

FERNANDO ROA OVALLE

CITOTAXONOMIA MOLECULAR DO GÊNERO
***Callisia* Loebl. (Commelinaceae)**

RECIFE
MARÇO 2007

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

CITOTAXONOMIA MOLECULAR DO GÊNERO *Callisia* Loefl. (Commelinaceae)

Dissertação apresentada por Fernando Roa Ovalle ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Marcelo Guerra

RECIFE
Março 2007

Roa Ovalle, Fernando.
Citotaxonomia molecular do gênero *Callisia* Loefl. (Commelinaceae).
/ Fernando Roa Ovalle. – Recife: O Autor, 2007.

48 folhas : il., fig. tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia Vegetal, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Commelinaceae 2. Heterocromatina 3. *Callisia* - Evolução cromossômica I. Título.

**582.565
584.86**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2008- 111**

FERNANDO ROA OVALLE

CITOTAXONOMIA MOLECULAR DO GÊNERO *Callisia* Loefl. (Commelinaceae)

COMISSÃO EXAMINADORA:

Membros titulares:

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

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

Prof. Leonardo Pessoa Félix. Depto. de Fitotecnia, CCA UFPB.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Botânica, por facilitar o uso de suas dependências.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de minha bolsa de estudo CAPES-PROF.

Aos Coordenadores da Pos-Graduação em Biologia Vegetal, Marccus Alves e Andrea Pedrosa, por seu apoio.

Ao professor Marcelo Guerra, por sua orientação, sua dedicação.

Ao Dr. Leonardo Félix, ao Dr. Robert Faden, ao Dr. Mauro Grabiele, ao Dr. Julio Daviña e à Dra. Maria do Carmo E. do Amaral pelos exemplares cedidos.

A Marlene e ao pessoal do Herbário pela montagem das exsicatas.

Aos colegas de Laboratório, Cícero, Ana Paula, Ana Emilia, Lili, Gabriela, Silvana, Gustavo e Sandra por sua ajuda com o português, e com as técnicas.

À FACEPE, ao CNPq, por terem financiado o material e equipamentos utilizados neste trabalho.

A todos que ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Histórico e problema taxonômico	2
2.1.1. A subtribo Tradescantiinae.....	2
2.1.2. O gênero <i>Callisia</i> . Seções, características e distribuição	3
2.2. Principais parâmetros citogenéticos utilizados na citotaxonomia.....	4
2.2.1. Número e morfologia cromossômica	4
2.2.2. Padrões de distribuição da heterocromatina.....	5
2.2.3. Análises citomoleculares.....	5
2.3. Citogenética da família Commelinaceae com ênfase no gênero <i>Callisia</i>	8
2.3.1. Citotaxonomia do gênero <i>Callisia</i>	9
2.3.2. Análises da heterocromatina em <i>Callisia</i>	10
2.3.3. Análises meióticas em <i>Callisia</i>	10
2.3.4. Evolução cromossômica do gênero <i>Callisia</i>	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
4. OBJETIVOS.....	16
5. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO <i>ANNALS OF BOTANY</i> .	17
Título, autores.....	17
Resumo.....	18
Introdução.....	19
Materiais e métodos	20
Resultados.....	22
Discussão	24
Agradecimentos	27
Literatura citada	28
6. CONCLUSÕES	41
7. RESUMO.....	42
8. ABSTRACT	43
ANEXOS	44
ANEXO 1. Fotos de alguns acessos estudados do gênero <i>Callisia</i>	45
ANEXO 2. Fotos dos acessos do gênero <i>Tripogandra</i>	47
ANEXO 3. Normas do manuscrito a submeter ao periódico <i>Annals of Botany</i>	49

1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Callisia*, (Commelinaceae, tribo Tradescantieae, subtribo Tradescantiinae) e as Commelinaceae, em geral, apresentam altos níveis de homoplasia de caracteres morfológicos, o que dificulta a análise taxonômica. Por esta razão, cladogramas produzidos com dados morfológicos para esse gênero ou para a família são diferentes dos produzidos a partir de dados moleculares (Evans *et al.*, 2000; Bergamo, 2003; Evans *et al.*, 2003).

Historicamente, as propostas taxonômicas para a subtribo Tradescantiinae apresentaram duas tendências, uma de estabelecer na subtribo muitos gêneros, vários deles monoespecíficos, e outra de agrupar espécies com poucas similaridades no mesmo gênero, mas estabelecendo subdivisões em seções. A proposta aceita atualmente (Hunt, 1986) para *Callisia* segue a segunda tendência. Hunt (1986) considerou uma série de características morfológicas e também dados citogenéticos, como número básico e morfologia cromossômica, para agrupar as espécies em seções e grupos. No entanto, não existe uma sinapomorfia que defina o gênero *Callisia*.

Análises filogenéticas recentes indicam que o gênero *Callisia* não é monofilético, devido ao agrupamento de suas espécies com outras do gênero *Tripogandra* e *Gibasis* (Evans *et al.*, 2003; Bergamo, 2003; Burns, 2006). De acordo com a análise molecular de Bergamo (2003), as espécies analisadas de *Tripogandra* e *Callisia* não constituem clados independentes. Entretanto, a análise conjunta de dados moleculares e morfológicos não favorece a fusão desses gêneros, mas sim propõe novamente a segregação de espécies e seções de *Callisia* em vários novos gêneros (Bergamo, 2003). Além disso, estudos citogenéticos indicam que as diferentes seções de *Callisia* apresentam cariótipos bem distintos, por isso, foi sugerido que suas espécies são muito divergentes para estarem agrupadas no mesmo gênero (Jones e Jopling, 1972; Jones e Kenton, 1984; Pitrez, 1998).

O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise citogenética detalhada de espécies do gênero *Callisia* e algumas espécies do gênero *Tripogandra*, visando entender a evolução cromossômica de *Callisia*. Foram analisados os número cromossômicos, a estrutura de núcleos interfásicos, o padrão de condensação profásica, as regiões de heterocromatina, e a localização dos sítios de DNAr 5S e 45S. Avaliando estas características citogenéticas juntamente com a filogenia molecular previamente publicada, foram indicadas as principais mudanças cariotípicas ocorridas durante a evolução das espécies analisadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico e problema taxonômico

Callisia Loefl. faz parte da subtribo Tradescantiinae Rohw., da tribo Tradescantieae Meisner, da família Commelinaceae. Nessa família existem duas subfamílias: Cartonematoideae (Pichon) Faden ex G. Tucker, com duas tribos, cada uma com um gênero, e a subfamília Commelinoideae Faden & D.R. Hunt, também com duas tribos (Tradescantieae e Commelineae). A família possui aproximadamente 40 gêneros, a maioria deles pertencente a oito subtribos da tribo Tradescantieae. Esta família apresenta uma notável variação morfológica, principalmente nos caracteres da inflorescência. As flores não produzem néctar, mas as mudanças ocorridas na simetria floral e no número, posição e estrutura dos estames funcionam na atração de polinizadores. Esta variação dificulta a interpretação das homologias destes caracteres, o que tem levado à reformulação da classificação taxonômica (Evans *et al.*, 2000).

2.1.1. A subtribo Tradescantiinae

A taxonomia da subtribo Tradescantiinae foi reformulada várias vezes, devido à dificuldade para obter uma classificação satisfatória para 12 de suas 120 espécies. Estas apresentavam algumas características típicas de vários gêneros da subtribo sendo, por isso, frequentemente mudadas de um gênero para outro, segundo a interpretação de cada autor (Hunt, 1986). De acordo com Hunt (1986) existiam duas opções para tentar resolver o problema da subtribo, nenhuma completamente satisfatória. Uma solução seria estabelecer aproximadamente dez gêneros, de uma ou duas espécies, e a outra seria ampliar o gênero *Callisia* e subdividi-lo em seções. Hunt considerou que a segunda seria “o mal menor”.

Várias publicações posteriores sobre o gênero *Callisia*, a subtribo Tradescantiinae e a família Commelinaceae (Tucker, 1989; Faden e Hunt, 1991; Faden, 1998) adotaram a proposta de Hunt (1986) de dividir o gênero em seções. Faden e Hunt (1991) revisaram a taxonomia do grupo e consideraram a subtribo Tradescantiinae composta por quatro gêneros: 1) *Callisia*, com cerca de 20 espécies do Novo Mundo, incluindo os antigos gêneros *Hadrodemas* H. Moore, *Cuthbertia* Small, *Aploeia* Raf., *Leiandra* Raf., *Phydina* Raf. e *Leptorhoeo* C. B. Clarke ex Hemsley; 2) *Gibasis* Raf., com 11 espécies neotropicais; 3) *Tradescantia* L., com cerca de 70 espécies do Novo Mundo, incluindo *Setcreasea* Schumann e Sydow, *Separotheca* Waterf., *Cymbispatha* Pichon, *Campelia* Rich., *Rhoeo* Hance e *Zebrina* Schnizl.; 4) *Tripogandra* Raf., com 22 espécies neotropicais. Contudo, nas análises

filogenéticas, o gênero *Elasis* da subtribo Thyrsantheminae, está agrupado em um clado junto com gêneros de Tradescantiinae, sugerindo que esta subtribo é parafilética (Evans *et al.*, 2003; Wade *et al.*, 2006). Além disso, as análises filogenéticas de Bergamo (2003), Evans *et al.* (2003) e Burns (2006) sugerem que os gêneros atualmente em Tradescantiinae, incluindo *Callisia*, não são monofiléticos.

2.1.2. O gênero *Callisia*: Seções, características e distribuição

O gênero *Callisia* foi descrito por Loeffling em 1758 sem espécie tipo. O neótipo foi descrito por Jacquin em 1760 como *Hapalanthus repens* e transferida para *Callisia* por Linnaeus, em 1762. Posteriormente foram incluídas paulatinamente outras espécies em *Callisia*, inclusive algumas que faziam parte de outros gêneros, alguns deles atualmente não existentes (revisado por Bergamo, 2003).

A concepção atual de *Callisia* surgiu como parte de uma tentativa de Hunt (1986) para resolver definitivamente o problema taxonômico da subtribo Tradescantiinae. O sistema de Hunt (1986), adotado em revisões taxonômicas posteriores, havia ampliado o gênero para 20 espécies que foram agrupadas em seis seções: *Leptocallisia*, *Callisia*, *Brachyphylla*, *Lauia*, *Hadrodemas* e *Cuthbertia*. Contudo, as espécies dessas seções não compartilham nenhuma sinapomorfia. Entretanto, podem ser distinguidas dos outros três gêneros da subtribo por apresentarem inflorescências com cincinos sésseis pareados sem brácteas espatáceas sob os mesmos e flores actinomorfas com estames monomórficos (Bergamo, 2003). Nos últimos anos, as análises moleculares colocaram em dúvida a classificação existente para o gênero (Evans *et al.*, 2003; Bergamo, 2003; Burns, 2006). Bergamo (2003), utilizando os resultados de uma análise molecular e os dados morfológicos disponíveis, propôs a segregação das seções *Brachyphylla* e *Cuthbertia* como gêneros diferentes e a segregação de *Callisia gracilis* da seção *Leptocallisia* em *Phyodina*, configurando um gênero monoespecífico.

O centro de diversidade proposto para o gênero *Callisia* é o México. As espécies ocorrem desde o sudeste dos Estados Unidos da América (EUA) até a Argentina (Hunt 1986; Bergamo, 2003). Os representantes da seção *Cuthbertia* são endêmicos do sudeste dos EUA. A seção *Brachyphylla* é endêmica do México e Texas (EUA) e sua distribuição não se sobrepõe com a de *Cuthbertia*. As seções monoespecíficas *Lauia* e *Hadrodemas* são endêmicas de Oaxaca (México) e Guatemala. A seção *Leptocallisia* apresenta distribuição mais ampla, estando presente no México, na América Central e na América do Sul. Dessa seção, *Callisia ciliata*, *C. filiformis* e *C. monandra* se encontram no Brasil. Barreto (1997) encontrou para o Brasil apenas uma citação de *C. ciliata* no estado do Amazonas; enquanto

que *C. filiformis* ocorre predominantemente nas regiões Nordeste e Centro-Oeste e *C. monandra* nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul. As espécies da seção *Callisia* apresentam distribuição restrita, exceto *C. repens*, do grupo Repens, que ocorre desde o sul dos Estados Unidos da América até a Argentina, e está presente nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil (Barreto, 1997). As espécies do grupo Gentlei se encontram no México e em algumas áreas da América Central. O grupo Fragens está presente no México e Guatemala (Bergamo, 2003; Hunt, 1986). A tabela 1 apresenta as diferentes seções de *Callisia* e suas distribuições geográficas.

As espécies com os caracteres florais mais reduzidos estão nas seções *Leptocallisia* e *Callisia*, localizadas desde o México até a América do Sul. Por outro lado, os membros das seções *Cuthbertia* e *Brachyphylla*, que possuem caracteres florais não-reduzidos e adaptações aos habitats mais secos, encontram-se apenas no sul da América do Norte (Hunt, 1986).

2.2. Principais parâmetros citogenéticos utilizados na citotaxonomia

Dentro das análises citogenéticas, vários parâmetros podem ser analisados, como o número e a morfologia cromossômica (Acosta *et al.*, 2005). No entanto, estas características podem ser compartilhadas entre várias espécies. Ao longo dos anos foram desenvolvidas técnicas de coloração cromossômica que permitem um maior grau de diferenciação dos cariótipos (Moscone *et al.*, 1993). Entre estas, estão as técnicas de coloração da heterocromatina como o bandeamento C e coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Mais recentemente, as análises citomoleculares, principalmente através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), têm sido ferramentas valiosas nos estudos da evolução cromossômica e citotaxonomia (Costa *et al.*, 2006). Além disso, a análise combinada de filogenias moleculares e características cromossômicas tem permitido um melhor entendimento das mudanças cromossômicas em diferentes grupos (Murray, 2002).

2.2.1. Número e morfologia cromossômica

Os primeiros parâmetros citogenéticos empregados na análise taxonômica, e em estudos sobre evolução cromossômica, foram o número e a morfologia cromossômica. Esses parâmetros são ainda muito utilizados e permitem compreender a evolução cromossômica e a relação entre esta e a evolução de características morfológicas. Por exemplo, em Limnocharitaceae, o aumento do número cromossômico e da assimetria cariotípica foram acompanhadas por mudanças em caracteres reprodutivos, como o aumento no número de

carpelos (Forni-Martins e Calligaris, 2002). Por outro lado, a comparação da morfologia cromossômica em cariótipos com diferentes números cromossômicos do complexo *Brachyscome breviscapis* permitiu encontrar um conjunto de cromossomos homeólogos básicos, sugerindo uma origem anfiplóide para este complexo (Watanabe e Smith-White, 1987). No gênero *Rhynchospora*, que possui cromossomos holocêntricos, os números cromossômicos variaram entre $2n = 4$ e $2n = 50$ e os fenômenos que explicam esta variação são poliploidia e em menor grau a disploidia (Vanzela *et al.*, 2000). Em grupos de número cromossômico mais estável, como Loranthaceae e Viscaceae, que possuem cromossomos simétricos, foi sugerida estabilidade cariotípica por ortoseleção (De Andrade *et al.*, 2005). Em espécies de *Solanum* e *Lycianthes*, a simetria do cariótipo foi um parâmetro concordante com a classificação sistemática baseada em caracteres morfológicos (Acosta *et al.*, 2005).

2.2.2. Padrões de distribuição da heterocromatina

O desenvolvimento de técnicas de bandeamento cromossômico permitiu conhecer a distribuição da heterocromatina, o que facilitou a diferenciação cariotípica das espécies. Por exemplo, em *Capsicum*, a aplicação do bandeamento C contribuiu para o agrupamento taxonômico e permitiu propor tendências de evolução cariotípica como o aumento da proporção de heterocromatina (Moscone *et al.*, 1993). Esta técnica também permitiu propor relações filéticas entre espécies de *Allium* (D'Emerico e Pignone, 1998). Além disso, a partir de padrões de distribuição divergentes de bandas C de *Alstroemeria*, foi confirmada a separação das espécies chilenas e brasileiras (Buitendijk e Ramanna, 1996).

