em minha educação, colocando-a sempre em primeiro lugar, me dando a oportunidade de ser e fazer o que gosto. Neles, tenho o exemplo de amor e dedicação. Agradeço ainda aos meus irmãos Juliana e Cristiano e a toda minha família que me acompanharam e “precisaram” entender minha ausência em alguns momentos.

Ao meu amor Marcos Bruno, que me faz sentir a pessoa mais especial do mundo e que mesmo estando geograficamente longe, me faz senti-lo tão pertinho de mim...

A Deus, que cuida de mim, colocando as pessoas certas na minha vida...

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos...

Meu “**Muito Obrigada**” a todos....

SUMÁRIO

Lista de figuras e tabelas.....	vii
1 Introdução.....	9
2 Fundamentação Teórica	
2.1 Origem e Distribuição das Pteridófitas.....	11
2.2 Classificação Taxonômica das Pteridófitas.....	12
2.3 Características Morfológicas Principais.....	13
2.4 O Ciclo Reprodutivo.....	14
2.5 Formas de Reprodução.....	15
2.6 Citogenética de Pteridófitas	
2.6.1 A variação de números cromossômicos.....	17
2.6.2 Variações na morfologia cromossômica.....	20
2.6.3 Estrutura do núcleo interfásico.....	21
2.7 Técnicas Citogenéticas Aplicadas na Citotaxonomia	
2.7.1 Bandeamento C	22
2.7.2 Bandeamento com fluorocromos.....	24
2.7.3 Hibridização <i>in situ</i>	25
2.7.4 Coloração com nitrato de prata.....	28
2.7.5 Imunolocalização da histona H3 fosforilada.....	29
3 Referências Bibliográficas.....	31
4 Manuscritos	
4.1 Manuscrito 1: Variação no número cromossômico, bandas CMA e sítios de DNAr 45S em espécies de <i>Selaginella</i> P. Beauv. (Pteridophyta).....	42
4.2 Manuscrito 2 Citogenética molecular de pteridófitas I. Distribuição das bandas heterocromáticas, sítios de DNAr e DNA telomérico em relação a outros parâmetros cariológicos.....	62
4.3 Manuscrito 3 Citogenética molecular de pteridófitas II. Padrão de fosforilação da histona H3.....	92
5 Conclusões.....	106
6 Resumo.....	108
7 Abstract.....	110
8 Anexos	
8.1 Normas de envio de manuscrito à revista <i>Annals of Botany</i>	114
8.3 Normas de envio de manuscrito à revista <i>Plant Cell Reports</i>	125
8.2 Normas de envio de manuscrito à revista <i>Plant Systematics and Evolution</i>	131

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Manuscrito 1

Pág

Tabela 1

Espécies analisadas de *Selaginella*, com seus respectivos números de registro em herbário, locais de coleta, números cromossômicos e contagens prévias. Todas as amostras foram coletadas no estado de Pernambuco (Brasil), exceto *S. plana*, que foi coletada no estado do Rio de Janeiro (Brasil)..... 58

Tabela 2

Variação no número de cromossomos, sítios de DNAr 45S e número de nucléolos por núcleo em quatro espécies de *Selaginella*..... 58

Figura 1

Complemento cromossômico (A–G), núcleos interfásicos (H e I), e número de RONS e nucléolos (J–L) observados em espécies de *Selaginella*. A, *S. willdenowii* (2n=18) com dois satélites (setas); B, *Selaginella* sp. (2n=18) com três satélites (setas); C, *S. simplex* (2n=18); D, *S. muscosa* (2n=18); E, *S. plana* (2n=20); F, *S. producta* (2n=20); G, *S. convoluta* (2n=24); H e I, núcleos interfásicos cromocêntricos de *S. plana* e *S. willdenowii*, respectivamente; J, célula prometafásica mostrando as RONS (setas); K e L, células prometafásicas mostrando cromossomos associados aos nucléolos (setas) em *S. plana* (K) e *S. convoluta* (L). Barra em A corresponde a 5 μ m..... 59

Figura 2

Distribuição das bandas CMA/DAPI e sítios de DNAr 45S em espécies de *Selaginella*. *Selaginella willdenowii* (A e B) e *S. convoluta* (D e E), coradas com CMA (A e D) e DAPI (B e E), respectivamente. Setas indicam as bandas CMA⁺/DAPI⁻. Sítios de DNAr 45S (C e F–L) em *S. willdenowii* (C), *S. convoluta* (F), em duas populações de *S. producta* (G e J), e em duas populações de *S. plana* (H e I); núcleo interfásico de *S. producta* (K), mostrando os dois sítios de DNAr 45S e de *S. plana* (L), mostrando até 10 sítios. Barra em L corresponde a 5 μ m..... 60

Manuscrito 2

Tabela 1

Espécies analisadas no presente trabalho, com local de coleta, números cromossômicos observados e contagens cromossômicas prévias. Todas as espécies foram coletadas em estados brasileiros, exceto *Marsilea quadrifolia*, procedente de Portugal, e *Azolla filiculoides*, procedente da Espanha..... 86

Tabela 2

Localização das bandas CMA⁺ e sítios de DNAr nas espécies investigadas..... 87

Figura 1

a–g Coloração convencional mostrando metáfases mitóticas; **h, i** núcleos interfásicos. **a** *Salvinia auriculata*, 2n=45. **b** *Azolla microphylla*, 2n=44. **c** *A.*

caroliniana, 2n=44. **d** *A. filiculoides*, 2n=44. **e** *Marsilea deflexa*, 2n=40. **f** *M. quadrifolia*, 2n=40. **g** *Isoetes panamensis*, 2n=44. **h** núcleos interfásicos reticulados em *S. auriculata*. **i** núcleos semi-reticulados em *M. quadrifolia*. Note em **d**, detalhe dos núcleos interfásicos arreticulados em *A. caroliniana*. Setas apontam satélites. Barra corresponde a 10 µm..... 88

Figura 2

a-n Tríplice coloração CMA/DA/DAPI. **a, b** *Marsilea deflexa*. **c, d** *Salvinia auriculata*. **e, f** *Marsilea quadrifolia*. **g, h** *Salvinia minima*. **i, j** *Regnellidium diphyllum*. **k, n** *Isoetes panamensis*. **l, m** *Isoetes bistris*. Figuras **d, j** mostram imagens com DAPI e CMA sobrepostas; **a, c, e, g, i, k, l** coloração DAPI; **b, f, h, m, n** coloração CMA. Cabeças de seta em **d** mostram bandas CMA⁺ intercalares no braço longo de um par cromossômico e em **c** mostram a banda DAPI; em **b, f** mostram pequenas bandas CMA⁺ intercalares e em **m** mostra um cromossomo com duas bandas CMA⁺ terminais. Setas em **c, e, g, k, m** apontam bandas CMA⁺ terminais. Asterisco em **b** mostra o único cromossomo do conjunto com uma banda CMA⁺ terminal mais forte que os demais e, em **f** mostra o par cromossômico com duas bandas CMA⁺ (uma terminal e outra intercalar). Barra corresponde a 10 µm..... 89

Figura 3

a-h Hibridização *in situ* com as sondas de DNAr 45S; **i, j** hibridização *in situ* com sequência de DNA telomérico TTTAGGG. **a, b** Sítios de DNAr 45S em *Salvinia auriculata*. **c, d** *Isoetes panamensis*. **e, f** *Isoetes bistris*. **g, h** *Marsilea deflexa*. **i, j** marcação telomérica em *Selaginella willdenowii*. Figuras **b, d, h, j** mostram imagens com DAPI e TRITC sobrepostas; figura **f** mostra imagem com DAPI e FITC sobrepostas. **a, c, e, g, i** Coloração DAPI. Setas apontam sítios de DNAr 45S menores e mais fracos. Cabeças de seta em **h** apontam par cromossômico com dois sítios de DNAr 45S terminais. Barra corresponde a 10 µm..... 90

Manuscrito 3

Figura 1

Imunocoloração para detecção da H3 fosforilada em células mitóticas (**a-q**) e meióticas (**r e s**) de espécies de pteridófitas. **a – f**, *Acrostichum danaeifolium*; **g – i**, *Regnellidium diphyllum*; **j – o**, *Selaginella willdenowii*; **p e q**, *Marsilea deflexa*, mostrando marcação na região pericentromérica dos cromossomos corados com FITC (**b, e, h, k, n, q e s**). Note nestas células, uma leve marcação ao longo dos cromossomos. Células em **a, d, g, j, m, p e r** estão coradas com DAPI e em **c, f, i, l e o** mostram sobreposição DAPI/FITC. Seta em **a** mostra com detalhe a região centromérica, apontando em **c** a marcação referente à fosforilação nessa região. Setas em **r** mostram uma marcação um pouco mais forte na região centromérica. Barra representa 10 µm..... 105

1 INTRODUÇÃO

As pteridófitas heterosporadas se caracterizam por produzirem dois tipos de esporos que originam gametófitos masculinos e femininos separados. As pteridófitas homosporadas, no entanto, desenvolvem esporos de um só tipo que dão origem a gametófitos bissexuais. Sete gêneros fazem parte do grupo das heterosporadas: *Isoetes*, *Marsilea*, *Pilularia*, *Regnellidium*, *Salvinia*, *Azolla* e *Selaginella*, sendo este último o que possui maior número de espécies. *Regnellidium* (Marsileaceae) é um gênero monotípico exclusivamente americano, representado no Brasil somente na região Sul. No nordeste brasileiro, alguns trabalhos de florística apontam a existência de cinco gêneros heterosporados: *Isoetes*, *Marsilea*, *Salvinia*, *Azolla* e *Selaginella*.

A poliploidia e a hibridização são eventos importantes na evolução das espécies de pteridófitas, sendo predominantes nas pteridófitas homosporadas. A poliploidia é claramente observada através das séries de números cromossômicos destas espécies, onde, em geral, os números básicos variam de $x=22$ a $x=60$. Entretanto, estes eventos não parecem predominar entre as pteridófitas heterosporadas, em vista dos números cromossômicos mais baixos. Entre estes gêneros heterosporados, por exemplo, observa-se a seguinte variação: *Selaginella*, $2n=14$ a $2n=60$; *Isoetes*, $2n=20$ a $2n=132$, *Marsilea*, $2n=40$ a $2n=60$, *Regnellidium*, $2n=38, 40$, *Salvinia*, $2n=18$ a $2n=63$ e *Azolla*, $2n=44$ a $2n=88$. Poucos são os registros sobre padrão de heterocromatina e número de sítios de DNAr 45S para pteridófitas, restringindo-se a três espécies do grupo das homosporadas. Ao contrário ocorre com as angiospermas e gimnospermas, nas quais o conhecimento citogenético tem auxiliado na compreensão do caminho evolutivo de suas espécies.

A grande maioria dos trabalhos de citogenética em pteridófitas se restringe a dados sobre número e morfologia cromossômica. Com a finalidade de conhecer melhor e procurar compreender a citotaxonomia do grupo, procurou-se investigar citogeneticamente representantes de pteridófitas heterosporadas e, com isso, compará-las com o que se conhece sobre as pteridófitas homosporadas e ainda com as angiospermas e gimnospermas. Para isso, foram analisados os números cromossômicos, com os objetivos de compará-los dados já existentes na literatura, observando a presença e frequência de poliploidia e obtendo contagens inéditas para algumas espécies. Foi também analisada a distribuição de heterocromatina nestas espécies, através da coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), bem como o número e a localização dos sítios de DNAr 45S, através da hibridização *in situ*. A presença da sequência telomérica (TTTAGGG)_n observada em angiospermas e gimnospermas foi também verificada em um representante do grupo. Adicionalmente, com o propósito de conhecer o padrão de fosforilação da histona H3 em pteridófitas, foi feita a imunocoloração para a detecção da histona H3 fosforilada em representantes de pteridófitas homosporadas e heterosporadas, com o objetivo de compará-lo ao padrão já observado em angiospermas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO DAS PTERIDÓFITAS

O período Devoniano superior marcou o nascimento de toda a flora vascular que existe hoje. Caracterizou-se pela colisão das massas continentais, sendo grande parte da flora, originada em clima equatorial, surgindo, nesse período, as primeiras plantas vasculares conhecidas. No período Carbonífero, a elevação das temperaturas da Terra, que teve como consequência o derretimento das calotas polares, e o aumento do nível do mar criaram um ambiente ideal para que as pteridófitas se estendessem por todo o ambiente terrestre (SPORNE, 1975; SALVO, 1990).

As pteridófitas distribuem-se principalmente em locais de clima tropical e subtropical. A maior diversidade ocorre nas Américas com cerca de 2.250 espécies, a maioria nos trópicos, seguida da Ásia (Sudeste) e Malásia, com cerca de 4.500 espécies. As quatro regiões com maior diversificação são as Antilhas (cerca de 900 espécies), o México e a América Central (cerca de 900 espécies), região dos Andes (cerca de 1.500 espécies) e Sudeste do Brasil (cerca de 600 espécies) (TRYON; TRYON, 1982).

No Brasil, de acordo com trabalhos florísticos realizados, a região Centro-Oeste conta com cerca de 300 espécies de pteridófitas, a região Sul com 550 espécies, a região Sudeste, pelas estimativas, apresenta cerca de 350 espécies, embora deva apresentar uma flora mais rica com 600 espécies, enquanto a região Nordeste é representante de uma flora pteridofítica de 300 espécies (BARROS; SYLVESTRE, 1999).

As pteridófitas raramente são dominantes em uma vegetação, sendo muito dependentes das outras plantas que fornecem condições para que elas se desenvolvam.

Precisam de condições hídricas ótimas, onde a geração gametofítica se desenvolva e o esporófito se estabeleça (HOLTTUM, 1947). Pode apresentar diferentes formas de vida como consequência da adaptação a diferentes ambientes. Muitas espécies se caracterizam por serem terrícolas, escandentes, epífitas, rupícolas e hidrófilas, estas necessitando de bastante umidade e luz. Algumas espécies são adaptadas a viverem em mangues, enquanto outras, são próprias de regiões serranas (BOWER, 1963; HOLTTUM, 1947).

2.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS PTERIDÓFITAS

No sistema de classificação mais recente (KRAMER; GREEN, 1990), as pteridófitas estão divididas em Psilotatae, Lycopodiatae, Equisetatae e Filicatae. Em Psilotatae estão posicionados os representantes mais primitivos, encontrando-se uma única família, Psilotaceae. Em Lycopodiatae estão as famílias Lycopodiaceae, Selaginellaceae e Isoetaceae. Equisetatae tem apenas a família Equisetaceae e a divisão Filicatae é a que possui maior representatividade, apresentando 33 famílias. Em um sistema de classificação anterior, Tryon e Tryon (1982) mantiveram três classes na divisão do grupo: Filicopsida, Equisetopsida e Lycopodiopsida. Baseados em dados morfológicos, citológicos, anatômicos e palinológicos os autores consideraram Lycopodiopsida como a classe mais evoluída dentro das divisões das pteridófitas.

Morfologicamente, os dois gêneros da família Psilotaceae, *Psilotum* e *Tmesipteris*, apresentam uma certa relação com espécies já extintas pertencentes às divisões Rhyniophyta, Zosterophyllophyta e Trimerophytophyta, sendo por isso considerados os gêneros mais primitivos. Do mesmo modo, *Selaginella* e *Lycopodium* apresentam características similares aos representantes da divisão fóssil Microphylllophyta. *Equisetum* é o único gênero vivente da

divisão Arthrophyta, que também teve sua origem no período Devoniano. A única divisão atual do grupo das pteridófitas que apresenta indivíduos fósseis e viventes atuais é a Filicatae (BOLD, 1973; SALVO, 1990).

Em trabalhos de filogenia baseados em seqüências de DNA, *Psilotum*, conhecido como um representante primitivo das pteridófitas, apresenta uma posição diferente dentro do grupo. Na análise dos genes *rbcL* e *atpB* (WOLF, 1997), espécies de Psilotaceae encontraram-se posicionadas junto a Ophioglossaceae, reunindo espécies eusporangiadas pertencente à divisão Filicatae. Isto também foi evidenciado por Duff e Nickrent (1999), quando analisaram uma seqüência parcial do DNAr mitocondrial 19S. As Lycopodiatae nessas análises geralmente mostram concordância nos resultados, aparecendo como um clado separado, posicionando-se na base das demais plantas vasculares (DUFF; NICKRENT, 1999; PRYER *et al.*, 2001). *Equisetum* é um outro gênero que apresenta posição controversa dentro das pteridófitas. Em alguns estudos, o gênero se posicionou na base de todas as outras plantas vasculares (WOLF, 1997), e em outros, mostrou-se pertencente à grande divisão das Filicatae (DUFF; NICKRENT, 1999; PRYER *et al.*, 2001).

2.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS PRINCIPAIS

As pteridófitas atuais e mais evoluídas apresentam morfologia diferenciada em rizoma, raiz, haste e folhas. As primeiras plantas vasculares não apresentavam essa diferenciação clara. *Psilotum* (Psilotatae), por exemplo, mostra características consideradas muito primitivas, como a ausência de raízes, substituídas por um rizoma provido de pelos, com a função de absorção. A parte aérea é representada por uma haste com folhas

diferenciadas em enações (expansões epidérmicas) e os esporos localizados em uma estrutura denominada sinângio, formada por esporângios (estrutura que reúne os esporos) reunidos, dispostos na parte superior da haste (SALVO, 1990).

As Lycopodiatae (*Lycopodium*, *Lycopodiella*, *Huperzia*, *Phylloglossum*, *Selaginella* e *Isoetes*), entretanto, já apresentam em determinados grupos, raízes que emergem de estruturas denominadas rizóforos. Têm folhas denominadas micrófilas, por serem de pequenas dimensões, possuírem apenas um único feixe vascular da base até o ápice e esporângios reunidos em estruturas denominadas estróbilos, localizados na extremidade dos ramos aéreos. As folhas de *Isoetes*, apesar de serem longas, também são consideradas micrófilas, devido à presença de um único feixe vascular. Este apresenta um caule subterrâneo (cormo) e os esporângios são localizados na base das micrófilas (RAVEN *et al.*, 2001).

As Equisetatae (*Equisetum*) apresentam rizoma, raízes, micrófilas e esporos também reunidos em estróbilos. O grande grupo das samambaias verdadeiras (Filicatae) é o grupo mais diversificado. Apresentam rizoma, raízes e frondes (megáfilos) que mostram uma grande variedade no tamanho e na forma, dependendo da espécie. Os esporângios podem unir-se para formar os sinângios, ou mais freqüentemente, podem estar associados em estruturas denominadas soros, localizados nas folhas (BOWER, 1963; SPORNE, 1975; SALVO, 1990; RAVEN *et al.*, 2001).

2.4 O CICLO REPRODUTIVO

No ciclo de vida das pteridófitas, a fase dominante, ou seja, a mais duradoura é a fase esporofítica (2n), que é, em parte, nutricionalmente dependente do gametófito, além de ser mais complexa morfológica e anatomicamente. O esporófito é organizado em raiz, ramos e

folhas e apresenta grande desenvolvimento dos tecidos condutores (xilema e floema). A fase gametofítica (n) é mais curta e independente nutricionalmente. O gametófito varia um pouco de tamanho e morfologia, podendo ser filamentar, tuberoso (frequentemente subterrâneo) ou cordiforme (SALVO, 1990).

Em relação aos tipos de esporos produzidos, as pteridófitas podem ser homosporadas ou heterosporadas. A homosporia é um caráter dominante no grupo, caracterizado pela formação de esporos iguais e de mesmo tamanho. Após a germinação, esses esporos produzem somente gametófitos bissexuados, que dão origem ao anterídeo (órgão formador do gameta masculino) e ao arquegônio (órgão formador do gameta feminino) (RAVEN *et al.*, 2001).

Entre os gêneros atuais, a heterosporia aparece somente em sete gêneros (*Isoetes*, *Selaginella*, *Salvinia*, *Azolla*, *Marsilea*, *Pillularia* e *Regnellidium*). As plantas desse grupo produzem esporos de tamanhos e funções diferentes. Os esporos, denominados micrósporos e megásporos, dão origem aos gametófitos masculinos e femininos, respectivamente (KLEKOWSKI, 1979).

2.5 FORMAS DE REPRODUÇÃO

As pteridófitas podem se reproduzir por autofecundação ou fecundação cruzada podendo haver fecundação intragametofítica, intergametofítica ou cruzamento intergametofítico. A fecundação intragametofítica (autofecundação) ocorre quando há fusão dos gametas masculino e feminino oriundos do mesmo gametófito. Na fecundação intergametofítica ocorre fusão dos gametas masculino e feminino entre diferentes gametófitos, sendo estes pertencentes ao mesmo indivíduo. E no cruzamento intergametofítico ocorre

fusão dos gametas masculino e feminino entre diferentes gametófitos, pertencentes a indivíduos diferentes (ver KLEKOWSKI, 1979).

A alternância de gerações do ciclo de vida coincide com a alternância das fases cromossômicas, de modo que a meiose por uma parte, e a fecundação, por outra, parecem determinar o caráter gametofítico e o esporofítico. No entanto, essa coincidência pode não ocorrer nos casos em que a meiose ou a fecundação é suprimida (SALVO, 1990). Essa alternância de gerações pode ser modificada temporariamente, por mecanismos de reprodução assexuada conhecidos como aposporia, apogamia ou apomixia, sendo este último, um processo muito significante na especiação (WALKER, 1984).

Na aposporia, o desenvolvimento do gametófito ocorre diretamente a partir do esporófito sem que haja a produção de esporos, sendo a meiose, nesse caso, suprimida. O gametófito tem o mesmo número cromossômico ($2n$) do esporófito, portanto, se ocorrer uma fecundação intragametofítica, resultará num esporófito com número cromossômico duplicado ($4n$). Na apogamia há o desenvolvimento do esporófito a partir do gametófito sem que haja produção de gametas, portanto, sem fecundação. A causa desse fenômeno pode ser genética, como no caso de espécies obrigatoriamente apogâmicas. Pode também ser causada pela ausência da fertilização, onde um dos fatores pode ser a ausência de água, necessária para que os anterozóides realizem a fecundação. O esporófito produzido através desse processo, possui o mesmo número cromossômico (n) do gametófito (WALKER, 1984; SALVO, 1990).

A apomixia, ao contrário da natureza ocasional e esporádica da aposporia e da apogamia, é caracterizada por repetir-se de geração em geração e por ser um tipo de reprodução regular de muitas samambaias (WALKER, 1979). Nesse processo, há alternância das gerações, mas não há alternância citológica, pois esporófito e gametófito apresentam o mesmo número cromossômico. No processo de formação do esporo, pode ocorrer um erro na divisão mitótica ou meiótica, que resultará num gametófito com o mesmo número

cromossômico do esporófito. Evidências indicam que esse processo é controlado por mecanismos genéticos. Espécies de reprodução apomíticas são conhecidas por apresentarem distribuição geográfica maior que seus parentes de reprodução sexual. A germinação dos esporos geralmente é mais rápida que nas espécies geradas sexualmente, podendo essa ocorrência estar relacionada à não dependência da água para a fertilização, o que pode ser considerado uma adaptação aos habitats mais secos (WALKER, 1979, 1984).

Pode ainda ocorrer apomixia vegetativa em muitas espécies através de gemas, estolões ou raízes, como um reforço à produção normal por esporos. A reprodução vegetativa permite o rápido aumento dos genótipos favoráveis em uma invasão e colonização de novos habitats. Permite ainda, a reprodução de híbridos estéreis até que a duplicação do número cromossômico possa ocorrer e torná-los férteis (LOVIS, 1977; WALKER, 1984).

2.6 CITOGENÉTICA DE PTERIDÓFITAS

2.6.1 *A variação de números cromossômicos*

A poliploidia é um processo evolutivo bastante observado entre as pteridófitas. Cerca de 95% das espécies de pteridófitas são consideradas poliplóides em vista dos altos números cromossômicos e altos números básicos observados nas espécies atuais (LEITCH; BENNETT, 1997). Essas espécies são geralmente consideradas paleopoliplóides ou neopoliplóides. Os paleopoliplóides são poliplóides antigos que não coexistem com possíveis ancestrais ou parentes diplóides. Os neopoliplóides são poliplóides surgidos recentemente na história evolutiva do grupo, que se caracterizam por apresentar parentes próximos (espécies ou citótipos) diplóides (GUERRA, 2000). Os números básicos $x=5, 7, 9, 10, 11, 13$ e 15

foram sugeridos como sendo os prováveis números básicos ancestrais das samambaias, que através de poliploidias e disploidias teriam evoluído até os números básicos atualmente conhecidos (LOVIS, 1977).

As pteridófitas homosporadas, ao contrário das heterosporadas, são consideradas espécies paleopoliplóides, por apresentarem números básicos atuais mais altos. Isto pode ser observado quando se compara as médias dos números básicos nos dois grupos, sendo $x=37,5$ nas homosporadas e $x=12,7$ nas heterosporadas, o que mostra uma maior incidência de poliploidia naquele grupo (WALKER, 1984). Essa origem paleopoliplóide pode ser compreendida quando se observa o número cromossômico diplóide nestes indivíduos. Na família Pteridaceae isto é evidente nos gêneros *Pteris*, $2n=58$ (KAWAKAMI, 1971; CHANG; SHIEH; TSAI, 1992); *Dennstaedtia*, $2n=60$; *Microlepia*, $2n=84$; *Sphenomeris*, $2n=96$; *Cheilantes*, $2n=90$ e 120 e em *Acrostichum* e *Adiantum*, $2n=60$ e 120 (KAWAKAMI, 1979, 1980; ROUX, 1993; BENKO-ISEPPON; DIAS, 2000; MARCON; BARROS; GUERRA, 2003a). Em Aspleniaceae observa-se em *Asplenium*, $2n=72$ (TATUNO; KAWAKAMI, 1969), e em Woodsiaceae, no gênero *Diplazium*, $2n=82$ (TAKAMIYA *et al.*, 2000, TAKAMIYA; OHTA, 2001).

Nas heterosporadas, a poliploidia parece não ser um evento predominante na evolução. Nestas, diferentemente das homosporadas, os megásporos e os micrósporos são produzidos independentemente. Portanto, dois eventos raros na natureza teriam que acontecer para a formação de um poliplóide: uma não-redução meiótica na formação do gameta feminino, devendo este ser fecundado por um gameta masculino haplóide normal, originando um triplóide. Posteriormente, outra não-redução meiótica ocorreria nesse triplóide, na formação do gameta feminino, e a fecundação com um gameta masculino haplóide normal originaria um tetraplóide (WALKER, 1984).

Na série de números cromossômicos de espécies heterosporadas percebem-se números menores quando comparado com as homosporadas, entretanto, triplóides, tetraplóides, pentaplóides e outros níveis de ploidia mais altos também são observados. *Selaginella*, por exemplo, apresenta a série $2n=16, 18, 20 (2x), 30 (3x), 32, 36, 40 (4x), 50 (5x)$ e $60 (6x)$ (KURIACHAN, 1963; JERMY; JONES; COLDEN, 1967; TAKAMIYA, 1993; MUKHOPADHYAY; GOSWAMI, 1996). No gênero *Azolla* já foram reportados os números $2n=44 (2x), 52, 66 (3x)$ e $88 (4x)$ (STERGIANOU; FOWLER, 1990) e *Salvinia*, com $x=9$, mostrou os números $2n=18 (2x), 45 (5x), 54 (6x)$ e $63 (7x)$ (TATUNO; TAKEI, 1969; 1970; SCHNELLER, 1980; 1981). *Isoetes* está, entre os gêneros heterosporados, como o que mais apresenta poliplóides, atingindo o nível dodecaplóide. Os indivíduos diplóides desse gênero apresentam $2n=22$, e os poliplóides mostram números múltiplos de 10 ou 11, considerados números básicos, chegando a indivíduos com $2n=132$ (KOTT; BRITTON, 1980; BRITTON; BRUNTON, 1992; HICKEY, 1984; TAKAMIYA, 1999).

A poliploidia pode também ser desencadeada como um mecanismo de sobrevivência de um híbrido recém-formado na natureza. A hibridização é um evento muito comum no grupo, sendo responsável pelo surgimento de novas espécies. Em determinados casos, a autofecundação é prevenida por mecanismos fisiológicos de incompatibilidade. Sendo assim, o gametófito pode produzir gametas masculinos antes da maturação do gameta feminino. Isso desencadearia a fecundação cruzada com indivíduos vizinhos, que no momento estivessem apresentando o gameta feminino maduro (MANTON, 1961). Esse processo pode então, formar espécies híbridas não férteis, que se reproduzem geralmente por apomixia vegetativa, até que esses híbridos cheguem à fertilidade, seja por seleção natural ou por duplicação do conjunto cromossômico (WALKER, 1984). Desse modo, estes poliplóides se estabilizam como espécies e começam a se propagar, muitas vezes, apresentando uma amplitude geográfica maior que a de seus parentais (CUBAS, 1990).

