



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TALITA ANGÉLICA DE OLIVEIRA ROSA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E GENÔMICA DE *Adenium
obesum* E *A. arabicum* (APOCYNACEAE)**

Londrina
2022



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



IDR-Paraná

Instituto de Desenvolvimento
Rural do Paraná - IAPAR-EMATER



TALITA ANGÉLICA DE OLIVEIRA ROSA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E GENÔMICA DE *Adenium*
obesum E *A. arabicum* (APOCYNACEAE)**

Londrina
2022

TALITA ANGÉLICA DE OLIVEIRA ROSA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E GENÔMICA DE *Adenium
obesum* E *A. arabicum* (APOCYNACEAE)**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela

**Londrina
2022**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

T146 Rosa, Talita Angelica de Oliveira.
Caracterização citogenética e genômica de *Adenium obesum* e *A. arabicum* (Apocynaceae). / Talita Angelica de Oliveira Rosa. - Londrina, 2022.
73 f. : il.

Orientador: André Luís Laforga Vanzela.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Apocynaceae, bandas CMA/DAPI, citometria de fluxo, cromocentros, DNAr, FISH, rosa do deserto - Tese. I. Laforga Vanzela, André Luís . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 575.1

TALITA ANGÉLICA DE OLIVEIRA ROSA

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E GENÔMICA DE *Adenium obesum* E *A. arabicum* (APOCYNACEAE)

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcos Letaif Gaeta
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Thaíssa B. de Souza
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Lúcia Giuliano Caetano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 12 de abril de 2022.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Genética e Biologia Molecular, e aos seus servidores, mantenedores, professores, técnicos e demais funcionários.

Agradeço às fundações de fomento à pesquisa CAPES, CNPq, FINEP e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Agradeço ao Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela pela paciência e conhecimento compartilhado durante o período de parceria no Laboratório de Citogenética e Diversidade Vegetal (LCVDV).

Aos membros da banca ao contribuir com meu trabalho e compartilhar sua experiência e conhecimento na avaliação da dissertação.

Aos meus colegas do laboratório LCDV por todo apoio e auxílio na convivência diária.

À minha família, e a todos os demais que fazem parte da minha vivência diária pelo apoio, credibilidade, conselhos e incentivos.

ROSA, Talita Angélica de Oliveira. **Caracterização citogenética e genômica de *Adenium obesum* e *A. arabicum* (Apocynaceae)**. 2022. 73f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, Londrina.

RESUMO

A família Apocynaceae compreende cerca de 550 gêneros e 5.100 espécies, com hábito variável e distribuição cosmopolita. O gênero *Adenium* é de origem africana e asiática, e suas espécies são conhecidas como “rosa do deserto”. Nove espécies de *Adenium* (*A. oleifolium*, *A. swazicum*, *A. boehmianum*, *A. multiflorum*, *A. obesum*, *A. somalense*, *A. crispum*, *A. socotranum* e *A. arabicum*) são usadas para fins ornamentais e farmacológicos, mas, apesar da exploração comercial ser recente, o crescimento no mercado floricultor é grande. Além de ser uma planta exuberante com caules distintos e esculturais, apresentam flores com uma ampla diversidade de cores e formas. Apesar do crescente investimento na cadeia produtiva das rosas do deserto, informações básicas sobre a genética do grupo são escassas. Dados de número e morfologia cromossômica, organização dos cariótipos, padrões de distribuição de bandas heterocromáticas, sítios de DNA ribossômicos e estimativas do conteúdo de DNA nuclear são importantes para entender a evolução de grupos vegetais e a organização sistemática das plantas. Assim, a carência no emprego dessas ferramentas em gêneros botânicos como *Adenium*, tem limitado nossa compreensão sobre a evolução desses genomas. Nesse sentido, o presente trabalho agrega conhecimento citogenômico ao comparar duas espécies que diferem quanto ao nível de ploidia. A análise citogenética mostrou cariótipos com predominância de cromossomos meta e submetacêntricos, $2n=2x=22$ (11 m + 11 sm) em *A. obesum* e $2n=2x=44$ (40 m + 4 sm) em *A. arabicum*, com genomas variando de $2C=2,06$ pg em *A. obesum* a $2C=2,91$ em *A. arabicum*. Há uma predominância de bandas DAPI⁺ (ricas em AT) na região proximal dos cromossomos, e bandas CMA⁺ (ricas em GC) nas regiões terminais. Em intérfase os cromocentros concentraram bandas ricas em AT (DAPI⁺), sempre com bandas ricas em GC (CMA⁺) posicionadas na periferia dos cromocentros. A espécie diploide *A. obesum* apresenta quatro sítios de DNAr, enquanto a poliploide *A. arabicum* apresenta oito sítios, localizados na fração terminal dos cromossomos. Os sítios de DNAr estão co-localizados em blocos ricos em GC (CMA⁺). As análises sugerem que, apesar da poliploidia, houve redução no conteúdo de DNA de *A. arabicum*, considerando o conteúdo de DNA no complemento

monoploide, apesar de que o perfil de bandas CMA/DAPI em *A. obesum* e *A. arabicum* tenham sido relativamente similares.

Palavras chave: Apocynaceae, bandas CMA/DAPI, citometria de fluxo, cromocentros, DNAr, FISH, rosa do deserto

ROSA, Talita Angélica de Oliveira. **Caracterização citogenética e genômica de *Adenium obesum* e *A. arabicum* (Apocynaceae)**. 2022. 73f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, Londrina.

ABSTRACT

The Apocynaceae family comprises about 400 genera and 5,100 species, with variable habit and cosmopolitan distribution. The genus *Adenium* is of African and Asian origin, and its species is known as “desert rose”. Nine species of *Adenium* (*A. oleifolium*, *A. swazicum*, *A. boehmianum*, *A. multiflorum*, *A. obesum*, *A. somalense*, *A. crispum*, *A. socotranum* and *A. arabicum*) are used for ornamental and pharmacological purposes, but, despite the commercial exploitation being recent, the growth in the floriculture market is great. In addition to being an exuberant plant with distinct and sculptural stems, they present flowers with a wide diversity of colors and shapes. Despite the growing investment in the desert rose production chain, basic information about the group's genetics is scarce. Data on chromosome number and morphology, organization of karyotypes, distribution patterns of heterochromatic bands, ribosomal DNA sites and satellite DNA and estimates of nuclear DNA content are important to understand the evolution of plant groups and the systematic organization of plants. Thus, the lack of use of these tools in botanical genera such as *Adenium* has limited our understanding of the evolution of these genomes. In this sense, the present work adds cytogenomic knowledge to compare two species that differ in terms of ploidy level. The cytogenetic analysis showed karyotypes with predominance of meta and submetacentric chromosomes, $2n=2x=22$ (11 m + 11 sm) in *A. obesum* and $2n=4x=44$ (40 m + 4 sm) in *A. arabicum*, with genomes varying from $2C=2.06$ pg in *A. obesum* to $2C=2.91$ in *A. arabicum*. There is a predominance of DAPI+ bands (AT-rich) in the proximal region of the chromosomes, and CMA+ bands (GC-rich) in the terminal regions. In interphase, the chromocenters concentrated bands rich in AT (DAPI+), always with GC-rich bands (CMA+) positioned on the periphery of the chromocenters. The diploid species *A. obesum* has four rDNA sites, while the polyploid *A. arabicum* has eight sites, located in the terminal fraction of the chromosomes. The rDNA sites are co-located in GC-rich blocks (CMA+). The analyzes suggest that, despite the polyploidy, there was a reduction in the DNA content of *A. arabicum*, considering the DNA content in the

monoploid complement, although the profile of CMA/DAPI bands in *A. obesum* and *A. arabicum* have been relatively similar.

Keywords: Apocynaceae, CMA/DAPI bands, flow cytometry, chromocenters, rDNA, FISH, desert rose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Características morfológicas de <i>Adenium obesum</i>	19
Figura 2 Características morfológicas de <i>Adenium arabicum</i>	20

CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E GENÔMICA DE *Adenium obesum* E *A. arabicum* (APOCYNACEAE)

Figura 1 Análises citogenéticas em <i>A. obesum</i> e <i>A. arabicum</i>	70
Figura 2 Idiogramas dos cariótipos e gráficos de citometria de fluxo em <i>A. obesum</i> e <i>A. arabicum</i>	71
Figura 3 Bandeamento DAPI e CMA	72
Figura 4 Bandeamento DAPI e CMA em células de anteras	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	Adenina e Timina
Blast	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DAPI	2, 4-6 diamidino-2-fenilindol
DNAc	DNA complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNAr	DNA ribossômico
DNAsat	DNA satélite
dNTP	Dinucleotídio Trifosfato
CMA	Cromomicina A3
ETs	Elementos Transponíveis
ERV	<i>Endogenous retrovirus</i>
FISH	Hibridização in situ fluorescente (<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>)
GC	Guanina e Citosina
IGS	Regiões do Espaçador Intergênico
ITS	Regiões Transcritas Internas
LINE	Sequências Longas Interespaçadas (<i>Long Interspersed Nuclear Element</i>)
LTR	Sequências Terminais Repetidas (<i>Long Terminal Repeat</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NORs	Regiões Organizadoras do Nucléolo (NORs)
NTS	Regiões Não Transcritas
Mb	Megabases
pb	Pares de Base
pg	Picogramas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
μL	Microlitro
μm	Micrometro
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
SINE	Sequências Curtas Interespaçadas (<i>Short Interspersed Nuclear Element</i>)
SSR	Sequências Simples Repetidas (<i>Simple sequence repeat</i>)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TIRs	Terminais Invertidos Repetidos (<i>Terminal inverted repeats</i>)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
REFERENCIAL TEÓRICO	16
O segmento de plantas ornamentais.....	16
O setor das plantas ornamentais no Brasil	17
Aspectos gerais e taxonômicos da família Apocynaceae e do gênero <i>Adenium</i>	18
Importância da citogenética no estudo botânico	20
Características citogenéticas em Apocynaceae e <i>Adenium</i>	22
Os genomas das plantas	24
<i>Heterocromatina em Apocynaceae</i>	26
<i>Organização e distribuição do DNAr</i>	27
Justificativa	28
OBJETIVOS	29
Objetivo geral.....	29
Objetivos específicos	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
Capítulo 1	42
CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E GENÔMICA DE <i>Adenium obesum</i> E <i>A. arabicum</i> (APOCYNACEAE)	42

INTRODUÇÃO

Os genomas vegetais são compostos por uma fração de DNA não repetitiva, ricas em genes, que se apresenta menos condensada em intérfase, e outra repetitiva, representada por sequências de diferentes origens, hiperacumulada nos genomas, com centenas a milhares de cópias, agrupadas ou dispersas nos cromossomos que, em geral, permanecem condensadas na intérfase (BISCOTTI *et al.*, 2015). Parte da fração mais condensada e reconhecida por técnicas de bandeamento cromossômico é denominada heterocromatina. Essa fração é pobre em genes constitutivos e rica em famílias de DNA satélite e elementos de transposição (GUERRA, 2000). Outras frações repetitivas podem conter genes importantes para a sobrevivência das células, como por exemplo a fração moderadamente repetitiva contendo os genes de DNA ribossômico (HESLOP-HARRISON; SCHMIDT, 2012; BISCOTTI *et al.*, 2015). O acúmulo diferenciado desses elementos repetitivos, em geral decorrentes de alterações cromossômicas estruturais, como ampliações, deleções, crossing-over desigual e recombinação não homóloga, juntamente com a poliploidia, são os principais fatores envolvidos na variação no tamanho dos genomas vegetais (VICIENT; CASACUBERTA, 2017; PELLICER *et al.*, 2018).

Os DNA repetitivos mais abundantes nas plantas são os elementos de transposição (ETs). Com base nos mecanismos de transposição e composição enzimática, foram classificados em duas grandes classes. Os elementos de classe I, ou retrotransposons e elementos de classe II, ou transposons (WICKER *et al.*, 2007; JOLY-LOPEZ; BUREAU, 2014). Os ETs podem ocupar diferentes regiões nos cromossomos, aparecendo dispersos ou localizados. Um exemplo é a localização centromérica dos retrotransposons *Gypsy CRM* (OLIVEIRA; TORRES, 2018; TALBERT; HENIKOFF, 2020). Estudos recentes têm demonstrado que os elementos de transposição têm interações complexas com genes e podem contribuir com variações regulatórias na expressão gênica, sendo capazes de gerar novos genes, alterar grupos de ligação e relações de territórios cromossômicos e, dessa forma, contribuir para a adaptação das plantas frente a alterações ambientais, e assim interferir na evolução dos genomas (MAKAREVITCH *et al.*, 2015; SAHEBI *et al.*, 2018; QUADRANA, 2020).

Há muitos casos relacionando DNAsat e ETs com regiões de heterocromatina, sejam elas encontradas em centrômeros ou telômeros, por exemplo (LIPPMAN *et al.*, 2004; GREWAL; JIA, 2007). Contudo, a atividade dos ETs geralmente é reprimida por mecanismos de

condensação de cromatina, por pequenos RNAs de interferência e silenciamento epigenético (SIGMAN; SLOTKIN, 2016).

A distribuição e constituição da heterocromatina pode ser variável entre espécies de um gênero, o que a torna importante para estudos citogenéticos comparativos (GUERRA, 2000). A família Apocynaceae está organizada em 550 gêneros e 5.100 espécies, e é uma das maiores famílias das angiospermas (RAPINI *et al.*, 2004; ENDRESS; LIEDE-SCHUMANN; MEVE, 2014; SANTOS; SILVA; ALMEIDA, 2020). Algumas espécies são utilizadas como ornamentais, como coração emaranhado (*Ceropegia linearis* E. Mey.), flor de cera (*Hoya carnosa* L.), dipladênia (*Mandevilla laxa* Ruiz & Pavon Woodson), espirradeira (*Nerium oleander* L.) (COLOMBO *et al.*, 2018). Contudo, há espécies ornamentais tóxicas e outras com utilização farmacológica, como por exemplo, maria sem vergonha (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don f.) (WONG; LIM; CHAN, 2013) e *Adenium* Roemer & Schult (SULEIMAN; BRIMA, 2021).

Dados citogenéticos em Apocynaceae são escassos, especialmente sobre a organização dos cariótipos, distribuição cromossômica da fração repetitiva e estimativas do conteúdo de DNA nuclear (SANTOS; SILVA; ALMEIDA, 2020). Tais informações são importantes para entender a evolução de grupos vegetais e a organização sistemática das plantas (GUERRA, 2008; MATA-SUCRE *et al.*, 2020). Assim, a carência no emprego dessas ferramentas em plantas com potencial crescimento no mercado floricultor e uso farmacológico como o gênero *Adenium*, tem limitado a compreensão e as relações desses cariótipos e genomas.

Nesse contexto, algumas questões foram elaboradas para conduzir esse estudo: i) Como estão organizados os cariótipos de *Adenium*? ii) Existem relações entre o complemento cromossômico e o conteúdo de DNA? iii) Como está distribuída a diversidade heterocromática no gênero? São ricas em bandas CMA/DAPI? iv) Espécies distintas compartilham a mesma localização do DNAr 35S? v) Há relação entre os sítios de DNAr 35S e as bandas CMA/DAPI? Para elucidar essas questões, técnicas de citogenômica comparativa foram utilizadas na caracterização de duas espécies do gênero *Adenium* (*A. obesum* e *A. arabicum*) da família Apocynaceae.

REFERENCIAL TEÓRICO

O segmento de plantas ornamentais

Desde a antiguidade, as plantas são usadas como adornos em estruturas arquitetônicas por estabelecer um maior contato do humano com a natureza, tornando os ambientes mais vistosos e agradáveis (WEISS, 2002). Ao longo da história, plantas e flores de diferentes grupos estéticos apresentam grande importância para a humanidade, o que fortaleceu o setor de floricultura (AKI; PEROSA, 2002; LANDGRAF; PAIVA, 2010; SHARROCK *et al.*, 2014).

As plantas ornamentais apresentam elevado valor comercial e ciclo de produção relativamente curto, o que possibilita um movimento constante de capital e breve retorno econômico em relação aos valores investidos, com lucro superior às outras culturas, como a de hortaliças e oleaginosas (JUNQUEIRA; PETZ, 2008). Assim, a floricultura pode ser uma alternativa emergente na distribuição de renda para pequenos produtores, na redução do êxodo rural e na valorização de pequenas propriedades. De fato, investimentos nesse setor podem ser capazes de reduzir os impactos negativos da crise econômica e financeira no país (JUNQUEIRA; PETZ, 2014; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2015).

No Brasil, cerca de 350 espécies ornamentais nativas e exóticas adaptadas são cultivadas por cerca de 8 mil produtores em uma área equivalente a 15.000 hectares. O mercado de flores é responsável pela maior parcela de trabalho formal e permanente na agricultura, com 215 mil empregos, utilizando de 15 a 20 pessoas por hectare. Esse grande número de trabalhadores por área se dá pela necessidade de tratamentos culturais específicos e manuais (IBRAFLOR, 2021).

O setor de floricultura é reconhecido também por englobar atividades relevantes às questões sociais, culturais e ecológicas (TERRA; ZÜGE, 2013). Do ponto de vista social, a cadeia produtiva contribui para a igualdade de gênero ao favorecer a inserção das mulheres no mercado de trabalho, já que 80% do número total de empregos gerados é feminino, resultado normalmente incomum nas demais atividades agrícolas do país (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2015). É importante mencionar que o uso do solo e da água acontece de maneira moderada em relação às outras culturas, pois as plantas ornamentais ocupam áreas menores. Além dessa atividade exercer menor pressão sobre os recursos naturais, há também o uso mais eficiente e moderado de fertilizantes (MARQUES; CAIXETA-FILHO, 2002).

