



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ADRIANO ALVES DE PAULA

**“DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DO  
GÊNERO *CESTRUM* L. (SOLANACEAE)”**

---

Londrina  
2013

ADRIANO ALVES DE PAULA

**“DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DO  
GÊNERO *CESTRUM* L. (SOLANACEAE)”**

Dissertação apresentada 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: Dr. André Luis Laforga Vanzela.

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

P324d Paula, Adriano Alves de.  
Diversidade cromossômica em espécies do gênero *Cestrum* L.  
(Solanaceae) / Adriano Alves de Paula. – Londrina, 2013.  
ix, 55f. : il.

Orientador: André Luis 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, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Solanaceae – Teses. 2. Citogenética vegetal – Teses. 3. Cromossomos  
vegetais – Teses. 4. DNA – Teses. 5. Hibridização in situ – Teses. I. Vanzela,  
André Luis Laforga. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.  
III. Título.

CDU 582.951.4

ADRIANO ALVES DE PAULA

**“DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO  
*CESTRUM* L. (SOLANACEAE)”**

Dissertação apresentada 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<sup>o</sup>. Dr. Alberto Sergio Fenocchio  
Universidade Nacional de Misiones - UNaM

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Renata da Rosa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. André Luís Laforga Vanzela  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2013.

Aos meus pais, irmã e amigos.

Obrigado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos espíritos que protegem minha vida, me dão forças e me guiam pelo caminho certo.

À minha mãe Elenice de Paula, pai Adilson de Paula, avós, avôs e demais familiares que me ensinaram os valores que carrego comigo. Especialmente a minha irmã Angélica de Paula por todo o apoio e por tudo que me ensinou durante a vida.

Aos meus amigos, por terem ajudado em varias etapas da minha vida e trazido diversas alegrias. Em especial Anderson Calzavara, Artur Rondina, André Lengert, Denis Caneshiro, Diego Garcia, Henrique Oliveira, Mario Meira Filho, Rafael da Penha e Vitor Pimenta.

Aos meus colegas do Laboratório de Citogenética Vegetal, Vanessa Bardela, Thiago Fernandes e Fabiola Santos, pela ajuda, companheirismo e pelos ensinamentos técnicos e científicos.

Aos antigos colegas de laboratório, em especial a Priscila Yuyama, Marcos Gaeta, Vanessa Michelan e Letícia Rego pela ajuda, companheirismo e pelos ensinamentos técnicos e científicos.

Ao meu orientador, prof<sup>o</sup>. Dr. André Vanzela, pelos ensinamentos, compreensão e companheirismo durante a minha formação acadêmica.

Ao professor Dr. José Torezan, à Ms. Alba Cavalheiro e aos técnicos Edi, Odaír, João, Orandir, Osmar e Norival do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE/UEL) pelo auxílio com coletas e cultivo do material biológico.

Às professoras Dra. Ana Dias, Dra. Renata da Rosa e Dra. Lúcia Caetano, assim como todos os alunos do Laboratório de Citogenética Animal (LACA/UEL) pelos ensinamentos e apoio técnico.

À Universidade Estadual de Londrina e o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, assim como seus funcionários e professores, por todo o apoio e capacitação que me proporcionaram.

À técnica administrativa do programa de pós-graduação, Maria Sueli T. Miranda, pelo apoio e paciência nos processos administrativos do programa e da universidade.

Aos técnicos dos diversos laboratórios do programa de pós-graduação e da universidade que sempre estiveram dispostos a ajudar, em especial ao Dário, Melissa e João Godoy.

À prof<sup>a</sup> Dra. Claudete Ruas e ao prof<sup>o</sup> Dr. Paulo Ruas, assim como Luana Rodrigues, Katia Rocha e demais alunos do Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas pela cooperação e apoio técnico.

Aos membros da banca examinadora prof<sup>o</sup> Dr. Alberto Fenocchio e Prof<sup>a</sup> Dra. Renata da Rosa por aceitarem contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa e financiamento de pesquisa.

Por fim agradeço a todos que de alguma forma ajudaram na construção deste trabalho e na minha formação acadêmica.

DE PAULA, Adriano Alves, **Diversidade cromossômica em espécies do gênero *Cestrum* (Solanaceae)**. 2013. 61p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina. 2013.