Estudos com o gênero *Isoetes* no Nordeste da América do Norte documentam ocorrência de híbridos interespecíficos e a presença de espécies poliplóides indicando que a especiação aloploplóide tem sido importante na evolução do gênero (HICKEY; TAYLOR; LUEBKE, 1989). As espécies terrestres de *Isoetes* geralmente são diplóides e raramente hibridizam, ao contrário das aquáticas, onde a hibridização entre espécies é decorrente dos eventos de dispersão de esporos através da água (TAYLOR; HICKEY, 1992). Como exemplo de espécies híbridas podemos apontar *I. x harveyi* ($2n=7x=77$) encontrada na América do Norte, onde os possíveis parentais são *I. macrospora* ($2n=10x=110$) e *I. tuckermanii* ($2n=4x=44$) (BRITTON, 1991). *Isoetes truncata* ($2n=5x=55$) também é um provável híbrido entre *I. maritima* ($2n=4x=44$) e *I. occidentalis* ($2n=6x=66$) (BRITTON; BRUNTON, 1993), observado através de análise morfológica, citológica e pela presença de esporos polimórficos, com grande quantidade de esporos abortivos. Morfologia intermediária e número cromossômico mostraram que *I. pantii* ($2n=46=44+2B$), em uma população da Índia aparentava ser um híbrido natural entre *I. coromandelina* ($2n=22+1$) e *I. sampathkumaini* ($2n=67$; $n=33+1$) (GOSWAMI, 2000).

2.6.2 Variações na morfologia cromossômica

É comum observar no cariótipo das pteridófitas um índice alto de cromossomos subtelocêntricos e telocêntricos (WALKER, 1984). Em várias espécies de Pteridaceae esse comportamento foi observado (KAWAKAMI, 1982). Em quatro espécies de *Pteris*, por exemplo, a morfologia do conjunto cromossômico mostrou variações, apresentando de 8,7 a 17,2% de cromossomos meta-submetacêntricos em relação a 82,8 a 91,4% de cromossomos subtelo-telocêntricos. Nesse mesmo estudo, três espécies de *Adiantum* mostraram 6,6-13,4% de cromossomos meta-submetacêntricos e 86,7-93,4% de cromossomos subtelo-telocêntricos. *Acrostichum aureum* apresentou 90% do cariótipo composto por cromossomos subtelo-

telocêntricos enquanto em *A. danaeifolium*, 87% do conjunto mostrou essa morfologia cromossômica (MARCON; BARROS; GUERRA, 2003a).

Nas espécies heterosporadas parece ocorrer um aumento no índice de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, algumas vezes em predominância nos conjuntos cromossômicos dessas espécies. Em *Salvinia molesta*, por exemplo, dos 45 cromossomos do conjunto, 29 mostraram ser metacêntricos e 14 submetacêntricos (KURIACHAN, 1979). Em *Selaginella*, espécies com $2n=16$ e $2n=32$ mostraram a relação 50% meta-submetacêntricos e 50% subtelo-telocêntricos; espécies com $2n=18$, 66% meta-submetacêntricos e 44% subtelo-telocêntricos e com $2n=20$ e $2n=30$, 60% meta-submetacêntricos e 40% subtelo-telocêntricos (TAKAMIYA, 1993). No conjunto cromossômico de *Regnellidium diphyllum* ($2n=38$) foi observada a fórmula cariotípica $8m+4sm+26st$, com 31% dos cromossomos sendo meta e submetacêntricos (KURIACHAN, 1994).

2.6.3 Estrutura do núcleo interfásico

O núcleo interfásico apresenta três componentes principais: a eucromatina difusa, a eucromatina condensada e a heterocromatina. Com base na proporção desta eucromatina condensada é que os núcleos podem ser classificados em reticulados, semi-reticulados e arreticulados (ver GUERRA, 1985). Nos arreticulados não é observada a eucromatina condensada, aparecendo somente os blocos de heterocromatina. Nos reticulados quase toda a eucromatina encontra-se condensada dificultando a visualização dos blocos heterocromáticos, enquanto que os semi-reticulados apresentam uma situação intermediária onde varia a proporção da eucromatina condensada.

O núcleo reticulado é bem característico nas pteridófitas homosporadas, observado na maioria das espécies (ver, por exemplo, MARCON; BARROS; GUERRA, 2003b). No gênero homosporado *Woodwardia* (Blechnaceae), Takamiya, Osato e Ono (1992) comentaram sobre

a uniformidade da cromatina corada nos núcleos interfásicos, o que podemos afirmar que se trata de núcleos do tipo reticulado. Esse resultado também foi observado em outro trabalho com espécies de *Lycopodium* (Lycopodiaceae), onde Takamiya (1992) se referiu a essa uniformidade dos grânulos cromoméricos nos núcleos interfásicos.

As heterosporadas, ao contrário, parecem apresentar uma variedade quanto ao tipo de núcleo interfásico, sendo os tipos semi-reticulado e arreticulado os mais comumente observados, como evidenciado em espécies de *Selaginella* por Takamiya (1993), e o reticulado encontrado, por exemplo, em espécies de *Salvinia* e *Isoetes* (MARCON; BARROS; GUERRA, em preparação).

2.7 TÉCNICAS CITOGENÉTICAS APLICADAS NA CITOTAXONOMIA

Apesar de bem estudadas citotaxonomicamente, quase toda a análise citogenética em pteridófitas tem sido feita estritamente com base nas técnicas de coloração cromossômica convencional. O conhecimento sobre o padrão de distribuição da heterocromatina, bem como sua evolução dentro do grupo, é praticamente nulo. Ao contrário, em angiospermas e gimnospermas, técnicas citogenéticas mais refinadas têm sido aplicadas objetivando um detalhamento maior ao nível de estrutura cromossômica. Dentre estas técnicas, podemos destacar o bandejamento C, bandejamento com fluorocromos, coloração com nitrato de prata, hibridização *in situ* e imunocoloração para a detecção da histona H3 fosforilada.

2.7.1 **Bandeamento C**

O cromossomo se distingue longitudinalmente em seqüências eucromáticas e heterocromáticas. Estas seqüências heterocromáticas apresentam um ciclo de condensação e

descondensação diferente da eucromatina e são formadas por seqüências repetitivas de DNA. Quando os cromossomos são submetidos a uma desnaturação e incubação em uma solução salina a alta temperatura e depois corados, são visualizadas, ao longo dos cromossomos, diversas bandas (denominadas bandas C, correspondente a heterocromatina constitutiva). A técnica se baseia no fato de que a heterocromatina constitutiva, no momento da renaturação (quando os cromossomos são submetidos à solução salina em alta temperatura) se renatura mais rápido e mais completamente que a eucromatina, corando mais fortemente (ver VOSA, 1985).

Os trabalhos com bandejamento C entre espécies próximas mostram padrões distintos destas bandas, o que pode ser útil no estudo de espécies afins, revelando pequenas diferenças com relação à estrutura heterocromáticas entre elas. Em seis espécies de *Sesbania* (Fabaceae), por exemplo, todas com $2n=12$, o bandejamento C revelou um padrão de distribuição bem diversificado. Tanto o número quanto a posição das bandas variou e, juntamente com dados morfológicos e de distribuição geográfica, o bandejamento contribuiu para a interpretação de que espécies com menor quantidade de heterocromatina apresentam uma condição primitiva dentro do gênero (FORNI-MARTINS; GUERRA, 1999).

Em *Capsicum*, o bandejamento C mostrou ser uma importante ferramenta na distinção entre as espécies, onde o cariótipo corado convencionalmente não mostra muitas diferenças. Os resultados mostraram significantes polimorfismos entre as espécies estudadas, tanto na quantidade quanto na distribuição da heterocromatina, o que resultou na proposição dos grupos I e II, incluindo táxons com baixa e alta quantidade de heterocromatina, respectivamente. Os dados obtidos com o bandejamento C corresponderam muito bem às afinidades e relações filogenéticas entre os táxons com base em estudos anteriores, o que demonstra a contribuição dessa técnica na relação evolutiva entre táxons (MOSCONE *et al.* 1993). Em *Pinus* (Gimnosperma), o bandejamento C foi aplicado em cinco espécies com

$2n=24$, pertencentes a dois subgêneros (*Strobis* e *Pinus*). O padrão de bandas C se mostrou único para cada espécie, além de separar muito bem os dois subgêneros pela presença de bandas centroméricas no subgênero *Pinus* ou ausência, no subgênero *Strobis*, (MCPHERSON; FILION, 1981).

2.7.2 **Bandeamento com fluorocromos**

Outra técnica utilizada na diferenciação longitudinal dos cromossomos é o bandejamento com fluorocromos. Em vegetais, os fluorocromos mais utilizados são a cromomicina A₃ (CMA), que cora seqüências do cromossomo ricas em guanina-citosina e o 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que cora seqüências ricas em adenina-timina (ver, por exemplo GUERRA, 2000). Entre as pteridófitas, tem-se conhecimento de apenas duas espécies analisadas através da coloração com fluorocromos, *Acrostichum aureum* e *A. danaeifolium* (MARCON; BARROS; GUERRA, 2003a). Estas espécies morfológicamente similares e simpátricas, mostraram diferenciação no número de bandas CMA⁺/DAPI⁻, sendo localizadas seis bandas em *A. aureum* e quatro em *A. danaeifolium*.

Em *Citrus*, o bandejamento com fluorocromos tem sido uma boa ferramenta não só na identificação de pares cromossômicos do cariótipo baseado na presença e posição dessas bandas, quanto na diferenciação entre espécies (ver GUERRA, 1993). Em *Pinus nigra*, a combinação entre as bandas CMA e DAPI auxiliou na identificação de cada um dos 24 cromossomos que compõem o cariótipo (HIZUME; OHGIKU; TANAKA, 1983). A quantidade e a distribuição das bandas CMA e DAPI também foram informativas no estudo com 15 amostras de espécies de *Capsicum* (MOSCONE; MATZKE; MATZKE, 1996) auxiliando na interpretação evolutiva do grupo.

2.7.3 *Hibridização in situ*

A aplicação da técnica de hibridização *in situ* na taxonomia permite identificar determinados cromossomos do conjunto, além de comparar espécies diferentes ao nível de organização do genoma, podendo indicar a presença de rearranjos recentes auxiliando no estudo evolutivo (ver HESLOP-HARRISON, 1994).

A técnica se baseia no isolamento de uma determinada seqüência de DNA, sua marcação com um fluorocromo e a hibridização desta molécula com o conjunto cromossômico da espécie que se deseja localizar esta seqüência. A seqüência de DNA marcada é chamada de sonda. Esta sonda é marcada geralmente com uma molécula marcadora (por exemplo, biotina e digoxigenina) para que se possa localizá-la nos cromossomos. Juntamente com esta sonda utiliza-se um anticorpo ligado a uma molécula sinalizadora (geralmente um fluorocromo) capaz de detectar a sonda. Desse modo, quando a sonda é colocada em contato com o conjunto cromossômico analisado será visualizada a sua exata localização no cromossomo (ver GUERRA, no prelo).

Para este fim, têm sido utilizadas com mais freqüência, as sondas de DNAr 45S e DNAr 5S e de seqüências centroméricas e teloméricas, que são seqüências repetitivas e evolutivamente estáveis. A localização destes sítios permite identificar determinados cromossomos dentro de um genoma possibilitando também interpretar sua evolução através da comparação de genomas de espécies próximas (revisado por BRASILEIRO-VIDAL; GUERRA, 2002).

Em cinco espécies de *Paeonia* (ZHANG; SANG, 1999), por exemplo, foi mapeado fisicamente o DNAr 45S através da hibridização *in situ*. Os conjuntos cromossômicos destas espécies diplóides ($2n=10$) se revelaram quase uniformes cariotipicamente, porém a localização física dessa seqüência mostrou que o número de sítios variou em cada uma das três seções do gênero. As espécies mostraram de seis a 10 sítios de DNAr 45S. Comparando

esse resultado com uma análise filogenética prévia, foi proposto que a evolução tenderia a um aumento do número de sítios, sendo a presença de seis sítios um caráter plesiomórfico, já que esse número foi observado em espécies das três seções.

Em *Passiflora*, a localização do DNAr 45S e 5S colaborou com a hipótese de $x=6$ ser o provável número básico ancestral do gênero, seguido dos números 9, 10 e 12. A variação no número desses sítios considerou $x=6$ como um número ancestral seguido de uma poliploidização que deu origem a espécies com $x=12$. A partir de $x=12$ haveria ocorrido uma série displóide com $x=10$ e $x=9$, explicando a redução do número de sítios de DNAr 45S e algumas vezes do DNAr 5S (MELO; GUERRA, 2003).

Na briófito *Marchantia polymorpha* (NAKAYAMA *et al.*, 2001), a sequência de DNAr 17S mostrou estar presente no cromossomo X. Essa espécie em sua fase haplóide apresenta $n=9=8+X$ (indivíduo feminino) e $n=9=8+Y$ (indivíduo masculino). Os cromossomos sexuais são menores que os autossomos e a hibridização com o DNAr 17S mostrou a presença de um sítio adicional no cromossomo X e nenhum sítio no cromossomo Y. Segundo os autores, essa diferença entre os cromossomos sexuais teria ocorrido como resultado da adição de sequências de DNA específicas durante a evolução.

Em pteridófitas essa técnica ainda é bem pouco aplicada. Pode-se citar a aplicação nas espécies *Osmunda japonica*, *Ceratopteris richardii*, *Selaginella apoda*, *Pteris cretica* e *S. martensii*. Em *O. japonica*, Kawakami, Kondo e Kawakami (1999) também utilizaram a sequência de DNAr 45S para localizá-la em indivíduos diplóides ($2n=44$) e haplóides induzidos ($n=22$). Oito sítios foram observados nos diplóides e quatro nos haplóides, como esperado. Com isso os autores procuraram mostrar a possível origem de um indivíduo haplóide através da apogamia, sem que isso cause alterações cromossômicas.

Utilizando a mesma sequência, McGrath e Hickok (1999) a localizaram na espécie *Ceratopteris richardii* ($2n=78$) relacionando os resultados à sua evolução. Pelo menos dois

sítios maiores e outros sítios pequenos foram observados, sendo estes atribuídos a seqüências silenciadas ou como sendo relíquias de genes. Isso foi interpretado como decorrente de pelo menos dois ciclos de poliploidização: (I) um ancestral ($x=10$) com apenas um par de sítios de DNAr 45S teria originado indivíduos com $x=20$ (com dois pares de DNAr 45S), que por sua vez teria dado origem a indivíduos com $x=40$ (quatro pares de sítios), seguido de (II) perda de cromossomos, o que explicaria o número $2n=78$.

A localização física de uma família de retrotransposons (*Ty1-copia*) foi observada em *Selaginella apoda* e em *Pteris cretica* juntamente com outras espécies de angiospermas e gimnospermas (BRANDES *et al.*, 1997). A distribuição dos retrotransposons no conjunto cromossômico de *S. apoda* ocorreu ao longo de todo o cromossomo em todos os cromossomos do conjunto, com exceção dos sítios onde se localizavam o DNAr 45S. Em *P. cretica* o *Ty1-copia* se mostrou reduzido em número de cópias, geralmente apresentando agrupamentos, principalmente no terminal dos cromossomos e mais disperso ao longo dos braços cromossômicos. Esta última, comparando com as demais espécies analisadas, mostrou uma organização única, interpretada como uma falha dos *primers* na amplificação do retroelemento nesta espécie considerada poliplóide.

Seqüências teloméricas foram utilizadas como sondas em uma única espécie de pteridófitas, *Selaginella martensii*, (FUCHS; SCHUBERT, 1996), que mostrou comportamento semelhante à maioria das espécies de angiospermas (FUCHS; BRANDES; SCHUBERT, 1995) e a algumas gimnospermas (HIZUME *et al.*, 2000) analisadas. Em *S. martensii* todos os telômeros marcaram, o que sugere que a unidade repetitiva telomérica TTTAGGG parece ocorrer também nas pteridófitas. Em algumas gimnospermas, entretanto, como *Pinus densiflora*, *P. thunbergii* e *Cunninghamia lanceolata* (HIZUME *et al.*, 2000), bem como em algumas espécies de *Zamia* (KONDO; TAGASHIRA, 1998), além de marcarem ambos os telômeros, sinais teloméricos foram observados também em regiões

centroméricas, intersticiais e proximais. Isto poderia sugerir a ocorrência de rearranjos cromossômicos no processo de evolução.

A hibridização genômica *in situ* (GISH) permite a identificação de um ou mais genomas, ou ainda de determinados cromossomos deste genoma na espécie em análise. A técnica consiste na extração do DNA total de uma determinada espécie, sua marcação com um fluorocromo e a hibridização com outra espécie. A técnica é muito útil no reconhecimento de parentais em espécies híbridas artificiais ou naturais e no reconhecimento de parte do genoma, tais como cromossomos alienígenas e a ocorrência de translocação e recombinação (ver STACE; BAILEY, 1999; BRASILEIRO-VIDAL; GUERRA, 2002).

Através da GISH, por exemplo, foi revelada a natureza alopoliplóide da gramínea *Milium montianum* (BENNETT; KENTON; BENNET, 1992), o que seria impossível através das técnicas convencionais. Análises anteriores indicavam *M. vernale* ($2n=8$) como um dos possíveis parentais de *M. montianum*. Hibridizando o genoma de *M. vernale* com *M. montianum* o resultado foi claro quando oito cromossomos apareceram corados, indicando *M. vernale* como um dos parentais.

2.7.4 Coloração com nitrato de prata

As regiões organizadoras do nucléolo (RONs) podem ser visualizadas nos cromossomos através da coloração com nitrato de prata, que apresenta afinidade pelas proteínas nucleolares. Nesta região, estão localizados os sítios de DNAr 45S visualizados com a hibridização *in situ*. As regiões organizadoras de nucléolos correspondem aos sítios de DNAr 45S ativos e estão associadas às constrições secundárias. Através da coloração com nitrato de prata, portanto, é possível verificar se todos os sítios de DNAr 45S existentes são ativos numa célula, tanto na detecção da RON na metáfase, quanto no número de nucléolos

corados nos núcleos interfásicos (ver, por exemplo, PEDROSA; GUERRA; SOARES-FILHO, 1997).

Em nove espécies do gênero *Capsicum* (MOSCONE *et al.*, 1995), foi aplicada esta coloração, o que permitiu a detecção dos sítios ativos, anteriormente observados através da hibridização *in situ* com o DNAr 45S. Em três espécies de *Cicer*, a coloração com nitrato de prata também foi realizada com o objetivo de investigar os sítios de DNAr 45S ativos (GALASSO *et al.*, 1996).

2.7.5 **Imunolocalização da histona H3 fosforilada**

Uma outra técnica citogenética aplicada tanto em animais como em vegetais é a imunocoloração, com o objetivo de reconhecer a fosforilação da histona H3 durante o ciclo mitótico e meiótico. Estudos têm mostrado que o processo de fosforilação da histona H3 na Serina-10 está relacionado à condensação cromossômica. A fosforilação reduziria a interação DNA-histona promovendo a condensação cromossômica, podendo ser detectada através de um anticorpo específico que reconhece a histona H3 fosforilada (HENDZEL *et al.*, 1997). A imunocoloração tem mostrado em animais e vegetais esta relação entre a H3 fosforilada e condensação cromossômica durante a mitose e a meiose. Isto já foi observado no protozoário *Tetrahymena termophila* (WEI *et al.*, 1998), em vegetais como *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Vicia faba* e *Triticum aestivum* e no inseto *Eyprepocnemis plorans* (HOUBEN *et al.*, 1999; MANZANERO *et al.*, 2000).

Na divisão meiótica, entretanto, diferenças entre a primeira e segunda divisão com relação à fosforilação foram observadas em milho (KASZÁS; CANDE, 2000), em *S. cereale* e em *T. aestivum* (MANZANERO *et al.*, 2000). Na meiose I, todo o cromossomo apareceu fosforilado, enquanto na meiose II, apenas as regiões pericentroméricas dos cromossomos fosforilaram, ao contrário de animais, onde o padrão foi semelhante na meiose I e II, ficando

todo o cromossomo fosforilado. Isto levou os autores a sugerirem que em plantas a fosforilação da histona H3 está mais relacionada à manutenção da coesão entre as cromátides-irmãs que ao processo de condensação cromossômica. Em pteridófitas não se tem conhecimento do padrão de fosforilação da histona H3.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, I. C. L.; SYLVESTRE, L. S. Estado da arte e perspectivas da pteridologia no Brasil: levantamentos florísticos e conservação. In: 50° CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 1999, Blumenau. Anais 50° Congresso Nacional de Botânica, Blumenau: UFSC, 1999. p. 307-308.

BENKO-ISEPPON, A. M.; DIAS, E. R. Da F. Cytological notes on five species of the genera *Danaea* and *Adiantum* (Pteridophyta) from northeastern Brazil. **Bol. Soc. Argent. Bot.**, v. 35. p. 269-273, 2000.

BENNETT, S. T.; KENTON, A. Y.; BENNETT, M. D. Genomic *in situ* hybridization reveals the allopolyploid nature of *Milium montianum* (Gramineae). **Chromosoma**, v. 101, p. 420-424, 1992.

BOLD, H. C. **Morphology of plants**. 3 ed. New York: Harper & Row, 1973. 668 p.

BOWER, F. O. **The ferns (Filicales): Analytical examination of the criteria of comparison**. v. 1. New Delhi: Today & Tomorrow Book Agency, 1963.

BRANDES, A. et al. Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of *Ty1-copia* like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 11-21, 1997.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C; GUERRA, A. M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, S. P.; IORCZSKI, E. J. (Ed.), **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 277-298.

BRITTON, D. M.; BRUNTON, D. F. *Isoetes x truncata*: a newly considered pentaploid hybrid from western North America. **Canadian Journal of Botany**, v. 71, p. 1016–1025, 1993.

BRITTON, D. M. A hybrid *Isoetes*, *I. x harveyi*, in a northeastern North America. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 634–640, 1991.

CUBAS, P. Procesos citogenéticos de especiación en pteridophyta. **Anales Jardín Botánico de Madrid**, v.46, n. 2, p. 519-531, 1990.

CHANG, Y-J.;SHIEH, W-C.; TSAI, J-L. Studies of the karyotype of the fern genus *Pteris* in Taiwan. In: SEMINAR ON ASIAN PTERIDOLOGY, 2., 1992, Taiwan. **Proceedings of the Second Seminar on Asian Pteridology**. Taiwan: National Chung Hsing University and National Science Council, 1992. p. 93-109.

DUFF, R. J; NICKRENT, D. L. Phylogenetic relationships of land plants using mitochondrial small-subunit rDNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 3, p.372-386, 1999.

FORNI-MARTINS, E. R.; GUERRA, M. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. species (Fabaceae). **Caryologia**, v. 52, p. 97-103, 1999.

FUCHS, J.; BRANDES, A.; SCHUBERT, I. Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. **Plant Systematics and Evolution**, v. 196, p. 227–241, 1995.

FUCHS, J.; SCHUBERT, I. *Arabidopsis*-type telomere sequences on chromosome termini of *Selaginella martensii* Spring (Pteridophyta). **Biol. Zent. Bl.**, v. 115, p. 260–265, 1996.

GALASSO, I. et al. Chromatin characterization by banding techniques, in situ hybridization, and nuclear DNA content in *Cicer* L. **Genome**, v. 39, p. 258-265, 1996.

GOSWAMI, H. K. Chromosome studies in natural populations of *Isoetes pantii*, with heterosporous sporangia. **Cytologia**, v. 40, p. 543–551, 1975.

GUERRA, M. Estrutura e diversificação de núcleos interfásicos em plantas. In: AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; MARTINS, P. S.; BANDEL, G. (Ed.), **Tópicos de Citogenética e Evolução de Plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1985. p. 137-153.

GUERRA M. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, v. 71, p. 234–241, 1993.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 1029–1041, 2000.

GUERRA, M. Hibridização *in situ*: princípio básicos. In: GUERRA, M. (Ed.), **FISH: conceitos e aplicações na citogenética**, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, no prelo.

HENDZEL, M. J. et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**, v. 106, p. 348–360, 1997.

HESLOP-HARRISON, J. S. **Techniques et Utilisations des Marqueurs Moléculaires**. Paris: INRA, 1994.

HICKEY, R. J. Chromosome numbers of neotropical *Isoetes*. **American Fern Journal**, v. 4, p. 9-13, 1984.

HICKEY, R. J.; TAYLOR, W. C.; LUEBKE, N.T. The species concept in Pteridophyta with special reference to *Isoetes*. **American Fern Journal**, v. 79, p. 78–89, 1989.

HIZUME, M., A. OHGIKU, E A. TANAKA. Chromosome banding in the genus *Pinus* I. Identification of chromosomes in *P. Nigra* by fluorescent banding method. **Botanical Magazine**, v. 102, p. 25-36, 1983.

HIZUME, M. et al. Chromosomal localization of telomere sequence repeats in five gymnosperm species. **Chromosome Science**, v. 4, p. 39–42, 2000.

HOLTTUM, R. E. A revised classification of leptosporangiate ferns. **Journal Linn. Soc. Bot.**, v. 53, p. 123-158, 1947.

HOUBEN, A. et al. The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. **The Plant Journal**, v. 18, p. 675–679, 1999.

JERMY, A. C.; JONES, K.; COLDEN, C. Cytomorphological variation in *Selaginella*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 60, p. 147–158, 1967.

KASZÁS, E.; CANDE, W. Z. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 3217–3226, 2000.

KAWAKAMI, S. Karyological studies on Pteridaceae I. Karyotypes of three species in *Pteris*. **Botanical Magazine**, v. 84, p. 180-186, 1971.

KAWAKAMI, S. Karyomorphological studies on Japanese Pteridaceae I-*Dennstaedtia*, *Microlepia*, *Sphenomeris*, *Pteris*. **Bulletin of Aichi University of Education (Natural Science)**, v. 28, p. 85-104, 1979.

KAWAKAMI, S. Karyomorphological studies on Japanese Pteridaceae II-*Pteris*, *Acrostichum*, *Cheilanthes*, *Onychium*. **Bulletin of Aichi University of Education (Natural Science)**, v. 29, p. 129-150, 1980.

KAWAKAMI, S. Karyomorphological studies on Japanese Pteridaceae IV-Discussion. **Bulletin of Aichi University of Education (Natural Science)**, v. 31, p. 175-186, 1982.

KAWAKAMI, S. M.; KONDO, K.; KAWAKAMI, S. Analysis of nucleolar organizer constitution by fluorescent in situ hybridization (FISH) in diploid and artificially produced haploid sporophytes of the fern *Osmunda japonica* (Osmundaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 216, p. 325–331, 1999.

KLEKOWSKI, J. R. The genetics and reproductive biology of ferns. In: DYER, A. F. (Ed.). **The Experimental Biology of Ferns**. London: Academic Press, 1979. p. 133-169.

KONDO, K.; TAGASHIRA, N. Regions *in situ*-hybridized by the *Arabidopsis*-type telomere sequence repeats in *Zamia* chromosomes. **Chromosome Science**, v. 2, p. 87–89, 1998.

KOTT, L. S.; BRITTON, D. M. Chromosome numbers for *Isoetes* in northeastern North America. **Canadian Journal of Botany**, v. 58, p. 980-984, 1980.

KRAMER, K. U.; GREEN, P. S. **The families and genera of vascular plants: vol I. pteridophytes and gymnosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

KURIACHAN, P. I. Cytology of the genus *Selaginella*. **Cytologia**, n. 28, p. 376–380, 1963.

KURIACHAN, P. I. Interspecific origin of *Salvinia molesta* Mitchell – evidence from karyotype. **Ind. J. Bot.**, v. 2, n. 1, p. 51-54, 1979.

KURIACHAN, P. I. Karyotype of *Regnellidium diphyllum* Lindm. **Caryologia**, v.47, n. 3-4, p. 311-314, 1994.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 470-476, 1997.

LOVIS, J. D. Evolutionary patterns and processes in ferns. **Adv. Bot. Res.**, v. 4, p. 229-415, 1977.

MANTON, I. Evolution in the pteridophyta. In: WANSTALL, P. J. (Ed.). **“A Darwin Centenary”**. London: Botanical Society British Isles Conference Reports 6, 1961. p. 105-120.

MANZANERO, S. et al. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. **Chromosoma**, v. 109, p. 308–317, 2000.

MARCON, A. B; BARROS, I. C. L.; GUERRA, M. A karyotype comparison between two closely related *Acrostichum* L. (Pteridaceae) species. **American Fern Journal**, v. 93, p. 116–125, 2003a.

MARCON, A. B; BARROS, I. C. L.; GUERRA, M. A. Cariologia de algumas espécies de pteridófitas ocorrentes no nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n. 1, p. 19-26, 2003b.