Mais recentemente, técnicas de coloração diferencial da heterocromatina, como o uso dos fluorocromos CMA e DAPI, foram empregadas para compreender, por exemplo, as relações e a origem de cultivares de varias espécies de tangerina (Cornélio *et al.*, 2003) ou para entender a filogenia do gênero *Passiflora* (De Melo *et al.*, 2001). Estes fluorocromos podem caracterizar melhor as bandas de heterocromatina pela diferente afinidade por bases nitrogenadas. A coloração CMA⁺ indica uma concentração maior de guanina e citosina, enquanto que as bandas DAPI⁺ indicam regiões ricas em adenina e timina (Guerra, 2000).

2.2.3. Análises citomoleculares

Com o desenvolvimento de técnicas de hibridização *in situ* de sondas de segmentos de DNA detectáveis com fluorocromos (FISH), foram disponibilizados novos marcadores citológicos, como os sítios de DNA ribossomal 5S e 45S. A combinação das técnicas de coloração da heterocromatina com a técnica de FISH possibilitou melhorar a caracterização

dos cromossomos em várias taxa, como o gênero *Echinodorus*, permitindo identificar mudanças cromossômicas ocorridas durante a evolução (Costa *et al.*, 2006). No gênero *Citrus*, o cariótipo de várias espécies de origem híbrida foi caracterizado pelo padrão de bandas CMA⁺ e a posição dos sítios de DNAr. Com base nestas análises foi discutido quais seriam as possíveis espécies parentais (Pedrosa *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2007).

Apesar dos enfoques citogenéticos terem ajudado a compreender as relações evolutivas entre diferentes espécies, geralmente é difícil estabelecer a direção da mudança do cariótipo. A análise combinada da taxonomia molecular e da citogenética tem permitido uma melhor análise evolutiva (Murray, 2002). Liu *et al.* (2003) e Cai *et al.* (2006) analisaram a localização dos sítios de DNAr em espécies do gênero *Pinus* e encontraram que as posições divergentes destes sítios nas diferentes espécies concordavam com suas relações filogenéticas. Em outros estudos, partindo da filogenia molecular tenta-se reconstruir a história das características cromossômicas, como variações nas regiões de heterocromatina e mudanças na posição dos sítios de DNAr. Ran *et al.* (2001), por exemplo, reconstruíram a filogenia do gênero *Clivia* utilizando seqüências de DNA espaçador dos DNAr 5S e 45S, e associaram à árvore filogenética a distribuição da heterocromatina e dos sítios de DNAr 5S e 45S. A partir desta análise conjunta indicaram as mudanças cromossômicas ocorridas durante a evolução desse gênero.

Na análise da origem de poliplóides são empregadas variações da técnica de FISH. Em Brassicaceae, a marcação de clones de DNA genômico foi utilizada para analisar os eventos antigos de poliploidização tendo em conta também a filogenia molecular. Nesse caso foram utilizadas sondas de DNA de uma região do cromossomo 4 de *Arabidopsis* em 21 espécies (Lysak *et al.*, 2006). Para estudar a origem dos aloploplóides, como em *Nicotiana*, foi aplicada uma modalidade de FISH conhecida como GISH (*Genomic in situ hybridization*), na qual se emprega como sonda o genoma total marcado, tentando estabelecer os possíveis parentais dessas espécies. Os resultados obtidos por GISH, podem ser confirmados com as árvores construídas a partir do seqüenciamento de regiões de DNA nuclear e plastidial, como ITS e *matK* (Chase *et al.*, 2003; Lim *et al.* 2004).

TABELA 1 *Números cromossômicos e distribuição geográfica de Callisia**

Seção e “grupo”	Espécies	2n	Distribuição geográfica
<i>Brachyphylla</i>	<i>C. navicularis</i> (Ortgies) D. R. Hunt	32, 48	Sul dos Estados Unidos, México
	<i>C. micrantha</i> (Torr.) D. R. Hunt	24, 26	Sul dos Estados Unidos, México
<i>Callisia</i> “Fragrans”	<i>C. fragrans</i> (Lindl.) Woodson	12, 24, 120	México
	<i>C. soconuscensis</i> Matuda	12	México
	<i>C. guerrerensis</i> Matuda		México e Guatemala
<i>Callisia</i> “Gentlei”	<i>C. gentlei</i> Matuda		Belize
	<i>C. gentlei</i> var. <i>macdougallii</i> (Miranda) D.R. Hunt		México
	<i>C. gentlei</i> var. <i>elegans</i> (Alexander ex H.E. Moore) D.R. Hunt	12	Guatemala, Honduras, México
	<i>C. tehuantepecana</i> Matuda	12	México
	<i>C. nizandensis</i> Matuda		México
<i>Callisia</i> “Repens”	<i>C. repens</i> (Jacq.) L.	12, 24	Sul-leste dos Estados Unidos, México, Caribe, América Central, América do Sul
	<i>C. insignis</i> C. B. Clarke	48	México
<i>Cuthbertia</i>	<i>C. graminea</i> (Small) G. Tucker	12, 24, 36	Sul-leste dos Estados Unidos
	<i>C. rosea</i> (Vent.) D. R. Hunt	24	Sul-leste dos Estados Unidos
	<i>C. ornata</i> (Small) G. Tucker		Sul-leste dos Estados Unidos
<i>Hadrodemas</i>	<i>C. warszewicziana</i> (Kunth & Bouché) D. R. Hunt	16	Guatemala
<i>Lauia</i>	<i>C. laui</i> (D. R. Hunt) D. R. Hunt		México
<i>Leptocallisia</i>	<i>C. monandra</i> (Sw.) Schultes f.	14	Sul dos Estados Unidos, Caribe, América do Sul
	<i>C. filiformis</i> (Martens & Galeotti) D. R. Hunt	14	México ao Brasil
	<i>C. cordifolia</i> (Sw.) Anderson & Woodson	14	Sul-leste dos Estados Unidos, México à Venezuela, Caribe, Peru.
	<i>C. gracilis</i> (Kunth) D. R. Hunt	56	Panamá ao Peru
	<i>C. multiflora</i> (Martens & Galeotti) Standl.	24,28,42	México à Nicarágua
	<i>C. ciliata</i> Kunth		Panamá, Colômbia, Brasil (Amazonas)
<i>Tripogandra</i>	<i>Tripogandra diuretica</i> (Mart.) Handlos	62+1B, 64	
	<i>Tripogandra glandulosa</i> (Seub.) Rohweder	16	
	<i>Tripogandra serrulata</i> (Vahl) Handlos	16, 32,48	

Os números cromossômicos foram compilados de: Giles, 1942; Jones e Colden, 1968; Handlos, 1970; Jones e Jopling, 1972; Moore, 1973; Moore, 1974; Federov, 1974; Guervin *et al.*, 1975; Moore, 1977; Pitrez *et al.*, 2001; Bergamo, 2003; Missouri Botanical Garden, 2006. A distribuição foi baseada em: Hunt 1986 e Bergamo, 2003.

2.3. Citogenética da família Commelinaceae com ênfase no gênero *Callisia*

Existem diversas análises citogenéticas na família Commelinaceae que documentam uma ampla variação cariotípica. Por isso, não é possível definir um complemento como típico ou representativo da família. Os números básicos variam de $x = 4$ a $x = 29$ e frequentemente tem sido observada poliploidia intraespecífica. O número cromossômico básico ancestral para a família Commelinaceae bem como para as tribos principais não está claro, devido à frequência de paleopoliploidia, neopoliploidia e à redução displóide do número básico, em alguns gêneros. Os maiores cromossomos foram encontrados em *Tradescantia virginiana* e os menores em *Stanfieldiella* e *Bufforestia*, com uma ampla gama de intermediários. Gêneros com até 15 espécies tendem a ter um único número básico como *Stanfieldiella* ($x = 11$), *Polyspatha* ($x = 14$) e *Buforrestia* ($x = 17$). Entretanto, gêneros maiores frequentemente têm múltiplos números básicos, por exemplo, $x = 9, 10, 13-16$ em *Aneilema*, e $x = 6, 9-11$ em *Murdannia*. A grande maioria dos cariótipos da família é assimétrica e apenas em alguns gêneros ocorrem cariótipos bimodais (Faden, 1998; Faden e Hunt, 1991; Jones e Jopling, 1972).

Em geral, os cromossomos da tribo Tradescantieae são de tamanho médio a grande, enquanto nas outras tribos, como em, Commelineae, são relativamente pequenos. Não existe correlação entre o tamanho cromossômico e o número básico. Em Commelineae, por exemplo, varia de $x = 6$ a $x = 29$, enquanto em Tradescantieae varia de $x = 4$ a $x = 20$ (Faden, 1998). Os cromossomos da subtribo Tradescantiinae, à qual pertence *Callisia*, têm sido alvo de uma grande quantidade de análises. A citogenética desta subtribo parece ser a mais interessante da família por apresentar nos gêneros *Tradescantia* (incluindo *Cymbispatha* e *Rhoeo*) e *Gibasis*, fenômenos de poliploidia, heterozigosidade para translocações, heterozigotos permanentes e complexos de Renner (Jones e Kenton, 1984; Kenton *et al.*, 1987; Golczyk *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrada uma redução displóide no número básico por translocações robertsonianas em *Gibasis* (Jones, 1974). Em algumas espécies de *Tradescantia*, durante a evolução cromossômica, aconteceram fusões Robertsonianas juntamente com poliploidia, produzindo variabilidade nos números cromossômicos, mas com número de braços cromossômicos constantes por conjunto haplóide (Jones e Kenton, 1984; Jones, 1990).

As primeiras análises citogenéticas no gênero *Callisia* mostraram que existem variações no tamanho, morfologia e números cromossômicos. Na classificação dos gêneros de Commelinaceae por tamanho cromossômico (Jones e Jopling, 1972), *Callisia* foi incluída na classe de cromossomos grandes, junto com *Tradescantia* e *Phyodina*, enquanto que *Aploleia* e *Hadrodemas* ficaram na classe de cromossomos medianos. Como algumas das espécies atuais

de *Callisia* estavam anteriormente nestes quatro últimos gêneros, estas ficaram distribuídas em duas classes (cromossomos grandes, medianos).

2.3.1 Citotaxonomia do gênero *Callisia*

As características citogenéticas dos representantes de *Callisia* divergem tanto entre si e quanto em relação a outras espécies da subtribo. Por isso, as mudanças taxonômicas que foram sustentadas por dados citogenéticos e envolveram espécies de *Callisia*, foram sempre segregações. Os representantes da seção *Cuthbertia* de *Callisia* foram segregados formando o gênero *Cuthbertia* por estudos de perfis de pigmentos (Matthews, 1966), por trabalhos anatômicos (Tomlinson, 1966) e pelo cariótipo assimétrico encontrado por Giles (1942), que contrastava com o cariótipo simétrico típico de *Tradescantia*, onde se encontravam anteriormente. Igualmente, Jones e Jopling (1972), Jones e Colden (1968) e Woodson (1942) encontraram que *Callisia micrantha*, *C. cordifolia* e outras que estavam em *Tradescantia*, não tinham o cariótipo simétrico característico desse gênero e sugeriram sua segregação em outro gênero.

Os citologistas da subtribo Tradescantiinae não encontraram nenhuma característica que unificasse a citologia das espécies atuais de *Callisia* analisadas. Por exemplo, Jones e Jopling (1972), a partir das diferenças nos números básicos encontradas entre *Callisia navicularis* ($2n = 32$, seção *Brachyphylla*) e *C. gracilis* ($2n = 56$, seção *Leptocallisia*), que formavam o gênero *Phyodina*, concluíram que este era um agrupamento de espécies heterogêneas e não seria um grupo natural. Tampouco encontraram semelhanças entre *C. micrantha* ($2n = 24$, seção *Brachyphylla*), apenas com cromossomos telocêntricos, *C. monandra* ($2n = 14$, seção *Leptocallisia*), com a maioria dos cromossomos metacêntricos, e *C. gentlei* var. *elegans* ($2n = 12$, seção *Callisia*), com dez cromossomos subtelocêntricos e dois submetacêntricos. Estes autores afirmaram também que o cariótipo de *C. warszewicziana* (seção *Hadrodemas*), com $2n = 16$, 12 cromossomos acrocêntricos e quatro submetacêntricos, era muito diferente das outras espécies de *Callisia*. Jones e Kenton (1984) não encontraram relações entre os cariótipos de *C. graminea* (seção *Cuthbertia*), *C. micrantha* (seção *Brachyphylla*) e *C. navicularis* (seção *Brachyphylla*) e concluíram que a única possível característica em comum seria que fossem remanescentes de uma flora tropical antiga.

Os taxonomistas acharam úteis as divergências citogenéticas das espécies de *Callisia* para a diferenciação das seções e grupos de *Callisia* (Hunt, 1986; Faden e Hunt, 1991). Eles propuseram $x = 6$, 7 e 8 como números básicos para as seções *Callisia*, *Leptocallisia* e *Hadrodemas*, respectivamente. Além disso, na seção *Callisia* o estabelecimento de grupos

levou em conta as diferenças em número de cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos. Espécies do grupo *Gentlei* possuem dois submetacêntricos (SM) e dez acrocêntricos (A), do grupo *Fragrans* possuem seis SM e seis A, e do grupo *Repens* possuem quatro SM e oito A.

Pitrez (1998) sugeriu que as seções *Callisia* e *Leptocallisia* eram cariotipicamente muito divergentes para serem incluídas em um mesmo gênero. Isto foi concluído pela análise de células profásicas de *Callisia repens* ($2n=12$; seção *Callisia*), *Callisia monandra* e *Callisia filiformis* ($2n=14$; seção *Leptocallisia*). O padrão de condensação observado em cromossomos profásicos permitiu diferenciar as espécies da seção *Callisia*, com condensação uniforme ao longo dos cromossomos, das espécies de *Leptocallisia*, com contraste entre regiões proximais e terminais. Além disso, os núcleos na seção *Leptocallisia* foram do tipo semi-reticulado enquanto os da seção *Callisia* foram reticulados (Pitrez *et al.*, 2001).

2.3.2. Análises da heterocromatina em *Callisia*

As análises da heterocromatina em *Callisia* são escassas. Pitrez (1998) fez uma análise da heterocromatina com fluorocromos, encontrando bandas CMA⁺ apenas nas regiões teloméricas dos braços curtos de um ou dois pares cromossômicos em *Callisia repens*, *C. filiformis* e *C. monandra*. Em *C. repens* foram encontrados dois citótipos, com um ou dois pares cromossômicos com bandas CMA⁺. Recentemente, Roa e Guerra (2006) encontraram em *C. filiformis* três pares cromossômicos apresentando bandas CMA⁺ em contraste com o único par cromossômico com bandas observado por Pitrez (1998). Jones e Kenton (1984) estudaram a heterocromatina de uma espécie não identificada de *Callisia* por bandeamento C e encontraram um padrão de coloração centromérico.

2.3.3. Análises meióticas em *Callisia*

Análises meióticas foram realizadas em apenas dos representantes do gênero. Em *C. micrantha* foi observada a formação de tetravalentes e foi concluído que se tratava de um autopoliplóide com $2n = 24$ (Jones e Colden, 1968). Esta espécie possui apenas cromossomos telocêntricos, uma característica cariotípica pouco comum. Nesta espécie há alta incidência de gametas aneuplóides (44%), o que explicaria as contagens de $n = 13$ e a geração de indivíduos com $2n = 26$. Isto pode estar associado ao grande vigor vegetativo e também ao baixo nível de seleção para fertilidade sexual (Jones e Colden, 1968). Por outro lado, em *Callisia repens* ($2n = 12$) foi verificada a ocorrência de uma meiose típica, com seis bivalentes (Sax, 1932).

2.3.4. Evolução cromossômica do gênero *Callisia*

As espécies atualmente incluídas no gênero *Callisia* possuem cariótipos assimétricos com cromossomos medianos a grandes, que vão de 4 a 12µm aproximadamente, e números cromossômicos que variam entre $2n = 12$ e $2n = 56$ (Jones e Jopling, 1972; Hunt, 1986; Pitrez, 1998). A Tabela 1 apresenta os números cromossômicos conhecidos para o gênero.

