

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**CITOGENÉTICA EVOLUTIVA NA FAMÍLIA ASTERACEAE
USANDO FLUOROCROMOS CMA/DAPI E FISH COM
SONDAS DE DNAr 45S E 5S**

EBENÉZER BERNARDES CORREIA SILVA

VIRTUS IMPAVIDA

**RECIFE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**CITOGENÉTICA EVOLUTIVA NA FAMÍLIA ASTERACEAE
USANDO FLUOROCROMOS CMA/DAPI E FISH COM
SONDAS DE DNAr 45S E 5S**

EBENÉZER BERNARDES CORREIA SILVA

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Genética
da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para
obtenção do grau de Doutor em
Genética pela UFPE

Orientadora: Profª. Dra. Ana Maria Benko Iseppon

Coorientadores: Profª. Dra. Ana Christina Brasileiro-Vidal

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

**RECIFE
2010**

Silva, Ebenézer Bernardes Correia

Citogenética evolutiva na família Asteraceae usando fluorocromos CMA/DAPI e FISH com sondas de DNAr 45S e 5S / Ebenézer Bernardes Correia Silva. – Recife: O Autor, 2010.

75 folhas : fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko Iseppon

Co-Orientadores: Ana Christina Brasileiro-Vidal

Reginaldo de Carvalho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Genética, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Genética 2. Citogenética 3. Heterocromatina 4. Angiosperma I. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

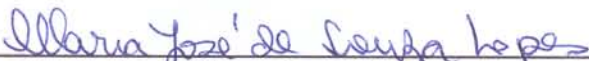
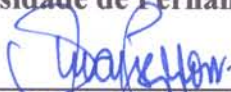
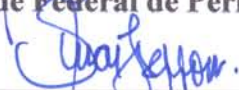
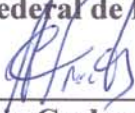
**Parecer da comissão examinadora da tese de doutorado de:
Ebenézer Bernardes Correia Silva**

intitulada:

**Citogenética evolutiva na família Asteraceae usando fluorocromos
CMA/DAPI e FISH com sondas de DNAr 45S e 5S**

**A comissão examinadora considera o presente trabalho
[APROVADO]**

**Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Ebenézer Bernardes Correia
Silva faz jus ao grau de Doutor em Genética pela UFPE. Recife, 17/12/2010**

1º Examinador:	 _____ Profa. Dra. Maria José de Souza Lopes Universidade Federal de Pernambuco
2º Examinador:	 _____ Profa. Dra. Vilma Loreto da Silva Universidade Federal de Pernambuco
3º Examinador:	 _____ Profa. Dra. Ana Emília Barros e Silva Universidade Federal da Paraíba
4º Examinador:	 _____ Profa. Dra. Rita de Cassia de Moura Universidade de Pernambuco
5º Examinador:	 _____ Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon Universidade Federal de Pernambuco
Orientadora:	 _____ Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon Universidade Federal de Pernambuco
Coorientadora:	 _____ Profa. Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal Universidade Federal de Pernambuco
Coordenador:	 _____ Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas Universidade Federal de Pernambuco

Ao Deus de amor e infinita bondade

A minha mãe, meu pai, minha irmã e minha tia

Dedico

Agradecimentos

A Deus pela vida e saúde, por permitir ter dado mais um passo na minha carreira e pelas inúmeras bênçãos recalcadas sacudidas e transbordantes que tenho recebido.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, em nome do coordenador Antônio Carlos de Freitas, como também a toda equipe de funcionários, especialmente Lobo, Zizi e Romildo, bem como os professores do Departamento, os quais se empenham na nossa formação como Rosilda Silva, Maurício Silva, Valdir Balbino, Marcos Morais, Éderson Kido, Mônica Carvalho e Tercílio Calsa.

À CAPES, ao CNPq e à FACEPE pelo apoio financeiro oferecido para o desenvolvimento deste projeto.

Meu interesse no curso de biologia foi a área de ecologia. A mudança foi mérito de algumas pessoas que tenho muito carinho, o primeiro, Adriano Barbosa, que me indicou o estágio, a segunda, Vilma Loreto (atual professora do Departamento e na época aluna de doutorado), que articulou minha entrada no Laboratório, culminando em Maria José (Mazé), minha primeira orientadora e um grande exemplo de profissional. Outra amizade importante adquirida neste momento foi a da professora Neide Santos, a qual a junção da qualidade profissional com a doçura inigualável que lhe é peculiar, me fizeram seu admirador não secreto.

Posteriormente fui adotado pela “mamãe do céu” a professora titular Ana Maria Benko Iseppon, personagem da minha história que eu realmente tenho muito a agradecer. Agradecer pelo exemplo profissional, exemplo de vida, exemplo de líder, exemplo de colega, exemplo de amiga. Não tenho palavras para agradecer tudo que fez por mim.

À professora Ana Christina Brasileiro Vidal, a qual foi de fundamental importância para o desenvolvimento do projeto, o aprendizado da genética, bem como o crescimento como pessoa. As palavras serão sempre insuficientes para agradecer seu apoio e a dedicação para meu crescimento.

Ao professor Reginaldo de Carvalho pela participação científica desde o período de mestrado

Aos amigos do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal Ágatha, Alberto, Amanda, Amaro, Ana Félix, Ana Carolina, Anaregina Souza, Emanuelle (filha), Giovani, Hayana, Ivanildo, Karla, Lidiane, Luís, Neto, Nina, Pollyana, Rodrigo e aos técnicos Claudete, Vanessa, Derô, Diegão, Valéria e Gilda pelo companherismo, apoio e descontração de tantas horas juntos. Alguns merecem ainda mais destaque como Diego Sotero e Geyner Alves pelo auxílio na redação do texto, Ana Rafaela na preparação das pranchas, Santelmo Vasconcelos sempre com observações oportunas e Brunno Leite, que foi uma alavanca do trabalho na preparação das lâminas com uma habilidade divina.

À minha grande amiga Kyria Bortoleti pelo auxílio em todas as etapas do desenvolvimento do projeto. Pelo companherismo, confiança, paciência, sempre com a mão estendida em minha ajuda e que fez dividir por dois todas as dificuldades enfrentadas nestes anos.

Às minhas amigas Anna Theresa, Anna Carla e Helen Barros por todo apoio e incentivo durante tantos anos.

Ao Instituto Federal de Alagoas (IFAL) em nome da Diretora Jeanne Melo e toda equipe de professores da biologia Luzenita Mallmann, Fábio Calazans, Sandra Ferraz, Ângela Barros, Rosângela Miranda, Lausanne Damasceno e aos técnicos Maria Isabel e Genilton Lopes, os quais ajudaram muito no compartilhar de experiência, material e em especial por toda liberação de carga-horária, indispensável para tornar este trabalho possível.

À minha família por todo apoio e incentivo, em especial ao meu pai Laury Bernardes *In memorian*, minha mãe Marlene Peixoto, meu avô Heronides Campelo, Minha irmã Laurylene Arão e seu esposo Marcelo Arão, minha tia Leny Amorim com seu esposo Pedro Malheiros, e a companhia, carinho e amor de Lirinha e toda sua família.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para minha formação, e desenvolvimento deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tabelas.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. Revisão da literatura.....	4
3.1. Aspectos taxonômicos da família Asteraceae.....	4
3.2. Distribuição geográfica, centro de origem e evolução das Asteraceae.....	6
3.3. Importância econômica no Brasil e no mundo.....	8
3.4. Considerações gerais sobre sistemática com ênfase na citotaxonomia em Asteraceae.....	9
3.4.1. Subfamília Carduoideae com ênfase em <i>Cynara cardunculus</i> L.	10
3.4.2. Subfamília Asteroideae com ênfase nas espécies <i>Leucanthemum vulgare</i> Lam., e <i>Bidens sulphurea</i> (Cav.) Sch.Bip.....	11
3.4.3. Subfamília Cichorioideae – Cichorieae.....	13
3.4.3.1. Evolução cromossômica no processo de divergência genética dentro de Cichorieae.....	14
3.4.3.2. Diferenciação da cromatina na subfamília Cichorioideae.....	16
4. Referências Bibliográficas.....	17

5. Manuscrito de Artigo Científico I

Caracterização cromossômica de <i>Cichorium endivia</i> L. e <i>C. intybus</i> L. (Asteraceae) com fluorocromos CMA/DAPI e FISH com sondas de DNAr 45S e 5S.....	26
--	----

6. Manuscrito de Artigo Científico II

Citogenética evolutiva em onze espécies da família Asteraceae utilizando bandeamento fluorescente (CMA/DAPI) e hibridização in situ (FISH) com sondas 45S e 5S.....	44
---	----

7. Conclusões.....	68
---------------------------	-----------

8. Anexos.....	69
-----------------------	-----------

8.1.Instrução para os autores.....	69
---	-----------

9. Memorial do aluno.....	75
----------------------------------	-----------

Lista de abreviaturas

AgNO ₃	Nitrato de prata
APG	<i>The Angiosperm Phylogeny Group</i> / O Grupo de Filogenia de Angiospermas
AT	Adenina – Timina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CGP	<i>Compositae Genome Project</i>
CMA	Cromomicina A
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> / Ácido Desoxirribonucleico
DNAcp	DNA cloroplastidial
DNAr	DNA ribossomal
DNAr 45S	DNA ribossomal 45S
DNAr 5S	DNA ribossomal 5S
EST	<i>Expressed sequence tag</i> / Etiqueta de sequências expressas
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i> / Hibridização Fluorescente <i>In Situ</i>
GC	Guanina – Citosina
GISH	<i>Genomic In Situ Hybridization</i> / Hibridização Genômica <i>In Situ</i>
HC	Heterocromatina Constitutiva
HIS	<i>In Situ Hybridization</i> / Hibridização <i>In Situ</i>
HC- RON	Heterocromatina constitutiva associada à RON
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICNA	Index to Chromosome Number in Asteraceae
IFAL	Instituto Federal de Alagoas
IPCN	Index to Plant Chromosome Number
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> / Espaçador de transcrito interno
kb	Kilo bases (mil pares de bases)
LGBV	Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> / Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNAr	RNA ribossomal
RONs	Regiões Organizadoras de Nucléolos
<i>sp</i>	Espécie
<i>ssp</i>	Subespécie
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

Lista de Figuras

Manuscrito I

Fig. 1 Células metafásicas dos acessos (a – b) *Cichorium endivia* subsp. *endivia* var. *endivia* (c – d) *C. intybus* var. *intybus*, com inserto de *C. intybus* var. *sativum* e (e - f) *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom. (a, c, e) Sobreposição de células coradas com os fluorocromos DAPI (azul) e CMA (amarelo). (b, d, f) Células hibridizadas com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde), contracoradas com DAPI. Setas indicam as bandas CMA⁺⁺/DAPI⁻ (a, c, e) e DNAr 45S (b, d, f). Cabeças de seta apontam sítios de DNAr 5S (b, d, f), bandas CMA⁺/DAPI⁰ (c) e CMA⁺⁺/DAPI⁻ (e). Insertos em c e d destacam os cromossomos portadores de DNAr. Inserto em e e f destacam os cromossomos dos pares heteromórficos 3 e 8. Barra em f corresponde a 10 µm..... 34

Fig. 2 Representação esquemática dos cromossomos de *Cichorium*: (a) Idiogramas das espécies *C. endivia* (a'), *C. intybus* (a'') e *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom (a'''). Os pares heteromórficos deste último acesso estão representados por linhas abaixo de ambos os homólogos. (b) Possíveis eventos ocorrido nos pares 3 e 8 de *C. intybus* como translocação recíproca com fissão (I) e fusão (II) cêntrica, na formação do novo citotipo de *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom (c)..... 35

Manuscrito II

Fig. 1 Células metafásicas de (a) *Cynara cardunculus*, (b) *Leucanthemum vulgare*, (c – d) *Bidens sulphurea* e (e – f) *Scolymus hispanicus*. Em (a, b, c, e) sobreposição de células coradas com os fluorocromos CMA (amarelo) e DAPI (cinza). Em (d, f) células hibridizadas com sondas de DNAr 45S (verde) e 5S (vermelho), contracoradas com DAPI. Inserto em b mostra núcleo interfásico reticulado, e em f cromossomos de outra célula com sítios de DNAr 5S. Setas apontam as bandas CMA⁺⁺/DAPI⁻ (a, b, c, e) e DNAr 45S (d, f). Cabeças de seta apontam sítios de DNAr 5S (d) e bandas CMA⁺/DAPI⁻ (c). Barra corresponde a 10 µm..... 52

Fig. 2 Células em metáfase de *Sonchus asper* (a - b) e *So. oleraceus* (c - d). Em (a, c) sobreposição de células coradas com os fluorocromos CMA (amarelo) e DAPI (cinza). Em (b, d) células hibridizadas com sondas de DNAr 45S (verde) e 5S (vermelho), contracoradas com DAPI. Inserto em b

mostra os pares 1 e 6, portadores de DNAr da mesma célula. Setas apontam as bandas CMA⁺⁺/DAPI⁻ (**a**, **c**) e DNAr 45S (**b**, **d**). Cabeças de seta apontam sítios de DNAr 5S (**b**, **d**) e bandas CMA⁺/DAPI⁻ (**a**, **c**). Barra em **d** corresponde a 10 µm.....

Fig. 3 Células de *Chondrila juncea* (**a** - **b**), *Taraxacum officinale* (**c** - **d**), *Prenanthes purpurea* (**e**) e *Leontodon incanus* (**f** - **g**). Em (**a**, **c**, **e**, **f**) sobreposição de células coradas com os fluorocromos CMA (amarelo) e DAPI (cinza). Em (**b**, **d**, **g**) células hibridizadas com sondas de DNAr 45S (verde) e 5S (vermelho), contracoradas com DAPI. Setas apontam as bandas CMA⁺⁺/DAPI⁻ (**a**, **c**, **e**, **f**) e DNAr 45S (**b**, **d**, **g**). Cabeças de seta apontam sítios de DNAr 5S (**b**, **d**, **g**) e bandas CMA⁺/DAPI⁻ (**a**, **c**). Inseto em **a** contém um par de *Ch. juncea* em prometáfase sem bandas DAPI terminal. Inseto em **g** contém os pares 1 e 4, portadores de DNAr 5S. Barra em **g** corresponde a 10 µm.

Fig. 4 Cariograma e idiograma de três células em diferentes estágios de condensação de *Tolpis barbata*. Bandeamento CMA/DAPI com CMA (amarelo) e DAPI (cinza) em uma prometáfase menos (**a**) e mais (**b**) condensada. Célula metafásica com mesmo padrão de coloração (**c**), e FISH apenas dos cromossomos portadores de DNAr (**d**), sendo DNAr 45S (verde) e 5S (vermelho), contracorados com DAPI. Setas finas apontam bandas CMA⁺⁺/DAPI⁻ correspondentes aos sítios de DNAr 45S, cabeças de seta apontam bandas CMA⁺/DAPI⁻ correspondentes aos sítios de DNAr 5S e setas largas apontam as bandas de condensação. barra corresponde a 10 µm.

Fig. 5 Dendrograma representativo das espécies analisadas no presente trabalho, baseado nas árvores da família Asteraceae e subfamília Cichorioideae propostas por Funk et al. (2009) e Kilian et al. (2009), respectivamente, excluindo todos os ramos intermediários e levando em consideração apenas critérios de taxonomia para divisão dos nós. Cada ramo terminal apresenta o idiograma da sua respectiva espécie. Próximos dos nós e ramos do dendrograma, informações representativas de características cariotípicas conservadas (ver texto). Do lado direito da figura a letra “SF” representa as subfamílias (SF1: Carduoideae, SF2: Asteroideae e SF3: Cichorioideae) “T” as tribos (T1: Carduinae, T2: Anthemideae, T3: Coreopsidae) e “ST” as subtribos (ST1: Scolyminae, ST2: Hyoseridinae, ST3: Chondrillinae, ST4: Crepidinae, ST5: Hypochaeridinae, ST6: Cichoriinae).

Lista de Tabelas

Manuscrito I

Tabela 1 Acessos de <i>Cichorium endivia</i> e <i>C. intybus</i> utilizados no presente trabalho com suas procedências, dados citogenéticos de tamanho do complemento, média cromossômica e indicação das figuras que ilustram os acessos correspondentes.	32
--	----

Manuscrito II

Tabela 1 Espécies analisadas no presente trabalho com sua classificação taxonômica, procedência, características citogenéticas analisadas e descrições anteriores referentes aos números cromossômicos.	49
---	----

Resumo

A família Asteraceae contém a maior biodiversidade entre as angiospermas, sendo relativamente bem estudada citogeneticamente quanto ao número cromossômico; no entanto, pouco se conhece a respeito das características específicas da cromatina da maioria de seus representantes. Neste contexto, o número diploide, o tamanho cromossômico, o padrão de bandeamento CMA/DAPI e a distribuição de genes ribossomais por FISH foram utilizados em uma análise comparativa de 23 acessos pertencentes a 13 espécies, 11 gêneros, nove tribos e três subfamílias, no intuito de analisar suas relações evolutivas. As alterações cromossômicas encontradas evidenciaram alguns rearranjos cariotípicos. Os sítios de DNAr 45S e 5S variaram em número e localização. Oito padrões de bandeamento CMA/DAPI foram descritos para a heterocromatina: 1) $CMA^{++}/DAPI^{-}$, colocalizada com sítio de DNAr 45S; 2) $CMA^{+}/DAPI^{-}$, colocalizada com sítio de DNAr 5S; 3) bandas $CMA^{+}/DAPI^{-}$ terminais; 4) bandas $CMA^{-}/DAPI^{+}$ terminais; 5) bandas $CMA^{-}/DAPI^{++}$ terminais; 6) bandas $CMA^{-}/DAPI^{+}$ pericentroméricas; 7) bandas $CMA^{-}/DAPI^{++}$ pericentroméricas, e 8) bandas dependentes do padrão de condensação. O gênero *Cichorium* destacou-se por apresentar variação interespecífica relacionada à diferença no número de sítios de DNAr entre *C. endivia* e *C. intybus*. Além disso, um dos acessos de *C. intybus* mostrou uma variação intraespecífica, com dois pares portadores de DNAr envolvidos em uma provável translocação recíproca. A ampla variabilidade de dados citogenéticos foi informativa, auxiliando no entendimento da evolução, compreendendo caracteres promissores para a classificação sistemática desta família.

Palavras-chave: Cariótipo, Compositae, evolução, heterocromatina e mapeamento cromossômico

Abstract

The Asteraceae family is the largest in terms of biodiversity among angiosperms, being relatively well studied regarding previous chromosomal conventional staining procedures. However, little is known about specific features of the chromatin regarding most of its representatives. In this context, the diploid number, chromosome size, banding pattern using CMA/DAPI and distribution of ribosomal genes by FISH were used in a comparative analysis of 23 accessions belonging to 13 species, 11 genera, nine tribes and three subfamilies, in order to infer about their evolutionary relationships. The chromosomal alterations found showed some karyotype rearrangements. The 45S rDNA and 5S signals varied in number and location. Eight different heterochromatin CMA/DAPI banding patterns have been identified, including: 1) CMA⁺⁺/DAPI⁻, with the presence of 45S rDNA, 2) CMA⁺/DAPI⁻ associated with 5S rDNA; 3) terminal CMA⁺/DAPI⁻ bands; 4) terminal CMA⁻/DAPI⁺ blocks; 5) terminal CMA⁻/DAPI⁺⁺ bands; 6) pericentromeric CMA⁻/DAPI⁺ blocks; 7) pericentromeric CMA⁻/DAPI⁺⁺ bands; and 8) bands depending on the condensing pattern. The genus *Cichorium* was distinguished by an interspecific variation, including differences in the number of rDNA repeats between *C. endivia* and *C. intybus*. Moreover, one of the accessions of *C. intybus* showed an intraspecific variation, involving two chromosome bearing rDNA sites, indicating the occurrence of a reciprocal translocation. The wide variability of cytogenetic data was very informative, helping in the understanding of the evolution of the group, including promising characters for systematic classification of this family.

Keywords: Karyotype, Compositae, evolution, heterochromatin and chromosome mapping

1. Introdução

A família Asteraceae L. é a mais representativa em todo o reino Plantae, sendo caracterizada principalmente pela inflorescência do tipo capítulo, na qual várias flores pequenas reúnem-se em um único receptáculo discoide (BONIFACINO *et al.*, 2009). Atualmente, é constituída por aproximadamente 1.620 gêneros e 23.000 espécies, destacando-se o girassol (*Helianthus annuus* L.), alface (*Lactuca sativa* L.), chicória (*Cichorium* sp.), alcachofra (*Cynara scolymus* L.), dente-de-leão (*Taraxacum officinale* F.H. Wigg) e cardo-de-ouro (*Scolymus hispanicus* L.), devido à sua importância alimentícia (DEMPEWOLF *et al.*, 2008).

Taxonomicamente, a penúltima classificação de Bremer (1994) dividiu a família em três subfamílias (Barnadesioideae, Cichorioideae e Asteroideae), levando em consideração principalmente características morfológicas e dados moleculares. Recentemente, Funk *et al.* (2009), utilizando principalmente comparações entre sequências de genes plastidiais, identificaram um alto número de agrupamentos parafiléticos, sugerindo uma nova classificação. Assim, sugeriu-se uma alteração da história evolutiva para 12 subfamílias e 49 tribos. Entretanto, esses autores indicam a necessidade da associação de abordagens mais informativas na definição das topologias encontradas, tais como a associação de caracteres moleculares, morfológicos e citogenéticos.

No âmbito da genética molecular, Asteraceae tem sido favorecida pelo CGP (*Compositae Genome Project*), que consiste em uma abordagem multidisciplinar, em que vários projetos vêm sendo realizados em parceria com Universidades, agregando informações sobre fisiologia, bioquímica e principalmente genética. Como resultado desses estudos, existe um banco de EST (*Expressed sequence tag*) com mais de 560.000 sequências de 21 espécies, destacando-se sete do gênero *Helianthus* L. e cinco do gênero *Lactuca* L., principais objetos de estudo desse consórcio. Estas pesquisas têm servido de base para estudos de evolução, bem como, para o melhoramento dessas culturas e de outras espécies relacionadas (CGP, 2010).

Do ponto de vista citogenético, esse grupo tem sido bem estudado por coloração convencional, com vários trabalhos de descrição numérica, como por exemplo, uma sequência de artigos iniciados por Raven *et al.* (1960) intitulado *Chromosome Numbers in Compositae I*, que se encontra na 18ª edição publicada por Carr *et al.* (1999). Adicionalmente, um banco de dados intitulado *Index to Chromosome Numbers in Asteraceae* (ICNA) (<http://www.lib.kobe-u.ac.jp>) tem contribuído para a disponibilidade dessas informações. Embora menos comuns, análises cariomorfológicas mais detalhadas têm resultado em informações importantes, incluindo variações interespecíficas e intraespecíficas. No gênero *Hieracium* L., por exemplo,

as espécies diploides são incomuns, enquanto as poliploides têm ampla distribuição (SZELAG *et al.*, 2007). Em *Mikania* Willd., vários citótipos foram descritos em diferentes populações (RUAS *et al.*, 2000).

Em relação à utilização de bandeamento cromossômico com fluorocromos base-específicos e hibridização *in situ* fluorescente (FISH), existem poucos relatos para essa família. Neste sentido, as descrições estão restritas a pequenos grupos como, girassol (SCHRADER *et al.* 1997), alface (MATOBA *et al.*, 2007), *Hypochaeris* L. (RUAS *et al.*, 2005) e *Tragopogon* L. (PIRES *et al.*, 2004; SOLTIS *et al.*, 2004), revelando ampla diversidade genômica. No entanto, análises com uma maior quantidade de gêneros, como as realizadas por FREGONEZI *et al.* (2004) ou GARCIA *et al.* (2010) são raras e as modificações cromossômicas existentes dentro da família como um todo têm sido pouco exploradas.

A ampla variação cromossômica, diferenças no padrão de bandeamento com fluorocromos e número de sítios de DNAr descritos nos trabalhos supracitados, ratifica a citotaxonomia como importante ferramenta no entendimento da evolução deste grupo. Assim, objetivando elucidar as principais características citogenéticas de representantes da família Asteraceae, mapas cromossômicos foram construídos para 13 espécies vegetais utilizando as metodologias de fluorocromos CMA/DAPI e FISH, com a finalidade de sugerir caracteres promissores para a classificação sistemática da referida família a partir das modificações cariotípicas encontradas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Efetuar uma caracterização citogenética de representantes da família Asteraceae, com ênfase na subfamília Cichorioideae, visando estabelecer a relação entre os cariótipos analisados, inferindo sobre sua relação filogenética de modo a auxiliar no entendimento de sua evolução, bem como em futuros programas de melhoramento vegetal.

2.2 Objetivos específicos

1. Analisar citogeneticamente espécies da família Asteraceae, gerando informações sobre seu número cromossômico, morfologia e distribuição de genes ribossomais.
2. Identificar regiões de Heterocromatina Constitutiva (HC) e sua especificidade de bases GC/AT por meio de coloração com os fluorocromos CMA/DAPI.
3. Utilizar a metodologia de hibridização *in situ* com sondas de DNAr 45S e 5S, para definir sua localização ao longo do cromossomo, inferindo sobre a distribuição e evolução desses marcadores no grupo.
4. Gerar mapas citogenéticos de espécies selecionadas, a partir da medição dos cromossomos e preparação de idiogramas representativos, inferindo comparativamente sobre modificações citogenética entre os cariótipos.

3. Revisão da literatura

3.1. Aspectos taxonômicos da família Asteraceae

A família Asteraceae possui mais de 23.000 espécies, correspondentes a cerca de 10% da flora mundial, sendo por isso considerada um dos grupos de maior sucesso evolutivo dentro do reino Plantae (FUNK *et al.*, 2009). Seus estudos iniciaram no começo do século XIX pelo botânico francês Henri Cassini, o qual subdividiu a família em 19 tribos. Muitos estudos modificaram a taxonomia da família, porém, com a diversidade existente, a dificuldade de estabelecer reações entre as espécies continua como um desafio para a sistemática, ainda com grupamentos polifiléticos (ANDERBERG *et al.*, 2007; FUNK *et al.*, 2009).

Pela classificação de Engler (1954), essa família denominava-se Compositae Giseke, pertencente à ordem Campanulales, ou Synandreae, agrupada em conjunto com Campanulaceae, Sphenocleaceae, Goodeniaceae, Stylidiaceae, Brunoniaceae e Calyceraceae. O nome Compositae faz referência à inflorescência do tipo capítulo, antes denominada de inflorescência composta, que corresponde a principal característica morfológica deste grupo (JOLY, 2002).