MCGRATH, J. M.; HICKOK, L. G. Multiple ribosomal RNA gene loci in the genome of the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. **Canadian Journal of Botany**, v. 77, p. 1199–1202, 1999.

MCPHERSON, P.; FILION, W. G. Karyotype analysis and the distribution of constitutive heterochromatin in five species of *Pinus*. **The Journal of Heredity**, p. 193-198. 1981.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, v. 92, p. 309–316, 2003.

MOSCONE, E. A. et al. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 186, p. 213-229, 1993.

MOSCONE, E. A. et al. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. **American Journal of Botany**, v. 82, p. 276–287, 1995.

MOSCONE, E. A.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. **Chromosoma**, v. 105, p. 231–236, 1996.

MUKHOPADHYAY, R.; GOSWAMI, N. Cytotaxonomic observations on two species of *Selaginella* P. Beauv. from India. **Indian Fern Journal**, v. 13, p. 22-29, 1996.

NAKAYAMA, S. et al. Additional locus of rDNA sequence specific to the X chromosome of the liverwort, *Marchantia polymorpha*. **Chromosome Research**, v. 9, p. 469-473, 2001.

PEDROSA, A.; GUERRA, M.; SOARES-FILHO, W. An hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Cytobios**, v. 92, p. 43–51, 1997.

PRYER, K. M. et al. Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. **Nature**, v. 409, p. 619-621, 2001.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001.

ROUX, J. P. A new cytotype for *Acrostichum aureum* **Bothalia**, v. 23, p. 75, 1993.

SALVO, E. **Guia de helechos de la Peninsula Ibérica y Baleares**. Madri: Ediciones Pirâmide, S. A. 1990. 377 p.

SCHNELLER, J. J. cytotaxonomic investigations of *Salvinia herzogii* De La Sota. **Aquatic Botany**, v. 9, p. 279-283, 1980.

SCHNELLER, J. J. Chromosome numbers and spores of *Salvinia auriculata* Aublet s.s. **Aquatic Botany**, v.10, p. 81-84, 1981.

SPORNE, K. R. **The morphology of pteridophytes: the structure of ferns and allied plants**. London: Hutchinson & Co Publishers, 1975.

STACE, C. A.; BAILEY, J. P. The value of genomic *in situ* hybridization (GISH) in plant taxonomic and evolutionary studies. In: HOLLINGSWORTH, P. M.; BATEMAN, R. M.; GORNALL, R. J. (Ed.), **Molecular systematics and plant evolution**. London: Taylor & Francis, 1999. p. 199-210.

STERGIANOU, K. K.; FOWLER, K. Chromosome numbers and taxonomic implications in the fern genus *Azolla* (Azollaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 173, p. 223-239, 1990.

TAKAMIYA, M. Karyomorphology of the Genus *Lycopodium sensu stricto* and Relationships Among Species. **Botanical Magazine**, v. 105, p. 573-588, 1992.

TAKAMIYA, M.; OSATO, K.; ONO, K. Karyomorphological Studies on *Woodwardia sensu lato* of Japan. **Botanical Magazine**, v. 105, p. 247-263, 1992.

TAKAMIYA, M. Comparative karyomorphology and interrelationships of *Selaginella* in Japan. **Journal of Plant Research**, v. 106, p. 149–166, 1993.

TAKAMIYA, M. Natural history and taxonomy of *Isoetes* (Isoetaceae). **Acta Phytotax. Geobot.**, v. 50, n. 1, p. 101-138, 1999.

TAKAMIYA, M. et al. Cytological and reproductive studies of japanese *Diplazium* (Woodziaceae; Pteridophyta). II. Polyploidy and Hybridity in the species group with summer-green bi-to tripinnate leaves. **Journal of Plant Research**, v. 113, p. 203-215, 2000.

TAKAMIYA, M.; OHTA, N. Cytological and reproductive studies of japanese *Diplazium* (Woodsiaceae; Pteridophyta). III. The cytological complexity of species groups with simple pinnate to bipinnatifid lesves. **Journal of Plant Research**, v. 114, p. 443-457, 2001.

TATUNO, S.; KAWAKAMI, S. Karyological Studies on Aspleniaceae I. Karyotypes of Three Species in *Asplenium*. **Botanical Magazine**, v. 82, p. 436-444, 1969.

TATUNO, S.; TAKEI, M. Cytological studies of Salviniaceae I. Karyotype of two species in the genus *Salvinia*. **Botanical Magazine**, v. 82, p. 403-408, 1969.

TATUNO, S.; TAKEI, M. Cytological studies of Salviniaceae II.. **Botanical Magazine**, n. 83, p. 67-73, 1970.

TAYLOR, W. C.; HICKEY, R. J. Habitat, evolution, and speciation in *Isoetes*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 79, p. 613-622, 1992.

TRYON, R. M.; TRYON, A. F. **Ferns and allied plants: with special reference to tropical America**. New York: Springer-Verlag, 1982.

VOSA, C. G. Chromosome banding in plants. In: SHARMA, A. K.; SHARMA, A. (Ed.), **Chromosome and Cell Genetics**. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1985. p. 79-99.

WALKER, T. G. The cytogenetics of ferns. In: DYER, A. F. (Ed.), **The Experimental Biology of Ferns**. London: Academic Press, 1979. p. 87-132.

WALKER, T. G. Chromosomes and evolution in pteridophyte. In: SHARMA, A. K.; SHARMA, A. (Ed.), **Chromosomes Evolution of Eukariotic Groups II**. Boca Raton: CRC Press, 1984. p. 103-141.

WEI, Y. et al. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 7480–7484, 1998.

WOLF, P. G. Evaluation of *atpB* nucleotide sequences for phylogenetic studies of ferns and other pteridophytes. **American Journal of Botany**, v. 84, p.1429-1440, 1997.

ZHANG, D.; SANG, T. Physical mapping of ribosomal RNA genes in peonies (*Paeonia*, Paeoniaceae) by fluorescent *in situ* hybridization: implications for phylogeny and concerted evolution. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 735-740, 1999.

4 MANUSCRITOS

4.1 Manuscrito 1

Variação no número cromossômico, bandas CMA e sítios de DNAr 45S
em espécies de *Selaginella* P. Beauv. (Pteridophyta)

Manuscrito submetido à revista *Annals of Botany*

-
- (i) VARIAÇÃO NO NÚMERO CROMOSSÔMICO, BANDAS CMA E SÍTIOS DE DNAR 45S EM ESPÉCIES DE *Selaginella* P. BEAUV. (PTERIDOPHYTA)
- (ii) Adriana Buarque Marcon. **Endereço:** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica. Rua Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50.670-420, Recife, Pernambuco, Brasil. **E-mail:** abmarcon@uol.com.br
- (iii) Duas figuras
- (iv) Duas tabelas
- (v) 303 palavras no Resumo
- (vi) 3390 palavras no Texto

- (i) VARIAÇÃO NO NÚMERO CROMOSSÔMICO, BANDAS CMA E SÍTIOS DE DNAR 45S EM ESPÉCIES DE *Selaginella* P. BEAUV. (PTERIDOPHYTA)
- (ii) Adriana Buarque Marcon, Iva Carneiro Leão Barros e Marcelo Guerra*
- (iii) Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica. Rua Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife, Pernambuco, Brasil
- (iv) Variabilidade Citogenética em Espécies de *Selaginella*
- (v) mguerra@ufpe.br

RESUMO

Introdução e Objetivos: *Selaginella* é o gênero com maior número de espécies dentro do grupo das pteridófitas heterosporadas. Cariologicamente, o gênero é conhecido somente pela ocorrência da série diplóide $n = 7 - 12$ e baixa frequência de poliplóides. Procurando contribuir para um melhor entendimento da variabilidade cromossômica estrutural do gênero, diferentes métodos de coloração foram aplicados em espécies com diferentes números cromossômicos. **Métodos:** Os complementos cromossômicos de sete espécies de *Selaginella* foram analisados e, em quatro destas, a distribuição dos sítios de DNAr 45S foram determinados por FISH. Adicionalmente, a coloração com os fluorocromos CMA/DA/DAPI e a coloração com nitrato de prata foram realizadas com o propósito de investigar a relação entre os sítios de DNAr 45S, as bandas heterocromáticas e o número de sítios ativos de DNAr. **Resultados:** Os números cromossômicos observados foram $2n=18$, 20 e 24 . As espécies com $2n=20$ mostraram complementos cromossômicos menores e menos variáveis que aquelas com $2n=18$. A única espécie com $2n=24$, *S. convoluta*, mostrou cromossomos relativamente maiores e mais assimétricos. Os núcleos interfásicos em todas as espécies foram do tipo cromocêntrico. A tríplice coloração CMA/DA/DAPI mostrou uma fraca diferenciação cromossômica das bandas heterocromáticas. Em *S. willdenowii* e *S. convoluta* oito e seis bandas CMA⁺ foram observadas respectivamente, e nenhuma banda DAPI⁺ foi visualizada. As bandas CMA⁺ corresponderam em número e localização aos sítios de DNAr. De modo geral, o número de sítios de DNAr se relaciona ao número máximo de nucléolo por núcleo. Dez sítios de DNAr foram observados em *S. plana* ($2n=20$), oito em *S. willdenowii* ($2n=18$), seis em *S. convoluta* ($2n=24$) e dois em *S. producta* ($2n=20$). **Conclusões:** A notável variação no tamanho cromossômico e no número de sítios de DNAr mostra que mudanças cariológicas dramáticas têm ocorrido durante a evolução do gênero, a nível diplóide. Adicionalmente, estes

dados sugerem que os dois prováveis números básicos do gênero, $x=9$ e $x=10$, devem ter surgido duas ou mais vezes, independentemente.

Palavras-chave: Pteridófitas, *Selaginella*, número cromossômico, coloração com fluorocromos, coloração com nitrato de prata, hibridização *in situ*, DNAr 45S.

INTRODUÇÃO

Selaginella P. Beauv. é um gênero heterosporado pertencente à família Selaginellaceae, compreendendo aproximadamente 750 espécies distribuídas nas regiões tropicais, incluindo 250 espécies nas Américas (Tryon e Tryon, 1982; Kramer e Green, 1990). São geralmente encontradas em florestas úmidas, embora possam também estar presentes em florestas secas, pântanos, em rochas úmidas ao longo de rios ou quedas d'água e ainda em regiões frias como os Alpes, ou em desertos (Tryon e Tryon, 1982).

Poliploidia e hibridização têm ocorrido numerosas vezes na evolução das pteridófitas, resultando em altos números cromossômicos, caracteristicamente observados neste grupo (Walker, 1984). Apesar disso, altos números cromossômicos são raros entre as pteridófitas heterosporadas. *Selaginella*, o gênero heterosporado mais representativo, apresenta umas poucas espécies poliplóides, embora uma grande variação displóide tenha sido reportada. Os números cromossômicos variam entre $2n=14$ e $2n=60$, e diversos autores têm reportado diferentes números cromossômicos básicos para o gênero: $x=7$, 8, 9, 10, 11, e 12 (Kuriachan, 1963; Jermy *et al.*, 1967; Takamiya, 1993).

Apesar de alguns estudos citotaxonômicos, a evolução cariológica deste grupo permanece incompreendida. Investigações citológicas têm sido baseadas principalmente em contagens

cromossômicas e, em poucos casos, em morfologia cromossômica. Nos estudos cariológicos em angiospermas e gimnospermas realizados nas duas últimas décadas têm sido empregados métodos mais específicos como bandejamento e hibridização *in situ* (FISH) (Greilhuber, 1995; Stace e Bailey, 1999). Bandas heterocromáticas em plantas têm sido analisadas principalmente através do bandejamento C ou da coloração com fluorocromos, que coram seqüências de DNA específicas (Guerra, 2000). A técnica de bandejamento com fluorocromos tem a vantagem de ser mais simples, mais reprodutível e menos destrutiva, quando comparada ao bandejamento C (Guerra, 1993). Os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), mostram coloração preferencial por seqüências ricas em pares de base GC e AT, respectivamente, permitindo a identificação de diferentes tipos de heterocromatina. A distamicina A (DA) também tem sido utilizada para aumentar o contraste entre CMA e DAPI (Schweizer e Ambros, 1994; Marcon *et al.*, 2003). Os sítios de DNAr 45S geralmente coram positivamente com o CMA e negativamente com DAPI. Em muitas espécies, os sítios de DNAr 45S são os únicos corados positivamente com CMA (ver, por exemplo, Melo e Guerra, 2003). As variações no número e na posição dos sítios de DNAr têm se mostrado como características cariotípicas adicionais, importantes para as análises citotaxonômicas de alguns gêneros de angiospermas, como *Clivia* (Ran *et al.*, 1999) e *Sanguisorba* (Mishima *et al.*, 2002). A coloração com nitrato de prata é outro método que permite a visualização das regiões organizadoras do nucléolo (RONs), que também estão relacionadas às constrições secundárias dos cromossomos, mas depois da coloração com nitrato de prata, somente os sítios ativados na intérfase anterior são corados na prófase ou metáfase (Moscone *et al.*, 1995). Em geral, o número máximo de sítios corados com nitrato de prata em cromossomos profásicos ou metafásicos e o número máximo de nucléolos presente no núcleo interfásico corresponde ao número de sítios de DNAr 45S (ver, por exemplo,

Moscone *et al.*, 1995). Essa relação parece ocorrer também em pteridófitas homosporadas (Kawakami *et al.*, 1999; Marcon *et al.*, 2003).

Com a finalidade de entender melhor a citogenética e evolução desse gênero, foram analisados os números cromossômicos de sete espécies brasileiras de *Selaginella* e, em quatro destas, foram observados o número e a distribuição dos sítios de DNAr 45S. Adicionalmente, foram investigados os blocos de heterocromatina corados com CMA/DA/DAPI e o número de nucléolos por núcleo, como uma indicação do número de RONS. Os resultados são discutidos com relação à evolução cromossômica do gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies investigadas, com seus respectivos locais de coleta, números cromossômicos e contagens cromossômicas prévias, estão listadas na Tabela 1. Uma parte do material coletado foi herborizada e as exsiccatas foram depositadas no herbário UFP (Universidade Federal de Pernambuco, Brasil). Outra parte do material foi mantida no jardim experimental do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, para a análise citogenética.

Brotos foliares foram coletados e pré-tratados em 8-hidroxiquinoleína 0.002 M por 1 h à temperatura ambiente, seguida de 23 h a 10 °C. Posteriormente, foram fixados em Carnoy (etanol : ácido acético 3 : 1) por 24 h à temperatura ambiente e estocados a -20 °C.

Para a coloração convencional, os brotos foliares fixados foram lavados duas vezes em água destilada por cinco min cada, hidrolisados em HCl 5 N por 30 min, e o meristema isolado e esmagado em ácido acético 45% (Guerra, 1983). As lâminas foram coradas com Giemsa 5 %

e montadas em Entellan. As medições cromossômicas foram feitas em fotografias ampliadas com o auxílio de um paquímetro.

A tríplice coloração CMA/DA/DAPI foi feita de acordo com Schweizer e Ambros (1994). Os brotos foliares foram lavados duas vezes em água destilada por 5 min cada, digeridos em uma mistura de celulase 2 % / pectinase 20% por 2 h a 37 °C, e o meristema isolado e esmagado em ácido acético 45%. Depois de retirada a lamínula, as lâminas foram envelhecidas por três dias à temperatura ambiente, coradas com CMA (0.5 mg/ml, 1 h), contra-coradas com distamicina A (0.1 mg/ml, 30 min), coradas com DAPI (2 µg/ml, 30 min) e montadas em glicerol/tampão McIlvaine (1:1) contendo 2,5 mM de cloreto de magnésio. A coloração CMA/DAPI sem distamicina A produziu um contraste muito fraco das bandas.

Broto foliares sem pré-tratamento foram fixados diretamente em Carnoy e utilizados para a coloração com nitrato de prata. As lâminas foram preparadas utilizando o mesmo tratamento enzimático empregado na coloração com fluorocromos, com exceção do envelhecimento das lâminas. Uma pequena gota de nitrato de prata (50% em água formicada) foi colocada sobre a mancha de células, cobrindo-a em seguida com uma lamínula e incubada em câmara úmida a 60 °C (Rufas *et al.*, 1987) por aproximadamente 10 min ou até atingir uma coloração adequada.

Para localizar o DNAr 45S, foram utilizadas as sondas SK18S e SK25S, contendo o DNAr 18S e 25S de *Arabidopsis thaliana* (Unfried *et al.*, 1989; Unfried e Gruendler, 1990), cedidas gentilmente pelo Prof. D. Schweizer da Universidade de Viena, e marcadas por *nick translation* com biotina-11-dUTP (Sigma) ou digoxigenina-11-dUTP (Roche). A sonda foi detectada com anti-biotina monoclonal produzida em camundongo (Dakopatts nº M743) e visualizada com o anticorpo anti-camundongo produzido em coelho conjugado com tetrametil-rodamina isotiocianato (TRITC) (Dakopatts nº R270) ou detectada com anti-digoxigenina produzido em ovelha conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC)

(Boehringer Mannheim nº 1207741) e visualizada com anticorpo anti-ovelha produzido em coelho, conjugado com FITC (Dakopatts F135, DAKO). A técnica foi baseada em Moscone *et al.* (1996), com algumas modificações (desnaturação a 80 °C e banhos pós-hibridização em 0,1 x SSC a 42 °C). Na maior parte dos experimentos de hibridização, a sonda de DNAr 5S obtida do DNA genômico de *Passiflora edulis* Sims (Melo e Guerra, 2003) foi adicionada à mistura mas nenhum sinal foi observado. As lâminas foram coradas com DAPI (2 µg/ml) e montadas em Vectashield (Vector).

As melhores células foram capturadas com uma câmera CCD Cohu acoplada a um microscópio Leica DMBL, ou fotografadas utilizando o filme Kodak Imagelink HQ ASA 25 para campo claro ou Kodak ASA 400 para fotografia com fluorescência.

RESULTADOS

As sete espécies de *Selaginella* analisadas no presente trabalho mostraram os seguintes números cromossômicos: 2n=18 [*S. muscosa* Spring, *S. simplex* Baker, *S. willdenowii* (Desv. ex Poiret) Baker e *Selaginella* sp.], 2n=20 [*S. producta* Baker e *S. plana* (Desv. ex Poiret) Hieron.] e 2n=24 [(*S. convoluta* (Arnott) Spring] (Figs. 1A – G).

Entre as espécies com 2n=18, *S. willdenowii* e *Selaginella* sp. mostraram os maiores cromossomos, sendo a maioria de morfologia meta- e submetacêntrica. Os cromossomos em *S. willdenowii* variaram entre 1,44 e 2,48 µm (Fig. 1A), e mostraram até seis satélites: dois nos braços curtos e quatro nos braços longos de cromossomos submetacêntricos. Em *Selaginella* sp., o tamanho cromossômico variou entre 1,35 e 2,32 µm e três satélites foram observados: dois em um par metacêntrico e o terceiro em um cromossomo submetacêntrico.

(Fig. 1B). Por outro lado, *S. simplex* e *S. muscosa* mostraram cromossomos menores, variando, respectivamente, entre 0,85 e 1,26 μm e 0,80 e 1,62 μm (Figs. 1C e D).

As espécies com $2n=20$ mostraram cromossomos menores, variando de 0,70 a 1,04 μm em *S. plana*, e de 0,78 a 1,43 μm em *S. producta* (Figs. 1E e F). A posição dos centrômeros não pôde ser observada em nenhuma destas duas espécies, devido ao pequeno tamanho de seus cromossomos. Satélites também não foram claramente identificados.

Na única espécie com $2n=24$, *S. convoluta*, a morfologia dos cromossomos pareceu variar de metacêntrica a acrocêntrica. O tamanho cromossômico variou entre 0,70 e 1,77 μm e satélites não foram observados (Fig. 1G).

Em todas as espécies analisadas, a estrutura do núcleo interfásico se mostrou granulada, com pequenos cromocentros, correspondendo ao tipo cromocêntrico, de acordo com a classificação de Tanaka (1971). Algumas espécies mostraram cromocentros maiores e distintamente contornados (Figs. 1H e I).

A coloração com nitrato de prata revelou que o número máximo de nucléolos por núcleo variou entre as espécies (Tabela 2). Em *S. producta* o número máximo de nucléolos por núcleo foi dois, enquanto que nas outras três espécies investigadas, o número máximo variou entre seis e 10, embora a maioria dos núcleos tenha exibido somente três nucléolos. *Selaginella willdenowii* mostrou a variação de um a 10 nucléolos por núcleo interfásico e até 10 RONS foram observadas em prometáfase (Fig. 1J). Em *S. convoluta* e *S. plana*, não foi possível identificar as RONS, mas seis e 10 cromossomos profásicos ou prometáfásicos, respectivamente, associados aos nucléolos foram observados (Fig. 1K e L).

Um maior número de células em metáfase foi obtido das espécies *S. willdenowii*, *S. plana*, *S. producta* e *S. convoluta*, possibilitando analisar os cromossomos através da coloração com fluorocromos e da hibridização *in situ*. A coloração com CMA/DA/DAPI revelou diferenciação de bandas somente em *S. willdenowii* e *S. convoluta*. Os cromossomos das

outras espécies coraram fracamente e homoganeamente com ambos, CMA e DAPI, mesmo quando contra-corados com distamicina A. Em células prometafásicas de *S. willdenowii*, até oito bandas terminais CMA⁺/DAPI⁻ foram observadas (Fig. 2A e B). Em *S. convoluta* (2n=24), seis bandas terminais CMA⁺/DAPI⁻ foram localizadas em três pares cromossômicos (Fig. 2D e E). Nenhuma banda DAPI⁺ foi observada nestas duas espécies, enquanto que as bandas CMA⁺ coraram negativamente com DAPI.

A hibridização *in situ* com o DNAr 45S nos cromossomos de *S. willdenowii* revelou a presença de sítios terminais nos braços longos de dois pares cromossômicos e nos braços curtos de outros dois pares cromossômicos (Fig. 2C). Em duas populações analisadas de *S. plana*, cinco pares submetacêntricos foram marcados terminalmente: três pares nos braços longos e dois pares nos braços curtos (Fig. 2H e I). Enquanto em uma das populações não foi possível observar bem o sítio menor, por este ter corado mais fracamente, na outra população analisada, os 10 sítios de DNAr 45S foram claramente marcados (Fig. 2I). Em *S. convoluta* havia quatro sítios em dois pares aparentemente acrocêntricos e dois sítios em um par submetacêntrico (Fig. 2F). Em *S. producta* (Fig. 2G e J) somente um par cromossômico foi marcado, na posição terminal, nas duas populações analisadas. Estes dois sinais se mostraram notavelmente distintos nos núcleos interfásicos (Fig. 2K), enquanto até 10 sinais foram observados nos núcleos interfásicos de *S. plana* (Fig. 2L).

DISCUSSÃO

Os números cromossômicos e a estrutura dos núcleos interfásicos reportados no presente trabalho são compatíveis com os dados cariológicos conhecidos para o gênero *Selaginella* (Kuriachan, 1963; Jermy *et al.*, 1967; Ghatak, 1977; Takamiya, 1993). Das sete espécies

examinadas, somente *S. plana* e *S. willdenowii* tinham sido previamente analisadas. Os números cromossômicos observados para estas espécies concordam com contagens anteriores.

Com relação ao tamanho e à morfologia cromossômica, há uma forte tendência à conservação da simetria cariotípica, com a predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. As espécies com $2n=20$ analisadas nesta amostra se mostraram mais semelhantes no tamanho cromossômico do que aquelas com $2n=18$. Takamiya (1993) encontrou resultados semelhantes entre espécies com $x=10$ e $x=9$. Um maior número de cromossomos meta e submetacêntricos foi observado no cariótipo de todas as espécies analisadas, parecendo ser uma tendência comum no gênero (Takamiya 1993), e em outras pteridófitas heterosporadas (Kuriachan 1979, 1994). Por outro lado, cromossomos acro- e telocêntricos são mais freqüentes entre as pteridófitas homosporadas (Kawakami, 1982; Takamiya *et al.*, 1992, Marcon *et al.*, 2003).

A hibridização *in situ* com o DNAr 45S revelou a variação estrutural mais proeminente entre as espécies. Uma espécie com $2n=20$, *S. plana*, apresentou 10 sítios de DNAr 45S, enquanto a outra espécie com o mesmo número cromossômico, *S. producta*, mostrou apenas dois. Por outro lado, *S. willdenowii* com $2n=18$, mostrou mais sítios de DNAr (oito) que *S. convoluta* (seis) com $2n=24$. Em angiospermas, variação similar tem sido amplamente reportada. Em *Passiflora*, por exemplo, o número de DNAr 45S variou de um a três pares entre espécies diplóides (Melo e Guerra, 2003). Em *Paeonia* (Zhang e Sang, 1999), cinco espécies diplóides ($2n=10$) apresentaram de três a 10 pares de sítios de DNAr. A variação no número de sítios de DNAr entre espécies de angiospermas de mesmo nível diplóide, tem sido atribuída a rearranjos cromossômicos, ação de elementos de transposição e silenciamento gênico (Moscone *et al.*, 1999). Igualmente, mecanismos similares podem estar atuando nas espécies de *Selaginella*.

Em *S. plana*, *S. convoluta* e *S. producta* houve uma perfeita relação entre número máximo de nucléolos (10, 6, e 2, respectivamente) e o número de sítios de DNAr 45S. A maior frequência de núcleos com poucos nucléolos, observado nas espécies analisadas, é devido, provavelmente, à fusão dos nucléolos, como observado em angiospermas (Moscone *et al.*, 1995).

Curiosamente, embora *S. willdenowii* tenha apresentando até 10 RONS, mostrou somente oito sítios de DNAr 45S e seis cromossomos satelitados. Essa aparente ausência de relação entre RONS e sítios de DNAr pode ser devida a um par de sítios de DNAr ativo muito reduzido em tamanho, não detectado pela FISH. O número de satélites observado, por outro lado, é frequentemente menor que o número de sítios de DNAr (ver, por exemplo, Guerra *et al.*, 1996), e em alguns casos eles não são observados, como em *S. convoluta*, *S. plana* e *S. producta*.

A coloração CMA/DA/DAPI revelou somente bandas CMA⁺/DAPI⁻ em *S. willdenowii* e *S. convoluta*. O número de bandas CMA⁺ se apresentou positivamente relacionado com o número de sítios de DNAr e o número máximo de nucléolos observado nestas espécies. Resultados similares foram encontrados no gênero homosporado *Acrostichum* (Marcon *et al.*, 2003), sugerindo que estas três características também são positivamente relacionadas em cromossomos de pteridófitas. Com exceção de um trabalho com o gênero *Acrostichum* (Marcon *et al.*, 2003), nenhum outro estudo prévio evidenciando bandas CMA em pteridófitas foi encontrado na literatura.

Jermy *et al.* (1967) propuseram que o número básico primário de *Selaginella* seria x=10, característico de espécies que crescem em florestas tropicais e subtropicais densas (ver também Kuriachan, 1963). Entretanto, análises cariológicas posteriores (Takamiya, 1993), tanto quanto dados morfológicos, anatômicos e paleobotânicos (Mukhopadhyay, 1998) sugerem que o número básico do gênero seria x=9, gerando sucessivas disploidias com n=10,

11, e 12 por um lado, e $n=8$ e 7 por outro lado. Takamiya (1993) propôs que a disploidia deve ter ocorrido repetidamente em diferentes linhas evolutivas dentro de cada subgênero. De fato, a notável variação no número e tamanho cromossômico e no número de sítios de DNAr, parece indicar que a variação estrutural é bem comum no gênero e que sua evolução cariológica pode ser mais complexa, com cada número básico surgindo duas ou mais vezes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a gentileza do Dr. Iván Valdespino, da Universidade do Panamá, em identificar espécies utilizadas neste trabalho, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

LITERATURA CITADA

- Fabri F. 1963.** Primo supplemento alle tavole cromosomiche delle Pteridophyta di Alberto Chiarugi. *Caryologia* **16**: 238-335.
- Ghatak J. 1977.** Biosystematic survey of pteridophytes from Shevaroy Hills, South India. *Nucleus* **20**: 105–108.
- Greilhuber J. 1995.** Chromosomes of the monocotyledons (General Aspects). In: Rudall PJ, Cribb PJ, Cutler DF, Humphries CJ, eds. *Monocotyledons: systematics and evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew, 379–414.