Características cromossômicas como tamanho, volume cromossômico e quantidade de DNA, permitiram fazer inferências sobre a evolução cariotípica de *Callisia*. Guervin *et al.* (1975) observaram uma série poliplóide com $2n = 12$, $2n = 24$; $2n = 48$ em *C. repens*, *C. multiflora* e *C. insignis*, respectivamente. O aumento no número cromossômico correspondeu a uma redução no volume cromossômico, o que foi relacionado com um fenômeno de compensação associado à poliploidia. No entanto, a relação entre *C. repens* (seção *Callisia*) e *C. multiflora* (seção *Leptocallisia*) por poliploidia não seria uma hipótese parcimoniosa à luz dos resultados da análise filogenética de Bergamo (2003), já que estas espécies aparecem em diferentes clados. Bergamo (2003), analisando espécies dos gêneros *Callisia* e *Tripogandra*, sugeriu um número básico ancestral $x = 8$, atualmente conservado em *C. warszewicziana* (seção *Hadrodemas*) e no gênero *Tripogandra*. Os clados da seção *Callisia* ($x = 6$) e outro que agrupou a maioria de espécies de *Leptocallisia* ($x = 7$) teriam sofrido reduções displóides independentes. Outra redução displóide teria acontecido em *Callisia gracilis* ($x = 7$), da seção *Leptocallisia*, que apareceu no clado de *Tripogandra* mostrando que o gênero é polifilético. Dessa forma, a perda cromossômica seria mais comum que o ganho no gênero (Bergamo, 2003).

A análise filogenética de Burns (2006) por sequenciamento das regiões não codificantes *trnL-F* e 5S NTS, confirmou a origem polifilética do gênero *Callisia* e sugeriu uma maior proximidade filogenética das seções *Leptocallisia* e *Callisia* com os gêneros *Tripogandra* e *Gibasis* que com as seções *Cuthbertia* (*C. graminea*) e *Brachyphylla* (*C. navicularis*). No entanto, não existem semelhanças cariotípicas claras entre os taxa mais próximos filogeneticamente. O gênero *Gibasis*, por exemplo, apresenta cariótipos simétricos ou bimodais com $x = 4$, $x = 5$ ou $x = 6$ (Jones, 1974; Jones *et al.*, 1975; Jones *et al.*, 1981); a seção *Callisia* ($x = 6$) apresenta cariótipos bimodais, mas com menor número de metacêntricos que o gênero *Gibasis* (Hunt, 1986) e a seção *Leptocallisia* apresenta número básico $x = 7$, sendo um dos seus cariótipos simétrico e os demais assimétricos (Jones e Jopling, 1972; Pitrez *et al.*, 2001).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta MC, Bernardello G, Guerra M, Moscone EA. 2005. Karyotype analysis in several South American species of *Solanum* and *Lycianthes rantonnei* (Solanaceae). *Taxon* 54: 713-723.
- Barreto RC. 1997. Levantamento das espécies de Commelinaceae R. Br. nativas do Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Bergamo S. 2003. A phylogenetic evaluation of *Callisia* Loeft. (Commelinaceae) based on molecular data. PhD Thesis, University of Georgia, USA.
- Burns JH. 2006. A comparison of invasive and noninvasive Commelinaceae in a phylogenetic context. PhD Thesis. The Florida State University College of Arts and Sciences. USA
- Buitendijk, J. Ramanna M. 1996. Giemsa C-banded karyotypes of eight species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. *Annals of Botany* 78: 449 - 457.
- Cai Q, Zhang D, Liu ZL, Wang XR. 2006. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobilus* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Annals of Botany* 97 :715-22.
- Carvalho R, Soares Filho WS, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M. 2005. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenetics and Genome Research* 109. 1-3.
- Chase MW, Knapp S, Cox AV, Clarkson JJ, Butsko Y, Joseph J, Savolainen V, Parokonny AS. 2003. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany* 92: 107-127.
- Cornélio MTMN, Figueirôa ARS, Santos KGB, Carvalho R, Soares Filho WS, Guerra M. 2003. Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Systematics and Evolution* 240: 149-61
- Costa JY, Forni-Martins ER, Vanzela ALL. 2006. Karyotype characterization of five Brazilian species of *Echinodorus* (Alismataceae) with chromosomal banding and 45S rDNA FISH. *Plant Systematics and Evolution* 257: 119-127
- D'Emérico S, Pignone D. 1998. Chromosome banding in three south Italian species of *Allium* section *Allium* (Alliaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* 45: 33-40.
- De Andrade MJG, Giulietti AM, Guerra M. 2005. Mitotic karyotype stability and meiotic irregularities in the families Loranthaceae Juss. and Viscaceae Miq. *Caryologia* 58: 70-77.
- De Melo NF, Cervi AC, Guerra M. 2001. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution* 226: 69-84.
- Evans TM, Faden RB, Simpson MG, Sytsma KJ. 2000. Phylogenetic relationships in the Commelinaceae: I. A cladistic analysis of morphological data. *Systematic Botany* 25: 668-

691.

Evans TM, Sytsma KJ, Faden RB, Givnish TJ. 2003. Phylogenetic relationships in the Commelinaceae: II. A cladistic analysis of rbcL sequences and morphology. *Systematic Botany* 28: 270-292.

Faden RB, Hunt DR. 1991. The Classification of the Commelinaceae. *Taxon* 40: 19-31.

Faden RB, 1998. Commelinaceae. In: Kubitzki K, ed. *The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. 4. Berlin: Springer-Verlag, 109-128.

Federov AMA. 1974. Chromosome number of flowering plants. Leningrado: Komarov Botanical Institute. 926 pp.

Forni-Martins ER, Calligaris KP. 2002. Chromosomal studies on Neotropical Limnocharitaceae (Alismatales). *Aquatic Botany* 74: 33-41.

Giles NH. 1942. Autopolyploidy and geographical distribution in *Cuthbertia graminea* Small. *American Journal of Botany* 29: 637—645.

Golczyk H, Hasterok R, Joachimiak AJ. 2005. FISH-aimed karyotyping and characterization of Renner complexes in permanent heterozygote *Rhoeo spathacea* Genome 48: 145–153.

Guervin C, Le Coq C, LaRoche J. 1975. Etude de la garniture chromosomique et des quantites d'ADN nucleaire: application a l'evolution du genre *Callisia* (Commelinacees) *Caryologia* 28: 45-56.

Guerra M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4, 1029-1041.

Handlos WL. 1970. Cytological investigations of some Commelinaceae from Mexico. *Baileya* 17: 6-33

Hunt DR. 1986. Amplification of *Callisia* Loebl. *American Commelinaceae: XV*. *Kew Bulletin* 41: 407-412.

Jones K, Colden C. 1968. The Telocentric complement of *Tradescantia micrantha*. *Chromosoma (Berl.)* 24: 135-157.

Jones K, Jopling C. 1972. Chromosomes and the classification of the Commelinaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 65: 129-162.

Jones K. 1974. Chromosome evolution by Robertsonian translocation in *Gibasis* (Commelinaceae). *Chromosoma (Berl.)* 45: 353-368.

Jones K, Papes D, Hunt DR. 1975. Chromosomes and the classification of the Commelinaceae. II. Further observations on *Gibasis geniculata* and its allies. *Botanical Journal of the Linnean Society* 62: 145-167

Jones K, Bhattarai S, Hunt DR. 1981. Contributions to the cytotaxonomy of the

Commelinaceae. *Gibasis linearis* and its allies. Botanical Journal of the Linnean Society. 83: 141-156.

Jones K, Kenton A. 1984. Mechanisms of chromosome change in the Evolution of the tribe Tradescantieae (Commelinaceae). In: Sharma A e Sharma AK, eds. Chromosomes in evolution of eukaryotic groups II. Boca Raton: CRC Press, 143-168.

Jones K. 1990. Robertsonian change in allies of *Zebrina* (Commelinaceae). Plant Systematics and Evolution 172:263-271.

Kenton A, Davies A, Jones K. 1987. Identification of Renner complexes and duplications in permanent hybrids of *Gibasis pulchella* (Commelinaceae) Chromosoma (Berl) 95:424-434.

Lim KY, Matyasek R; Kovarik A; Leitch AR. 2004. Genome evolution in allotetraploid *Nicotiana*. Biological Journal of the Linnean Society 82: 599-606.

Lysak MA, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K, Schubert I. 2006. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. Proceedings of the National Academy of Sciences 103: 5224-5229

Liu ZL, Zhang D, Hong DY, Wang XR. 2003. Chromosomal localization of 5S and 18S-5.8S-25S ribosomal DNA sites in five Asian pines using fluorescence in situ hybridization. Theoretical and Applied Genetics 106: 198-204

Matthews JF. 1966. A paper chromatographic study of the North American and South American species of the genus *Tradescantia*. Botanical Gazette 127: 74-78.

Missouri Botanical Garden, 2006. Index to Plant Chromosome Numbers.
Disponível em: <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>. Acessado em: 30/04/2006

Moore RJ. 1973. Index to plant chromosome numbers 1967-1971. Regnum Vegetabile 90: 1-539.

Moore RJ. 1974. Index to plant chromosome numbers for 1972. Regnum Vegetabile 91: 1-108.

Moore RJ. 1977. Index to plant chromosome numbers for 1973-1974. Regnum Vegetabile 96: 1-257

Moraes AP, Soares Filho WS, Guerra M. 2007. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. Chromosome Research 15: 115-121.

Moscone EA, Lambrou M, Hunziker AT, Ehrendorfer F. 1993. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). Plant Systematics and Evolution 186: 213-229.

Murray BG. 2002. Trees, maps and FISH: The application of genome based technologies to the analysis of chromosome evolution. Current Genomics 3:539-550.

Pedrosa A, Schweizer D, Guerra M. 2000. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Theoretical and Applied Genetics 100: 361-367.

- Pitrez SR, Felix LP, Barreto R, Guerra M. 2001. Números cromossômicos de espécies de commelinaceae R. Br. ocorrentes no nordeste do Brasil. Boletim de Botânica, Universidade de São Paulo 19: 7-14.
- Pitrez SR. 1998. Citogenética de representantes da família Commelinaceae do nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
- Ran Y, Hammett KRW, Murray BG. 2001. Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia* (Amaryllidaceae). Annals of Botany 87: 823-830.
- Roa F, Guerra M. 2006. Padrões cromossômicos contrastantes entre três espécies do Gênero *Callisia*. Resumos do 52º Congresso Nacional de Genética, Foz de Iguaçu. 3 a 6 de setembro. p.1107.
- Sax K. 1932. The cytological mechanism of crossing over. Journal of the Arnold Arboretum. 13:180-213.
- Tomlinson BP. 1966. Anatomical data in the classification of Commelinaceae. Journal of the Linnean Society of London 59: 371-395.
- Tucker GC. 1989. The Genera of Commelinaceae in the Southeastern United States. Journal of the Arnold Arboretum 70: 97-130.
- Vanzela ALL, Luceño M, Guerra M. 2000. Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 134: 557-566.
- Wade DJ, Evans TM, Faden RB. 2006. Subtribal relationships in tribe Tradescantieae (Comelinaceae) based on molecular and morphological data. Aliso 22: 520–526
- Watanabe K, Smith-White S. 1987. Phyletic and evolutionary relationships of *Brachyscome lineariloba* (Compositae). Plant Systematics and Evolution 157: 121-141.
- Woodson RE Jr. 1942. Commentary on the North American genera of the Commelinaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden 29: 141-154.

4. OBJETIVOS

4.1 Identificar os mecanismos de evolução cromossômica que poderiam explicar as diferenças interespecíficas no número cromossômico, morfologia cromossômica, distribuição da heterocromatina e posição e número de sítios de DNAr 5S e 45S em *Callisia*.

4.2 Comparar os dados cromossômicos com os dados moleculares do grupo para tentar uma explicação parcimoniosa da evolução cromossômica do gênero.

5. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *ANNALS OF BOTANY*.

TÍTULO COMPLETO: **Evolução cromossômica em espécies do gênero *Callisia* Loeft. (Commelinaceae)**

FERNANDO ROA

MARCELO GUERRA*

Laboratório de Citogenética Vegetal, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

TÍTULO ABREVIADO: Evolução cromossômica de *Callisia*
msfguerra@hotmail.com

RESUMO

CONTEXTO E OBJETIVOS: O gênero *Callisia* apresenta grande diversidade de número e morfologia cromossômica entre e dentro de suas seções. Além disso, análises filogenéticas sugerem que o gênero não é monofilético e algumas de suas espécies estariam mais relacionadas a *Tripogandra*. Com o intuito de investigar a evolução cariotípica do gênero e entender as relações com *Tripogandra* foram analisadas a morfologia cromossômica, a estrutura do núcleo interfásico, o padrão de condensação profásica e a distribuição da heterocromatina em oito espécies de três seções do gênero *Callisia* e em três espécies de *Tripogandra*.

MÉTODOS: A estrutura dos núcleos interfásicos e a condensação profásica foi analisada em células coradas com Giemsa. A morfologia cromossômica foi definida a partir de metáfases coradas com DAPI, enquanto a heterocromatina foi localizada por bandeamento C e pela coloração com os fluorocromos CMA e DAPI. Os sítios de DNAr 5S e 45S foram revelados com a técnica de FISH.

RESULTADOS CHAVE: Os resultados confirmaram que as espécies de *Callisia* têm uma diversidade cariotípica excepcionalmente alta. Dentro da seção *Callisia* o número cromossômico, a estrutura do núcleo interfásico e o padrão de condensação profásica foram conservados, sugerindo que se trata de um agrupamento natural. Porém, nessa seção e na seção *Leptocallisia*, a morfologia cromossômica e a distribuição das bandas C, e DAPI⁺ variaram extensamente. Apesar disso, a posição terminal dos sítios de DNAr 45S e intersticial dos sítios de DNAr 5S foi em geral conservada. No gênero *Tripogandra*, também houve variação na distribuição da heterocromatina e na estrutura dos núcleos interfásicos.

CONCLUSÕES: A presente análise citogenética, utilizando padrões de bandas heterocromáticas e hibridização *in situ* de sondas de DNAr, mostrou que as diferenças citológicas não se limitam à morfologia cromossômica, senão que incluem mudanças na distribuição e composição da heterocromatina. Os cariótipos dos gêneros *Callisia* e *Tripogandra* são muito diferentes, impossibilitando estabelecer relações evolutivas. A explicação mais provável para a elevada diversificação cariotípica de *Callisia* é a ocorrência de múltiplos rearranjos e amplificação de seqüências repetitivas de DNA, acompanhados de eventos independentes de disploidia.

Palavras chave: *Callisia*, evolução cromossômica, FISH, heterocromatina.

INTRODUÇÃO

O gênero *Callisia* (Commelinaceae) é composto por aproximadamente 20 espécies com centro de diversidade ao norte da América Central e no México. A proposta taxonômica de Hunt (1986) para *Callisia*, baseada em caracteres morfológicos e números cromossômicos, estabeleceu seis seções no gênero: *Leptocallisia* ($x = 7$), com número reduzido de ovários, lóculos e estames, com ampla distribuição no México, América Central e América do Sul; *Callisia* ($x = 6$), com corola reduzida, conectivo da antera expandido e tendência a anemofilia por seus estames projectados para fora, com distribuição restrita, principalmente no México. As outras seções (*Brachyphylla*, *Cuthbertia*, *Hadrodemas* e *Lauia*) apresentam flores actinomorfas de seis estames e uma distribuição restrita a algumas regiões da América do Norte (Hunt, 1986; Faden, 1998).

As análises filogenéticas têm proposto relações evolutivas entre as seções e com os gêneros próximos (Bergamo, 2003; Burns, 2006). A análise molecular baseada no sequenciamento da região variável do gene *ndhF* e da região intergênica *trnL-F*, realizada por Bergamo (2003), sugeriu uma origem monofilética para a maioria das seções estabelecidas por Hunt (1986). No entanto, uma das espécies da seção *Leptocallisia* foi agrupada num clado com espécies do gênero *Tripogandra*, sugerindo que o gênero seria polifilético. De forma similar, a análise filogenética de Burns (2006) por sequenciamento das regiões não codificantes *trnL-F* e 5S NTS confirmou a origem polifilética do gênero e sugeriu uma maior proximidade filogenética das seções *Leptocallisia* e *Callisia* com os gêneros *Tripogandra* e *Gibasis*.