O capítulo compreende um tipo de inflorescência formada por muitas flores reduzidas, sésseis, agrupadas de uma forma compacta diretamente sobre um receptáculo em formato de disco. As flores periféricas, em geral, apresentam um prolongamento unilateral (lígula), sendo denominada de flores liguladas. As flores centrais são simples, sem prolongamentos e por isso denominadas tubiformes. Além disso, existem brácteas que envolvem a inflorescência até a abertura do capítulo, semelhante a sépalas. Devido a esse arranjo, o aspecto da inflorescência assemelha-se a uma única flor, na qual as flores liguladas parecem pétalas. Esta estratégia reduz o investimento necessário para atrair polinizadores, pois apenas uma pequena porção das flores produzem pétalas grandes e estas beneficiam todas as outras. Embora o arranjo de flores liguladas nas bordas e tubiformes ao centro seja o mais comum, os capítulos podem conter apenas flores tubulosas (como nos gêneros *Vernonia* e *Eupatorium*), apenas flores liguladas (como *Taraxacum* e *Cichorium*), ou ainda somente flores bilabiadas (*Mutisia*), neste último quando ocorre um lábio superior formado por duas pétalas, e um lábio inferior formado por três pétalas (JOLY, 2002).

Em Asteraceae encontra-se uma ampla variedade de hábitos, que vão desde ervas, subarbustos e trepadeiras, até alguns poucos representantes arbóreos, sendo cerca de 98% correspondente a plantas de pequeno porte. Outras características destacam-se, tais como as

folhas inteiras, fendidas ou denteadas, alternas ou opostas, normalmente com canais secretores de resina ou látex, inflorescência em capítulo, arranjas em racemo, flores pentâmeras, diclamídeas ou sem cálice, com simetrias radial, zigomórfica ou bilabiada, hermafroditas ou de sexo separado, podendo estar na mesma inflorescência, ou dioicas. O androceu apresenta cinco estames férteis, soldados na base, formando um tubo por onde passa o estilete, porém de filetes livres, apresentando anteras intosas. O ovário é ínfero, bicarpelar, unilocular com um único óvulo ereto. O cálice modifica-se profundamente formando o papilho cerdoso ou plumoso que ajuda na dispersão do fruto, em geral anemófila, ou por epizooecoria, aderindo-se à pele de animais. O fruto do tipo arquênio, de pericarpo seco com seu arranjo formando um pseudofruto denominado de cipsela (JOLY, 2002; JUDD *et al.*, 1999).

Posteriormente, pela classificação de Cronquist (1981), a família passou a ser denominada de Asteraceae Martynov, visto que nesta classificação os táxons recebem o nome do seu representante mais significativo, que no caso pertence ao gênero *Aster*. O nome áster no latim significa estrela, referindo-se ao capítulo radial encontrado neste grupo. Este prefixo nomeia a subclasse Asteridae, superordem Asteriflorae e ordem Asterales integrantes desta classificação (BARROSO, 1991).

De acordo com Judd *et al.* (1999) modificações taxonômicas foram propostas por meio da análise molecular em conjunto com os dados morfológicos e químicos, incluindo a referida família na subclasse Asteridae. Esta é caracterizada principalmente por pétalas fusionadas, ou flores simpétalas, com o número de estames menor ou igual ao número de pétalas. Dentro de Asteridae, há uma grande subdivisão formada por duas ordens, Cornales e Ericales e dois grandes clados, Euasteridae I e II.

Dentro de Euasteridae II, a ordem Aquifoliales encontra-se como grupo mais externo em relação às outras três (Apiales, Asterales e Dipsacales). A família Asteraceae destaca-se pela presença de sesquiterpeno lactona, armazenamento de oligossacarídeos através do composto inulina, presença de poliacetilenos (em geral), óleos terpenoides aromáticos, alcaloides, presença de lactíferos e canais resiníferos (JUDD *et al.*, 1999).

A classificação mais atualizada das angiospermas denomina-se APG (*Angiosperm Phylogeny Group* = Grupo de Filogenia das Angiospermae). Nas taxonomias antigas, especialmente as que utilizam apenas dados morfológicos, o modo de inferir sobre a relação entre grupos torna-se muito difícil. A APG baseia-se em análises cladísticas a partir de estudos moleculares, especialmente dos genes ribossomal DNAr 18S, cloroplastidial *rbcL* relacionado à síntese de rubisco, uma das substâncias responsáveis pela fotossíntese, e *atpB*, gene envolvido na síntese do ATP. Mais especificamente, em clados mais derivados, foram

também utilizadas sequências do genoma cloroplastidial como o gene *matK*, responsável pelo processamento do RNAm, e o gene *ndhF*, cujo produto está envolvido na desidrogenase do NADH, além de três sequências não transcritas (APG, 2003; 2009).

As análises comparativas dessas sequências refletem mais nitidamente relações filogenéticas entre os táxons, permitindo a construção apenas de grupamentos monofiléticos. A família Asteraceae é uma das 11 famílias da ordem Asterales, a qual junto com Aquifoliales e Escalloniales ocupam uma posição basal em relação a Bruniales, Apiales, Paracryphiales e Dipsacales, formando a subclasse Campanulide. Esta subclasse pertence ao clado Asteridae, o qual ocupa uma posição derivada entre as Eudicotiledôneas (Core Eudicots) (APG, 2009).

Dentro da família Asteraceae, as primeiras classificações propostas basearam-se apenas na subdivisão em tribos. Posteriormente, foi proposta a divisão em subfamílias, como por exemplo, nas modificações propostas por Carlquist (1976) e Wagenitz (1976), os quais subdividiram em Asteroideae e Cichorioideae. Esta classificação ficou totalmente obsoleta com estudos moleculares de DNA cloroplastidial (DNACp) realizados por Jansen e Palmer (1987), os quais descreveram que dentro de Asteraceae alguns grupos compartilhavam com outras plantas o DNACp, enquanto outros apresentavam uma inversão na sequência. Este foi um dos principais critérios para posteriormente Bremer (1994) consolidar uma nova classificação com três subfamílias, das quais uma mais primitiva (Barnadesioideae) não portadora da inversão, e duas outras portadoras (Cichorioideae e Asteroideae). Adicionalmente, esta classificação constou com 17 tribos e 1.535 gêneros.

A classificação mais atual para Asteraceae advém de vários estudos de filogenia, os quais foram agrupados em uma superárvore por Funk *et al.* (2009). A partir destas análises, a manutenção da história evolutiva foi observada em 12 subfamílias, 49 tribos e 1.620 gêneros. Apesar da família como um todo ser considerada um grupo monofilético, as relações entre níveis taxonômicos inferiores ainda permanecem pouco compreendidas e vários grupos polifiléticos ainda permeiam a superárvore. Os próprios autores comentam a necessidade da associação de abordagens mais informativas na definição das topologias encontradas, incluindo a associação de caracteres moleculares, morfológicos e citogenéticos.

3.2. Distribuição geográfica, centro de origem e evolução das Asteraceae

Uma das principais características da família Asteraceae é a distribuição cosmopolita, podendo ser encontrada nos mais variados tipos de ambientes, que inclui desde desertos até altas montanhas, com exceção apenas do hábitat aquático. Sobrevive desde ambientes secos a alta umidade, tendo um expressivo número de espécies nas regiões temperadas e tropicais. Os

continentes de maiores destaque são o asiático e o europeu, embora, em alguns locais sua abundância seja notável, destacando-se sudeste dos Estados Unidos, México, sudeste do Brasil, Andes, Mediterrâneo, regiões sudeste e central da Ásia, sul da África e Austrália (BARROSO, 1991; BREMER, 1994; JUDD *et al.*, 1999).

No que tange aos períodos geológicos, admite-se a origem no início do Cretáceo ou Oligoceno, após a separação de Gondwana na parte ocidental, sendo o Oligoceno responsável pela maior abundância do grupo, identificado pelo grande número de pólenes fossilizados. O local mais provável para centro de origem da família delimita-se no sul do Brasil, ou norte dos Andes, devido ao grande número de clados basais na América do Sul (BARROSO, 1991; BREMER, 1994).

A associação do estudo de fósseis com o surgimento e dispersão do grupo revela pontos importantes. Primeiramente, a descoberta do centro de origem na América do Sul no período Oligoceno inferior, sendo identificadas impressões foliares e arquênios. Posteriormente, no Mioceno superior uma abundância de estruturas de Asteraceae foi encontrada por toda Europa, caracterizando seu rápido estabelecimento, decorrente de seu alto sucesso evolutivo, bem como grande capacidade de dispersão. No Mioceno inferior a ocorrência de um capítulo sugere que esta família se diferenciou rapidamente, apresentando morfologia semelhante às espécies atuais. A marcante presença na região mediterrânea, tanto após o surgimento indicado pelo registro fóssil, quanto na atualidade pelo alto número de representantes aponta essa região como um dos centros de diversificação da família (BARROSO, 1991; BREMER, 1994).

Em relação aos principais grupos que deram origem das Asteraceae, Barroso (1991) ressalta a família Calyceraceae e um complexo formado pelas ordens Dipsacales e Rubiales como basais de todas as Asteridae. Campanulaceae também se destaca na proximidade com Asteraceae, de forma a originar a superordem Asteriflorae pela classificação de Cronquist (1981). As principais características que unem Asteraceae e Campanulaceae são em nível bioquímico, em que ambas apresentam inulina, não possuem tanóides nem compostos iridóides (BARROSO, 1991). Dentre as tribos de Asteraceae, Cynareae e a Heliantheae destacam-se pela presença de caracteres mais primitivos, sendo descritas por Barroso (1991) como prováveis ancestrais de todas as outras tribos dessa família.

No Brasil, cerca de 300 gêneros e aproximadamente 2.000 espécies têm distribuição em todo território brasileiro, especialmente nas regiões áridas, que detém maior diversidade de espécies (SOUZA e LORENZI, 2005). Um trabalho que destaca a importância dessa família no Brasil foi desenvolvido por Almeida *et al.* (2005), que contabilizaram asteráceas remanescentes de cerrado no estado de São Paulo, sendo identificadas 399 amostras, das quais

40% foram de espécies raras. Além disso, 11% das espécies identificadas nesse trabalho não tinham sido registradas em estudos anteriores. Estes resultados evidenciam a importância das asteráceas na biodiversidade brasileira.

3.3. Importância econômica no Brasil e no mundo

Uma grande importância econômica da família trata de seu valor ornamental, devido à beleza de suas inflorescências, destacando-se: cravo-de-defunto (*Tagetes patula*), capitão (*Zinnia elegans*), alegria-de-jardim (*Bidens sulfurea* (Cav.) Sch.Bip.), calêndula ou malmequer (*Calendula officinalis*), rainha-margarida (*Callistephus chinensis*) e margarida (*Leucanthemum vulgare* Lam.), onde se notifica muito desses indivíduos cultivados em jardins (SOARES *et al.*, 2004).

O uso de plantas medicinais e fitoterapia têm crescido muito nos últimos anos no mundo. A família Asteraceae também se destaca nesta categoria. No circuito de plantas medicinais e aromáticas de Belo Horizonte (2005), foram descritas as seguintes espécies: assa-peixe (*Vernonia polyanthes*), candeia (*Eremanthus erytropappus*), carqueja (*Baccharis trimera*), guaco (*Mikania glomerata*) e marcela (*Achyrocline satureoides*). No Rio de Janeiro, estudos de etnobotânica desenvolvidos por Azevedo e Silva (2006) verificaram a comercialização de 17 espécies da família Asteraceae em mercados e feiras-livres, sendo a família de maior predominância no estudo.

Um grande problema entre as espécies medicinais comercializadas nas feiras-livres e mercados ocorre devido a não confirmação científica da sua eficácia, de forma que o remédio homeopático tomado pode ser prejudicial. São exemplos de espécies tóxicas comercializadas como medicinais: losna (*Artemisia absinthium*), catinga-de-mulata (*Tanacetum vulgare*), bardana (*Actium minus*), artemisia (*Artemisia vulgaris*) e arnica (*Arnica montana*) (GOMES *et al.*, 2001).

Além do valor medicinal, para algumas plantas têm-se observado outra característica que acresce sua importância: sua ameaça de extinção. Por exemplo, na lista do IBAMA (2010) (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) de plantas medicinais ameaçadas de extinção encontram-se listadas as espécies *Lychnophora ericoides* e *Vernonia aurea*.

O uso alimentício de asteráceas tem destaque nas espécies de girassol (*Helianthus annuus* L.), alface (*Lactuca sativa* L.), chicória (*Cichorium* sp.), alcachofra (*Cynara cardunculus* L.), dente-de-leão (*Taraxacum officinale* F.H. Wigg) e cardo-de-ouro (*Scolymus hispanicus* L.). Seu cultivo tem sido cada vez maior, visto que possuem um alto teor nutritivo

e uma grande facilidade de manejo (DEMPEWOLF *et al.*, 2008). Krarup (2006) comenta sobre a necessidade de uma reeducação alimentar, tendo em vista os malefícios das comidas industrializadas consumidas no mundo, aumentando os níveis de colesterol, gordura e açúcares sanguíneos, levando a muitas doenças cardiovasculares, e em especial ao número de pessoas com obesidade. Na família Asteraceae, destacam-se a alface e a alcachofra, as quais contêm resveratrol e silimarina, responsáveis pela proteção do sistema vascular e redução dos problemas hepáticos respectivamente, bem como compostos fenólicos (antioxidantes) e sesquiterpenos (sedativos), presentes de uma forma geral em toda família.

Em decorrência da facilidade na dispersão e ampla plasticidade adaptativa, várias espécies são consideradas invasoras (ALEXANDER *et al.*, 2009), a exemplo de *Chondrilla juncea* L., *Leontodon incanum* Schrank, *Tolpis barbata* (L.) Gaertner e *Prenanthes purpurea* L. (WEBER, 2003). Contudo, no gênero *Sonchus*, observa-se um impacto negativo ainda mais acentuado, visto que seus representantes chegam a causar danos na agricultura mediante sua capacidade em armazenar vírus prejudiciais ao cultivo da alface (CHAVES *et al.*, 2007).

3.4. Considerações gerais sobre sistemática com ênfase na citotaxonomia em Asteraceae

Sob o ponto de vista citogenético, Asteraceae tem sido bem estudada pela coloração convencional, com vários trabalhos reportando números cromossômicos, como por exemplo, uma sequência de artigos iniciados por Raven *et al.* (1960) intitulado *Chromosome Numbers in Compositae I*, a qual se encontra na 18ª edição publicada por Carr *et al.* (1999). No que tange à organização dessas informações, dois sites destacam-se na disponibilidade desses dados que são o *Index to Plant Chromosome Numbers* (IPCN), procedente do Missouri Botanical Garden (<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>) e outro mais específico intitulado *Index to Chromosome Numbers in Asteraceae* (ICNA) (<http://www.lib.kobe-u.ac.jp>).

De uma forma geral, na família Asteraceae pode ser observada uma grande amplitude de número cromossômico, incluindo espécies com $2n = 4$, como *Haplopappus gracilis* e *Brachycome lineariloba*, a $2n = 220$, em *Melanthera aspera*, sendo esta dodecaploide. No entanto, cerca de 80% das espécies descritas possuem números entre $2n = 8$ e $2n = 36$, sendo $x = 9$ o número modal, com mais de 30% dos registros (WATANABE *et al.*, 2007). Gruenstaeudl *et al.* (2009), com base em dados de morfologia e sequenciamento, referem este número como básico para a família.

3.4.1. Subfamília Carduoideae com ênfase em *Cynara cardunculus* L.

A alcachofra cultivada, previamente denominada *Cynara scolymus* L. foi identificada como derivada da espécie selvagem *Cy. cardunculus* L., devido principalmente a características morfológicas (ZOHARY e BASNIZKY, 1975). Porém, com o advento das técnicas moleculares, a taxonomia do gênero sofreu alterações e atualmente ambas as espécies foram consideradas como uma única *Cy. cardunculus* L., com diversas variedades, entre elas var. *sylvestris* (Lamk) Fiori, var. *sativa* Moris, var. *scolymus* (L.) Fiori, spp. *scolymus* (L.) Hegi e var. *altilis* DC (SONNANTE *et al.*, 2007). Além das recentes modificações ocorridas dentro do gênero, existem problemas com relação ao posicionamento da subtribo Carduinae dentro da tribo Cardueae, pois ainda não está claro se realmente Carduinae e Centaureinae formam um grupo monofilético, ou trata-se de uma segregação de um dos grupos, gerando um agrupamento parafilético (HÄFFNER e HELLWIG, 1999; GARCIA-JACAS *et al.*, 2002; ROBBA *et al.*, 2005).

Os dados citogenéticos anteriores apenas confirmam o número básico de $x = 17$ para todo o gênero *Cynara* (tribo Cardueae, subtribo Carduinae) (DALGAARD, 1991). Posteriormente, o mesmo número foi proposto para toda a subtribo Carduinae por Häffner (2000), o qual sugere que este número foi provavelmente decorrente de poliploidia, formando $n = 18$, com disploidia descendente originando $n = 17$. A subtribo Carduinae difere da Centaureinae pela maioria das espécies desta última apresentar $x = 9$, sendo as variações numéricas sugeridas principalmente devido a poliploidia e disploidia (HELLWIG, 1994; ROMASCHENKO *et al.*, 2004). O estudo cariológico do gênero *Cirsium*, pertencente à mesma subtribo de *Cynara*, corrobora o número de $2n = 34$ (MELAHAT *et al.*, 2008).

Com relação à quantidade de DNA, observam-se de modo geral valores reduzidos para o grupo, como 5,28 pg de DNA para *Cy. cardunculus* subsp. *scolymus* e 4,24 e 4,84 pg, para *Galactites tormentosa* ($2n = 22$) e *Carduus nutans* ($2n = 16$), respectivamente, as quais são espécies pertencentes a gêneros muito próximos, porém com números diploides diferentes (MAGGINI *et al.*, 1988).

Dados da FISH neste grupo foram obtidos para o gênero *Centaurea* L. nas espécies *Ce. phrygia* ($2n = 2x = 22$), *Ce. jacea* ($2n = 4x = 44$) e *Ce. oxylepis* ($2n = 4x = 44$). Neste caso, a espécie diploide apresentou três pares de DNAr 45S e um de 5S, enquanto nas poliploides observaram-se seis pares de 45S e dois de 5S (DYDAK *et al.*, 2009). Para os gêneros *Amphoricarpus* Spruce ex Miers, *Chardinia* Desf., *Siebera* J.Gay e *Xeranthemum* L, maiores variações cromossômicas foram descritas, caracterizando este grupo como de evolução complexa. Entre os exemplos, destaca-se a poliploidia entre a espécie diploide *X.*

longipapposum ($2n = 2x = 14$) e a tetraploide *X. inapertum* ($2n = 4x = 28$), as quais não apresentam variação no número de sítios de DNAr, sendo quatro de 45S e dois de 5S (GARNATJE *et al.*, 2004).

Em relação aos dados de fluorocromos, Garnatje *et al.* (2004) e Dydak *et al.* (2009) evidenciaram apenas bandas CMA coincidentes com as RONS, não sendo descritas bandas DAPI. Os autores comentam a possibilidade de que a ausência de heterocromatina rica em AT seja uma condição ancestral para esta subfamília.

3.4.2. Subfamília Asteroideae com ênfase nas espécies *Leucanthemum vulgare* Lam., e *Bidens sulphurea* (Cav.) Sch.Bip.

Tanto *Leucanthemum* como *Bidens* apresentaram significativas modificações na taxonomia. A primeira descrição de *Chrysanthemum* por Lineu corresponde atualmente a *Chrysanthemum sensu lato*, composta de 12 subtribos, 108 gêneros (entre os quais *Leucanthemum*) e 1.741 espécies. Na atual classificação, em Coreopisidae, *Bidens* separa-se em três clados, com diferentes graus de afinidade com os gêneros *Thelesperma*, e *Coreopsis* (FUNK *et al.*, 2009; MASUDA *et al.*, 2009).

Em relação à citogenética, os dois gêneros diferem quanto ao número básico, sendo $x = 9$ para *Leucanthemum* e $x = 12$ para *Bidens*. No caso de *Leucanthemum*, o número encontra-se conservado em relação à família (ZHAO *et al.*, 2009). Por outro lado, em *Bidens* a mudança provavelmente advém de disploidias compartilhadas por outros gêneros próximos como *Coreopsis* (TURNER, 1960), com amplitude de $x = 9$ a $x = 14$, e *Comos*, com $x = 10$ a $x = 18$ (STROTHER E PAENERO, 2001).

Os gêneros *Bidens* (FACHINETTO *et al.*, 2008) e *Leucanthemum* (ZHAO *et al.*, 2009) se inserem em grupos com intensos eventos de poliploidia. Embora *B. sulphurea* apresente invariavelmente $2n = 24$ (JOSE E MATHEW, 1995), outras espécies, como *B. subaltermans* e *B. alba*, mostraram ambas $2n = 48$, enquanto *B. pilosa* revelou números de $2n = 36, 48, 54$ e 72 (GROMBONE-GUARATINI *et al.*, 2006; FACHINETTO *et al.*, 2008). Apesar da variabilidade numérica observada para o gênero, a maioria das espécies apresenta $2n = 24$ (ROBINSON *et al.*, 1981).

No complexo formado pela espécie *Leuchanthemum vulgare*, também foi encontrada uma ampla variação citogenética com $2n = 18, 36, 54$ (BOCHER e LARSEN, 1957) e $2n = 72$ (LIPPERT e HEUBL, 1989), sendo $2n = 36$ com o maior número de registros (INCEER E HAYIRLIOGLU-AYAZ, 2007). Estes autores ressaltaram a importância da associação entre a

diversidade ecológica e divergência genética encontrada na compreensão dos processos evolutivos dentro dessa espécie.

Com relação ao tamanho cromossômico, tanto em *Leucanthemum* como em *Bidens* as médias assemelham-se com cerca de 4,0 μm (WILCOX, 1982; GROMBONE-GUARATINI *et al.*, 2006). Cromossomos maiores puderam ser observados em espécies de *Chrysanthemum* *sensu lato*, como na espécie *Tanacetum kittaryanum* (C.A. Mey.) Tzvel. ($2n = 36$), com cromossomos alcançando até 10,13 μm (Zhmyleva e Kondo, 2006). No entanto, em tribos mais basais desta subfamília, como Inuleae, a média de tamanho cromossômico correspondeu a menos de 2,0 μm na maioria das espécies analisadas por Badr *et al.* (1997).

Diversos trabalhos de FISH foram realizados nesta subfamília, inicialmente pela importância econômica do girassol (espécie *Helianthus annuus*), o qual apresenta três pares cromossômicos portadores de DNAr 45S (CUELLAR *et al.*, 1996), sendo estas análises posteriormente estendidas a várias espécies próximas do mesmo gênero (GARCIA *et al.*, 2010). Enquanto todas as outras subfamílias analisadas apresentaram DNAr 45S e 5S em sítios separados, observou-se em vários representantes de Asteroideae que o gene de DNAr 5S pode encontrar-se inserido entre os genes 18S e 26S (partes integrantes do DNAr 45S). Este padrão conhecido como colocalização aparenta ter surgido por volta de 35 milhões de anos atrás, encontrando-se presente nas tribos Anthemidaea, Gnaphaelieae e Heliantheae (GARCIA *et al.*, 2010).

De acordo com vários dados descritos de *Chrysanthemum*, El-Twab e Kondo (2007a) descreveram três padrões distintos acerca da presença e localização de genes de DNAr no cariótipo. No primeiro, o DNAr 45S e 5S são independentes e localizados em cromossomos separados, no segundo estes também estão independentes, mas ocupam o mesmo cromossomo, podendo localizar-se no mesmo braço ou em braço diferente, enquanto no terceiro tipo ocorre a colocalização entre ambos DNAr. Estas diferenças indicaram que no processo de especiação muitos rearranjos cromossômicos podem ocorrer formando novos citotipos. Os dados de FISH em *Chrysanthemum* promoveram informações úteis na indicação de marcas cromossômicas importantes, colaborando para o entendimento da sistemática, taxonomia, evolução e para seu melhoramento.

Para tentar compreender as alterações cromossômicas durante a evolução reticulada El Twab e Kondo (2007b) fizeram análises citogenéticas de híbridos artificiais. Em um primeiro experimento foram cruzadas as espécies *Chrysanthemum boreale* ($2n = 18$, com seis sítios de DNAr 45S e dois de DNAr 5S) e *C. vestitum* ($6n = 54$, com 10 sinais de DNAr 45S e oito de DNAr 5S). Embora o resultado esperado fosse de oito sítios de DNAr 45S (três+cinco) e cinco de DNAr 5S (um + quatro), foram visualizados no híbrido seis sinais de 45S e oito de

DNAr 5S. Os autores sugeriram que essas diferenças entre o resultado esperado e o observado devem se tratar de rápidas modificações genômicas devido a processos de translocação e deleção cromossômica logo após o processo de hibridação. Adicionalmente, os mesmos autores evidenciaram através de GISH que 18 cromossomos do híbrido apresentaram homologia tanto com *C. borale* quanto com *C. vestitum*, enquanto dois cromossomos mostraram translocação entre os dois genomas.

3.4.3. Subfamília Cichorioideae – Cichorieae

Entre os grupos com conflito na taxonomia dentro de Cichorieae destacam-se toda a subtribo Sonchinae, em que foi mostrada, a partir de análise com matK e ITS, uma subdivisão em 10 clados, na qual o gênero *Sonchus* está presente em cinco deles, evidenciando claramente tratar-se de um grupo polifilético (KIM, 2007). Além disso, agrupamentos conflitantes baseados em estudos de sequenciamento foram observados, como *Prenanthes pendulata* (subtribo Hypochaeridinae), que foi agrupada junto aos gêneros *Sventenia* Font Quer, *Babcockia* Boulos e *Sonchus* (subtribo Sonchinae). De modo semelhante, *P. altissima* foi situada próxima a *Ta. officinale* (subtribo Crepidinae), e *P. purpurea* comportou-se como clado irmão dentro de ambas subtribos Sonchinae e Crepidinae (KIM *et al.*, 1996). Os dados de sequenciamento com *ndhF* também evidenciaram que os gêneros *Tolpis* (subtribo Cichoriinae) e *Taraxacum* ainda tem problemas taxonômicos, uma vez que *To. capensis* agrupou-se com *Taraxacum* e *To. staticifolia* com *Crepis* (subtribo Crepidinae) (PARK *et al.*, 2001).