- Guerra M. 1983.** O uso de Giemsa na citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura* **35**: 191–193.
- Guerra M. 1993.** Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* **71**: 234–241.
- Guerra M. 2000.** Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology* **23**:1029–1041.
- Guerra M, Kenton A, Bennett MD. 1996.** rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization. *Annals of Botany* **78**: 157-161.
- Jermey AC, Jones K, Colden C. 1967.** Cytomorphological variation in *Selaginella*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **60**: 147–158.
- Kawakami S. 1982.** Karyomorphological studies on Japanese Pteridaceae IV - Discussion. *Bulletin of Aichi University of Education (Natural Science)* **31**: 175–186.
- Kawakami SM, Kondo K, Kawakami S. 1999.** Analysis of nucleolar organizer constitution by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in diploid and artificially produced haploid sporophytes of the fern *Osmunda japonica* (Osmundaceae). *Plant Systematics and Evolution* **216**: 325–331.
- Kramer KU, Green PS. 1990.** The Families and Genera of Vascular Plants. Vol I. Pteridophytes and Gymnosperms. *Berlin: Springer-Verlag*.
- Kuriachan PI. 1963.** Cytology of the genus *Selaginella*. *Cytologia* **28**: 376–380.
- Kuriachan PI. 1979.** Interspecific origin of *Salvinia molesta* Mitchell – Evidence from karyotype. *Ind. J. Bot.* **2**: 51–54.
- Kuriachan PI. 1994.** Karyotype of *Regnellidium diphyllum* Lindm. *Caryologia* **47**: 311–314.

- Marcon AB, Barros ICL, Guerra M. 2003.** A karyotype comparison between two closely related *Acrostichum* L. (Pteridaceae) species. *American Fern Journal* **93**: 116–125.
- 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.
- Mishima M, Ohmido N, Fukui K, Yahara T. 2002.** Trends in site number change of rDNA loci during polyploid evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae). *Chromosoma* **110**: 550–558.
- Moscone EA, Loidl J, Ehrendorfer F, Hunziker AT. 1995.** Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *American Journal of Botany* **82**: 276–287.
- Moscone EA, Matzke MA, Matzke AJM. 1996.** The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* **105**: 231–236.
- Moscone EA, Klein F, Lambrou M, Fuchs J, Schweizer D. 1999.** Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* **42**: 1224–1233.
- Mukhopadhyay R. 1998.** Cytotaxonomic observations on *Selaginella* Beauv. *Phytomorphology* **48**: 343–347.
- Ran Y, Murray BG, Hammett KRW. 1999.** Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and *in situ* hybridization. *Euphytica* **106**: 139–147.
- Rufas JS, Giménez-Abián J, Suja JA, Garcia De La Vega C. 1987.** Chromosome organization in meiosis revealed by light microscope analysis of silver-staining cores. *Genome* **29**: 706–712.
- Schweizer D, Ambros PF. 1994.** Chromosome banding. In: Gosden JR, ed. *Methods in Molecular Biology*, 29. Totowa: Human Press, 97–112.

- Stace CA, Bailey JP. 1999.** The value of genomic *in situ* hybridization (GISH) in plant taxonomic and evolutionary studies. In: Hollingsworth PM, Bateman RM, Gornall RJ, eds. *Molecular Systematics and Plant Evolution*. London: Taylor & Francis, 199–210.
- Takamiya M, Osato K, Ono K. 1992.** Karyomorphological studies on *Woodwardia* sensu lato of Japan. *Botanical Magazine* **105**: 247–263.
- Takamiya M. 1993.** Comparative karyomorphology and interrelationships of *Selaginella* in Japan. *Journal of Plant Research* **106**: 149–166.
- Tanaka R. 1971.** Types of resting nuclei in Orchidaceae. *Botanical Magazine* **84**: 118–122.
- Tryon RM, Tryon AF. 1982.** *Ferns and Allied Plants - with Special Reference to Tropical America*. New York: Springer-Verlag.
- Unfried I, Stocker U, Gruendler P. 1989.** Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from *Arabidopsis thaliana* Col0. *Nucleic Acids Research* **17**:7513.
- Unfried I, Gruendler P. 1990.** Nucleotide sequence of the 5.8S and 25S rRNA genes and of the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **18**:4011.
- Walker TG. 1984.** Chromosomes and evolution in pteridophyte. In: Sharma AK, Sharma A, eds. *Chromosome Evolution of Eukaryotic Groups II*. Boca Raton: CRC Press, 103–141.
- Zhang D, Sang T. 1999.** Physical mapping of ribosomal RNA genes in peonies (*Paeonia*, Paeoniaceae) by fluorescent *in situ* hybridization: implications for phylogeny and concerted evolution. *American Journal of Botany* **86**: 735–740.

TABELA 1. *Espécies analisadas de Selaginella, com seus respectivos números de registro em herbário, locais de coleta, números cromossômicos e contagens prévias. Todas as amostras foram coletadas no estado de Pernambuco (Brasil), exceto S. plana, que foi coletada no estado do Rio de Janeiro (Brasil)*

Espécies	Número de registro em herbário	Local de coleta	Número cromossômico (2n)	Contagens prévias (2n)	Referências
<i>S. muscosa</i> Spring	36588	Bonito	18	—	—
<i>S. simplex</i> Baker	36412	Gravatá	18	—	—
<i>S. willdenowii</i> (Desv. ex Poiret) Baker	36589	Recife	18	18	Fabri 1963; Kuriachan 1963; Jermy <i>et al.</i> 1967
<i>Selaginella</i> sp.	—	Itamaracá	18	—	—
<i>S. producta</i> Baker	36410	Paulista	20	—	—
	36411	Igarassú	20	—	—
	36591	Bonito	20	—	—
<i>S. plana</i> (Desv. ex Poiret) Hieron	36409	Recife	20	20	Fabri 1963; Kuriachan 1963; Jermy <i>et al.</i> 1967
	36590	Rio de Janeiro	20	20	Fabri 1963; Kuriachan 1963; Jermy <i>et al.</i> 1967
<i>S. convoluta</i> (Arnott) Spring	36408	Petrolina	24	—	—

TABELA 2. *Variação no número de cromossomos, sítios de DNAr 45S e número de nucléolos por núcleo em quatro espécies de Selaginella*

Espécies	2n	Número de sítios de DNAr	Variação no número de nucléolos por núcleo		
			Número de células analisadas	Variação	Números mais frequentes
<i>S. willdenowii</i>	18	8	1015	1–10	3 (29,5%) e 4 (21,1%)
<i>S. plana</i>	20	10	800	1–10	2 (27,8%) e 3 (31,7%)
<i>S. producta</i>	20	2	308	1–2	1 (94,2%)
<i>S. convoluta</i>	24	6	528	1–6	2 (28,0%) e 3 (35,7%)

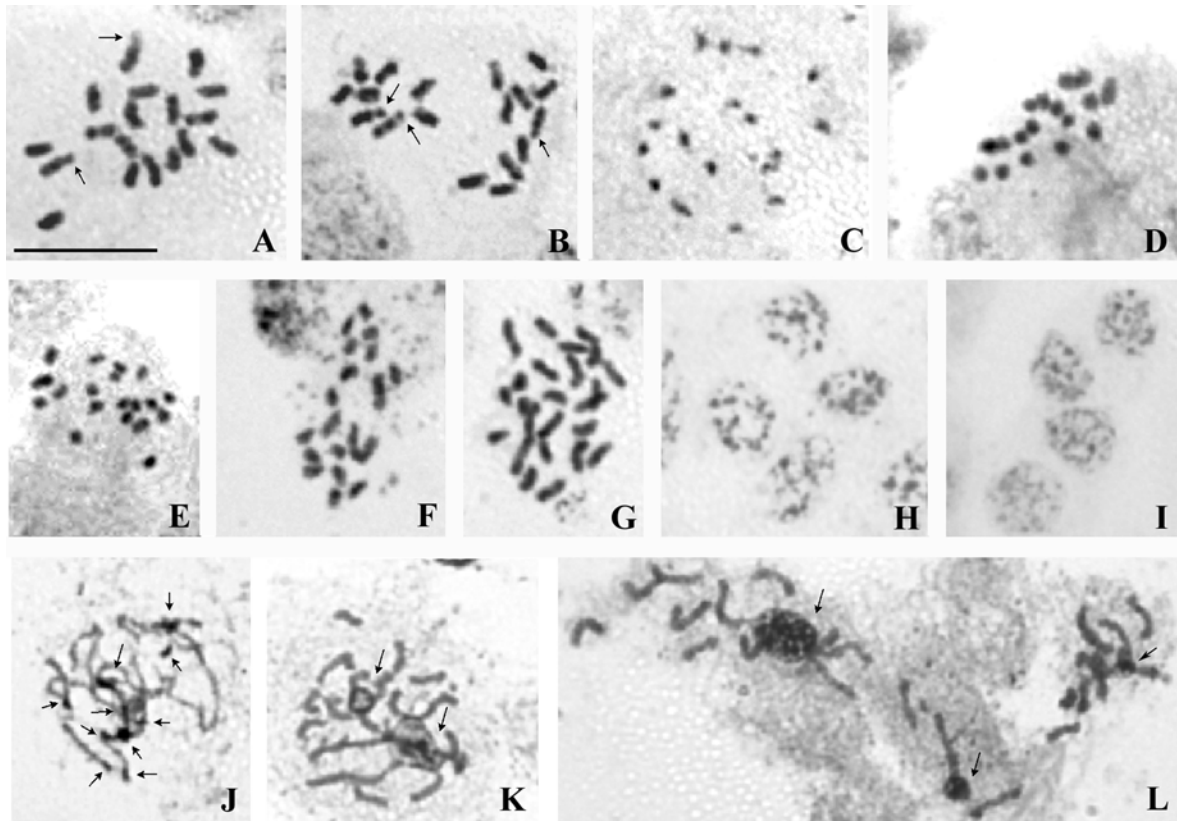


FIG. 1. Complemento cromossômico (A–G), núcleos interfásicos (H e I), e número de RONS e nucléolos (J–L) observados em espécies de *Selaginella*. A, *S. willdenowii* ($2n=18$) com dois satélites (setas); B, *Selaginella* sp. ($2n=18$) com três satélites (setas); C, *S. simplex* ($2n=18$); D, *S. muscosa* ($2n=18$); E, *S. plana* ($2n=20$); F, *S. producta* ($2n=20$); G, *S. convoluta* ($2n=24$); H e I, núcleos interfásicos cromocêntricos de *S. plana* e *S. willdenowii*, respectivamente; J, célula prometafásica mostrando as RONS (setas); K e L, células prometafásicas mostrando cromossomos associados aos nucléolos (setas) em *S. plana* (K) e *S. convoluta* (L). Barra em A corresponde a 5 μm .

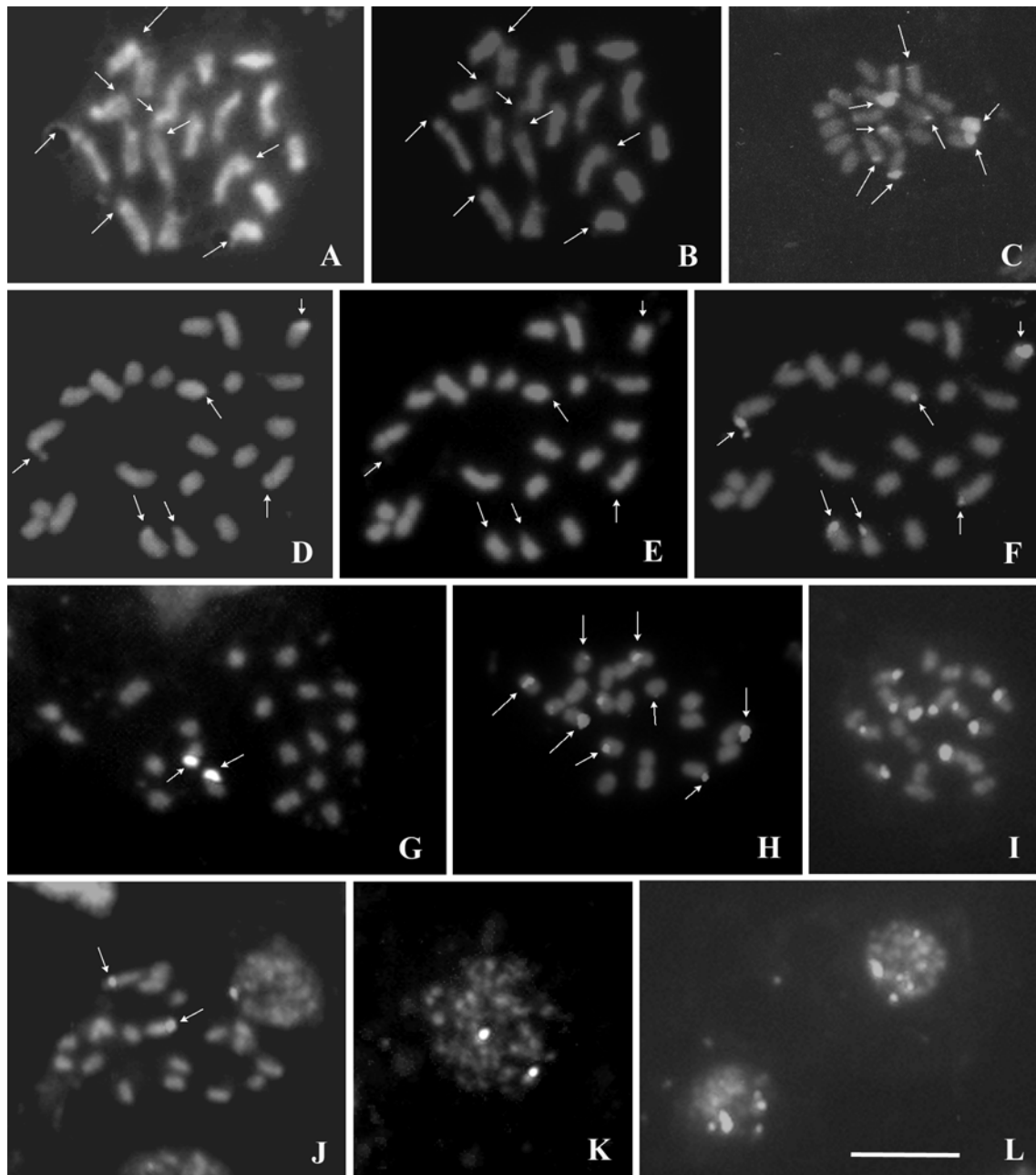


FIG. 2. Distribuição das bandas CMA/DAPI e sítios de DNAr 45S em espécies de *Selaginella*. *Selaginella willdenowii* (A e B) e *S. convoluta* (D e E), coradas com CMA (A e D) e DAPI (B e E), respectivamente. Setas indicam as bandas CMA⁺/DAPI⁻. Sítios de DNAr 45S (C e F–L) em *S. willdenowii* (C), *S. convoluta* (F), em duas populações de *S. producta* (G e J), e em duas populações de *S. plana* (H e I); núcleo interfásico de *S. producta* (K), mostrando os dois sítios de DNAr 45S e de *S. plana* (L), mostrando até 10 sítios. Barra em L corresponde a 5 µm.

4.2 Manuscrito 2

Citogenética molecular de pteridófitas I. Distribuição das bandas heterocromáticas, sítios de DNAr e DNA telomérico em relação a outros parâmetros cariológicos

Manuscrito a ser submetido à revista *Plant Cell Reports*

A. B. Marcon¹ • I. C. L. Barros² • M. Guerra³

Citogenética molecular de pteridófitas I. Distribuição das bandas heterocromáticas, sítios de DNAr e DNA telomérico em relação a outros parâmetros cariológicos

Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil. E-mail: abmarcon@uol.com.br¹; ivaleao@truenet.com.br²; mguerra@ufpe.br³

(✉) M. Guerra

e-mail: mguerra@ufpe.br

Telefone: 55 81 2126-8846

Fax: 55 81 2126-8348

Resumo

Com o propósito de caracterizar citogeneticamente as pteridófitas heterosporadas, foram analisados em alguns representantes, o número e a morfologia dos cromossomos, a estrutura dos núcleos interfásicos, os padrões de bandas CMA e DAPI, o número de sítios de DNAr 45S e investigada a presença da sequência telomérica (TTTAGGG)_n. Os números cromossômicos observados foram: *Salvinia auriculata*, 2n=45; *S. minima*, 2n=ca. 63; *Azolla caroliniana*, *A. microphylla* e *A. filiculoides*, 2n=44; *Marsilea deflexa* e *M. quadrifolia*, 2n=40; *Regnellidium diphyllum*, 2n=ca. 40; *Isoetes panamensis*, 2n=44 e *I. hystrix*, 2n=20. Os núcleos interfásicos mostraram variação entre arreticulado, semi-reticulado e reticulado. Em todas as espécies houve um predomínio de cromossomos submetacêntricos e metacêntricos. Bandas CMA⁺/DAPI⁻ foram observadas em *S. auriculata* (total de 14 bandas), *S. minima* (quatro bandas); *M. deflexa* (total de 10 bandas); *M. quadrifolia* (total de 14 bandas); *R. diphyllum* (10 bandas); *I. panamensis* (10 bandas); *I. hystrix* (nove bandas). Houve co-localização das bandas CMA⁺ com os sítios de DNAr 45S em *I. panamensis* (10 sítios) e *I. hystrix* (10 sítios) e aparentemente também em *S. auriculata* (8 sítios) e *M. deflexa* (12 sítios). A sequência telomérica mostrou marcação em todos os telômeros de *Selaginella willdenowii*. Esses resultados sugerem uma semelhança entre que em relação à variabilidade de número cromossômico, à estrutura dos núcleos interfásicos e às sequências de DNAr e telomérica, os cromossomos das pteridófitas heterosporadas são semelhantes aos de angiospermas.

Palavras-chave: pteridófitas heterosporadas, número cromossômico, núcleos interfásicos, coloração com fluorocromos, DNAr 45S, sequência telomérica

Introdução

Existem atualmente apenas sete gêneros de pteridófitas heterosporadas: *Salvinia*, *Azolla*, *Marsilea*, *Regnellidium*, *Pilularia*, *Isoetes* e *Selaginella*. Os gêneros *Salvinia* (Salviniaceae) e *Azolla* (Azollaceae) juntamente com *Marsilea*, *Regnellidium* e *Pilularia* (Marsileaceae) pertencem à divisão Filicatae enquanto *Isoetes* (Isoetaceae) e *Selaginella* (Selaginellaceae) estão posicionadas na divisão Lycopodiatae (Kramer e Green 1990). *Salvinia* e *Azolla* são plantas aquáticas flutuantes, com ampla distribuição nos trópicos, apresentando em torno de dez e seis espécies, respectivamente. *Marsilea*, com cerca de 50 espécies habita lugares úmidos, crescendo em águas superficiais e em borda de tanques. *Regnellidium* é um gênero monotípico, presente somente na região Sul do Brasil e na Argentina, crescendo entre vegetação aquática. *Pilularia* é composto de cerca de cinco espécies aquáticas ou palustres, de ampla distribuição. *Isoetes*, o segundo gênero com maior representatividade entre as heterosporadas, é cosmopolita, representado por cerca de 150 espécies que crescem em uma variedade de habitats, onde o solo esteja encharcado em pelo menos uma parte do ano. *Selaginella* é o gênero mais representativo com cerca de 750 espécies, distribuídas principalmente em regiões tropicais. As espécies são geralmente encontradas em florestas úmidas, em rochas ao longo de rios ou quedas d'água, em pântanos, e também podem estar presentes em florestas secas, em regiões frias como os Alpes, ou em desertos (Tryon e Tryon 1982).

As pteridófitas heterosporadas apresentam números cromossômicos mais baixos que as homosporadas e suas características cromossômicas (morfologia cromossômica, estrutura de núcleo interfásico, quantidade de DNA nuclear, etc.) diferem significativamente destas últimas (Walker 1984; Takamiya 1993; Bennett e Leitch 2001; Obermayer et al. 2002). Apesar da similaridade cariológica entre elas, as pteridófitas heterosporadas constituem um grupo

aparentemente polifilético (Pryer et al. 2001). Citologicamente, estas últimas são conhecidas apenas pelo número cromossômico e, em alguns casos, pela morfologia cromossômica e estrutura do núcleo interfásico, sem informação sobre padrão de bandas heterocromáticas, número e localização de sítios de DNAr ou outros dados citomoleculares. Uma exceção à parte é *Selaginella* que recentemente foi investigada quanto à presença de DNA telomérico (Fuchs e Schubert 1996) e DNAr 45S (Marcon et al. 2005). Os números cromossômicos já relatados para as espécies desses gêneros mostraram a ocorrência de poliploidia e disploidia. A poliploidia pode ser reconhecida em todos ou em alguns números cromossômicos encontrados nos gêneros, a saber: *Salvinia*: $2n=18, 36, 45, 54, 63$ (Tatuno e Takei 1969; 1970; Rychlewski e Jankun 1972; Kuriachan 1979; Schneller 1980; 1981); *Azolla*, $2n=40, 44, 48, 52, 66, 88$ (Stergianou e Fowler 1989; Nayak e Singh 1989; Saunders e Fowler 1993); *Marsilea*, $2n=40, 42, 50, 60$ (Roy e Singh 1975; Kuriachan 1991); *Regnellidium*, $2n=38$ (Kuriachan 1994); *Isoetes*, $2n=20, 22, 33, 44, 55, 66, 77, 88, 110, 132$ (Love e Love 1976; Kott e Britton 1980; Hickey 1984; Britton e Brunton 1992; 1993; Rychlewski e Jankun 1972; Jermy 1991; Takamiya et al. 1996; 1997). Observa-se também que esses números nem sempre são múltiplos exatos, aparentemente devido à ocorrência simultânea de poliploidias e disploidias.

Em angiospermas e gimnospermas, técnicas citogenéticas mais refinadas têm revelado um detalhamento maior do cariótipo de várias espécies. A utilização de corantes fluorescentes como a cromomicina A₃ (CMA) e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que coram seqüências dos cromossomos ricas em pares de base GC e AT, respectivamente, tem revelado um padrão de bandas heterocromáticas importante para a caracterização de muitos cariótipos (revisado por Guerra 2000). Em algumas espécies, tem sido utilizada a tríplice coloração com CMA, DAPI e o antibiótico não fluorescente distamicina A (DA). Este último se liga preferencialmente ao DNA rico em AT, contribuindo para acentuar o contraste com as regiões

ricas em GC (Schweizer 1981). Resultados anteriores com CMA/DAPI e CMA/DA/DAPI em *Acrostichum* e *Selaginella* revelaram que essa última coloração é mais eficiente para evidenciar bandas CMA em pteridófitas (Marcon et al. 2005).

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com a utilização de seqüências de DNAr 5S e 45S como sondas, tem mostrado diferenças entre espécies tanto no número quanto na localização dos sítios de DNAr nos cromossomos, auxiliando na caracterização cromossômica e no estudo evolutivo destas espécies (Ran et al. 1999; Melo e Guerra 2003). A seqüência de DNA telomérico (TTTAGGG)_n, identificada inicialmente em *Arabidopsis thaliana* (Richards e Ausubel 1988) tem sido também investigada em várias espécies. A hibridização usando esta seqüência como sonda tem mostrado sua estabilidade evolutiva em diferentes grupos de angiospermas (Cox et al. 1993; Fuchs et al. 1995), e em uma espécie de pteridófito, *Selaginella martensii* (Fuchs e Schubert 1996). Entretanto, alguns grupos de angiospermas não apresentam esta seqüência, como por exemplo, Alliaceae e famílias relacionadas (Pich et al. 1996; Adams et al. 2000) ou entre as solanáceas dos gêneros *Cestrum*, *Vestia* e *Sessea* (Sykorova et al. 2003). No caso de algumas gimnospermas, com *Zamia* (Kondo e Tagashira 1998) e *Pinus* (Hizume et al. 2000), esta seqüência tem sido encontrada não só nos telômeros, mas também em regiões centroméricas, proximais e intercalares de alguns cromossomos.

Tendo em vista a contribuição dessas análises citomoleculares para o melhor entendimento da evolução cariológica e da taxonomia de angiospermas e gimnospermas, no presente trabalho foram investigados, além do número e morfologia cromossômica e estrutura dos núcleos interfásicos, os padrões de bandas CMA e DAPI e o número de sítios de DNAr 45S em representantes de *Salvinia*, *Azolla*, *Marsilea*, *Regnellidium* e *Isoetes*. Além disso, foram analisadas a ocorrência e distribuição da seqüência telomérica TTTAGGG em um outro representante de *Selaginella*. A distribuição dos sítios de DNAr 45S em espécies de *Selaginella* foi divulgada em outro artigo (Marcon et al. 2005).

Material e Métodos

As espécies analisadas, com seus respectivos locais de coleta, números cromossômicos observados e contagens cromossômicas prévias estão listadas na Tabela 1. Parte do material coletado foi herborizada e posteriormente identificada. As exsicatas estão depositadas nos herbários UFP e HASU. Uma outra parte do material foi cultivada no Jardim Experimental do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco para posterior análise citogenética.

Meristemas foliares de *Salvinia auriculata* Aublet, *S. minima* Baker, *Azolla caroliniana* Willd., *A. microphylla* Kaulf., *A. filiculoides* Lam. e *Selaginella willdenowii* (Desv. ex Poirlet) Baker, báculos de *Marsilea deflexa* A. Braun e *M. quadrifolia* L. e raízes de *Regnellidium diphyllum* Lindm., *Isoetes panamensis* Maxon & C.V. Morton e *I. hystrix* Dur. foram coletados e pré-tratados em 8-hidroxiquinoleína 0,002M por 20 a 24 h a 10 °C. Posteriormente, foram fixados em Carnoy (etanol:ácido acético 3:1) por 2 a 24 h à temperatura ambiente e conservados à -20°C..

Para a análise convencional, os meristemas foliares, báculos ou raízes foram lavados em água destilada, duas vezes por cinco minutos cada lavagem, hidrolisados em HCl 5N por 30 min, e o meristema isolado e esmagado em ácido acético 45%. Em seguida o material foi corado com Giemsa 5% (modificado de Guerra 1983) e montado em Entellan.

Para a localização da heterocromatina foi feita a coloração com os fluorocromos CMA e DAPI. Os meristemas foliares, báculos ou raízes foram lavados em água destilada duas vezes por cinco minutos, digeridos em uma mistura de celulase 2%-pectinase 20% por 1-5 h (dependendo da espécie) a 37 °C e esmagados em ácido acético 45%. A coloração foi procedida de acordo com Schweizer e Ambros (1994). As lâminas foram envelhecidas por três dias à temperatura ambiente, coradas com CMA (0,5 mg/ml, 1 h), contra-coradas com

distamicina A (0,1 mg/ml, 30 min), coradas com DAPI (2 µg/ml, 30 min) e montadas em glicerol/tampão McIlvaine (1:1) contendo 2,5 mM de cloreto de magnésio.

Para a localização do DNAr 45S foram utilizadas as sondas SK 18S, SK 25S e R2 de *Arabidopsis thaliana* (Unfried *et al.*, 1989; Unfried and Gruendler, 1990; Wanzenböck *et al.*, 1997), gentilmente cedidas pelo Prof. Dieter Schweizer, da Universidade de Viena, Áustria. As sondas foram marcadas por *nick translation* com biotina-11-dUTP (Sigma) ou com digoxigenina-11-dUTP (Roche). A sonda telomérica (TTTAGGG)_n foi amplificada com a utilização dos *primers* (TTTAGGG)₅ e (CCCTAAA)₅, através do método de concatenação, por PCR (Ijdo *et al.* 1991). O produto da PCR foi marcado com biotina-11-dUTP (Sigma) por *nick translation*. A técnica foi realizada de acordo com Moscone *et al.* (1996), com algumas modificações (desnaturação a 80 °C e banhos pós-hibridização em 0,1 x SSC a 42 °C). As sondas marcadas com biotina foram detectadas com anti-biotina monoclonal produzida em camundongo (Dakopatts nº M743) e visualizada com o anticorpo anti-camundongo produzido em coelho conjugado com tetrametil-rodamina isotiocianato (TRITC) (Dakopatts nº R270). A sonda marcada com digoxigenina foi detectada com anti-digoxigenina produzido em ovelha conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC) (Boehringer Mannheim nº 1207741) e visualizada com anticorpo anti-ovelha produzido em coelho, conjugado com FITC (Dakopatts F135, DAKO).

As melhores células foram capturadas com câmera de vídeo CCD Cohu no microscópio Leica DMLB, utilizando o programa Q-FISH da Leica para imagens de fluorescência e o programa IM50 para as imagens com coloração convencional. As pranchas foram confeccionadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop 6.0.

Resultados

Os números cromossômicos observados estão listados na Tabela 1. Em algumas espécies as contagens obtidas concordaram com dados já relatados na literatura, e em outras não se tem conhecimento da existência de contagens anteriores.