A análise filogenética de Bergamo (2003) sugere que a redução displóide seria o mecanismo responsável pela origem dos números básicos de várias espécies de *Callisia* a partir de um número ancestral $x = 8$, que estaria conservado na seção *Hadrodemas* e no gênero *Tripogandra*. Entretanto, essa hipótese não trata das grandes diferenças na morfologia cromossômica presentes dentro das seções. Por exemplo, na seção *Leptocallisia* foi observado um cariótipo com predomínio de acrocêntricos (A) em *C. filiformis*, enquanto que *C. monandra* apresentou predomínio de metacêntricos (M) e submetacêntricos (SM) (Jones e Jopling, 1972; Pitrez et al., 2001). De forma similar, na seção *Brachyphylla* foi observado um cariótipo de cromossomos telocêntricos (T) em *C. micrantha* ($2n = 24$), sendo que *Callisia navicularis* com $2n = 32$ apresentou apenas acrocêntricos (Jones e Jopling, 1972; Jones e Kenton, 1984).

O desconhecimento da origem de tal variação cromossômica pode ser devido ao fato de que as análises citogenéticas publicadas tratam apenas do número e morfologia

cromossômica (Jones e Jopling, 1972; Guervin e LeCoq, 1965). A análise de outros parâmetros cariológicos, como o padrão de bandas C, a coloração CMA/DAPI, a estrutura dos núcleos interfásicos e a distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S podem fornecer uma melhor visão da diversificação cariotípica e da similaridade citogenética entre espécies de um gênero e são uma ferramenta valiosa para entender as mudanças cromossômicas ocorridas durante a evolução (ver, por exemplo, Kenton, 1991; Lee *et al.* 2005; Moraes *et al.*, 2007; Zhang e Xia, 2007).

Neste trabalho foi realizada uma análise da heterocromatina e da posição dos sítios de DNA ribossomal 5S e 45S em oito espécies do gênero *Callisia* visando compreender sua evolução cariotípica. Adicionalmente, foram investigadas três espécies de *Tripogandra* para avaliar a relação entre os dois gêneros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudados 17 acessos de oito espécies do gênero *Callisia*, das seções *Leptocallisia*, *Callisia* e *Hadrodemas*, e três espécies do gênero *Tripogandra*. As exsiccatas foram depositadas no herbário UFP, da Universidade Federal de Pernambuco. A Tabela 1 apresenta a lista das espécies analisadas com os respectivos números de *voucher* e procedência.

Preparação das lâminas

Pontas de raízes foram coletadas, pré-tratadas com 8 hidroxiquinoleína (8HQ) 0,002M ou colchicina 0,2% por 20 horas a 10 °C, fixadas em etanol: ácido acético 3:1 (v/v) por um período de 5 a 24 horas à temperatura ambiente e estocadas a -20 °C no próprio fixador. As raízes foram lavadas em água destilada, digeridas em uma gota de solução enzimática contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma), e esmagadas em ácido acético 45%. Posteriormente, a lamínula foi retirada após resfriamento em nitrogênio líquido.

Bandeamento C e coloração CMA/DAPI

O procedimento para bandejamento C foi baseado em Schwarzacher *et al.* (1980). As lâminas foram envelhecidas por dois dias, hidrolisadas em ácido acético 45%, a 60 °C por 10 min, tratadas em uma solução de hidróxido de bário 5% à temperatura ambiente por 10 min, lavadas em ácido acético 45% e depois em água corrente por 2 min, secadas e

incubadas em 2X SSC a 60°C por 80 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, secadas e coradas com Giemsa a 2% por 10-20 min ou com DAPI (1 µg/µl).

Para a coloração CMA/DAPI foi seguida a metodologia descrita por Guerra (1993). As lâminas foram envelhecidas por três dias, coradas com 10 µl de CMA (0,5 mg/ml) por 1 h e lavadas com água destilada. Em seguida, foram coradas com 10 µl de DAPI (1 µg/ml) por 30 min, lavadas e montadas em tampão McIlvaine-glicerol (1:1, v/v) contendo 2,5 mM de cloreto de magnésio. As imagens foram capturadas com câmera de vídeo COHU CCD, acoplada a um microscópio de fluorescência Leica DMLB e analisadas com o software QFISH de Leica.

Hibridização *in situ* fluorescente

As melhores lâminas coradas com os fluorocromos CMA e DAPI foram descoradas em etanol: ácido acético 3:1 (v/v) e submetidas ao processo de FISH de acordo com Moscone *et al.* (1996), com modificações. A sonda de DNAr 5S foi obtida de *Lotus japonicus* (Pedrosa *et al.*, 2002) e a de DNAr 45S de *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck *et al.*, 1997), ambas gentilmente cedidas pela professora Andrea Pedrosa-Harand (Universidade Federal de Pernambuco). As sondas de DNAr 5S e 45S foram marcadas com Cy3-dUTP e com digoxigenina 16-dUTP, respectivamente por *nick translation*. A mistura de hibridização foi composta por 60% (v/v) de formamida, 5% (p/v) de dextran sulfato em 2X SSC, além do DNA marcado na concentração final de 5 ng/µl. A mistura de hibridização e as preparações citológicas foram desnaturadas a 70°C por 10 min e hibridizadas por 18-20 horas a 37°C em câmara úmida. A sonda de DNAr 45S foi detectada com anticorpo primário anti-digoxigenina produzido em ovelha conjugado com FITC (Roche) e o sinal amplificado com anticorpo secundário contra anti-digoxigenina de ovelha produzido em coelho conjugado com FITC (Dako). As lâminas foram montadas em Vectashild contendo DAPI (2 µg/ml), e as melhores células capturadas como descrito anteriormente.

Análise cariotípica

A nomenclatura usada para a descrição da morfologia cromossômica foi a de Guerra (1986). Os cromossomos foram medidos nas imagens de metáfases completas com menor sobreposição de cromossomos e melhor definição de bandas e sinais. Os idiogramas foram

desenhados de acordo com as médias de quatro células para cada par cromossômico, e ordenados por tamanho cromossômico, do maior para o menor.

RESULTADOS

Seção Leptocallisia

Apesar do número básico constante $x = 7$, as espécies da seção *Leptocallisia* apresentaram variações na morfologia cromossômica, padrão de condensação profásica e estrutura do núcleo interfásico. *Callisia filiformis* e *C. monandra* apresentaram núcleos de tipo semi-reticulado e cromossomos profásicos com as regiões terminais mais fracamente coradas que as proximais (dados não mostrados). *Callisia multiflora* e *C. cordifolia* apresentaram núcleo de tipo reticulado e as regiões terminais dos cromossomos profásicos uniformes (Figura 1A e 1B).

Em *C. filiformis* foram observadas bandas C pericentroméricas no braço longo de todos os 14 cromossomos acrocêntricos (14A), mas apenas em quatro pares essas bandas C foram também positivas com DAPI⁺ (Fig. 2A). Adicionalmente, esta espécie apresentou blocos CMA⁺ em três pares de cromossomos acrocêntricos (Fig. 2B), um deles colocalizado com o sítio de DNAr 45s (Fig. 2C). *Callisia monandra* ($2n = 14$; 6M + 6SM + 2A) apresentou bandas C na região centromérica de todos os cromossomos e no satélite de um cromossomo metacêntrico. A coloração com CMA também revelou estas regiões como CMA⁺ (Fig. 2D), sendo que o par de satélites, que também foi CMA⁺, co-localizou com o sítio de DNAr 45S (Fig. 2E). Em *C. cordifolia* ($2n = 14$; 2SM + 12A), bandas DAPI⁺ intersticiais foram localizadas no braço longo de dois pares cromossômicos acrocêntricos (Fig. 2F). Nesta espécie e em *C. multiflora* ($2n = 28$; 12SM + 16A) foi observado apenas um sítio terminal de DNAr 45S, que colocalizou com uma banda CMA⁺ no braço curto de um par de acrocêntricos (compare as Figs. 2F, G e 2H, I). Nesta seção os sítios de DNAr 5S foram localizados em posição intersticial em um par acrocêntrico (Figs. 2C, 2G, 2I) exceto em *C. monandra*, onde foram observados em um par de metacêntricos (Fig. 2E). A Tabela 1 resume algumas características citogenéticas estudadas.

Seção Hadrodemas

Em *C. warszewicziana*, a estrutura do núcleo interfásico foi do tipo reticulada, com condensação uniforme nos cromossomos profásicos (Figura 1C). O número cromossômico observado foi $2n = 16$ (2M + 10SM + 4A). Nesta espécie foi observada uma banda C na região terminal do braço curto do maior par cromossômico, que correspondeu a uma banda CMA⁺

(Fig. 2J) e ao sítio de DNAr 45S (Fig. 2K). O sítio de DNAr 5S foi observado em posição intersticial no maior acrocêntrico.

Seção *Callisia*

Nesta seção não houve divergência no tipo de núcleo interfásico e padrão de condensação profásico. As três espécies analisadas apresentaram núcleo interfásico do tipo reticulado e o padrão de condensação profásico foi uniforme (Fig. 1D, E, F).

Callisia repens ($2n = 12$; 4SM + 8A) apresentou bandas C centroméricas em todos os cromossomos, bandas proximais nos braços curtos de dois pares de acrocêntricos e dois pares de submetacêntricos, e uma banda terminal no braço curto de um par submetacêntrico. A Fig. 3A mostra uma metáfase tratada com a técnica de bandas C e corada com DAPI. As bandas proximais dos submetacêntricos corresponderam a regiões DAPI⁺ e as bandas proximais dos dois pares de acrocêntricos a regiões CMA⁺ (Fig. 3B). Estas últimas colocaram com os sítios de DNAr 45S (Fig. 3C). As bandas CMA⁺ foram polimórficas, havendo em algumas populações dois pares cromossômicos com bandas (Areia, Triunfo e Cult. em Recife; Fig. 3B) e em outras apenas um par (Brasília; Foz de Iguaçu; Posadas; Cult. em Recife; Fig. 3D). Em *C. repens* foi analisado um citótipo com $2n = 24$, mas todas as características da morfologia cromossômica do diplóide foram duplicadas no tetraplóide, sugerindo que se trate de um autotetraplóide. Esta amostra apresentou dois pares de bandas CMA⁺ correspondentes aos satélites e uma banda DAPI⁺ extra na região terminal do braço longo de um dos pares acrocêntricos (Fig. 3E).

Em *C. fragrans* ($2n = 12$; 6SM + 6A) foram observados dois pares com bandas C terminais, uma no braço curto de um dos acrocêntricos e outra no braço longo de outro acrocêntrico. Estas corresponderam às regiões CMA⁺ (Fig. 3F), que colocaram com o DNAr 45S (Fig. 3G). Por outro lado, *Callisia gentlei* var. *elegans* ($2n = 12$; 2SM + 10A) apresentou duas bandas CMA⁺, nas duas extremidades do maior par acrocêntrico, que colocaram com o DNAr 45S (Fig. 3H, 3I).

Nesta seção, os sítios de DNAr 5S foram sempre localizados em posição intersticial no braço longo de um par acrocêntrico, exceto em *C. repens*. Apenas em *C. fragrans*, os sítios de DNAr 5S e 45S foram localizados no mesmo cromossomo em braços opostos (Fig. 3G). Em algumas metáfases de *C. repens* e *C. fragrans* foi observada uma banda CMA⁺ muito pequena, aparentemente colocando com o sítio de DNAr 5S (ver inserto em 3B, 3C). A figura 5 apresenta um idiograma de todas as espécies de *Callisia*.

Gênero *Tripogandra*

Cada espécie analisada do gênero *Tripogandra* apresentou um tipo de núcleo interfásico diferente. Foi observado núcleo do tipo semi-reticulado em *T. diuretica* (Fig. 1G), reticulado em *T. glandulosa* (Fig. 1H), e um padrão intermediário em *T. serrulata* (Fig. 1I). Nos cromossomos profásicos foram observadas regiões terminais menos coradas apenas em *T. diuretica*.

A análise com bandejamento C revelou bandas C pericentroméricas em *T. glandulosa* ($2n = 16$; $2M + 6SM + 8A$) e em *T. diuretica* ($2n = 64$; $6M + 20SM + 38A$). Nesta última, as bandas C corresponderam a bandas $DAPI^+$ (Fig. 4A). Além disso, essas duas espécies apresentaram quatro pares cromossômicos acrocêntricos ou submetacêntricos com bandas CMA^+ terminais (Fig. 4A). Por outro lado, *T. serrulata* ($2n = 48$; $8M + 12SM + 28A$) apresentou apenas dois pares acrocêntricos com blocos CMA^+ no braço curto em posição terminal e uma banda intersticial no braço longo de um acrocêntrico (Fig. 4B). Sítios de DNAr 45S foram analisados apenas em *T. glandulosa* (Fig 4C), localizados nos braços curtos de quatro pares de acrocêntricos, nas mesmas posições que as bandas CMA^+ . A figura 6 apresenta um idiograma que sintetiza esses dados.

DISCUSSÃO

De uma maneira geral, as espécies do gênero *Callisia* divergem amplamente em vários parâmetros cariotípicos. O número cromossômico variou entre as espécies investigadas, mas foi praticamente constante dentro das seções, com poucos casos de poliploidia. A análise de diversos outros parâmetros, como a distribuição da heterocromatina, sugere que mesmo dentro de cada seção a variação cariotípica é muito alta.

Na seção *Callisia*, as três espécies estudadas compartilham o mesmo número cromossômico ($2n = 12$) e um cariótipo bimodal, o qual difere entre as espécies no número de cromossomos submetacêntricos. Hunt (1986) levou em conta essa diferença quando descreveu os três grupos dentro da seção *Callisia* (*Fragrans*, *Gentlei* e *Repens*), cada um deles com um representante neste estudo. As diferenças observadas entre as três espécies investigadas aqui sugerem que as variações estruturais entre elas ocorrem tanto na morfologia cromossômica quanto no tipo e quantidade de seqüências repetitivas. Mudanças similares foram observadas noutros gêneros como, por exemplo, na seção *Alatae* de *Nicotiana* (Lim *et al.*, 2006), onde as espécies apresentaram diferentes padrões de distribuição de seqüências repetidas em tandem. Além disso, diferenças na presença de heterocromatina centromérica têm sido observadas em vários outros gêneros, como em *Clivia* e *Lathyrus* (Murray, 2002), sugerindo que este tipo de

variação pode ser devido a amplificação de seqüências repetitivas que pode ocorrer em períodos de tempo relativamente curtos. De fato, em *C. repens* foi observado um aumento no número de bandas DAPI⁺ no tetraplóide em comparação ao diplóide, sugerindo que após a poliploidização ocorreu ao menos um novo evento de amplificação de seqüências repetitivas.

A posição das bandas CMA⁺ entre os seis pares de cromossomos de cada espécie da seção *Callisia* foi sempre terminal, principalmente nos braços curtos de um ou dois pares acrocêntricos. Por outro lado, bandas DAPI⁺ apareceram apenas nos dois cromossomos maiores de *C. repens*. A distribuição dos sítios de DNAr 45S foi a mesma das bandas CMA⁺, e em algumas metáfases também foi possível observar uma correspondência das bandas CMA⁺ com os sítios de DNAr 5S, como relatado para outros gêneros (Cabral *et al.*, 2006). Em *C. gentlei* var. *elegans* a posição das bandas CMA⁺ e os sítios de DNAr 45S coincidiram com a posição das constrições secundárias descritas por Jones e Kenton (1984) para esta espécie, mas ao contrário de *C. fragrans* e *C. repens*, os dois sítios de DNAr 45S/CMA de *C. gentlei* var. *elegans* estiveram presentes em um só cromossomo (Fig 5).