O setor das plantas ornamentais no Brasil

A produção de flores e plantas ornamentais vêm acompanhando a tendência de expansão do mercado mundial, sendo considerada um dos mais promissores segmentos do agronegócio brasileiro. Estima-se que, mesmo durante a crise econômica dos últimos anos, o setor vivencia números extremamente significativos. O faturamento desta atividade no país, desde a década de 90, vem apresentando um crescimento de 15% ao ano, com lucro de R\$ 10,9 bilhões em 2021 (IBRAFLOR, 2021).

A demanda mundial por flores e plantas ornamentais tem aumentado de maneira significativa, mas 97% dos valores anuais de comercialização são essencialmente focados no consumo interno, deixando margem para um crescimento ainda maior, com a possibilidade de exportação (OLIVEIRA *et al.*, 2021; IBRAFLOR, 2021). O Brasil possui vantagens para a produção de flores, como diversidade de microclimas, disponibilidade de áreas agricultáveis, água em abundância, mão de obra, desenvolvimento tecnológico e infraestrutura, capaz de proporcionar uma distribuição adequada dos produtos (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011). Apesar da importância para o ramo agroindustrial, há a necessidade de criar novas oportunidades de negócios e de inserção comercial competitiva aos polos emergentes, como o investimento em pesquisa (PINTO; GRAZIANO, 2003; JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

A exploração comercial de espécies do gênero *Adenium* é recente, e há potencial de crescimento no mercado floricultor. São plantas com caules trabalhados, que permitem a técnica de bonsai e enxerto. Talvez um dos pontos mais fortes seja a obtenção de várias cores de flores em uma única planta com a técnica de enxertia. Os exemplares de rosa do deserto com maior tempo de cultivo, bem trabalhadas e mais raras, alcançam preços exorbitantes (DOS REIS PORTES, 2018).

Além do aspecto ornamental, a rosa do deserto representa também uma fonte de fitoquímicos com potenciais farmacêuticos, como ação anticâncer, antiviral, antibacteriana, tripanocida, acaricida e antioxidante (DIPAK; KARABI; SANKAR, 2015). Apesar da crescente importância de *Adenium* no mercado floricultor brasileiro, trabalhar com esse grupo ainda é considerado um desafio, diante da carência de informações (TIAGO-NETO *et al.*, 2017).

Aspectos gerais e taxonômicos da família Apocynaceae e do gênero *Adenium*

A família Apocynaceae está subdividida em cinco subfamílias; Apocynoideae, Asclepiadoideae, Rauvolfioideae, Periplocoideae e Secamonoideae (ENDRESS; BRUYNS, 2000; ENDRESS; LIEDE-SCHUMANN; MEVE, 2014). Apocynaceae está organizada em 550 gêneros e 5.100 espécies, com hábito variável, desde pequenas ervas, lianas, arbustos, suculentas, plantas herbáceas e árvores em sua maioria latescentes (RAPINI *et al.*, 2004; ENDRESS; LIEDE-SCHUMANN; MEVE, 2014). Este grupo apresenta distribuição cosmopolita, com exceção da Antártica (SOUZA; LORENZI, 2008; SANTOS-TRINDADE, 2014).

Algumas espécies são utilizadas como ornamentais, como ameixa de natal (*Carissa spectabilis* Sond. Pichon), coração emaranhado (*Ceropegia linearis* E. Mey.), trombeta (*Beaumontia grandiflora* Wallich), flor de cera (*Hoya carnosa* L.), dipladênia (*Mandevilla laxa* Ruiz & Pavon Woodson), espirradeira (*Nerium oleander* L.), palmeira de madagascar (*Pachypodium saundersii* N.E. Br.) e chapéu de napoleão (*Thevetia peruviana* Pers. Merr.) (COLOMBO *et al.*, 2018). Contudo, há espécies ornamentais tóxicas como por exemplo, dedal de dama (*Allamanda cathartica* Linn.), maria sem vergonha (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don f.), jasmim manga (*Plumeria rubra* L.) (WONG; LIM; CHAN, 2013) e *Adenium* Roemer & Schult (SULEIMAN; BRIMA, 2021).

O gênero *Adenium* compreende 9 espécies: *A. oleifolium* Stapf, *A. swazicum* Stapf, *A. boehmianum* (Schinz) G.D. Rowley, *A. multiflorum* Klotzsch, *A. obesum* (Forssk.) Roem. & Schult, *A. somalense* (Balf.f.) Rowley, *A. crispum* Chiov, *A. socotranum* (Vierh.) Lavranos e *A. arabicum* Balf.f (DIMMITT; JOSEPH; PALZKILL, 2009). Essas espécies são originárias das regiões semiáridas da África a Ásia e, em menção ao seu local de origem, as espécies do gênero são conhecidas como rosas do deserto. Essas possuem hábito herbáceo, suculentas, de aspecto escultural, variável, paquicaule, que atuam como reservatório de água e nutrientes (**Figuras 1A e 2A**) (COLOMBO *et al.*, 2018). As rosas do deserto possuem folhas verde-escuras caduciformes, com flores diclamídeas, pentâmeras, com variações de cores e formas (SILVEIRA, 2016; COLOMBO *et al.*, 2018). Em território nacional, as florações ocorrem nos períodos mais quentes do ano, entre verão e outono. Em decorrência da ausência de polinizador natural, já que tratam-se de espécies exóticas, a produção de sementes ocorre via da polinização artificial (COLOMBO *et al.*, 2018; SKILLIN, 2021). As sementes são aladas e

as cápsulas apresentam em média 30 centímetros (**Figuras 1D e 2D**) (SENNBLAD; BREMER, 1996).

Os estames são em forma de cone e as anteras apresentam fendas voltadas para o estigma da flor (SKILLIN, 2021). O ovário é sincárpico e o fruto apocárpico do tipo cápsula que, ao atingir a maturação em cerca de 90 dias, abre-se longitudinalmente pela linha de união dos carpelos, podendo produzir até 200 sementes (**Figuras 1 e 2 - C e D**) (DIMMITT; JOSEPH; PALZKILL, 2009). A propagação da espécie ocorre por estaquia, enxertia e sementes (COLOMBO *et al.*, 2018).

Adenium arabicum diferencia-se das demais espécies por apresentar caule de formato globular, com ramificações que partem da base do caule. As folhas são pilosas e as flores são rosa-pálidas. As sementes apresentam até 3 vezes o tamanho das demais espécies de *Adenium* (SURADINATA; AMALIA; NURAINI, 2017).



Figura 1. Características morfológicas de *Adenium obesum*. **A-** Planta adulta. **B e C-** Morfologia floral. **D-** Cápsulas: evidenciando sementes. Barra 1 cm. Fonte: Próprio autor.

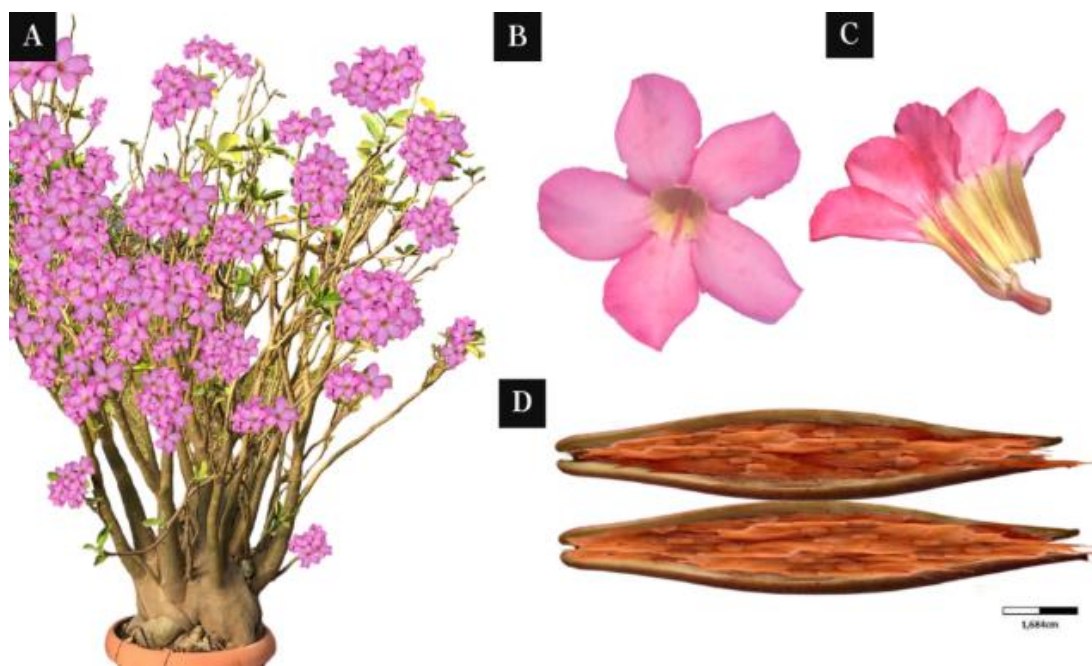


Figura 2 Características morfológicas de *Adenium arabicum*. **A**- Planta adulta. **B** e **C**- Morfologia floral. **D**- Cápsulas: evidenciando sementes. Barra padrão_1 cm. Fonte: Próprio autor.

Importância da citogenética no estudo botânico

Os cariótipos, ou conjuntos cromossômicos, podem variar quanto ao número, tamanho e forma dos cromossomos, em todos os estratos taxonômicos. Tais variações podem ser o resultado de muitas forças que atuam sobre os genomas em termos estruturais, organizacionais e funcionais (GUERRA, 2000). Assim, a análise da estabilidade ou variação cariotípica pode auxiliar na descrição e delimitação de padrões, bem como no reconhecimento de espécies e populações (HENEIDAK *et al.*, 2019).

Dados citogenéticos como número e morfologia cromossômica, organização dos cariótipos, padrões de distribuição de bandas heterocromáticas, famílias de DNA repetitivo, sítios de DNAr e DNA satélites, assim como as estimativas do conteúdo de DNA nuclear, são úteis em comparações genéticas e citotaxonômicas (GUERRA, 2008). Tais informações podem revelar aspectos da evolução de grupos vegetais e ajudar a organizar a sistemática das plantas (GUERRA, 2008; MATA-SUCRE *et al.*, 2020).

Nesse sentido, a aplicação dessas ferramentas em grupos botânicos poucos explorados pela citogenética, como as Apocynaceae, é de extrema importância. Assim, como visto em Solanaceae, com diversos estudos citogenômicos em gêneros de importância comercial, como

S. tuberosum L. (batata), *S. melongena* L. (berinjela), *Capsicum* L. (pimentas), *Solanum lycopersicum* L. (tomate), *Physalis* L. (juá), *Nicotiana* L. (tabaco), *Petunia* Juss. (petúncias) e o *Cestrum* L. (damas-da-noite) (OLMSTEAD, 2008; LIMA, 2017). Em *Physalis* o uso de ferramentas citogenômicas analisou a diversidade genética e a possibilidade de cruzamento entre as espécies com base no número e na semelhança cromossômica. Tais informações auxiliaram nas conduções de programas de melhoramento e hibridação das espécies (ARAÚJO, 2012).

Variações nos níveis de ploidia podem ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento das espécies vegetais (NOVIKOVA; HOHMANN; VAN DE PEER, 2018). Mas, em geral, tais alterações são fixadas nas populações quando essas atingem o trato reprodutivo e vencem as barreiras pré e pós-zigóticas. Poliploidia, aneuploidia e disploidia são variações numéricas importantes na especiação e diversificação das plantas (SOLTIS; SOLTIS, 2004; SOLTIS; SOLTIS, 2009; DE STORME; MASON, 2014). Cerca de 80% das espécies de plantas vasculares existentes são poliploides (MASTERSON, 1994; MOGHE; SHIU, 2014). Essa abundância de poliploides em espécies selvagens sugere vantagens evolutivas, que permitiram adaptações em novos nichos ecológicos em decorrência do maior número de genes disponíveis, independente ou não de fenótipos similares aos progenitores diploides (HEGARTY; HISCOCK, 2008; AVERSANO *et al.*, 2012).

Organismos poliploides são aqueles que apresentam mais de dois conjuntos cromossômicos nos núcleos (RANNEY, 2006; CHEN, 2010). De acordo com a origem da poliploidia, as espécies podem ser classificadas como autopoliploides, quando os conjuntos extras têm origem no mesmo genoma, e alopoliploides, quando os genomas são originados por meio da hibridação interespecífica (TAMAYO-ORDÓÑEZ *et al.*, 2016). De acordo com o número de conjuntos cromossômicos, os poliploides são classificados em triploides (3x), tetraploides (4x), hexaploides (6x), e assim por diante (OLSEN; RANNEY; VILORIA, 2006).

Além da poliploidia, há alterações relacionadas ao ganho ou perda de um ou mais cromossomos. Essas são chamadas de disploidia e aneuploidia. No primeiro caso, as modificações numéricas são causadas por rearranjos, como fusões que levam a variação decrescente (diminuição do número), e fissões que levam a uma variação crescente ou aumento no número cromossômico (GUERRA, 2008; UDALL *et al.*, 2019). As alterações cromossômicas associadas à disploidia podem consistir em alterações neutras, e não contribuir para os processos de especiação (ESCUADERO *et al.*, 2014), como visto na espécie holocêntrica *Eleocharis maculosa* (DA SILVA; GONZÁLEZ-ELIZONDO; VANZELA,

2008), por exemplo. No segundo caso, a aneuploidia, é um evento que leva ao ganho ou perda de um ou mais cromossomos, provocado pela não disjunção durante as divisões celulares. Isso pode ocorrer pelo retardo cromossômico, formação irregular das fibras do fuso ou outros eventos (NASMYTH; HAERING, 2009; SIEGEL; AMON, 2012). A aneuploidia é organizada em quatro tipos: nulissomia (perda de um par homólogo), monossomia (perda de um único cromossomo), trissomia (ganho de um único cromossomo) e tetrassomia, quando há o ganho de 2 cópias de cromossomos homólogos (ZHANG *et al.*, 2013). Os aneuploides podem apresentar genomas muitas vezes desbalanceados (SIEGEL; AMON, 2012), e parecem ser mais tolerados em poliploides (GUERRA, 2008).

Características citogenéticas em Apocynaceae e *Adenium*

Na família Apocynaceae os números básicos variam de $x=8, 9, 10$ e 11 , sendo $x=11$ considerado o número primitivo na família, aparecendo em cerca de 60% dos gêneros (ALBERS; MEVE, 2001; MOTOHASHI *et al.*, 2008). Embora pouco estudadas, as Apocynaceae parecem apresentar cariótipos relativamente homogêneos em termos intragenéricos, quando comparados com gêneros distintos. A variação numérica vai de $2n=10$ no gênero *Rhabdadenia* Müll. Arg. (SOUZA; 2015) a $2n=88$ em *Rauvolfia* L. (VAN DER LAAN; ARENDS 1985). A maioria dos gêneros são caracterizados por um número básico constante (VAN DER LAAN; ARENDS, 1985). Mas, variações cromossômicas numéricas são observadas em *Plumeria* L. com $2n=36$ e 54 (CHAUHAN; RAGHUVANSHI, 1977), *Asclepias* L. com $2n=22$ e 24 (MOYER, 1936) e *Allamanda* L. com $2n=18, 22$ e 36 (BRITO *et al.*, 2014; SAENSOUK; SAENSOUK, 2021).

Variações numéricas foram atribuídas à eventos de aneuploidia, dispoloidia e poliploidia. As espécies poliploides são principalmente tetraploides com $2n=4x=44$, mas há também registros de octaploides, como no gênero *Rauvolfia* L. com $2n=8x=88$ (ALBERS; MEVE, 2001). Poliploidia intra e interespecíficas parecem ser importantes na diferenciação cariotípica de algumas Apocynaceae, como nos gêneros *Kopsia* Dumort. ($2n=36$ e 72), *Catharanthus* G. Don ($2n=16, 24$ e 32) e *Ceropegia* L. com $2n=22$ e 44 (VAN DER LAAN; ARENDS, 1985; MEVE; LIEDE-SCHUMANN, 2007).

Cariótipos com $2n=2x=22$ também foram observados nas subfamílias monofiléticas Rauvolfioideae e Apocynoideae (LIVSHULTZ *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2016). Na subfamília Apocynoideae, que engloba a tribo Nerieae com os gêneros *Nerium* L. e *Adenium*,

o número diploide $2n=2x=22$ é comum (VAN DER LAAN; ARENDS, 1985), assim como poliploides (*A. swazicum*) com $2n=4x=44$ (DAS; MOHANTY; DAS, 1999). Para esse grupo, $x=11$ é considerado o número cromossômico básico da tribo Nerieae (ALBERS; MEVE, 2001).

As informações cariotípicas em *Adenium* são limitadas, e o estudo mais abrangente foi publicado por Das, Mohanty e Das (1999). Esses autores também estimaram a quantidade de DNA 4C em 6 espécies: *A. arabicum*, *A. obesum*, *A. multiflorum*, *A. somalense*, *A. speciosum* e *A. swazicum*. O gênero *Adenium* apresenta cariótipos assimétricos e predominância do número cromossômico $2n=2x=22$, como é o caso da *A. obesum* e *A. arabicum*, com exceção de *A. swazicum* com $2n=4x=44$ (DAS; MOHANTY; DAS, 1999).