O gênero *Leontodon* também foi bastante modificado taxonomicamente. Pouco depois que Lineu fez a primeira classificação para o gênero, descobriu-se que na verdade tratava-se de vários grupos que correspondem na atualidade a quatro gêneros: *Hypochaeris*, *Helminthotheca*, *Picris* e *Leontodon* (BREMER, 1994). Wider (1975) subdividiu *Leontodon* em dois subgêneros: subg. *leontodon* e subg. *oporinia*. Mais recentemente, Samuel *et al.* (2006), analisando dados de sequenciamento, evidenciaram que *Leontodon* subg. *leontodon* comporta-se como grupo irmão de *Picris* e *Helminthotheca*, enquanto *Leontodon* subg. *oporinia* forma um clado basal entre todos os quatro gêneros, indicando que a classificação é difilética.

Dentro do gênero *Cichorium*, a taxonomia também sofreu várias modificações. Inicialmente, cerca de 30 espécies foram inseridas no gênero, porém quando estudos mais minuciosos foram realizados, foram sugeridas apenas três (TUTIN *et al.*, 1976; PIGNATTI, 1982) e sete espécies (WAGENITZ e BEDARFF, 1989). Mais recentemente, Kiers *et al.*

(2000) descreveram seis espécies para o gênero, reconhecendo *C. calvum* Sch. Bip., *C. pumilum* Jacq., *C. spinosum* L. e *C. bottae* A. Deflers., sendo as demais consideradas como sinônimas ou subespécies de *C. endivia* ou *C. intybus*.

3.4.3.1. Evolução cromossômica no processo de divergência genética dentro de Cichorieae

Nesta subfamília, o número básico de $x = 9$ proposto para toda família (GRUENSTAEUDL *et al.*, 2009) encontra-se bem distribuído dentro de grande parte das espécies analisadas citogeneticamente. Em *Cichorium*, os dados citogenéticos para *C. endivia* (RICK, 1953), *C. intybus* (RICK, 1953; DOBES *et al.*, 1997), *C. intybus* var. *intybus* (LÖVKVIST e HULTGÅRD, 1999) e *C. spinosum* L. (BRULLO, *et al.*, 1977; MONTMOLLIN, 1986) mostraram apenas o número diploide de $2n = 2x = 18$, número que remete a uma informação comum para muitos grupos próximos, como *Agoseris* Raf., *Catananche* L., *Dendroseris* D. Don, *Hieracium* L., *Lactuca* L., *Malacothrix* DC., *Rothmaleria* Font Quer, *Sonchus* L. e *Tolpis* Adans ressaltando a conservação desta característica ao longo da evolução (BREMER, 1994).

No gênero *Sonchus*, as variações numéricas existentes ocorrem principalmente devido a eventos de poliploidia, os quais podem ocorrer não apenas como variação interespecífica, mas também como intraespecífica a exemplo de *So. asper* com $2n = 18$ e $2n = 36$ (CARR *et al.*, 1999) ou *So. oleraceus*, com $2n = 32$ e $2n = 64$ (GEMEINHOLZER E FAUSTMANN, 2005). Em *So. oleraceus* destaca-se ainda que a ausência de $x = 9$ deve-se ao fato de uma anfidiplóidia derivada de *So. asper* ($2n = 18$) e *So. tenerrimus* ($2n = 14$) como proposto por Stebbins *et al.* (1953) e reafirmado por Mejías e Andrés (2004).

Alguns grupos têm poucas variações citogenéticas descritas, como a subtribo Scolyminae e o gênero *Prenanthes*. Em Scolyminae existem quatro gêneros, três deles, *Hymenonema*, *Catananche* e *Gundelia* baseiam-se em $x = 9$. Por outro lado, *Scolymus*, o mais derivado da subtribo, apresenta uma disploidia com $x = 10$, diferindo dos demais por uma nítida variação intragenérica (LACK *et al.*, 1980; NERSEYN e NAZAROVA, 1989). No gênero *Prenanthes* existe uma subdivisão baseada em variações intraespecífica que separam dois subgêneros: subg. *Prenanthes* com $x = 9$ e subg. *Nabalus* com $x = 8$ (MILSTEAD, 1964).

Entre os gêneros de maior diversidade citogenética encontra-se *Leontodon*, em que a citotaxonomia foi de fundamental importância para o entendimento das relações entre seus indivíduos. O gênero *Leontodon* subdivide-se em dois subgêneros: subg. *Leontodon* e subg. *Oporinia*. Dentro do subg. *Leontodon* ainda podem ser divididas duas seções: sect. *Leontodon*, com número básico provavelmente mais primitivo de $x = 7$ e sect. *Asterothrix*, abrigando

espécies com $2n = 8$ e $2n = 22$, sendo estes últimos provavelmente híbridos entre $x = 7$ e $x = 4$, formando $x = 11$ (ROUSI, 1973; PITTONI, 1974; SAMUEL *et al.*, 2006). Por outro lado, no subg. *Oporinia* foram descritos os números básicos de $x = 6$ e $x = 5$ (IZUZQUIZA e FELINER, 1991). Corroborando com a primitividade do $x = 5$, este parece ser o número ancestral para os gêneros *Picris* (SLOVÁK *et al.*, 2007), *Helminthotheca* (OBERPRIELER e VOGT, 1993) e provavelmente *Hipochaeris* (CERBAH *et al.*, 1998).

Duas espécies destacaram-se pela presença de poliploidia: *Chondrilla juncea* e *Taraxacum officinale*. Em *Ch. juncea*, a descrição de $2n = 15$ (BERGAN 1950; 1952) e $2n = 20$ (CHEPINOGA *et al.* 2009), baseada em $x = 5$ foi confirmada por outras espécies do gênero, como *Ch. ambigua*, com $2n = 10$ nos indivíduos diploides, e $2n = 15$ e $2n = 20$, em indivíduos poliploides (BERGMAN, 1950 e 1952; PARRA *et al.*, 1998). Em *Ta. officinale*, a série poliploide baseia-se em $x = 8$, com indivíduos diploides, triploides, tetraploides e hexaploides, sendo o citotipo triploide o mais frequente (RICHARDS, 1973; BAARLEN *et al.*, 2000; KASHIN *et al.*, 2003; SATO *et al.*, 2007a)

Apesar da triploidia proporcionar erros meióticos como trivalentes na meiose I e formação de gametas anormais estas espécies não apresentaram problemas reprodutivos, e por isso têm sido alvos de estudos para compreender quais fatores promovem esta compensação, sendo encontrados três principais: a diplosporia, a agamospermia e a apomixia. A diplosporia está associada à formação de gametas não reduzidos. Em *Taraxacum* a diplosporia advém da formação de núcleos de restituição, os quais são formados com a fusão dos núcleos logo após a primeira divisão meiótica. Como resultados da diplosporia são visualizadas díades, ao invés de tétrades, com o mesmo número de cromossomos da planta mãe. A agamospermia significa que as flores podem originar sementes normais sem a necessidade de polinização. Nos poliploides, é comum que a agamospermia ocorra na formação de todas as sementes. A apomixia, por sua vez, é uma estratégia de reprodução vegetativa a partir da formação de embriões de células não reduzidas do gametófito (BAARLEN *et al.*, 2000; VIJVERBERG *et al.*, 2010). Estes autores admitem que essas estratégias reprodutivas podem estar amplamente distribuídas em outras espécies da família, e correspondem a um dos fatores do sucesso evolutivo do grupo.

Embora a maioria dos trabalhos tenha relatado apenas o número cromossômico das espécies estudadas, alguns promoveram um estudo mais detalhado dos cariótipos, como Dalgaard (1986), que descreveu três cromossomos satelitados no cariótipo de *Tolpis barbata*, e dois em *So. oleraceus*. Estudos posteriores realizados por Mejías e Andrés (2004) apenas no gênero *Sonchus*, descreveram para *So. oleraceus*, *So. asper* e *So. microcephalus* dois pares satelitados em cada uma das espécies. Estes autores também analisaram a morfologia dos

cromossomos nestas três espécies, sendo observada a predominância da morfologia metacêntrica, com alguns submetacêntricos e um par telocêntricos em cada uma das espécies. Estes autores comentaram ainda sobre a dificuldade de descrição da morfologia e visualização dos satélites, devido ao pequeno tamanho dos cromossomos.

Em relação à *Taraxacum*, uma característica levada em consideração nas análises do gênero foi o número e a localização do satélite. Mogie e Richards (1983) e Krahulcová (1993) relataram um satélite intersticial no braço longo em várias espécies deste gênero, sugerindo que a presença deste cromossomo corresponderia a uma característica primitiva para o gênero. Analisando o cariótipo de seis espécies diploides de *Taraxacum* ($2n = 16$), Sato *et al.* (2007b) descreveram para cinco delas os pares cromossômicos 1 e 4 com constrição secundária intersticial no braço longo, e *T. maruyamanum* Kitam, apenas no par 1, salientando evento de alteração no número de satélite dentro do gênero.

Apesar do grande número de trabalhos envolvendo a descrição do número diploide de *T. officinale*, apenas o de Sato *et al.* (2007a), se deteve em aferir o tamanho e a morfologia dos cromossomos. Estes autores encontraram dois tipos de fórmulas cariotípicas dependendo se os indivíduos eram autotriploides ($1M+17m_{cs}+3sm+3sm_{cs}$) ou alotriploide ($4M+11m+1m_{cs}+6sm+2sm_{cs}$). Em relação à morfologia cromossômica de outras espécies, Kokubugata *et al.* (2002), Sato *et al.* (2007b), Aquaro *et al.* (2008), e Peruzzi *et al.* (2009), descreveram a maioria do tipo metacêntrica, com alguns submetacêntricos. Analisando o conteúdo de DNA, Závesky *et al.* (2005) verificaram uma significativa variação de $1C = 0,87$ pg, nas espécies *T. linearisquameum* e *T. brachyglossum*, a $1C = 1,73$, em *T. albidum*, o que significa quase o dobro de DNA para cada genoma haploide. Estes autores comentaram que a variação do conteúdo de DNA sem a variação do número cromossômico pode estar atrelada a pequenas transformações cariotípicas.

3.4.3.2. Diferenciação da cromatina na subfamília Cichorioideae

Entre os trabalhos mais importantes dentro dos grupos mais basais desta subfamília, tem-se o do gênero *Tragopogon*. Este grupo caracteriza-se por uma evolução recente, na qual três espécies (*T. dubius* Scop., *T. porrifolius* L. e *T. pratensis* L.) foram ancestrais diploides ($2n = 12$) de duas espécies ($2n = 24$) aloploiploides (*T. mirtus* Ownbey e *T. miscellus* Ownbey). Em relação à distribuição do DNAr foi observado que *T. dubius* e *T. pratensis* apresentaram apenas um par de sítios de DNAr 45S e 5S, ambos no mesmo cromossomo, porém o sítio de DNAr 45S localizou-se na região terminal do braço curto e o DNAr 5S na

intersticial do braço longo. Em *T. porrifolius* foram observados dois pares de sítios de DNAr 45S e 5S, sendo um cromossomo conservado com 45S e 5S, e o par 4 e 6 portadores de DNAr 45S e 5S, respectivamente. Nos aloploidos, houve uma transmissão direta do número e localização dos sítios de DNAr (PIRES *et al.*, 2004).

Vale salientar neste caso de *Tragopogon*, que apesar da similaridade citogenética, estudos moleculares como análise de isoenzimas, marcadores moleculares dos tipos ITS, ETS, DNAr e avaliação da expressão gênica por *Slot blot*, revelaram uma origem múltipla de diferentes genomas parentais. Com a presença de diferentes sequências para uma mesma espécie de *T. mirtus* e *T. miscellus*, pode ser admitida uma evolução em concerto. Este tipo de evolução em concerto consiste da homogenização das sequências gênicas dentro da espécie e heterogenização entre outras espécies (SOLTIS *et al.*, 2004). Estudos posteriores realizados por Lim *et al.* (2008) identificaram por meio de GISH que indivíduos de *T. mirtus* e *T. miscellus* apresentaram várias alterações, como monossomias, trissomias uniparentais, translocações intergenômicas e variações no número de cópias e expressão de DNAr.

Nos estudos realizados por Matoba *et al.* (2007) em *Lactuca*, foram analisados a alface cultivada (*Lactuca sativa*) e três espécies selvagens, as quais apresentaram a forma conservada $2n = 18$, quatro sítios de DNAr 45S e dois de DNAr 5S, sendo um par cromossômico portador de ambos DNAr 45S e 5S. Em *Hieracium transylvanicum*, foi descrito um padrão semelhante àquele de *Lactuca*, com número diploide conservado de $2n = 18$, quatro sítios de DNAr 45S e dois 5S, sendo um par portador dos dois tipos de DNAr (TOMASZ *et al.*, 2010). No caso de *Hypochaeris*, existe uma maior amplitude de variação cromossômica derivada de vários eventos de alterações cromossômicas como translocações, inversões e fusões. Porém, dados sugerem os cariótipos contendo dois sítios de DNAr 45S e um de DNAr 5S em cromossomos separados seja o mais basal para este gênero (CERBAH *et al.*, 1998; RUAS *et al.*, 2005).

4. Referências Bibliográficas

- Alexander JM, Naylor B, Poll M, Edwards PJ, Dietz H (2009) Plant invasions along mountain roads: the altitudinal amplitude of alien Asteraceae forbs in their native and introduced ranges. *Ecography* 32: 334-344.
- Almeida AM, Fonseca CRSD; Prado PI, Almeida NM, Diniz S, Kubota U, Braun MR, Raimundo RLG, Anjos LA, Mendonça TG, Futada SM, Lewinsohn TM (2005) Diversidade e ocorrência de Asteraceae em cerrados de São Paulo. *Biota Neotrop* 5 (2): 1-17.

- Anderberg AA, Baldiwin BG, Bayer RG, Breitwieser J, Jeffrey C, Dillon MO, Eldenas P, Funk V, Garcia-Jacas N, Hind DJN, Karis PO, Lack HW, Nesom G, Nordenstam B, Oberprieler C, Panero JL, Puttock C, Robinson, Stuessy TF, Susanna A, Urtubey E, Vogt R, Ward J, Watson (2007) Compositae. Kadereit JW, Jeffrey (ed) The families and Genera of Vascular Plants VIII. Springer, Alemanha, pp 61-588.
- APG – The Angiosperm Phylogeny Group (2003) An update of the angiosperm phylogeny group classificatin for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot J Linn Soc 141: 399-436.
- APG – The Angiosperm Phylogeny Group (2009) An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot J Linn Soc 161: 105-121.
- Aquaro G, Caparelli KF, Peruzzi L (2008) The genus *Taraxacum* (Asteraceae) in Italy. I. A systematic study of *Taraxacum* sect *Palustria*. Phytol Balcanica 14(1): 61-67.
- Azevedo S, Silva I (2006) Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Acta Bot Bras 20 (1): 185-194.
- Baarden PV, Dijk PJV, Hoekstra RF, Jong JH (2000) Meiotic recombination in sexual diploid and apomictic triploid dandelions (*Taraxacum officinale* L.) Genome 43: 827–835.
- Badr A, Kamel A, Garcia-Jacas N (1997) Chromosomal studies in the Egyptian flora. VI. Karyotype features of some species in subfamily Asteroideae (Asteraceae) Comp News 30: 15-28.
- Barroso GM (1991) Sistemática de Angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa (ed), Viçosa, Vol.3 pp 326.
- Bergan BT (1950) Meiosis in two different clones of the apomictic *Chondrilla juncea*. Hereditas 36: 297-320.
- Bergan BT (1952) Chromosome morphological studies in *Chondrilla juncea* and some remarks on the microsporogenesis. Hereditas 38 (2): 128-130.
- Bocher TW, Larsen K (1957) Cytotaxonomical studies in the *Chrysanthemum leucanthemum* complex. Watsonia 4: 11-16.
- Bonifacino JM, Harold R, Funk VA, Lack HW, Wagenitz G, Feuillet C, Hind N (2009). A history of research in Compositae: early beginnings to the Reading Meeting (1975). In: Funk, V.A., A. Susanna, T. F. Stuessy, and R. J. Bayer (eds.). Systematics, evolution, and biogeography of the Compositae, (ed). IAPT. Austria. Pp. 3-38.
- Bremer K (1994) Asteraceae: cladistics and classification. Timber Press, Portland, 752p.
- Brullo S, Majorana G, Pavone P, Terrasi MC (1977) Numeri cromosomici per la flora Italiana: 283-298. Inf Bot Ital 9: 40-55.

- Carlquist S (1976) Tribal interrelationships and phylogeny of the Asteraceae. *Aliso* 8: 465-492.
- Carr GD, King RM, Powell AM, Robinson H (1999) Chromosome numbers in Compositae. XVIII. *Amer J Bot* 86(7): 1003–1013.
- Cerbah M, Souza-Chies T, Jubier MF, Lejeune B, Siljak-Yakovlev S (1998) Molecular Phylogeny of the Genus *Hypochaeris* Using Internal Transcribed Spacers of Nuclear rDNA: Inference for Chromosomal Evolution. *Mol Biol Evol* 15(3):345–354.
- CGP - Compositae Genome Project Database Disponível em: [http://cgpdb.ucdavis.edu]. acessado em 27 de novembro de 2010.
- Chaves ALR, Colariccio A, Eiras M, Galleti SR (2007) *Sonchus asper* e *S. oleraceus* como reservatórios naturais de vírus em cultivos de alface no cinturão-verde de São Paulo. *Arq Inst Biol* 74(2): 101-106.
- Chepinoga VV, Gnutikov AA, Enushchenko IV, Rosbakh AS (2009) IAPT/IOPB chromosome data 8. *Taxon* 58 (4): 1281–1289.
- Cronquist A (1981) An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, pp 126.
- Cuellar T, Belhassen E, Fernandez-Calvin B, Orellana J, Bella JL (1996) Chromosomal differentiation in *Helianthus annuus* var. *macrocarpus*: heterochromatin characterization and rDNA location. *Heredity* 76: 586-591.
- Dalgaard V (1986) Chromosome studies in flowering plants from Macaronesia. *Anales Jard Bot Madrid* 43(1): 83-111.
- Dalgaard V (1991) Chromosome studies in flowering plants from Macaronesia II. *Willdenowia* 20: 139-152.
- Dempewolf H, Rieseberg LF, Cronk QC (2008) Crop domestication in the Compositae: a family-wide trait assessment. *Genet Resour Crop Evol* 55:1141–1157.
- Dobes C, Hahn B, Morawetz W (1997) Chromosomenzahlen von Pflanzen - Flora Österreichs *Linzer Biol Beit* 29(1): 5-43.
- Dydak M, Kolano B, Nowak T, Siwinska D, Maluszynska J (2009) Cytogenetic studies of three European species of *Centaurea* L. (Asteraceae). *Hereditas* 146: 152-161.
- El-Twab MHA, Kondo K (2007a) FISH physical mapping of 5S rDNA and telomere sequence repeats identified a mapping and mutation in *Leucanthemella linearis* and *Nipponanthemum nipponicum* in *Chrysanthemum sensu lato*. *Chrom Bot* 2: 11-17.
- El-Twab MHA, Kondo K (2007b) Isolation of chromosomes and mutation in the interspecific hybrid between *Chrysanthemum boreale* and *Chr. vestitum* using fluorescence *in situ* hybridization and genomic *in situ* hybridization. *Chromosome Bot* 2: 19-24.

- Engler A (1954) Syllabus der pflanzenfamilien. Gebruder, Bd.I (ed) 12th. Borntraeger, Berlin. pp 214.
- Fachinetto JM, Laughinghouse IV HD, Ferreira da Silva AC, Bosio Tedesco S (2008) Variability of the chromosomal number and meiotic behavior in the populations of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) from southern Brazil. *Caryologia* 61: 164-169.
- Fregonezi JN, Torezan JMD, André LL, Vanzela ALL (2004) A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence in situ hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA₃ banding. *Genet Mol Biol* 27(2): 223-227.
- Funk VA, Susanna A, Steussy TF, Bayer RJ (2009) Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. IAPT, Vienna, pp 965.
- Garcia S, Panero JL, Siroky J, Kovarik A (2010) Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. *BMC Plant Biology* 10:176-194.
- Garcia-Jacas N, Garnatje T, Susanna A, Vilatersana R (2002) Tribal and Subtribal Delimitation and Phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): A Combined Nuclear and Chloroplast DNA Analysis. *Mol Phylogenet Evol* 22(1): 51-64.
- Garnatje T, Vallès J, Vilatersana R, Garcia-Jacas N, Susanna A, Siljak-Yakovlev S (2004) Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). *Plant Biol* 6: 140-146.
- Gemeinholzer B, Faustmann I (2005) New chromosome counts for some Lactuceae (Compositae). *Comp News* 42: 42-47.
- Gomes EC, Elpo ERS, Gabriel, MM, Lopes M (2001) Plantas medicinais com características tóxicas usadas pela população do município de Morretes, PR. *Revista Visão Acadêmica* 2(2): 77-80.
- Grombone-Guaratini MT, Mansanares ME, Semir J, Solferini VN (2006) Chromosomal studies of three species of *Bidens* (L.) (Asteraceae). *Caryologia* 59(1): 14-18.
- Gruenstaeudl M, Urtubey E, Jansen RK, Samuel R, Barfuss HJ, Stuessy T (2009) Phylogeny of Barnadesioideae (Asteraceae) inferred from DNA sequence data and morphology. *Mol Phylogenet Evol* 51(3): 572-587.
- Häffner E, Hellwig FH (1999) Phylogeny of the tribe Cardueae (Compositae) with emphasis on the subtribe Carduinae: an analysis based on ITS sequence data. *Willdenowia* 29: 27-39.
- Häffner (2000) On the Phylogeny of the Subtribe Carduinae (Tribe Cardueae, Compositae). *Englera* 21: 3-208.

- Hellwig FH (1994) Chromosomenzahlen aus der Tribus Cardueae (Compositae). Willdenowia 24: 219-248.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2010) Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção. Portaria nº 37-N de 3 de abril de 1.992. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/flora/divs/plantasextincao.pdf>. Acesso: 02 de Dezembro de 2010.
- Inceer H, Hayirlioglu-Ayaz S (2007) Chromosome numbers in the tribe Anthemideae (Asteraceae) from north-east Anatolia. Bot J Linn Soc 153: 203–211.
- Izuzquiza A, Feliner GN (1991) Cytotaxonomic notes on the *Leontodon* (Asteraceae, Hypochoeridinae). Willdenowia 21: 215-224.
- Jansen RK, Palmer JD (1987) A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). Proc Natl Acad Sci 84: 5818-5822.
- Joly AB (2002) Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. 13 ed. Ed. Nacional, São Paulo, Brasil. pp. 777.
- Jose JC, Mathew PM (1995) Chromosome numbers in the south Indian Heliantheae (Compositae). Comp News 27: 7-10.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA and Stevens PF (1999) Plant Systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Sunderland. pp 576.
- Kashin AS, Demotshco YA, Martinova VS (2003) Caryotype variation in population of apomictic and sexual species of agamic complexes of Asteraceae. Bot Zhurn 88:35-51.
- Kiers AM, Mes THM, R. Meijden Rvd, Bachmann K (2000) A search for diagnostic AFLP markers in *Cichorium* species with emphasis on endive and chicory cultivar groups. Genome 43: 470-476.
- Kim SC (2007) Mapping Unexplored Genomes: A Genetic Linkage Map of the Woody *Sonchus* Alliance (Asteraceae: Sonchinae) in the Macaronesian Islands. Heredity 98(4): 293-299.
- Kim SC, Crawford DJ, Jansen RK (1996) Phylogenetic relationships among the genera of the Subtribe Sonchinae (Asteraceae): evidence from ITS sequences. Syst Bot 21(3): 417-432.
- Kokubugata G, Kondo K, Tatarenko IV, Kulikov PV, Knyasen MS, Ryabinina ZN. (2002) Cytological studies of 13 Asteraceae species from Russia. ChromosomSci. 6(3): 67-72.
- Krahulcová A (1993) New chromosome numbers in *Taraxacum* with reference to SAT-chromosomes. Folia Geobot Phytotax 28(3): 289-294.
- Krarup C (2006) Alimentos básicos del futuro. Agronomía y Forestal 29: 13-18.

- Lack HW, Ern H, Straka H (1980) Die Gattung *Rothmaleria* Font Quer (Asteraceae, Lactuceae). Willdenowia 10: 37-49.
- Lim KY, Soltis DE, Soltis PS, Tate J, Matyasek R, Srubarova H, Kovarik A, Pires JC, Xiong Z, Leitch AR (2008) Rapid chromosome evolution in recently formed polyploids in *Tragopogon* (Asteraceae). Plos One 3(10): 1-13.
- Lippert W, Heubl GR (1989) Chromosomenzahlen von pflanzen aus Bayern und abgrenzenden Gebieten: (Teil 1). Ber Dtsch Bot Ges 60: 73–83.
- Lövkvist B, Hultgård UM (1999) Chromosome numbers in south Swedish vascular plants. Opera Bot 137: 1-42.
- Maggini F, Tucci GF, Gelati MT (1988) Ribosomal RNA genes in species of the Cynareae tribe (Compositae). II. Protoplasma 144: 125-131.
- Masuda Y, Yukawa T, Kondo K (2009) Molecular phylogenetic analysis of members of *Chrysanthemum* and its related genera in the tribe Anthemideae, the Asteraceae in East Asia on the basis of the internal transcribed spacer (ITS) region and the external transcribed spacer (ETS) region of nrDNA. Chromosome Bot 4:25-36.
- Matoba H, Mizutani T, Nagano K, Hoshi Y, Uchiyama H (2007) Chromosomal study of lettuce and its allied species (*Lactuca* spp., Asteraceae) by means of karyotype analysis and fluorescence in situ hybridization. Hereditas 144: 235-243.
- Mejías JA, Andrés C (2004) Karyological studies in Iberian *Sonchus* (Asteraceae: Lactuceae): *S. oleraceus*, *S. microcephalus* and *S. asper* and a general discussion. Folia Geobotanica 39: 275–291.
- Melahat O, Hayirlioglu-Ayaz S, Inceer H (2008) Chromosome counts of the some *Cirsium* (Asteraceae, Cardueae) taxa from Turkey. Caryologia 61(4): 375-382.
- Milstead WL (1964) A revision of the North American species of *Prenanthes*. PhD. Thesis, Purdue University, Lafayette, Indiana, USA.
- Mogie M, Richards AJ (1983) Satellited chromosomes, systematic and phylogeny in *Taraxacum* (Asteraceae). Plant Syst Evol 141: 219-229.
- Montmollin BD (1986) Etude cytotaxonomique de la flore de la Crète. III. Nombres chromosomiques. Candolle 41: 431-439.
- Nersesyan AA, Nazarova EA (1989) Karyosystematic study of *Gundeliia tournefortii* (Asteraceae). Bot Zurnal 74: 837-839.
- Oberprieler C, Vogt R (1993) Chromosome numbers of North African phanerogams. II. Willdenowia 23: 211-238.