Com relação ao tamanho cromossômico, *Isoetes panamensis* foi a espécie que apresentou cromossomos maiores, com medidas aproximadas de 3,8 a 5,7 μm , enquanto *I. hystrix* variou entre 1,4 e 2,8 μm . O complemento cromossômico de menor tamanho foi encontrado entre as espécies de *Azolla* (0,8 a 1,4 μm), sem variação significativa entre elas. Em *Marsilea deflexa*, o tamanho cromossômico variou de 1,41 a 2,5 μm e *M. quadrifolia* apresentou cromossomos um pouco maiores, com cerca de 1,8 a 3,2 μm . *Regnellidium diphyllum* mostrou cromossomos ainda maiores com 2,1 a 4,3 μm . Dentre as espécies de *Salvinia*, *S. auriculata* apresentou a variação de 1,66 a 4,07 μm e em *S. minima* foi observado que o maior cromossomo media em torno de 3,2 μm e o menor, 1,4 μm .

Quanto à morfologia cromossômica, *S. auriculata* apresentou cariótipo composto por cromossomos metacêntricos, subtelocêntricos e, principalmente, submetacêntricos (em torno de 50%). Nessa espécie, algumas células não apresentaram satélites e em outras somente um ou dois satélites foram observados, mostrando-se bem distendidos (Fig. 1a). Nas demais espécies, a morfologia não foi bem definida, exceto em *Marsilea* (Fig. 1e, f) e *Isoetes* (Fig. 1g), que apresentaram grande parte do cariótipo composto por cromossomos submetacêntricos e metacêntricos.

Os núcleos interfásicos variaram entre arreticulados, semi-reticulados e reticulados. Núcleos arreticulados foram encontrados em *Azolla caroliniana* (Fig 1c). As espécies que apresentaram núcleos semi-reticulados foram *A. microphylla*, *A. filiculoides*, *Marsilea deflexa* (Fig. 1i) e *M. quadrifolia*. Os núcleos em *A. filiculoides* mostraram cromocentros bem

definidos (Fig. 1d). As demais espécies, como *Salvinia auriculata* (Fig 1h), *S. minima* e *Isoetes panamensis*, mostraram núcleos interfásicos reticulados.

A coloração com CMA/DA/DAPI nas espécies de *Marsilea*, *Regnellidium*, *Isoetes* e *Azolla* não mostrou um contraste muito bom. Ao contrário, em *Salvinia*, as bandas CMA⁺ se mostraram bem contrastadas. Além dessas bandas, em *S. minima* foi observado um grande número de bandas neutras para CMA e positivas com DAPI. A Tabela 2 mostra o número total de bandas CMA⁺/DAPI⁻ e o número de sítios de DNAr 45S encontrados nas espécies analisadas.

Nas três populações analisadas de *S. auriculata* (2n=45), observou-se um número máximo de 14 bandas CMA⁺/DAPI⁻ (Fig 2c, d). Em células com cromossomos mais condensados, esse número foi menor (8 a 14 bandas), provavelmente porque a maior condensação dificultou a visualização das menores bandas, enquanto as oito bandas maiores foram sempre observadas. Em dez cromossomos, as bandas mostraram-se localizadas terminalmente no braço curto, em dois cromossomos a banda ocupava a posição terminal do braço longo e nos dois outros cromossomos a banda foi localizada na região subterminal do braço longo. Na maioria das células analisadas de *S. minima* (2n=ca.63) três bandas CMA⁺/DAPI⁻ foram visualizadas. Em dois cromossomos a banda foi terminal e maior que a banda do outro cromossomo, que pareceu ser subterminal (Fig. 2h). As bandas terminais foram sempre presentes e melhor visualizadas por serem mais brilhantes. Uma quarta banda observada, em algumas poucas células, foi muito pouco contrastada. Além das bandas CMA⁺/DAPI⁻, bandas CMA⁰/DAPI⁺ foram visíveis na maioria dos braços curtos, ocupando todo ou quase todo o braço curto (Fig. 2g, h).

Em *Marsilea deflexa* (2n=40), observou-se três a seis cromossomos com bandas CMA⁺ terminais e três a quatro cromossomos com bandas intersticiais (Fig. 2b). Todas as bandas CMA⁺ foram muito pequenas, com exceção de uma banda terminal muito brilhante

(CMA⁺/DAPI⁻), sempre observada em somente um cromossomo do conjunto. As bandas CMA⁺ pareceram ser também DAPI⁻, porém nem sempre isso foi evidente, principalmente nas bandas intersticiais (Fig. 2a). Em *M. quadrifolia* (2n=40), a variação observada foi de quatro a nove cromossomos com bandas terminais e quatro a cinco cromossomos com bandas intersticiais. Um número aparentemente maior de bandas foi encontrado em células com cromossomos menos condensados, observando-se um ou dois cromossomos com duas bandas, uma terminal e outra intersticial (Fig. 2e, f).

Em *R. diphyllum* (2n=ca. 40), 10 bandas terminais CMA⁺/DAPI⁻ mais fortes foram observadas nos 40 cromossomos do complemento. Estas bandas não contrastaram muito bem com o CMA, em relação ao restante dos cromossomos, que corou também mais ou menos fortemente, entretanto, apresentaram-se melhor contrastadas com DAPI. Bandas bem menores e mais fracas foram eventualmente observadas, embora devido ao pequeno tamanho das mesmas, não tenha sido possível precisar o seu número (Fig. 2i, j).

Isoetes panamensis (2n=44) apresentou 10 bandas CMA⁺/DAPI⁻, todas terminais (Fig. 2n). As bandas CMA⁺ contrastaram pouco com o restante do cromossomo, sendo melhor observadas quando comparadas com a coloração com DAPI, onde apareceram como uma pequena região negativa no cromossomo (Fig. 2k). *Isoetes histrix* (2n=20) apresentou oito bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais, muito pequenas e pouco contrastadas. Em uma célula dessa espécie, um dos cromossomos bandeados mostrou outra banda CMA⁺ também terminal (Fig. 2l, m). Em *Azolla filiculoides* (2n=44), a única espécie do gênero analisada com fluorocromos, não foi detectada a ocorrência de bandas.

A hibridização *in situ* com o DNAr 45S mostrou em *S. auriculata* a presença de oito sítios, todos terminais. Quatro sítios geralmente apareceram mais fortes e quatro eram menores e mais fracos, todos com a mesma intensidade de sinal (Fig. 3a, b). Em *I. panamensis*, o número de sítios de DNAr 45S observado foi 10, todos terminais, sendo seis

um pouco mais fortes e maiores que os demais (Fig. 3c, d). Em *I. hystrix*, a maioria das células mostrou 10 sítios de DNAr 45S, havendo um único par cromossômico com dois sítios terminais de tamanhos diferentes, em cada cromossomo. Os demais sítios se localizaram terminalmente em três pares cromossômicos. Em apenas duas células foram observadas mais um ou dois cromossomos com um sítio de DNAr 45S muito pequenos, que talvez por isso não foram visualizados nas demais células (Fig. 3e, f). Em *M. deflexa* foram localizados 12 sítios de DNAr 45S, havendo oito cromossomos com um só sítio terminal e dois cromossomos com sítios terminais nos dois braços cromossômicos. Destes 12 sítios, dois pareceram menores e menos brilhantes (Fig. 3g, h).

A hibridização *in situ* com a sequência de DNA telomérico (TTTAGGG)_n em *Selaginella willdenowii* mostrou marcação em ambos os telômeros de todos os cromossomos (Fig. 3i, j). O tamanho dos sinais pareceu geralmente grande, embora alguns cromossomos mostrassem um dos telômeros bem pequenos. Não foram observados sinais intersticiais em nenhuma célula.

Discussão

As contagens cromossômicas feitas nas espécies analisadas no presente trabalho mostraram a ocorrência generalizada de espécies com números cromossômicos altos em relação à variabilidade conhecida dentro de seus respectivos gêneros, sugerindo que se tratem de poliplóides. Nas três populações de *Salvinia auriculata* examinadas, foi sempre observado $2n=45$, um número já reportado na literatura para esta espécie considerada um pentaplóide ($2n=5x=45$), com número básico $x=9$ (Fabri 1963; 1965). Schneller (1981) reportou a

ocorrência de um citótipo hexaplóide ($2n=6x=54$) em uma população de Trinidad para esta espécie.

A variação de tamanho cromossômico em *S. auriculata* mostrou semelhança com a da espécie *S. molesta* Mitchell, que juntamente com mais três espécies fazem parte do complexo *Salvinia auriculata* (ver Tryon e Tryon 1982). *Salvinia molesta* tem o mesmo número cromossômico que *S. auriculata* ($2n=45$) e tamanho cromossômico semelhante, entre 1,6 μm e 4,1 μm (Kuriachan 1979). Este autor agrupou os cromossomos dessa espécie em 18 grupos, sendo nove grupos de três cromossomos e nove grupos de dois cromossomos. Essa diferenciação no cariótipo levou o autor a considerar *S. molesta* como um híbrido formado por duas espécies com genomas distintos. Seguindo esse raciocínio, é provável que *S. auriculata* também tenha tido uma origem híbrida. Em *S. minima*, o número cromossômico observado foi $2n=\text{ca.}63$, com cromossomos menores que os de *S. auriculata*. Isso confirma a ocorrência nesse gênero de espécies de citótipos de ploidia ímpar, provavelmente estéreis, embora, neste caso não haja indício de hibridização interespecífica. Como essa é a primeira contagem cromossômica para essa espécie, não se sabe se existem também citótipos de nível de ploidia par ou se todos os indivíduos dessa espécie são heptaplóides. Esses dados sugerem que o complexo *Salvinia auriculata*, como um todo, tenha se originado por hibridizações entre espécies ou citótipos com diferentes níveis de ploidia, provavelmente conservando uma espécie pivotante, como observado em outros complexos poliplóides semelhantes (ver por exemplo Bennert e Fisher 1993).

As espécies de *Azolla*, *A. microphylla*, *A. caroliniana* e *A. filiculoides*, mostraram todas o mesmo número cromossômico ($2n=44$), observado anteriormente por Stergianou e Fowler (1989), que as consideraram diplóides, com $x=22$ (ver também Fabri 1963; 1965). Igualmente em *Marsilea deflexa* e *M. quadrifolia*, o número observado, $2n=40$ é considerado diplóide, em vista dos números básicos $x=20$ e 22 do gênero (Fabri 1963; 1965).

Espécies poliplóides são mais comuns no gênero *Isoetes*, que mostra uma variação de $2n=20$ a $2n=132$ (Love e Love 1976; Kott e Britton 1980; Hickey 1984; Britton e Brunton 1992; 1993; Rychlewski e Jankun 1972; Takamiya et al. 1996; 1997). Essas espécies apresentam múltiplos de $x=11$, como o tetraplóide *I. panamensis* ($2n=44$), com exceção de *I. histrix* ($2n=20$) (ambas analisadas neste trabalho) e *I. pantii* ($x=12$) (ver Goswami 1975). A ocorrência de citótipos aneuplóides e poliplóides, que vão do nível diplóide ao dodecaplóide (ver Takamiya et al. 1994), parece ser devido principalmente à especiação por aloploidia, um fator evolutivo importante dentro do gênero (Taylor e Hickey 1992; Takamiya et al. 1996).

Com relação à estrutura dos núcleos interfásicos, foram observados núcleos arreticulados em *A. caroliniana*, semi-reticulados nas demais espécies de *Azolla*, *Marsilea* e *Regnellidium* e reticulados em *Salvinia* e *Isoetes*. Essa diversidade é comparável à que se observa em algumas famílias de angiospermas com bastante variação, como Orchidaceae (Felix e Guerra 1998; 2000, e Commelinaceae (Pitrez et al. 2001), e muito diferente das pteridófitas homosporadas, que apresentam núcleos reticulados muito densos em sua grande maioria (ver Delay 1949; Marcon et al. 2003a).

Trabalhos de bandeamento cromossômico e hibridização fluorescente *in situ* são escassos em pteridófitas, ao contrário do que ocorre nas angiospermas e gimnospermas, onde a aplicação destas técnicas tem sido melhor explorada e tem trazido uma contribuição significativa para os trabalhos de citotaxonomia e evolução cromossômica (ver, por exemplo, Hizume et al. 1989; Hizume et al. 2002; Cornélio et al. 2003). De uma maneira geral, os cromossomos das pteridófitas não produzem um padrão de bandas bem definido com CMA/DAPI. Muito freqüentemente a eucromatina cora bastante com ambos os fluorocromos e a diferenciação das bandas é pobre e variável. Essa variação parece significativa, uma vez que nas mesmas condições em que foi realizado esse trabalho diversas espécies de

angiospermas foram analisadas sempre com bom contraste e repetibilidade (ver, por exemplo, Cornélio et al. 2003; Melo et al. 2001).

O uso combinado das técnicas de coloração com fluorocromos e FISH mostrou que os sítios de DNAr 45S geralmente coram positivamente com CMA, possivelmente por serem ricos em pares de base GC (revisado por Guerra 2000). Comportamento semelhante foi observado nas espécies de pteridófitas homosporadas *Acrostichum danaeifolium* e *A. aureum* (Marcon et al. 2003b) e nas heterosporadas *Selaginella willdenowii* e *S. convoluta* (Marcon et al. no prelo). No presente trabalho, essa relação foi verificada em duas das quatro espécies nas quais as duas técnicas foram testadas seqüencialmente: *I. panamensis* e *I. histrix*. Em *Salvinia auriculata* e *Marsilea deflexa*, entretanto, não se conseguiu uma coloração seqüencial e não foi possível confirmar a co-localização das bandas/sítios. Contudo, os sítios de DNAr e as bandas CMA que puderam ser visualizadas tinham a mesma posição cromossômica, sugerindo uma co-localização ao menos para a maioria dessas marcas. As demais bandas CMA⁺ observadas em *S. auriculata* (que mostrou um número maior de bandas CMA em relação aos sítios de DNAr 45S), provavelmente são independentes dos sítios de DNAr 45S, como ocorre em *Citrus* e outras espécies (Carvalho et al. no prelo). Neste trabalho, foi utilizado o critério de que o maior número de bandas/sítios claramente distinto é o mais representativo da espécie.

Salvinia minima foi a única espécie analisada no presente trabalho que apresentou regiões cromossômicas que coraram positivamente com DAPI. Em angiospermas, essas bandas (ricas em AT) são mais freqüentes nas regiões proximais de cromossomos pequenos (Guerra 2000). Nesta espécie, as bandas pareceram ocupar todo o braço curto, o que em parte coincide com as regiões proximais.

Um fato curioso é que em *Isoetes* o número de bandas/sítios foi praticamente o mesmo em uma espécie com $2n=20$ (*I. histrix*) e outra com $2n=44$ (*I. panamensis*). A ocorrência de

espécies de *Isoetes* com números cromossômicos baixos ($2n=20, 22$), indica que esse gênero foi originalmente diplóide, provavelmente com $x=11$ (Takamiya et al. 1996). Entretanto, comparando-se o diplóide *I. hystrix* com o tetraplóide *I. panamensis*, observa-se que essas espécies divergiram não apenas no nível de ploidia e no número de bandas heterocromáticas e de sítios de DNAr, mas de forma ainda mais dramática no tamanho de seus cromossomos, que aumentou no tetraplóide ao invés de reduzir, como ocorre na maioria dos poliplóides (ver, por exemplo, Stergianou e Fowler 1990). Por outro lado, *I. hystrix* apresenta um cariótipo muito diferente da maioria das espécies diplóides conhecidas nesse gênero (Britton e Goltz 1991; Takamiya et al. 1994) com cromossomos menores e menor número cromossômico. Esses dados sugerem que essas duas espécies derivam de linhagens muito distintas dentro do gênero. Mais provavelmente, a diversidade estrutural que levou à diversidade de tamanho cromossômico e diferenciação longitudinal dos mesmos ocorreu, em grande parte, antes da formação do poliplóide. Portanto, a similaridade de bandas/sítios entre essas duas espécies é mais provavelmente casual.

Os resultados iniciais obtidos com a hibridização *in situ*, indicam que as espécies de pteridófitas heterosporadas, que possuem em média números cromossômicos menores que as homosporadas, apresentam um número de sítios relativamente maior do que as homosporadas. *Acrostichum aureum* e *A. danaeifolium* ($2n=60$) apresentaram seis e quatro sítios de DNAr 45S, respectivamente (Marcon et al. 2003b), *Ceratopteris richardii* ($2n=72$), mostrou seis sítios maiores desta sequência (McGrath e Hickok 1999) e *Ophioglossum* sp., com $n=120$ mostrou 14 sítios (dados não publicados). Essa divergência pode ser devida à suposta natureza paleopoliplóide da maioria das pteridófitas homosporadas atuais, que sofrem uma maior pressão para “diploidizar” o genoma através do silenciamento de genes duplicados (Soltis e Soltis 2000). Pichersky et al. (1990) analisaram cinco clones do gene *CAB* em *Polystichum munitum* ($n=41$) e observaram que quatro não eram funcionais, sugerindo que teria acontecido

um silenciamento das cópias extras desse gene. No caso dos sítios de DNAr, as cópias extras podem ter sido silenciadas por eventos epigenéticos, seguidos de mutação e homogeneização de seqüências (evolução em concerto) ou deleção, o que levaria à perda completa da identidade dessas seqüências. Esses eventos parecem comuns em poliplóides (Wendel 2000).

A sonda telomérica (TTTAGGG)_n utilizada em *Selaginella willdenowii*, mostrou marcação somente nos telômeros, sem nenhum sinal na região centromérica ou intercalar, como observado em algumas angiospermas e gimnospermas. Fuchs e Schubert (1996) utilizaram essa mesma seqüência em *S. martensii* e encontraram uma idêntica marcação. Resultados semelhantes foram observados na pteridófitas homosporada *Ophioglossum* sp. (dados não publicados). Portanto, é provável que ao menos a maioria das pteridófitas apresentem em seus telômeros a mesma seqüência (TTTAGGG)_n encontrada em outros grupos de plantas distantemente relacionados.

Esses dados sugerem que em relação às seqüências fundamentais para a estrutura e função cromossômica, como a seqüência telomérica ou os genes essenciais à manutenção da célula (*housekeeping* genes) como o DNAr, os cromossomos das pteridófitas não diferem dos cromossomos típicos das angiospermas. Brandes et al. (1997) mostraram, por FISH, que os retrotransposons, abundantes nas angiospermas, também aparecem dispersos nos cromossomos das pteridófitas, constituindo-se em um componente importante na composição da cromatina. Entretanto, a coloração com os fluorocromos CMA e DAPI parece indicar uma diferença significativa na composição de pares de base AT ou GC dos cromossomos das pteridófitas. O significado dessa diferença ainda precisa ser mais investigado. A análise de outras espécies com CMA/DAPI ou com sondas mais específicas, como microsatélites ricos em AT ou GC, certamente auxiliarão na compreensão da estrutura desses cromossomos.

Os autores agradecem aos Drs. Leonardo Pessoa Felix (UFPB) e Leopoldo Medina (Jardim Botânico de Madri), a Carlos Rodrigo Lehn (UNISINOS) e Carlos Eduardo Everton Machado (UFMA) pela coleta de algumas espécies utilizadas neste trabalho, ao Dr. James Hickey (Depto. de Botânica, Universidade de Miami) pela identificação de *Isoetes panamensis* e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

Referências

- Abraham A, Ninan CA, Mathew PM (1962) Studies on the cytology and phylogeny of the pteridophytes VII: Observations on one hundred species of South Indian ferns. J Indian bot Soc 41: 340–421
- Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Leitch AR (2000) *Aloe* L. – a second plant family without (TTTAGGG)_n telomeres. Chromosoma 109: 201–205
- Bennert HW, Fischer G (1993) Biosystematics and evolution of the *Asplenium trichomanes* complex. Webbia 48: 743–760
- Bennett MD, Leitch IJ (2001) Nuclear DNA amounts in Pteridophytes. Ann Bot 87: 335–345
- Brandes A, Heslop-Harrison JS, Kamm A, Kubis S, Doudrick RL, Schmidt T (1997) Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of Ty1-*copia*-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. Plant Mol Biol 33: 11–21
- Britton DM, Brunton DF (1992) *Isoetes* x *jeffreyi*, hyb. nov., a new *Isoetes* (*Isoetes macrospora* x *Isoetes riparia*) from Quebec, Canada. Can J Bot 70: 447–452

- Britton DM, Brunton DF (1993) *Isoetes x truncata*: a newly considered pentaploid hybrid from western North America. Can J Bot 71:1016–1025
- Britton DM, Goltz JP (1991) *Isoetes prototypus*, a new diploid species from easter Canada. Can J Bot 69: 277–281
- Carvalho R, Soares Filho WS, Guerra M Evidências citológicas da origem híbrida das limas e limões diplóides e suas relações com cidras e pomelos. no prelo.
- 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 Syst Evol 240: 149–161
- Cox AV, Bennett ST, Parokonny AS, Kenton A, Callimassia MA, Bennett MD (1993) Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe. Ann Bot 72: 239–247.
- Delay C (1949) Recherches sur la structure des noyauxquiescents chez les phanérogames. Rev Cytol Cytophysiol Veg 10: 103-228.
- Fabri F (1963) Primo supplemento alle tavole cromosomiche delle Pteridophyta di Alberto Chiarugi. Caryologia 16: 238–335
- Fabri F (1965) Secondo supplemento alle tavole cromosomiche delle Pteridophyta di Alberto Chiarugi. Caryologia 18: 675–731
- Felix LP, Guerra M (1998) Cytogenetic studies on species of *Habenaria* (Orchidoideae: Orchidaceae) occuring in the northeast of Brazil. Lindleyana 13: 224–230
- Felix LP, Guerra M (2000) Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. Genet Mol Biol 23: 957–978
- Fuchs J, Brandes A, Schubert I (1995) Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. Plant Syst Evol 196: 227–241

- Fuchs J, Schubert I (1996) *Arabidopsis*-type telomere sequences on chromosome termini of *Selaginella martensii* Spring (Pteridophyta). Biol Zent bl 115: 260–265
- Goldblatt P (1981) Index to plant chromosome numbers 1975-1978. Missouri Botanical Garden, Saint Louis
- Goldblatt P (1988) Index to plant chromosome numbers 1984-1985. Missouri Botanical Garden, Saint Louis
- Goswami HK (1975) Chromosome studies in natural populations of *Isoetes pantii*, with heterosporous sporangia. Cytologia 40: 543–551
- Guerra M (1983) O uso de Giemsa na citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandeamento. Ciência e Cultura 35: 191–193
- Guerra M (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. Genet Mol Biol 23:1029–1041
- Hickey RJ (1984) Chromosome numbers of neotropical *Isoetes*. Amer Fern J 4: 9–13
- Hizume M, Ohgiku A, Tanaka A (1989) Chromosome banding in the genus *Pinus* II. Interspecific variation of fluorescent banding patterns in *P. densiflora* and *P. thunbergii*. Bot Mag 102: 25–36
- Hizume M, Shibata F, Matsusaki Y, Kondo T (2000) Chromosomal localization of telomere sequence repeats in five gymnosperm species. Chrom Sci 4: 39–42
- Hizume M, Shibata F, Matsusaki Y, Garajova Z (2002) Chromosome identification and comparative karyotypic analyses of four *Pinus* species. Theor Appl Genet 105: 491–497
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. Nucl Acids Res 19: 4780
- Jermy AC (1991) Isoetaceae. In: Kramer KU, Green PS (eds) Chromosome Pteridophytes and Gymnosperms. Springer-Verlag, Berlin.

- Kondo K, Tagashira N (1998) Regions *in situ*-hybridized by the *Arabidopsis*-type telomere sequence repeats in *Zamia* chromosomes. *Chrom Sci* 2: 87–89
- Kott LS, Britton DM (1980) Chromosome numbers for Isoetes in northeastern North America. *Canad J Bot* 58: 980–984
- Kramer KU, Green PS (1990) The families and genera of vascular plants. vol I. Pteridophytes and Gymnosperms. Springer-Verlag, Berlin
- Kuriachan PI (1979) Interspecific origin of *Salvinia molesta* Mitchell-evidence from karyotype. *Ind J Bot* 2: 51–54
- Kuriachan PI (1991) Cytology of *Marsilea coromandelina* Burm. F. from Kerala. *Ind Fern J* 8: 151–153
- Kuriachan PI (1994) Karyotype of *Regnellidium diphyllum* Lindm. *Caryologia* 47: 311–314
- Lin YX, Sleep A (1988) A chromosome count from *Azolla filiculoides* (Azollaceae: Pteridophyta). *Fern Gaz* 13: 194–198
- Love A, Love D (1976) IOPB chromosome number reports XLVIII. *Taxon* 25: 483–500
- Marcon AB, Barros ICL, Guerra M (2003a) Cariologia de algumas espécies de pteridófitas ocorrentes no nordeste do Brasil. *Acta Bot Bras* 17: 19-26
- Marcon AB, Barros ICL, Guerra M. (2003b) A karyotype comparison between two closely related *Acrostichum* L. (Pteridaceae) species. *Amer Fern J* 93: 116–125
- Marcon AB, Barros ICL, Guerra M. (2005) Variation in chromosome number, CMA bands and 45S rDNA sites in species of *Selaginella* P. Beauv. (Pteridophyta). *Ann Bot*: 95: 271-276
- McGrath JM, Hickok LG (1999) Multiple ribosomal RNA gene loci in the genome of the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. *Can J Bot* 77: 1199–1202
- Melo NF, Cervi AC, Guerra M (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant Syst Evol* 226: 69–84

- Melo NF, Guerra M (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Ann Bot* 92: 309–316
- Moore RJ (1973) Index to plant chromosome numbers for 1967-1971. *Regnum Vegetabile* 90: 1–539
- Moore RJ (1977) Index to plant chromosome numbers for 1973-1974. *Regnum Vegetabile* 96: 1–257
- Moscone EA, Matzke MA, Matzke AJM (1996) The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* 105: 231–236
- Nayak SK, Singh PK (1989) Cytological studies in the genus *Azolla*. *Cytologia* 54: 275–286
- Obermayer R, Leitch IJ, Hanson L, Bennett MD (2002) Nuclear DNA C-values in 30 species double the familial representation in Pteridophytes. *Ann Bot* 90: 209–217
- Pich U, Fuchs J, Schubert I (1996) How do Alliaceae stabilize their chromosomes ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosome Res* 4: 207–213
- Picherski E, Soltis D, Soltis P (1990) Defective chlorophyll a/b-binding protein genes in the genome of a homosporous fern. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 195–199
- Pitrez SR, Felix LP, Barreto R, Guerra M (2001) Números cromossômicos de espécies de Commelinaceae R. BR. ocorrentes no nordeste do Brasil. *Bol Bot Univ São Paulo* 19: 7–14
- Pryer KM, Schneider H, Smith AR, Cranfill R, Wolf PG, Hunt JS, Sipes SD (2001) Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest relatives to seed plants. *Nature* 409: 618–621
- Ran Y, Murray BG, Hammett KRW (1999) Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and *in situ* hybridization. *Euphytica* 106: 139–147

- Roy SK, Singh JB (1975) A note on the chromosome numbers in some ferns from Pachmarhi hills, Central India. *Sci Cult* 41: 181–183
- Rychlewski J, Jankun A (1972) Chromosome number of some Polish Pteridophytes. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 15: 51–60
- Salvo E (1990) Guia de helechos de la Peninsula Ibérica y Baleares. Ediciones Pirâmide, S. A., Madri.
- Saunders RMK, Fowler K (1993) The supraspecific taxonomy and evolution of the fern genus *Azolla* (Azollaceae). *Plant Syst Evol* 184: 175–193
- Schneller JJ (1981) Chromosome numbers and spores of *Salvinia auriculata* Aublet s.s. *Aquatic Bot* 10: 81–84
- Schweizer D (1981) Counterstain-enhanced chromosome banding. *Hum Genet* 57: 1–14
- Schweizer D, Ambros PF (1994) Chromosome banding. In: Gosden JR (ed) *Methods in Molecular Biology*, 29. Humana Press, Totowa, pp. 97–112.
- Soltis PS, Soltis DE (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7051–7057
- Stergianou KK, Fowler K (1989) Preliminary report of chromosome counts in the genus *Azolla* (Pteridophyta). *Fern Gaz* 13: 317–319
- Stergianou KK, Fowler K (1990) Chromosome numbers and taxonomic implications in the fern genus *Azolla* (Azollaceae). *Plant Syst Evol* 173: 223–239
- Sykorova E, Lim KY, Chase MW, Knapp S, Leitch IJ, 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. *Plant J* 34: 283–291
- Takamiya M (1993) Comparative karyomorphology and interrelationships of *Selaginella* in Japan. *J Plant Res* 106: 149–166

- Takamiya M, Watanabe M, Ono K (1994) Biosystematic studies on the genus *Isoetes* in Japan I. Variations of the somatic chromosome numbers. J Plant Res 107: 289–297
- Takamiya M, Watanabe M, Ono K (1996) Biosystematic studies on the genus *Isoetes* (Isoetaceae) in Japan II. Meiotic behavior and reproductive mode of each cytotype. Amer J Bot 83: 1309–1322
- Takamiya M, Watanabe M, Ono K (1997) Biosystematic studies on the genus *Isoetes* (Isoetaceae) in Japan. IV. Morphology and anatomy of sporophytes, phytogeography and taxonomy. Acta Phytotax Geobot 48: 89–122
- Tatuno S, Takei M (1969) Cytological studies of Salviniaceae I. Karyotype of two species in the genus *Salvinia*. Bot Mag Tokio 82: 403–408
- Tatuno S, Takei M (1970) Cytological studies of Salviniaceae II. Bot Mag Tokio 83: 67–73
- Taylor WC, Hickey RJ (1992) Habitat, evolution, and speciation in *Isoetes*. Ann Missouri Bot Gard 79: 613–622
- Tryon RM, Tryon AF (1982) Ferns and allied plants - with special reference to tropical America. Springer-Verlag, New York
- Unfried I, Stocker U, Gruendler P (1989) Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from *Arabidopsis thaliana* Col0. Nucl Acids Res 17:7513.
- Unfried I, Gruendler P (1990) Nucleotide sequence of the 5.8S and 25S rRNA genes and of the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana*. Nucl Acids Res 18:4011.
- Walker TG (1984) Chromosomes and evolution in pteridophyte. In: Sharma AK, Sharma A (eds) Chromosome Evolution of Eukaryotic Groups II. CRC Press, Boca Raton, pp 103–141
- 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 J 11: 1007–1016

Wendel JF (2000) Genome evolution in polyploids. Plant Mol Biol 42: 225–249

Tabela 1 Espécies analisadas no presente trabalho, com local de coleta, números cromossômicos observados e contagens cromossômicas prévias. Todas as espécies foram coletadas em estados brasileiros, exceto *Marsilea quadrifolia*, procedente de Portugal, e *Azolla filiculoides* e *Isoetes histrix*, procedentes da Espanha.