O polimorfismo encontrado em *C. repens* com duas ou quatro bandas CMA⁺ havia sido detectado previamente por Pitrez (1998). No cariótipo com quatro bandas CMA⁺, todas colocaram com sítios de DNAr 45S, sugerindo que nas populações com duas bandas existiriam só dois sítios de DNAr 45S. A variação no número e posição dos sítios de DNAr é um fenômeno comum em vários gêneros, como em *Selaginella* (Marcon *et al.*, 2005) e *Passiflora* (Melo e Guerra, 2003), podendo ocorrer mesmo dentro de uma única espécie (Pedrosa-Harand *et al.*, 2006). Esta variação pode estar relacionada a rearranjos cromossômicos, eventos de transposição, silenciamento gênico (Moscone *et al.*, 1999) e permuta desigual (Arnheim *et al.*, 1980; Wendel *et al.*, 1995).

Nas espécies da seção *Callisia*, o padrão de condensação cromossômica profásica e a estrutura do núcleo interfásico foram conservados. Isso parece se dever ao fato de que essas características são muito influenciadas pelo tamanho cromossômico (Guerra, 1985). Espécies com cromossomos grandes, acima de 5,0 µm, como os dessa seção, geralmente possuem núcleos reticulados e cromossomos profásicos com condensação uniforme (Delay, 1949).

Na seção *Leptocallisia* ($x = 7$), o número básico e o cariótipo bimodal observado na seção *Callisia* ($x = 6$) praticamente desapareceram. As diferenças entre estas duas seções não podem ser explicadas por fusão-fissão cêntrica, como proposto por Jones e Kenton (1984) para espécies dos gêneros *Gibasis* e *Tradescantia*, já que a morfologia cromossômica observada não foi compatível com esse tipo de alteração. Dentro desta seção parece haver ao menos dois cariótipos bem distintos: *C. monandra*, com cromossomos predominantemente

meta a sub-metacêntricos, e *C. filiformis*, com todos os cromossomos acrocêntricos. Essas espécies diferem ainda pela presença de bandas paracentroméricas DAPI⁺ na maioria dos cromossomos de *C. filiformis*, e bandas centroméricas CMA⁺ em todos os cromossomos de *C. monandra*. Entretanto, *C. monandra* e *C. filiformis* foram semelhantes quanto ao tipo de núcleo interfásico (semi-reticulado) e cromossomos profásicos. Por outro lado, o cariótipo de *C. cordifolia*, com cromossomos grandes, núcleos reticulados, cromossomos profásicos uniformemente condensados e um número muito reduzido de bandas CMA⁺ ou DAPI⁺, se assemelha mais ao cariótipo de *C. gentlei* var. *elegans* da seção *Callisia* do que ao das demais espécies de sua seção. Essa similaridade não se reflete na filogenia molecular, que mostra que essas espécies pertencem a diferentes clados (Bergamo, 2003).

Callisia multiflora, com $2n = 28$, foi a única espécie tetraplóide desta seção. A análise do tamanho e morfologia cromossômica dessa espécie sugere um cariótipo duplicado, provavelmente um autopoliplóide derivado de uma espécie próxima a *C. monandra*, mas com um cariótipo mais assimétrico. O evento de poliploidização teria sido seguido por outras mudanças responsáveis pelas variações na morfologia cromossômica e pela redução no número de sítios de DNAr. Alterações semelhantes têm sido freqüentemente relatadas em outros poliplóides (Leitch e Bennett, 2004; Ma e Gustafson, 2005). Uma estreita relação entre *C. multiflora* e *C. monandra* foi constatada previamente com base em caracteres morfológicos por Moore (1961) e por Bergamo (2003) com base em seqüências de DNA plastidial.

O cariótipo de *C. warszewicziana*, da seção *Hadrodemas*, se diferenciou das espécies da seção *Callisia* pelo número e tamanho cromossômico (Fig. 5). No entanto, existe uma relação estreita entre estas seções sugerida pela análise filogenética (Bergamo, 2003). Além disso, *C. warszewicziana* e *C. fragrans* da seção *Callisia* compartilham o mesmo tipo de arranjo foliar em espiral. O fato de que a seção *Callisia* apresenta caracteres florais mais derivados (flores sésseis, pétalas reduzidas e tendência à anemofilia) que a seção *Hadrodemas* (Hunt, 1986), sugere que esta última teria uma posição mais basal na filogenia do gênero. Nesse caso, a evolução cromossômica no clado que envolve *Callisia* e *Hadrodemas* teria sido por disploidia descendente, como sugerido por Bergamo (2003).

As espécies investigadas de *Tripogandra* têm em comum a ampla predominância de cromossomos acrocêntricos e um único número básico ($x = 8$), mas variaram em tamanho cromossômico, simetria cariotípica, tipo de núcleo interfásico, padrão de condensação em prófase e distribuição e número de bandas. Os eventos de poliploidização que deram origem aos cariótipos de *T. diuretica* e *T. serrulata* foram acompanhados de diminuição do tamanho cromossômico, como observado por Sharma (1970) em *Vicia* e *Lathyrus*.

Callisia warszewicziana compartilhou com *Tripogandra* o número básico, mas a filogenia molecular (Bergamo, 2003) mostra essas espécies em diferentes clados e sugere que esse número tenha ocorrido mais de uma vez neste grupo. Por outro lado, as análises filogenéticas indicam que a proximidade entre alguns membros da seção *Leptocallisia* e espécies de *Gibasis* ou *Tripogandra* poderia ser maior do que a existente entre algumas seções de *Callisia* (Bergamo, 2003; Burns, 2006).

Pela análise da árvore filogenética e dos dados citológicos discutidos, parece provável que os cariótipos do gênero *Callisia* tenham começado a divergir desde o início da diversificação da subtribo Tradescantiinae. Essa diversidade cariológica também pode ser observada em outros membros da subtribo Tradescantiinae, como no gênero *Tradescantia sensu* Hunt (Sakurai e Ichikawa, 2001). Segundo Jones e Kenton (1984), a divergência de alguns cariótipos do gênero *Callisia* sugere que essas espécies seriam remanescentes de uma flora tropical antiga, onde as espécies atuais de *Callisia*, *Tripogandra* e outros membros da subtribo Tradescantiinae que também apresentam cariótipos divergentes, seriam os atuais representantes daquela flora.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de expressar nosso agradecimento ao Dr. Robert Faden (Smithsonian Institution), Mauro Grabiele e Julio Daviña da Universidade Nacional de Misiones, ao Dr. Leonardo P. Félix da Universidade Federal da Paraíba e à Dra. Maria do Carmo Estanislau do Amaral da UNICAMP por os exemplares de *Callisia* e *Tripogandra* cedidos para esta análise. Às entidades de financiamento FACEPE, CNPq e CAPES.

LITERATURA CITADA

- Arnheim N, Krystal M, Schmickel R, Wilson G, Ryder O, Zimmer E. 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on non-homologous chromosomes in man and apes. PNAS. 77:7323–7327
- Bergamo S. 2003. A phylogenetic evaluation of *Callisia* Loebl. (Commelinaceae) based on molecular data. PhD Thesis, University of Georgia, USA.
- Burns JH. 2006. A comparison of invasive and noninvasive Commelinaceae in a phylogenetic context. PhD Thesis. The Florida State University College of Arts and Sciences. USA
- Cabral JS, Felix LP, Guerra M. 2006. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). Genetics and Molecular Biology 29: 659-664 .
- Delay C. 1949. Recherches sur la structure des noyaux quiescents chez les phanérogames. Revue de Cytologie et de Cytophysiologie Végétales 10: 103-228
- Faden RB, 1998. Commelinaceae. In: Kubitzki K, ed. The Families and Genera of Vascular Plants, vol. 4. Berlin: Springer-Verlag, 109-128.
- Guerra M. 1985. Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas. In: Tópicos de citogenética e evolução de plantas. Eds: Aguiar-Perecin M, Sodero P, Bandel G. Piracicaba, SP: Sociedade Brasileira de Genética.
- Guerra M. 1986. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. Brazilian Journal of Genetics. 9: 741-743.
- Guerra M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. Heredity 71:234–241.
- Guervin C, Le Coq C. 1965. Caryologie du *Callisia elegans* Alexander. Bulletin de la Société Botanique de France. 112: 225-233.
- Hunt DR. 1986. Amplification of *Callisia* Loebl. American Commelinaceae: XV. Kew Bulletin 41: 407-412.
- Jones K, Jopling C. 1972. Chromosomes and the classification of the Commelinaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 65: 129-162.
- Jones K, Kenton A. 1984. Mechanisms of chromosome change in the Evolution of the tribe Tradescantieae (Comelinaceae). In: Sharma A e Sharma AK, eds. Chromosomes in evolution of eukaryotic groups II. Boca Raton: CRC Press, 143-168.
- Kenton A. 1991. Heterochromatin accumulation, disposition and diversity in *Gibasis karwinskyana* (Comelinaceae). Chromosoma 100: 467-478.

- Lee WK, Choi HW, Koo D, Kim SY, Bang JW. 2005. Molecular cytogenetics of five *Pulsatilla* species to the 5S, 45S rDNA genes by fluorescence in situ hybridization. *Korean Journal of Genetics*. 27: 179-185.
- Leitch IJ, Bennett MD. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 651–663.
- Lim KY, Kovarik A, Matyasek R, Chase MW, Knapp S, McCarthy E. 2006. Comparative genomics and repetitive sequence divergence in the species of diploid *Nicotiana* section *Alatae*. *Plant Journal* 48: 907–919.
- Lysak MA, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K, Schubert I. 2006. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *PNAS*: 103: 5224-5229
- Ma XF, Gustafson JP. 2005. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. *Cytogenetics and Genome Research*: 109: 236-249.
- Marcon AB, Barros ICL, Guerra M. 2005. Variation in Chromosome numbers, CMA bands and 45S rDNA sites in species of *Selaginella* (Pteridophyta). *Annals of Botany* 95: 271-276.
- Melo NF, Guerra M. 2003. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* 92: 309-316.
- Moore HE. 1961. The genus *Aploleia* (Commelinaceae). *Baileya* 9: 13-19.
- Moraes A, Santos W, Guerra, M. 2007. Karyotype diversity and the origin of grapefruit *Chromosome Research*. 15: 115-121.
- Moscone EA, Lambrou M, Ehrendorfer F. 1996. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 202: 37-63
- Moscone EA, Klein F, Lambrou M, Fuchs J, Schweizer D. 1999. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* 42: 1224–1233.
- Murray BG. 2002. Trees, maps and FISH: The application of genome based technologies to the analysis of chromosome evolution. *Current Genomics*. 3:539-550.
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A. 2002. Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Genetics*. 161: 1661-1672
- Pedrosa-Harand A, Souza de Almeida CC, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M. 2006. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics* 112:924-933.
- Pichon, M. 1946. Sur Les Commélinacées. *Notulae Systematicae, Herbarium de Paris. Phanérogamie* 12: 217-242.

- Pitrez SR. 1998. Citogenética de Representantes da família Commelinaceae do Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
- Pitrez SR, Felix LP, Barreto R, Guerra M. 2001. Números cromossômicos de espécies de commelinaceae R. Br. ocorrentes no nordeste do Brasil. Boletim de Botânica, Universidade de São Paulo 19: 7-14.
- Sakurai T, Ichikawa S. 2001. Karyotypes and Giemsa C-banding patterns of *Zebrina pendula*, *Z. purpusii* and *Setcreasea purpurea*, compared with those of *Tradescantia ohiensis*. Genes Genetics and Systematics. 76:235-242.
- Schwarzacher T, Ambros P, Schweizer D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. Plant Systematics and Evolution 134: 293-297.
- Sharma AK. 1970. Polyploidy and chromosome size. Chromosomes Today 3: 248-252.
- 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*. The plant journal. 11: 1007-1016
- Wendel JF, Schnabel A, Seelanan T. 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). PNAS 92:280–284
- Zhang X, Xia N. 2007. A karyomorphological study of the genera *Michelia* and *Manglietia* (Magnoliaceae). Caryologia. 60: 52-63.

TABELA 1. Relação das espécies analisadas com indicação dos números cromossômicos observados, fórmula cariotípica, distribuição da heterocromatina, do número de *voucher* e procedência

Espécie	Seção	2n	Formula	Heterocromatina‡	No. <i>Voucher</i>	Proveniência
<i>C. gentlei</i> var. <i>elegans</i> (Alexander ex H.E. Moore) D.R. Hunt	<i>Callisia</i>	12	2SM + 10 ^a	4CMA/t	44477-UIF	Cult. Recife, PE
<i>C. repens</i> (Jacq.) L.	<i>Callisia</i>	12	4SM+8A	4CMA/t + 4DAPI/p:BC + 12BC/p + 4BC/t	44542-UIF	Cult. Recife, PE (folha verde claro)
“		12	4SM+8A	2CMA/t + 4DAPI/p	44629-UIF	Cult. Recife, PE (folha grande, roxa)
“		12	4SM+8A	2CMA/t + 4DAPI/p	44630-UIF	Cult. Recife, PE (folha peq., roxa)
“		12	4SM+8A	2CMA/t + 4DAPI/p	44626-UIF	Posadas, Argentina
“		24	8SM+16A	4CMA/t + 8DAPI/p	44628-UIF	Cult. Recife, PE (tetraplóide)
“		12	4SM+8A	4CMA/t + 4DAPI/p	44633-UIF	Triunfo, PE
“		12	4SM+8A	4CMA/t + 4DAPI/p	44632-UIF	Areia, PB
“		12	4SM+8A	2CMA/t + 4DAPI/p	44674-UIF	Iguaçu, PR
“		12	4SM+8A	2CMA/t + 4DAPI/p	44631-UIF	Brasília, DF
<i>Callisia fragrans</i> (Lindl.) Woodson	<i>Callisia</i>	12	6SM+6A	4CMA/t:BC	44875-UIF	Cult. Recife, PE
“		12	6SM+6A		44028-UIF	Cult. Triunfo, PE
<i>C. warszewicziana</i> (Kunth & Bouché) D. R. Hunt	<i>Hadrodemas</i>	16	2M+10SM+2A	2CMA/t:BC	43947-UIF	Cult. Campinas, SP
<i>C. cordifolia</i> (Sw.) Anderson & Woodson	<i>Leptocallisia</i>	14	2SM+12A	2CMA/t + 4DAPI/i	44476-UIF	Florida, EUA
<i>C. multiflora</i> (Martens & Galeotti) Standl.	<i>Leptocallisia</i>	28	12SM+16A	2CMA/t	44636-UIF	México
<i>C. monandra</i> (Sw.) Schultes f.	<i>Leptocallisia</i>	14	6M+6SM+2A	2CMA/t:BC + 14CMA/p:BC	20589-UIF	Triunfo, PE
<i>C. filiformis</i> (Martens & Galeotti) D. R. Hunt	<i>Leptocallisia</i>	14	14A	6CMA/t + 8DAPI/p:BC + 6BC/p	20575-UIF	Recife, PE
<i>Tripogandra diuretica</i> (Mart.) Handlos	--	64	6M+20SM+38A	8CMA/t + 64DAPI/p:BC	44383-UIF	Cult. Recife, PE
<i>Tripogandra serrulata</i> (Vahl) Handlos	--	48	8M+12SM+28A	4CMA/t	44634-UIF	Guiana Francesa
<i>Tripogandra glandulosa</i> (Seub.) Rohweder	--	16	2M+6SM+8A	8CMA/t + 16BC/p	44635-UIF	Cult. Posadas, Argentina

*M: metacêntrico, SM: submetacêntrico, A: acrocêntrico. ‡: t: posição terminal; p: proximal; i: intersticial, BC: Bandas C, analisadas apenas em *C. warszewicziana*, *C. monandra*, *C. filiformis*, *C. repens* 44542-UIF, *C. fragrans* 44383-UIF, *T. diuretica*, *T. glandulosa*. Cult: cultivada.