As Apocynaceae exibem, em geral, cariótipos com cromossomos submetacêntricos e metacêntricos, com variação no tamanho dos cromossomos de 0,5 μm a 3,5 μm (ENDRESS; BRUYNS, 2000; ENDRESS; LIEDE-SCHUMANN; MEVE, 2014). Na maioria dos gêneros, os cromossomos são pequenos de difícil contagem e mensuração (VAN DER LAAN; ARENDS, 1985). Em alguns casos, os comprimentos médios dos cromossomos são maiores que o encontrado para a família Apocynaceae, como em *Gomphocarpus sinaicus* (Boiss.) Muschl. (Subfamília Asclepiadoideae) com 9 μm e em três espécies de suculentas; *Caudanthera sinaica* (Dec.) A. Berger, *C. edulis* (MEVE; LIEDE-SCHUMANN, 2007) e *Desmidorchis acutangula* (Decne) com 7,25 μm , 6,14 μm e 5,38 μm (HENEIDAK *et al.*, 2019).

Espécies de *Nerium* apresentam cariótipos simétricos com cromossomos metacêntricos pequenos e variação de 0,8 μm a 1,6 μm (CHAUHAN; RAGHUVANSHI, 1977; EBRAHIMI; GHORBANI NOHOOJI; MIRI, 2021). Em *Adenium* há variação de 1,3 μm a 3,2 μm (ROY TAPADAR, 1964) e 1,21 μm a 2,55 μm (DAS; MOHANTY; DAS, 1999). Há um relato com híbridos de *A. obesum* com variação cromossômica de 2,56 a 5,13 μm (HASTUTI; SURANTO; SETYONO, 2009). Estes dados quando comparado com estudos anteriores diferem do esperado para o grupo (MOTOHASHI *et al.*, 2008). Provavelmente, a variação no tamanho dos cromossomos relatada em Hastuti, Suranto e Setyono (2009) deva ser decorrente de medições em cromossomos com diferentes níveis de condensação, como já apontado por Van der Laan e Arends (1985).

Estimativas de conteúdo de DNA no gênero *Adenium* ainda são escassas, com apenas registros de valores 4C utilizando a técnica de microdensitometria por Feulgen. De acordo com Das, Mohanty e Das (1996), o conteúdo 4C de DNA foi de 12,76 pg em *A. arabicum*,

13,94 em *A. obesum*, 10,96 em *A. multiflorum*, 11,75 em *A. somalense*, 14,49 em *A. speciosum* e 18,37 no poliploide *A. swazicum*, o que equivale a um valor 2C médio de ~6,86 pg. Na família Apocynaceae, as estimativas dos tamanhos dos genomas por citometria de fluxo mostram que o conteúdo de DNA 2C varia de 0,60 no gênero *Apocynum* L. (BAI *et al.*, 2012) a 4,90 pg em *Hoodia gordonii* Masson (ZONNEVELD; LEITCH; BENNETT, 2005).

Os genomas das plantas

Os genomas das plantas são compostos por sequências codificantes e não codificantes, as quais encontram-se distribuídas ao longo dos cromossomos. A cromatina ativa ou potencialmente ativa, é rica em genes e mais descondensada em intérfase, enquanto que a fração pobre em genes constitutivos e rica em DNA repetitivo, aparece mais condensada. Um exemplo dessa fração mais condensada é a heterocromatina (KUBIS; SCHMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998; GUERRA, 2008; HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011; HESLOP-HARRISON; SCHMIDT, 2012), que pode conter desde DNA satélite até elementos transponíveis (CONTENTO; HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2005; SHCHERBAN, 2015). Muitas das regiões cromossômicas que concentram famílias repetitivas de DNA podem ser ricas em DNA moderadamente repetitivo, composta por genes de DNA ribossômicos (DNAr) e outros genes importantes para a manutenção celular (histonas e de citoesqueleto) (SHCHERBAN, 2015).

Os elementos transponíveis são sequências de repetições dispersas e, com base em seu mecanismo básico de transposição e sua composição enzimática, foram classificados em duas grandes classes. Os elementos de classe I ou retrotransposons, se movimentam nos genomas utilizando um mecanismo de “copia e cola”, via RNA intermediário modulado pela transcriptase reversa. Os elementos de classe II, ou transposons, movimentam-se por meio de um mecanismo de “corta e cola”, no qual o elemento é excisado de uma região e reintegrado em outra utilizando a enzima transposase (WICKER *et al.*, 2007; JOLY-LOPEZ; BUREAU, 2014). As atividades dos elementos transponíveis podem influenciar na quantidade do genoma nuclear, e alterar a expressão de genes, a depender do ponto de inserção no genoma (VICIENT; CASACUBERTA, 2017). No entanto, a maioria dos elementos transponíveis são inativos, em decorrência de mutações que alteram sua estrutura, por mecanismos epigenéticos que levam ao silenciamento, ou pela inserção em regiões não gênicas e inativas (BENNETZEN, 2000; BENNETZEN; WANG, 2014). Os retrotransposons com LTR,

especialmente os das superfamílias *Copia* e *Gypsy*, são os mais abundantes nos genomas vegetais. Membros das classes I e II diferem pelo número e ordem das sequências que codificam para as proteínas funcionais, presença ou ausência de LTRs (*long terminal repeats*), TIRs (*terminal inverted repeats*), entre outras características, e as relações entre esses elementos são usualmente estabelecidas pelas análises e alinhamento de suas sequências (NEUMANN *et al.*, 2019).

Como mencionado anteriormente, a poliploidia é o principal mecanismo que aumenta o conteúdo de DNA nos genomas das plantas, mas, de maneira secundária, variações na fração de DNAs repetitivos, pelo acúmulo ou eliminação de *repeats*, deleções, ampliações, crossing-over desigual, recombinação não homóloga e ilegítima, são importantes fatores que provocam a diferenciação genômica (GROVER; WENDEL, 2010; BENNETZEN; WANG, 2014). Informações sobre a distribuição cromossômica da fração repetitiva na família Apocynaceae ainda são limitadas, há dados mostrando que a proporção de DNA repetitivo pode variar dentro dos gêneros. De acordo com Santos, Silva e Almeida (2020), a fração repetitiva ocupa desde 51% do genoma de *Asclepias syriaca* (L.) e até 20% do genoma de *Hancornia speciosa* (Gomes).

A fração de DNA satélites, ou DNAsat, também desempenha um papel considerável na diferenciação dos genomas vegetais. Essa fração é composta por uma diversidade de monômeros organizados em *tandem*, não codificantes, cuja composição (tamanho, número e posição dos monômeros) varia entre as espécies, acompanhando, em geral, a filogenia (GARRIDO-RAMOS, 2015). Em teoria, os monômeros de DNAsat podem ter tamanhos variados, a partir de 30 pb, sendo as sequências mais curtas conhecidas como microsátélites (SSR <10 pb) e minisátélites (>10 pb), mas o que mais importa não é o tamanho dos repeats, mas sim o modo de amplificação e distribuição nos cromossomos (GARRIDO-RAMOS, 2017; THAKUR; PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021). As repetições de DNAsat se acumulam nas regiões de heterocromatina, e são encontradas formando blocos nos centrômeros, pericentrômeros e subtelômeros, enquanto os microsátélites e minisátélites têm um perfil mais disperso, ocorrendo em regiões pericentroméricas, intersticiais e subteloméricas (HOUBEN *et al.*, 2007; GARRIDO-RAMOS, 2017). Espécies próximas podem conter as mesmas sequências satélites, mas isso não é uma regra. Algumas famílias de DNAsat podem apresentar pouca divergência entre as sequências, e uma alta similaridade intra e interespecífica, mas isso também não é uma regra (GARRIDO-RAMOS, 2017; THAKUR *et al.*, 2021).

Heterocromatina em Apocynaceae

A heterocromatina é caracterizada por ser uma região de cromatina altamente condensada, replicação tardia, rica em DNAs repetitivos, altamente metilada, comumente associada ao silenciamento transcricional. Essa região é evidenciada pela técnica de bandeamento C, na qual apresenta um padrão de coloração denso, diferente do observado no restante dos cromossomos (RICHARDS; ELGIN, 2002; HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011). A distribuição e constituição da heterocromatina pode ser variável entre espécies de um gênero (GUERRA, 2000), podendo ser ricas em AT ou GC e formar blocos ou faixas em diferentes regiões cromossômicas (proximal, intersticial e terminal). A caracterização e distribuição da heterocromatina pode ser avaliada com o uso de técnicas convencionais, como bandeamento C-Giemsa, com fluorocromos CMA (cromomicina A3) e DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol), ou por técnicas citomoleculares, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNA satélite, ou por imunolocalização de histonas modificadas (GUERRA, 2000; BRASZEWSKA-ZALEWSKA; DZIURLIKOWSKA; MALUSZYNSKA, 2012; LIU; MIN, 2016; ZHOU *et al.*, 2020). Dados de bandeamento cromossômico em Apocynaceae, embora limitados, mostram uma distribuição variável da heterocromatina. Guimarães *et al.* (2012) mostraram que em *Catharanthus roseus*, o bandeamento C seguido de coloração DAPI revelaram regiões paracentroméricas ricas em AT em quatro pares cromossômicos. A medição dessas regiões sugere que 20% do comprimento total do complemento cromossômico equivalem às bandas DAPI. Dados similares foram publicados por Datta *et al.* (2020), porém, esses autores associaram a heterocromatina aos cromocentros nos núcleos interfásicos. Sinais DAPI e CMA positivos foram observados em intérfase, prófase e metáfase. Datta *et al.* (2020), também associaram as diferenças nas regiões ricas em GC e AT aos tipos florais de cores branca e rosa. No tipo floral rosa foram observados um total de 7 bandas CMA⁺ nas regiões terminais de braços curtos dos pares 4, 6 e 7, enquanto no cromossomo 8, apenas um homólogo apresentava bandas, indicando possivelmente uma deleção. No tipo floral branco 4 bandas CMA⁺ foram encontradas também nas regiões terminais. As bandas apareceram nos pares 4 e 6. Um maior número de bandas DAPI⁺ foi observada no tipo floral branco (10) quando comparado ao tipo floral rosa (6). Porém, no tipo floral rosa as bandas DAPI⁺ foram terminais, nos braços curtos dos pares 5, 6 e 8, enquanto que no tipo floral branco as bandas DAPI⁺ apareceram nas regiões centroméricas dos pares 1, 4, 5, 7 e 8. O estudo de Datta *et al.* (2020) sugere que há diversidade no número de bandas AT e GC, mesmo em genomas semelhantes.

O estudo mais detalhado com bandeamento na família Apocynaceae, trouxe um apanhado de 15 espécies representando 8 gêneros, com números diploides variando de 18 a 34 (SANTOS, 2017). As espécies apresentaram uma elevada variabilidade quanto ao número, padrão e distribuição de bandas heterocromáticas. As bandas CMA⁺ ocorreram em todas as espécies analisadas e variaram de 2 a 18, localizadas em regiões terminais e paracentroméricas. Algumas espécies apresentaram bandas ricas em GC em duas posições (paracentroméricas e/ou terminais) e nenhuma banda DAPI⁺. Há casos, particulares como em *Temnadenia stellaris* (Lindl. Miers) com 18 bandas paracentroméricas CMA⁺ e *P. peltatus* com 34 bandas terminais DAPI⁺. Foi observado heterocromatina associada a RONs em (*Mandevilla tenuifolia* (Woodson), *Aspidosperma pyriformium* (Mart. & Zucc.), *Temnadenia stellaris* e *Tabernaemontana catharinensis* (A. DC.) e a sítios de DNAr. Bandas DAPI⁺ também variaram, de 2 a 34, em regiões terminais e paracentroméricas. Algumas espécies como *Mandevilla leptophylla* (A. DC. K. Schum.), *Peltastes peltatus* (Vel. Woodson) e *Petalostelma dardanoi* (Fontella) apresentaram blocos heterocromáticos paracentroméricos, ocupando quase a totalidade de alguns cromossomos (SANTOS, 2017).

Organização e distribuição do DNAr

Os DNAs ribossômicos são sequências gênicas presentes nos genomas em inúmeras cópias, organizadas em *tandem*. As regiões codificadoras dos genes de DNAr são constituídas por sequências altamente conservadas entre as espécies, e úteis como marcadores cromossômicos em estudo comparativo e filogenético (HEMLEBEN *et al.*, 2021). Dois tipos de DNAr estão presentes nas plantas, o DNAr 35S e 5S (GARCIA; KOVARIK, 2013). O DNAr 35S é organizado em subunidades formadas por regiões codificadoras dos genes 18S, 5.8S e 26S, regiões transcritas internas (ITS1 e ITS2), transcritas externa (ETS) e não transcrita (NTS) do espaçador intergênico (IGS) (HEMLEBEN *et al.*, 2021). A região do ITS 1 está situada entre os genes 18S e o 5.8S, já o ITS 2 está entre os genes 5.8S e 26S (HU *et al.*, 2019; HEMLEBEN *et al.*, 2021). Os sítios de DNAr 35S e suas regiões espaçadoras transcritas e não transcritas correspondem as regiões organizadores de nucléolo (NORs) (HESLOP-HARRISON; SCHMIDT, 2012). Os genes de DNAr 5S são constituídos por uma região gênica conservada de 120pb, também apresentam promotores externos no espaçador intergênico (IGS) e ocorrem como repetições em *tandem* (RÖSER *et al.*, 2001), na maioria das vezes separados da fração de DNAr 35S (ROA; GUERRA, 2015).

Estudos com FISH utilizando sondas de DNAr para a família Apocynaceae, foram realizadas em três espécies e apenas dois gêneros: *Catharanthus* (*C. roseus*) e *Cynanchum* (EU.) (*C. wilfordii* e *C. auriculatum*) (GUIMARÃES *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2020). Em *C. roseus*, os autores mostraram sinais de FISH terminais em um único par de cromossomos (6), com a sonda de DNAr pTa71 de trigo, contendo o fragmento de 18S-5.8S-26S (GUIMARÃES *et al.*, 2012). Os dados de FISH em *Cynanchum wilfordii* mostraram dois sítios terminais de DNAr 35S (KIM *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2022).

Justificativa

O mercado brasileiro de plantas ornamentais tem acompanhado a tendência de expansão do mercado mundial, com lucro de R\$ 10,9 bilhões em 2021, sendo considerado um segmento promissor do agronegócio. No Paraná, o setor de floricultura apresentou crescimento de 29,2%, com renda bruta de R\$ 171,6 milhões. Os núcleos regionais de Curitiba, Maringá, Cascavel, Toledo e Londrina correspondem a 88% da produção do estado. Os números favoráveis apresentados, são resultantes da diversidade de microclimas, disponibilidade de áreas agricultáveis, água em abundância, mão de obra e infraestrutura (DERAL, 2021).

A produção de flores é reconhecida como uma alternativa emergente na distribuição de renda para pequenos produtores, na redução do êxodo rural e na valorização de pequenas propriedades (JUNQUEIRA; PETZ, 2014; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2015). Fato este, capaz de reduzir os impactos negativos da crise econômica. Atualmente, no Brasil, este setor é responsável pela maior parcela de trabalho formal e permanente na agricultura, são gerados 210 mil empregos (IBRAFLOR, 2021).

Dentre as plantas com aplicação ornamental e farmacológica destaca-se o gênero *Adenium*, com espécies suculentas de caule escultural e variações nas formas e cores das flores (PLAIZIER, 1980). Tais características morfológicas lhes conferem um elevado potencial ornamental e alto valor comercial (VARELLA *et al.*, 2015; COLOMBO *et al.*, 2018).

Considerando a ampla utilização do gênero *Adenium* no mercado de flores e a fase inicial dos programas de melhoramento vegetal, informações básicas sobre a citogenética e os genomas dessas espécies são de fundamental importância. Neste contexto, dados de citogenética convencional como, caracterização e comparação dos cariótipos, variações

numéricas ou estruturais, identificação de regiões heterocromáticas e a hibridização *in situ*, podem ampliar a compreensão dos processos evolutivos aos quais os genomas passaram, fornecendo informações das relações entre *A. obesum* e *A. arabicum*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Compreender as diferenças cariotípicas e genômicas entre *A. obesum* e *A. arabicum*, utilizando dados de citogenética convencional, molecular e conteúdo de DNA nuclear.

Objetivos específicos

1. Comparar as duas espécies quanto ao número e morfologia cromossômica e entender o processo de poliploidia;
2. Comparar e entender as diferenças cariotípicas por meio do bandeamento cromossômico;
3. Entender a organização do DNAr 35S;
4. Entender as diferenças genômicas com base nos valores C de DNA;
5. Compreender o processo de diferenciação cariotípica em *Adenium* e compará-lo às demais Apocynaceae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKI, A.; PEROSA, J.M.Y. Aspectos da produção e consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.8, n.1,2, p.13-23, 2002.

ALBERS, F.; MEVE U. A Karyological Survey of Asclepiadoideae, Periplocoideae, and Secamonoideae, and Evolutionary Considerations within Apocynaceae s.l. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.88, p. 624-656, 2001.

ARAÚJO, F. L. **Estudo genético e citogenético de duas espécies do gênero *Physalis* (Solanaceae)**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

AVERSANO, R. *et al.* Molecular Tools for Exploring Polyploid Genomes in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 8, p. 10316-10335, 2012.

BAI, C. *et al.* New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States. *Annals of Botany*. v.110, p. 1623-1629, 2012.

BENNETZEN, J. L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant molecular biology**, v.42, n.1, p. 251-269, 2000.