Espécies	Procedência	Número cromossômico (2n)	Contagens prévias (2n)	Referências
Azollaceae				
<i>Azolla caroliniana</i> Willd.	PE, Gravatá	44	44, 66	Stergianou e Fowler 1989, 1990
<i>Azolla microphylla</i> Kaulf.	SE, próximo a Neópolis	44	44, 66	Stergianou e Fowler 1989, 1990
<i>Azolla filiculoides</i> Lam.	Ciudad Real	44	40, 44, 66	Stergianou e Fowler 1989; Nayak e Singh 1989; Lin e Sleep 1988
Salvinaceae				
<i>Salvinia auriculata</i> Aublet	PE, Recife	45	45; 54	Fabri 1963; Schneller 1981
	PE, Sirinhaém	45		
	MT, Pantanal	45		
<i>Salvinia minima</i> Baker	MA, São Luís	ca. 63	—	—
Marsileaceae				
<i>Marsilea deflexa</i> A. Braun	PB, Itapororoca	40	—	—
<i>Marsilea quadrifolia</i> L.	Trás-os-Montes	40	40	Abraham, Ninan e Mathew 1962; Fabri 1963; Goldblatt 1988
<i>Regnellidium diphyllum</i> Lindm.	RS, Triunfo	ca. 40	38; 38+B; 38+(1-5B);	Moore 1973; Moore 1977; Goldblatt 1981 Kuriachan 1994; Abraham, Ninan e Mathew 1962
Isoetaceae				
<i>Isoetes histrix</i> Dur.	Sevilla	20	20	Jermy 1991
<i>Isoetes panamensis</i> Maxon & C.V. Morton	MA, Timon	44	—	—
Selaginellaceae				
<i>Selaginella willdenowii</i> (Desv. ex Poiret) Baker	PE, Recife	18	18	Fabri 1963; Kuriachan 1963; Jermy <i>et al.</i> 1967

Tabela 2 Localização das bandas CMA⁺ e sítios de DNAr 45S nas espécies investigadas

Espécie	2n	Número e localização das bandas CMA ⁺	Localização dos sítios de DNAr 45S
<i>Salvinia auriculata</i>	45	14 bandas (12 terminais e 2 subterminais)	8 sítios terminais
<i>S. minima</i>	ca. 63	4 bandas (3 terminais e 1 subterminal)	_____
<i>Marsilea deflexa</i>	40	10 bandas (6 terminais e 4 intercalares)	12 sítios terminais
<i>M. quadrifolia</i>	40	14 bandas (9 terminais e 5 intercalares)	_____
<i>Regnellidium diphyllum</i>	ca. 40	10 bandas terminais	_____
<i>Isoetes panamensis</i>	44	10 bandas terminais	10 sítios terminais
<i>I. histrix</i>	20	9 bandas terminais	12 sítios terminais

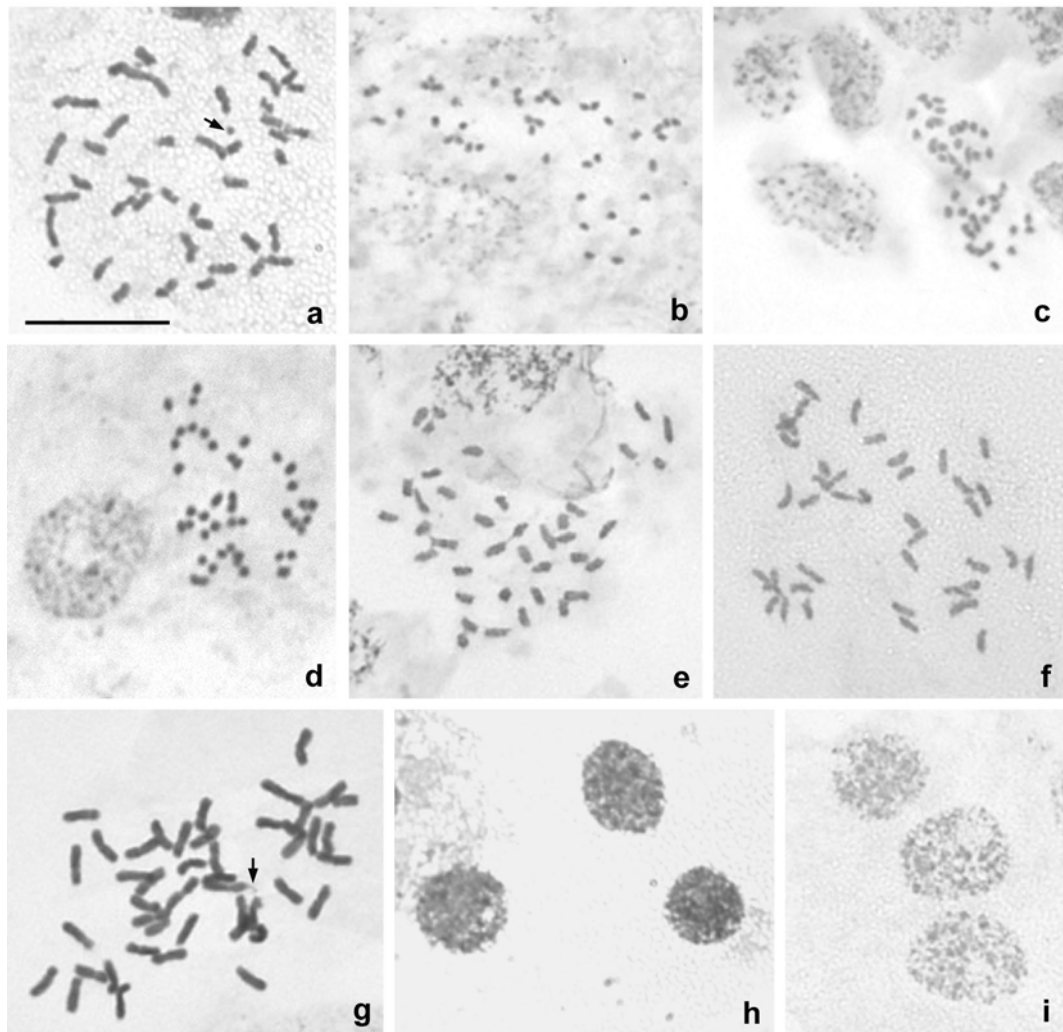


Fig. 1 a-g Coloração convencional mostrando metáfases mitóticas; **h, i** núcleos interfásicos. **a** *Salvinia auriculata*, $2n=45$. **b** *Azolla microphylla*, $2n=44$. **c** *A. caroliniana*, $2n=44$. **d** *A. filiculoides*, $2n=44$. **e** *Marsilea deflexa*, $2n=40$. **f** *M. quadrifolia*, $2n=40$. **g** *Isoetes panamensis*, $2n=44$. **h** núcleos interfásicos reticulados em *S. auriculata*. **i** núcleos semi-reticulados em *M. quadrifolia*. Note em **c**, detalhe dos núcleos interfásicos arreticulados em *A. caroliniana*. Setas apontam satélites. Barra corresponde a 10 μ m.

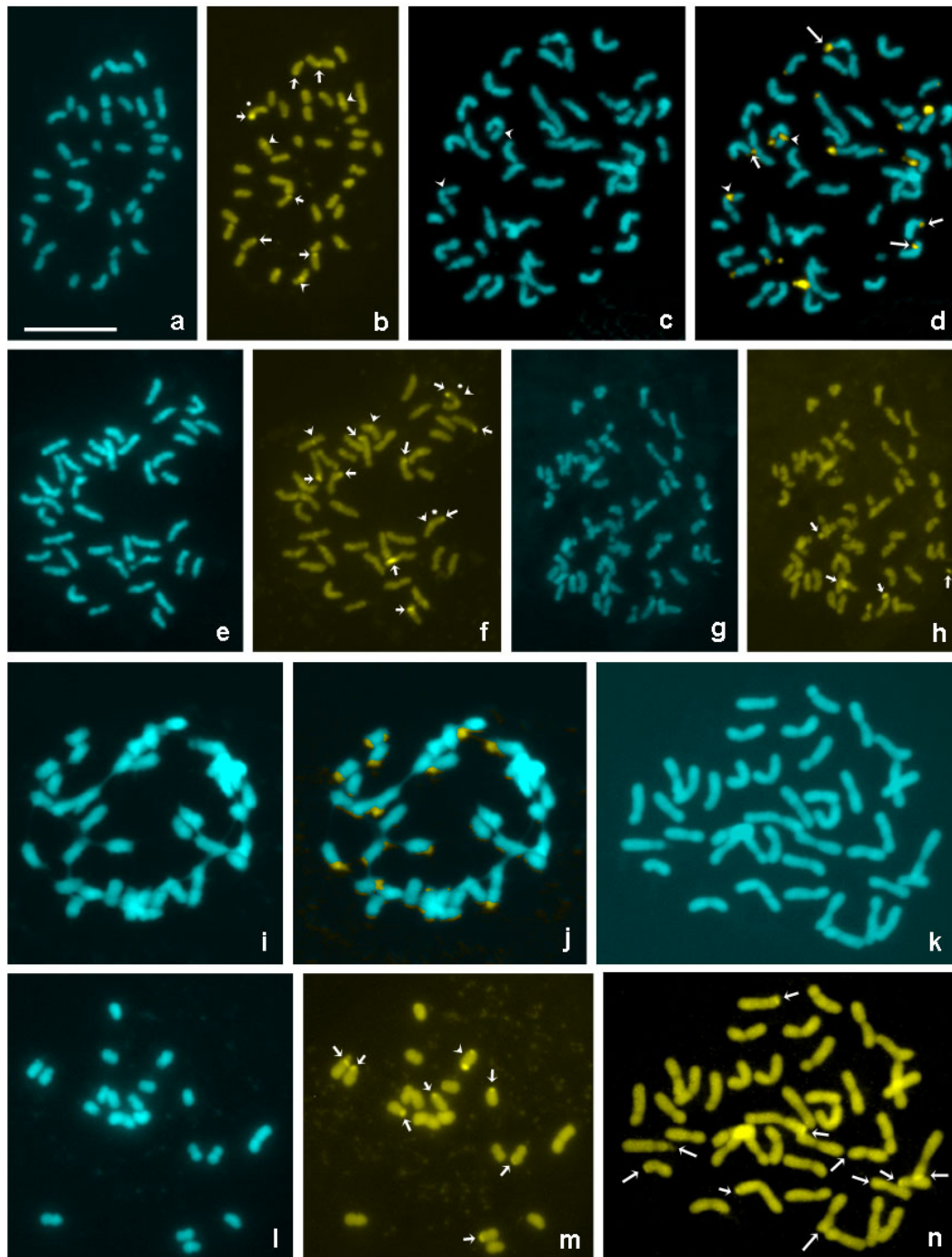


Fig. 2a-n Tríplice coloração CMA/DA/DAPI. **a, b** *Marsilea deflexa*. **c, d** *Salvinia auriculata*. **e, f** *M. quadrifolia*. **g, h** *S. minima*. **i, j** *Regnellidium diphyllum*. **k, n** *Isoetes panamensis*. **l, m** *I. histrix*. Figuras **d, j** mostram imagens com DAPI e CMA sobrepostas; **a, c, e, g, i, k, l** coloração DAPI; **b, f, h, m, n** coloração CMA. Cabeças de seta em **d** mostram bandas CMA⁺ intercalares no braço longo de um par cromossômico e em **c** mostram a banda DAPI; em **b, f** mostram pequenas bandas CMA⁺ intercalares e em **m** mostra um cromossomo com duas bandas CMA⁺ terminais. Setas em **c, e, g, k, m** apontam bandas CMA⁺ terminais. Asterisco em **b** mostra o único cromossomo do conjunto com uma banda CMA⁺ terminal mais forte que os demais e, em **f** mostra o par cromossômico com duas bandas CMA⁺ (uma terminal e outra intercalar). Barra corresponde a 10 µm.

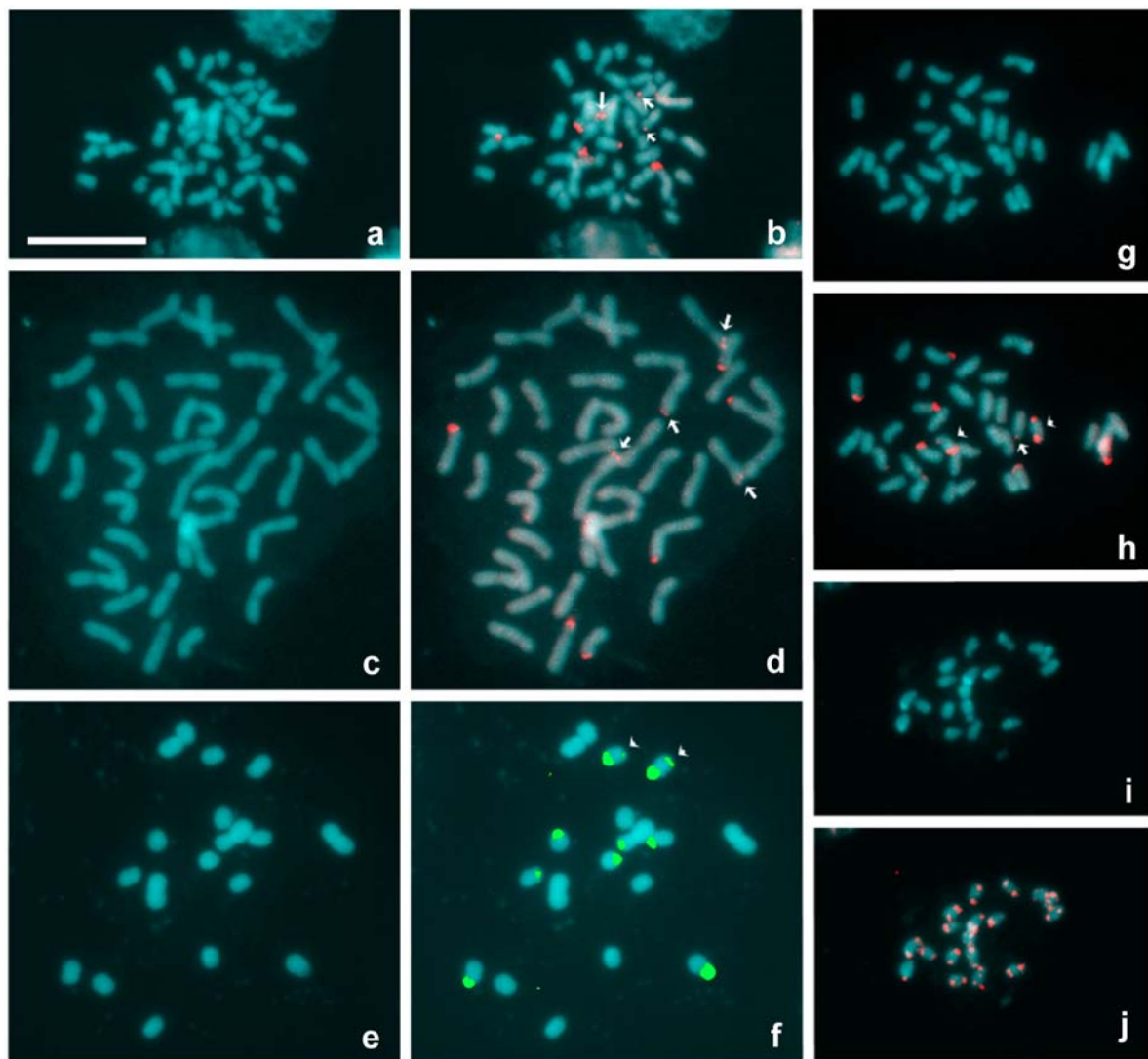


Fig. 3a-h Hibridização *in situ* com as sondas de DNAr 45S; **i, j** hibridização *in situ* com sequência de DNA telomérico (TTTAGGG)_n. **a, b** sítios de DNAr 45S em *Salvinia auriculata*. **c, d** *Isoetes panamensis*. **e, f** *I. histrix*. **g, h** *Marsilea deflexa*. **i, j** marcação telomérica em *Selaginella willdenowii*. Figuras **b, d, h, j** mostram imagens com DAPI e TRITC sobrepostas; figura **f** mostra imagem com DAPI e FITC sobrepostas. **a, c, e, g, i** coloração DAPI. Setas apontam sítios de DNAr 45S menores e mais fracos. Cabeças de seta em **h** apontam par cromossômico com dois sítios de DNAr 45S terminais Barra corresponde a 10 µm.

4.3 Manuscrito 3

Citogenética molecular de pteridófitas II. Padrão de fosforilação da histona H3

Manuscrito a ser submetido à revista *Plant Systematics and Evolution*

Citogenética molecular de pteridófitas II. Padrão de fosforilação da histona H3

A.B.Marcon e M.Guerra

Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

Resumo: A fosforilação da histona H3 em cromossomos mitóticos e meióticos parece ser um dos mecanismos fundamentais no controle do ciclo nuclear de todos os eucariotas. Entretanto, o padrão de fosforilação da H3 é conhecido apenas em alguns animais e angiospermas. No presente trabalho foi feita a imunocoloração indireta com um anticorpo que reconhece a histona H3 fosforilada na serina 10 em quatro espécies de pteridófitas, com o objetivo de verificar se o padrão de fosforilação nas pteridófitas se assemelha ao padrão dominante nas angiospermas. Para isso, foi analisado o padrão de fosforilação da H3 durante a mitose de três espécies de pteridófitas heterosporadas (*Selaginella willdenowii*, *Marsilea deflexa* e *Regnellidium diphyllum*) e em mitose e meiose de uma espécie homosporada (*Acrostichum danaeifolium*). Em todas as células mitóticas, foi visto um início de fosforilação a partir de prófase final – prometáfase, estendendo-se até anáfase inicial e desaparecendo em anáfase final, enquanto na intérfase e nas demais fases não foi observado nenhum indício de marcação. Em mitose, as regiões centroméricas e pericentroméricas dos cromossomos de todas as espécies se mostraram fortemente marcadas, enquanto os braços cromossômicos apareceram não-marcados ou muito fracamente marcados. Nas células meióticas de *A. danaeifolium*, a fosforilação começou a ser observada apenas a partir de diplóteno final até a anáfase I, sendo mais ou menos igualmente intensa ao longo de toda extensão dos

cromossomos. Em metáfase II, entretanto, apenas a região terminal, provavelmente pericentromérica, mostrou-se corada, persistindo esse padrão até a anáfase II, e desaparecendo na telófase II. O padrão observado nas pteridófitas se mostrou similar ao encontrado nas angiospermas com cromossomos monocêntricos, tanto em células mitóticas quanto meióticas. Esse padrão difere claramente do existente em plantas com cromossomos holocêntricos e em animais e sugere que a diferenciação quanto ao padrão de fosforilação de plantas e animais tenha surgido no início da separação desses grupos.

Palavras-chave: imunocoloração, fosforilação da histona H3, pteridófitas, mitose, meiose

Até recentemente, os ciclos mitótico e meiótico eram discutidos apenas no nível citológico e de um ponto de vista mecanicista. Uma série de técnicas recentes, incluindo a fusão da proteína fluorescente verde (“green fluorescent protein”) com proteínas nucleolares e com tubulinas do aparelho do fuso e o desenvolvimento de novos anticorpos para diversas proteínas nucleolares, têm revolucionado a compreensão desse mecanismo e o entendimento do controle dos ciclos nucleares (veja Swedlow e Hirano 2003).

No processo de condensação cromossômica, tanto na mitose quanto na meiose, ocorrem alterações importantes na estrutura de algumas histonas, das quais a mais conhecida é a fosforilação da histona H3 na serina-10. O mecanismo de atuação da fosforilação na condensação do filamento de DNA não está esclarecido, mas o modelo mais aceito propõe que a fosforilação da serina-10 da H3 reduziria a interação DNA-histona promovendo uma descondensação local da cromatina, o que facilitaria a ligação com outros fatores de condensação, como a topoisomerase II e a condensina (Hendzel et al. 1997; Wei et al. 1998). Em células de mamíferos o processo de fosforilação da H3 parece ter início no final da fase

G2, estendendo-se até a anáfase, acompanhando a condensação da cromatina (Hendzel et al. 1997). Resultado semelhante foi observado no micronúcleo do protozoário *Tetrahymena thermophila* (Wei et al. 1998) e em células somáticas de plantas, como centeio, cevada, *Vicia faba*, trigo e milho (Houben et al. 1999; Kaszás e Cande 2000). Contudo, a relação entre fosforilação e condensação pode não ser universal. Manzanero et al. (2000), por exemplo, propõem que a fosforilação da histona H3 em plantas pode estar relacionada principalmente à coesão das cromátides-irmãs.

Embora a fosforilação da H3 seja um fenômeno bem conservado entre os eucariotos, algumas diferenças foram observadas entre cromossomos mitóticos de animais e de vegetais e entre a primeira e a segunda divisão meiótica. Em células mitóticas de animais, a fosforilação inicia-se nas regiões pericentroméricas dos cromossomos e acompanha a condensação da cromatina ao longo de toda a sua extensão, resultando em cromossomos mitóticos completa e uniformemente fosforilados (Hendzel et al. 1997; Manzanero et al. 2000). Nas mitoses dos vegetais, entretanto, somente a região pericentromérica aparece fosforilada, ficando o restante dos cromossomos fracamente fosforilado ou não fosforilado (Houben et al. 1999). Durante a meiose I dos vegetais, todos os cromossomos se mostram inteiramente fosforilados enquanto que na meiose II a fosforilação ocorre apenas nas regiões pericentroméricas. Ao contrário, nos animais, tanto na meiose I quanto II, todo o cromossomo é fosforilado (Manzanero et al. 2000; Kaszás e Cande 2000).

Embora a fosforilação da histona H3 e a condensação cromossômica sejam fenômenos claramente relacionados, parece não haver uma relação causal entre ambos. Cobb et al. (1999) concluíram que em espermátócitos de camundongos a fosforilação da H3 pode ser necessária para a condensação dos cromossomos meióticos, mas não seria suficiente. Em plantas, a fosforilação da H3 parece estar mais relacionada à coesão das cromátides-irmãs que à condensação cromossômica, em ambas as divisões meióticas. Nesse caso, a fosforilação

poderia promover a coesão entre as cromátides-irmãs estabilizando a ligação da coesina com a cromatina durante a metáfase, e ainda, poderia preparar os cromossomos para a destruição da coesina na transição da metáfase para a anáfase (Kaszás e Cande 2000, Swedlow e Hirano 2003).

Embora as diferenças com respeito à fosforilação da H3 entre os cromossomos dos animais e plantas até agora investigados pareçam claras, não se sabe se esse comportamento se aplica igualmente a todos os vegetais ou a todos os animais. Em alguns casos, a organização molecular tem mostrado diferenças importantes dentro de determinados grupos. Por exemplo, a sequência telomérica encontrada em *Arabidopsis thaliana* pareceu inicialmente hibridizar nos telômeros de todas as plantas (Cox et al. 1993, Fuchs et al. 1995). Entretanto, Pich et al. (1996) observaram que essa sequência era ausente em cebola e posteriormente foi visto que estava ausente também em várias famílias relacionadas às Alliaceae e em algumas outras angiospermas (Adams et al. 2000, Sykorova et al. 2003). Por outro lado, nas gimnospermas essa sequência tem sido também encontrada fora dos telômeros (Kondo e Tagashira 1998, Hizume et al. 2000). Em relação à fosforilação da histona H3, a única variação conhecida em plantas foi reportada por Gernand et al. (2003) em cromossomos holocêntricos de *Luzula luzuloides*. Nessa espécie, a fosforilação dos cromossomos ocorre uniformemente em toda a sua extensão, não sendo restrita à região pericentromérica como visto em outras plantas. Afora as angiospermas, nenhum outro grupo de plantas foi investigado quanto ao processo de fosforilação da histona H3. No presente trabalho, procurou-se investigar o padrão de fosforilação da histona H3 nos cromossomos mitóticos de quatro espécies de pteridófitas e ainda em cromossomos meióticos de uma pteridófita homosporada, visando verificar se o comportamento citomolecular dos cromossomos desse grupo se assemelha ao das angiospermas estudadas.

Material e Métodos

Foram analisados os cromossomos de uma espécie de pteridófito homosporado (*Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch) e três espécies de pteridófitas heterosporadas [(*Selaginella willdenowii* (Desv. ex Poiret) Baker, *Marsilea deflexa* A. Braun e *Regnellidium diphyllum* Lindm.]. As exsiccatas das espécies investigadas se encontram depositadas nos herbários UFP e HASU.

Para a análise mitótica, raízes de *A. danaeifolium* e *R. diphyllum* e brotos foliares de *S. willdenowii* e *M. deflexa* foram pré-tratados em 8-hidroxiquinoleína por 20-24 h, dependendo da espécie, e posteriormente fixadas, ou então, diretamente fixadas sem pré-tratamento. Para a análise meiótica em *A. danaeifolium*, esporângios jovens foram fixados diretamente. A fixação foi feita em paraformaldeído 4% (em PBS) por 45 min. Em seguida, o material foi lavado por 40 min em PBS, digerido em uma mistura de celulase 2%-pectinase 20% a 37 °C por 4-7 h, novamente lavado em PBS (15 min) e esmagado em PBS. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas deixadas secar ao ar. Depois de secas, as lâminas foram coradas com DAPI 2µl/ml em PBS, e selecionadas quanto à qualidade da lâmina e à presença de células em divisão, no microscópio de luz ultravioleta. Testes anteriores mostraram que após a retirada da lamínula, as lâminas podem ser secadas e coradas com DAPI, antes do uso dos anticorpos, sem que isso afete a reação de imunocoloração (ver também Giménez-Abian et al. 1997).

Para a imunocoloração [(de acordo com Manzanero *et al.* (2000)], primeiramente as lâminas foram lavadas em PBS e encubadas em BSA 3%, Triton X100 0,1% em PBS à temperatura ambiente, por 10 min. Em seguida, foi colocado o anticorpo produzido em coelho que reconhece a H3 fosforilada na serina-10 (*anti-phospho-histone H3 Upstate*), diluído 1:300 em BSA 3%, Triton X100 0,1% em PBS e encubadas por 12 h a 4°C. Posteriormente, as

lâminas foram lavadas em PBS por 15 min e colocado o anticorpo IgG-FITC anti-coelho (Sigma), diluído 1:60 em BSA 3%, Triton X100 0,1% em PBS por 3 h à temperatura ambiente. Depois as lâminas foram novamente lavadas em PBS por 15 min, coradas com DAPI 2µg/ml e montadas em Vectashield. As melhores células foram capturadas com uma câmera CCD Cohu acoplada a um microscópio Leica DMLB, utilizando o programa Q-FISH, Leica. A prancha foi confeccionada com o auxílio do programa Adobe Photoshop 6.0.

Resultados e Discussão

Em todos os materiais investigados, o citoplasma tornou-se relativamente rígido após a fixação com paraformaldeído 4%, comparando com os mesmos materiais fixados com Carnoy (3:1) em trabalhos anteriores (Marcon et al. 2003; Marcon et al. em preparação). Isso parece ter impedido um bom espalhamento dos cromossomos, mesmo em células pré-tratadas, como as da Fig. 1a e 1j. Um padrão temporal (ao longo do ciclo mitótico) e espacial (ao longo dos cromossomos) de fosforilação da H3, foi claramente observado em todas as espécies.