## RESUMO

O gênero *Cestrum* L. é composto por cerca de 250 espécies arbustivas e arbóreas de regiões tropicais e subtropicais. Suas espécies possuem cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, podendo alcançar até 14  $\mu$ m por cromossomo, os quais são considerados os maiores da família Solanaceae Juss. Estudos citogenéticos têm mostrado que os cariótipos em *Cestrum* apresentam grande diversidade no acúmulo e distribuição de segmentos repetitivos (heterocromatina e DNAr), além da ocorrência de cromossomos B. Contudo, há uma tendência à localização destes segmentos em regiões terminais, exceto pelo DNAr 5S que é sempre proximal e por bandas heterocromáticas pequenas (*dots*) localizadas em regiões intersticiais. Até o momento, estudos citogenéticos foram feitos para cerca de 5% das espécies conhecidas. Neste estudo, foram analisadas amostras de duas espécies, *Cestrum nocturnum* e *C. mariquitense*, empregando técnicas convencionais, bandeamento CMA/DAPI e FISH com DNAr. Adicionalmente, o cromossomo B de *C. strigilatum* foi microdissectado para a produção de sondas utilizadas na hibridização *in situ*. Os resultados mostram que ambos, *C. nocturnum* e *C. mariquitense*, exibem grande diversidade no acúmulo e na distribuição de segmentos de heterocromatina e DNAr 45S, assim como as demais espécies do gênero, porém, com o mesmo perfil de distribuição (blocos maiores nas regiões intersticiais/terminais e blocos menores intersticiais) e dispersão de modo equidistante/equilocal. A FISH mostrou que os sítios de DNAr 45S são variáveis tanto em número quanto em tamanho entre as amostras, embora tenha sido localizado sempre na região terminal dos cromossomos. Os sítios de DNAr 5S foram localizados sempre na região proximal do braço longo do par 8. A microdissecção do cromossomo B de *C. strigilatum*, seguida de amplificação e marcação, ambos por *random primers*, permitiu localizar sinais de hibridização no braço longo do cromossomo B, além de vários sinais nos cromossomos A, adjacentes a blocos de heterocromatina, indicando que cromossomos A e B compartilham este conjunto de segmentos. Foram encontrados ainda sítios de hibridização localizados na região pericentromérica do par 8, adjacente ao DNAr 5S. Em uma espécie do mesmo gênero, *C. mariquitense*, também foram encontrados sinais em diferentes cromossomos do complemento A e sítios adjacentes ao DNAr 5S.

**Palavras-chave:** Bandeamento cromossômico. Heterocromatina. Hibridização *in situ*. Cromossomo B. Microdissecção. *Cestrum*. Solanaceae.

DE PAULA, Adriano Alves, **Chromosome diversity in species of genus *Cestrum* (Solanaceae)**. 2013. 61p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) - Universidade Estadual de Londrina. 2013.

### ABSTRACT

The genus *Cestrum* L. comprises about 250 species of shrubs and trees of tropical and subtropical regions. Its species have metacentric and submetacentric chromosomes and can reach up to 14  $\mu\text{m}$ , which are considered the largest of the family Solanaceae Juss. Cytogenetic studies have shown that the karyotypes in *Cestrum* exhibit great diversity in the accumulation and distribution of repetitive segments (heterochromatin and rDNA), besides the occurrence of B chromosomes. There is a tendency to the location of these segments in the terminal regions, except for the 5S rDNA which is always proximal heterochromatic bands and small (dots) located in the interstitial regions. To date, cytogenetic studies were done to about 5% of known species. In this study, we analyzed samples of two species, *Cestrum nocturnum* and *C. mariquitense*, using conventional techniques, CMA / DAPI banding and FISH with rDNA. Additionally, the B chromosome of *C. strigilatum* was microdissected for producing a micro-library of the probes and in situ hybridization. The results show that, both *C. nocturnum* and *C. mariquitense* exhibit great diversity in the accumulation and distribution heterochromatic segments and 45S rDNA, as well as other species of the genus, but with the same distribution profile (larger blocks in the interstitial regions / terminals and smaller blocks interstitial), equidistantly / equilocal dispersion. The FISH showed that the 45S rDNA sites are variable in number and in size between samples, although it was always located at the chromosomes ends. The sites of 5S rDNA were always located in the proximal region of the long arm of pair 8. The microdissection of the B chromosome of *C. strigilatum*, followed by amplification and labeling by random primers allowed localize hybridization signals on the long arm of B chromosome, and various signals in the A chromosomes, adjacent heterochromatin blocks, indicating that chromosome A and B share this set of threads. Were still found hybridization sites located at pericentromeric region of the pair 8, adjacent the 5S rDNA. In one species of the same genus, *C. mariquitense*, signals were also found in different A chromosomes and adjacent sites of 5S rDNA.

**Keywords:** Chromosome banding. Heterochromatin. *In situ* hybridization. B Chromosome. Microdissection. *Cestrum*. Solanaceae.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Características botânicas de *Cestrum*. (A) fruto de *C. mariquitense*, (B) ramo de *C. intermedium*, (C) arbusto de *C. nocturnum*, (D) flor de *C. mariquitense* evidenciando a corola tubular-infundibiliforme, (E) esquema da estrutura floral de *C. intermedium* mostrando a presença de cinco estames inclusos soldados ao tubo da corola até o meio ou mais e (F) fruto de *C. nocturnum* com poucas sementes comprimidas..... 24
- Figura 2** - Filogenia de alguns grupos da família Solanaceae (adaptado de Knapp, Bohs e Nee (2004)). Os grupos em azul apresentam gêneros ou algumas espécies com acúmulo de DNA e grandes cromossomos, quando comparados à maioria das espécies da família. Note que a presença de cromossomos grandes ocorre de maneira independente em Solanaceae. E os grupos podem ser próximos, como *Solanum* (*Cyphomandra*) e *Capsicum*, ou distantes como *Cestrum* e *Capsicum*..... 25