- Park SJ, Korompai EJ, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Jansen RK (2001) Phylogenetic relationships of *Tolpis* (Asteraceae: Lactuceae) based on *ndhF* sequence data. *Pl Syst Evol* 226: 23-33.
- Parra R, Valdés B, Álvarez A, Villarreal J, Roldán J (1998) Números cromosómicos para la flora española. 793-805. *Lagascalia* 20(2): 302-308.
- Peruzzi L, Aquaro G, Caparelli KF, Raimondo FM (2009) The genus *Taraxacum* (Asteraceae) in Italy. III. A new species of *T.* sect. *Erythrocarpa* from Sicily. *Fl Medit* 19: 73-79.
- Pignatti S (1982) Flora d'Italia. Edagricole (ed.), Italy (3). pp 324.
- Pires JC, Lim KY, Kovarik A, Matyasek R, Boyd A, Leitch AR, Leitch IJ, Bennett MD, Soltis PS, Soltis DE (2004) Molecular cytogenetic analysis of recently evolved *Tragopogon* (asteraceae) allopolyploids reveal a karyotype that is additive of the diploid progenitors. *Am J Bot* 91(7): 1022–1035.
- Pittoni H (1974) Behaarung und Chromosomenzahlen sternhaariger *Leontodon* – Sippen. *Phyton* 16: 165-188.
- Raven PH, Solbrig OT, Kyhos DW, Snow R (1960) Chromosome numbers in Compositae. I. Astereae. *Am J of Bot* 47: 124-132.
- Richards AJ (1973) The origin of *Taraxacum* agamospecies. *Bot J Linn Soc* 66:189-211.
- Rick CM (1953) Hybridization between chicory and endive. *Am Soc Hortic Sci* 61: 459–466.
- Robba L, Carine MA, Russell SJ, Raimondo FM (2005) The monophyly and evolution of *Cynara* L. (Asteraceae) *sensu lato*: evidence from the Internal Transcribed Spacer region of nrDNA. *Pl Syst Evol* 253: 53–64.
- Robinson H, Powell AM, King RM, Weedin JF (1981) Chromosome numbers in Compositae, XII: Heliantheae. *Smithson Contrib Bot* 52: 1-28.
- Romaschenko K, Ertugrul K, Susanna A, Garcia-Jacas N, Uysal T, Arslan E (2004) New chromosome counts in the *Centaurea* Jacea Group (Asteraceae, Cardueae) and some related taxa. *Bot J Linn Soc* 145: 345-352.
- Rousi A (1973) Studies on the cytotaxonomy and mode of reproduction of *Leontodon* (Compositae). *Ann Bot Fennici* 10: 201–215.
- Ruas PM, Ruas CF, Maffei EMD, Marin-Morales MA, Aguiar-Perecin (2000) Chromosome studies in the genus *Mikania* (Asteraceae) *Genet Mol Biol* 23(4): 979-984.
- Ruas CF, Vanzela A LL, Santos MO, Fregonezi JN, Ruas MP, Matzenbacher NI, Aguiar Perecin MLR (2005) Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genet Mol Biol* 28(1): 129-139.

- Samuel R, Gutermann W, Stuessy TF, Ruas CF, Lack HW, Tremetsberg K, Talavera S, Hermanowski B, Ehrendorfer F (2006) Molecular phylogenetics reveals *Leontodon* (Asteraceae, Lactuceae) to be dyphyletic. *Am J Bot* 93(8): 1193-1205.
- Sato K, Iwatsubo Y, Watanabe M, Serizawa S, Naruhashi N (2007a) Cytogenetic studies of Japanese triploid *Taraxacum officinale* (Common Dandelion: Asteracea). *Cytologia* 72(4): 475-482.
- Sato K, Iwatsubo Y, Naruhashi N (2007b) Chromosome studies of native lowland diploid species of *Taraxacum* (Asteraceae) in Japan. *Cytologia* 72(3): 309-317.
- Schrader O, Ahne R, Fuchs J, Schubert I (1997) Karyotype analysis of *Helianthus annuus* using Giemsa banding and fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Res* 5(7): 451-456.
- Slovák M, Šingliarová B, Mráz P (2007) Chromosome numbers and mode of reproduction in *Picris hieracioides* s.l. (Asteraceae), with notes on some other *Picris* taxa. *Nordic J Bot* 25: 238-244.
- Soares ELC, Vendruscolo GS, Eisinger SM, Záchia RA (2004) Estudo etnobotânico do uso dos recursos vegetais em São João do Polêsine, RS, Brasil, no período de outubro de 1999 a junho de 2001. *Ver Bras Pl Med* 6(3): 69-95.
- Soltis DE, Soltis PS, Pires JC, Kovarik A, Tate JA, Mavrodiev E (2004) Recent and recurrent polyploid in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. *Biol J Linn Soc* 82: 485-501.
- Sonnante G, Pignone D, Hammer K (2007) The Domestication of Artichoke and Cardoon: From Roman Times to the Genomic Age. *Ann Bot* 100: 1095–1100.
- Souza VC, Lorenzi H (2005) Botânica sistemática. Nova Odessa. SP. Instituto Plantarum. 640p.
- Stebbins GL, Jenkins JA, Walters MS (1953). Chromosomes and phylogeny in the Compositae, tribe Cichorieae. *Univ Calif Publ Bot* 26: 401-430.
- Strother JL, Panero JL (2001) Chromosome studies: Mexican Compositae. *Am J Bot* 88(3): 499-502.
- Szelag Z, Ilnicki T, Niketić M, Tomović G (2007) Diploid Chromosome Numbers In Five *Hieracium* Species From Serbia And Montenegro. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Bot* 49(1): 119–121.
- Tomasz I, Hasterok R, Szeląg Z (2010) Cytogenetic analysis of *Hieracium transylvanicum* (Asteraceae). *Caryologia* 63 (2): 192-196.
- Turner BL (1960) Meiotic chromosome numbers in texas species of the genus *Coreopsis* (Compositae-Heliantheae). *Southwestern Nat* 5 (1): 12-15.

- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (1976) *Flora Europaea*. Vol. 4. Cambridge University Press (ed) pp 426.
- Vijverberg K, Milanovic-Ivanovic S, Bakx-Schotman T, Dijk PJV (2010) Genetic fine-mapping of diplosporous in *Taraxacum* (dandelion; Asteraceae) indicates a duplicated DIP-gene. *BMC Plant Biology*. 10: 1-17.
- Wagenitz G, Bedarff U (1989) Taxonomic notes on some species of the genus *Cichorium* (Compositae-Lactuceae). in: Tan, K. (ed.), *The Davis & Hedge Festschrift*. – Edinburgh. pp. 11-21.
- Wagenitz, G (1976) Systematics and phylogeny of the compositae (Asteraceae). *Pl Syst Evol* 125: 29-49.
- Watanabe K, Yahara T, Hashimoto G, Nagatani Y, Soejima A, Kawahara T, Nakazawa M (2007) Chromosome numbers and karyotypes in Asteraceae. *Ann Missouri Bot Gard* 94: 643-654.
- Weber E (2003) *Invasive Plant species of the world – A reference guide to environmental weeds*. CABI Publishing (ed) pp. 52.
- Widder FJ (1975) Die Gliederung der Gattung *Leontodon*. *Phyton* 17: 23–29.
- Wilcox BH (1982) Cytological and hybridization studies in *Leucanthemum* (Compositae - Anthemidae) from North Africa. *Pl Syst Evol* 139: 179-195.
- Záveský L, Jarolímová V, Štěpánek J (2005): Nuclear DNA content variation within the genus *Taraxacum* (Asteraceae). *Folia Geobot* 40: 91-104.
- Zhao HE, Liu ZH, Hu X, Yin JL, Li W, Rao GY, Zhang XH, Huang CL, Anderson N, Zhang QX, Chen JY (2009) *Chrysanthemum* genetic resources and related genera of *Chrysanthemum* collected in China. *Genet Resour Crop Evol* 56:937–946.
- Zhmyleva AP, Kondo K (2006) Comparison of somatic chromosomes in some species of *Chrysanthemum sensu lato* in Russia. *Chromosome Bot* 1: 13-22.
- Zohary D, Basnizky J (1975) The cultivated Artichoke – *Cynara scolymus* its probable wild ancestors. *Econ Bot* 29: 233-235.

5. MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO I

Caracterização cromossômica de *Cichorium endivia* L. e *C. intybus* L. (Asteraceae) com fluorocromos CMA/DAPI e FISH com sondas de DNAr 45S e 5S

Manuscrito a ser encaminhado à revista

***Plant Systematics
and Evolution***

ISSN 0378-2697

Caracterização cromossômica de *Cichorium endivia* L. e *C. intybus* L. (Asteraceae) com fluorocromos CMA/DAPI e FISH com sondas de DNAr 45S e 5S

Ebenézer C. S. Bernardes, Ana M. Benko-Iseppon, Reginaldo Carvalho, Ana C. Brasileiro-Vidal

E. C. S. Bernardes

Departamento de Ciências da Natureza, Instituto Federal de Alagoas,
Rua Mizael Domingues, 75, CEP 57020-600 Maceió, AL, Brasil
Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco,
Av. da Engenharia s/n, CEP 50740-600 Recife, PE, Brasil
e-mail: bernardeseecs@gmail.com

A. M. Benko-Iseppon (&) A. C. Brasileiro-Vidal

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco,
Av. da Engenharia s/n, CEP 50740-600 Recife, PE, Brasil
e-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

R. Carvalho

Departamento de Biologia/Genética, Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, CEP 52171-900 Recife, PE, Brasil
e-mail: reginaldo.ufrpe@gmail.com

A. C. Brasileiro-Vidal

e-mail: brasileiro_vidal@hotmail.com

Resumo As espécies *Cichorium endivia* e *C. intybus* destacam-se como hortaliças de amplo consumo mundial. Apesar de sua importância econômica, inexistem quaisquer informações sobre as diferentes frações da sua cromatina. Neste contexto, os cromossomos foram medidos, sendo gerados mapas cromossômicos para cinco acessos de *C. endivia* e cinco de *C. intybus* mediante bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas DNAr 45S e 5S. Em todos os acessos foram identificados o mesmo número cromossômico de $2n = 18$. Nos acessos de *C. endivia*, o bandeamento com os fluorocromos revelou seis bandas proximais $CMA^{++}/DAPI^{-}$ colocalizadas com os sítios de DNAr 45S. Em relação ao DNAr 5S, o par cromossômico 8 mostrou um sítio subterminal no braço curto, enquanto um segundo sítio foi observado no par 3, próximo à região organizadora de nucléolo (RON). Como variação interespecífica, *C. intybus* apresentou bandas $CMA^{++}/DAPI^{-}$ e DNAr 45S colocalizadas nas regiões proximais apenas dos pares 1 e 3. O sítio de DNAr 5S foi localizado na região subterminal do braço curto do par 8, sendo caracterizado como $CMA^{+}/DAPI^{-}$. Em contraste aos outros acessos, *C. intybus* L. var. *foliosum* cv. Zoom Hegi apresentou uma variação intraespecífica envolvendo polimorfismos na distribuição dos sítios de DNAr nos pares cromossômicos 3 e 8, ressaltando a presença de um cromossomo portador de sítios DNAr 45S e 5S, nas regiões proximal e subterminal, respectivamente, as quais foram evidenciadas como $CMA^{++}/DAPI^{-}$, portando no caso do DNAr 5S uma amplificação da heterocromatina constitutiva. Tal fato evidenciou a ocorrência de rearranjos cromossômicos nesta cultivar, enfatizando a aplicabilidade de estudos citogenéticos como ferramenta valiosa na identificação de variações importantes para o entendimento da evolução do gênero e melhor direcionamento de programas de melhoramento de suas variedades cultivadas.

Palavras-chave Cariótipo, Cichorieae, cromossomo, hibridização *in situ*, mapeamento citogenético

Introdução

A tribo Cichorieae Lam & DC. compreende cerca de 70 gêneros e 1.500 espécies. Destaca-se morfológicamente dentro da família Asteraceae pela presença de látex e por apresentar todas as flores perfeitas no capítulo. Entre seus membros de maior importância econômica estão a alface (*Lactuca sativa* L.) e as chicórias (incluindo *Cichorium intybus* L. e *C. endivia* L.), por sua ampla utilização como hortaliças em todo mundo (Bremer 1994; Kilian et al. 2009). Embora menos utilizadas do que o alface, estas duas espécies de *Cichorium* têm ampliado suas áreas de cultivo, sendo cada vez mais inseridas na culinária devido às suas características nutricionais, medicinais e a seu sabor exótico (Lucchin et al. 2008).

Aspectos taxonômicos do gênero *Cichorium* têm sido discutidos desde o século XVIII, havendo controvérsias quanto ao número de espécies que o gênero compreende. Alguns autores sugeriram que o gênero seja composto de cerca de 30 espécies, enquanto análises mais minuciosas na morfologia indicaram apenas três (Tutin et al. 1976; Pignatti 1982) e sete (Wagenitz e Bedarff 1989) espécies válidas. Mais recentemente, Kiers et al. (2000) descreveram mediante marcadores moleculares seis espécies para o gênero, sendo as demais consideradas como sinônimas ou subespécies de *C. endivia* ou *C. intybus*.

A análise de marcadores cromossômicos através dos fluorocromos CMA/DAPI e da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), dentro da família Asteraceae tem sido usada como ferramenta para citotaxonomia de espécies nativas (Fregonezi et al. 2004), bem como para subsidiar o melhoramento genético de espécies cultivadas, como no caso do girassol (Vanzela et al. 2002) e da alface (Matoba et al. 2007). Entretanto, os dados citogenéticos existentes ainda são restritos a poucas espécies, especialmente quando consideramos a extensa biodiversidade da família e sua relevância no contexto evolutivo, como um grupo derivado dentro das angiospermas (Watanabe et al. 2007). No que tange aos estudos citológicos prévios para *C. endivia* e *C. intybus*, destaca-se apenas a identificação do número cromossômico (ambas com $2n = 18$) mediante coloração convencional (Rick 1953).

O presente estudo compreendeu dados citogenéticos relativos a 10 cultivares comerciais do gênero *Cichorium*, sendo cinco de *C. endivia* e cinco de *C. intybus*, mediante coloração com os fluorocromos CMA/DAPI e FISH utilizando sondas DNAr 45S e 5S. Os dados mostraram diferenças no número de sítios de DNAr 45S entre as duas espécies e variação cromossômica dentro de *C. intybus*, revelando importantes aspectos para a análise evolutiva do grupo e para o estabelecimento de estratégias de melhoramento.

Material e métodos

Sementes de cinco acessos de *C. endivia* e cinco de *C. intybus* de diferentes procedências (Tabela 1) foram germinadas em placas de Petri, coletadas e pré-tratadas em 8-hidroxiquiloneína 2 mM por 24 h, sendo na primeira hora conservada à temperatura ambiente e as demais a 8 °C. Posteriormente, o material foi fixado em Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1, v/v) por 4-24 h à temperatura ambiente e armazenadas a -20 °C (Benko-Iseppon e Morawetz 2000). Para preparação das lâminas, as raízes foram digeridas em celulase 2% [p/v, 'Onozuka R-10' (Serva)] e pectinase 20% (v/v, Sigma-Aldrich) por 3 h a 37 °C. Em seguida, foram lavadas em água destilada, imersas em ácido acético 60% por 20 min a 37 °C e novamente lavadas em água destilada por no mínimo 1 h. A separação e maceração do meristema foi feita em ácido acético 60%, e posteriormente, submetida a nitrogênio líquido e secagem ao ar. Após três dias à temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com CMA (Cromomicina A₃, 0,5 mg/mL) e com DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindole, 1 µg/mL) segundo Schweizer (1976) e Deumling e Greiher (1982). Após análise, as lâminas, foram descoradas em fixador Carnoy por 30 min, mantidas em etanol absoluto durante 1 h para o procedimento sequencial CMA/DAPI-FISH.

DNA plasmidial das bactérias D2, contendo um fragmento de 400 pb com duas unidades de repetição de DNAr 5S, proveniente de *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (Pedrosa et al. 2002), e R2, com a unidade de repetição de DNAr 18S-5,8S-25S, oriunda de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Wanzenböck et al. 1997), foi extraído e marcado com biotina-11-dUTP (Sigma) e digoxigenina-11-dUTP (Roche), respectivamente, por *nick translation* (Invitrogen).

Para hibridização in situ fluorescente (FISH) as lâminas receberam lavagens pré e pós-hibridização de acordo com o descrito por Pedrosa et al. (2002). A desnaturação dos cromossomos e das sondas foram efetuadas de acordo com Heslop-Harrison et al. (1991), e Jiang et al. (1996), respectivamente, com adaptações. As preparações foram desnaturadas em formamida 70% (70% formamida, 20% água e 10% de 20x SSC) a 90 °C por 10 min. As misturas de hibridização consistiram de formamida 50% (v/v), dextran-sulfato 10% (p/v), 2x SSC e 2-5 ng/µL de sonda, sendo hibridizadas por pelo menos 18 h a 37 °C. As sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas usando antidigoxigenina crescida em ovelha conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC; Boehringer Mannheim) e amplificadas com antiovelha conjugado com FITC (DAKO) em BSA1% (p/v). As sondas marcadas com biotina foram detectadas usando antibiotina crescida em camundongo (Dakopatts M743, DAKO) e amplificadas com anticamundongo conjugado com tetrametilrodamina (TRITC)

(DakoCytomation R0270) em BSA 1% (p/v). Todas as preparações foram montadas em 2 µg/mL de DAPI em Vectashield (Vector).

As células foram analisadas em fotomicroscópio Leica DMLB, e as melhores imagens capturadas com câmera Leica DFC 340FX, utilizando o programa Leica CW 4000. As imagens foram otimizadas em brilho e contraste no Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated), com resolução de 300 dpi. Nas figuras com CMA/DAPI e DAPI/FITC/TRITC, as imagens foram sobrepostas sobre a imagem do DAPI com a opção “Lighten” disponível no menu “Level”. As medições cromossômicas foram efetuadas em três metáfases de cada acesso utilizando o programa MicroMeasure 3.3 (Reeves 2001 disponível em: <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure/>), e os idiogramas gerados com auxílio do programa Adobe Flash CS4 Professional (Adobe Systems Incorporated). A análise da morfologia dos cromossomos foi baseada em Guerra (1986), considerando-se a proporção entre braço curto e braço longo, sendo metacêntricos resultados iguais ou inferiores a 1,5 e submetacêntricos resultados superiores a este valor.

Tabela 1 Acessos de *Cichorium endivia* e *C. intybus* utilizados no presente trabalho com suas procedências, dados citogenéticos de tamanho do complemento, média cromossômica e indicação das figuras que ilustram os acessos correspondentes.

Acesso	Procedência	Tamanho do complemento (µm)	Média cromossômica (µm)	Figuras
<i>Cichorium endivia</i> L.	Flora-Frey ^b	45,6	2,53	-
<i>C. endivia</i> L. subsp. <i>endivia</i> var. <i>endivia</i>	IPK ^c	44,5	2,48	1a-b
<i>C. endivia</i> L. subsp. <i>endivia</i> var. <i>crispum</i> Lam	IPK	46,1	2,56	-
<i>C. endivia</i> L. subsp. <i>endivia</i> var. <i>latifolium</i> Lam	IPK	43,5	2,41	-
<i>C. endivia</i> L. subsp. <i>divaricatum</i> (Schousb.) P. D. Sell	IPK	42,8	2,38	-
<i>C. endivia</i> (média dos acessos)	-	44,5	2,47	2a'
<i>C. intybus</i> L.	Flora-Frey	54,7	3,04	-
<i>C. intybus</i> L. var. <i>intybus</i>	IPK	54,2	3,02	1c-d
<i>C. intybus</i> L. var. <i>foliosum</i> Hegi	IPK	52,4	2,92	-
<i>C. intybus</i> L. var. <i>foliosum</i> cv. Zoom Hegi	Kiepenkerl ^b	55,3	3,08	1e-f e 2a''
<i>C. intybus</i> L. var. <i>sativum</i> Lam. & DC.	IPK	50,2	2,79	1c-d
<i>C. intybus</i> (média dos acessos)^a	-	52,9	2,94	2a''

^aValores médios com exceção de *C. intybus* L. var. *foliosum* cv. Zoom Hegi. ^bEmpresa de sementes. ^cLeibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research.

Resultados

Todos os acessos de *C. endivia* (Fig. 1a-b) e *C. intybus* (Fig. 1c-f) apresentaram número diploide de $2n = 2x = 18$, núcleos interfásicos semirreticulados (Fig. 1c) e cariótipo gradativo, observando-se uma média cromossômica de 2,47 e 2,94 μm para *C. endivia* e *C. intybus*, respectivamente. Considerando-se o tamanho do complemento cromossômico, *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom destacou-se pelo maior tamanho do complemento (55,3 μm), enquanto *C. endivia* subsp. *divaricatum* mostrou o menor comprimento (42,8 μm) (Tabela 1).

A presença de constrições secundárias proximais foi notada nos três maiores pares do complemento cromossômico de *C. endivia* (1, 2 e 3) (Fig. 1a-b), enquanto *C. intybus* mostrou apenas os pares 1 e 3 satelitados (Fig. 1c-d). A morfologia predominante foi metacêntrica, com exceção de *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom o qual apresentou o par 7 submetacêntrico e polimorfismos cromossômicos envolvendo os pares 3 e 8, com um dos cromossomo de cada par submetacêntricos. Devido à proximidade dos acessos de *C. endivia* (Fig. 2a') e os de *C. intybus* (Fig. 2a''), os valores médios de cada espécie foram agrupados em idiogramas únicos. Por outro lado, para *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom, pela particularidade de seus resultados, foi elaborado um idiograma exclusivo (Fig. 2a''').

A dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI revelou um padrão de bandas de heterocromatina constitutiva fortemente marcada $\text{CMA}^{++}/\text{DAPI}^-$ em ambas as espécies. Nos acessos de *C. endivia* este foi localizado nas regiões proximais do braço curto dos pares cromossômicos 1, 2 e 3 (Figs. 1a; 2a'), enquanto em *C. intybus* foi observado nos pares 1 e 3. Adicionalmente, para esta espécie, também foi observada uma tênue banda $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ na região subterminal do braço curto do cromossomo 8 (Figs. 1c; 2a''). O acesso *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom apresentou padrão de bandas semelhante aos demais estudados, no maior par cromossômico. Contudo, o par 3 foi heteromórfico, contendo um cromossomo com uma banda proximal menor no braço curto e o outro com duas bandas $\text{CMA}^{++}/\text{DAPI}^-$, uma proximal no braço longo e uma subterminal no braço curto. Além disso, o par 8, também heteromórfico, consistiu de um cromossomo com uma banda subterminal no braço curto $\text{CMA}^{++}/\text{DAPI}^-$ e o outro sem bandas (Figs. 1e; 2a''').

A FISH com sonda de DNAr 45S evidenciou a presença de três pares de sítios proximais nos acessos de *C. endivia*, as quais foram colocalizadas com bandas $\text{CMA}^{++}/\text{DAPI}^-$. Em relação à distribuição de DNAr 5S, um sítio foi observado no braço longo do par cromossômico 3, adjacente ao DNAr 45S proximal. O outro sítio foi visível na região subterminal do braço curto do cromossomo 8, porém, sem a presença de bandas CMA/DAPI (Figs. 1a-b; 2a').

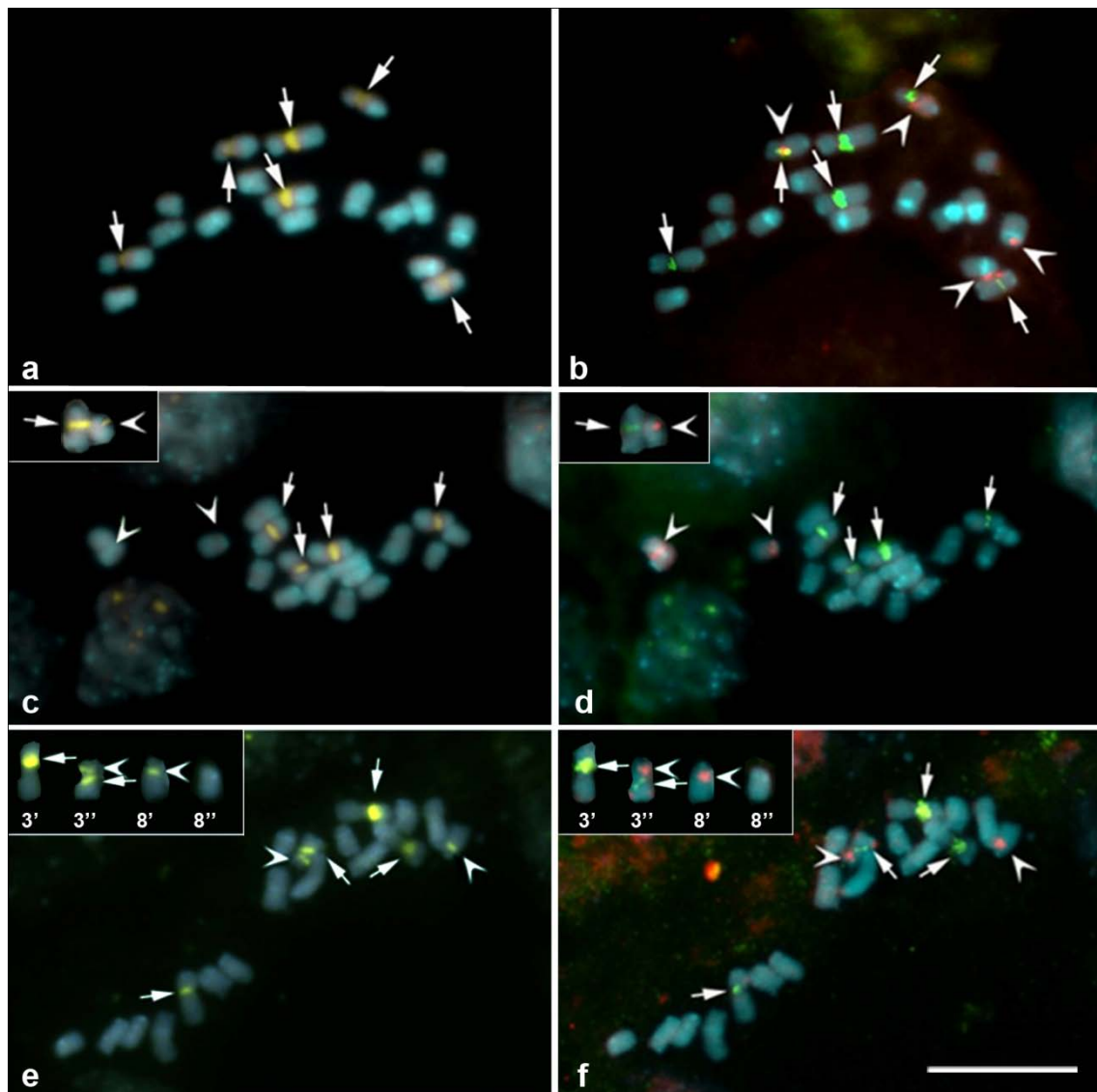


Fig. 1 Células metafásicas dos acessos (a – b) *Cichorium endivia* subsp. *endivia* var. *endivia* (c – d) *C. intybus* var. *intybus*, com inserto de *C. intybus* var. *sativum* e (e – f) *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom. (a, c, e) Sobreposição de células coradas com os fluorocromos DAPI (azul) e CMA (amarelo). (b, d, f) Células hibridizadas com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde), contracoradas com DAPI. Setas indicam as bandas CMA⁺⁺/DAPI⁺ (a, c, e) e DNAr 45S (b, d, f). Cabeças de seta apontam sítios de DNAr 5S (b, d, f), bandas CMA⁺/DAPI⁰ (c) e CMA⁺⁺/DAPI⁻ (e). Insertos em c e d destacam os cromossomos portadores de DNAr. Inserto em e e f destacam os cromossomos dos pares heteromórficos 3 e 8. Barra em f corresponde a 10 µm.