BENNETZEN, J.L.; WANG, H. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. **Annual Review of Plant Biology**, v.65, p. 505-530, 2014.

BISCOTTI, M.A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J.S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, p. 415-420, 2015.

BRASZEWSKA-ZALEWSKA, A.; DZIURLIKOWSKA, A.; MALUSZYNSKA, J. Histone H3 methylation patterns in *Brassica nigra*, *Brassica juncea*, and *Brassica carinata* species. **Genome**, v.55, n.1, p. 68-74, 2012.

BRITO, J. G. *et al.* IAPT / IOPB chromosome data 17 [Relatórios]. **Táxon**, v. 63, p. 1149-1150, 2014.

CHAUHAN, A. K. S.; RAGHUVANSHI, S. S. Cytogenetical Studies of Some Members of Apocynaceae. **Cytology**, v. 42, p.723-729, 1977.

COLOMBO, R. C. *et al.* *Adenium obesum* como nova flor de vaso: manejo cultural. **Ornamental Horticulture**, v. 24, p.197-205, 2018.

CONTENTO, A.; HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER T. Diversity of a major repetitive DNA sequence in diploid and polyploid Triticeae. **Cytogenetic and Genome Research**, v.109, p. 34-42, 2005.

CHEN, Z. J. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. **Trends in Plant Science**, v.15, p.57-72, 2010.

DA SILVA, C. R.; GONZÁLEZ-ELIZONDO, M. S.; VANZELA, A. L. L. Chromosome reduction in *Eleocharis maculosa* (Cyperaceae). **Cytogenetic and genome research**, v. 122, n. 2, p. 175-180, 2008.

DAS, A. B.; MOHANTY, S.; DAS, P. Chromosome number, Karyotype and nuclear DNA content in some *Adenium* species of the family Apocynaceae. **Cytobios**, v. 98: 95-104, 1999.

DATTA, T. *et al.* Orcein and Fluorescent Banding Analysis of Two Floral Types of *Catharanthus Roseus* L.. Dhaka. **University Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 219-227, 2020.

DE STORME, N.; MASON, A. Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: Cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance. **Current Plant Biology**, v. 1, p. 10-33, 2014.

DERAL - Departamento de Economia Rural.7p. 2021. Disponível em:<<https://www.agricultura.pr.gov.br/>>. Acesso em: 01/12/2021.

- DIMMITT, M.; JOSEPH, G.; PALZKILL, D. **Adenium: Sculptural Elegance, Floral Extravagance**. Ed 1^a. Scathingly Brilliant Idea. Tucson, 2009.
- DIPAK, P.; KARABI, B.; SANKAR, N. S. Biological Activities of *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult.: A Concise Review. **Journal of Biosciences**, v.2, n. 4, p. 214-221, 2015.
- EBRAHIMI, F.; GHORBANI NOHOJJI, M.; MIRI, S. M. First karyotype analysis of *Nerium oleander* populations in Iran. **Rostaniha**, v. 22, n. 2, p. 186-193, 2021.
- ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P. V. A revised classification of the Apocynaceae sl. **The Botanical Review**, v. 66, n. 1, p. 1-56, 2000.
- ENDRESS, M. E.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. An updated classification for Apocynaceae. **Phytotaxa**, v. 159, n. 3, p. 175-194, 2014.
- ESCUADERO, M. *et al.* Karyotypic changes through dysploidy persist longer over evolutionary time than polyploid changes. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85266, 2014.
- GARCIA, S.; KOVAŘÍK, A. Dancing together and separate again: gymnosperms exhibit frequent changes of fundamental 5S and 35S rRNA gene (rDNA) organisation. **Heredity**, v. 111, n. 1, p. 23-33, 2013.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in plants: more than just rubbish. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 2, p. 153-170, 2015.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: an evolving topic. **Genes**, v. 8, n. 9, p. 230, 2017.
- GROVER, C. E.; WENDEL, J.F. Recent insights into mechanisms of genome size change in plants. *Journal of Botany*, v. 2010, 2010.
- GUERRA, M. Chromosome number variation and evolution in monocots. **Monocots: systematics and evolution**. CSIRO, Melbourne, p. 127-136, 2000.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome research**, v. 120, n. 3-4, p. 339-350, 2008.

GUIMARÃES, G. *et al.* Cytogenetic characterization and genome size of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **AoB Plants**, v. 2012, 2012.

GREWAL, S. I.; JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 1, p. 35-46, 2007.

HASTUTI, D.; SURANTO, S.; SETYONO P. Variation of morphology, karyotype and protein band pattern of adenium (*Adenium obesum*) varieties. **Nusantara Bioscience**, v. 1, n. 2, 2009.

HEGARTY, M. J.; HISCOCK, S. J. Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. **Current biology**, v. 18, n. 10, p. R435-R444, 2008.

HEMLEBEN, V. *et al.* Personal Perspectives on Plant Ribosomal RNA Genes Research: From Precursor-rRNA to Molecular Evolution. **Frontiers in plant science**, v. 12, 2021.

HENEIDAK, S. *et al.* Chromosome counts and karyotype analysis of species of family Apocynaceae from Egypt. **Caryologia**, v. 72, n. 4, p. 69-78, 2019.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Organisation of the plant genome in chromosomes. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 18-33, 2011.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHMIDT, T. Plant nuclear genome composition. **eLS**, 2012.

HOUBEN, A. *et al.* CENH3 interacts with the centromeric retrotransposon cereba and GC-rich satellites and locates to centromeric substructures in barley. **Chromosoma**, v. 116, n. 3, p. 275-283, 2007.

HU, X. *et al.* Characterization analysis of the 35S rDNA intergenic spacers in *Erianthus arundinaceus*. **Gene**, v. 694, p. 63-70, 2019.

IBRAFLOR. Instituto Brasileiro de Floricultura, 2021 – Dados do Setor. 132p. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com.br>>. Acesso em: 01/02/2022.

JOLY-LOPEZ, Z.; BUREAU, T. E. Diversity and evolution of transposable elements in *Arabidopsis*. **Chromosome research**, v. 22, n. 2, p. 203-216, 2014.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M.S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância sócio-econômica recente. **Ornamental Horticulture**, v. 14, n. 1, 2008.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M.S. Panorama socioeconômico da floricultura no Brasil. **Ornamental Horticulture**, v. 17, n. 2, p. 101-109, 2011.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M.S. O setor produtivo de flores e plantas ornamentais do Brasil, no período de 2008 a 2013: atualizações, balanços e perspectivas. **Ornamental Horticulture**, v. 20, n. 2, p. 115-120, 2014.

KIM, S. H. *et al.* Cytogenetical Study of *Cynanchum wilfordii* and *Cynanchum auriculatum* using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). **Korean Journal of Medicinal Crop Science**, v. 28, n. 5, p. 325-330, 2020.

KUBIS, S.; SCHMIDT, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. **Annals of Botany**, v. 82, p. 45-55, 1998.

LANDGRAF, P. C.; PAIVA, P. D. O. Exportação de flores e plantas ornamentais pelo estado de Minas Gerais. **Ornamental Horticulture**, v. 16, n. 2, 2010.

LEE, S. H. *et al.* Genome structure and diversity among *Cynanchum wilfordii* accessions. **BMC plant biology**, v. 22, n. 1, p. 1-14, 2022.

LIMA, S. A. A. Variabilidade ecofisiológicas da germinação em *Physalis L.* e em espécies de *Solanum L.* Neotropicais. 2017. 61 f. Tese (Doutorado Programa de Pós-Graduação em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 2017.

LIMA-JÚNIOR, J. C. *et al.* Mapeamento e Quantificação do Mercado de Flores e Plantas Ornamentais do Brasil. Coordenação e organização: Neves, M. F.; Pinto, M. J. A. 1 Ed. São Paulo: **OCESP**, 2015. 122 p.

LIPPMAN, Z. *et al.* Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 471-476, 2004.

LIU, Y.; MIN, J. Structure and function of histone methylation-binding proteins in plants. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 12, p. 1663-1680, 2016.

LIVSHULTZ, T. *et al.* Phylogeny of Apocynoideae and the APSA clade (Apocynaceae s.l.) 1. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 94, n. 2, p. 324-359, 2007.

MAKAREVITCH, I. *et al.* Transposable elements contribute to activation of maize genes in response to abiotic stress. **PLoS genetics**, v. 11, n. 1, p. e1004915, 2015.

MARQUES, R. W. C.; CAIXETA-FILHO J. V. Sazonalidade do mercado de flores e plantas ornamentais no Estado de São Paulo: o caso da CEAGESP-SP. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 40, p. 789-806, 2002.

MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 421-424, 1994.

MATA-SUCRE, Y. *et al.* Revisiting the cytomolecular evolution of the Caesalpinia group (Leguminosae): a broad sampling reveals new correlations between cytogenetic and environmental variables. **Plant Systematics and Evolution**, v. 306, n. 2, p. 1-13, 2020.

MEVE, U.; LIEDE-SCHUMANN, S. *Ceropegia* (Apocynaceae, Ceropegieae, Stapeliinae): paraphyletic, but still taxonomically sound1. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 94, n. 2, p. 392-406, 2007.

MOGHE, G.D.; SHIU, S.H. The causes and molecular consequences of polyploidy in flowering plants. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1320, n. 1, p. 16-34, 2014.

MOTOHASHI, T. *et al.* Chromosome numbers of four species of *Ochrosia* sensu lato (Apocynaceae). **Chromosome Botany**, v. 3, n. 1, p. 7-10, 2008.

MOYER, L. S. Chromosome numbers and electrophoresis of latex in *Asclepias*. **Botanical Gazette**, v. 97, n. 4, p. 860-865, 1936.

NASMYTH, K.; HAERING, C.H. Cohesin: its roles and mechanisms. **Annual review of genetics**, v. 43, p. 525-558, 2009.

NEUMANN, P. *et al.* Systematic survey of plant LTR-retrotransposons elucidates phylogenetic relationships of their polyprotein domains and provides a reference for element classification. **Mobile DNA**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2019.

NOVIKOVA, P. Y.; HOHMANN, N.; VAN DE PEER, Y. Polyploid *Arabidopsis* species originated around recent glaciation maxima. **Current opinion in plant biology**, v. 42, p. 8-15, 2018.

OLIVEIRA, C. B. *et al.* A cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais no Brasil: uma revisão sobre o segmento. **Revista Livre de Sustentabilidade e Empreendedorismo**, v. 6, n. 2, p. 180-200, 2021.

OLIVEIRA, L. C.; TORRES, G. A. Plant centromeres: genetics, epigenetics and evolution. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 5, p. 1491-1497, 2018.

OLMSTEAD, R. G. *et al.* A molecular phylogeny of the Solanaceae. **Taxon**, v. 57, n. 4, p. 1159-1181, 2008.

OLSEN, R.T.; RANNEY, T. G.; VILORIA, Z. Reproductive behavior of induced allotetraploid x *Chitalpa* and in vitro embryo culture of polyploid progeny. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 131, n. 6, p. 716-724, 2006.

PELLICER, J. *et al.* Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. **Genes**, v. 9, n. 2, p. 88, 2018.

PINTO, A. C. R.; GRAZIANO, T. T. Potencial ornamental de curcuma. **Ornamental Horticulture**, v. 9, n. 2, 2003.

PLAIZIER, A. C. **A revision of *Adenium* Roem. & Schult. and of *Diplorhynchus* Welw. ex Fic. & Hiern (Apocynaceae).** Veenman, 1980.

DOS REIS PORTES, R. G. Curva de embebição e interferência da luz na germinação de sementes de rosa-do-deserto (*Adenium obesum* (Forssk.), Roem. & Schult.). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 5, n. 1, 2018.

QUADRANA, L. The contribution of transposable elements to transcriptional novelty in plants: The FLC affair. **Transcription**, v. 11, n. 3-4, p. 192-198, 2020.

RANNEY, T. G. Polyploidy: From evolution to new plant development. In: **Combined proceedings international plant propagators' society**. v. 56, p. 137-142, 2006.

RAPINI, A. *et al.* Apocynaceae (dogbane and milkweed family). **Flowering plants of the Neotropics. Princeton University Press, Princeton**, p. 23-26, 2004.

RICHARDS E. J.; ELGIN S. C. R Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 489-500, 2002.

ROA, F.; GUERRA, M. Non-random distribution of 5S rDNA sites and its association with 45S rDNA in plant chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 3, p. 243-249, 2015.

RÖSER, M. *et al.* Molecular diversity and physical mapping of 5S rDNA in wild, and cultivated oat grasses (Poaceae: Aveneae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 21, n. 2, p. 198-217, 2001.

ROY TAPADAR, N. N. Cytotaxonomic studies in Apocynaceae and delineation of the different evolutionary tendencies operating within the family. **Caryologia**, v. 17, n. 1, p. 103-138, 1964.

SAENSOUK, S.; SAENSOUK, P. Comparative chromosomal features for four Apocynaceae species from Northeastern Thailand. **Biologia**, v. 76, n. 9, p. 2485-2490, 2021.

SAHEBI, M. *et al.* Contribution of transposable elements in the plant's genome. **Gene**, v. 665, p. 155-166, 2018.

SANTOS, A. M. S. **Evolução cromossômica em plantas de inselbergues com ênfase na família Apocynaceae Juss.** 2017. 139f. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 2017.

SANTOS, V.; SILVA, E. F. D.; ALMEIDA, C. Genome size and identification of repetitive DNA sequences using low coverage sequencing in *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae: Gentianales). **Genetics and molecular biology**, v. 43, 2020.

SANTOS-TRINDADE, R. C. **Caracterização Farmacognóstica e Farmacobotânica das Folhas de *Aspidosperma excelsum* Benth. (Apocynaceae).** 2014. 56f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi, Brasil, 2014.

SENNBLAD, B.; BREMER, B. The familial and subfamilial relationships of Apocynaceae and Asclepiadaceae evaluated with RbCl data. **Plant Systematics and Evolution**, v. 202, n. 3, p. 153-175, 1996.

SHARROCK, S.; OLDFIELD, S.; WILSON, O. Plant Conservation Report 2014: a review of progress towards the Global Strategy for Plant Conservation 2011-2020. **CBD Technical Series**, n. 81, 2014.

SHCHERBAN, A. B. Repetitive DNA sequences in plant genomes. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 5, n. 3, p. 159-167, 2015.

SIEGEL, J. J.; AMON, A. New insights into the troubles of aneuploidy. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 28, p. 189-214, 2012.

SIGMAN, M. J.; SLOTKIN, R. K. The first rule of plant transposable element silencing: location, location, location. **The Plant Cell**, v. 28, n. 2, p. 304-313, 2016.

SILVEIRA, M.P. C. **Avaliação dos parâmetros ecofisiológicos e de crescimento em rosa do deserto sob restrição hídrica associada ao filme de partícula de CaCO₃**. 2016. 60 f. Dissertação (Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2016.

SKILLIN, R. An Illustrated Guide to Pollinating Pachypodium and Adenium. **Cactus and Succulent Journal**, v. 93, n. 4, p. 267-272, 2021.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. E.; TATE, J. A. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. **New phytologist**, v. 161, n. 1, p. 173-191, 2004.

SOLTIS, O. S.; SOLTIS, D. E. The role of hybridization in plant speciation. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 561-588, 2009.

SOUZA, A. P. **Delimitação taxonômica do gênero Rhabdadenia (Rhabdadenieae, Apocynaceae) com base em caracteres anatômicos e micromorfológicos**. 2015. 50f. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Brasil, 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.** 4ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SULEIMAN, M.; BRIMA, E. I. Phytochemicals, trace element contents, and antioxidant activities of bark of Taleh (*Acacia seyal*) and desert rose (*Adenium obesum*). **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 8, p. 3135-3146, 2021.

SURADINATA, Y. R.; AMALIA, A. C.; NURAINI, A. Effect of pruning on growth: Branching and stump enlargement three cultivars of “Kamboja Jepang” (*Adenium arabicum*). **Kultivasi**, v. 16, n. 2, 2017.

TALBERT, P. B.; HENIKOFF, S. What makes a centromere?. **Experimental cell research**, v. 389, n. 2, p. 111895, 2020.

TAMAYO-ORDÓÑEZ, M. C. *et al.* Advances and perspectives in the generation of polyploid plant species. **Euphytica**, v. 209, n. 1, p. 1-22, 2016.

TERRA, S. B.; ZÜGE, D. P. P. O. Floricultura: a produção de flores como uma nova alternativa de emprego e renda para a comunidade de Bagé-RS. **Revista Conexão UEPG**, v. 9, n. 2, p. 342-353, 2013.

THAKUR, J.; PACKIARAJ, J.; HENIKOFF, S. Sequence, chromatin and evolution of satellite DNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4309, 2021.

TIAGO-NETO, L. J. *et al.* Ocorrência de insetos fitófagos em *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult no estado de Goiás. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 11, n. 4, p. 379-384, 2017.

UDALL, J. A. *et al.* The genome sequence of *Gossypioides kirkii* illustrates a descending dysploidy in plants. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1541, 2019.

VAN DER LAAN, F. M.; ARENDS, J. C. Cytotaxonomy of the Apocynaceae. **Genetica**, v. 68, n. 1, p. 3-35, 1985.

VARELLA, T. L. *et al.* In vitro germination of desert rose varieties. **Ornamental Horticulture**, v. 21, n. 2, p. 227-234, 2015.

VICIENT, C. M.; CASACUBERTA, J. M. Impact of transposable elements on polyploid plant genomes. **Annals of Botany**, v. 120, p. 195-207, 2017.