### CAPÍTULO I: Variabilidade na distribuição de heterocromatina e DNAr em *Cestrum nocturnum* L. e *C. mariquitense* Kunth (Cestroidae, Solanaceae)

- Figura 1** - Mapa dos locais de coleta no Paraná / Brasil. Populações de *C. mariquitense* foram coletadas nas cidades de Cianorte, Faxinal, Maringá e Londrina. Os exemplares de *C. nocturnum* (exótica) foram coletados em canteiros públicos da cidade de Londrina..... 36
- Figura 2** - Metáfases mitóticas de *Cestrum mariquitense* população de Cianorte (A), Faxinal (B), Maringá (C), Londrina (D) e *C. nocturnum* (E), coradas com Giemsa 2%. As setas apontam para o par 8..... 37
- Figura 3** - Bandeamento C/CMA/DAPI em *Cestrum mariquitense* nas populações de Cianorte (A), Faxinal (B), Maringá (C) e Londrina (D), e em *C. nocturnum* (E). Sinais em amarelo correspondem às bandas CMA<sup>+</sup> e sinais em azul correspondem às bandas DAPI<sup>+</sup>. Caixas laterais mostram detalhes de bandas tênues do par 1 e de bandas intersticiais do par 2 em *C. nocturnum*..... 38
- Figura 4** - FISH com as sondas de DNAr 45S (vermelho) e 5S (verde) de trigo. Em *C. mariquitense* população de Cianorte (A), Faxinal (B), Maringá (C), Londrina (D). E *C. nocturnum* (E, F). Note o sinal proximal do par 8 obtido

com a sonda de DNAr 5S em todas as espécies. A seta em C aponta o sinal mais intenso, que se estende por quase todo o braço curto do par 7 da população de Maringá. As cabeças de seta em E indicam sítios hibridização tênues no par 5 e o sítio em um dos homólogos do par 3..... 39

**Figura 5** - Idiogramas dos cromossomos de *Cestrum mariquitense* população de Cianorte (A), Faxinal (B), Maringá (C), Londrina (D) e *C. nocturnum* (E). Note a ausência de blocos centroméricos, a equilocalidade dos blocos e que as bandas maiores são preferencialmente localizadas na região terminal dos braços curtos. No par 3 de D e E foram encontrados polimorfismos de posição ..... 40

## CAPÍTULO II: Análise cito-molecular do cromossomo B de *Cestrum strigilatum*

**Ruiz et Pav**

**Figura 1** - Exemplo do processo de microdissecção cromossômica em uma célula em metáfase mitótica de *C. strigilatum* observada sob contraste de fase ..... 49

**Figura 2** - Hibridização *in situ* com o produto do cromossomo B de *C. strigilatum* microdissectado e amplificado por *random primers*. FISH em uma metáfase mitótica de *C. strigilatum*: A) DAPI, B) biotina-FITC e C) sobreposição. A seta grande aponta para o cromossomo B. FISH com as sondas do B de *C. strigilatum* em uma metáfase de *C. mariquitense*: D) DAPI, E) biotina-FITC e F) sobreposição. As setas menores indicam o sinal de hibridização localizado adjacente ao DNAr 5S no par 8 das duas espécies. Pontas de seta indicam sinais de hibridização nos cromossomos A de *C. mariquitense* e *C. strigilatum*. Em detalhe (G-I) o cromossomo B aparece em maior ampliação. Note que a FISH gerou sinais mais brilhantes no braço longo do cromossomo B (seta maior). As pontas de seta (J-K) indicam sinais de hibridização nos cromossomos A de *C. strigilatum*, os quais ocorrem preferencialmente adjacentes a heterocromatina DAPI<sup>+</sup> ..... 50

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I: Variabilidade na distribuição dos sítios de heterocromatina e DNAr em *Cestrum nocturnum* L. e *C. mariquitense* Kunth (Cestroideae, Solanaceae).**

**Tabela 1** - Medidas cromossômicas das amostras analisadas. CP = comprimento dos maiores e menores pares cromossômicos; TCH = tamanhos totais dos complementos haplóides; DP = desvio padrão; FC = fórmulas cariotípicas; FUEL = número da exsicata .....36