LEGENDAS

FIG. 1. Tipos de núcleos interfásicos e padrões de condensação profásica em espécies de *Callisia* e *Tripogandra*. A- *C. multiflora* ($2n = 28$). B- *C. cordifolia* ($2n = 14$). C- *C. warszewicziana* ($2n = 16$). D- *C. gentlei* var. *elegans* ($2n = 12$). E- *C. repens* ($2n = 12$). F- *C. fragrans* ($2n = 12$). G- *T. diuretica* ($2n = 64$). H- *T. glandulosa* ($2n = 16$). I- *T. serrulata* ($2n = 48$). Núcleos interfásicos do tipo reticulado e cromossomos profásicos com condensação uniforme em A-F e H. Núcleo semi-reticulado e cromossomos profásicos com regiões terminais menos condensadas em G, e núcleos de um tipo intermediário em I. Barra em I representa 10 μm .

FIG. 2. Bandas CMA/DAPI e sítios de DNAr 5S e 45S nas espécies das seções *Leptocallisia* e *Hadrodemas*. A, B, C- *C. filiformis* ($2n = 14$); D, E- *C. monandra* ($2n = 14$); F, G- *C. cordifolia* ($2n = 14$); H, I- *C. multiflora* ($2n = 28$); J, K- *C. warszewicziana* ($2n = 16$). Observe bandas DAPI⁺ em B e F (azul). Em amarelo aparecem bandas CMA⁺ em A, D, F, H, J. Sítios de DNAr 5S e 45S (C, E, G, I, K) em vermelho e verde, respectivamente. Barra em I representa 10 μm .

FIG. 3. Bandas C/DAPI (A), CMA/DAPI (B, E) e CMA (D, F, H) e sítios de DNAr (C, G, I) 5S (vermelho) e 45S (verde) em espécies da seção *Callisia*. A-E- *C. repens* ($2n = 12$; $2n = 24$). F, G- *C. fragrans* ($2n = 12$). H, I- *C. gentlei* var. *elegans* ($2n = 12$). Observe bandas DAPI⁺ (azul) em B, E e bandas CMA⁺ (amarelo) em B, D, F e H. As fotos B e D mostram, respectivamente, quatro e duas bandas CMA⁺ encontradas nas amostras cultivadas em Recife. Observe no inserto em B e C uma região CMA⁺ que corresponde ao DNAr 5S. Cabeças de seta azuis em E indicam bandas que ocorrem apenas nesta população. Barra em I representa 10 μm .

FIG. 4. Bandas CMA e DAPI (A, C) e sítios de DNAr 45S (B) em espécies de *Tripogandra*. A- *T. diuretica* ($2n = 64$) mostrando heterocromatina centromérica DAPI⁺ (azul) e bandas terminais CMA⁺ (amarelo). B- *T. serrulata* ($2n = 48$). Cabeças de seta apontam bandas CMA⁺. C- *T. glandulosa* ($2n = 16$) com sítios de DNAr 45S em verde. Barra em C representa 10 μm .

FIG. 5. Idiograma de oito espécies do gênero *Callisia* e suas relações filogenéticas. Cada cor de fundo indica uma seção (laranja para *Callisia*, roxo para *Hadrodemas*, verde para *Leptocallisia*, e amarelo para *Cuthbertia*). O cladograma à esquerda (Bergamo, 2003) indica que a seção *Leptocallisia* é polifilética. O cladograma à direita (Burns, 2006) sugere que as seções *Leptocallisia* e *Callisia* são mais próximas aos gêneros *Gibasis* e *Tripogandra*. Linhas pontilhadas indicam taxa não estudados neste trabalho. As setas ↘ indicam redução dispolide. Várias setas ↗↗↗ indicam diferentes níveis de poliploidia.

FIG. 6. Idiogramas de espécies de *Tripogandra*. A. *T. diuretica* ($2n = 64$), B. *T. glandulosa* ($2n = 16$). C. *T. serrulata* ($2n = 48$).

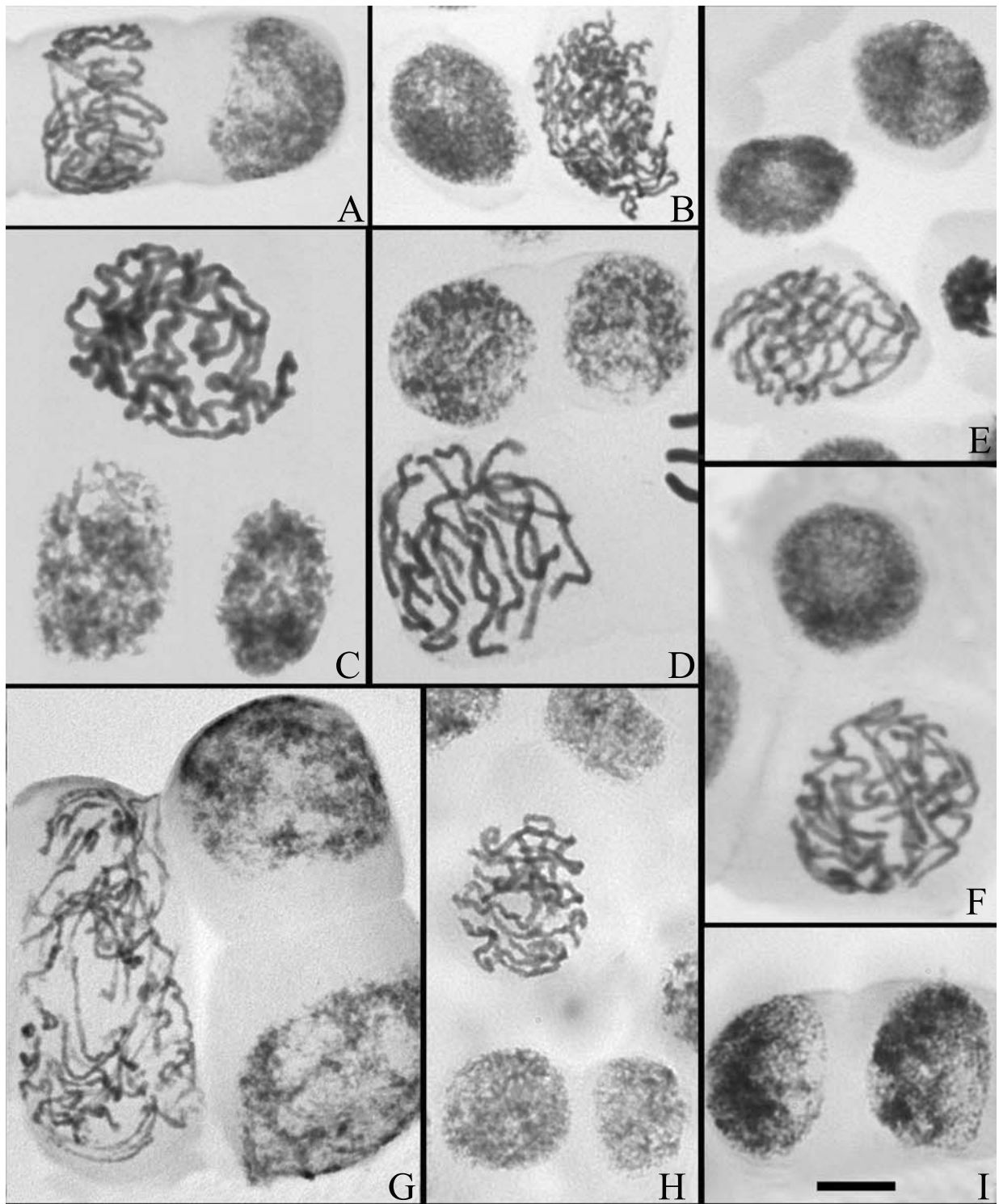


FIG. 1. Tipos de núcleos interfásicos e padrões de condensação profásica em espécies de *Callisia* e *Tripogandra*. A- *C. multiflora* ($2n = 28$). B- *C. cordifolia* ($2n = 14$). C- *C. warszewicziana* ($2n = 16$). D- *C. gentlei* var. *elegans* ($2n = 12$). E- *C. repens* ($2n = 12$). F- *C. fragrans* ($2n = 12$). G- *T. diuretica* ($2n = 64$). H- *T. glandulosa* ($2n = 16$). I- *T. serrulata* ($2n = 48$). Núcleos interfásicos do tipo reticulado e cromossomos profásicos com condensação uniforme em A-F e H. Núcleo semi-reticulado e cromossomos profásicos com regiões terminais menos condensadas em G, e núcleos de um tipo intermediário em I. Barra em I representa 10 μm .

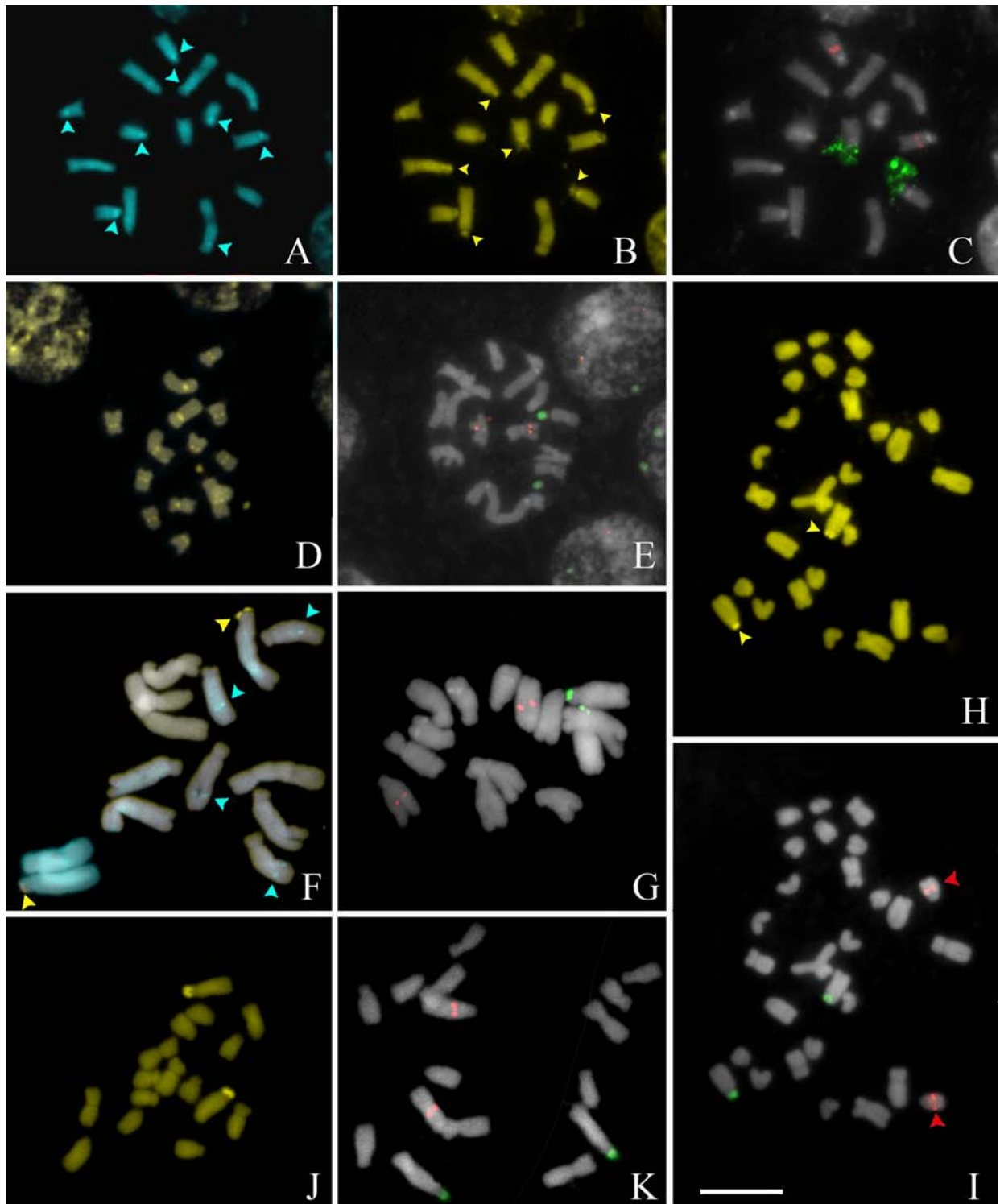


FIG. 2. Bandas CMA/DAPI e sítios de DNAr 5S e 45S nas espécies das seções *Leptocallisia* e *Hadrodemas*. A, B, C- *C. filiformis* ($2n = 14$); D, E- *C. monandra* ($2n = 14$); F, G- *C. cordifolia* ($2n = 14$); H, I- *C. multiflora* ($2n = 28$); J, K- *C. warszewicziana* ($2n = 16$). Observe bandas DAPI⁺ em B e F (azul). Em amarelo aparecem bandas CMA⁺ em A, D, F, H, J. Sítios de DNAr 5S e 45S (C, E, G, I, K) em vermelho e verde, respectivamente. Barra em I representa 10 μm

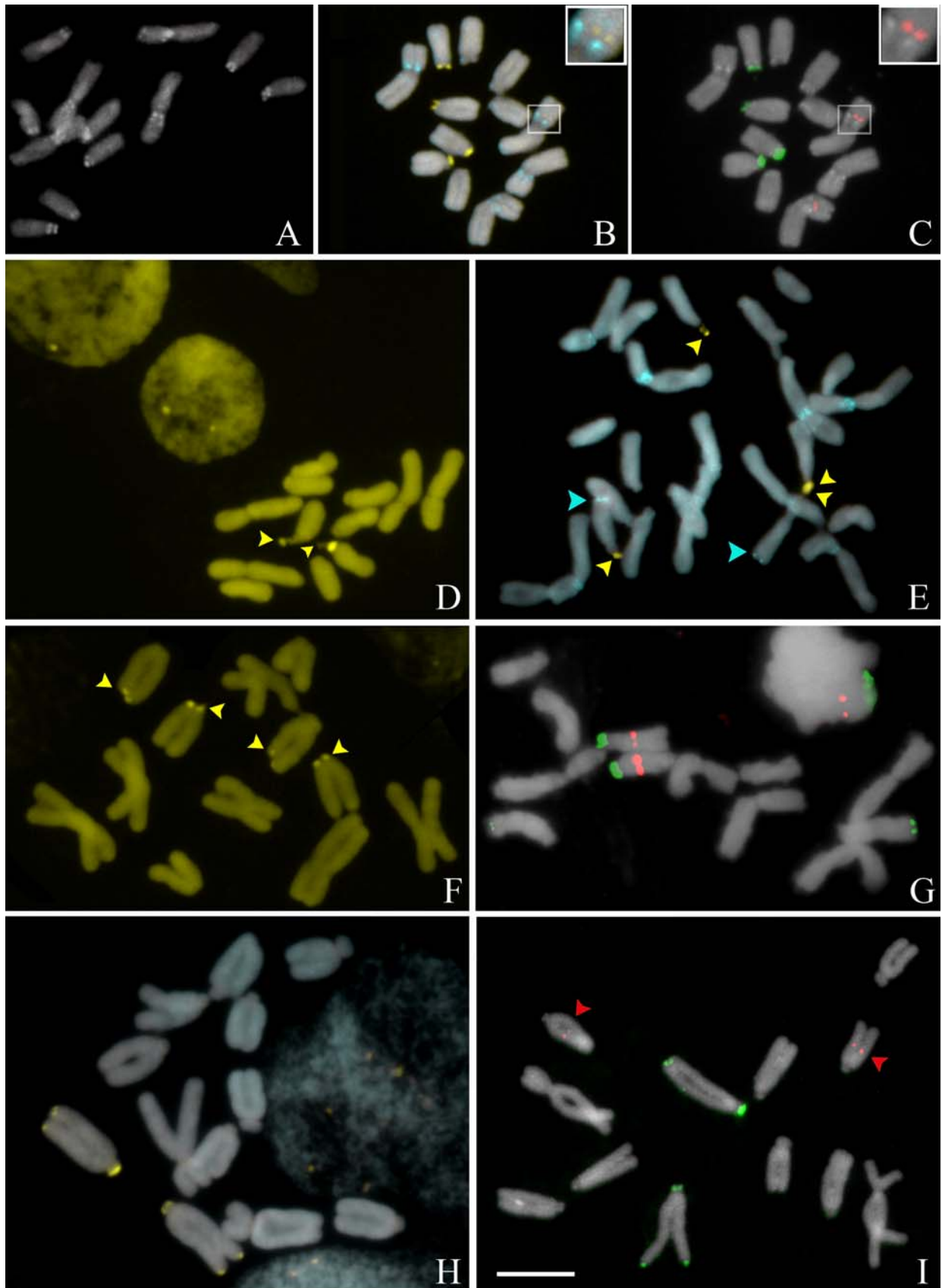


FIG. 3. Bandas C/DAPI (A), CMA/DAPI (B, E) e CMA (D, F, H) e sítios de DNAr (C, G, I) 5S (vermelho) e 45S (verde) em espécies da seção *Callisia*. A–E- *C. repens* ($2n = 12$; $2n = 24$). F, G- *C. fragrans* ($2n = 12$). H, I- *C. gentlei* var. *elegans* ($2n = 12$). Observe bandas DAPI⁺ (azul) em B, E e bandas CMA⁺ (amarelo) em B, D, F e H. As fotos B e D mostram, respectivamente, quatro e duas bandas CMA⁺ encontradas nas amostras cultivadas em Recife. Observe no inserto em B e C uma região CMA⁺ que corresponde ao DNAr 5S. Cabeças de seta azuis em E indicam bandas que ocorrem apenas nesta população. Barra em I representa 10 μ m.