WEISS, D. Introduction of new cut flowers: domestication of new species and introduction of new traits not found in commercial varieties. In: **Breeding for Ornamentals: Classical and Molecular Approaches**. Springer, Dordrecht, 2002. p. 129-137.

WICKER, T. *et al.* A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.

WONG, S. K.; LIM, Y. Y.; CHAN, E. W. C. Botany, uses, phytochemistry and pharmacology of selected Apocynaceae species: A review. **Pharmacognosy Communications**, v. 3, n. 3, 2013.

YANG, L. L. *et al.* A supermatrix approach provides a comprehensive genus-level phylogeny for Gentianales. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 54, n. 4, p. 400-415, 2016.

ZHANG, H. *et al.* Persistent whole-chromosome aneuploidy is generally associated with nascent allohexaploid wheat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 9, p. 3447-3452, 2013.

ZHOU, H. *et al.* The function of histone lysine methylation related SET domain group proteins in plants. **Protein Science**, v. 29, n. 5, p. 1120-1137, 2020.

ZONNEVELD, B. J.; LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. **Annals of botany**, v. 96, n. 2, p. 229-244, 2005.

Capítulo 1

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E GENÔMICA DE *Adenium obesum* E *A. arabicum* (APOCYNACEAE)

Artigo será submetido a AoB Plants

Caracterização citogenética e genômica de *Adenium obesum* e *A. arabicum* (Apocynaceae)

Talita Angélica de Oliveira Rosa^{1,2}, Letícia Maria Parteka^{1,2} and André Luís Laforga Vanzela^{1,*}

¹Laboratório de Citogenética e Diversidade Vegetal, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 86097-570, Paraná, Brazil.

²Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 86097-570, Paraná, Brazil.

*Correspondência:

E-mail: andrevanzela@uel.br, ORCID: 0000-0002-2442-2211

Resumo

Introdução: O gênero *Adenium* Roem. & Schult. (Apocynaceae) compreende espécies suculentas com caule escultural e variações nas formas e cores das flores. São plantas originárias de regiões semiáridas da África e Ásia. Apresentam importância farmacológica devido aos compostos secundários, mas espécies como *A. obesum* e *A. arabicum* (rosas do deserto) vêm se destacando no setor de plantas ornamentais. Apesar dos grandes investimentos na cadeia produtiva, informações básicas sobre a citogenética e o genoma dessas espécies foram pouco exploradas. O presente artigo agrega conhecimento genético básico pela comparação genômica e cariotípica entre *A. obesum* ($2n=22$) e *A. arabicum* ($2n=44$).

Metodologia: Esse estudo comparativo foi baseado em análises citogenética (coloração convencional, bandeamento cromossômico e FISH) e genômica (citometria de fluxo).

Resultados e Discussão: A análise citogenética mostrou cariótipos com predominância de cromossomos meta e submetacêntricos, $2n=2x=22$ (11 m + 11 sm) em *A. obesum* e $2n=4x=44$ (40 m + 4 sm) em *A. arabicum*, com genomas variando de $2C=2,06$ pg em *A. obesum* a $2C=2,91$ para *A. arabicum*. Há uma predominância de bandas DAPI⁺ (ricas em AT) na região proximal dos cromossomos, e bandas CMA⁺ (ricas em GC) nas regiões terminais, associadas principalmente com o DNAr. As bandas DAPI estão associadas à formação de cromocentros em intérfase, sempre com bandas CMA posicionadas na periferia. Aparentemente houve redução no conteúdo de DNA no processo de poliploidia, e isso pode ser notado no

comprimento cromossômico total e nas estimativas de valor C de *A. arabicum* poliploide. A espécie diploide *A. obesum* apresenta quatro sítios de DNAr, enquanto a poliploide *A. arabicum* apresenta oito sítios, localizados na fração terminal dos cromossomos.

Palavras chave: bandas CMA/DAPI, cromocentros, DNAr, FISH, rosa do deserto

Introdução

O gênero *Adenium* (Forssk.) Roem. & Schult, pertence à família Apocynaceae e é originário das regiões semiáridas da África e Ásia (Oyen 2008; Limones *et al.* 2018). São espécies suculentas típicas das savanas e florestas abertas de solo arenoso ou rochoso, apresentam caule escultural, com variações nas formas e cores das flores (Plaizier 1980). Tais características morfológicas lhes conferem um elevado potencial ornamental e alto valor comercial (Varella *et al.* 2015; Colombo *et al.* 2018). *Adenium obesum* é a espécie mais conhecida do gênero, em função das propriedades medicinais (Versiani *et al.* 2014; Hossain 2018). De acordo com Akhtar *et al.* (2017) e Gurung *et al.* (2020), são conhecidos mais de 50 compostos secundários, entre glicosídeos, flavonóides e terpenóides, sendo alguns tóxicos e outros com atividades biológicas importantes, como antivirais, antibacterianos, antitumorais e antioxidantes. Apesar do crescente interesse fitoquímico do grupo, a maior parte do investimento em cultivo, melhoramento e produção de híbridos está sendo feito para fins ornamentais, mas sem conhecimentos genéticos básicos das espécies do gênero.

Do ponto de vista citogenético, representantes de Apocynaceae foram estudados principalmente quanto aos números cromossômicos (Singh 1951; Darlington e Wylie 1955; Roy Tapadar 1964; Santos 2017). Há variações de $2n=10$ no gênero *Rhabdadenia* Müll. Arg. (Souza 2015) a $2n=88$ em *Rauvolfia* L. (Van der Laan e Arends 1985), com registros de variação cromossômica numérica em *Plumeria* L. com $2n=36$ e 54 (Chauhan e Raghuvanshi 1977), *Asclepias* L. com $2n=22$ e 24 (Moyer 1936) e *Allamanda* L. com $2n=18$, 22 e 36 (Brito *et al.* 2014; Saensouk e Saensouk 2021). Tais variações ocorreram principalmente por

disploidia e poliploidia. Poliploidia intra e interespecíficas parecem ser importantes na diferenciação cariotípica de algumas Apocynaceae, como nos gêneros *Kopsia* Dumort. ($2n=36$ e 72), *Rauvolfia* ($2n=22$, 44 , 66 e 88), *Catharanthus* G. Don ($2n=16$, 24 e 32) e *Ceropegia* L. com $2n=22$ e 44 (Van der Laan e Arends 1985; Meve e Liede-Schumann 2007).

Contagens cromossômicas em Apocynaceae herbáceas mostraram diferentes números básicos, como $x=8$ em *Catharanthus*, $x=8$ e 11 em *Apocynum* L. e *Trachomitum* Woodson, $x=10$ em *Trachelospermum* Lem., $x=11$ em *Amsonia* Walter e *Rhazya* Decne., e $x=23$ em *Vinca* L. O número básico $x=11$ foi considerado primitivo na família, por aparecer em cerca de 60% dos gêneros (Albers e Meve 2001; Motohashi *et al.* 2008). Esses números básicos são mantidos na subfamília Apocynoideae, onde está inserida a tribo Nerieae (Endress e Bruyns 2000), com os gêneros *Nerium* L. e *Adenium*, ambos com $2n=22$ (Van der Laan e Arends 1985) e poliploides com $2n=44$ (Das *et al.* 1999). Análises de filogenia molecular baseada em genes plastidiais indicam que *Nerium* e *Adenium* formam um clado monofilético (Fishbein *et al.* 2018; Alanazi *et al.* 2021). Cromossomos das espécies de Apocynaceae tendem a ser muito pequenos, variando de cerca de $0,5$ a $3,5$ μm , tais como descritos para espécies dos gêneros *Rauvolfia* e *Ochrosia* Juss. (Van der Laan 1985; Motohashi *et al.* 2008). De acordo com esses últimos autores, o tamanho dos cromossomos dificulta a determinação da posição dos centrômeros.

O estudo citogenético mais abrangente em *Adenium* foi publicado por Das *et al.* (1999), o qual, além de analisar números cromossômicos, também estimou o comprimento cromossômico total e a quantidade de DNA $4C$ em *A. arabicum*, *A. obesum*, *A. multiflorum*, *A. somalense*, *A. speciosum* e *A. swazicum*, utilizando citofotometria com a coloração de Feulgen. Esses autores mostraram que há variações nos tamanhos e formas dos cromossomos entre as espécies, além de variações na simetria dos cariótipos e conteúdo de DNA genômico.

Esses dados somaram características que colocam em evidência os conflitos taxonômicos no gênero (Plaizier 1980; Das *et al.* 1999; Hastuti *et al.* 2009).

Apesar da contribuição de Das *et al.* (1999), estudos iniciais realizados por nós mostraram diversas características cariológicas notáveis, como uma grande variação no número e tamanho de cromocentros em intérfase, riqueza em regiões ricas em bases AT. Como as espécies de *Adenium* estão sendo amplamente utilizadas em programas de melhoramento vegetal voltado à cadeia produtiva de flores ornamentais, o objetivo desse estudo foi agregar conhecimento genético básico pela comparação genômica e cariotípica entre *A. obesum* ($2n=22$) e *A. arabicum* ($2n=44$), baseado em dados de citogenética convencional, molecular e conteúdo de DNA nuclear.

Materiais e métodos

Material botânico

Sementes e plântulas de *Adenium obesum* (cultivares TS001 e TS002) e *A. arabicum* (cultivares TS013 e TS014) foram obtidas da coleção da empresa Flora Takemura, Distrito da Warta-Paraná, e cultivadas na casa de vegetação do Laboratório de Citogenética e Diversidade Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

Estimativa dos valores C de DNA

O conteúdo de DNA nuclear foi estimado seguindo o protocolo proposto por Praça-Fontes *et al.* (2011), com adaptações, como a utilização de polietileno glicol (PEG) a 7% no tampão de isolamento dos núcleos, como antioxidante. Para a análise do valor C de DNA foram utilizados núcleos de tecido foliar jovem de *Pisum sativum* L. ($2C = 9.09$ pg; Doležel *et al.* 1998), como padrão, juntamente com o tecido foliar jovem de *A. obesum* e *A. arabicum* fragmentadas em 125 μ L do tampão Otto I (Otto, 1990) contendo PEG 40% e RNase a 1

mg/mL. Posteriormente, as amostras foram filtradas em uma malha de nylon de 25 μm , centrifugadas a 100 g por 5 minutos e tratadas com uma solução composta por 375 μL de solução tampão Otto II, PEG 40%, RNase 1mg/mL e iodeto de propídio a 1mg/mL, por 40 minutos.

As medições foram realizadas usando o citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences), seguindo as especificações do fabricante, em três estimativas independentes em dias diferentes. Foram estimados no mínimo 50 mil eventos por rodada, para cada espécie. Os valores de 2C foram calculados como a média do pico da amostra / média do pico padrão x 2C da quantidade padrão de DNA (pg).

Citogenética convencional, molecular e PCR

As células foram obtidas a partir de meristemas radiculares e florais, tratadas com uma solução saturada de paradiclorobenzeno por 2 h, fixadas em uma solução etanol: ácido acético (3:1, v:v) por 24 h, e estocadas a -20 °C. Meristemas foram digeridos em uma solução composta por celulase a 2% e pectinase 20% (w:v), ambos da Sigma, a 37 °C por 1 h e hidrolisadas com HCl 5M à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram preparadas por esmagamento em uma gota de ácido acético a 60%. As lamínulas foram removidas após congelamento em nitrogênio líquido, secas à temperatura ambiente e coradas com Giemsa a 2%. Lâminas permanentes foram montadas com Entellan (Merck).

O bandeamento C - CMA/DAPI foi feito como descrito por Guerra e Souza (2002), em lâminas preparadas por esmagamento utilizando meristemas digeridos com celulase a 2% e pectinase 20% (w:v). Após o preparo, as lâminas foram envelhecidas por três dias e coradas com cromomicina A3 (CMA₃) a 0.5 mg/mL por 90 minutos e em seguida com 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ por 30 min. As amostras foram montadas em um meio composto por glicerol/tampão McIlvaine (pH 7.0, 1:1, v:v) com 2.5mM de MgCl₂.

A hibridização *in situ* com fluorocromos (FISH) foi feita em lâminas preparadas como descrito para o bandeamento C- CMA/DAPI, a sonda pTa71 contendo a sequência de rDNA 18S-5.8S-26S isolada de trigo (Gerlach e Bedbrook 1979) foi usada para localizar os sítios cromossômicos de DNAr 35S. A sonda foi marcada através de reação com kit Nick Translation (Roche Diagnostics®) com nucleotídeo conjugado a digoxigenina (Dig-11-dUTP). A FISH foi realizada como descrita por Da silva *et al.* (2008), onde a sonda foi utilizada em uma mistura de 34 µL contendo formamida a 100% (15 µL), polietileno glicol a 50% (6 µL), 20× SSC (3 µL), 100 ng de DNA de bloqueio (1 µL), SDS a 10% (1 µL), e 200 ng (4 µL). As amostras foram desnaturadas 90 °C por 10 min, e a hibridização feita a 37° C por 24 horas em uma câmara úmida. As lavagens pós-hibridização foram feitas em tampão SSC (citrato de sódio salino) com estringência de 70%. A sonda marcada com digoxigenina foi detectada com anti-digoxigenina-rodamina, e as lavagens pós-deteção feitas em 4× SSC/0.2% Tween 20, à temperatura ambiente. As lâminas foram contra coradas com 4 µL de DAPI a 2 µg/mL⁻¹ por 30 min, e montadas com 25 µL de DABCO, composto por glicerol (90%), 1,4-díaza-biciclo (2,2,2)-octano (2.3%), 20 mM TrisHCl, pH 8.0 (2%), 2,5 mM MgCl₂ (4%) e água ultrapura (1,7%).

Resultados

Os cariótipos em Adenium

A análise dos núcleos interfásicos mostrou a presença de cromocentros bem delimitados em ambas as espécies, com predominância de poucos cromocentros grandes em núcleos menores e muitos cromocentros menores quando os núcleos apresentam-se em tamanho maior (**Figuras 1A-B e E-G**). A análise cariotípica convencional mostrou meiose com segregação normal e com quiasmas terminais ou subterminais (**Figura 1D**). Em mitose

há predominância de cromossomos meta e submetacêntricos, sendo $2n=2x=22$ (11 m + 11 sm) em *A. obesum* (**Figura 1C**) e $2n=4x=44$ (40 m + 4 sm) em *A. arabicum* (**Figura 1H**). Foram encontradas diferenças nas fórmulas cariotípicas, em função de diferenças nas formas e tamanhos dos cromossomos. *A. obesum* apresentou cromossomos maiores, com tamanhos variando de 1,25 a 2,45 μm e comprimento cromossômico total (CT) de 20,82 μm (**Figura 2A**), enquanto que em *A. arabicum* a variação foi de 0,96 a 2,06 μm e comprimento cromossômico total de 30,71 μm (**Figura 2B**). Apesar do CT em *A. arabicum* ser maior 67,8%, esse valor foi cerca de 25% menor do que o esperado para um genoma autoploide a partir de *A. obesum*, que hipoteticamente seria 41,64 μm . As estimativas dos tamanhos dos genomas por citometria de fluxo mostraram um valor de $2C=2,06$ pg para *A. obesum* e $2C=2,91$ para *A. arabicum* (**Figuras 2A e B**). A quantidade de DNA nuclear em *A. arabicum* é de 70,7% maior que a *A. obesum*, o que se aproxima da diferença observada nas medições cromossômicas.

Bandeamento C- CMA/DAPI

A coloração com os fluorocromos DAPI (que se ligam preferencialmente em regiões ricas em AT) e CMA (que se ligam em regiões ricas em GC), mostrou bandas positivas de tamanhos diferentes em vários locais nos cromossomos. Os núcleos interfásicos também mostrou sinais DAPI⁺ formando cromocentros (**Figuras 3A e C**) e sinais CMA⁺ dispostos ao redor do nucléolo e na periferia dos cromocentros (**Figuras 3B, C-H, J e K**). Em *A. obesum*, os sinais DAPI⁺ predominaram nas regiões paracentroméricas de 6 cromossomos (**Figura 3D**), os sinais CMA⁺ apareceram nas regiões paracentroméricas (2 cromossomos) e terminais (4 cromossomos), sendo dois sinais fortes e quatro mais fracos (**Figura 3E**), um destes sinais são adjacentes ao bloco DAPI⁺ como destacado nos *boxes* pelas setas (**Figuras 3D e E**). Em *A. arabicum*, os sinais DAPI⁺ também ocorreram nas regiões paracentroméricas

de 10 cromossomos, destes 8 ocupam quase que a totalidade do braço curto (**Figura 3I**) adjacentes a esses os sinais CMA⁺ ocorreram nas regiões proximais de 6 cromossomos (**Figura 3J**), como destacado nos *boxes* pelas setas (**Figuras 3J e K**). Há um único registro heteromórfico de bandas DAPI⁺ na região paracentromérica do braço longo do cromossomo 1 em *A. arabicum* (**Figura 2B**) e banda terminal CMA⁺ também no braço longo do cromossomo 2 em *A. obesum* (**Figura 2A**).

Na meiose de *A. obesum*, os cromocentros DAPI⁺ foram pouco evidentes na intérfase inicial e os sinais CMA⁺ formaram um ou dois blocos próximos ao nucléolo (**Figuras 4A-C**), enquanto que em intérfase mais próximas à prófase, houve reorganização de cromocentros (DAPI⁺) e quatro sinais CMA⁺ (**Figura 4D**). Em zigóteno e paquíteno, os cromocentros proximais (DAPI⁺) se destacaram, e os sinais CMA⁺ apareceram como um grande bloco terminal, adjacente ao bloco DAPI, e outros dois menores (**Figura 4 E-F**).