Em *C. intybus*, a FISH com sonda de DNAr 45S evidenciou sítios nos pares cromossômicos 1 e 3 em região proximal do braço curto. Como observado em *C. endivia*, esses sítios foram colocalizados com bandas CMA⁺⁺/DAPI⁺. A FISH com sonda de DNAr 5S evidenciou um único sítio na região subterminal do braço curto do par cromossômico 8, colocalizada com uma banda CMA⁺/DAPI⁺ (Figs. 1c-d e 2a'').

Por outro lado, o acesso *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom apresentou heteromorfismos envolvendo os pares 3 e 8, com relação à distribuição dos sítios de DNAr, diferenciando-se dos demais acessos analisados para a referida espécie. No par 3, um de seus homólogos apresentou um sítio de DNAr 45S proximal no braço curto, semelhante aos demais acessos. Contudo, o outro cromossomo do par apresentou um sítio de DNAr 45S proximal no braço longo e um sítio de DNAr 5S subterminal no braço curto. Por sua vez, um cromossomo do par 8 apresentou um sítio subterminal de DNAr 5S bem evidente, o qual não foi visualizado em seu homólogo. Todos os sítios de DNAr colocalizaram com bandas CMA⁺⁺/DAPI⁻ (Figs. 1e-f e 2a''').

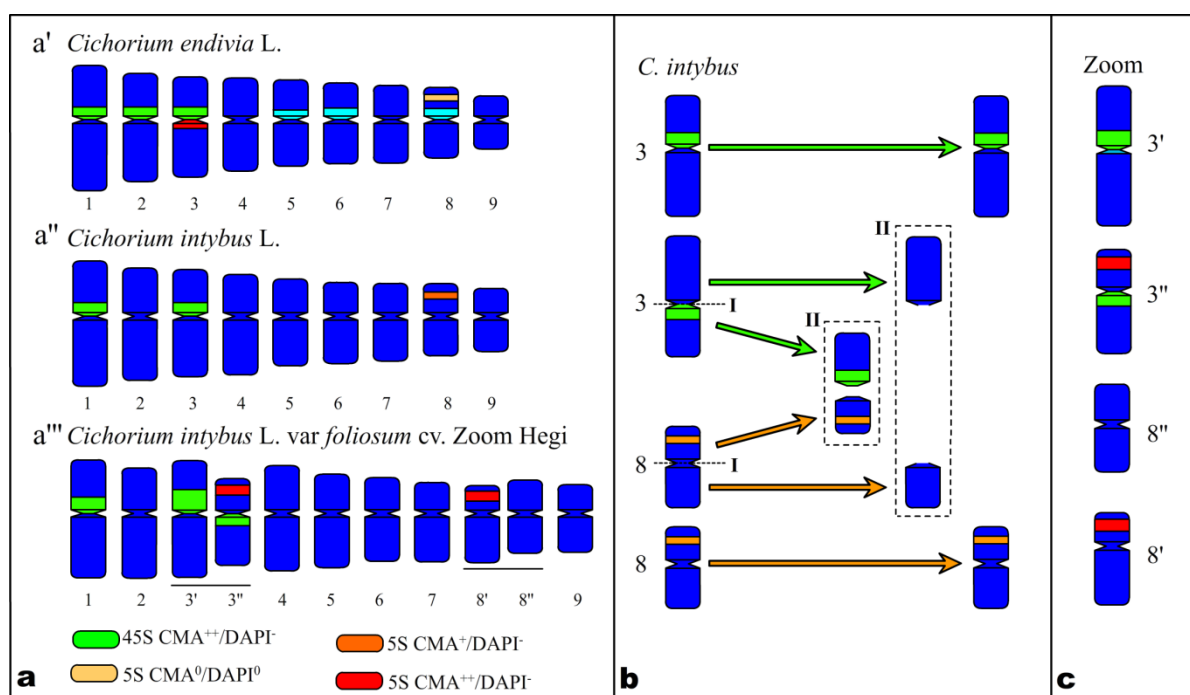


Fig. 2 Representação esquemática dos cromossomos de *Cichorium*: (a) Idiogramas das espécies *C. endivia* (a'), *C. intybus* (a'') e *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom (a'''). Os pares heteromórficos deste último acesso estão representados por linhas abaixo de ambos os homólogos. (b) Possíveis eventos ocorrido nos pares 3 e 8 de *C. intybus* como translocação recíproca com fissão (I) e fusão (II) cêntrica, na formação do novo citotipo de *C. intybus* var *foliosum* cv. Zoom (c).

Em relação ao padrão de bandas CMA/DAPI não relacionadas à RON, foi possível a visualização de bandas CMA⁰/DAPI⁺ proximais no braço curto dos pares cromossômicos 5, 6 e 8 para *C. endivia* (Fig. 1a, 2a'). Por outro lado, para *C. intybus* foram observados dois pares cromossômicos com bandas proximais e várias pequenas bandas terminais nem sempre visíveis, principalmente em cromossomos mais condensados (Fig. 1c, e), as quais, por este motivo, não foram representadas no idiograma. Em ambos os casos, após o procedimento de FISH, essas bandas aumentaram de intensidade, e até mesmo novas bandas tornaram-se evidentes (comparar a coloração DAPI na Fig. 1 entre a; c; e com b; d; f).

Discussão

Estudos citogenéticos prévios do gênero *Cichorium* incluíram apenas contagens de número cromossômico para as espécies *C. endivia* (Rick 1953), *C. intybus* (Dobes et al. 1997), *C. intybus* var. *intybus* (Lövkvist e Hultgard 1999) e *C. spinosum* L. (Montmollin 1986), todas relatando o número diploide com $2n = 2x = 18$, sem análises detalhadas de cariomorfologia ou aplicação de técnicas de bandeamento. O conhecimento do número cromossômico reportado remete a uma informação comum para muitos grupos dentro de Cichorioideae, como *Hieracium* L., *Lactuca* L., *Sonchus* L. e *Tolpis* Adans sugerindo ser esta uma característica primitiva e conservada ao longo da evolução dessa tribo (Bremer 1994).

A presença de três pares de sítios de DNAr 45S e dois pares de DNAr 5S em *C. endivia* revelou resultados divergentes daqueles observados em *C. intybus*, a qual apresentou dois pares e um par de sítios de DNAr 45S e DNAr 5S, respectivamente. Esta divergência de número de sítios de DNAr difere do relatado para *Lactuca* (subfamília Cichorioideae, tribo Cichorieae; com $2n = 18$) em que os autores observaram uma conservação do número de sítios de DNAr em quatro espécies do gênero (Matoba et al. 2007). Por outro lado, Pires et al. (2004) relataram que no gênero *Tragopogon* (subfamília Cichorioideae, tribo Cichorieae; com $2n = 2x = 12$) as espécies *T. dubius* Scop. e *T. pratensis* L. apresentaram um par cromossômico com sítios de DNAr 45S, enquanto que em *T. porrifolius* L. dois pares foram observados.

A alteração no número de sítios de DNAr entre as duas espécies de *Cichorium* pode estar relacionada a diversos tipos de alterações cromossômicas. Entre os principais exemplos de aumento no número de sítios descritos em Asteraceae, pode-se citar a translocação, ocorrida de forma natural em *Hypochaeris* (Cerbah et al. 1998) ou na formação artificial de híbridos em *Chrysanthemum* (El Twab e Kondo, 2006). No sentido da redução do número de sítios, observa-se a deleção como principal evento descrito tanto em *Hypochaeris* (Cerbah et al. 1998) como *Chrysanthemum* (El Twab e Kondo, 2007). Adicionalmente, em *Hypochaeris* foram descritas RONS inativas com sua provável eliminação genômica em espécies derivadas. Apesar das duas possibilidades de perda ou ganho de sítios, o aumento numérico torna-se mais provável devido à descrição de espécies próximas com dois pares de sítios como *Lactuca* (Matoba et al. 2007) e *Hieracium* (Tomasz et al., 2010).

Geralmente, os sítios de DNAr 45S estão localizados nas regiões terminais em diferentes representantes das subfamílias de Asteraceae, como observado em *Chaptalia nutans* (L.) Pol. (Mutisioideae) (Fregonezi et al. 2004) e nos gêneros *Crepis* L. (Fregonezi et al. 2004), *Hieracium* (Tomasz et al. 2010), *Lactuca* (Matoba et al. 2007), *Tragopogon* L.

(Pires et al. 2004; Garcia et al. 2010) e *Vernonia* Schreb. (Salles-de-Melo et al. 2010), pertencentes à subfamília Cichorieae.

Apesar do alto número de descrições das RONS terminais em Asteraceae, tanto *C. endivia* quanto *C. intybus* apresentaram RONS proximais. Estes resultados foram semelhantes aos observados em três espécies do gênero *Achyrocline* (Less.) DC., subfamília Asteroideae, com RON proximal no par 10 (Mazzella et al. 2010). Em *Hypochaeris* L. várias alterações cromossômicas tanto estruturais quanto numéricas foram descritas para justificar as alterações no posicionamento das RONS (Cerbah et al. 1998; Ruas et al. 2005). A ocorrência de RONS proximais, a exemplo do observado em *Cichorium*, sugere que inversões paracêntricas tenham ocorrido ao longo da evolução gerando essa divergência, uma vez que os cariótipos permanecem simétricos. Além da semelhança entre os pares 1 e 3, o par 8 (portador de DNAr 5S) também mostrou-se conservado entre as duas espécies, indicando caracteres úteis em futuros estudos de citotaxonomia.

De acordo com a literatura, as Asteraceae apresentam dois tipos de localização dos sítios de DNAr 45S e 5S, isolados e colocalizados. No padrão isolado, as sequências gênicas dos DNAr encontram-se em sítios diferentes. Por outro lado, a colocalização caracteriza-se pela inserção da sequência de DNAr 5S entre os genes 18S e 26S, sendo observada em representantes da subfamília Asteroideae. Garcia et al. (2010) afirmaram que a colocalização surgiu há cerca de 35 milhões de anos, época em que houve uma grande diferenciação nessa subfamília. Como característica basal, a colocalização apresenta-se em várias tribos, como Anthemidaea, Gnaphaelieae e Heliantheae (Garcia et al. 2010). Considerando que o gênero *Cichorium* pertence ao grupo em que os DNAr estão isolados, sugere-se que embora os sítios de DNAr 45S e 5S estejam no mesmo cromossomo, não ocorra colocalização e sim, adjacência dos sítios.

A colocalização das bandas CMA/DAPI e sítios de DNAr 45S nas espécies analisadas evidenciou a presença de heterocromatina CMA positiva (CMA⁺) associada à RON. Esta associação está descrita na literatura para Asteraceae (Fregonezi et al. 2004; Mazzella et al. 2010; Salles-de-Melo et al. 2010), bem como para as plantas de uma forma geral (Guerra 2000). Por outro lado, devido ao menor número de repetições e tamanho restrito, bem como pela facilidade de ocorrência de metilações nas citosinas, interferindo na reatividade de sequências, os sítios de DNAr 5S tornam-se menos sensíveis ao bandeamento com fluorocromos (Neves et al. 2005; Cabral et al. 2006). Em Asteraceae, bandas CMA⁺ nos sítios de DNAr 5S foram descritas em todos os casos em que houve colocalização entre os sítios de DNAr 45S e 5S, assim como relatado para os gêneros *Achyrocline* (Mazzella et al. 2010) e *Artemisia* (Pellicer et al. 2008; Konowalik et al. 2010). Contudo, com as sequências DNAr

45S e 5S separadas, dois tipos de bandejamento foram descritos: sítios DNAr 5S associadas ao CMA⁺, como nos gêneros *Amphoriocarpus* Vis., *Chardinia* Desf., *Sieberta* J.Gay, *Xanthemum* L. (Garnatje et al. 2004) e *Hypochaeris* (Ruas et al. 2005), bem como sítios DNAr 5S associados a regiões CMA/DAPI neutras, como observado nos gêneros *Centaurea* (Dydak et al. 2009) e *Helianthus* (Cuellar et al. 1996; Garcia et al. 2010).

Em *C. intybus*, além da presença da banda CMA⁺/DAPI associada ao DNAr 5S, pôde ser observado um nítido aumento de brilho (CMA⁺⁺/DAPI) no acesso *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom, o que parece estar relacionado à amplificação do sítio, corroborando também com um maior sinal visualizado pela FISH. A ausência de bandas com fluorocromos em *C. endivia*, pode estar relacionada a um menor número de repetições no sítio em questão, à facilidade de ocorrência de metilações nas citosinas ou a uma diferenciação na proporção de GC ocasionadas por mutações nas sequências intergênicas (Neves et al. 2005; Cabral et al. 2006).

As bandas DAPI observadas nas espécies de *Cichorium* apresentaram semelhanças com o padrão encontrado em três representantes do gênero *Artemisia*, uma vez que blocos proximais e terminais foram descritos. Porém, em *Artemisia* foram observados tanto blocos CMA⁺/DAPI⁰ quanto CMA⁰/DAPI⁺ (Pellicer et al. 2008). A variação do padrão de bandas entre essas espécies remete a uma ampla variabilidade da heterocromatina constitutiva, indicando que modificações na HC têm uma importante contribuição no processo de divergência evolutiva em Asteraceae. Em relação à maior evidência dos sinais após a FISH nas espécies aqui analisadas, a mesma pode ter ocorrido devido ao tratamento das lâminas no processo de hibridização *in situ*, o qual pode facilitar a visualização de heterocromatina constitutiva. Portanto, bandas DAPI observadas após esta metodologia não necessariamente significam distribuição preferencial de DNA repetitivo rico em AT (Barros-e-Silva e Guerra 2009).

As principais diferenças entre os cariótipos de *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom e dos demais acessos dessa espécie envolveram os pares cromossômicos 3 e 8, portadores de sítios de DNAr 45S e 5S, respectivamente, no cariótipo ancestral de *C. intybus*. No citado acesso, o par 3 apresentou um cromossomo metacêntrico portador de DNAr 45S proximal no braço curto, semelhante ao observado para os demais acessos, sendo seu homólogo portador de DNAr 45S proximal no braço longo e DNAr 5S subterminal no braço curto. Por sua vez, o par 8 mostrou um cromossomo submetacêntrico portador do sinal subterminal de DNAr 5S no braço curto e outro metacêntrico sem a presença de sinais. As diferenças encontradas nos pares 3 e 8 parecem ser decorrentes de uma translocação recíproca na altura do centrômero, envolvendo um homólogo de cada par em eventos de fissão e fusão cêntricas, gerando dois

pares heteromórficos. Com base nos dados obtidos foi feita uma representação esquemática das possíveis alterações cromossômicas envolvendo os pares 3 e 8 de *C. intybus* (Fig. 2b) para formação do novo citotipo em *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom (Fig. 2c). Além disso, outros rearranjos complexos devem ter ocorrido ocasionando algumas mudanças significativas, incluindo a amplificação da heterocromatina colocalizada ao sítio de DNAr 5S; menor tamanho que o esperado para um dos homólogos do par 8 (sem bandas), e a morfologia submetacêntrica do par 7.

A formação de cromossomos heteromórficos no cariótipo pode levar a efeitos drásticos para espécie, principalmente no que tange ao processo de divisão meiótica (Cai e Xu 2007). Dessa forma, seria esperado que *C. intybus* var. *foliosum* cv. Zoom apresentasse problemas de germinação, o que não foi observado. No entanto, a família Asteraceae destaca-se pela ocorrência de apomixia, uma estratégia de reprodução vegetativa a partir da formação de embriões de células não reduzidas do gametófito (Dijk et al. 1999; Krahulcová et al. 2004), o que pode ter sido responsável pela germinação apropriada e pela preservação da variação citogenética observada em todos os indivíduos analisados do referido acesso.

As análises efetuadas permitiram a construção de mapas citogenéticos para *C. endivia* e *C. intybus*, evidenciando diferenças interespecíficas significativas, além de ressaltar a ocorrência de algumas variações citogenéticas intraespecíficas. Estes mapas são de grande importância para compreensão da organização dos genomas, além de constituírem ferramentas valiosas para a identificação de processos de divergência e evolução dentro do gênero.

Agradecimentos Os autores agradecem ao Biol. Brunno Leite, Biol. Rafaela Oliveira, M.Sc. Santelmo Vasconcelos, o M.Sc. Geyner Alves e a Dra. Kyria Bortoleti, pelo suporte e sugestões de fundamental importância para a realização do trabalho. O trabalho teve apoio financeiro dos órgãos de fomento a pesquisa Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências Bibliográficas

- Barros-e-Silva AE, Guerra M (2009) The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotech Histochem* 85(2): 115-125.
- Benko-Iseppon AM, Morawetz W (2000) Cytological comparison of Calyceraceae and Dipsacaceae with special reference to their taxonomic relationships. *Cytologia* 65: 123-128.
- Bremer K (1994) *Asteraceae: cladistics and classification*. Timber Press, Portland, 752p.
- Cabral JS, Felix LP, Guerra M (2006) Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillariaspecies* (Orchidaceae). *Genet Mol Biol* 29(4): 659-664.
- Cai X, Xu SS (2007) Meiosis-Driven Genome Variation in Plants. *Curr Genomics*, 8: 151-161.
- Cerbah M, Souza-Chies T, Jubier MF, Lejeune B, Siljak-Yakovlev S (1998) Molecular Phylogeny of the Genus *Hypochaeris* Using Internal Transcribed Spacers of Nuclear rDNA: Inference for Chromosomal Evolution. *Mol Biol Evol* 15(3):345–354.
- Cuellar T, Belhassen E, Fernandez-Calvin B, Orellana J, Bella JL (1996) Chromosomal differentiation in *Helianthus annuus* var. *macrocarpus*: heterochromatin characterization and rDNA location. *Heredity* 76: 586-591.
- Deumling B, Greilhuber J (1982) Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by *in situ* hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. *Chromosoma* 84: 535-555.
- Dijk PJV, Tas ICQ, Falque M, Bakx-Schotman T (1999) Crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*).II. The breakdown of apomixis. *Heredity* 83: 715-721.
- Dobes C, Hahn B, Morawetz W (1997) Chromosomenzahlen zur ~~Cpfl~~ Pflanzen -Flora Österreichs *Linzer Biol Beit* 29(1): 5-43.
- Dydak M, Kolano B, Nowak T, Siwinska D, Maluszynska J (2009) Cytogenetic studies of three European species of *Centaurea* L. (Asteraceae). *Hereditas* 146: 152-161.
- El-Twab MHA, Kondo K (2006) FISH physical mapping of 5S, 45S and Arabidopsis-type telomere sequence repeats in *Chrysanthemum zawadskii* showing intra-chromosomal variation and complexity in nature. *Chromosome Bot.* 1: 1-5.

- El-Twab MHA, Kondo K (2007) Isolation of chromosomes and mutation in the interspecific hybrid between *Chrysanthemum boreale* and *Chr. vestitum* using fluorescence *in situ* hybridization and genomic *in situ* hybridization. *Chromosome Bot* 2: 19-24.
- Fregonezi JN, Torezan JMD, André LL, Vanzela ALL (2004) A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence *in situ* hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA₃ banding. *Genet Mol Biol* 27(2): 223-227.
- Garcia S, Panero JL, Siroky J, Kovarik A (2010) Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. *BMC Plant Biology* 10:176-194.
- Garnatje T, Vallès J, Vilatersana R, Garcia-Jacas N, Susunna A, Siljak-Yakovlev S (2004) Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). *Plant Biol* 6: 140-146.
- Guerra M (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet Mol Biol* 23(4): 1029-1041.
- Guerra MS (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Rev Brasil Genét* IX (4): 741-743.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Ananthawat-Jonsson, K, Leitch, AR, Shi M, Leitch, IJ (1991) *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Tech J Meth Cell Mol Biol* 3: 109–116.
- Jiang J, Hulbert SH, Gill BS, Ward DC (1996) Interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping: a physical mapping strategy for plant species with large complex genomes. *Mol Gen Genet* 252(5):497–502.
- Kiers AM, Mes THM, R. Meijden Rvd, Bachmann K (2000) A search for diagnostic AFLP markers in *Cichorium* species with emphasis on endive and chicory cultivar groups. *Genome* 43: 470-476.
- Kilian N, Gemeinholzer B, Lack HW (2009) Cichorieae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TE, Bayer RJ (ed) *Systematics, evolution and biogeography of Compositae*. IAPT, Vienna, pp 343-383.
- Konowalik K, Garcia S, Pellicer J, Kreitschitz A, Vallès J (2010) Cytogenetic characterization of *Artemisia absinthium* (Asteraceae, Anthemidae) and its Polish endemic var. *calcigena*. *Anna Bot Fennici*. 47: no prelo.
- Krahulcová A, Papoušková S, Krahulec F (2004) Reproduction mode in the allopolyploid facultatively apomictic hawkweed *Hieracium rubrum* (Asteraceae, H. subgen. *Pilosella*). *Hereditas* 141: 19-30.

- Lövkvist B, Hultgård UM (1999) Chromosome numbers in south Swedish vascular plants. *Opera Bot* 137: 1-42.
- Lucchin M, Varotto S, Barcaccia G, Parrini P (2008) Chicory and endive. In: Prohen J, Nuez F. (ed) *Vegetables I*. New-York: Springer, New York, pp 3-48.
- Matoba H, Mizutani T, Nagano K, Hoshi Y, Uchiyama H (2007) Chromosomal study of lettuce and its allied species (*Lactuca* spp., Asteraceae) by means of karyotype analysis and fluorescence in situ hybridization. *Hereditas* 144: 235-243.
- Mazzella C, Rodríguez M, Vaio M, Gaiero P, López-Carro B, Santiñaque FF, Folle GA, M. Guerra M (2010) Karyological Features of *Achyrocline* (Asteraceae, Gnaphalieae): Stable Karyotypes, Low DNA Content Variation and Linkage of rRNA Genes. *Cytogenet Genome Res* 128: 169-176.
- Montmollin BD (1986) Etude cytotaxonomique de la flore de la Crète. III. Nombres chromosomiques. *Candolle* 41: 431-439.
- Neves N, Delgado M, Silva M, Caperta A, Morais-Cecílio L, Viegas W (2005) Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenet Genome Res* 109:104–111.
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002) Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161: 1661–1672.
- Pellicer J, Garcia S, Garnatje T, Hidalgo O, Siljak-Yakovlev S, Vallès J (2008) Molecular cytogenetic characterization of some representatives of the subgenera *Artemisia* and *Absinthium* (genus *Artemisia*, Asteraceae). *Collect Bot* 27: 19-27.
- Pignatti S (1982) *Flora d'Italia*. Edagricole (ed.), Italy (3). pp 324.
- Pires JC, Lim KY, Kovarik A, Matyasek R, Boyd A, Leitch AR, Leitch IJ, Bennett MD, Soltis PS, Soltis DE (2004) Molecular cytogenetic analysis of recently evolved *Tragopogon* (asteraceae) allopolyploids reveal a karyotype that is additive of the diploid progenitors. *Am J Bot* 91(7): 1022–1035.
- Reeves A (2001) MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome* 44: 439–443.
- Rick CM (1953) Hybridization between chicory and endive. *Am Soc Hortic Sci* 61: 459–466.
- Ruas CF, Vanzela A LL, Santos MO, Fregonezi JN, Ruas MP, Matzenbacher NI, Aguiar Perecin MLR (2005) Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genet Mol Biol* 28(1): 129-139.
- Salles-de-Melo MRC, Lucena RM, Semir J, Carvalho R, Pereira RCA, Benko-Iseppon AM (2010) Karyological features and cytotaxonomy of the tribe Vernonieae (Asteraceae). *Plant Syst Evol* 285:189–199.

- Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin A e DAPI. *Chromosoma* 58:307-324.
- Tomasz I, Hasterok R, Szeląg Z (2010) Cytogenetic analysis of *Hieracium transylvanicum* (Asteraceae). *Caryologia* 63 (2): 192-196.
- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (1976) *Flora Europaea*. Vol. 4. Cambridge University Press (ed) pp 426.
- Vanzela ALL, Ruas CF, Oliveira MF, Ruas PM (2002) Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. *Genetica* 114: 105-111.
- Wagenitz G, Bedarff U (1989) Taxonomic notes on some species of the genus *Cichorium* (Compositae-Lactuceae). in: Tan, K. (ed.), *The Davis & Hedge Festschrift*. – Edinburgh. pp. 11-21.
- Wanzenböck EM, Schöfer C, Schweizer D, Bachmair A (1997) Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 11:1007-1016.
- Watanabe K, Yahara T, Hashimoto G, Nagatani Y, Soejima A, Kawahara T, Nakazawa M (2007) Chromosome numbers and karyotypes in Asteraceae. *Ann Missouri Bot Gard* 94: 643-654.

6. MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO II

Citogenética evolutiva em onze espécies da família Asteraceae utilizando bandeamento fluorescente (CMA/DAPI) e hibridização in situ (FISH) com sondas 45S e 5S

Manuscrito a ser encaminhado à revista

***Plant Systematics
and Evolution***

ISSN 0378-2697

Citogenética evolutiva em onze espécies da família Asteraceae utilizando bandeamento fluorescente (CMA/DAPI) e FISH com sondas 45S e 5S

Ebenézer C. S. Bernardes, Ana C. Brasileiro-Vidal, Reginaldo Carvalho, Ana M. Benko-Iseppon

E. C. S. Bernardes

Departamento de Ciências da Natureza, Instituto Federal de Alagoas,

Rua Mizael Domingues, 75, CEP 57020-600 Maceió, AL, Brasil

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco,

Av. da Engenharia s/n, CEP 50740-600 Recife, PE, Brasil

e-mail: bernardesecs@gmail.com

A. C. Brasileiro-Vidal (&) A. M. Benko-Iseppon

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco,

Av. da Engenharia s/n, CEP 50740-600 Recife, PE, Brasil

e-mail: brasileiro_vidal@hotmail.com

R. Carvalho

Departamento de Biologia/Genética, Universidade Federal Rural de Pernambuco

Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, CEP 52171-900 Recife, PE, Brasil

e-mail: reginaldo.ufrpe@gmail.com

A. M. Benko-Iseppon

e-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

Resumo A família Asteraceae contém a maior biodiversidade do reino Plantae. Citogeneticamente, tem sido bastante estudada quanto à coloração convencional, no entanto, pouco se conhece a respeito de características específicas da cromatina de seus representantes. Neste contexto, o número diploide, tamanho cromossômico, distribuição de genes ribossomais através da metodologia de FISH e padrão de bandeamento CMA/DAPI foram utilizados em uma análise comparativa de 11 representantes de 10 gêneros, quatro tribos e três subfamílias, analisando suas relações evolutivas. As alterações numéricas consistiram, principalmente, em disploidias e poliploidias. Variações no tamanho e na morfologia cromossômica evidenciaram a ocorrência de rearranjos cromossômicos. Os sítios de DNAr 45S e 5S variaram em número (de três a 12 e de dois a seis para DNAr 45S e 5S, respectivamente), localização (terminal, intersticial e proximal) e relação (adjacentes, próximas ou em cromossomos diferentes). Oito padrões de bandeamento CMA/DAPI foram descritos para a heterocromatina constitutiva (HC), incluindo: 1) $CMA^{++}/DAPI$, com a presença de sítio de DNAr 45S; 2) $CMA^{+}/DAPI$, localizada com sítio de DNAr 5S; 3) bandas $CMA^{+}/DAPI$ terminais; 4) bandas $CMA^{-}/DAPI^{+}$ terminais; 5) bandas $CMA^{-}/DAPI^{++}$ terminais; 6) bandas $CMA^{-}/DAPI^{+}$ pericentroméricas; 7) bandas $CMA^{-}/DAPI^{++}$ pericentroméricas; 8) bandas dependentes do padrão de condensação. A ampla variabilidade encontrada de dados citogenéticos, foi informativa para auxiliar no entendimento da evolução, apresentando ainda caracteres promissores para a classificação sistemática desta família.

Palavras-chave Cariótipo, Cichorieae, cromossomo, Compositae, hibridização *in situ*, mapeamento citogenético.

Introdução

A família Asteraceae L. é a mais representativa em todo o reino Plantae, sendo caracterizada principalmente pela inflorescência do tipo capítulo, na qual várias flores pequenas reúnem-se em um único receptáculo discoide (Bonifacino et al. 2009). Atualmente, é constituída por aproximadamente 1.620 gêneros e 23.000 espécies, destacando-se o girassol (*Helianthus annuus* L.), alface (*Lactuca sativa* L.), chicória (*Cichorium* sp.), alcachofra (*Cynara scolymus* L.), dente-de-leão (*Taraxacum officinale* F.H. Wigg) e cardo-de-ouro (*Scolymus hispanicus* L.), devido à sua importância alimentícia (Dempewolf et al. 2008).

Em decorrência da facilidade na dispersão e ampla plasticidade adaptativa, várias espécies são consideradas invasoras (Alexander et al. 2009), como por exemplo, *Chondrilla juncea* L., *Leontodon incanum* Schrank, *Tolpis barbata* (L.) Gaertner e *Prenanthes purpurea* L. (Weber 2003). No gênero *Sonchus*, observa-se um impacto negativo ainda mais acentuado, visto que, seus representantes chegam a causar danos na agricultura mediante sua capacidade em armazenar vírus prejudiciais ao cultivo da alface (Chaves et al. 2007). Por outro lado, outras asteráceas são consideradas ornamentais, devido à beleza de suas inflorescências, como *Leucanthemum vulgare* Lam. (margarida) e *Bidens sulfurea* (Cav.) Sch.Bip. (alegria-de-jardim) (Soares et al. 2004).

Taxonomicamente, a penúltima classificação da família proposta por Bremer (1994) dividiu a família em três subfamílias, levando em consideração principalmente características morfológicas e dados moleculares. Recentemente, Funk et al. (2009), utilizando principalmente comparações entre sequências de genes plastidiais, identificaram um alto número de agrupamentos parafiléticos, propondo uma nova classificação. Assim, sugeriu-se uma alteração da história evolutiva para 12 subfamílias e 49 tribos. Entretanto, estes autores indicaram a necessidade da associação de abordagens mais informativas na definição das topologias encontradas, tais como a associação de caracteres moleculares, morfológicos e citogenéticos.

No âmbito da genética molecular, Asteraceae tem sido favorecida pelo CGP (*Compositae Genome Project*). Devido a uma abordagem multidisciplinar, vários projetos vêm sendo realizados em parceria com universidades, agregando informações sobre fisiologia, bioquímica e molecular. Como resultado desses estudos, existe um banco de EST com mais de 560.000 sequências de 21 espécies, destacando-se sete do gênero *Helianthus* L. e cinco do gênero *Lactuca* L., principais objetos de estudo desse consórcio. Estas pesquisas têm servido de base para estudos de evolução, bem como para o melhoramento dessas culturas e de outras espécies relacionadas (CGP 2010).

Do ponto de vista citogenético, este grupo tem sido bem estudado por coloração convencional, com vários trabalhos de contagens de números cromossômicos, como uma sequência de artigos iniciados por Raven et al. (1960) intitulado *Chromosome Numbers in Compositae I*, que se encontra na 18ª edição publicada por Carr et al. (1999). Adicionalmente, um banco de dados intitulado *Index to Chromosome Numbers in Asteraceae* (ICNA) (<http://www.lib.kobe-u.ac.jp>) tem contribuído na disponibilidade dessas informações. Embora menos comuns, análises cariomorfológicas mais detalhadas têm resultado em informações bastante importantes, incluindo variações interespecíficas e intraespecíficas, como por exemplo, no gênero *Hieracium* L., em que as espécies poliploides têm maior distribuição que as diploides (Szelag et al. 2007), e em *Mikania* Willd., em que vários citotipos foram descritos em diferentes populações (Ruas et al. 2000).

Em relação à utilização de bandeamento com fluorocromos base-específicos evidenciando a heterocromatina constitutiva (HC) e a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), existem poucos relatos para esta família. Neste sentido, as análises estão restritas a pequenos grupos como girassol (Schrader et al. 1997), alface (Matoba et al. 2007), *Hypochaeris* L. (Ruas et al. 2005) e *Tragopogon* L. (Pires et al. 2004; Soltis et al. 2004), revelando ampla diversidade genômica. No entanto, análises com uma maior quantidade de gêneros, como as de Fregonezi et al. (2004) ou Garcia et al. (2010) são raras e as modificações cromossômicas existentes dentro da família como inversões e translocações têm sido pouco exploradas (Mazzella et al. 2010).

A ampla variação cromossômica, diferenças no padrão de bandeamento com fluorocromos e número de sítios de DNAr descrita nos trabalhos supracitados, ratifica os marcadores cromossômicos como importantes ferramentas em estudos citotaxonômicos e melhora no entendimento da evolução deste grupo. Assim, objetivando elucidar as principais características citogenéticas de representantes da família Asteraceae, mapas cromossômicos foram construídos para 11 espécies vegetais utilizando as metodologias de fluorocromos CMA/DAPI e FISH com sondas de DNAr 45S e 5S, permitindo a identificação de caracteres promissores para a classificação sistemática da referida família.

Material e métodos

As 11 espécies analisadas no presente trabalho pertencem a quatro tribos e três subfamílias, sendo procedentes do Botanischer Garten Leipzig (Alemanha) ou Jardin Botanique de la Ville de Clermont-Ferrand (França), com exceção de *Bidens sulphurea*, a qual foi coletada no jardim experimental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE – Recife, Brasil), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 Espécies analisadas no presente trabalho com sua classificação taxonômica, procedência, características citogenéticas analisadas e descrições anteriores referentes aos números cromossômicos.

Espécies	Subfamília/ Tribo/ Subtribo	Proce dência	Números cromossômicos ^d	Fórmula cariotípica	Tamanho do complemento (µm)	Variação cromossômica (µm)	CMA/DAPI	DNAr 45S	DNAr 5S	Figura
<i>Cynara cardunculus</i> L.	Carduoideae/ Cardueae / Carduinae	BGL ^a	2n = 34^e	28m ^s +6sm ^t	15,45	0,32-0,80	8 ter ^u C ⁺⁺ /D ⁻	-	-	1a
<i>Leucanthemum vulgare</i> Lam.	Asteroideae/ Anthemideae / Leucantheminae	VCF ^b	2n = 36^{f,g}/ 2n = 18^{g,h} 2n = 54^g/ 2n = 72ⁱ	36m	-	-	8 ter C ⁺⁺ /D ⁻ ter C ⁰ /D ⁺⁺ per ^v C ⁰ /D ⁺	-	-	1b
<i>Bidens sulphurea</i> (Cav.) Sch.Bip.	Asteroideae/Coreopsidae/ -	- ^c	2n = 24^j	24m	27,73	0,83-1,54	6 ter C ⁺⁺ /D ⁻ ter C ⁺ /D ⁰	6	4	1c e d
<i>Scolymus hispanicus</i> L.	Cichorioideae/ Cichorieae / Scolyminae	VCF	2n = 20^k	12m+6sm	28,82	1,18-1,89	4 ter C ⁺⁺ /D ⁻ 2 int ^x C ⁺ /D ⁰	4	2	1e e f
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill	Cichorioideae/ Cichorieae / Hyoseridinae	VCF	2n = 18^l/ 2n = 36^m	18m	13,10	0,55-0,97	6 per C ⁰ /D ⁺ 4 ter C ⁺⁺ /D ⁻ 2 int C ⁺ /D ⁻ per C ⁰ /D ⁺⁺	4	2	2a e b
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Cichorioideae/Cichorieae/ Hyoseridinae	VCF	2n = 32^{m,k} 2n = 36, 64^k	28m+4sm	29,65	0,62-1,25	12 ter C ⁺⁺ /D ⁻ 4 int C ⁺ /D ⁻ per C ⁰ /D ⁺⁺	12	4	2c e d
<i>Chondrilla juncea</i> L.	Cichorioideae/Cichorieae/ Chondrillinae	BGL	2n = 18 2n = 15ⁿ, 20^h	18m	15,80	0,72-1,25	4 prx C ⁺⁺ /D ⁻ int C ⁺ /D ⁻ ter C ⁰ /D ⁺	4	2	3a e b
<i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg.	Cichorioideae/ Cichorieae / Crepidinae	BGL	2n = 24^o/ 2n = 16^p 2n = 32^q/ 2n = 48^r	21m+3sm	62,95	2,00-3,52	3 int C ⁺⁺ /D ⁻ 6 int C ⁺ /D ⁻	3	6	3c e d
<i>Prenanthes purpurea</i> L.	Cichorioideae/ Cichorieae / Hypochaeridinae	BGL	2n = 18^k	18m	58,93	2,19-4,02	4 ter C ⁺⁺ /D ⁻	-	-	3e
<i>Leontodon incanus</i> Schrank	Cichorioideae/ Cichorieae / Hypochaeridinae	BGL	2n = 14^k	2m+12sm	18,58	1,09-1,85	8 ter C ⁺⁺ /D ⁻ 2 int C ⁰ /D ⁺⁺	8	4	3f e g
<i>Tolpis barbata</i> (L.) Gaertner	Cichorioideae/ Cichorieae / Cichoriinae	BGL	2n = 18^k	12m+6sm	19,48	0,72-1,42	6 ter C ⁺⁺ /D ⁻ 2 int C ⁰ /D ⁺⁺	6	2	4

^aBotanischer Garten Leipzig; ^bVille de Clermont-Ferrand ^cColeta Campus UFPE, Recife. ^dEm negrito: número cromossômico encontrado no presente trabalho. ^{e-s}Descrições anteriores: publicação mais recente extraída do Missouri Botanical Garden, Index to Plant Chromosome Numbers (IPCN. Disponível em: <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>), e do Index to Chromosome Numbers in Asteraceae (ICNA. Disponível em: <http://www.lib.kobe-u.ac.jp>). ^eDalgaard 1991; ^fInceer e Hayirlioglu-Ayaz 2007; ^gBocher e Larsen 1957; ^hChepinoga et al. 2009; ⁱLippert e Heubl 1989; ^jJose e Mathew 1995; ^kGemeinholzer e Faustmann 2005; ^lRazaq 1994; ^mCarr et al. 1999; ⁿParra et al. 1998; ^oSato et al. 2007a; ^pBaarlén et al. 2000; ^qKashin et al. 2003; ^rRichards 1973. ^sMetacêntrico; ^tsubmetacêntrico; ^u terminal, ^vpericentromérica, ^xintersticial.

Raízes de sementes recém-germinadas foram coletadas e pré-tratadas em 8-hidroxiquiloneína 2 mM por 24 h, sendo a primeira hora à temperatura ambiente e as demais a 8 °C. Posteriormente, o material foi fixado em Carnoy (etanol:ácido acético; 3:1, v/v) por 4 - 24 h à temperatura ambiente e armazenado a -20 °C (Benko-Iseppon e Morawetz 2000). Para preparação das lâminas, as raízes foram digeridas em celulase 2% [p/v, 'Onozuka R-10' (Serva)] e pectinase 20% (v/v, Sigma-Aldrich) por 3 h a 37°C. Em seguida, foram lavadas em água destilada, imersas em ácido acético 60% por 20 min a 37 °C e novamente lavadas em água destilada por no mínimo 1 h. A separação e maceração do meristema foi feita em ácido acético 60%, e posteriormente, submetida a nitrogênio líquido e secagem ao ar. Após três dias à temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com CMA (Cromomicina A₃ a concentração de 0,5 mg/mL) e com DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindole a concentração de 1 mg/mL) segundo Schweizer (1976) e Deumling e Greihuber (1982). Após análise, as lâminas, foram descoradas em fixador Carnoy por 30 min, mantidas em etanol absoluto durante 1 h para o procedimento sequencial CMA/DAPI-FISH.

DNA plasmidial das bactérias D2, contendo um fragmento de 400 pb com duas unidades de repetição de DNAr 5S, proveniente de *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (Pedrosa et al. 2002), e R2, com a unidade de repetição de DNAr 18S-5,8S-25S, oriunda de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Wanzenböck et al. 1997), foi extraído e marcado com biotina-11-dUTP (Sigma) e digoxigenina-11-dUTP (Roche), respectivamente, por *nick translation* (Invitrogen).

Para hibridização *in situ* fluorescente (FISH) as lâminas receberam lavagens pré e pós-hibridização de acordo com o descrito por Pedrosa et al. (2002). A desnaturação dos cromossomos e das sondas foram efetuadas de acordo com Heslop-Harrison et al. (1991), e Jiang et al. (1996), respectivamente, com adaptações. As preparações foram desnaturadas em formamida 70% (70% formamida, 20% água e 10% de 20x SSC) a 90 °C por 10 min. As misturas de hibridização consistiram de formamida 50% (v/v), dextran-sulfato 10% (p/v), 2x SSC e 2-5 ng/μL de sonda, sendo hibridizadas por pelo menos 18 h a 37 °C. As sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas usando antidigoxigenina crescida em ovelha conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC; Boehringer Mannheim) e amplificadas com antiovelha conjugado com FITC (DAKO) em BSA1% (p/v). As sondas marcadas com biotina foram detectadas usando antibiotina crescida em camundongo (Dakopatts M743, DAKO) e amplificadas com anticamundongo conjugado com tetrametilrodamina (TRITC) (DakoCytomation R0270) em BSA 1% (p/v). Todas as preparações foram montadas em 2 μg/mL de DAPI em Vectashield (Vector).

As células foram analisadas em fotomicroscópio Leica DMLB, sendo as melhores fotografadas com câmera Leica DFC 340FX, utilizando o programa Leica CW 4000. As imagens foram otimizadas em brilho e contraste no Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated), com resolução de 300 dpi. Nas figuras com DAPI/CMA e DAPI/FITC/TRITC, as imagens foram sobrepostas sobre a imagem do DAPI com a opção “Lighten” disponível no menu “Level”. As medições cromossômicas foram efetuadas em três metáfases de cada espécie utilizando o programa MicroMeasure 3.3 (Reeves 2001 disponível em: <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure/>) e os idiogramas realizados no programa Adobe Flash CS4 Professional (Adobe Systems Incorporated).

A partir das árvores filogenéticas da família Asteraceae e subfamília Cichorieae propostas por Funk et al. (2009) e Kilian et al. (2009) respectivamente, foi construído um dendrograma baseado nas relações com os idiogramas estabelecidos. Todavia, foram desprezados todos os ramos intermediários, sendo apenas considerados critérios de taxonomia para divisão dos nós.

Resultados

O número cromossômico das espécies analisadas no presente trabalho está apresentado na Tabela 1. A subfamília Carduinae foi representada apenas por *Cynara cardunculus*, com $2n = 34$ (Fig. 1a). Em Asteroideae foram analisadas *Leucanthemum vulgare* (Fig. 1b) e *Bidens sulphurea* (Fig. 1c, d), as quais diferiram quanto ao número cromossômico de $2n = 36$ e $2n = 24$, respectivamente. Dentro de Cichorioideae a amplitude foi significativa, sendo *Scolymus hispanicus* (Fig. 1e, f) a única com $2n = 20$. As espécies *Sonchus asper* (Fig. 2a, b), *Chondrila juncea* (Fig. 3a, b), *Prenanthes purpurea* (Fig. 3e) e *Tolpis barbata* (Fig. 4) apresentaram $2n = 18$. A espécie *Taraxacum officinale* (Fig. 3c, d) foi a única espécie triploide analisada com $2n = 3x = 24$. Adicionalmente, *Leontodon incanum* mostrou $2n = 14$ (Fig. 3f, g). Em relação ao tamanho cromossômico, as espécies com menores médias foram *Cy. cardunculus* (0,45 μm), *So. asper* (0,73 μm) e *So. oleraceus* (0,93 μm), enquanto as maiores foram *P. purpurea* (3,27 μm) e *Ta. officinale* (2,62 μm). Pode-se ainda destacar a marcante diferença entre os cromossomos de maior e menor média cromossômica (ver Tabela 1, Fig. 1a-f). Os cromossomos apresentaram dois tipos de morfologia: metacêntrica e submetacêntrica (Tabela 1). Contudo, a forma metacêntrica foi predominante em todos os cariótipos, com exceção de *Leo. incanus*, a qual apresentou 12 cromossomos submetacêntricos de um total de 14 (Fig. 1e, f).

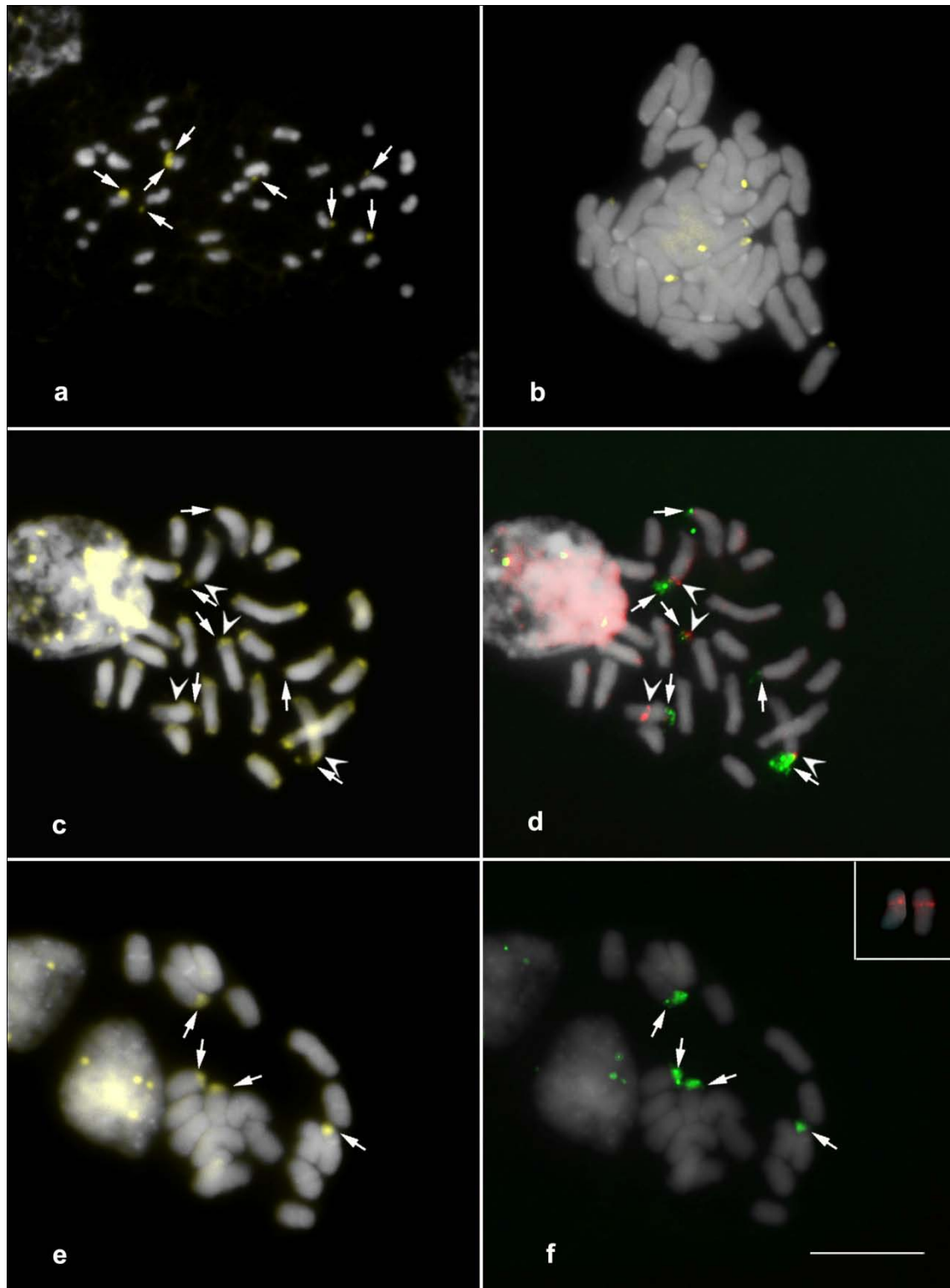


Fig. 1 Células metafásicas de (a) *Cynara cardunculus*, (b) *Leucanthemum vulgare*, (c – d) *Bidens sulphurea* e (e – f) *Scolymus hispanicus*. Em (a, b, c, e) sobreposição de células coradas com os fluorocromos CMA (amarelo) e DAPI (cinza). Em (d, f) células hibridizadas com sondas de DNAr 45S (verde) e 5S (vermelho), contracoradas com DAPI. Inseto em b mostra núcleo interfásico reticulado, e em f cromossomos de outra célula com sítios de DNAr 5S. Setas apontam as bandas CMA⁺⁺/DAPI⁺ (a, b, c, e) e DNAr 45S (d, f). Cabeças de seta apontam sítios de DNAr 5S (d) e bandas CMA⁺/DAPI⁺ (c). Barra corresponde a 10 µm.

Todas as espécies apresentaram núcleo interfásico semirreticulado (ver Fig. 1c, e; Fig. 2a; Fig. 3a), exceto *Leu. vulgare* em que o núcleo interfásico foi do tipo reticulado (inserto Fig. 1b). A respeito do padrão de condensação, foi encontrado um padrão homogêneo em todas as espécies, com exceção de *B. sulphurea*, a qual mostrou um padrão de condensação heterogêneo (Fig 1c e Fig. 4a-c).

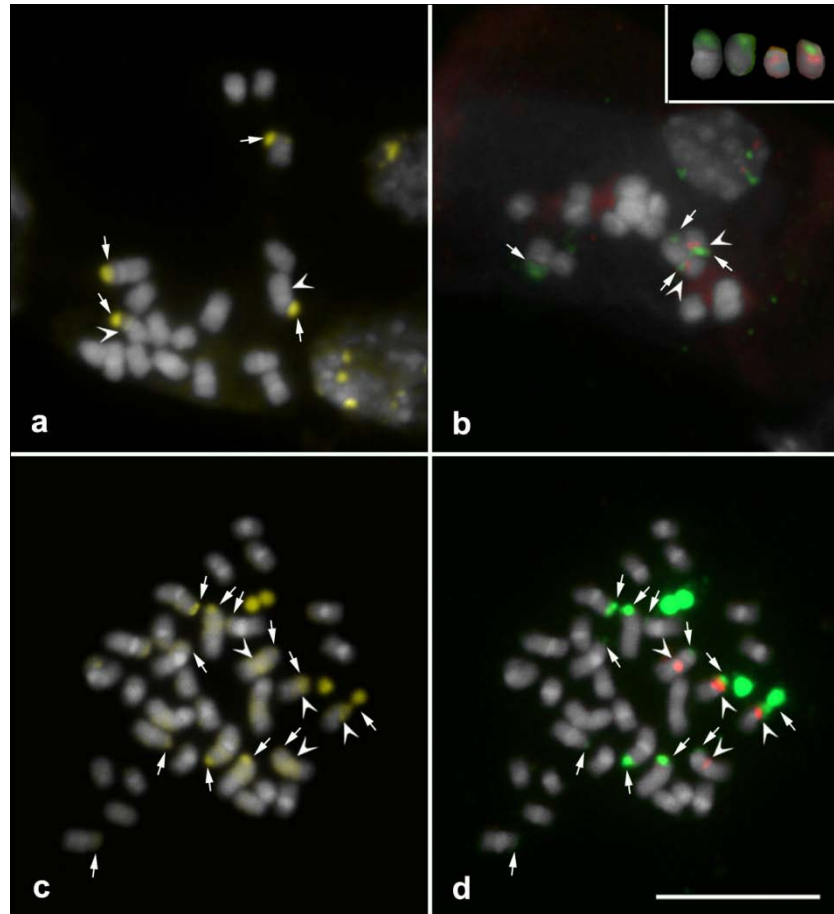


Fig. 2 Células em metáfase de *Sonchus asper* (a - b) e *So. oleraceus* (c - d). Em (a, c) sobreposição de células coradas com os fluorocromos CMA (amarelo) e DAPI (cinza). Em (b, d) células hibridizadas com sondas de DNAr 45S (verde) e 5S (vermelho), contracoradas com DAPI. Inserto em b mostra os pares 1 e 6, portadores de DNAr da mesma célula. Setas apontam as bandas CMA⁺⁺/DAPI⁻ (a, c) e DNAr 45S (b, d). Cabeças de seta apontam sítios de DNAr 5S (b, d) e bandas CMA⁺/DAPI⁻ (a, c). Barra em d corresponde a 10 µm.