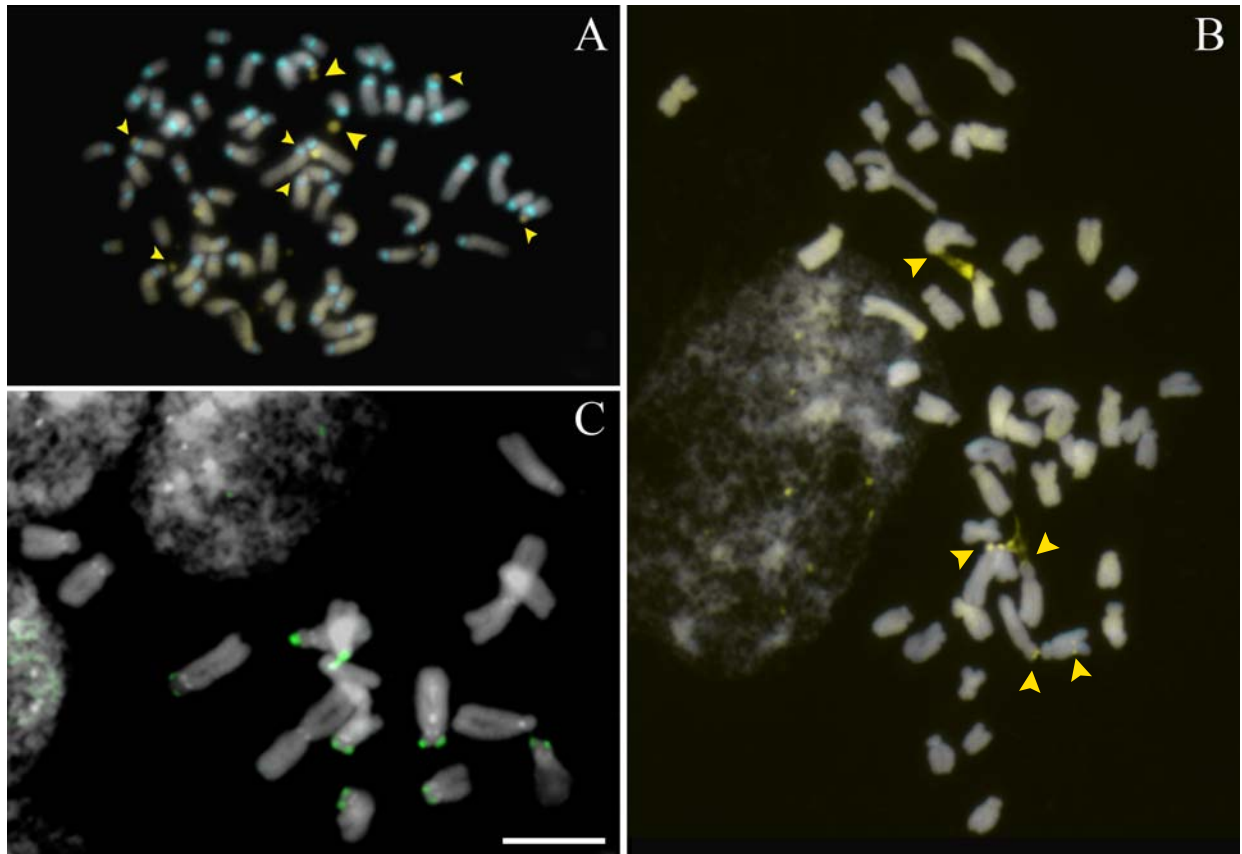
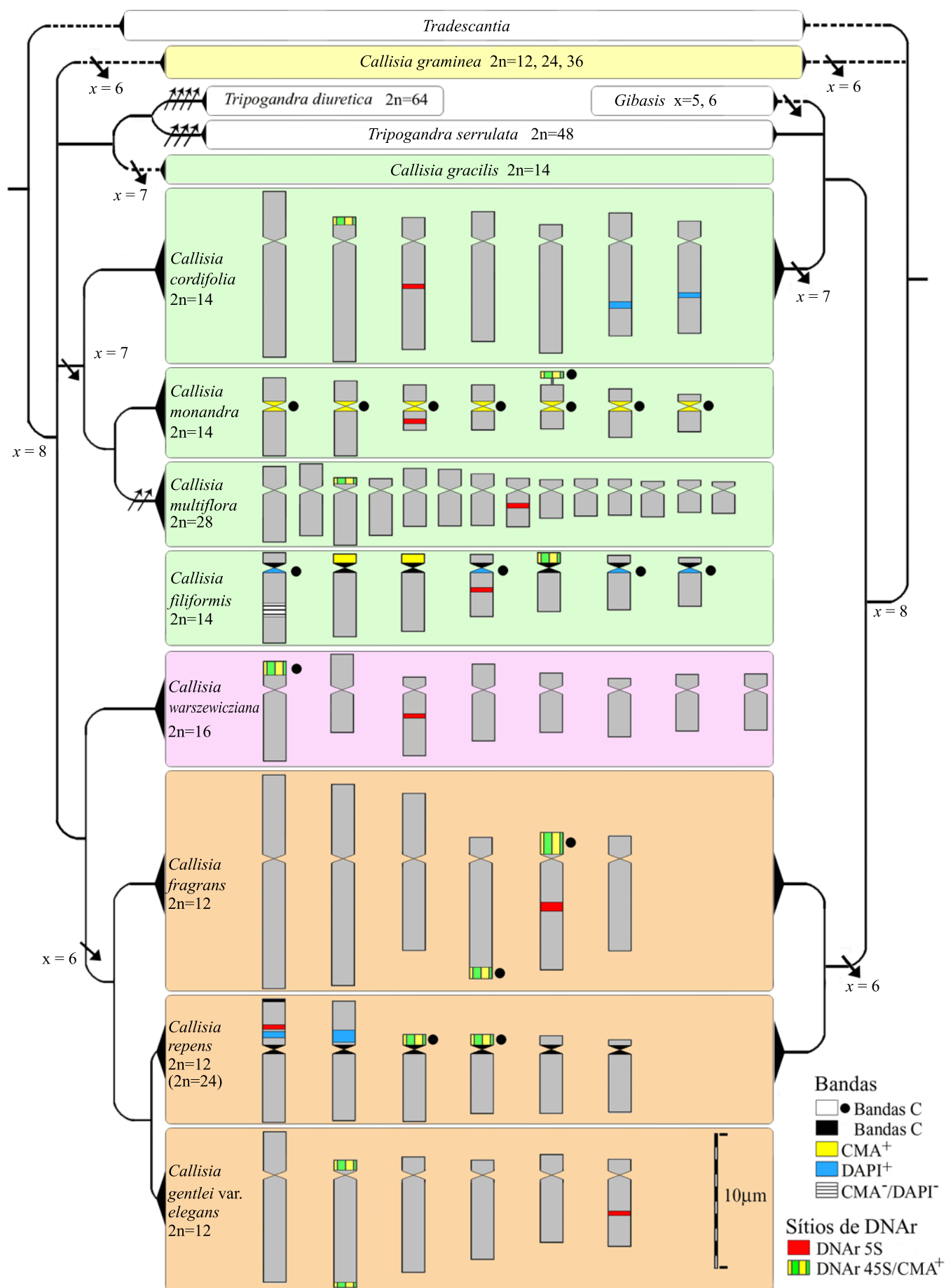


FIG. 4. Bandas CMA e DAPI (A, C) e sítios de DNAr 45S (B) em espécies de *Tripogandra*. A- *T. diuretica* ($2n = 64$) mostrando heterocromatina centromérica DAPI⁺ (azul) e bandas terminais CMA⁺ (amarelo). B- *T. serrulata* ($2n = 48$). Cabeças de seta apontam bandas CMA⁺. C- *T. glandulosa* ($2n = 16$) com sítios de DNAr 45S em verde. Barra em C representa 10 μ m

FIG. 5. Idiograma de oito espécies do gênero *Callisia* e suas relações filogenéticas. Cada cor de fundo indica uma seção (laranja para *Callisia*, roxo para *Hadrodemas*, verde para *Leptocallisia*, e amarelo para *Cuthbertia*). O cladograma à esquerda (Bergamo, 2003) indica que a seção *Leptocallisia* é polifilética. O cladograma à direita (Burns, 2006) sugere que as seções *Leptocallisia* e *Callisia* são mais próximas aos gêneros *Gibasis* e *Tripogandra*. Linhas pontilhadas indicam taxa não estudados neste trabalho. As setas ▼ indicam redução dispoloide. Várias setas ↗↗↗ indicam diferentes níveis de poliploidia.



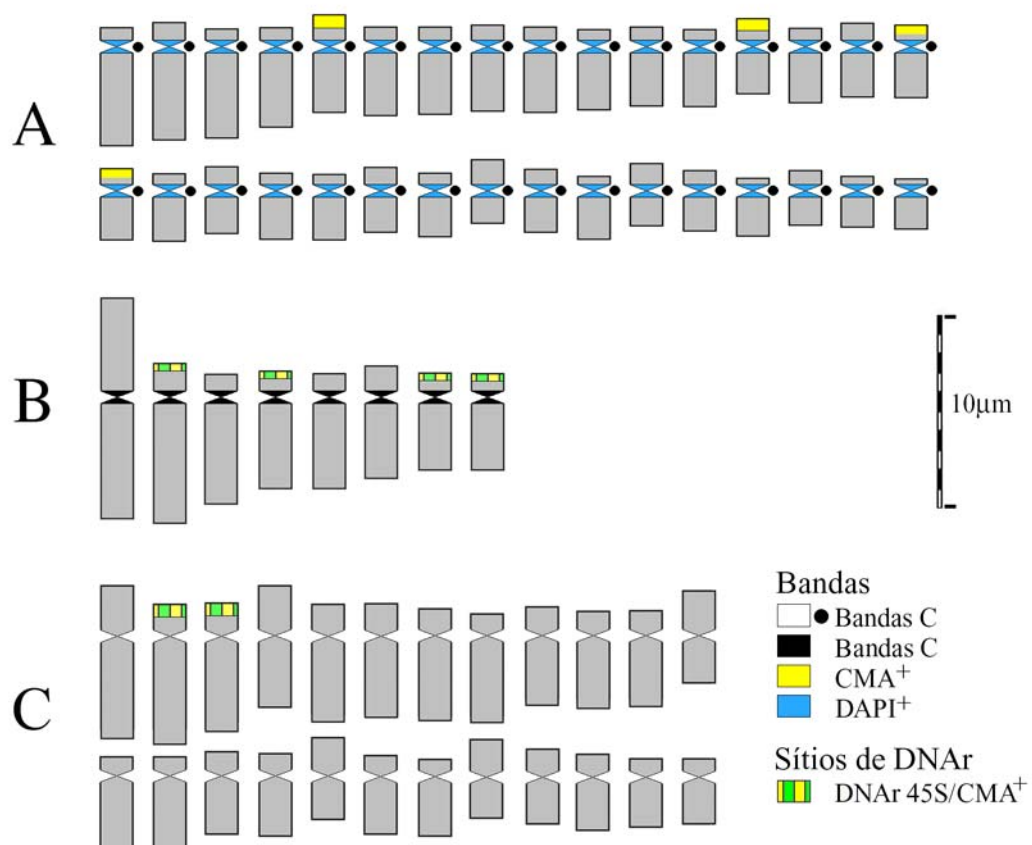


FIG. 6. Idiogramas de espécies de *Tripogandra*. A. *T. diuretica* ($2n = 64$), B. *T. glandulosa* ($2n = 16$), C. *T. serrulata* ($2n = 48$).

6. CONCLUSÕES

6.1. Foi confirmado o número básico para cada uma das seções sendo $x = 6$ para *Callisia*, $x = 8$ para *Hadrodemas* e $x = 7$ para *Leptocallisia*.

6.2. Considerando-se a filogenia molecular existente para o gênero, deve-se supor que tenha ocorrido uma redução do número básico nas seções *Callisia* e *Leptocallisia* a partir de um ancestral com $x = 8$.

6.3. Os núcleos interfásicos do tipo reticulado observados na seção *Callisia* pareceram relacionados ao padrão de condensação profásico uniforme e a cromossomos grandes. Por outro lado, na seção *Leptocallisia* além desse tipo de núcleos, também foram encontrados núcleos semi-reticulados em espécies com padrão de condensação profásico diferencial e cromossomos medianos a pequenos. Isto somado à informação das análises filogenéticas sugere que essa seção não é um agrupamento natural.

6.4. Além das diferenças cariotípicas interespecíficas, foram encontrados também polimorfismos para bandas CMA, sítios de DNAr 45S e bandas DAPI em *C. repens*, sugerindo que essas mudanças teriam acontecido em um período de tempo relativamente curto.

6.5. Os cariótipos das espécies dos gêneros *Callisia* e *Tripogandra* apresentam diferenças quanto à morfologia cromossômica e distribuição da heterocromatina que impossibilitam estabelecer suas relações evolutivas.

6.6. A explicação mais provável para a elevada diversificação cariotípica de *Callisia* é a ocorrência de múltiplos rearranjos e amplificação de seqüências repetitivas de DNA, acompanhados de eventos independentes de disploidia. Estes cariótipos podem ter começado a divergir desde o início da diversificação da subtribo Tradescantiinae.

7. RESUMO

O gênero *Callisia* apresenta grande diversidade de número e morfologia cromossômicos entre e dentro de suas seções. Além disso, análises filogenéticas sugerem que o gênero não é monofilético e algumas de suas espécies estariam mais relacionadas a *Tripogandra*. Com o intuito de investigar a evolução cariotípica do gênero e entender as relações com *Tripogandra*, foram analisados a morfologia cromossômica, a estrutura do núcleo interfásico, o padrão de condensação profásica e a distribuição da heterocromatina em oito espécies de três seções do gênero *Callisia* e em três espécies de *Tripogandra*. A estrutura dos núcleos interfásicos e a condensação profásica foram analisadas em células coradas com Giemsa. A morfologia cromossômica foi definida a partir de metáfases coradas com DAPI, enquanto a heterocromatina foi revelada por bandeamento C e pela coloração com os fluorocromos CMA e DAPI. Os sítios de DNAr 5S e 45S foram localizados com a técnica de FISH. Os resultados confirmaram que as espécies de *Callisia* têm uma diversidade cariotípica excepcionalmente alta. Dentro da seção *Callisia* o número cromossômico, a estrutura do núcleo interfásico e o padrão de condensação profásica foram conservados, sugerindo que se trata de um agrupamento natural. Porém, nessa seção e na seção *Leptocallisia*, a morfologia cromossômica e a distribuição das bandas C e DAPI⁺ variaram extensamente. Apesar disso, a posição terminal dos sítios de DNAr 45S e intersticial dos sítios de DNAr 5S foi em geral conservada. No gênero *Tripogandra* também houve variação na distribuição da heterocromatina e na estrutura dos núcleos interfásicos. A presente análise citogenética, utilizando padrões de bandas heterocromáticas e hibridização *in situ* de sondas de DNAr, mostrou que as diferenças citológicas não se limitam à morfologia cromossômica, mas incluem mudanças na distribuição e composição da heterocromatina. Os cariótipos dos gêneros *Callisia* e *Tripogandra* são muito diferentes, impossibilitando estabelecer relações evolutivas. A explicação mais provável para a elevada diversificação cariotípica de *Callisia* é 'a ocorrência de múltiplos rearranjos e amplificação de seqüências repetitivas de DNA, acompanhados de eventos independentes de disploidia.