FISH com sonda de DNAr

FISH com sonda (pTa71) foram usadas para determinar a distribuição dos sítios de DNAr 35S nos cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos do gênero *Adenium*.

Em *A. obesum* e *A. arabicum* o DNAr 35S foram encontradas duas condições distintas: i) ausência de associação com heterocromatina e ii) associação com segmentos C-CMA⁺ e coloração intensa quando comparado as demais bandas. A co-localização de sítios de DNAr 35S em domínio heterocromático rico em GC ocorreram nas regiões terminais dos braços curtos dos dois cromossomos menores em ambas, *A. obesum* e *A. Arabicum*.

Em *A. obesum*, os sítios de DNAr 35S foram observados nas posições terminais dos braços curtos de quatro cromossomos e nos cromocentros em intérfase (**Figuras 3J-M**). Resultado similar foi observado em *A. arabicum* poliploide, mas com oito sítios de hibridização, concentrados nas regiões terminais dos cromossomos (**Figuras 3N-O**).

Discussão

Citogenética de Apocynaceae e Adenium

Dados de número e morfologia cromossômica, organização dos cariótipos, meiose e estimativas do conteúdo de DNA nuclear são importantes na análise genética comparativa (Guerra 2000). Quando somados à informações de famílias de DNA repetitivo, como bandas heterocromáticas e sítios de DNAr, a citogenética comparativa torna-se mais eficaz, ampliando o potencial das montagens de mapas cromossômicos físicos e a compreensão das relações entre espécies e populações (Guerra 2008; Mata-Sucre *et al.* 2020). A aplicação dessas ferramentas em grupos botânicos amplos como as Apocynaceae, é ainda mais importante.

Segundo Defani-Scoarize *et al.* (1995) e Martins *et al.* (2010) o comportamento meiótico nas plantas está diretamente relacionado a fertilidade, e ao sucesso reprodutivo, já que alterações na divisão celular refletem na viabilidade dos grãos de pólen. Enquanto as formações de quiasmas atuam como um indicativo de similaridade genética, e em *Adenium* sua baixa ocorrência sugerem que exista pouca afinidade cromossômica dentro de um mesmo genoma, já que quanto maior o número de univalentes, menor a afinidade genômica (Techio e Davide 2007). Nesse sentido, a o comportamento meiótico regular de *A. obesum* e *A. arabicum* demonstraram que as espécies analisadas podem ser opções parentais candidatas para técnicas de melhoramento genético.

Espécies de Apocynaceae apresentam cromossomos pequenos e morfologicamente difíceis de serem analisados, como já havia sido apontado por Albers e Meve (2001). Há evidências de variações no número e tamanho dos cromossomos nas subfamílias Rauvolfioideae, Periplocoideae, Asclepiadoideae, Secamonoideae e Apocynoideae (Endress e Bruyns 2000; Endress *et al.* 2014). Segundo Van der Laan e Arends (1985) e Motohashi *et al.* (2008), os cromossomos em Apocynaceae variam de 0,5 μm a 3,5 μm , e há predominância de

cromossomos meta e submetacêntricos. Mas há casos particulares, como em *Gomphocarpus sinaicus* (Boiss.) Muschl. (tribo Asclepiadeae), onde os cromossomos podem alcançar cerca de 9 μm (Heneidak *et al.* 2019).

A subfamília Apocynoideae é considerada monofilética, com estabilidade cariotípica com $2n=2x=22$ (Livshultz *et al.* 2007; Yang *et al.* 2016). Espécies do gênero *Nerium* (tribo Nerieae, subfamília Apocynoideae) têm $2n=2x=22$, com cromossomos metacêntricos pequenos (0.8 a 1.6 μm) e cariótipos simétricos (Chauhan e Raghuvanshi 1977; Ebrahimi *et al.* 2021). Esse perfil cariotípico se assemelha muito ao de *Adenium*.

Nossa análise realizada em *A. obesum* e *A. arabicum* mostrou cariótipos com $2n=2x=22$ e $2n=4x=44$, respectivamente, com predominância de cromossomos pequenos, metacêntricos e submetacêntricos, o que concorda com dados já publicados para outras espécies de Apocynaceae, incluindo *Adenium* (Roy Tapadar 1964; Van der Laan e Arends 1985). Se considerarmos $x=11$ como número cromossômico básico da tribo Nerieae (Albers e Meve 2001), tanto *A. Swazicum* G.D. Rowley reportado por Das *et al.* (1996) quanto *A. arabicum* estudado aqui seriam tetraploides com $2n=4x=44$. Contudo, há algumas inconsistências nas medições realizadas por diferentes pesquisadores. Nossos dados de medidas cromossômicas variaram de 1,25 a 2,45 μm em *A. obesum* e de 0,96 a 2,06 μm em *A. arabicum*, o que difere dos valores publicados por Das *et al.* (1999). Apesar de considerarmos que tal diferença se dá por medições em metáfases com diferentes níveis de condensação, a publicação de Hastuti *et al.* (2009) em híbridos de *A. obesum* mostra uma variação cromossômica de 2,56 a 5,13 μm .

Registros de estimativas dos valores 2C em Apocynaceae mostram que o conteúdo de DNA varia de 0,60 pg no gênero *Apocynum* L. (Bai *et al.* 2012) a 4,90 pg em *Hoodia gordonii* Masson (Zonneveld *et al.* 2005). As estimativas de $2C=2,06$ pg em *A. obesum* e $2C=2,91$ em *A. arabicum* são compatíveis ao observado em Apocynaceae. Os dados obtidos

por Das *et al.* (1996), com valores $4C=12,76$ pg em *A. arabicum* e 13,94 pg em *A. obesum*, com a técnica de microdensitometria por Feulgen, representam uma grande diferença, que pode ser explicada por detalhes metodológicos, como a preparação das amostras, do tempo de hidrólise e do tipo de tecido utilizado, o que para Bennet e Smith (1976) e Schifino-Wittmann (2001) seria a explicação para muitas das inconsistências relacionadas ao conteúdo C de DNA. De qualquer modo, os dados de Das *et al.* (1996) remetem à materiais com os mesmos níveis de ploidia, o que difere da nossa amostra de *A. arabicum* que é tetraploide.

Duplicações de genomas completos que culminam em poliploidia foram muito importantes nos processos de diferenciação genômica e especiação (Levin e Soltis 2018). A poliploidia é muito comum nas angiospermas (cerca de 80%) pode se dar durante o desenvolvimento ontogenético gametofítico (n) e esporofítica ($2n$) das espécies (Novikova *et al.* 2018). Apenas 12,5% das Apocynaceae estudadas por Roy Tapadar (1964) seriam poliploides, mas Van der Laan e Arends (1985), estimaram que esse valor poderia ser maior, aproximadamente 22%. Aparentemente, os cromossomos de alguns táxons poliploides tendem a ser menores do que os diploides (Albers e Meve 2001; Du *et al.* 2017), e isso foi observado tanto nas medições cromossômicas quanto nas estimativas dos valores C de DNA de *A. arabicum*, quando comparado com *A. obesum*. Albers e Meve (2001) sugeriram uma tendência de redução no tamanho dos cariótipos nas espécies da subfamília Periplocoideae (plesiomórfica) em comparação às espécies de Asclepiadoideae (apomórfica).

As diferenças observadas no comprimento cromossômico total e nas estimativas de valor C entre *A. obesum* diploide e *A. arabicum* poliploide, que apresentou um genoma menor que o esperado, pode ser explicada Segundo Leitch e Bennett (2004), Leitch *et al.* (2008) e Roa e Guerra (2012) pelo processo de diploidização, comum em plantas poliploides, que tendem a reduzir o tamanho original do genoma monoplóide. Essa condição provavelmente seja explicada em razão dos poliploides já apresentarem um genoma maior. É possível que

isso esteja associado a alguma vantagem competitiva em comparação aos diploides, considerando o custo bioquímico inerente de síntese deste DNA extra, especialmente em espécies que ocupam ambientes pobres em minerais, como é o caso da *Adenium*. Além disso, flutuações no tamanho dos genomas associadas à ação de elementos transponíveis ou de rearranjos cromossômicos poderiam influenciar ao aumento ou à diminuição nos tamanho dos genomas (Leitch e Bennett 2004; Leitch *et al.* 2008).

Diferenças nos tamanhos de genomas e cariótipos também podem ocorrer em populações com distribuição geográfica distinta (Savas Tuna *et al.* 2019). Para Silveira *et al.* (2016) há uma predominância de espécies poliploides em ambientes com condições climáticas severas. Felix e Guerra (2000) reportaram que orquídeas diploides dos gêneros *Catasetum* e *Oncidium* predominam em habitats epifíticos, enquanto que aquelas poliploides apresentaram hábitos terrestres e rupícolas. Diferenças interespecíficas na distribuição diploide e poliploide podem ser explicadas provavelmente em decorrência de pressões derivadas de isolamento, como alterações de altitude e clima, que contribuem para diversificações genéticas (Savas Tuna *et al.* 2019; Fallahi *et al.* 2020). As Apocynaceae africanas diploides com $2n=22$ distribuem-se principalmente em regiões subtropicais (Livshultz *et al.* 2007; Yang *et al.* 2016), enquanto que as poliploides parecem ocorrer em áreas adjacentes (DeWet 1980; Albers e Meve 2001). Tais dados concordam com a distribuição geográfica do gênero *Adenium*, já que *A. arabicum* (tetraploide) ocorre na Arábia Saudita, e *A. swazicum*, também poliploide, tem ocorrência limitada à região norte da África do Sul, com condições climáticas mais severas, enquanto que *A. obesum* (diploide) ocorre na África Subsaariana (Dipak *et al.* 2015), predominantemente mais úmida (Rishmawi *et al.* 2016).

Organização genômica e DNA repetitivo em Adenium

Os genomas vegetais são constituídos por sequências codificantes e não codificantes, que encontram-se distribuídas de maneira agrupada ou dispersa ao longo dos cromossomos (Heslop-Harrison e Schwarzacher 2011). A eucromatina, rica em genes e potencialmente ativa, diferencia-se da heterocromatina por essa fração ser rica em famílias de DNA repetitivo, em especial DNA satélites, e por ser mais condensada e ter baixa densidade de genes (Kubis *et al.* 1998; Heslop-Harrison e Schmidt 2012). Há ainda regiões ricas em DNA moderadamente repetitivo, composta por sequências de DNA ribossômicos e outros genes importantes para a manutenção celular (histonas e de citoesqueleto). Mas a porção repetitiva dominante (cerca de 80%) nos genomas das plantas é a dos elementos de transposição (ETs), como transposons, retrotransposons e outras sequências de naturezas similares (Contento *et al.* 2005; Dodsworth *et al.* 2015).

Dados de sequenciamento genômico em Apocynaceae foram baseados apenas em bibliotecas de representação reduzida, direcionados à caracterização dos genomas plastidial (DNAcp) e mitocondrial (DNAm), para estudos de relações filogenéticas e evolutivas (Venter *et al.* 2006; Endress *et al.* 2007; Goyder *et al.* 2007; Meve e Liede-Schumann 2007). Informações sobre a distribuição cromossômica da fração repetitiva na família ainda são limitadas. Sabe-se que essa fração ocupa 51,674% do genoma de *Asclepias syriaca* (L.) enquanto que em *Hancornia speciosa* (Gomes) é de 19,87%. Nos dois casos, os elementos transponíveis foram os mais abundantes (Santos *et al.* 2020). Dados de bandeamento cromossômico em Apocynaceae mostram que em *Catharanthus roseus*, a heterocromatina constitutiva ocorre em cerca de 20% do comprimento total do complemento cromossômico, predominando nas regiões paracentroméricas, como blocos DAPI⁺ ricos em AT (Guimarães *et al.* 2012). Já em Datta *et al.* (2020), a heterocromatina aparece como cromocentros ricos em AT e GC nos núcleos interfásicos e homoganeamente distribuídas na prófase e metáfase,

exceto pelas bandas CMA⁺ que foram observadas nas regiões terminais (braços curtos). Em intérfase, os sinais CMA⁺ e DAPI⁺ também aparecem como cromocentros, com as regiões ricas em GC predominando na periferia dos cromocentros. Em metáfase, os sinais DAPI⁺ predominaram nas regiões paracentroméricas e os sinais CMA⁺ também foram preferencialmente terminais, em ambas as espécies.

Um estudo mais abrangente com bandeamento cromossômico em Apocynaceae, envolvendo 15 espécies de oito gêneros, foi publicado por Santos (2017). Esse autor mostrou uma grande diversidade das bandas heterocromáticas, especialmente quanto ao número de bandas. As bandas CMA⁺ foram predominantemente terminais e em alguns casos paracentroméricas, exceto por *Temnadenia stellaris* (Lindl. Miers) a qual exibiu 18 bandas paracentroméricas CMA⁺ e *Peltastes peltatus* (Vel. Woodson) com 34 bandas terminais DAPI⁺. Bandas DAPI⁺ também variaram em número (2 a 34), predominando nas regiões paracentroméricas. Em algumas espécies como *Mandevilla leptophylla* (A. DC. K. Schum.), *Peltastes peltatus* e *Petalostelma dardanoi* (Fontella), os blocos heterocromáticos ricos em AT paracentroméricas ocuparam quase que a totalidade de alguns cromossomos, o que também foi visto aqui em *Adenium*.

Nossos resultados mostram que há variação no tipo e quantidade de heterocromatina no gênero *Adenium*. No entanto, também observamos semelhanças principalmente na distribuição de bandas, com maior ocorrência de DAPI⁺ e CMA⁺ nos braços curtos dos cromossomos. Há um único registro heteromórfico de bandas DAPI⁺ na região paracentromérica do braço longo do cromossomo 1 em *A. arabicum* e uma banda terminal CMA⁺ também no braço longo do cromossomo 2 em *A. obesum*. Esses dados sugerem que neste gênero a heterocromatina está envolvida com rearranjos, embora não consigamos identificar com clareza quais seriam essas alterações. Apesar disso, a identificação de rearranjos foi importante para mostrar que os cariótipos em *Adenium* estão em processo de

diversificação, assim como registrado em algumas angiospermas (Guerra 2000, Vanzela *et al.* 2002; Castro *et al.* 2016).

Distribuição do DNAr em Adenium

Os ribossomos são encontrados no citoplasma, mitocôndrias e cloroplastos de organismos vivos, e apresentam papel crucial na síntese de proteínas. Os genes ribossômicos são constituídos por sequências organizadas em *tandem*, com regiões internas altamente conservadas entre as espécies, o que os tornam úteis como marcadores cromossômicos em estudos comparativos e filogenéticos (Hemleben *et al.* 2021).

O DNAr 35S é organizado em subunidades formadas por regiões codificadoras dos genes 18S, 5.8S e 26S, são transcritos como um único operon e são separados por espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2), transcritos externos (ETS) e não transcritos (NTS) do espaçador intergênico (IGS) (Hemleben *et al.* 2021). A região do ITS 1 está situada entre os genes 18S e o 5.8S, já o ITS 2 está entre os genes 5.8S e 26S (Hu *et al.* 2019; Hemleben *et al.* 2021). A sonda utilizada por nós (pTa71) contém o cistron completo, isolado de trigo e clonado em vetor plasmidial, alcançando um total de ~12Kb (Gerlach e Bedbrook 1979). As regiões de DNAr 35S formam domínios cromossômicos chamados de regiões organizadoras de nucléolo (NORs) (Heslop-Harrison e Schmidt, 2012; Wang *et al.* 2019) e são as regiões cromossômicas mais bem mapeadas em plantas (Roa e Guerra 2015).

Em *Adenium* os sítios DNAr 35S foram localizados nas regiões terminais, nos braços curtos. Resultados semelhantes foram observados na família Apocynaceae com estudos utilizando sondas de DNAr 35S em *Catharanthus roseus* ($2n=2x=16$) (Guimarães *et al.* 2012), e em *Cynanchum wilfordii* Franco. & A. Sav. ($2n=2x=22$) (Kim *et al.* 2020; Lee *et al.* 2022).

Apesar da localização terminal estável dos sítios de DNAr 35S em *Adenium*, o tamanho dos blocos foi variável. Esse padrão de distribuição foi observado também em *C.*

roseus (Guimarães *et al.* 2012) e *C. wilfordii* (Kim *et al.* 2020; Lee *et al.* 2022), no gênero *Lillium* L. (Lee *et al.* 2014) e em outro grupo de plantas, como nas cactáceas (Castro *et al.* 2016). Esta variação pode ser o resultado de rearranjos cromossômicos envolvendo os segmentos de DNAr 35S, decorrentes da acumulação e dispersão desigual (Adams *et al.* 2000; Nardy *et al.* 2010), o que parece ser comum em plantas (Pedrosa-Harand *et al.* 2006).