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	12
2.1	CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS DE SOLANACEAE E CESTRUM.....	12
2.2	CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS DE SOLANACEAE E CESTRUM.....	13
2.3	HETEROCROMATINA E DNA REPETITIVOS.....	14
2.4	HETEROCROMATINA EM SOLANACEAE E CESTRUM.....	15
2.5	DNA RIBOSSÔMICOS EM SOLANACEAE E CESTRUM.....	17
2.6	CROMOSSOMOS B.....	18
2.7	CROMOSSOMOS B EM SOLANACEAE E CESTRUM.....	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>4</b>	<b>ARTIGOS</b> .....	26
	<b>CAPÍTULO I: Variabilidade na distribuição dos sítios de heterocromatina e DNAr em <i>Cestrum nocturnum</i> L. e <i>C. mariquitense</i> Kunth (Cestroideae, Solanaceae)</b> .....	26
	<i>Introdução</i> .....	26
	<i>Materiais e Métodos</i> .....	28
	<i>Resultados</i> .....	30
	<i>Discussão</i> .....	32
	<i>Referências</i> .....	41
	<b>CAPÍTULO II: Análise cito-molecular do cromossomo B de <i>Cestrum strigilatum</i> Ruiz et Pav</b> .....	44
	<i>Introdução</i> .....	44
	<i>Materiais e métodos</i> .....	46
	<i>Resultados e discussão</i> .....	47
	<i>Referências</i> .....	51
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	53
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cestrum* é composto por espécies arbóreas e arbustivas que se distribuem pelas regiões tropicais e subtropicais das Américas, sendo o Brasil um importante centro de diversidade para o gênero (HUNZIKER, 1976). Suas espécies possuem características fitoquímicas que atraem estudos para o grupo, como a produção de compostos secundários com propriedades antimicrobianas e fitotóxicas (BHATTACHARJEE et al., 2005; BARBOSA et al., 2010). Além disso, espécies deste gênero apresentam cromossomos grandes que são alvo para estudos de acúmulo de sequências repetitivas e estruturação genômica (BERG e GREILHUBER 1992, 1993a e 1993b; FREGONEZI et al., 2006; FERNANDES et al., 2009). Neste trabalho foram analisadas a organização cariotípica das espécies de *Cestrum mariquitense* e *C. nocturnum*, assim como parte da constituição do cromossomo B de *C. strigilatum*.

Os cariótipos de *C. nocturnum* e de quatro populações de *C. mariquitense* apresentaram ao menos dois sítios de hibridização da sonda de DNAr 45S, geralmente na região terminal dos menores pares, e um sítio de hibridização do DNA 5S na região proximal do menor par associado à heterocromatina CMA<sup>+</sup>. O maior acúmulo de bandas heterocromáticas CMA<sup>+</sup> e DAPI<sup>+</sup> ocorreu nas regiões terminais dos cromossomos, sendo os blocos intersticiais menores e menos numerosos. Os blocos parecem seguir o padrão equilocal e equidistante de dispersão embora o tamanho e a posição ao longo dos pares tenham produzido uma marca a respeito da diferenciação das espécies.

As sondas obtidas por *random priming* do cromossomo B microdissectado de *C. strigilatum* mostraram sinais de hibridização adjacentes às bandas DAPI<sup>+</sup> nos cromossomos A e um sinal forte na região proximal do par 8 (região descrita como sítio de ocorrência do DNAr 5S). Em outra espécie do gênero a sonda mostrou sinais em vários cromossomos e também um sinal mais forte na região proximal do par 8. Os dados sugerem que na origem do cromossomo B de *C. strigilatum* há a participação de uma ou mais sequências repetitivas comum a mais de uma espécie de *Cestrum*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS DE SOLANACEAE E *CESTRUM*

O gênero *Cestrum* L. pertence à família Solanaceae, uma das maiores dentre as angiospermas, com cerca de 2.500 espécies (OLMSTEAD et al., 2008). Esta família apresenta diversas espécies de interesse econômico tais como *Solanum lycopersicum* L. (tomate), *S. tuberosum* L. (batata), *S. melongena* L. (berinjela), bem como outras dos gêneros *Capsicum* L. (pimentas), *Nicotiana* L. (tabaco) e *Petunia* Juss. (petúnias). As espécies são agrupadas em Solanaceae por apresentarem características como: óvulos e sementes numerosos, dois carpelos obliquamente orientados, ausência de látex, cotilédones não plicados, estilete simples e estigma único, pouco ou nada lobado (CRONQUIST, 1988). As espécies da família se distribuem por todo o globo, preferencialmente nas regiões tropicais e subtropicais, exceto no Círculo Polar Ártico e no continente Antártico (D' ARCY, 1991).

Solanaceae é dividida em três subfamílias e doze tribos. Dessas, a tribo Cestreae G. Don (subfamília Cestroideae Schltld.) é predominantemente sul-americana e agrupa os gêneros *Cestrum*, *Metternichia* Mikan, *Pantacantha* Speg, *Tsoala* Bosser & D'Arcy, *Sessea* Ruiz e Pav e *Vestia* Willd. (D' ARCY, 1991). Hunkizer (2001), no entanto, agrupou em Cestreae apenas os gêneros *Cestrum*, *Sessea* e *Vestia*, baseado na presença de cinco estames, antera diteca, nunca com estame ou teca estéril, número cromossômico básico  $x = 8$  e alcalóides nicotínicos, indólicos ou esteroidais.