O uso de fluorocromos base-específicos CMA/DAPI revelou oito tipos de padrões de bandeamento: 1) CMA⁺⁺/DAPI⁻, com a presença de sítio de DNAr 45S; 2) CMA⁺/DAPI⁻, localizada com sítio de DNAr 5S; 3) bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais; 4) bandas CMA⁻/DAPI⁺ terminais; 5) bandas CMA⁻/DAPI⁺⁺ terminais; 6) bandas CMA⁻/DAPI⁺ pericentroméricas; 7) bandas CMA⁻/DAPI⁺⁺ pericentroméricas; 8) bandas dependentes do padrão de condensação. O

principal deles correspondeu a uma banda $\text{CMA}^{++}/\text{DAPI}^-$ visualizada em todas as espécies, colocalizada com o sítio de DNAr 45S revelado pela FISH. O número de sítios variou de um a seis dependendo da espécie analisada, sendo na maioria dos casos dois por genoma haploide. Além disso, esses sítios também variaram em tamanho. Algumas espécies apresentaram sítios de tamanhos reduzidos, como no caso dos pares 3 e 7 em *Leo. incanus* (Fig. 3g), dos pares 4 e 7 em *So. oleraceus* (Fig. 2c), e do par 6 em *To. barbata* (Fig. 4d). Embora todas as espécies tenham apresentado constrição secundária terminal, em *Ch. juncea* foi observado uma constrição secundária proximal portadora do sítio de DNAr 45S nos pares 1 e 3 (Fig. 3a e b).

Outro tipo de padrão observado foi $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ o qual foi coincidente com o sítio de DNAr 5S revelado pela FISH em todas as espécies. Neste caso, o número de sítios variou de um a dois por genoma haploide. Quanto à localização, *B. sulphurea* diferenciou das demais por apresentar dois pares cromossômicos com os sítios de DNAr 45S e 5S adjacentes (Fig. 1d). No gênero *Sonchus* (Fig. 2) e em *To. barbata* (Fig. 4d), os DNAr 45S e 5S foram identificados próximos no braço curto do mesmo cromossomo. Nas demais espécies estes sítios foram observados em diferentes pares cromossômicos. Adicionalmente, no par 1 de *Leo. incanus* (Fig. 3g) foi visualizado polimorfismo de localização do sítio de DNAr 5S, no qual um dos cromossomos apresentou um sítio subtelomérico e o outro intersticial (inserto da Fig. 3g).

Bandas com fluorocromos não relacionadas à RON foram identificadas em várias espécies, como $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ terminais em *B. sulphurea*, as quais variaram em tamanho e intensidade de acordo com o nível de condensação (Fig. 1c). A espécie *Leu. vulgaris* apresentou bandas terminais $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^{++}$ e pericentroméricas $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^+$ em todo complemento cromossômico (Fig. 1b). Outro tipo de bandas $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^{++}$ com localização pericentromérica estava presente em todos os cromossomos do complemento nas duas espécies do gênero *Sonchus* (Fig. 2a, c). Além destes tipos, foram visualizadas bandas $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^+$ pericentroméricas nos pares 1, 4 e 5 de *Sc. hispanicus* (Fig. 1e). Adicionalmente, bandas $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^+$ terminais foram evidenciadas em *Ch. juncea* (Fig. 3a), no entanto estas bandas foram variáveis em tamanho de acordo com o estado de condensação cromossômica, uma vez que em cromossomos mais descondensados a sua visualização foi dificultada (inserto da Fig. 3a).

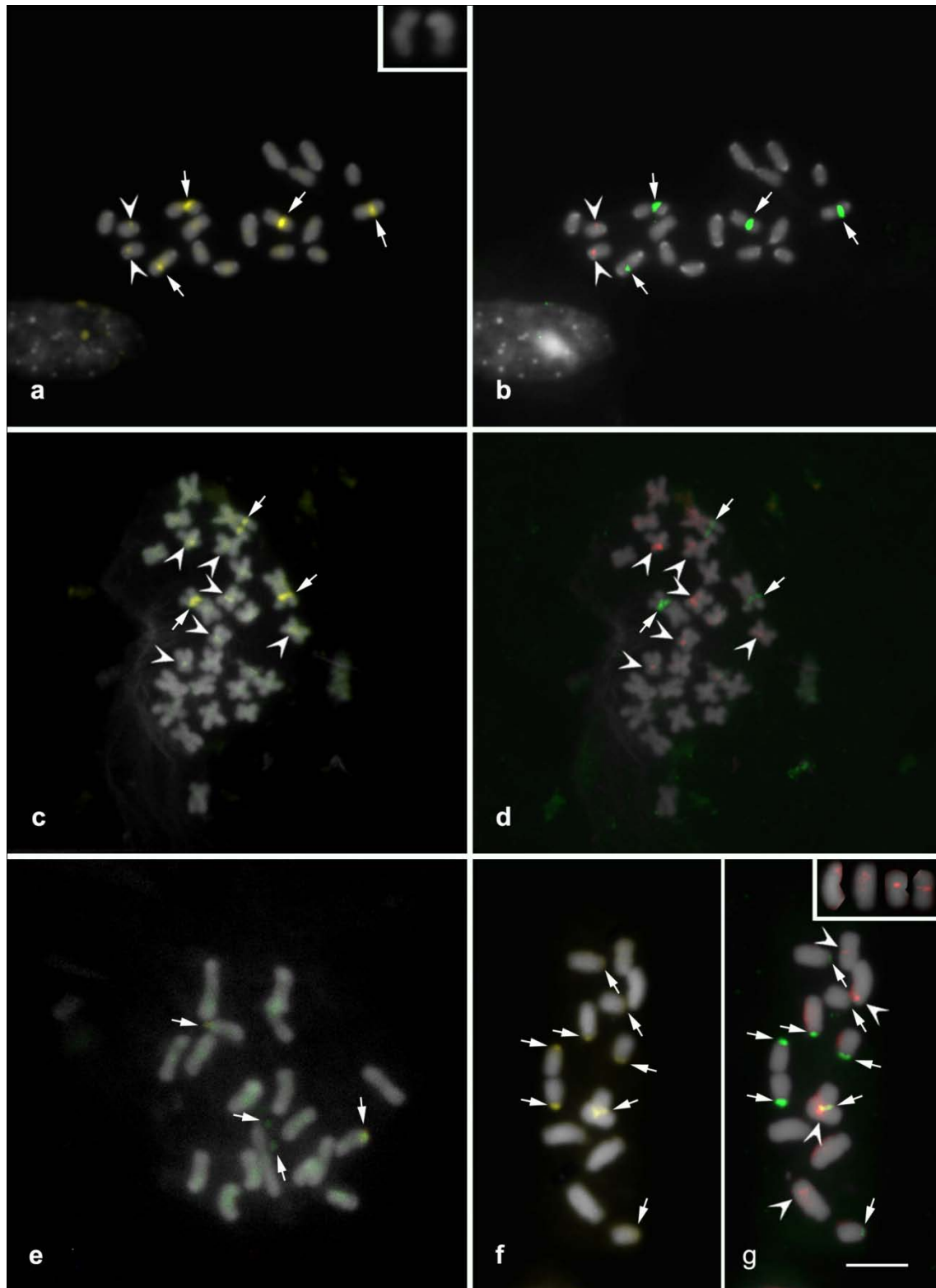


Fig. 3 Células de *Chondrila juncea* (a - b), *Taraxacum officinale* (c - d), *Prenanthes purpurea* (e) e *Leontodon incanus* (f - g). Em (a, c, e, f) sobreposição de células coradas com os fluorocromos CMA (amarelo) e DAPI (cinza). Em (b, d, g) células hibridizadas com sondas de DNAr 45S (verde) e 5S (vermelho), contracoradas com DAPI. Setas apontam as bandas CMA⁺⁺/DAPI⁻ (a, c, e, f) e DNAr 45S (b, d, g). Cabeças de seta apontam sítios de DNAr 5S (b, d, g) e bandas CMA⁺/DAPI⁻ (a, c). Inseto em a contém um par de *Ch. juncea* em prometáfase sem bandas DAPI terminal. Inseto em g contém os pares 1 e 4, portadores de DNAr 5S. Barra em g corresponde a 10 μ m.

Diferentes tipos de bandas não associadas ao DNAr foram classificadas baseadas no tipo de bandas, se evidenciadas por CMA ou DAPI ($\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$, $\text{CMA}^{++}/\text{DAPI}^-$, $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^+$ e $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^{++}$); no tipo de localização, se terminal ou pericentromérica; ou ainda dependente do padrão de condensação. Neste último caso, as bandas foram mais visíveis em estágios de condensação menos avançados, tornando-se imperceptíveis com o aumento da condensação, como pode ser visto para *To. barbata* na Fig. 4a-c. Nesta espécie, na visualização de células prometáfásicas mais descondensada (Fig. 4a), foram observadas bandas CMA^+ em todos os cromossomos. Em outra prometáfase mais condensada (Fig. 4b), os cromossomos portadores de sítios de DNAr apresentaram bandas adicionais intersticiais no braço longo. Por outro lado, em metáfase (Fig. 4c) o número de bandas diminuiu para seis $\text{CMA}^{++}/\text{DAPI}^-$ e duas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$, correspondentes aos sítios 45S e 5S respectivamente.

Levando em consideração o número, tamanho, morfologia, organização do DNAr e o bandejamento CMA/DAPI das células metafásicas, foram obtidos idiogramas das espécies analisadas. Estes idiogramas foram plotados em ramos terminais de um dendrograma baseado no posicionamento taxonômico de cada espécie (Fig. 5). Em alguns nós do dendrograma foram inseridos cromossomos representativos de padrões conservados ou derivados, de acordo com o proposto na discussão.

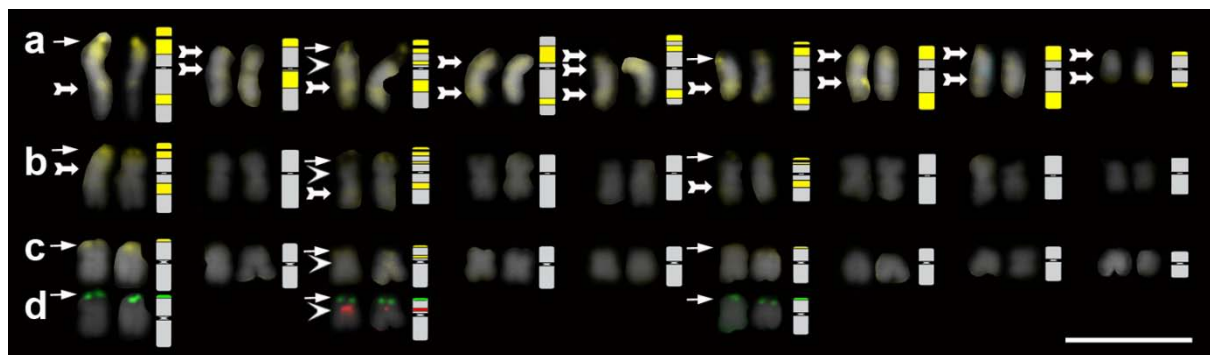


Fig. 4 Cariograma e idiograma de três células em diferentes estágios de condensação de *Tolpis barbata*. Bandejamento CMA/DAPI com CMA (amarelo) e DAPI (cinza) em uma prometáfase menos (a) e mais (b) condensada. Célula metafásica com mesmo padrão de coloração (c), e FISH apenas dos cromossomos portadores de DNAr (d), sendo DNAr 45S (verde) e 5S (vermelho), contracolorados com DAPI. Setas finas apontam bandas $\text{CMA}^{++}/\text{DAPI}^-$ correspondentes aos sítios de DNAr 45S, cabeças de seta bandas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ correspondentes aos sítios de DNAr 5S e setas largas as bandas de condensação. barra corresponde a 10 μm .

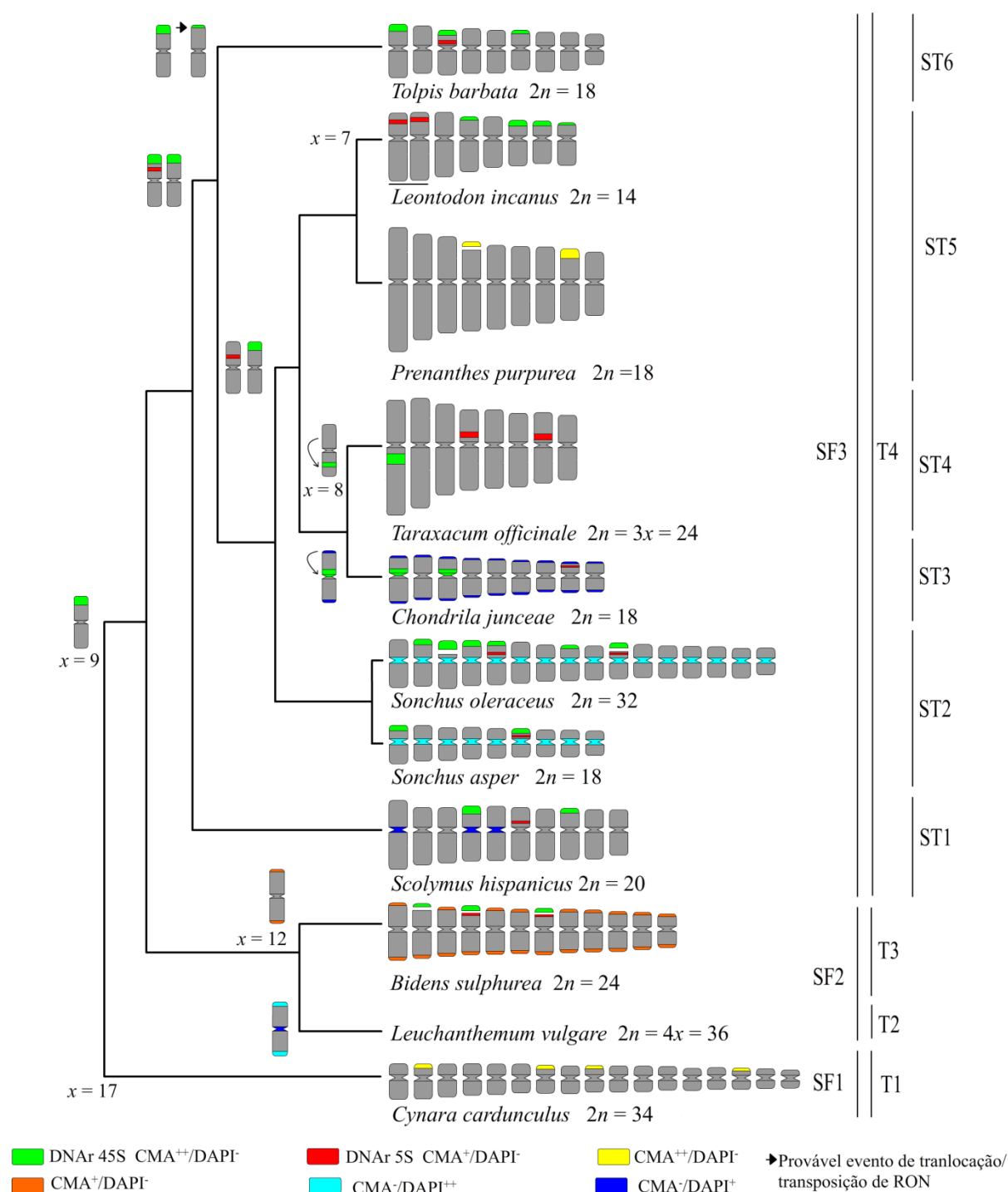


Fig. 5 Dendrograma representativo das espécies analisadas no presente trabalho, baseado nas árvores da família Asteraceae e subfamília Cichorioideae propostas por Funk et al. (2009) e Kilian et al. (2009), respectivamente, excluindo todos os ramos intermediários e levando em consideração apenas critérios de taxonomia para divisão dos nós. Cada ramo terminal apresenta o idiograma da sua respectiva espécie. Próximos dos nós e ramos do dendrograma, informações representativas de características cariotípicas conservadas (ver texto). Do lado direito da figura a letra “SF” representa as subfamílias (SF1: Carduoideae, SF2: Asteroideae e SF3: Cichorioideae) “T” as tribos (T1: Carduinae, T2: Anthemideae, T3: Coreopsidae) e “ST” as subtribos (ST1: Scolyminae, ST2: Hyoseridinae, ST3: Chondrillinae, ST4: Crepidinae, ST5: Hypochaeridinae, ST6: Cichoriinae).

Discussão

A família Asteraceae apresenta grande variação de números cromossômicos, sendo $x = 9$ seu número mais frequente, observado em mais de 30% das espécies analisadas citogeneticamente (Watanabe et al. 2007). Considerando dados morfológicos e moleculares, Gruenstaeudl et al. (2009) confirmaram esse número como sendo o número básico primário para a família, contudo havendo divergências em vários grupos, como observado no presente trabalho em *Cy. cardunculus* ($x = 17$), *Bidens sulphurea* ($x = 12$), *Sc. hispanicus* ($x = 10$), *Ta. officinale* ($x = 8$) e *Leo. incanus* ($x = 7$). Com relação ao tamanho cromossômico, *P. purpurea* (ST5) destacou-se por apresentar cromossomos com os maiores tamanhos médios, enquanto *Cy. cardunculus* (T1) e o gênero *Sonchus* (ST2) os menores.

Para a subfamília Carduoideae (T1), os dados obtidos para *Cy. cardunculus* confirmaram o número $2n = 34$, descrito para a espécie, o gênero (Dalgaard 1991) e a subtribo Carduinae (Häffner 2000). Esse número parece ter sido derivado por poliploidia de $n = 9$, seguida por disploidia descendente formando $n = 17$ (Häffner 2000). Após esta derivação, muitos rearranjos cromossômicos provavelmente ocorreram para a diminuição da quantidade de DNA, com consequente redução do tamanho cromossômico. A média cromossômica de *Cy. cardunculus* foi cerca de quatro a sete vezes menor que cromossomos de espécies da tribo Centaureinae, pertencente à mesma subfamília (Dydak et al. 2009).

Dentro da subfamília Asteroideae (SF2), o número de $2n = 24$ para *B. sulphurea* confirmou as descrições anteriores. Porém, essa espécie está inserida em um gênero que apresenta um complexo poliploide, com números de até $2n = 72$ (Grombone-Guaratini et al. 2006). Apesar da ocorrência de poliploidia nesse grupo, a disploidia é um evento incomum (Fachinetti et al. 2008), sugerindo que a alteração para o número básico $x = 12$ tenha surgido antes da formação do gênero.

Em Cichorioideae (SF3), as espécies *Sc. hispanicus* (subtribo Scolyminae, ST1), *Ta. officinale* (subtribo Crepidinae, ST4) e *Leo. incanus* (Hypochaeridinae, ST5) apresentaram números básicos de $x = 10$, $x = 8$ e $x = 7$ respectivamente, resultante de provável disploidia de $x = 9$. Na subtribo Scolyminae, *Scolymus* é o único gênero descrito até o momento com a referida variação (Lack et al. 1980; Nersesyan e Nazarova 1989). Na subtribo Crepidinae, $x = 8$ encontrado para *Taraxacum* corresponde a um caractere compartilhado com *Ixeris*, sendo provavelmente derivado na divisão da subtribo (Fujishima 2001; Denda e Yokota 2004). Na subtribo Hypochaeridinae, praticamente todos os gêneros portam significativa diversidade quanto ao número cromossômico (Slovák et al. 2007), destacando-se *Leontodon*, com

variação intragenérica de $2n = 8$ a $2n = 22$ e vários números básicos sugeridos para o grupo (Izuzquiza e Feliner, 1991; Samuel et al. 2006).

Diferente das espécies analisadas, *Ch. juncea* (Cichorieae/ Chondrillinae), com $2n = 18$, foi a única que divergiu quanto ao número em relação às descrições anteriores. A hipótese sugerida para a primeira descrição de $2n = 15$ foi tratar-se de um triploide baseado em $x = 5$, o que seria suportado por outras espécies, como *Ch. ambigua* com $2n = 10$ (Bergman 1950). Em estudos mais recentes, Chepinoga et al. (2009) descreveram um indivíduo com $2n = 20$ em *Ch. juncea*. De acordo com nossas análises, a constrição secundária proximal muito distendida pode ter levado estes autores a um erro de contagem, considerando o braço curto do maior par cromossômico como um par a mais totalizando $2n = 20$.

Dentre as espécies que apresentaram vários números cromossômicos descritos, destacam-se *Leu. vulgare*, *So. asper*, *So. oleraceus* e *Ta. officinale* como portadores de neopoliploidias, gerando um complexo de espécies. A influência deste tipo de variação cromossômica abrange vários casos na família (Watanabe et al. 2007). No caso de *So. oleraceus* ($2n = 32$), o aumento do número cromossômico não correspondeu a um múltiplo diretamente derivado de $x = 9$, pois esta espécie poderia tratar-se provavelmente de um anfidiplóide derivado de *So. asper* ($2n = 18$) e *So. tenerrimus* Schur ($2n = 14$) (Mejías e Andrés 2004).

Em relação aos resultados de CMA/DAPI e FISH, um padrão compartilhado na família corresponde ao DNAr 45S colocalizado com banda $CMA^{++}/DAPI^{-}$ em posição terminal (Mazzella et al. 2010; Salles-de-Melo et al. 2010), como observado na maioria das espécies analisadas. Por outro lado, a variação no número desses sítios, de um a seis por genoma haploide, evidencia que embora as características da heterocromatina constitutiva se conservem ao longo da evolução, rearranjos cromossômicos envolvendo estas regiões correspondem a um fato recorrente dentro do grupo.

Apesar da associação entre sítios de DNAr 45S e regiões CMA^{+} serem observadas de forma ampla em todo reino Plantae, a associação do DNAr 5S a este fluorocromo apresenta diferentes padrões (Guerra 2000). Na ocorrência de colocalização DNAr 45S/5S, o bloco $CMA^{++}/DAPI^{-}$ ocupa toda esta região, como o observado na literatura para vários representantes da subfamília Asteroideae, como os gêneros *Achyrocline* (Mazzella et al. 2010) e *Artemisia* (Pellicer et al. 2008; Konowalik et al. 2010). No entanto, a técnica de FISH aplicada em *B. sulphurea* (Asteroideae) não revelou indícios suficientes de sobreposição dos sinais de DNAr 45S e 5S, mas de adjacência. Na ausência de colocalização, dois tipos de bandeamento foram descritos em relação ao sítio DNAr 5S para Asteraceae: bandas $CMA^{+}/DAPI^{-}$, encontradas em todos os gêneros aqui analisados e em *Amphoriocarpus* Vis.,

Chardinia Desf., *Siebera* J.Gay e *Xanthemum* L. (Garnatje et al. 2004); ou ausência de bandas com fluorocromos, como descrito em *Centaurea* (Dydak et al. 2009) e *Helianthus* (Cuellar et al. 1996; Garcia et al. 2010).

Nos gêneros *Sonchus* e *Tolpis*, um cromossomo portador de dois sítios de DNAr apresentou um padrão conservado nas espécies analisadas. Este cromossomo marcador caracterizou-se pela presença de um sítio de DNAr 45S terminal e DNAr 5S intersticial no braço curto. Resultados similares também foram descritos em outros grupos como em quatro espécies de *Lactuca* (Matoba et al. 2007) e *Hieracium transylvanicum* Heuff. (Tomasz et al. 2010). Além do cromossomo marcador, observou-se um número variável de sítios extras de DNAr 45S sendo um, dois e três pares em *So. asper*, *To. barbata* e *So. oleraceus*, respectivamente. O padrão de *So. asper* foi idêntico aquele das espécies de *Lactuca* e *Hieracium* (Matoba et al. 2007; Tomasz et al. 2010). Por outro lado, o maior número de RONS em *To. barbata* e *So. oleraceus* encontrou-se diretamente relacionado ao aumento de sítios menores, podendo estar relacionados a eventos de transposição e translocação de DNA envolvendo RONS, como ocorrido, por exemplo, em *Chrysanthemum* e espécies próximas (El Twab e Kondo 2006; 2007).

Em *Ta. officinale*, a presença de apenas um conjunto de cromossomos portadores de RONS está provavelmente ligada à perda de um conjunto durante sua diferenciação, tendo em vista que em espécies diploides dois pares satelitados dentro do cariótipo parecem refletir a condição mais primitiva (Sato et al. 2007b). Além disso, seria provável em *Ta. officinale* a presença de dois conjuntos e não apenas um, como observado. Em relação ao posicionamento intersticial no braço longo, a RON parece ter sofrido alterações cromossômicas, incluindo uma inversão pericêntrica ou paracêntrica ancestral, quando considerada a formação de *Taraxacum* (Mogie e Richards 1983).

Em *Ch. juncea* a presença de RONS proximais também indica a existência de alterações cromossômicas dentro do cariótipo. Alterações no posicionamento do DNAr para a região proximal foram descritas anteriormente nos gêneros *Chrysanthemum* (El-Twab e Kondo 2006) e *Achyrocline* (Less.) DC. (Mazzella et al. 2010) e *Cichorium* (Bernardes, 2010). Porém, devido à distância entre estas espécies, pode-se supor que esta alteração tenha ocorrido de forma independente mais de uma vez dentro da família. El-Twab e Kondo (2007) relataram a presença de sinais intersticiais e terminais de 45S e 5S em *Chrysanthemum sensu lato*, sendo estes dados sugestivos para a ocorrência de inversões ou translocações ao longo da evolução. Eventos como estes podem ter ocorrido em *Ch. juncea*, explicando esta diferenciação.

A presença de vários padrões de bandeamento com fluorocromos não relacionados a RON evidenciaram uma grande diversidade de HC dentro da família, como as bandas CMA⁺/DAPI observadas na região terminal de *B. sulphurea*, CMA⁻/DAPI⁺⁺ relativas às regiões centroméricas de *So. asper* e *So. oleraceus* e terminais em *Leu. vulgare*, e CMA⁻/DAPI⁺ na região terminal de *Ch. juncea* e centromérica de *Sc. hispanicus* e *Leu. vulgare*. Tais variações remetem a uma evolução rápida, alterando unidades de repetição e as homogeneizando dentro do genoma (Lamb et al. 2007).