Conclusões

Nessa análise citogenômica comparativa entre duas espécies do gênero *Adenium* (*A. obesum* e *A. arabicum*) da família Apocynaceae, foram avaliados dados dos cariótipos, organização física da fração repetitiva rica em AT e GC e conteúdo de DNA. Com base nessas análises, conseguimos concluir que:

1. *A. obesum* e *A. arabicum* mostraram cariótipos com $2n=2x=22$ e $2n=4x=44$, sendo que para essa última espécie, a poliploidia foi registrada pela primeira vez;
2. Os cariótipos foram relativamente assimétricos, já que houve predominância de cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos, com cromossomos pequenos sendo cerca de três vezes menores que os maiores cromossomos;
3. A análise cariotípica convencional mostrou em *A. obesum* e *A. arabicum* meiose com segregação normal e com quiasmas terminais ou subterminais;
4. As estimativas de $2C=2,06$ pg em *A. obesum* e $2C=2,91$ em *A. arabicum* são compatíveis ao observado em Apocynaceae, porém os valores foram bem menores do que os apresentados por Das *et al.* (1999);
5. Houve redução no conteúdo de DNA no processo de poliploidia, já que *A. arabicum* apresenta cromossomos menores e o valor C de DNA foi bem menor que o dobro do valor do diploide;

6. Bandas DAPI⁺ são predominantemente paracentroméricas e formam cromocentros na intérfase, sempre com bandas CMA⁺ posicionadas na periferia desses;
7. Ambas as espécies apresentam bandas CMA⁺ nas regiões terminais dos cromossomos;
8. A região codificante do DNAr 35S é conservada e está co-localizada em um segmento rico em GC nos braços curtos dos cromossomos;
9. Diante da simetria cariotípica altamente similar entre as espécies, a diferenciação cariotípica não se deu por grandes rearranjos cromossômicos, mesmo na espécie poliploide *A. arabicum*, a quantidade de segmentos heterocromáticos permanece semelhante ao observado na espécie diploide *A. obesum*.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Agência Brasileira CNPq (processos 407194 / 2018-5 e 309902 / 2018-5), a ProPPG-UEL, PPG-GBM, FINEP e a Fundação Araucária pelo apoio.

Contribuições do autor

ALLV: aquisição de financiamento; conceituação e supervisão; TAOR e LMP: Metodologia; ALLV e TAOR: redação, revisão e edição.

Financiamento: Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária, Paraná (FA) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Declarações

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Aprovação ética

Este artigo não contém estudos com participantes humanos ou animais realizados por nenhum dos autores.

Consentimento para participar e publicar

Todos os autores revisaram e aprovaram a versão final para publicação.

Referências

- Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Chase MW, Leitch AR.** 2000. Ribosomal DNA evolution and phylogeny in Aloe (Asphodelaceae). *American Journal of Botany*, 87(11), 1578-1583.
- Akhtar SM, Hossain MA, Sadri SA.** 2017. Isolation and characterization of anti microbial compound from the stem-bark of the traditionally used medicinal plant *Adenium obesum*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7: 296-300.
- Alanazi KM, Ali MA, Kim SY, Rahman MO, Farah MA, Alhemaïd F, Elangbam M, Gurung AB, Lee J.** 2021. The cp genome characterization of *Adenium obesum*: Gene content, repeat organization and phylogeny. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 28: 3768-3775.
- Albers F, Meve U.** 2001. A Karyological Survey of Asclepiadoideae, Periplocoideae, and Secamonoideae, and Evolutionary Considerations within Apocynaceae s.l. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 624-656.
- Bai C, Alverson WS, Follansbee A, Waller DM.** 2012. New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States. *Annals of Botany* 110:1623-1629.
- Bennet MD, Smith JB.** 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 274: 227-274.
- Brito JG, Santos RS, Meira PRH, Alves LIF, Andrade MJG, Rapini A, Felix LP.** 2014. IAPT / IOPB chromosome data 17 [Relatórios]. *Táxon* 63: 1149-1150.
- Castro JP, Medeiros-Neto E, Souza G, Alves LI, Batista FR, Felix LP.** 2016. CMA band variability and physical mapping of 5S and 45S rDNA sites in Brazilian Cactaceae: Pereskioideae and Opuntioideae. *Brazilian Journal of Botany* 39(2): 613-620.

- Chauhan AKS, Raghuvanshi SS.** 1977. Cytogenetical Studies of Some Members of Apocynaceae. *Cytology* **42**:723-729.
- Colombo RC, Cruz MA, Carvalho DU, Hoshino RT, Alvez GA, Faria RT.** 2018. *Adenium obesum* como nova flor de vaso: manejo cultural. *Ornamental Horticulture*, **24**:197-205.
- Contento A, Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T.** 2005. Diversity of a major repetitive DNA sequence in diploid and polyploid Triticeae. *Cytogenetic and Genome Research* **109**: 34-42.
- Darlington CD, Wylie AP.** 1955. *Chromosome atlas of flowering plants*. George Allen and Unwin Ltd., 2^a ed. London, UK: Good.l.
- Das AB, Mohanty S, Das P.** 1999. Chromosome number, Karyotype and nuclear DNA content in some *Adenium* species of the family Apocynaceae. *Cytobios* **98**: 95-104.
- Da Silva CR, González-Elizondo MS, Vanzela ALL.** 2008. Chromosome reduction in *Eleocharis maculosa* (Cyperaceae). *Cytogenetic and genome research* **122**: 175-180.
- Datta T, Pinky MS, Dash CK, Begum KN.** 2020. Orcein and Fluorescent Banding Analysis of Two Floral Types of *Catharanthus Roseus* L.. Dhaka. *University Journal of Biological Sciences* **29**: 219-227.
- Defani-Scoarize, MA.** 1995. Evaluation of meiotic behavior in double-cross *maize* hybrids and their parents. *Maydica*, **40**: 319-324.
- DeWet JMJ.** 1980. Origin of polyploids. In: Lewis WH, ed. *Polyploidy: Biological Relevance*. Plenum: New York, 3-15.
- Dipak P, Karabi B, Sankar NS.** 2015. Biological Activities of *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult.: A Concise Review. *Journal of Biosciences* **2**: 214-221.
- Dodsworth S, Chase MW, Kelly LJ, Leitch IJ, Macas J, Novák P, Piednoël M, Weiss-Schneeweiss H, Leitch AR.** 2015. Genomic Repeat Abundances Contain Phylogenetic Signal. *Systematic Biology* **64**: 112-126.

- Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysák MA, Nardi L, Obermayer R.** 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany* **82**:17-26.
- Du YP, Bi Y, Zhang MF, Yang FP, Jia GX, Zhang XH.** 2017. Genome size diversity in *Lilium* (Liliaceae) is correlated with karyotype and environmental traits. *Front Plant Science* **8**: 1303.
- Ebrahimi F, Ghorbani NM, Miri SM.** 2021. First karyotype analysis of *Nerium oleander* populations. *Rostaniha* **10**:1.
- Endress ME, Bruyns PV.** 2000. A revised classification of the Apocynaceae s.l. *Botanical Review* **66**: 1-56.
- Endress ME, Liede-Schumann S, Meve U.** 2007. Advances in Apocynaceae: The enlightenment, an introduction. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **94**: 259-267.
- Endress ME, Liede-Schumann S, Meve U.** 2014. An updated classification for Apocynaceae. *Phytotaxa* **159**: 175-194.
- Fallahi M, Mohammadi A, Miri SM.** 2020. The Natural Variation in Six Populations of *Calendula officinalis* L.: A Karyotype Study. *Journal of Genetic Resources* **6**: 34-40.
- Felix LP, Guerra M.** 2000. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of *Cymbidioid* orchids. *Genetics and Molecular Biology* **23**: 957-978.
- Fishbein M, Livshultz T, Straub SCK, Simões AO, Boutte J, McDonnell A, Foote A.** 2018. Evolution on the backbone: Apocynaceae phylogenomics and new perspectives on growth forms, flowers, and fruits. *American Journal of Botany* **105**: 495-513.
- Gerlach WL, Bedbrook JR.** 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* (8) 1869:1885.

- Goyder DJ, Nicholas A, Liede-Schumann S.** 2007. Phylogenetic relationships in subtribe Asclepiadinae (Apocynaceae: Asclepiadoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **94**: 423-434.
- Guerra M.** 2000. Chromosome number variation and evolution in: *Monocots: Systematics and Evolution*. CSIRO: Melbourne 127-136.
- Guerra M.** 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic Genome Research* **120**: 339–350.
- Guerra M, Souza MD.** 2002. *Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. 1ª ed. Ribeirão Preto: FUNPEC.
- Guimarães G, Cardoso L, Oliveira H, Santos C, Duarte P, Sottomayor M.** 2012. Cytogenetic characterization and genome size of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *AoB Plants*. pls002.
- Gurung AB, Ali MA, Lee J, Al-Hemaid F, Farah MA, Al-Anazi KM.** 2020. Molecular docking elucidates the plausible mechanisms underlying the anticancer properties of acetyldigitoxigenin from *Adenium obesum*. *Saudi J. Biological Sciences* **27**: 1907-1911.
- Hastuti D, Suranto, Setyono P.** 2009. Variation of morphology, karyotype and protein band pattern of *Adenium* (*Adenium obesum*) varieties. *Nusantara Bioscience* **1**: 78-83.
- Hemleben V, Grierson D, Borisjuk N, Volkov RA, Kovarik A.** 2021. Personal Perspectives on Plant Ribosomal RNA Genes Research: From Precursor-rRNA to Molecular Evolution. *Frontiers in plant science* **12**.
- Motohashi, T. M.; Tagashira N, Kokubugata G, Aoyama M, Kondo K.** 2008. Chromosome numbers of four species of *Ochrosia* sensu lato (Apocynaceae). *Chromosome Botany* **3**: 7-10.

- Heneidak S, Martin E, Altinordu F, Badr A, Eroğlu HE.** 2019. Chromosome counts and karyotype analysis of species of family Apocynaceae from Egypt. *Caryologia* **72**: 69-78.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T.** 2011. Organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal* **66**: 18-33.
- Heslop-Harrison JS, Schmidt T.** 2012. Plant Nuclear Genome Composition. *Encyclopedia of Life Sciences* 1-8.
- Hossain MA.** 2018. A review on *Adenium obesum*: A potential endemic medicinal plant in Oman. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* **7**: 559-563.
- Hu X, Yu F, Huang Y, Sun L, Li X, Yang S, Chen K, Huang F, Zeng K, Zhang M, Deng Z.** 2019. Characterization analysis of the 35S rDNA intergenic spacers in *Erianthus arundinaceus*. *Gene* **694**: 63-70.
- Kim SH, Kim WC, Kim HH, Heo K.** 2020. Cytogenetical Study of *Cynanchum wilfordii* and *Cynanchum auriculatum* using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Korean Journal of Medicinal Crop Science* **28**(5), 325-330.
- Kubis S, Schmidt T, Heslop-Harrison JS.** 1998. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Annals of Botany* **82**: 45-55.
- Lee SH, Kim J, Park HS, Koo H, Waminal NE, Pellerin RJ, Shim H, Lee HO, Kim E, Park JY, Yu HS, Kim HH, Lee J, Yang TJ.** 2022. Genome structure and diversity among *Cynanchum wilfordii* accessions. *BMC plant biology* **22**(1), 1-14.
- Leitch IJ, Bennett MD.** 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological journal of the Linnean Society* **82**(4), 651-663.
- Leitch IJ, Hanson L, Lim KY, Kovarik A, Chase MW, Clarkson JJ, Leitch AR.** 2008. The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of botany* **101**(6) 805-814.

- Levin DA, Soltis DE.** 2018. Factors promoting polyploid persistence and diversification and limiting diploid speciation during the K-Pg interlude. *Current opinion in plant biology* **42**:1-7.
- Limones V, Baas FM, Borges I.** 2018 La rosa del desierto (*Adenium obesum*): de exótica flor de ornato a interesante fuente de compuestos bioactivos. Desde el *Herbário CICY* **10**: 128-131.
- Livshultz T, Middleton DJ, Endress ME, Williams JK.** 2007. Phylogeny of Apocynoideae and the APSA clade (Apocynaceae s.l.). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **94**: 324-359.
- Martins KC, Pereira TNS, Souza PSA, Costa FR.** 2010. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annum* e *Capsicum baccatum*. *Ciência Rural*,4 (8):1746-1751.
- Mata-Sucre Y, Costa L, Gagnon E, Gwilym PL, Ili JL, Souza G.** 2020. Revisiting the cytomolecular evolution of the Caesalpinia group (Leguminosae): a broad sampling reveals new correlations between cytogenetic and environmental variables. *Plant Systematics and Evolution* **306**: 48.
- Meve U, Liede-Schumann S.** 2007. *Ceropegia* (Apocynaceae, Ceropegieae, Stapeliinae): paraphyletic, but still taxonomically sound. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **94**: 392-406.
- Moyer LS.** 1936. Chromosome Numbers and Electrophoresis of Latex in *Asclepias*. *Botanical Gazette* **97**: 860–865.
- Nardy M, Yuyama PM, Rego LNAA, Vanzela ALL.** 2010. Chromosome banding patterns and localization of 5S and 45S rDNA sites in three shrub-tree species of *Erythrina* L. (Leguminosae: Papilionoideae) from Brazil. *Brazilian Journal of Biociences* **(8)** 2: 149-153.

- Novikova PY, Hohmann N, Van de Peer Y.** 2018. Polyploid *Arabidopsis* species originated around recent glaciation máxima. *Current Opinion in Plant Biology* **42**: 8-15.
- Otto FJ** .1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewicks Z, Crissman HA (eds) *Methods in cell biology* **33**: 05-110.
- Oyen LPA.** 2008. *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult. In: Schmelzer GH, Gurib Fakim A (eds). Plant resources of tropical Africa, medicinal plants, *Backhuys, Wageningen* 46-49.
- Pedrosa-Harand A, De Almeida CCS, 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**(5), 924-933.
- Plaizier AC.** 1980. A revision of *Adenium* Roem. & Schult. and of *Diplorhynchus* Welw. ex Fic. & Hiern (Apocynaceae). *Wageningen: H. Veenman & Zonen B.V* **80**-12.
- Praça-Fontes MM, Carvalho CR, Clarindo WR, Cruz CD.** 2011. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. *Plant Cell Reports* **30**:1183-1191.
- Rishmawi K, Prince SD, Xue Y.** 2016. "Vegetation Responses to Climate Variability in the Northern Arid to Sub-Humid Zones of Sub-Saharan Africa" *Remote Sensing* **8**: 910.
- Roa F, Guerra M.** 2012. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology* **12**(1) 1-13.
- Roa F, Guerra M.** 2015. Non-random distribution of 5S rDNA sites and its association with 45S rDNA in plant chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* (**146**) 3: 243-249.
- Roy Tapadar NN.** 1964. Cytotaxonomic Studies in Apocynaceae and Delineation of the Different Evolutionary Tendencies Operating within the Family, *Caryologia* **17**:103-138.

- Saensouk S, Saensouk P.** 2021. Comparative chromosomal features for four Apocynaceae species from Northeastern Thailand. *Biology* **76**: 2485-2490.
- Santos AMS.** 2017. *Evolução cromossômica em plantas de inselbergues com ênfase na família Apocynaceae Juss.* Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba, Brasil.
- Santos V, Silva EFD, Almeida C.** 2020. Genome size and identification of repetitive DNA sequences using low coverage sequencing in *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae: Gentianales). *Genetics and Molecular Biology* **43**: 3.
- Savas Tuna GS, Başer İ, Tuna T.** 2019. Genome size variation among natural populations of *Brachypodium distachyon* and *B. Hybridum* collected from different regions of Turkey. *Turkish Journal of Botany* **43**: 196-207.
- Schifino-Wittmann MT.** 2001. Determinação da Quantidade de DNA Nuclear em Plantas. *Ciência Rural* **31**: 897-902.
- Silveira RM, Machado RM, Forni-Martins ER, Verola CF, Costa IR.** 2016. Environmental variations drive polyploid evolution in neotropical *Eugenia* species (Myrtaceae). *Genetics and Molecular Research* **15**:1-19.
- Singh B.** 1951. Chromosome numbers in some flowering Plants. *Current Science* **20**: 105.
- Souza AP.** 2015. *Delimitação taxonômica do gênero Rhabdadenia (Rhabdadenieae, Apocynaceae) com base em caracteres anatômicos e micromorfológicos.* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Brasil.
- Techio VH, Davide LC.** 2007. Análise genômica em cromossomos de plantas com base no pareamento meiótico. *Biotemas*, 20 (4): 7-18.
- Van der Laan FM, Arends JC.** 1985. Cytotaxonomy of the apocynaceae. *Genetics* **68**: 1-33.

- Vanzela ALL, Ruas CF, Oliveira MF, Ruas P.** 2002. Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. *Genetica* 114: 105–111.
- Varella TL, Silva GM, Da La Cruz KZCM, Mikovski AI, Da Silva JR, Carvalho IF, Silva ML.** 2015. In vitro germination of desert rose varieties. *Ornamental Horticulture* 21: 227-234.
- Venter HJT, Dold AP, Verhoeven RL, Ionta G.** 2006. *Kappia lobulata* (Apocynaceae, Periplocoideae), a new genus from South Africa. *South African Journal of Botany* 72: 529-533.
- Versiani MA, Ahmeda SK, Ikrama A, Alia ST, Yasmeena K, Faizib S.** 2014. Chemical Constituents and Biological Activities of *Adenium obesum* (Forsk.) Roem. Schult. *Chemistry & Biodiversity, Zurich* 11: 171-180.
- Yang LL, Li HL, Wei L, Yang T, Kuang DY, Li MH, Liao YY, Chen ZD, Wu H, Zhang SZ.** 2016. A supermatrix approach provides a comprehensive genus-level phylogeny for Gentianales. *Journal of Systematics and Evolution* 54: 400-415.
- Zonneveld BJ, Leitch IJ, Bennett MD.** 2005. First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. *Annals of botany* 96: 229-244.
- Wang W, Wan T, Becher H, Kuderova A, Leitch IJ, Garcia S, Leitch AR, Kovařík, A.** 2019. Remarkable variation of ribosomal DNA organization and copy number in gnetophytes, a distinct lineage of gymnosperms. *Annals of botany* 123(5), 767-781.