O gênero *Cestrum* L. é composto por espécies arbustivas e arbóreas que se distribuem pelas regiões tropicais e subtropicais das Américas. A maior concentração de espécies do gênero ocorre no Brasil e na região que se estende do norte argentino até os Andes venezuelanos (HUNZIKER, 1976). Este gênero é o terceiro maior da família Solanaceae Juss. com cerca de 250 espécies (aproximadamente 10% das espécies da família). Seus representantes são reconhecidas por compartilharem as seguintes sinapomorfias: i) corola tubular-infundibuliforme, ii) cinco estames inclusos e soldados ao tubo da corola até ao meio ou mais, iii) poucas sementes comprimidas e iv) embrião reto (SMITH e DOWNS, 1966) (Figura 1).

Espécies deste gênero, tais como *C. diurnum* L. e *C. laevigatum* Schltld. são conhecidas pela produção de compostos secundários com propriedades antimicrobianas e fitotóxicas (BHATTACHARJEE; GHOSH; CHANDRA, 2005; BARBOSA et al., 2010, respectivamente). Além disso, as espécies de *Cestrum* possuem grande valor ecológico, uma

vez que o gênero é reconhecido como pioneiro no processo de sucessão vegetal em diferentes tipos de habitats.

Segundo Vignoli-Silva (2009), a uniformidade morfológica interespecífica e a variação morfológica intraespecífica das espécies de *Cestrum* no Brasil extra-amazônico (região analisada no trabalho) ainda são conflitantes, comprometendo a identificação dos táxons bem como avaliação da amplitude do gênero. Isto torna o gênero prioritário para estudos mais amplos envolvendo diferentes áreas da biologia, como a Genética e a Citogenética.

## 2.2 CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS DE SOLANACEAE E *CESTRUM*

Estudos citogenéticos mostram que o número básico das espécies da família Solanaceae varia entre  $x = 7$  e 14, podendo ocorrer derivações como  $x = 17$ , 19 e 23 (LAS PENAS et al., 2006). Os cariótipos são organizados predominantemente por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, como previamente descritos para *Solanum* L., com  $2n = 24$  e 48 (REGO et al., 2009; ACOSTA; GUERRA; MOSCONE, 2012), *Nicotiana* L., com  $2n = 18$  até 64 (LIM et al., 2000; KITAMURA et al., 2001; CHASE et al., 2003) e *Capsicum* L., com  $2n = 24$  e 26 (POZZOBON, SCHIFINO-WITTMAN; BIANCHETTI, 2006; MOSCONE; SCALDAFERRO; GRABIELE, 2007). Estes últimos autores encontraram que em espécies de *Capsicum* com  $2n = 26$  são comuns os subtelocêntricos e telocêntricos.

O conteúdo de DNA e o comprimento do lote haplóide variam bastante na família e até mesmo dentro de um mesmo gênero. As espécies *S. amygdalifolium* Steud. e *S. granuloso-leprosum* Dun. apresentam 13  $\mu\text{m}$  de comprimento do complemento haplóide enquanto *S. corymbiflorum* (Sendtn.) Bohs (antiga *Cyphomandra corymbiflorum*) apresenta 78  $\mu\text{m}$  (REGO et al., 2009).

O antigo gênero *Cyphomandra* Mart. ex Sendtner é um caso interessante, pois este foi incorporado ao gênero *Solanum* (BOHS, 1995), mas, apesar de ter o mesmo número cromossômico, suas espécies têm complementos haplóides bem maiores do que *Solanum*, já que variam de 55,5  $\mu\text{m}$  em *C. corymbiflora* Sendtn até 116,5  $\mu\text{m}$  em *C. uniloba* Rusby e o conteúdo 1C de DNA varia de 6,75 pg em *C. corymbiflora* até 24,8 pg em *C. hartwegii* Miers (PRINGLE e MURRAY, 1991).

Em grupos bem definidos também é possível notar tal variação. O conteúdo 1C de DNA em *Capsicum*, por exemplo, varia de 3,35 pg em *C. chacoense* Hunz. até 5,77 pg em *C. parvifolium* Sendtn. A variação no tamanho total do complemento haplóide vai de 41

$\mu\text{m}$  em *C. rhomboideum* (Dunal) Kuntze até 103  $\mu\text{m}$  em *C. flexuosum* Sendtn. e *C. mirabile* Mart. *Capsicum*, apesar de filogeneticamente próximo ao *Solanum*, apresenta cromossomos em média até três vezes maiores que o deste último gênero (PARK, et al. 2011).