Na pteridófitas homosporada *A. danaeifolium*, que possui cromossomos relativamente grandes, quase todos acrocêntricos (Marcon et al. 2003), a marcação foi quase sempre próxima a uma das extremidades terminais de cada cromossomo, coincidindo com a posição do centrômero. A Fig. 1a-c mostra uma metáfase pré-tratada onde se vê a localização do centrômero de alguns cromossomos e a marcação com o anti-H3 fosforilada. Observa-se que o sinal de FITC/anti-H3 parece revestir a parte proximal do braço curto e do braço longo, correspondendo à região pericentromérica. Além dessa marcação forte e brilhante, uma marcação muito fraca e difusa, visível apenas com uma sobre-exposição fotográfica, foi detectada ao longo de todos os cromossomos. Nos núcleos interfásicos e nas prófases iniciais

não houve nenhum sinal de fosforilação, começando a ser percebido pontos corados na prófase final e prometáfase. Na anáfase inicial a marcação pericentromérica ainda era bem visível, entretanto, parecia menor e menos brilhante que na metáfase (Fig 1d-f), desaparecendo completamente na anáfase final e telófase.

Em *R. diphyllum*, a espécie heterosporada com os maiores cromossomos desta amostra, apareceram marcações fortes e brilhantes em células prometáfásicas e metafásicas. O cariótipo desta espécie é formado em sua maioria por cromossomos subtelocêntricos (Kuriachan 1994) e um destes pode ser observado isolado na Fig 1g-i. Nesta metáfase sem pré-tratamento, a marcação com anti-H3 fosforilada coincide com a região pericentromérica, alcançando quase todo o braço curto. Nesta espécie, uma fraca marcação também pôde ser visualizada ao longo de todos os cromossomos.

Nas outras duas espécies heterosporadas, *S. willdenowii* (Fig. 1j-o) e *M. deflexa* (Fig. 1p, q), a marcação com anti-H3 fosforilada pareceu também mais forte nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, sendo visível a partir da prófase final até a anáfase inicial. Em *S. willdenowii*, que apresenta cromossomos bem pequenos, variando de 1,4 a 2,5 μm (Marcon et al., *in press*), o sinal da H3 fosforilada parece ocorrer na região do centrômero, ocupando, em alguns cromossomos, também o braço curto. A figura 1j-o mostra o tamanho dessas regiões marcadas em metáfase (1j-l) e em prófase (1m-o). Schroeder-Reiter et al. (2003) demonstraram em células de cevada, por microscopia eletrônica de varredura, utilizando imunodeteção da H3 fosforilada conjugada com partículas Nanogold, que a região centromérica propriamente marca apenas na prometáfase, ficando a marcação nos demais estágios, restrita à região pericentromérica.

Em células meióticas de *A. danaeifolium*, o sinal da fosforilação da H3 começou a ser observado na fase de diplóteno final, aparecendo os cromossomos corados em toda sua extensão (Fig. 1r, s). Nestas células observou-se uma região corada um pouco mais forte, que

correspondia à região terminal do cromossomo, provavelmente englobando o centrômero e regiões adjacentes. Essa marcação foi observada até metáfase I, não tendo sido possível observar se os sinais persistiam até anáfase e telófase I devido à pequena quantidade de células nestas fases. Em metáfase II, foram observados pequenos pontos corados, mas não foi possível comprovar se esses pontos correspondiam às regiões pericentroméricas. Estes sinais persistiram até anáfase II, desaparecendo em telófase II. Portanto, o padrão de fosforilação da H3 em células meióticas das pteridófitas parece repetir o mesmo padrão observado em células meióticas de outras plantas com cromossomos monocêntricos, com marcação generalizada por todo o cromossomo na meiose I e localizada na região pericentromérica na meiose II (Manzanero et al. 2000). Este padrão de fosforilação difere daquele encontrado na meiose de animais e de plantas com cromossomos holocêntricos, em que tanto na meiose I quanto na meiose II a histona H3 aparece fosforilada em toda a extensão do cromossomo (Cobb et al. 1999, Gernand et al. 2003).

As pteridófitas homosporadas geralmente apresentam cromossomos muito densos e fortemente corados e núcleos interfásicos eurreticulados, com uma estrutura de cromatina caracteristicamente densa e homogênea (Delay 1949). As pteridófitas heterosporadas, por outro lado, embora muito divergentes filogeneticamente (ver, por exemplo, Pryer et al. 2001), têm uma estrutura cromossômica e de núcleos interfásicos mais semelhante à das angiospermas, possuindo cromossomos menores e com regiões cromossômicas mais densas e menos densas, apresentando núcleos interfásicos geralmente menos densos e com cromocentros bem distintos (ver, por exemplo, Walker 1984, Takamiya 1993). Embora o conhecimento da organização molecular dos cromossomos de pteridófitas seja ainda muito incipiente, os poucos dados existentes sobre distribuição de sítios de DNAr (Kawakami et al. 1999, McGrath e Hickok 1999, Marcon et al. 2003), retrotransposons (Brandes et al. 1997) e DNA telomérico (Fuchs e Schubert 1996, Marcon et al. em preparação) sugerem não haver

diferença entre a organização molecular geral das pteridófitas e das angiospermas. A ocorrência de diferentes padrões de fosforilação em plantas com cromossomos monocêntricos por um lado, e em animais e plantas com cromossomos holocêntricos por outro, sugere que a condição “fosforilação generalizada” dos últimos seja o padrão original dos eucariotas. A condição “fosforilação localizada” parece ter surgido posteriormente na evolução do controle mitótico das plantas, revertendo para a condição original nos grupos com cromossomos holocêntricos, como em *Luzula* (Gernand *et al.* 2003) e *Rhynchospora* (Guerra, dados não publicados). A ocorrência de fosforilação difusa também na meiose I de plantas com cromossomos monocêntricos observada em pteridófitas e em angiospermas (Kaszás e Cande 2000, Manzanero *et al.* 2000), reforça essa suposição de que esse seja o padrão ancestral dos eucariotas.

O presente trabalho confirma que qualquer que seja o papel da fosforilação da histona H3 no ciclo mitótico, esse mecanismo parece ser universal e aparentemente se aplica igualmente bem às pteridófitas, independente de parâmetros como tamanho e densidade de seus cromossomos. A razão para a ocorrência de uma variante deste padrão, observada em cromossomos mitóticos holocêntricos de vegetais e em monocêntricos de animais permanece inexplicada. Estudos adicionais com outras proteínas distribuídas diferencialmente na região centromérica/pericentromérica, como a CENH3 e a topoisomerase II (Swedlow e Hirano 2003) poderão ajudar a entender o papel desses diferentes padrões de fosforilação da histona H3.

Os autores agradecem a Carlos Rodrigo Lehn (UNISINOS), pela coleta de *Regnellidium diphyllum* analisada neste trabalho, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

Referências

- Adams S. P., Leitch I. J., Bennett M. D., Leitch A. R. (2000) *Aloe* L. – a second plant family without (TTTAGGG)_n telomeres. *Chromosoma* 109: 201–205.
- Brandes A., Heslop-Harrison J. S., Kamm A., Kubis S., Doudrick R. L., Schmidt T. (1997) Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of *Ty1-copia* like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. *Plant Mol. Biol.* 33: 11–21.
- Cobb J., Miyaike M., Kikuchi A., Handel M. A. (1999) Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase II α localization and chromosome condensation. *Chromosoma* 108: 412–425.
- Cox A. V., Bennett S. T., Parokonny A. S., Kenton A., Callimassia M. A., Bennett M. D. (1993) Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe. *Ann. Bot.* 72: 239–247.
- Delay C. (1949) Recherches sur la structure des noyaux quiescents chez les phanérogames. *Rev. Cytol. Cytophysiol. Veg.* 10: 103–228.
- Fuchs J., Brandes A., Schubert I. (1995) Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Plant Syst. Evol.* 196: 227–241.
- Fuchs J., Schubert I. (1996) *Arabidopsis*-type telomere sequences on chromosome termini of *Selaginella martensii* Spring (Pteridophyta). *Biol. Zent. bl.* 115: 260–265.

- Gernand D., Demidov D., Houben A. (2003) The temporal and spatial pattern of histone H3 phosphorylation at serine 28 and serine 10 is similar in plants but differs between mono- and polycentric chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 101: 172–176.
- Giménez-Abián M. I., Giménez-Martín G., Navarrete M. H., De la Torre C. (1997) Microtubular structures developed in response to acarbamate herbicide in plant mitosis. *Protoplasma* 200: 65–70.
- Hendzel M. J., Wei Y., Mancini M. A., Hooser A. V., Ranalli T., Brinkley B. R., Bazett-Jones D. P., Allis C. D. (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106: 348–360.
- Hizume M., Shibata F., Matsusaki Y., Kondo T. (2000) Chromosomal localization of telomere sequence repeats in five gymnosperm species. *Chrom. Sci.* 4: 39–42.
- Houben A., Wako T., Furushima-Shimogawara R., Presting G., Künzel G., Schubert I., Fukui K. (1999) The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *Plant J.* 18: 675–679.
- Kaszás E., Cande W. Z. (2000) Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J. Cell Sci.* 113: 3217–3226.
- Kawakami S. M., Kondo K., Kawakami S. (1999) Analysis of nucleolar organizer constitution by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in diploid and artificially produced haploid sporophytes of the fern *Osmunda japonica* (Osmundaceae). *Plant Syst. Evol.* 216: 325–331.
- Kondo K., Tagashira N. (1998) Regions *in situ*-hybridized by the *Arabidopsis*-type telomere sequence repeats in *Zamia* chromosomes. *Chrom. Sci.* 2: 87–89.
- Kuriachan P. I. (1994) Karyotype of *Regnellidium diphyllum* Lindm. *Caryologia* 47: 311–314.

- McGrath J. M., Hickok L. G. (1999). Multiple ribosomal RNA gene loci in the genome of the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. *Canad. J. Bot.* 77: 1199–1202.
- Manzanero S., Arana P., Puertas M. J., Houben A. (2000) The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. *Chromosoma* 109: 308–317.
- Marcon A. B., Barros I. C. L., Guerra M. (2003) A karyotype comparison between two closely related *Acrostichum* L. (Pteridaceae) species. *Amer. Fern J.* 93: 116–125.
- Marcon A. B., Barros I. C. L., Guerra M. Variation in chromosome number, CMA bands and 45S rDNA sites in species of *Selaginella* P. Beauv. (Pteridophyta). *Ann Bot.* in press
- Pich U., Fuchs J., Schubert I. (1996) How do Alliaceae stabilize their chromosomes ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosome Res.* 4: 207–213.
- Pryer K. M., Schneider H., Smith A. R., Cranfill R., Wolf P. G., Hunt J. S., Sipes S. D. (2001) Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest relatives to seed plants. *Nature* 409: 618–621.
- Schroeder-Reiter E., Houben, A., Wanner, G. (2003) Immunogold labeling of chromosomes for scanning electron microscopy: A closer look at phosphorylated histone H3 in mitotic metaphase chromosomes of *Hordeum vulgare*. *Chromosome Res.* 11: 585–596.
- Swedlow J. R., Hirano T. (2003) The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol. Cell* 11: 557–569.
- Sykorova E., Lim K. Y., Chase M. W., Knapp S., Leitch I. J., Leitch A. R., Fajkus J. (2003) The absence of *Arabidopsis*-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (Solanaceae): first evidence from eudicots. *Plant J.* 34: 283–291.
- Takamiya M. (1993) Comparative karyomorphology and interrelationships of *Selaginella* in Japan. *J. Plant Res.* 106: 149–166.

- Walker T. G. (1984) Chromosomes and evolution in pteridophyte. In: Sharma A. K., Sharma A. (eds.) Chromosome Evolution of Eukaryotic Groups II. CRC Press, Boca Raton, pp. 103–141.
- Wei Y., Mizzen C. A., Cook R. G., Gorovsky M. A., Allis C. D. (1998) Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7480–7484.

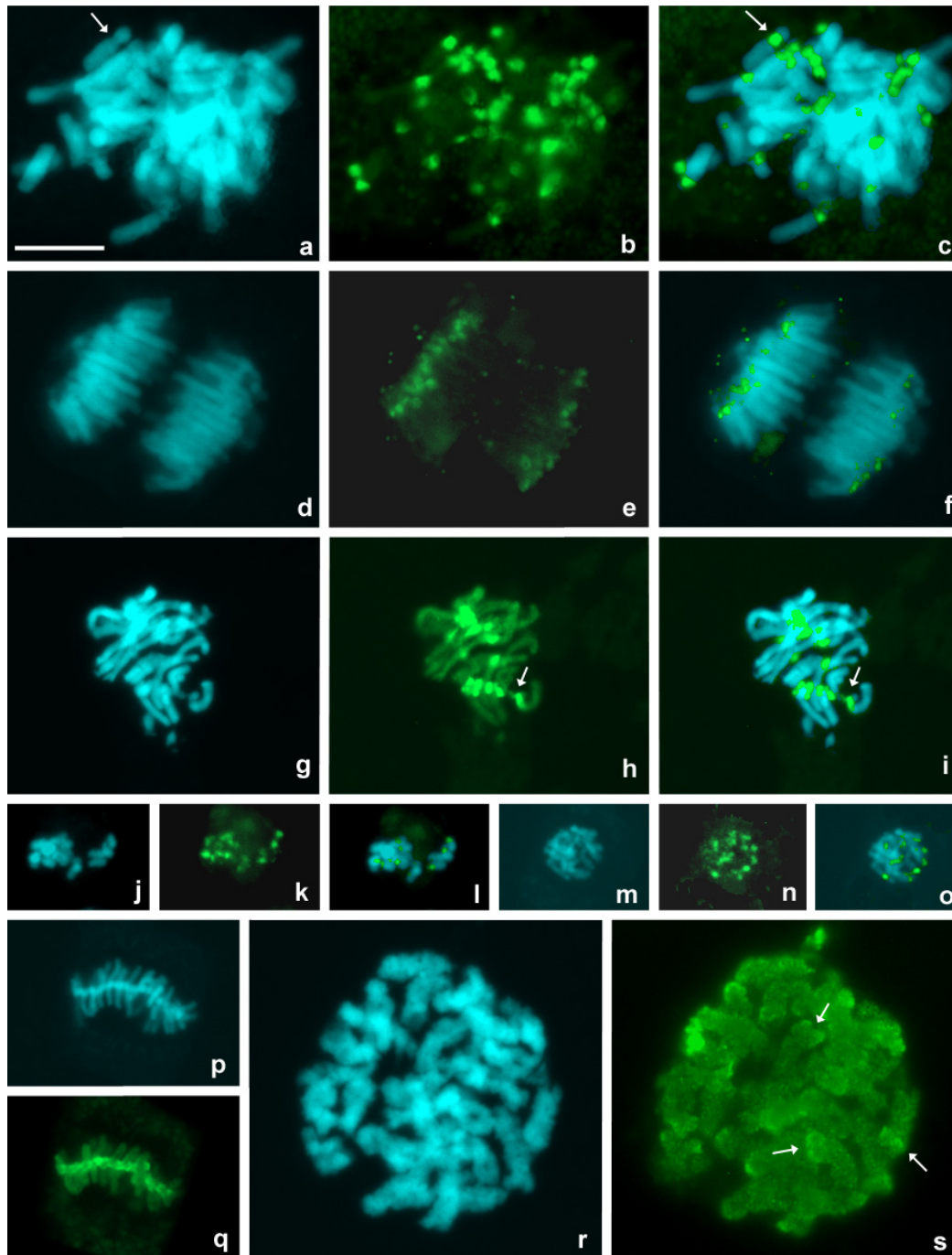


Fig. 1. Imunocoloração para detecção da H3 fosforilada em células mitóticas (a-q) e meióticas (r e s) de espécies de pteridófitas. a – f, *Acrostichum danaeifolium*; g – i, *Regnellidium diphyllum*; j – o, *Selaginella willdenowii*; p e q, *Marsilea deflexa*, mostrando marcação na região pericentromérica dos cromossomos corados com FITC (b, e, h, k, n e q). Note nestas células, uma leve marcação ao longo dos cromossomos. r e s, *A. danaeifolium* (célula em diplóteno final), mostrando marcação ao longo dos cromossomos corados com FITC (r). Células em a, d, g, j, m, p e r, estão coradas com DAPI e em c, f, i, l e o, mostram sobreposição DAPI/FITC. Seta em a mostra com detalhe a região centromérica, apontando em c a marcação referente à fosforilação nessa região. Setas em r mostram uma marcação um pouco mais forte na região centromérica. Barra representa 10 μm.

5 CONCLUSÕES

5.1 A poliploidia mostra ser bem comum entre as espécies de *Salvinia* (*S. auriculata* e *S. minima*) e *Isoetes* (*I. panamensis*) ocorrentes no nordeste do Brasil. Entretanto, entre as espécies dos gêneros *Selaginella*, *Marsilea*, *Regnellidium* e *Azolla*, somente indivíduos diplóides foram observados.

5.2 Em todas as espécies analisadas parece haver uma predominância de cromossomos com morfologia metacêntrica e submetacêntrica. Essa característica difere das homosporadas, que apresentam uma maior quantidade de cromossomos com morfologia acrocêntrica e telocêntrica.

5.3 As pteridófitas heterosporadas confirmam possuir uma maior diversidade de núcleos interfásicos em relação às homosporadas, se assemelhando, nesse aspecto, às angiospermas.

5.4 A variabilidade de número e tamanho cromossômico e a diferença no número de sítios de DNAr 45S observadas entre as espécies de *Selaginella*, contribuíram com a idéia de que os números básicos reconhecidos para o gênero ($x=7, 8, 9, 10, 11$ e 12) tenham surgido duas ou mais vezes, através de disploidia, dentro de cada subgênero.

5.5 A marcação da sequência telomérica (TTTAGGG)_n em todos os telômeros da espécie *S. willdenowii*, mostra sua conservação mesmo entre grupos vegetais evolutivamente distantes.

5.6 Os resultados sugerem que, com relação às seqüências de DNAr 45S e telomérica, os cromossomos das pteridófitas não diferem do comumente encontrado nas angiospermas. Entretanto, a coloração com os fluorocromos CMA e DAPI parece indicar uma diferença significativa na composição de pares de base AT ou GC nos cromossomos das pteridófitas.

5.7 As espécies heterosporadas mostraram que, apesar de apresentarem números cromossômicos menores com relação às homosporadas, apresentaram maior quantidade de sítios de DNAr 45S. Essa diferença pode estar relacionada à suposta natureza paleopoliploide da maioria das pteridófitas homosporadas atuais, que tendem a “diploidizar” o genoma através do silenciamento de genes duplicados. Esse silenciamento seria seguido de mutação e homogeneização de seqüências (evolução em concerto) ou deleção, o que levaria à perda completa da identidade dessas seqüências.

5.8 A imunodeteção da histona H3 fosforilada em representantes de pteridófitas homosporadas e heterosporadas mostrou se aplicar bem a este grupo, que apresentou comportamento semelhante às angiospermas, tanto no ciclo mitótico quanto meiótico, percebendo-se a universalidade desse mecanismo.

6 RESUMO

Representantes de pteridófitas heterosporadas pertencentes aos gêneros *Selaginella*, *Isoetes*, *Marsilea*, *Regnellidium*, *Salvinia* e *Azolla* foram analisadas citogeneticamente com relação ao número cromossômico, estrutura dos núcleos interfásicos, padrão de bandas heterocromáticas e fosforilação da histona H3. Os números cromossômicos encontrados nas espécies de *Selaginella* foram $2n=18$, $2n=20$ e $2n=24$, em *Isoetes*, $2n=20$ e $2n=44$, em *Marsilea*, $2n=40$, em *Regnellidium*, $2n=ca.40$, em *Salvinia*, $2n=45$ e $ca. 63$ e em *Azolla*, $2n=44$, confirmando contagens já existentes para algumas espécies e a ocorrência de poliplóides entre as espécies de *Salvinia* e *Isoetes*. Dentre as espécies analisadas, em três foi verificada a ocorrência de contagens inéditas. Os núcleos interfásicos variaram de arreticulado em *Azolla caroliniana*, semi-reticulado nas demais espécies de *Azolla*, *Selaginella*, *Marsilea* e *Regnellidium* a reticulado em *Salvinia* e *Isoetes*. A coloração com fluorocromos mostrou a presença de bandas $CMA^+/DAPI^-$ em um padrão diferenciado nas espécies analisadas. Bandas $CMA^0/DAPI^+$ foram observadas somente em *Salvinia minima*. Foi verificada a relação das bandas CMA^+ com os sítios de DNAr 45S, entretanto, essa relação não foi observada em algumas bandas intercalares e terminais, indicando a presença de heterocromatina rica em GC independente da sequência de DNAr 45S. Entre as espécies de *Selaginella*, os dados citológicos obtidos neste trabalho concordaram com estudos morfológicos, anatômicos e paleobotânicos, de que $x=9$ é o número básico do gênero, gerando por disploidia, os demais números encontrados. Essa disploidia teria ocorrido repetidamente dentro de cada subgênero. A hibridização com a sequência telomérica $(TTTAGGG)_n$, encontrada em angiospermas e gimnospermas, mostrou marcação em todos os telômeros de *S. willdenowii*, demonstrando a

conservação dessa seqüência mesmo entre grupos de plantas evolutivamente distantes. A imunocoloração para a detecção da histona H3 fosforilada no ciclo mitótico de espécies homosporadas e heterosporadas, mostrou uma forte fosforilação na região pericentromérica dos cromossomos. No ciclo meiótico, foi verificada a fosforilação da histona H3 ao longo de toda a extensão cromossômica em meiose I, enquanto na meiose II, essa se limitou principalmente à região pericentromérica. Estes resultados concordaram com o padrão obtido em espécies monocêntricas de angiospermas, indicando ser esse um fenômeno conservado em outros grupos vegetais, apesar da divergência em relação ao padrão observado em animais.

7 ABSTRACT

Heterosporous pteridophyte species belonging to the genera *Selaginella*, *Isoetes*, *Marsilea*, *Regnellidium*, *Salvinia* and *Azolla* were analyzed cytogenetically in respect to chromosome number, interphase nuclear structure, heterochromatin organization and phosphorylation of histone H3. The chromosome numbers found in *Selaginella* species were $2n=18$, 20 and 24, in *Isoetes*, $2n=20$ and 44, in *Marsilea*, $2n=40$, in *Regnellidium*, $2n=ca.40$, in *Salvinia*, $2n=45$ and ca. 63 and in *Azolla*, $2n=44$, corroborating previous counts for some species and the occurrence of polyploidy in *Salvinia* and *Isoetes*. Furthermore, chromosome numbers of three species were determined for the first time. The interphase nuclei varied from arreticulated in *Azolla caroliniana*, semi-reticulated in *Selaginella*, *Marsilea*, *Regnellidium* and *Azolla* species, to reticulated in *Salvinia* and *Isoetes* species. Fluorochrome staining revealed the presence of $CMA^+/DAPI^-$ bands in all taxa, although its distribution pattern differed among the analysed species. $CMA^0/DAPI^+$ bands were observed only in *Salvinia minima*. A correlation between some CMA^+ bands and the 45S rDNA sites was observed, however, others intercalary and terminal bands were not associated to rDNA sites, indicating the existence of other GC-rich sequences in the heterochromatin. The present cytological data for *Selaginella* corroborated previous morphological, anatomical and paleobotanical analyses that suggested $x=9$ as the basic number of the genus and the repeatedly occurrence of dysploidy in different evolutionary lines. *In situ* hybridization using the telomeric sequence $(TTTAGGG)_n$, which has been detected in angiosperms and gymnosperms, clearly labeled all *S. willdenowii* telomeres. This result demonstrated the conservation of that sequence even among distantly related plant groups. Immunostaining with a specific antibody against

phosphorylated histone H3 at serine-10 in homosporous and heterosporous pteridophytes detected phosphorylation of H3 mostly in the pericentromeric regions of the chromosomes during mitosis. In the first meiotic division, phosphorylation was observed along the entire length of all chromosomes, and in meiose II, it was restricted mostly to the pericentromeric regions. These results agreed with the pattern observed in monocentric species of angiosperms, suggesting that this is a conserved feature of plant chromosomes.

8 ANEXOS

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Annals of Botany

Annals of Botany

Instructions to Authors

Introduction

Experimental, theoretical, descriptive and applied papers on all aspects of plant science are welcome. To merit publication in *Annals of Botany*, contributions should be substantial and combine originality of content with potential general interest. The manuscript or its essential content, must not have been published previously or be under consideration for publication elsewhere. Standard research papers (ORIGINAL ARTICLES) should not normally exceed ten printed pages (each page holds approximately 1000 words or 40–50 references). REVIEWS submitted speculatively should have fewer than 24 printed pages. SHORT COMMUNICATIONS and TECHNICAL NOTES should not exceed six printed pages. Short opinion papers (VIEWPOINT) will also be considered. INVITED REVIEWS (up to 24 pages) and BOTANICAL BRIEFINGS (up to 6 pages) are published by invitation only.

Manuscripts should be prepared in English as described below. Submission should be electronic (see **Formatting and Submitting a Paper for Peer Review** for details) preferably as a single consolidated document submitted on disc or as an e-mail attachment. After satisfactory peer review by at least two experts and, if necessary, following receipt of a suitably revised manuscript, authors will be asked for a final electronic version that is technically distinct from the submitted version and thus suitable for reproduction in the Journal.

Authors pay no fees or page charges and receive a free copy of the issue of the Journal in which their paper appears. Authors also receive 100 reprints of their article without charge or alternatively a unique URL that gives access to the Journal's PDF (Portable Document Format) file of their article. Colour plates and graphics are also printed without charge where their use enhances scientific content or clarity.

Preparing Content

(Always consult a recent issue of *Annals of Botany*)

Text must be typed using size 12 Times New Roman or Courier, double-spaced throughout and with no less than 25 mm margins on all sides. All pages should be numbered sequentially. Each page line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1.

The **first page** of a submitted article should contain (i) full title of the manuscript, (ii) full name, postal address, telephone and fax numbers and e-mail address of the corresponding author to be used during manuscript evaluation and processing, (iii) number of figures, (iv) number of tables, (v) number of words in the abstract and (vi) number of words in the remaining text (excluding tables).

The **second page** should comprise: (i) a concise and informative full title; (ii) names of all authors each followed by an identifying superscript number (^{1,2,3}, etc.) with the corresponding author's name also followed by a superscript asterisk*; (iii) institutional address of each author preceded by the relevant superscript number; (iv) a running heading of not more than eight words; (v) e-mail address of the corresponding author.

The **third page** should contain a structured **Abstract** not exceeding 300 words made up of bulleted headings as follows for ORIGINAL ARTICLES:

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

Alternative bulleted section headings, such as 'Aims', 'Scope' and 'Conclusions', are acceptable for REVIEWS, INVITED REVIEWS, BOTANICAL BRIEFINGS, TECHNICAL NOTES and VIEWPOINT papers.

The Abstract should be followed by up to 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 for indexing and some electronic searches. **Title**, **Abstract** and **Key words** should be self-explanatory without reference to the remainder of the paper.

The **fourth and subsequent pages** should comprise the remaining contents of the article. 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, any tables and finally the figures themselves. Each table should have a caption at the top and should start on a new page. Each figure should be on a separate page and be numbered (e.g. Fig. 2). Results should not include extensive discussion and should not appear in both graphical and tabular form. The Discussion should avoid repeating the results and must finish with 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'.

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. $5 \times 10^{-9} \text{ m}^3$, $5 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ or $5 \times 10^{-3} \text{ m}^3$) 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 $\mu\text{mol L}^{-1}$), or 5 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. 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 (<http://www.ipni.org/index.html>) 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. *Lycopersicon esculentum* 'Moneymaker' following the appropriate international code of practice. For guidance, refer to *International Code for Nomenclature of Cultivated Plants* (1995) edited by P. Treharne, C. D. Brickell, B. R. Baum, W. L. A. Hettterscheid, A.C. Leslie, J. McNeill, S.A. Spongberg. and F. Vrugtman (Wimborne: Quarterjack Publishing. ISSN 0800-0694. ISBN 0-948117-01-X). 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 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 re-keying.

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)

(<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcbn/>). 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 useful 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 (<http://www.ebi.ac.uk>), GenBank (<http://www.psc.edu/general/software/packages/seq-intro/genbankfile.html>), or the DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) and to include an accession number in the paper. Sequences matrices should only be included if alignment information is critical to the paper; they 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 (http://www.agron.missouri.edu/maize_nomenclature.html),

rice (<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/basic/geneName.shtml>),

wheat (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/wgc/98/>) and

arabidopsis (<http://www.arabidopsis.org/links/nomenclature.html>).