FIGURAS E LEGENDAS

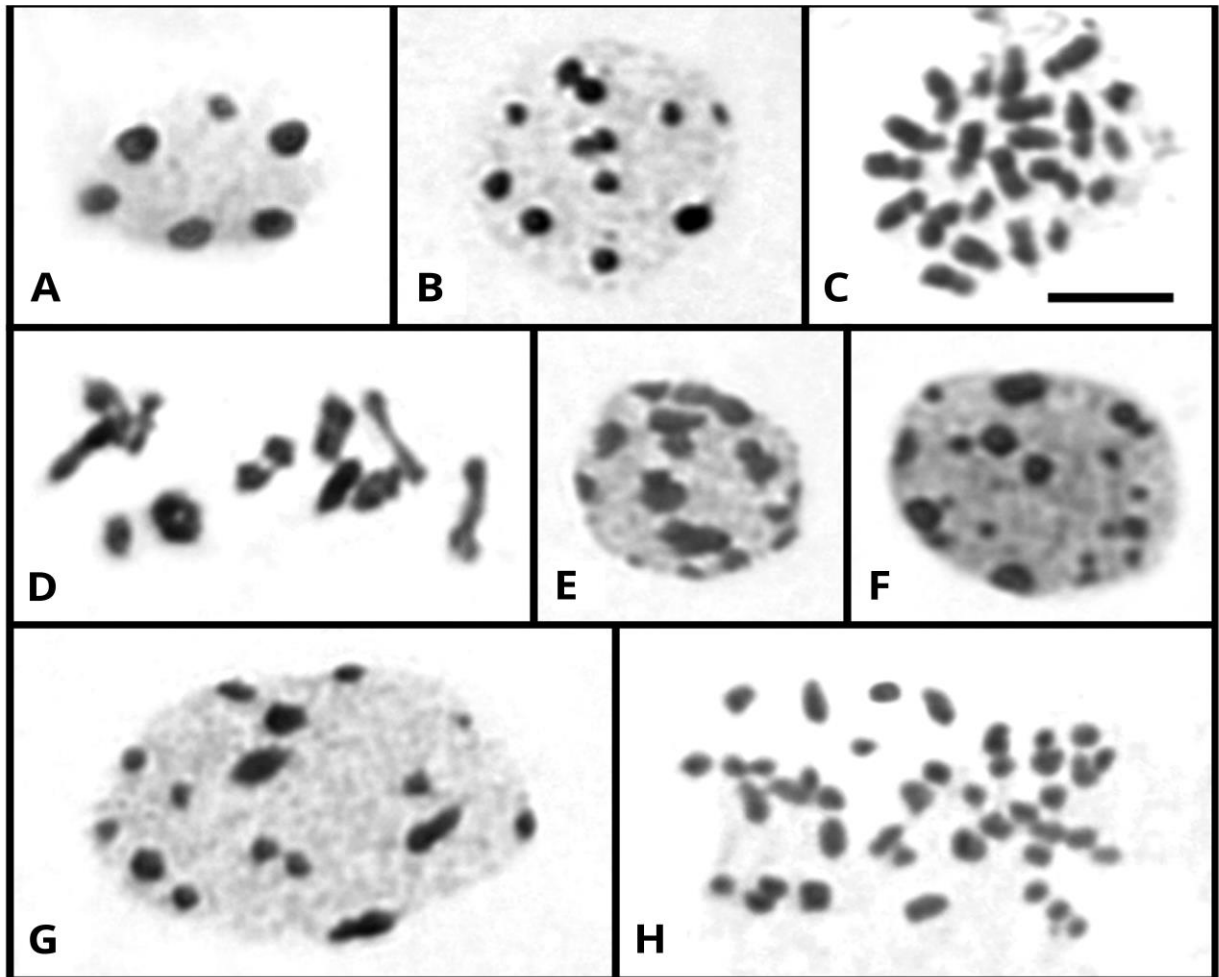


Figura 1. Análises citogenéticas em *A. obesum* e *A. arabicum*. (A-B) Núcleos interfásicos com variação no número de cromocentros em *A. obesum*. (C) Metáfase mitótica (2n) com 22 cromossomos em *A. obesum*. (D) Diacinese com 11 bivalentes em *A. obesum*. (E-G) Núcleos interfásicos com variação no número de cromocentros em *A. arabicum*. (H) Metáfase mitótica (2n) com 44 cromossomos em *A. arabicum*. Barra 5 µm.

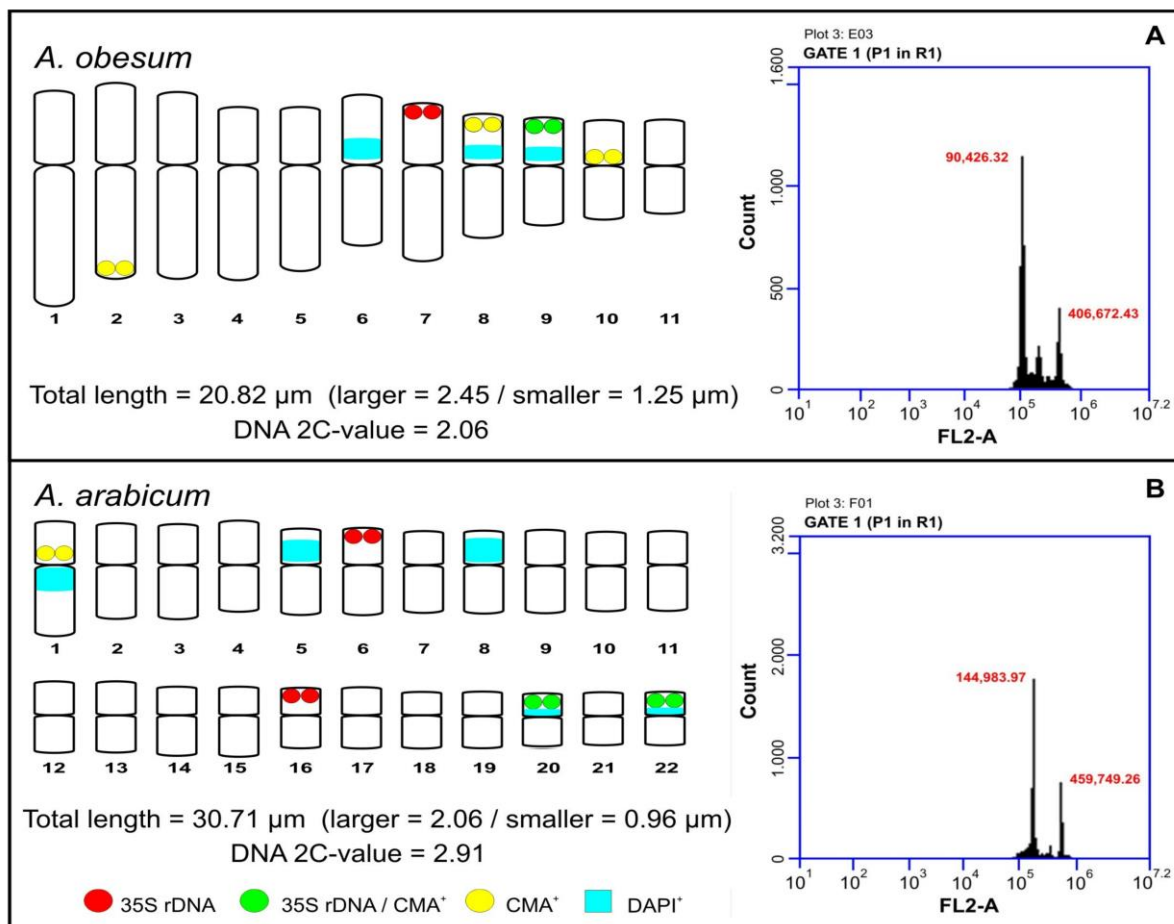


Figura 2. Idiogramas dos cariótipos e gráficos de citometria de fluxo em *A. obesum* e *A. arabicum*. Observe os cariótipos relativamente assimétricos e a distribuição das regiões heterocromáticas ricas em AT e GC preferencialmente no braço curto dos cromossomos, sinais de FISH com DNAr 35S em regiões terminais em *A. obesum* (A) e *A. arabicum* (B). Dados de citometria mostram valores 2C, sendo os que maiores picos representam G1, os menores G2 e os picos intermediários correspondem ao padrão (*P. sativum*). Barra 10 μm .

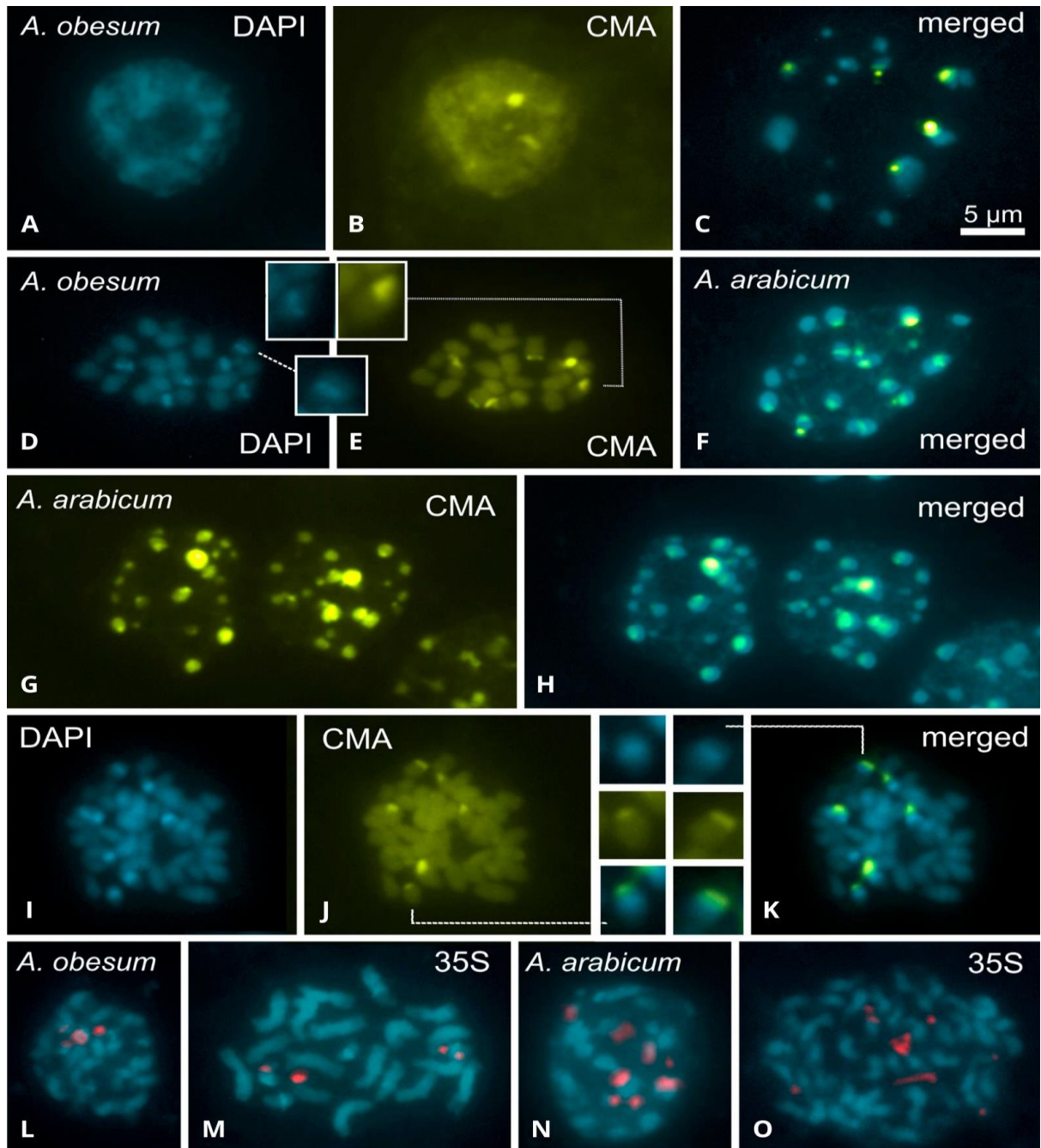


Figura 3. Bandeamento DAPI e CMA. (A e C) Núcleos interfásicos com sinais DAPI⁺ (azul) formando cromocentros ricos em AT e sinais CMA⁺ mostrando regiões adjacentes ricas em GC em *A. obesum*. (D-E) Metáfase mitótica em *A. obesum* mostrando regiões ricas em AT proximais e bandas ricas em GC terminais. (F-J) Bandeamento C em *A. arabicum*. Sinais CMA⁺ dispostos na periferia dos cromocentros (F-H). Sinais DAPI⁺ proximais em metáfase (I) bandas DAPI⁺ (J) bandas CMA⁺ (K) Metáfase mitótica em *A. arabicum* mostrando regiões ricas em AT proximais e bandas ricas em GC dispostos adjacentes (I-M) FISH com sonda *Pta71* DNAr 35S marcada com digoxigenina e detectada com antidigoxigenina (vermelho) hibridizando em núcleo e metáfase de *A. obesum* (N-O) FISH com sonda *Pta71* DNAr 35S marcada com digoxigenina e detectada com antidigoxigenina (vermelho) hibridizando em núcleo e metáfase de *A. arabicum*. Barra 5 µm.

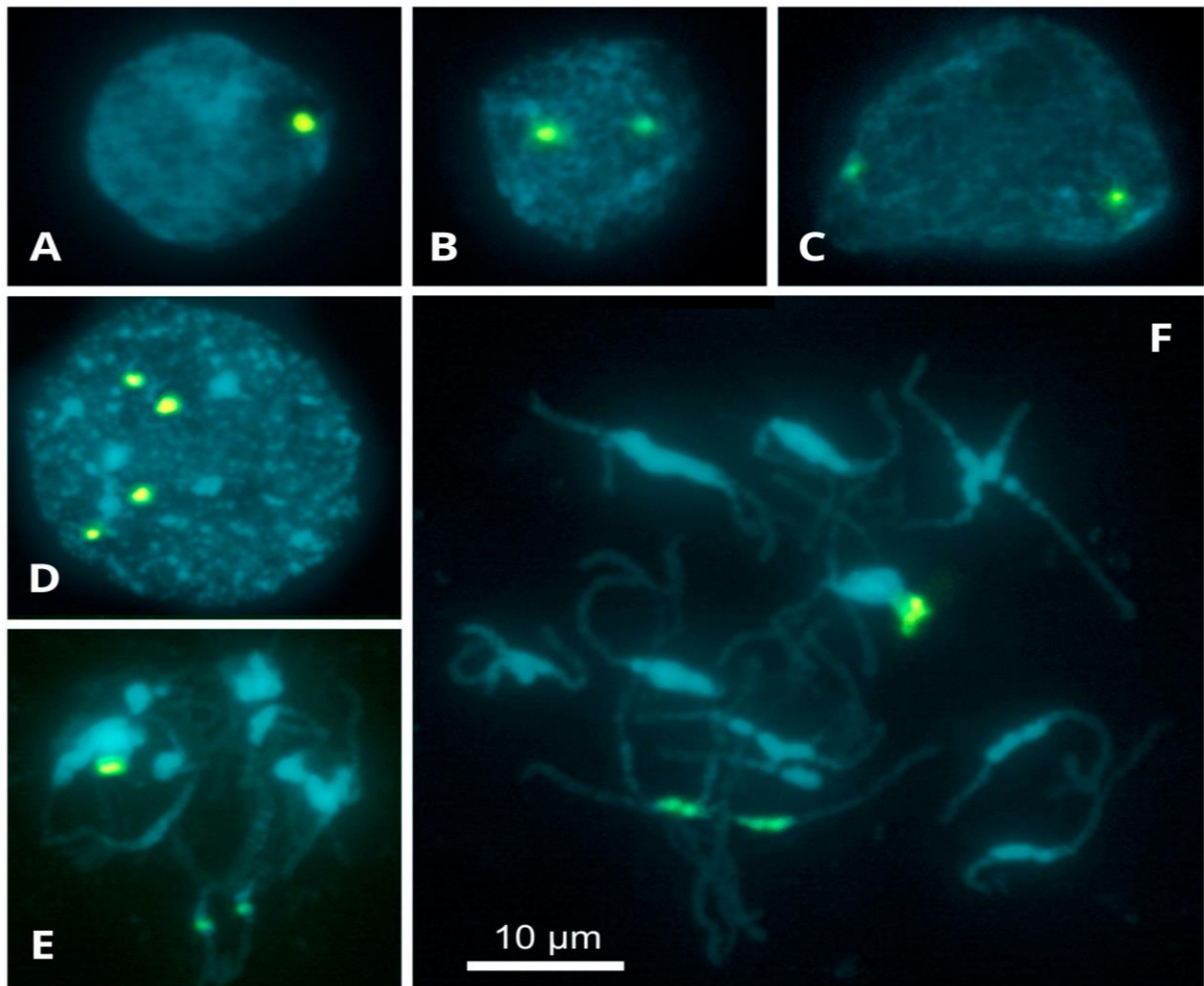


Figura 4. Bandejamento DAPI e CMA em células de anteras de *A. obesum*. (A-C) Interfáse com cromocentros DAPI⁺ e CMA⁺. (D) Reorganização de cromocentro (DAPI⁺) e aumento no número de sinais CMA⁺. Zigóteno (E) e paquíteno (F) mostrando o agrupamento de regiões paracentroméricas ricas em AT (azul) e de blocos ricos em GC (amarelo esverdeado). Barra 10 μm.