A tribo Cestreae engloba espécies com cromossomos predominantemente metacêntricos e em geral grandes. Nos gêneros *Sessea* e *Vestia* as únicas medidas de complemento haplóide descritas até então são: 57,7  $\mu\text{m}$  para *V. foetida*  $\mu\text{m}$  e 84,2 para *S. corymbiflora* (LAS PENAS et al., 2006) esses dados caracterizam a tribo como um taxa com grandes cromossomos. Os números cromossômicos parecem estar estabilizados em  $2n = 16$  (BERG e GREILHUBER, 1992, 1993a, 1993 b; LAS PENAS et al., 2006; FREGONEZI et al., 2006; FERNANDES et al., 2009)

Os cariótipos das espécies de *Cestrum* são compostos por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, grandes, podendo alcançar até 14  $\mu\text{m}$  por cromossomo (BERG e GREILHUBER, 1993a). O complemento haplóide varia de 24  $\mu\text{m}$  em *C. capsulare* Carv. et Schnoor, antiga *Sessea regnellii* Taubert (FERNANDES et al., 2009) até 92,09  $\mu\text{m}$  em *C. buxifolium* Kunth (LAS PENAS et al., 2006).

Os dados citogenéticos e moleculares utilizando *exons* de 10 marcadores COSII (conjunto ortólogo conservado na sigla em inglês) sugerem que a aproximadamente 23,7 milhões de anos atrás um ancestral comum deu origem a *Nicotiana* (diplóide) e a um grupo formado por *Capsicum annuum* L. e o ancestral comum de *S. melongena*, *S. tuberosum* e *S. lycopersicum*. Os estudos com estas espécies sugerem que Solanaceae possui uma taxa modesta de mudanças cromossômicas, apresenta pontos preferenciais de quebra e rearranjo e sofre mais inversões que translocações (WU e TANKSLEY, 2010). Esta organização dos grupos concorda com a filogenia molecular realizada por Olmstead et al. (2008) baseado em sequências *ndhF* e *trnLF* de DNA de cloroplasto. Apesar da proximidade filogenética entre *Capsicum*, *Nicotiana* e *Solanum*, não há referência para o grande acúmulo de DNA em *Cyphomandra* (atualmente *Solanum*) e *Capsicum*, assim como em grupos mais distantes como *Cestrum* (Figura 2).

### 2.3 HETEROCROMATINA E DNA REPETITIVOS

A heterocromatina é um tipo de cromatina que apresenta coloração intensa (heteropiconose positiva), replicação tardia e condensação diferencial em estágios onde outras regiões cromossômicas estão descondensadas e vice-versa, sendo comumente reveladas pela técnica de bandeamento C (PARDUE e HENNIG, 1990). Este tipo de cromatina é também o

principal sítio de ocorrência dos DNAs satélites, podendo apresentar relação com outras famílias de DNAs repetitivos, como: DNA ribossômico, retrotransposons e transposons (HESLOP-HARRISON, 2000).

Os elementos de transposição, em particular, podem corresponder a maior porcentagem do genoma de alguns organismos como a cevada, *H. vulgare* L. com 55%, e o milho, *Z. mays* L., com 60 % (KIDWELL, 2002), que em geral podem estar associados à heterocromatina. Ouyang e Buell (2004) encontraram que entre as espécies com genoma sequenciado, as monocotiledôneas gramíneas foram as que mais acumularam DNAs repetitivos, sendo os elementos transponíveis a principal classe destes DNAs. Solanaceae, porém, apresentou o menor número de sequências repetidas dentre as famílias estudadas por esses autores. Um fato incomum apontado por Ouyang e Buell (2004), é que a maior parte das sequências repetitivas encontradas para Solanaceae são da classe dos DNAs ribossomais, sendo elementos transponíveis (principalmente retroelementos) a segunda classe mais abundante. Contudo somente duas plantas do gênero *Solanum* foram avaliadas. Dados citogenéticos mostram que para *Solanum lycopersicum* L. o DNA ribossomal 45S ocupa apenas cerca de 3,6 % do complemento haplóide (BRASILEIRO-VIDAL *et al.*, 2009).

#### 2.4 HETEROCROMATINA EM SOLANACEAE E *CESTRUM*

A heterocromatina possui distribuição bem variável nas angiospermas e sua ocorrência independe da quantidade de eucromatina e do conteúdo de DNA. Desse modo, estudos envolvendo regiões heterocromáticas podem ser importantes para entender a evolução cariotípica de diversos grupos taxonômicos (GUERRA, 2000).