Palavras chave: *Callisia*, evolução cromossômica, FISH, heterocromatina.

8. ABSTRACT

The genus *Callisia* displays a remarkable diversity in chromosomal number and morphology within and between its sections. In addition, phylogenetic analyses suggest that it is not monophyletic, and some of its species could be more related to *Tripogandra*. Aiming to investigate the karyotypic evolution of the genus and understand its relationship with *Tripogandra*, chromosomal morphology, structure of interphase nuclei, prophase condensation pattern and heterochromatin distribution were analyzed in eight species of three sections of *Callisia* and three species of *Tripogandra*. The structure of interphase nuclei and prophasic condensation pattern were analyzed in cells stained with Giemsa. Chromosomal morphology was defined from DAPI stained metaphases, whereas the heterochromatin was localized by C-banding and CMA/DAPI fluorochrome staining. The 5S and 45S rDNA sites were revealed by FISH. The results confirmed that *Callisia* species have an exceptionally high karyotypic diversity. In *Callisia* section, the chromosome number, the structure of interphase nuclei and the prophasic condensation pattern were conserved, suggesting that it is a natural group. Nevertheless, in this section and section *Leptocallisia*, both chromosomal morphology and DAPI and C-band distribution had extensive variation. On the other hand, terminal and interstitial position of 45S rDNA and 5S rDNA, respectively, were well conserved. In *Tripogandra* genus, there was also variation in heterochromatin distribution and structure of interphase nuclei. The present cytogenetic analysis, using heterochromatin banding patterns and *in situ* hybridization of rDNA probes, showed that cytological differences are not constrained to chromosomal morphology, but also include changes in distribution and composition of the heterochromatin. Karyotypes of *Callisia* and *Tripogandra* are very different, making impossible to establish evolutive relationships. The more probable explanation for this high karyotypic diversification in *Callisia* is the occurrence of multiple rearrangements and amplification of repetitive DNA sequences, along with independent dispoloidy events.

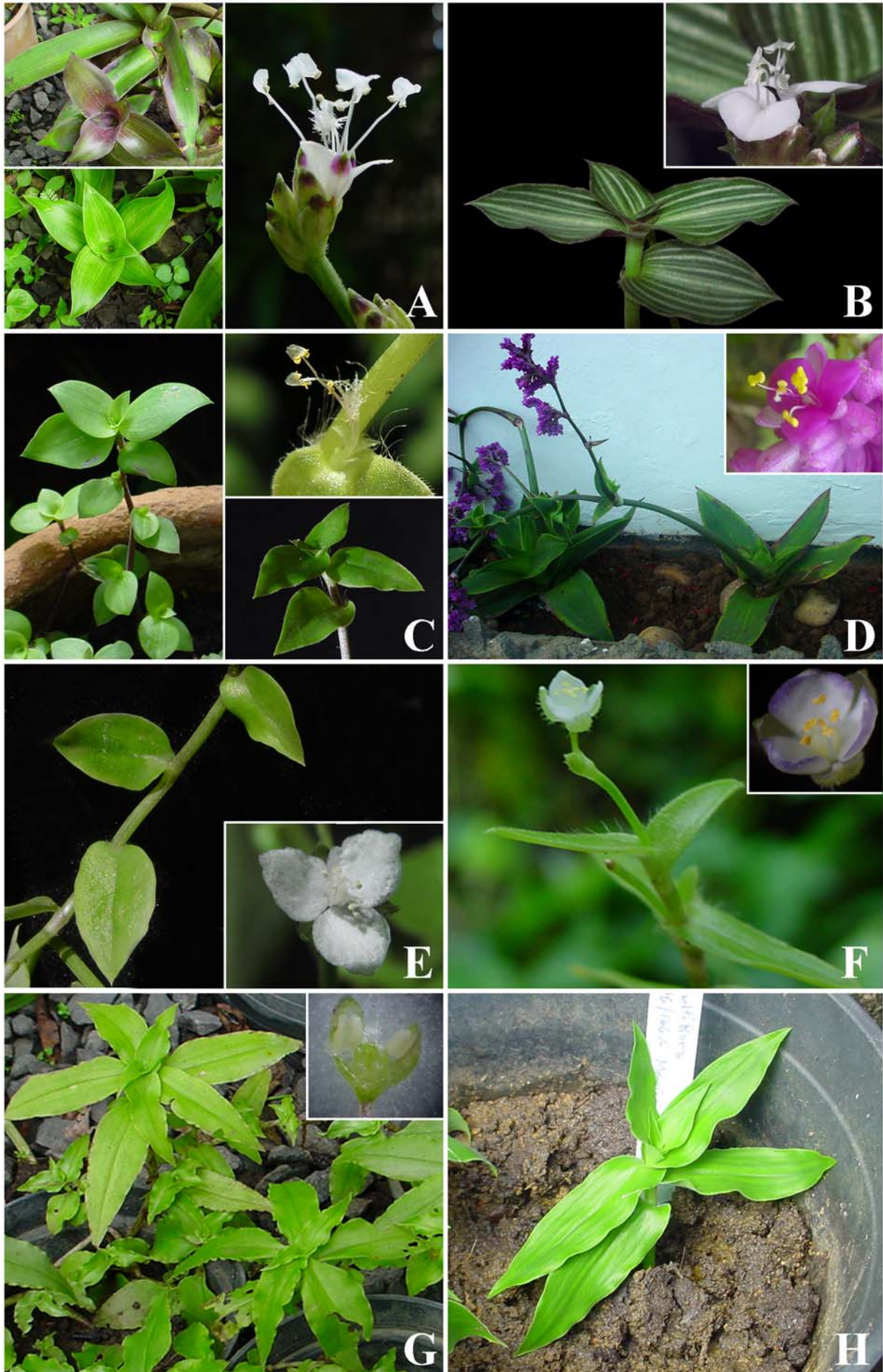
Keywords: *Callisia*, chromosomal evolution, FISH, heterochromatin.

ANEXOS

ANEXO 1. Fotos de alguns acessos estudados do gênero *Callisia*.

A-C – Seção *Callisia*. A – *C. fragrans*. B – *C. gentlei* var. *elegans*. C – *C. repens*. D – Seção *Hadrodemas*, *C. warszewicziana*. E-H – Seção *Leptocallisia*. E – *C. cordifolia*. F – *C. filiformis*. G – *C. monandra*. H – *C. multiflora*. Os insertos detalham as inflorescências.

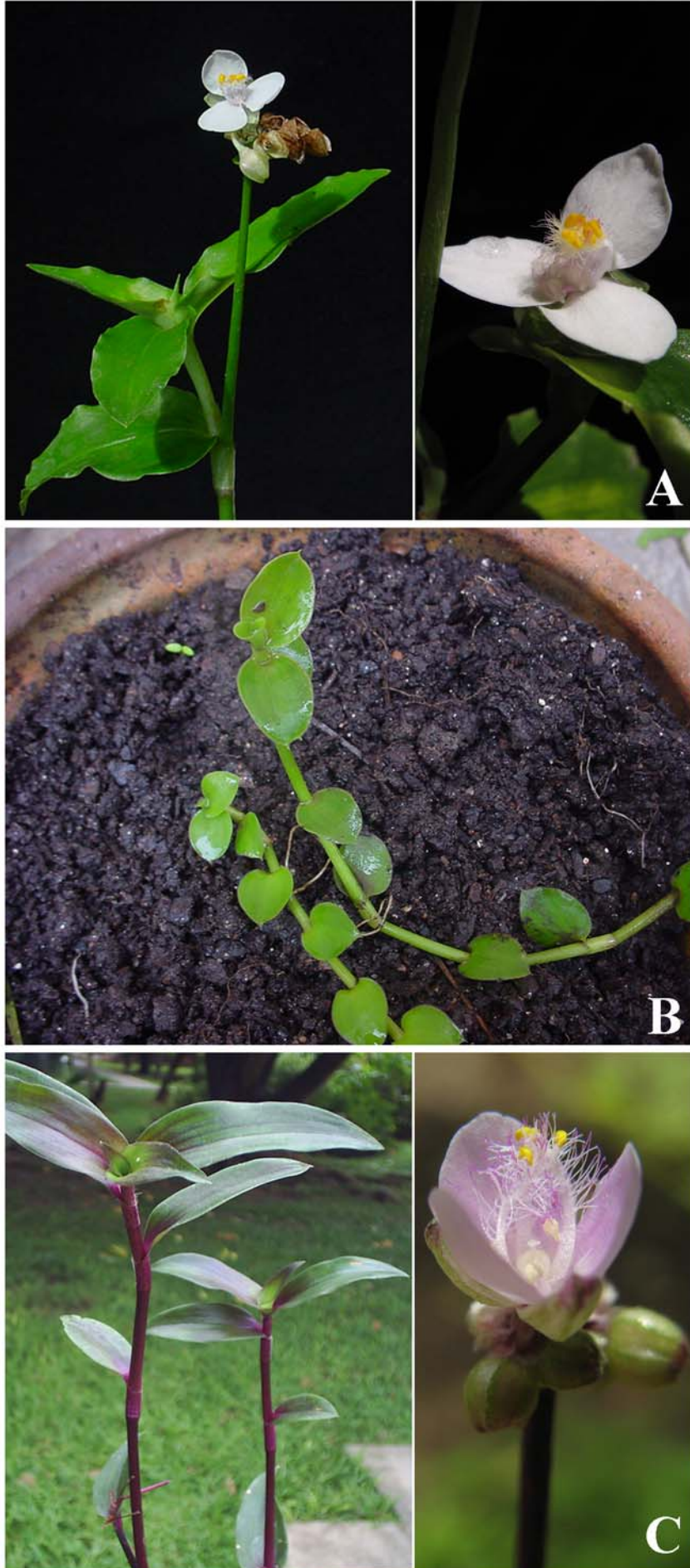
ANEXO 1. Fotos de alguns acessos do gênero *Callisia*



ANEXO 2. Fotos dos acessos estudados do gênero *Tripogandra*.

A – *T. diuretica*. B – *T. glandulosa*. C – *T. serrulata*. Os insertos detalham as inflorescências.

ANEXO 2. Fotos dos acessos do gênero *Tripogandra*



ANEXO 3. Normas do manuscrito a submeter ao periódico *Annals of Botany*

INTRODUCTION

Scope of the Journal

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

Charges

Authors pay no fees or page charges unless electing for our Open Access scheme (see below for details). The corresponding author receives a free copy of the issue of the Journal in which their paper appears, 25 offprints of their article without charge and a unique URL that gives access to a PDF (Portable Document Format) file of their article. Colour photographs and graphics are also printed without charge where their use enhances scientific content or clarity.

Open Access

Starting in January 2006, *Annals of Botany* authors have the option to make their accepted paper freely available online immediately upon publication, under the 'Oxford Open' initiative. Authors can choose this open access option when completing the customary Licence to Publish form sent to the corresponding author of all accepted papers. Here, authors are asked to indicate whether or not they wish to have their paper made freely available immediately online. There is a charge, which varies depending on circumstances (see <http://www.oxfordjournals.org/oxfordopen>) but it is considerably cheaper for authors whose university or institution subscribes to the Journal, and for authors in developing countries. If you do not select the Open Access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

Types of article

Standard research papers ('ORIGINAL ARTICLES') and 'TECHNICAL ARTICLES' should not normally exceed ten printed pages (each printed page in the journal holds approximately 1000 words or 40–50 references). A 'REVIEW' submitted speculatively should have fewer than 24 printed pages. 'SHORT COMMUNICATIONS' should not exceed six printed pages. Short opinion papers ('VIEWPOINT') up to 6 pages long will also be considered. 'INVITED REVIEWS' (up to 24 pages) and 'BOTANICAL BRIEFINGS' (up to 6 pages) are published by invitation only. The journal also publishes book reviews (Publishers' Books for Review).

Summary of submission processes

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

If you are unable to access our web-based submission system, please contact the Editorial Office (e-mail: annals-botany@bristol.ac.uk) for alternative methods of submitting your paper. The postal address is *Annals of Botany* Editorial Office, School of Biological Sciences, University of Bristol, Woodland Road, Bristol BS8 1UG, UK.

Back to Start

Preparing a covering letter

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

PREPARING THE ARTICLE FILE

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

Text should be typed using size 12 Times New Roman or Courier, **double-spaced throughout and with an approx. 25 mm margin**. All pages should be numbered sequentially. **Each line of the text should also be numbered**, with the top line of each page being line 1. The article file should be in PC-compatible Microsoft Word - file type DOC [please make sure the "Language" is "English (U.K.)" via Tools → Language → Set Language]. RTF formats are also acceptable. Please do not submit PDFs, desktop publishing files or LaTeX files. The article file should include a list of any figure legends but exclude tables and any figures themselves – these should be submitted separately. Please do not embed tables and images in the article file. Instead, tables and figures should each be allocated separate electronic files on your computer for later uploading as explained below under PREPARING TABLE and FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES AND VIDEO FILES.

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

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

- Background and Aims
- Methods
- Key Results
- Conclusions

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

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

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

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

Abbreviations are discouraged except for units of measurement, standard chemical symbols (e.g. S, Na), names of chemicals (e.g. ATP, Mes, Hepes, NaCl, O₂), procedures (e.g. PCR, PAGE, RFLP), molecular terminology (e.g. bp, SDS) or statistical terms (e.g. ANOVA, s.d., s.e., n, F, t-test and r²) where these are in general use. Other abbreviations should be spelled out at first mention and all terms must be written out in full when used to start a sentence. Abbreviations of scientific terms should not be followed by a full stop. Use the minus index to indicate 'per' (e.g. m⁻³, L⁻¹, h⁻¹) except in such cases as 'per plant' or 'per pot'. If you decide that a list of abbreviations would help the reader, this should be included as an Appendix.

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

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

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

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

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

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

Mathematical equations must be in proper symbolic form; word equations are not acceptable. Each quantity should be defined with a unique single character or symbol together with a descriptive subscript if necessary. Each subscript should also be a single character if possible, but a short word is permissible. For example, a relationship between plant dry mass and fresh mass should appear as $M_d = 0.006M_f1.461$, where M_d is plant dry mass and M_f is plant fresh mass; and not as $DM = 0.006FM1.461$.

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

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

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

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

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

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

maize; rice; wheat and arabidopsis.

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

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

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

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

Books

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

Chapters in books

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

Research papers

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

Theses

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

Anonymous sources

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

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

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

Appendix.

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

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

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

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

Tables. The best guide for laying out tables and diagrams are papers in a recent issue of *Annals of Botany*. Each table should have a separate file, a complete caption at the top and be numbered Table 1, Table 2 etc. according to the order in which they are first mentioned in the text. When preparing tables, adopt the 'Tables' set-up in MS Word, using one cell for each datum cluster (e.g. 12.2 ± 1.65) and avoid the use of the 'return' key. Please do not use MS Excel for submitting tables. These can easily be copied into MS Word files prior to submission.

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

graphs and diagrams of finally accepted papers are normally redrawn by the publisher to ensure a consistent house style and should be inspected carefully by authors at the proof stage.

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

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

FERNANDO ROA OVALLE

CITOTAXONOMIA MOLECULAR DO GÊNERO *Callisia* Loebl (Commelinaceae)

COMISSÃO EXAMINADORA:

Membros titulares:

Marcelo Guerra

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

Andrea Pedrosa Horvath

Prof. Dra. Andrea Pedrosa. Depto. de Botânica CCB, UFPE

Leonardo Pessoa Félix

Prof. Dr. Leonardo Pessoa Félix. Depto. de Fitotecnia, CCA UFPB.