Considerações Finais

Apesar da família Asteraceae ser considerada um grupo monofilético, as relações entre níveis taxonômicos inferiores ainda não estão bem compreendidas, levando ao reconhecimento gradual de grupos parafiléticos adicionais, reorganizados em novas classificações. Entre os exemplos existentes, o mais marcante compreende a divisão em subfamília, a qual foi alterada de três por Bremen (1994), para 11 por Panero e Funk (2002), e posteriormente para 12 por Funk et al. (2009). A correta delimitação dos gêneros também se constitui como um sério problema, em que agrupamentos parafiléticos tem sido descritos em vários gêneros como *Tolpis* (Park et al. 2001), *Prenanthes* e *Sonchus* (Kim et al. 1996).

A citogenética tem desempenhado um importante papel dentro da família, sendo importante na indicação de relações filogenéticas, como no caso de descrições de números básicos, seja para a família inteira com $x = 9$ (Gruenstaeudl et al. 2009), ou para alguns grupos que tenham modificações gerando novos números básicos em gêneros ou tribos. Os gêneros *Taraxacum* ($x = 8$) e *Scolymus* ($x = 10$), ou a subtribo Carduinae ($x = 17$), exemplificam tais modificações. A identificação de alterações cariotípicas evidencia barreiras reprodutivas e caminhos direcionais no processo de divergência evolutiva (Watanabe et al. 2007).

Existem muitas situações em que táxons, mesmo próximos podem apresentar diferenças significativas em suas porções da cromatina (Guerra, 2008). Baseado nos estudos de técnicas diferenciais dentro de Asteraceae, a descrição de tipos de heterocromatina evidenciam uma grande variabilidade citogenética, e salientam este grupo como promissor para utilização deste tipo de análise como ferramenta na citotaxonomia, podendo facilmente diferenciar ou agrupar espécies, atuando como uma característica valiosa no entendimento da evolução e consequentemente taxonomia e sistemática.

Agradecimentos Os autores agradecem a Brunno Leite, Ana Rafaela Oliveira, Santelmo Vasconcelos, Diego Sotero e Kyria Bortoleti, pelo suporte e sugestões de fundamental importância para a realização do trabalho. O trabalho teve apoio financeiro na forma de bolsas e auxílio à pesquisa, recebidos da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências Bibliográficas

- Alexander JM, Naylor B, Poll M, Edwards PJ, Dietz H (2009) Plant invasions along mountain roads: the altitudinal amplitude of alien Asteraceae forbs in their native and introduced ranges. *Ecography* 32: 334-344.
- Baarlen PV, Dijk PJV, Hoekstra RF, Jong JH (2000) Meiotic recombination in sexual diploid and apomictic triploid dandelions (*Taraxacum officinale* L.) *Genome* 43: 827–835.
- Benko-Iseppon AM, Morawetz W (2000) Cytological comparison of Calyceraceae and Dipsacaceae with special reference to their taxonomic relationships. *Cytologia* 65: 123-128.
- Bergan BT (1950) Meiosis in two different clones of the apomictic *Chondrilla juncea*. *Hereditas* 36: 297-320.
- Bocher TW, Larsen K (1957) Cytotaxonomical studies in the *Chrysanthemum leucanthemum* complex. *Watsonia* 4: 11-16.
- Bonifacino JM, Harold R, Funk VA, Lack HW, Wagenitz G, Feuillet C, Hind N (2009). A history of research in Compositae: early beginnings to the Reading Meeting (1975). In: Funk, V.A., A. Susanna, T. F. Stuessy, and R. J. Bayer (eds.). *Systematics, evolution, and biogeography of the Compositae*, (ed). IAPT. Austria. Pp. 3-38.
- Bremer K (1994) *Asteraceae: cladistics and classification*. Timber Press, Portland, 752p.
- Carr GD, King RM, Powell AM, Robinson H (1999) Chromosome numbers in Compositae. XVIII. *Amer J Bot* 86(7): 1003–1013.
- CGP - Compositae Genome Project Database Disponível em: [<http://cgpdb.ucdavis.edu>]. acesso em 27 de novembro de 2010.
- Chaves ALR, Colariccio A, Eiras M, Galletti SR (2007) *Sonchus asper* e *S. oleraceus* como reservatórios naturais de vírus em cultivos de alface no cinturão-verde de São Paulo. *Arq Inst Biol* 74(2): 101-106.

- Chepinoga VV, Gnutikov AA, Enushchenko IV, Rosbakh AS (2009) IAPT/IOPB chromosome data 8. *Taxon* 58 (4): 1281–1289.
- Cuellar T, Belhassen E, Fernandez-Calvin B, Orellana J, Bella JL (1996) Chromosomal differentiation in *Helianthus annuus* var. *macrocarpus*: heterochromatin characterization and rDNA location. *Heredity* 76: 586-591.
- Dalgaard V (1991) Chromosome studies in flowering plants from Macaronesia II. *Willdenowia* 20: 139-152.
- Dempewolf H, Rieseberg LF, Cronk QC (2008) Crop domestication in the Compositae: a family-wide trait assessment. *Genet Resour Crop Evol* 55:1141–1157.
- Denda T, Yokota M (2004) Cytogeography of *Ixeris nakazonei* (Asteraceae, Lactuceae) in the Ryukyu Archipelago of Japan and Taiwan. *J Plant Res* 117: 3-11.
- Deumling B, Greilhuber J (1982) Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by *in situ* hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. *Chromosoma* 84: 535-555.
- Dydak M, Kolano B, Nowak T, Siwinska D, Maluszynska J (2009) Cytogenetic studies of three European species of *Centaurea* L. (Asteraceae). *Hereditas* 146: 152-161.
- El-Twab MHA, Kondo K (2006) FISH physical mapping of 5S, 45S and *Arabidopsis*-type telomere sequence repeats in *Chrysanthemum zawadskii* showing intra-chromosomal variation and complexity in nature. *Chromosome Bot.* 1: 1-5.
- El-Twab MHA, Kondo K (2007) FISH physical mapping of 5S rDNA and telomere sequence repeats identified a mapping and mutation in *Leucanthemella linearis* and *Nipponanthemum nipponicum* in *Chrysanthemum sensu lato*. *Chromosome Bot.* 2: 11-17.
- Fachinetto JM, Laughinghouse IV HD, Ferreira da Silva AC, Bosio Tedesco S (2008) Variability of the chromosomal number and meiotic behavior in the populations of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) from southern Brazil. *Caryologia* 61: 164-169.
- Fregonezi JN, Torezan JMD, André LL, Vanzela ALL (2004) A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence *in situ* hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA₃ banding. *Genet Mol Biol* 27(2): 223-227.
- Fujishima H (2001) A karyological study on speciation of the *Ixeris dentata* complex. *Chromosome Sci* 5(1): 1344-1051.
- Funk VA, Susanna A, Steussy TF, Bayer RJ (2009) Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. IAPT, Vienna, pp 965.

- Garcia S, Panero JL, Siroky J, Kovarik A (2010) Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. *BMC Plant Biology* 10:176-194.
- Garnatje T, Vallès J, Vilatersana R, Garcia-Jacas N, Susunna A, Siljak-Yakovlev S (2004) Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). *Plant Biol* 6: 140-146.
- Gemeinholzer B, Faustmann I (2005) New chromosome counts for some Lactuceae (Compositae). *Comp News* 42: 42-47.
- Grombone-Guaratini MT, Mansanares ME, Semir J, Solferini VN (2006) Chromosomal studies of three species of *Bidens* (L.) (Asteraceae). *Caryologia* 59(1): 14-18.
- Gruenstaeudl M, Urtubey E, Jansen RK, Samuel R, Barfuss HJ, Stuessy T (2009) Phylogeny of Barnadesioideae (Asteraceae) inferred from DNA sequence data and morphology. *Mol Phylogenet Evol* 51(3): 572-587.
- Guerra M (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet Mol Biol* 23(4): 1029-1041.
- Guerra M (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: Concepts and implications. *Cytogenet Genome Res* 120: 339-350.
- Häffner (2000) On the Phylogeny of the Subtribe Carduinae (Tribe Cardueae, Compositae). *Englera* 21: 3-208.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Ananthawat-Jonsson, K, Leitch, AR, Shi M, Leitch, IJ (1991) *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Tech J Meth Cell Mol Biol* 3: 109-116.
- Jiang J, Hulbert SH, Gill BS, Ward DC (1996) Interphase fluorescence in situ hybridization mapping: a physical mapping strategy for plant species with large complex genomes. *Mol Gen Genet.* 252(5):497-502.
- Inceer H, Hayirlioglu-Ayaz S (2007) Chromosome numbers in the tribe Anthemideae (Asteraceae) from north-east Anatolia. *Bot J Linn Soc* 153: 203-211.
- Izuzquiza A, Feliner GN (1991) Cytotaxonomic notes on the *Leontodon* (Asteraceae, Hypochoeridinae). *Willdenowia* 21: 215-224.
- Jose JC, Mathew PM (1995) Chromosome numbers in the south Indian Heliantheae (Compositae). *Comp News* 27: 7-10.
- Kashin AS, Demotshco YA, Martinova VS (2003) Caryotype variation in population of apomictic and sexual species of agamic complexes of Asteraceae. *Bot Zhurn* 88: 35-51.

- Kilian N, Gemeinholzer B, Lack HW (2009) Cichorieae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TE, Bayer RJ (ed) Systematics, evolution and biogeography of *Compositae*. IAPT, Vienna, pp 343-383.
- Kim SC, Crawford DJ, Jansen RK (1996) Phylogenetic relationships among the genera of the Subtribe Sonchinae (Asteraceae): evidence from ITS sequences. *Syst Bot* 21(3): 417-432.
- Konowalik K, Garcia S, Pellicer J, Kreitschitz A, Vallès J (2010) Cytogenetic characterization of *Artemisia absinthium* (Asteraceae, Anthemidae) and its Polish endemic var. *calcigena*. *Anna Bot Fennici*. 47: no prelo.
- Lack HW, Ern H, Straka H (1980) Die Gattung *Rothmaleria* Font Quer (Asteraceae, Lactuceae). *Willdenowia* 10: 37-49.
- Lamb JC, Yu W, Han F, Birchler JA (2007) Plant chromosomes from end to end: telomeres, heterochromatin and centromeres. *Curr Opin Plant Biol* 10: 116-122.
- Lippert W, Heubl GR (1989) Chromosomenzahlen von pflanzen aus Bayern und abgrenzenden Gebieten: (Teil 1). *Ber Dtsch Bot Ges* 60: 73-83.
- Matoba H, Mizutani T, Nagano K, Hoshi Y, Uchiyama H (2007) Chromosomal study of lettuce and its allied species (*Lactuca* spp., Asteraceae) by means of karyotype analysis and fluorescence in situ hybridization. *Hereditas* 144: 235-243.
- Mazzella C, Rodríguez M, Vaio M, Gaiero P, López-Carro B, Santiñaque FF, Folle GA, M. Guerra M (2010) Karyological Features of *Achyrocline* (Asteraceae, Gnaphalieae): Stable Karyotypes, Low DNA Content Variation and Linkage of rRNA Genes. *Cytogenet Genome Res* 128: 169-176.
- Mejías JA, Andrés C (2004) Karyological Studies In Iberian *Sonchus* (Asteraceae: Lactuceae): *S. oleraceus*, *S. microcephalus* and *S. asper* and a general discussion. *Folia Geobotanica* 39: 275-291.
- Mogie M, Richards AJ (1983) Satellited chromosomes, systematic and phylogeny in *Taraxacum* (Asteraceae). *Plant Syst Evol* 141: 219-229.
- Nersesyan AA, Nazarova EA (1989) Karyosystematic study of *Gundeliia tournefortii* (Asteraceae). *Bot Zurnal* 74: 837-839.
- Panero JL, Funk VA (2002) Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proc Biol Soc Wash* 115(4): 760-773.
- Parra R, Valdés B, Álvarez A, Villarreal J, Roldán J (1998) Números cromosómicos para la flora española. 793-805. *Lagascalia* 20(2): 302-308.

- Park SJ, Korompai EJ, Francisco Ortega J, Santos Guerra A, Jansen RK. (2001) Phylogenetic relationships of *Tolpis* (Asteraceae: Lactuceae) based on *ndhF* sequence data. *Pl Syst Evol* 226: 23-33.
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002) Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161: 1661–1672.
- Pellicer J, Garcia S, Garnatje T, Hidalgo O, Siljak-Yakovlev S, Vallès J (2008) Molecular cytogenetic characterization of some representatives of the subgenera *Artemisia* and *Absinthium* (genus *Artemisia*, Asteraceae). *Collect Bot* 27: 19-27.
- Pires JC, Lim KY, Kovarik A, Matyasek R, Boyd A, Leitch AR, Leitch IJ, Bennett MD, Soltis PS, Soltis DE (2004) Molecular cytogenetic analysis of recently evolved *Tragopogon* (asteraceae) allopolyploids reveal a karyotype that is additive of the diploid progenitors. *Am J Bot* 91(7): 1022–1035.
- Razaq ZA, Vahidy AA, Ali SI (1994) Chromosome numbers in Compositae from Pakistan. *Ann Missouri Bot Gard* 81: 800-808.
- Raven PH, Solbrig OT, Kyhos DW, Snow R (1960) Chromosome numbers in Compositae. I. Astereae. *Am J of Bot* 47: 124-132.
- Reeves A (2001) MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome* 44: 439–443.
- Richards AJ (1973) The origin of *Taraxacum* agamospecies. *Bot J Linn Soc* 66:189-211.
- Ruas PM, Ruas CF, Maffei EMD, Marin-Morales MA, Aguiar-Perecin (2000) Chromosome studies in the genus *Mikania* (Asteraceae) *Genet Mol Biol* 23(4): 979-984.
- Ruas CF, Vanzela A LL, Santos MO, Fregonezi JN, Ruas MP, Matzenbacher NI, Aguiar Perecin MLR (2005) Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genet Mol Biol* 28(1): 129-139.
- Salles-de-Melo MRC, Lucena RM, Semir J, Carvalho R, Pereira RCA, Benko-Iseppon AM (2010) Karyological features and cytotaxonomy of the tribe Vernonieae (Asteraceae). *Plant Syst Evol* 285:189–199.
- Samuel R, Gutermann W, Stuessy TF, Ruas CF, Lack HW, Tremetsberg K, Talavera S, Hermanowski B, Ehrendorfer F (2006) Molecular phylogenetics reveals *Leontodon* (Asteraceae, Lactuceae) to be dyphyletic. *Am J Bot* 93(8): 1193-1205.
- Sato K, Iwatsubo Y, Watanabe M, Serizawa S, Naruhashi N (2007a) Cytogenetic studies of Japanese triploid *Taraxacum officinale* (Common Dandelion: Asteracea). *Cytologia* 72(4): 475-482.
- Sato K, Iwatsubo Y, Naruhashi N (2007b) Chromosome studies of native lowland diploid species of *Taraxacum* (Asteraceae) in Japan. *Cytologia* 72(3): 309-317.

- Schrader O, Ahne R, Fuchs J, Schubert I (1997) Karyotype analysis of *Helianthus annuus* using Giemsa banding and fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Res* 5(7): 451-456.
- Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin A e DAPI. *Chromosoma* 58:307-324.
- Slovák M, Šingliarová B, Mráz P (2007) Chromosome numbers and mode of reproduction in *Picris hieracioides* s.l. (Asteraceae), with notes on some other *Picris taxa*. *Nordic J Bot* 25: 238-244.
- Soares ELC, Vendruscolo GS, Eisinger SM, Záchia RA (2004) Estudo etnobotânico do uso dos recursos vegetais em São João do Polêsine, RS, Brasil, no período de outubro de 1999 a junho de 2001. *Ver Bras Pl Med* 6(3): 69-95.
- Soltis DE, Soltis PS, Pires JC, Kovarik A, Tate JA, Mavrodiev E (2004) Recent and recurrent polyploid in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. *Biol J Linn Soc* 82: 485-501.
- Szelag Z, Ilnicki T, Niketić M, Tomović G (2007) Diploid Chromosome Numbers In Five *Hieracium* Species From Serbia And Montenegro. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Bot* 49(1): 119–121.
- Tomasz I, Hasterok R, Szeląg Z (2010) Cytogenetic analysis of *Hieracium transylvanicum* (Asteraceae). *Caryologia* 63 (2): 192-196.
- Wanzenböck EM, Schöfer C, Schweizer D, Bachmair A (1997) Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 11:1007-1016.
- Watanabe K, Yahara T, Hashimoto G, Nagatani Y, Soejima A, Kawahara T, Nakazawa M (2007) Chromosome numbers and karyotypes in Asteraceae. *Ann Missouri Bot Gard* 94: 643-654.
- Weber E (2003) Invasive Plant species of the world – A reference guide to environmental weeds. CABI Publishing (ed) pp. 52.

7. Conclusões

1. As espécies *Cichorium endivia* e *Ci. intybus* embora pertençam ao mesmo gênero e apresentem o mesmo número cromossômico de $2n = 2x = 18$ possuem diferenças significativas na distribuição do DNAr, observando-se importantes rearranjos cromossômicos envolvendo um provável aumento do número de sítios de RON na divergência dessas espécies.
2. Apesar de apresentarem diferenças na morfologia, os cinco acessos de *Ci. endivia* e quatro dos cinco acessos de *Ci. intybus* não apresentaram modificações cariotípicas significativas que evidenciem barreiras reprodutivas intraespecíficas. O acesso *Ci. intybus* var. *foliosum* cult. Zoom, por outro lado, apresentou rearranjos marcantes no cariótipo, constituindo-se de dois pares cromossômicos heteromórficos portadores de DNAr, permitindo a identificação de uma possível translocação recíproca ocorrida apenas para este acesso. Estas mutações cromossômicas certamente promoveriam uma barreira reprodutiva da planta, no entanto possivelmente estratégias de reprodução vegetativa devem estar ocorrendo para a manutenção da viabilidade reprodutiva deste acesso.
3. Todas as espécies analisadas confirmaram contagens prévias na literatura, com exceção de *Ch. juncea* ($2n = 18$), na qual pode ter ocorrido erros de contagem devido à presença de uma constrição secundária proximal.
4. Embora com o número básico de $x = 9$, a família Asteraceae sofreu vários eventos de disploidia gerando uma amplitude significativa de números cromossômicos, variando de $x = 7$ a $x = 17$.
5. Variações na quantidade, localização e tamanho dos sítios de DNAr permitiram identificar vários tipos de rearranjos sofridos durante a evolução. Entre os de maior destaque tem-se inversões, transposição e translocações.
6. A ampla variedade da heterocromatina constitutiva não relacionada à RON, evidenciada através dos fluorocromos, indicam prováveis processos de mutação nas unidades de repetição e processos de homogenização dessas novas sequências.
7. As marcantes diferenças citogenéticas entre grupos próximos indicam uma evolução muito rápida neste grupo.

8. Anexos

8.1. Regras da Revista Plant Systematic and Evolution

Plant Systematics and Evolution

• Instructions for Authors

EDITORIAL PROCEDURE

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

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript submission

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

Permissions

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

Online Submission

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

TITLE PAGE

The title page should include:

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

Abstract

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

Keywords

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

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- o Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- o Use italics for emphasis.
- o Use the automatic page numbering function to number the pages.
- o Do not use field functions.
- o Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- o Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- o Use the equation editor or MathType for equations.
Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.
- o Save your file in doc format. Do not submit docx files.
- o Word template
Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- o LaTeX macro package

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

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

Footnotes

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

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

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

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

SCIENTIFIC STYLE

- o Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.
- o Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- o Genus and species names should be in italics.
- o Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.
- o 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".
- o Data matrices including sequence alignments must be made available to the public. There must be a sentence included in the Materials and methods section that such information is available from the corresponding author. "DNA or proteine sequences must be deposited in public data bases (GenBank, EMBL, etc.) before the revised version is sent to the editor."

REFERENCES

Citation

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

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

Reference list

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

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

- o Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325-329
- o Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- o Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- o Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- o Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- o Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

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

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

- o EndNote style

TABLES

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

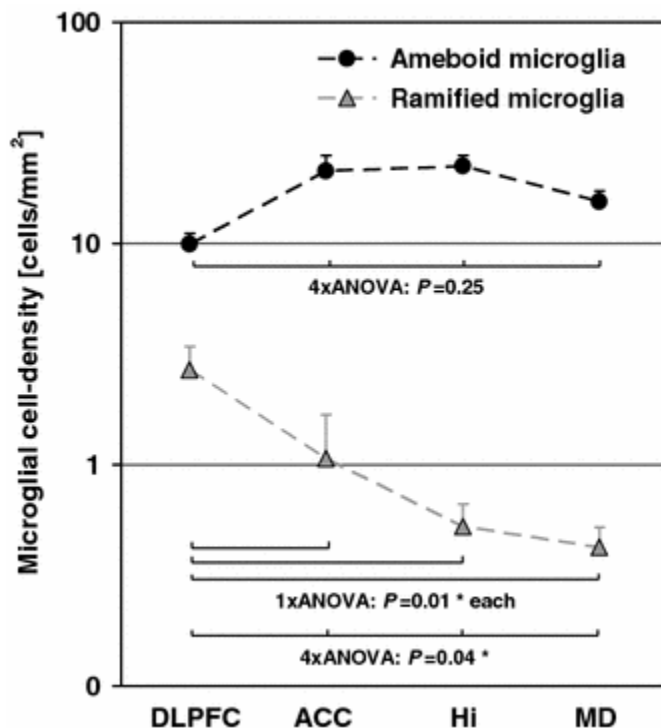
ARTWORK

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

Electronic Figure Submission

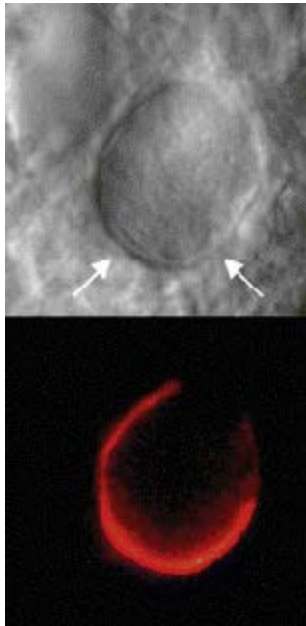
- o Supply all figures electronically.
- o Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- o For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- o Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded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

Line Art



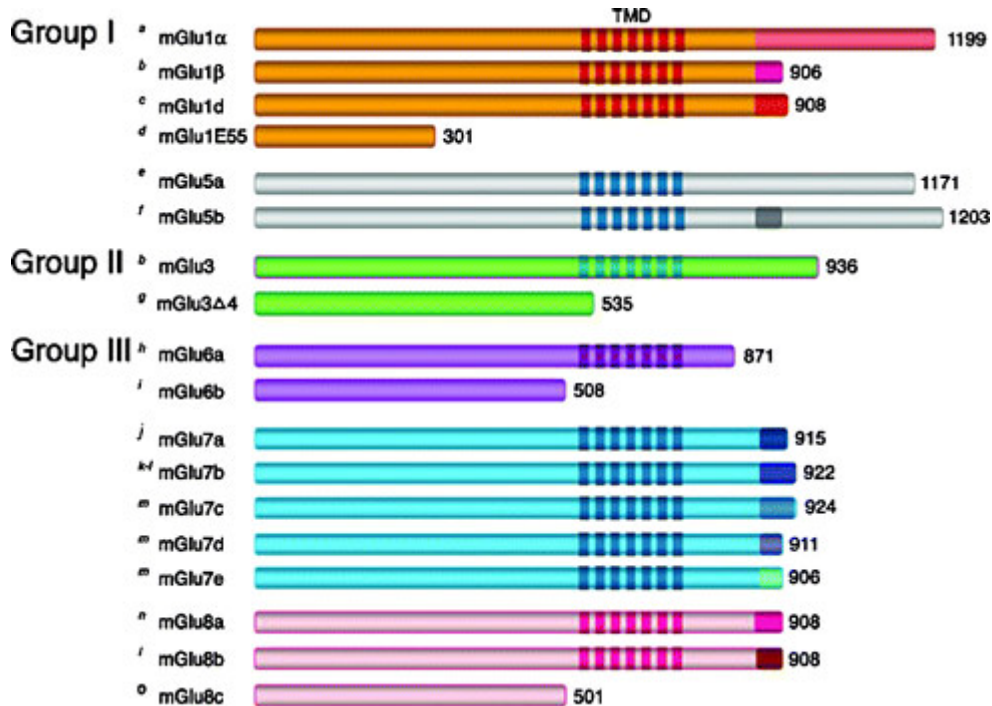
- o Definition: Black and white graphic with no shading.
- o Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- o All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- o Scanned line drawings and line drawings in bitmap format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

Halftone Art



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

Combination Art



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

Color Art

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

Figure Lettering

- o To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

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

Figure Numbering

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

Figure Captions

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

Figure Placement and Size

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

Permissions

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

Accessibility

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

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

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

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

Submission

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

Audio, Video, and Animations

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

Text and Presentations

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

Spreadsheets

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

Specialized Formats

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

Collecting Multiple Files

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

Numbering

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

Captions

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

Processing of supplementary files

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

Accessibility

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

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

AFTER ACCEPTANCE

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

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

Open Choice

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

- o Springer Open Choice

Copyright transfer

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

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

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

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

Proof reading

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

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

Online First

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

9. Memorial do aluno

Ebenézer Bernardes Correia Silva [benebernardes@gmail.com], nascido em 14 de janeiro de 1982, iniciou o curso de Ciências Biológicas em 2000 na Universidade Federal de Pernambuco, obtendo o título de bacharel em 03 de março de 2004, com o trabalho de conclusão: Caracterização cromossômica de *Euschistus heros* (Hemiptera-Pentatomidae): Comportamento meiótico, bandeamento C e coloração com nitrato de prata (AgNO_3). Ingressou no mestrado em genética pela mesma instituição em março de 2004, adquirindo o título de mestre em genética com a dissertação intitulada: Caracterização citogenética de cinco espécies de *Eucalyptus* (Myrtaceae) através de técnicas convencionais e bandeamento cromossômico, defendida em 21 de fevereiro de 2006. No mesmo ano ingressou no doutorado em genética na mesma pós-graduação. Em paralelo, no ano de 2007, realizou um curso de especialização em Análises Clínicas pela Faculdade Frassinetti do Recife (FAFIRE) com monografia intitulada: Contribuição da citogenética para o diagnóstico da síndrome mielodisplásica (SMD). Os resultados obtidos durante os cursos foram apresentados como primeiro autor em vários congressos na área de genética (49º, 50º, 52º Congresso Brasileiro de Genética, XVII ENGGENE), botânica (56º Congresso Nacional de Botânica) e melhoramento (4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas e II Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos). Em 2009 foi convocado mediante concurso público para assumir o cargo de professor do Instituto Federal de Alagoas (IFAL), no qual ministra aulas para os níveis técnico integrado, licenciatura em biologia a distância e licenciatura em biologia, este último como um dos responsáveis pela implementação do curso na instituição.