Espécies da família Solanaceae possuem uma grande variabilidade na ocorrência e distribuição da heterocromatina, porém, em muitos grupos, existe uma tendência à distribuição preferencial nas regiões terminais. A maioria das espécies de *Solanum* apresentam blocos heterocromáticos C-CMA<sup>+</sup> terminais (REGO *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2012), com exceção de *S. palinacanthum* Dunal, o qual apresenta um acúmulo de bandas C-CMA<sup>+</sup> intercalares e pericentroméricas (REGO *et al.*, 2009). *Lycium* L. apresenta bandas C-CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>0</sup> terminais, associadas à NOR no maior par cromossômico nas cinco espécies até o momento estudadas (LAURA *et al.*, 2010). Espécies de *Capsicum*, por exemplo, apresentam blocos C-CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> preferencialmente nas regiões cromossômicas terminais, podendo em alguns casos se estenderem por mais da metade dos braços (MOSCONE *et al.*, 1993;

MOSCONE; LAMBROU; EHRENDORFER, 1996, MOSCONE; SCALDAFERRO; GRABIELE, 2007; SCALDAFERRO; GRABIELE; MOSCONE, 2012).

Existem ainda espécies como *Nicotiana plumbaginifolia* L., a qual acumula bandas C-Giemsa<sup>+</sup> nas regiões centromérica e terminal de todos os pares e na região intercalar da maioria deles (MOURAS; WILDENSTEIN; SALESSES, 1986). Não existem estudos sobre o acúmulo de heterocromatina nos gêneros *Sessea* e *Vestia* (tribo Cestreae), porém, os estudos citogenéticos com *Cestrum* têm mostrado que a diferenciação cariotípica no gênero, sobretudo no que diz respeito ao acúmulo e distribuição de segmentos repetitivos, é bastante diversa (BERG e GREILHUBER, 1992, 1993 a,b; FREGONEZI et al., 2006; FERNANDES et al., 2009). Em *Cestrum*, os maiores blocos heterocromáticos se acumulam principalmente nas regiões terminais e intercalares dos braços curtos. Por outro lado, a região centromérica parece não ter um papel tão importante no acúmulo de heterocromatina, exceto por *C. megalophyllum* Dunal (FERNANDES et al., 2009). Esses autores mostraram que há diversas bandas pequenas e inconstantes (em geral Giemsa<sup>+</sup> e DAPI<sup>+</sup>) que aparecem como pequenos *dots* em diferentes regiões cromossômicas. Porém, na maioria dos casos, esses *dots* respeitam uma distribuição equilocal, assim como os grandes blocos CMA e DAPI. Em geral, as bandas C-Giemsa<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup> ou C-CMA<sup>+</sup> são encontradas principalmente nas regiões terminais dos braços curtos, mas também podem ser encontradas em regiões intercalares ou associadas ao DNAr 45S e 5S (FREGONEZI et al., 2006; FERNANDES et al., 2009).

Em algumas espécies de *Cestrum*, os blocos C-DAPI<sup>+</sup> parecem ser o principal sítio de ocorrência de regiões cromossômicas que sofrem uma descompactação quando tratadas à baixas temperaturas. Estas são conhecidas como regiões sensíveis ao frio ou *cold-sensitive regions* (CSRs) (BERG & GREILHUBER, 1992, 1993 a, 1993 b; FREGONEZI et al., 2006). Estas regiões são encontradas em cerca de 11 gêneros de monocotiledôneas e três de eudicotiledôneas, mas já foram descritas em várias espécies de *Cestrum* (BERG e GREILHUBER, 1992, 1993 a, 1993 b; FREGONEZI et al., 2006). As CSRs de *Cestrum* correspondem às regiões heterocromáticas ricas em pares de bases AT, que estão associadas à eventos de hipometilação da citosina, como reportado por Guarido et al. (2012).

Todos os exemplos citados até o momento mostram quão a heterocromatina é variável em *Cestrum* e em Solanaceae, bem como o potencial deste marcador cromossômico para estudos de evolução cromossômica e citotaxonomia.

## 2.5 DNAs RIBOSSÔMICOS EM SOLANACEAE E *CESTRUM*

Os DNAs ribossômicos são os elementos repetitivos mais estudados quanto à localização e distribuição em cariótipos vegetais. Na família Solanaceae, estes apresentam pouca variação dentro dos gêneros mais estudados. Em *Solanum*, por exemplo, é comum um sítio de DNAr 5S e um de DNAr 45S geralmente localizados na região intercalar (5S) e terminal dos cromossomos (45S). Este último aparece quase sempre associado às regiões CMA+ (BRASILEIRO-VIDAL et al., 2009; REGO et al., 2009).

Em *Nicotiana*, o perfil mais encontrado é um par com o DNAr 5S terminal e dois ou três pares com o DNAr 45S terminais. Esta variação no número de sítios de DNAr 45S parece estar condicionado às alterações numéricas, como aneuploidias e poliploidias, comuns em espécies deste gênero (LIM et al., 2006; KOVARIK et al., 2008). Devido ao fato de *Nicotiana* possuir várias espécies aloploplóides, este foi utilizado como modelo para a investigação da dominância nucleolar e homogeneização das sequências de DNAr 45S, a qual indicou que um controle epigenético pode estar atuando logo na primeira geração de híbridos. Neste caso, o DNAr ativo apresentou-se homogêneo enquanto os sítios inativos sofreram mutações, chegando a ser deletados (KOVARIK et al., 2008).