The website of The Commission on Plant Gene Nomenclature

(<http://mbclserver.rutgers.edu/CPGN/>) may also be helpful. Otherwise, *Annals of Botany* adopts the following conventions for abbreviations: lowercase italics for mutant genes (e.g. *rp-etr1*); italicized capitals (e.g. *LE-ACO1*) for wild-type genes; upright lower-case for proteins of mutated genes (e.g. *adh1*), and upright upper-case for proteins of wild-type genes (e.g. *ATMYB2*). 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 Bray (2003) 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. Ioanidis *et al.*, 2002). 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.’ (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 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, and then any three-author papers etc. If a further level of alphabetical ordering is needed this should be based on the first letter of the surnames of co-authors. Italicised letters ‘a’, ‘b’, ‘c’, etc., should be added to the date of papers with the same authorship and year.

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

Books

Nobel PS. 1999. *Physicochemical and environmental plant physiology*, 2nd edn. San Diego: Academic 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.

Theses

Fiorani F. 2001. *Leaf growth of contrasting Poa species*. PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands.

Anonymous sources

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

On-line references 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 and Appendix. In the Acknowledgements please be brief. 'We thank . . .' (not 'The present authors would like to express their thanks to . . .').

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.

Figures and Tables. Only scientifically necessary illustrations should be used. **Half-tone and colour images** must be clear and sharp. **Colour images** are encouraged and printed without charge where they enhance significantly the clarity of the scientific information. Line diagrams must be of high black on white contrast, and boxed with inward scale markings. Use of colour in line diagrams is also permitted where it 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 or double column reproduction and grouping of related graphics is encouraged. Note that graphs and diagrams may be edited by the publisher to ensure a consistent house style and should be proof read by authors. Electron and light photomicrographs should have internal scale markers. When a block of illustrative material consists of several parts, they should be labelled A, B, C, etc. and not treated as separate figures. The best guides for laying out **tables** and **diagrams** are papers in a recent issue of *Annals of Botany*. When preparing tables, adopt the 'Tables' set-up in Microsoft Word, using one cell for each datum cluster (e.g. 12.2 ± 1.65) and avoid the use of the 'return' key.

Supplementary Information

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 text authors should indicate what details are available followed by the words **[Supplementary Information]** in bold and between square brackets. Special arrangements will need to be made with the Editorial Office to handle videos (e.g. giving access to the URL of a web site where this can be viewed). Videos should be created for viewing in a widely available program such as Windows MediaPlayer. A short paragraph

describing the contents of any **Supplementary Information** should be inserted immediately before acknowledgements.

Formatting and Submitting a Paper for Peer Review

All submissions should be in electronic form except by prior arrangement. **Two methods** for doing this are described below. Each submission should be accompanied by a **Covering Letter** formatted in Microsoft 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 or a re-submission. Names and contact details (including e-mail addresses) of up to three referees can be suggested provided that they are not institutional colleagues, former students or recent collaborators. However, the Journal fully retains the right to select referees of its own choosing.

Method 1. Formatting and submitting a consolidated electronic document

Papers should be prepared as a *single* consolidated file in Microsoft Word that contains all text, tables and figures. This will require that figures are inserted after the text, using the 'Insert-Picture' or the appropriate 'Select', 'Copy' and 'Paste' functions to position illustrative material into previously created blank pages. TIFF files are recommended. PowerPoint presentations can be inserted into the Word file *after* conversion to individual TIFF files. If you can, convert the consolidated document into a PDF file using Acrobat Distiller or the free Adobe on-line PDF creator (<http://www.adobe.com>) or other PDF-creation program, after embedding Asian and other fonts. If you are unable to create a PDF, the Editorial Office will convert your consolidated Word file to a PDF prior to peer review.

The consolidated document can be sent to the Editorial Office (annals-botany@bristol.ac.uk) as an e-mail attachment provided the total file size does not exceed 5 MB. A second file containing the covering letter must accompany it. Alternatively, the consolidated document and covering letter can be sent on a disc (3.5 inch floppy, CD-ROM or Zip disc) suitable for PCs. Discs should be clearly labelled with the name of the corresponding author and posted to Annals of Botany Editorial Office, School of Biological Sciences, University of Bristol, Woodland Road, Bristol BS8 1UG, UK, using an accelerated postal service where appropriate.

If there is no electronic version available for a figure or photograph please inform the Editorial Office by e-mail and post a hard copy that is suitable for scanning.

Method 2. Conventional electronic submission

If submission of a consolidated document is not possible we can accept a conventional PC-compatible electronic version prepared and submitted as follows. Prepare (i) the covering letter as a Microsoft Word or Rich Text Format file (ii) the text sections *including all tables and figure legends* as a Microsoft Word

or RTF file, (iii) any continuous tone images as TIFF or JPG files at approx. 300 dpi, (iv) any graphics as TIFF, GIF or JPEG files. Where possible, combine similar graphics into one file. Mac files should only be submitted in a form that is PC-readable. The electronic files can be submitted as an e-mail attachment to annals-botany@bristol.ac.uk (maximum size 5 MB) or on a disc (floppy, CD-ROM or Zip disc) and posted to: Annals of Botany Editorial Office, School of Biological Sciences, University of Bristol, Woodland Road, Bristol BS8 1UG, UK, using accelerated delivery service where appropriate. Discs should be clearly labelled with the name of the corresponding author. Normally, we do not require printed copy.

If electronic submission is not possible please contact the Editorial Office so that special arrangements can be made.

Review Process

The Editorial Office acknowledges receipt of the manuscript by e-mail, provides a reference number and identifies the Editor to whom the manuscript has been assigned. Manuscripts considered suitable for peer review (typically 80 % of submissions) are sent to at least two outside referees. We give referees a target of two weeks for the return their reports and the option of refereeing openly or confidentially. Currently (2002) approximately 55 % of peer reviewed papers are accepted. Authors are asked to revise provisionally accepted articles within four weeks.

Preparing an Accepted Paper for Production

On final acceptance of a suitably revised article, the corresponding author is informed by e-mail and asked to prepare an electronic version suitable for production purposes (see below) and also asked to complete a **Licence to Publish Form** (see **Formal Statement**). In addition, authors will be asked to prepare a 60-word summary of their paper and attach an accompanying 'thumbnail' illustration, in colour. Both will be used in the **ContentSnapshots** feature that appears in the front of each issue.

For production purposes, the corresponding author is asked to supply an electronic version on disc (floppy, CD-ROM or Zip disc) within one week of final acceptance. Discs should be posted to: Annals of Botany Editorial Office, School of Biological Sciences, University of Bristol, Woodland Road, Bristol BS8 1UG, UK. Alternatively, the paper may also be sent as an e-mail attachment to annals-botany@bristol.ac.uk provided the attachment is smaller than 5 MB. A hard copy of each figure should also be sent to the Editorial Office to ensure that electronic images are reproduced accurately.

Text and tables should be in the form of a PC-readable Microsoft Word or RTF file. Use of other word processing packages may delay publication. Unfortunately, desktop publishing files and LaTeX files cannot be used for production. Please use Times New Roman or Courier. Text, figure legends and all

tables should be collected together in one file.

Image files should be saved separately for each figure or plate. Black and white line drawings and graphs should be supplied as 1200 dpi Encapsulated PostScript (EPS) or TIFF files. For continuous tone images, please supply as TIFF, JPG or GIF files at 300 dpi (or 600 dpi if the image is a mix of pictures and text and/or has thin lines). Colour figures should be in CMYK. Each file should be identified with the allocated manuscript number and an appropriate descriptor (e.g. 03-521fig2.jpg). All images should be submitted at approximately the size they would appear in the Journal after any surrounding space has been removed. Figures containing several parts should be consolidated into one file wherever possible. 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. PowerPoint may be used to illustrate the layout and labelling of such figures, but separate TIFF, JPG or GIF files should be supplied as detailed above.

Pictures on the front cover. Authors of accepted papers are invited to submit a colour photograph or diagram for possible display on the front cover along with a short description summarizing the subject (30 words max.). 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 preferably be sent in electronic form as a TIFF, JPG or GIF file at 300 dpi. However, prints or transparencies (returnable) are also acceptable provided they are of scannable quality. Authors of selected material will receive a copy of the cover illustration and a complimentary copy of the relevant issue of the Journal.

Production and Publication

On receipt of a satisfactory production version, the title of the paper, authorship and hot-linked e-mail address of the corresponding author will be posted on the Annals of Botany web site under **AOBFirstAlert**. This is readily accessible from the Journal's home page (<http://www.aob.oupjournals.org>) by both subscribers and non-subscribers.

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 **equations and figures** since these are usually re-keyed or re-drawn by the publisher.

At this stage, authors will be invited to order reprints and extra single copies of the issue in which the article will appear. Reprints may be ordered in paper form, as a unique URL that gives access to the Journal's PDF file of their article, or in a combination of these forms.

Publication and printing process

Once corrected proofs have been received and checked, the paper is posted on the web site 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. This will appear on line 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 when published in its final form.

The corresponding author will receive a free copy of the printed issue in which their paper appears together with 100 free printed copies of their article or a free URL that gives access to the article PDF. These items are normally dispatched within seven days of publication of the printed journal.

Formal Statement

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 Form**. 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 and in advance.

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 web site. 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.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Plant Cell Reports

Legal requirements

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, or thesis); 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.

The "Copyright Transfer Statement" has to be signed and faxed to the publisher together with the corrected proofs (see below) with which it will be provided by the publisher shortly after the manuscript has been accepted for publication.

Editorial procedure

Papers must present scientific results that are essentially new. All manuscripts are subject to peer review.

The journal publishes peer reviewed short original articles and invited reviews. Authors intending to write a review should contact the Reviews Editor first.

Manuscripts must be written in English and sent in triplicate to an appropriate editor (addresses on page A3, A4 of each issue). Please be sure to include your e-mail address and your fax number.

Papers are published in the following sections:

1. Cell Biology and Morphogenesis
2. Genetic Transformation and Cell Hybridization
3. Genetics and Genomics
4. Physiology and Biochemistry
5. Biotic and Abiotic Stress

To help authors to identify an appropriate editor, numbers corresponding to those in front of the topics listed above appear next to the editors' names in the journal. When submitting a manuscript to an editor, please state the section in which you would prefer to have your paper published (the editors' addresses and fields of expertise can be found in every issue of the journal, and from the journal homepage).

Papers sent to the authors for revision should be returned within 60 days; otherwise they will be treated as new submissions

All manuscripts are subject to copy editing and will, if necessary, be returned to the author(s) for questions to be answered or for missing information to be supplied before being sent to the typesetter.

The publisher reserves the right to charge the author for any corrections in the proof that are made for purely stylistic reasons, as well as for any changes that alter the page make-up.

Manuscript preparation

Please submit one original manuscript typed on one side of the sheet in double-line spacing with wide margins (3.0 cm). The lines on each page of the text should be numbered to aid the reviewers. Additional copies can be photocopied on both sides. Three sets of original figures must be submitted with the manuscript. Rejected manuscripts will only be returned to the authors when they contain important original comments from the referees. Original illustrations will always be returned.

The pages should be numbered consecutively, starting with the title page.

The desired position of figures and tables should be marked in the margin. Form and content should be checked carefully to minimize the need for corrections in the proofs.

When extensive corrections are necessary, authors are responsible for having manuscripts retyped.

Title page

– The name(s) of the author(s)

■ – A concise and informative title

– The affiliations and addresses, including e-mail addresses of each of the authors

– The e-mail address, telephone and fax numbers of the communicating author

Abstract

Each paper must be preceded by an abstract presenting the most important results and conclusions in no more than 120 words.

Keywords

Three to five keywords should be supplied after the Abstracts for indexing purposes.

Abbreviations

should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

Introduction

After statement of purpose of the investigation this section should give a short review of the pertinent literature.

Materials and methods

Following the Introduction this section should provide enough information to permit repetition of the experimental work. Citations to previously published methodology may be used, being careful to describe any changes from the published protocol.

Results

This section should describe the outcome of the study. Data should be presented as concisely as possible, where appropriate in the form of tables or figures. However, very large tables should be avoided.

Discussion

The results should be interpreted with reference to the significant work by other authors.

References

The list of references should only include peer-reviewed works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications should only be mentioned in the text.

Journal titles should be abbreviated in accordance with international standards.

In the text, references should be cited by author and year (e.g. Hammer 1994; Hammer and Sjöqvist 1995; Hammer et al. 1993) and listed in alphabetical order in the reference list.

If available, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of the reference in question.

Examples:

* Journal articles:

Christey MC, Sinclair BK, Braun RH, Wyke L (1997) Regeneration of transgenic vegetable brassicas (*Brassica oleracea* and *B. campestris*) via Ri-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 16:587-593

Sarasan V, Roberts AV, Rout GR (2001). Methyl laurate and 6-benzyladenine promote the germination of somatic embryos of a hybrid rose. *Plant Cell Rep* 20:183-186. DOI 10.1007/s002990000303

* Books:

Larcher W (1995) *Physiological plant ecology*, 3rd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York

* Multiauthor books:

Fowke LC, Rennie PJ (1995) Botanical microtechniques for plant cultures. In: Gamborg OL, Phillips GC (eds) *Plant cell, tissue and organ culture (fundamental methods)*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 217-228

SI units

should be used throughout except where non-SI units are more common [e.g. liter (l) for volume].

Illustrations and Tables

All figures (photographs, graphs or diagrams) and tables should be cited in the text, and each numbered consecutively throughout. Figure parts should be identified by lower-case roman letters. The placement of figures

and tables should be indicated in the left margin. For submission of figures in electronic form see below.

Line drawings

Please submit good-quality prints. The inscriptions should be clearly legible.

Half-tone illustrations

(black and white and color). Please submit well-contrasted photographic prints with the top indicated on the back. Magnification should be indicated by scale bars.

Plates

Several figures or figure parts should be grouped in a plate on one page.

Size of figures

The figures should either match the width of the column (8.6 cm) or be 13.1 cm or 17.6 cm wide. The maximum length is 23.6 cm.

Figure legends

must be brief, self-sufficient explanations of the illustrations. The legends should be placed at the end of the text.

Color illustrations

The authors will be expected to make a contribution (EUR 485 or US \$ 534, plus 16% VAT) towards the extra costs of color illustration, irrespective of the number of color figures.

Tables

should have a title and a legend explaining any abbreviation used in that table. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Further technical instructions

1. Layout guidelines

Use a normal, plain font (e.g., Times Roman) for text.

Other style options:

- for textual emphasis use italic types.
- for special purposes, such as for mathematical vectors, use boldface type.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

For indents use tab stops or other commands, not the space bar.

Use the table functions of your word processing program, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor of your word processing program or MathType for equations.

Place any figure legends or tables at the end of the manuscript.

■ Submit all figures as separate files and do not integrate them within the text.

2. Illustrations

The preferred figure formats are EPS for vector graphics exported from a drawing program and TIFF for halftone illustrations. EPS files must always contain a preview in TIFF of the figure. The file name (one file for each figure) should include the figure number. Figure legends should be included in the text and not in the figure file.

Scan resolution: Scanned line drawings should be digitized with a minimum resolution of 800 dpi relative to the final figure size. For digital halftones, 300 dpi is usually sufficient.

Colour illustrations: Store colour illustrations as RGB(8 bits per channel) in TIFF format.

Vector graphics: Fonts used in the vector graphics must be included. Please do not draw with hairlines. The minimum line width is 0.2 mm (i.e., 0.567 pt) relative to the final size.

3. Data formats

Save your file in two different formats:

RTF (Rich Text Format) or Microsoft Word compatible formats

pdf (a single pdf file including text, tables and figures)

4. General information on data delivery

Please send your data, preferably a zip file (text and illustrations in separate files, unencoded) to the Editor either:

by e-mail (only suitable for small file sizes)

or on any of the following media:

- On a diskette [you may use .tar, .zip, .gzip (.gz), .sit, and compress (.Z)]
- On a ZIP cartridge
- On a CD-ROM

In case you have not sent electronic files of your article together with the accepted version, you should send your data, preferably a zip file (text and illustrations in separate files, unencoded) to Springer-Verlag either:

Via ftp.springer.de (to our ftp.server; log-in anonymous"; password: your e-mail address; further information in the readme file on the server)

or by e-mail (only suitable for small volumes of data)

Please always supply the following information with your data: journal title, manuscript number, operating system, word processing program, drawing program, image processing program, compression program.

The file name should be memorable (e.g., author name), have no more than 8 characters, and include no accents or special symbols. Use only the extensions that the program assigns automatically.

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



accepted after peer review



ESM may consist of:

information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (use QuickTime, .avi, .mpeg, animated GIFs, or any other common file format)



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 (color and black & white), etc.



Legends must be brief, self-sufficient explanations of the ESM. ESM is to be numbered and referred to as S1, S2, etc.

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.

Proofreading

Authors are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. Proofreading is the responsibility of the author. Authors should make their proof corrections (formal corrections only) on a printout of the pdf file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. Substantial changes in content, e.g. new results, corrected values, title and authorship are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the Editorial Office before returning the proofs to the publisher. After online publication, corrections can only be made in exceptional cases and in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

Papers will be published online about one week after receipt of the corrected proofs. Papers published online can already be cited by their DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Offprints

Twenty-five offprints of each contribution are supplied free of charge. If you wish to order additional offprints you must return the order form which is provided with the proofs and return it together with the corrected proofs. When ordering additional offprints, an author is entitled to receive, upon request, a pdf file of the article for own personal use.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Plant Systematics and Evolution

Plant Systematics and Evolution

Instructions to Authors

Authors transfer the copyright on their articles to Springer effective if and when each article is accepted for publication. The copyright covers the exclusive and unlimited rights to reproduce and distribute the article in any form (printing, electronic media or any other form); it also covers translation rights for all languages and countries. For U.S. authors the copyright is transferred to the extent transferable.

Manuscripts should be sent to the Editorial Assistant, to the Editor-in-Chief or to one of the Associate Editors:

Prof. Dr. Jorge V. Crisci, Division Plantas Vasculares,
Museo de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de
La Plata, Paseo del Bosque, La Plata 1900, Argentina
(jcrisci@netverk.com.ar).

Prof. Dr. A. Dafni, Laboratory of Pollination Ecology,
Institute of Evolution, Haifa University, Haifa 31905,
Israel (adafni@research.haifa.ac.il).

Prof. Dr. Peter K. Endress, Institute of Systematic Botany,
University of Zurich, Zollikerstrasse 107, 8008 Zurich,
Switzerland (pendress@systbot.unizh.ch).

Prof. Dr. Else Marie Friis, Department of Palaeobotany,
Swedish Museum of Natural History, Box 50007,
10405 Stockholm, Sweden (else.marie.friis@nrm.se).

Prof. Dr. Frank H. Hellwig (Editor-in-Chief), Institut für
Spezielle Botanik, Botanischer Garten und Herbar
Haussknecht, Universität Jena, Philosophenweg 16,
07743 Jena, Germany (hellwig@otto.biologie.
uni-jena.de).

Prof. Dr. Michael Hesse, Institut für Botanik der Universität
Wien, Rennweg 14, 1030 Wien, Austria
(michael.hesse@univie.ac.at).

Univ.-Prof. Dr. Markus Koch, Abteilung für Biodiversität
und Pflanzensystematik, Universität Heidelberg,
Im Neuenheimer Feld, Geb. 345, 2. Stock, 69120
Heidelberg, Germany (markus.koch@urz.uni-
heidelberg.de).

Prof. Dr. Pauline Y. Ladiges, Head, School of Botany,
The University of Melbourne, Parkville, Victoria 3010,
Australia (p.ladiges@unimelb.edu.au).

Uta Schwabe (Editorial Assistant), Dammerweg 7,
35102 Lohra, Germany
(uta.martin.schwabe@t-online.de).

Prof. Dr. Kenneth J. Syltsma, 250 Birge Hall, University of
Wisconsin, 430 Lincoln Drive, Madison, Wisconsin
53706, USA (kjsyltsma@facstaff.wisc.edu).

Prof. Dr. Günter Theißen, Lehrstuhl für Genetic, Universität
Jena, Philosophenweg 12, 07743 Jena, Germany.

1. General

Only papers written in English will be considered. Manuscripts should be typewritten double-spaced with wide margins, and submitted in triplicate (original typed on one side of the paper only plus two copies photocopied on both sides, copies of photographic illustrations may be high quality laser prints). Maximum length is twenty printed pages including tables and figures.

Papers submitted should only comprise new and

important results. They must be written in concise form and in clear, grammatical language.

Submission of diskettes is encouraged, but these should not be sent until changes requested following the reviewing process have been entered and authors have been notified of acceptance for publication. Authors are forced to follow the Instructions to Authors carefully for preparation of printed copy and diskette.

Papers sent to the authors for revision should be returned within two months; otherwise they will be treated as new submissions. Rejected manuscripts will only be returned to the authors when they contain important comments from the referees. Original illustrations will always be returned.

It is essential that manuscripts be submitted in their final form ready for printing, with the approximate desired position of all figures and tables marked in the margins.

To facilitate communication between authors, editors and publisher, the telephone and fax numbers and/or e-mail address of the corresponding author should be provided in the accompanying letter. The full names and addresses of the authors must also be included at the end of the manuscript.

2. Text

The **title** should be brief and characterise the main contents of the paper. An eventual series title has to be given as footnote.

Abstract. All papers should be preceded by an abstract (150 words in maximum) denoting the most important taxa, problems and results treated in the paper.

Key words. A list of up to 8 key words, including the complete botanical name and common name (if any) of the plant material, must be supplied. Other key words should include the topic investigated and any special techniques used.

Running title. A running title (up to 75 characters) should be suggested by the author(s).

Headings. Main headings (Introduction, Materials and methods, etc.) should be placed on separate lines.

Small print. Footnotes, Material and methods sections, Acknowledgements, References, Tables, and figure legends should be marked for small print.

Scientific names.

Italics should be used for names at generic and lower taxonomic rank, but not for names at higher ranks.

Units and symbols. Temperatures may be expressed in degrees Celsius, time in seconds (s), minutes (min), hours (h), days (d). Otherwise, the International System of Units (SI) should be used.

Standard chemical symbols and abbreviations for chemical names may be used if they are concise and widely accepted, see *Eur J Biochem* (1993) 213: 1-3

Gene symbols must be written in lower case *italics* as e. g. *rbcL*, *matK*.

Protein symbols designated on the basis of gene names are written with first or all letters capitalized and in roman type.

Footnotes to the text should be numbered consecutively.

Literature citations in the text should be by author(s) and year. Where there are more than two authors, only the first should be named, followed by "et al."

Example: ... has been investigated by Sorensson (1993) and Sorensson and Brewbaker (1994) ... Yang et al. (1992) have shown

The list of **references** should include only publications cited in the text. They should be in alphabetical order by name of the first author with all authors and the complete title of each work cited. Citation must obey the same rules as for the main text. The second and subsequent lines are indented.

Examples are:

a) Articles from journals and other serial publications:
Knapp S., Persson V., Blackmore S. (1998) Pollen morphology and functional dioecy in *Solanum* (Solanaceae). *Plant Syst. Evol.* 210: 113–139.

b) Articles from non-serial collective publications (symposia volumes, encyclopedias, etc.) and books:
Verma D. P. S., Nadler K. (1984) Legume-Rhizobium symbiosis: host's point of view. In: Verma D. P. S., Hohn T. (eds.) *Genes involved in microbe-plant interactions*. Springer, Wien New York, pp. 57–93 (Plant gene research).

For standardization of formats, authors are requested to adhere to the following: in Literature Cited, use of abbreviations of journals contained in B-P-H (G. H. M. Lawrence, A. F. G. Buchheim, G. S. Daniels and H. Dolezal, eds., 1968, *Botanico-Periodicum-Huntianum*, Hunt Botanical Library, Pittsburgh), including Supplementum; (G. D. R. Bridson and E. R. Smith, eds., 1991, B-P-H/S, Hunt Institute for Botanical Documentation, Pittsburgh); in taxonomic treatments, use of book abbreviations from TL-II (F. A. Stafleu and R. S. Cowan, 1976–1988, *Taxonomic Literature*, ed. 2, vols. 1–7, Bohn, Scheltema & Holkema, Utrecht; plus Supplements); throughout the text, use of taxonomic author abbreviations from *Authors of Plant Names* (R. K. Brummitt and C. E. Powell, eds., 1992, Royal Botanic Gardens, Kew).

It is recommended that the work be divided into Introduction (without heading), Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements (without heading) and References.

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 protein sequences must be deposited in public data bases (GenBank, EMBL, etc.) before the revised version is sent to the editor.*

3. Tables

Tables should be numbered consecutively with arabic numbers. Footnotes to tables should be indicated by lower case superscript letters, beginning with a in each table.

4. Illustrations

The number of illustrations should be kept at the minimum needed to clarify the text. Double documentation of the same points in figures and tables is not acceptable.

All figures should be numbered consecutively. Half-tone illustrations should be submitted as sharp, glossy, high-quality photographic prints. Line drawings should be supplied as black-and-white drawings suitable for reproduction. Figures that are to appear together should be either photographed as a group or mounted together on flexible white drawing paper (0.4 mm thick, about 300 g/m²). All figures should be trimmed at right angles and be of a size permitting direct printing: no more than 7.6 cm across for column width, no more than 15.9 cm for page width, no higher than 22.7 cm. (The publisher reserves the right to reduce illustrations.)

Illustrations can be published in colour only if authors agree to bear some of the extra costs for reproduction and printing.

In line drawings all lines should be of uniform thickness; letters and numbers should be of professional quality and proper dimensions (approx. 2 mm high after reduction). Computer drawings are acceptable provided they are of comparable quality to line drawings. Photographs should exhibit high contrast. Arrows, letters and numbers should be inserted with template rub-on letters. Illustrations showing organisms or their details should have an internal scale with the dimensions stated in the legend.

Legends should be typed on a separate sheet. Each legend should be explanatory and meaningful without reference to the text.

5. Submission in electronic form. Technical instructions are given on next page.

6. Proofs, Offprints

For all papers page proofs will be sent as PDF files to the authors. Misprints only should be corrected, and no changes of contents or style should be made on the page proofs. Costs caused by changes or revisions in the page proofs – other than those resulting from printer's errors – exceeding 10 per cent of the typesetting costs will be charged to the author.

Springer will supply the corresponding author with one **PDF-file** of each paper free of charge for your own personal use. Additional offprints may be ordered at cost price. A price list and an order form will be sent with the proofs. The filled – in order form should accompany the corrected proofs when they are returned.

7. Online First publication. *Online First* articles are published in electronic form weeks before distribution of the printed journal. An *Online first* publication date is published in each *Online First* article and its print version. Authors should be aware that after electronic publication they cannot withdraw an article or change its content. Any corrections have to be made in an Erratum which will be hyperlinked to the article. *Online First* articles can be cited using their *Digital Object Identifier*, a unique and consistent identification code included in both the print and the electronic versions.

All business communications and all correspondence concerning technical details, financial items, and offprints should be addressed directly to SpringerWien New York, Production Department, Sachsenplatz 4-6, P. O. Box 89, 1201 Wien, Austria (Fax +43/1/330 24 26-64; e-mail: petra.naschenweng@springer.at).

Technical instructions for manuscripts and illustrations in electronic form

Text

Submit the digital file of your paper together with the corresponding printout containing the final version of your work. To organize the structure of your paper, please follow the detailed "Instructions to Authors". Save your data either as PC-compatible text format such as Word 95/97/00/XP or RTF (Rich Text Format) or as Word for Macintosh. If you have used LaTeX for your paper, you can send this file together with your text version.

Layout guidelines

- Place figure captions and tables at the end of the paper consecutively numbered according to the numbering in the text.
- Do not include field functions (except for equations) and use normal plain fonts (e.g., Times New Roman, Helvetica ...) for the text and labelling of the figures.
- For textual emphasis italics or bold face types can be used.

Figures

Submit all figures as separate files (with printouts) and do not integrate them into the text file; the file names should include the relevant number of the figure.

Technical guidelines

- Halftone figures: For an acceptable reproduction in color a resolution of 300 dpi is necessary. The figures must be converted in CMYK-model and stored as tiff-file (24 bit). Monotone figures must be stored in grayscale model (8 bit) with the same final resolution.
- Line drawings: All figures (colored or black & white) including line arts and text labellings created with a drawing programme (Adobe Illustrator, Macromedia Freehand, CorelDraw) should be stored with a resolution not less than 800–1200 dpi in eps-format. The used fonts must be embedded in the file to avoid changes or lost characters.

Do not use presentation programmes (e.g., PowerPoint ...) or files downloaded from the internet to submit figures; in most cases data cannot be processed.

For further information please contact:

 SpringerWienNewYork

Production Department, Sachsenplatz 4–6, 1201 Wien, Austria
Fax +43/1/330 24 26-64; E-mail: production@springer.at