Em *Capsicum*, o número de sítios de DNAr 5S parece ser estável, sendo localizado apenas um na região distal do primeiro par. O DNAr 45S, porém, pode variar de dois, como em *C. annuum*, até 14 como em *C. baccatum* L. Embora haja uma maior diversidade no número de sítios de DNAr 45S, esses foram encontrados sempre nas regiões terminais dos cromossomos (YOUN-KYU et al., 1999; KWON e KIM, 2009).

Fregonezi et al. (2006) e Fernandes et al. (2009) estudaram a localização dos DNAs ribossômicos 45S e 5S em 8 espécies de *Cestrum*. Quase todas as espécies apresentam sítios grandes de DNAr 45S em ao menos um dos menores pares, exceto por *C. sendtnerianum*. Porém sítios adicionais de DNAr 45S também são localizados em cromossomos maiores em *C. amictum*, *C. intermedium*, *C. strigilatum*, *C. capsulare*, *C. laevigatum* e *C. megalophyllum*. O DNAr 5S, apresenta geralmente um sítio na região proximal do braço longo do último par, exceto por *C. capsulare*, que apresentou este sítio no par 4.

## 2.6 CROMOSSOMOS

Cromossomos B, também chamados de extranumerários, são cromossomos adicionais ou dispensáveis ao complemento haplóide, que não se recombinam com os cromossomos do complemento A, possuem padrão próprio de evolução e modos de herança não mendeliana (JONES, 2012).

Em uma das mais importantes revisões acerca da ocorrência de cromossomos B em plantas, Jones (1995) reportou que já foram descritos mais de 1.300 espécies de plantas com B. Além disso, este autor estimou que tais cromossomos possam ocorrer em cerca de 15% das plantas superiores. A presença dos B não pode ser detectada por marcadores morfológicos e isto limita os levantamentos de sua ocorrência. Levin et al. (2005) realizou um grande estudo abrangendo cerca de 10% do número de espécies proposto para angiospermas. Neste, foram analisadas 23.652 e encontradas 979 espécies com cromossomos B (4,1%). Estes autores ainda detectaram que 8% das monocotiledôneas e 3% das eudicotiledôneas estudadas apresentavam B. Embora haja uma heterogeneidade entre grupos taxonômicos, as ordens Liliales e Commelinales são exemplos de grupos com alta frequência de B. Em um estudo mais recente com espécies da flora italiana, Bedini, Garbari e Peruzzi (2011) acessaram o banco de dados Chrobase.it, e encontraram que 148 espécies de plantas vasculares apresentavam cromossomos B, o que corresponde a 5,3 % do conjunto de dados. Apesar do grande número de espécies com B, sua formação é provavelmente um evento raro, já que em algumas espécies diferentes variantes dos cromossomos B parecem ser relacionadas (HOUBEN et al., 2011).

A origem dos cromossomos B nos diferentes organismos ainda é uma incerteza, além disso, diferentes estudos apontam para diferentes caminhos e origens, a depender das espécies em questão. Dentre estes caminhos, podemos mencionar as hibridizações interespecíficas ou a origem a partir de um dos cromossomos do próprio genoma hospedeiro. Para Camacho, Sharbel e Beukeboom (2000) e Jones e Houben (2003), esta última possibilidade parece ser a fonte mais provável desses cromossomos.

Um exemplo bem caracterizado da origem a partir dos cromossomos A foi reportado por Dahr et al. (2002) em *Plantago lagopus* (Plantaginaceae), onde o cromossomo B foi originado após um evento de aneuploidia. Neste caso, um cromossomo do complemento A em trissomia sofreu várias fragmentações. Dois desses fragmentos contendo DNAs ribossômicos e centrômero se fundiram dando origem a um micro-cromossomo B. O micro-cromossomo sofreu posteriormente amplificação das sequências ribossômicas e

telomerização, culminando na formação de um novo cromossomo, o qual, após um evento de divisão irregular na região centromérica, originou um isocromossomo B.

Outro exemplo foi descrito para *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae) por Houben et al., (2001) e Jones e Houben (2003). Estes autores mostraram a existência de dois cromossomos B distintos, um grande e um micro, os quais parecem ter surgido por caminhos diferentes. O micro-cromossomo B, exibiu uma coleção de sequências repetidas em *tandem* também encontradas em diversos cromossomos do complemento A. A hipótese dos autores é de que este micro B não tenha sido originado de um único rearranjo cromossômico, mas que seu conteúdo seja um aglomerado de sequências oriundas de diferentes cromossomos A.

Existem ainda estudos que apontam que os cromossomos B podem ser gerados espontaneamente devido a rearranjos estruturais, tais como eliminação, amplificação e reorganização de sequências em resposta às novas condições genômicas, como por exemplo, alopoloidização. Um exemplo foi relatado para o híbrido entre *Cestrum parqui* L'Hér × *C. aurantiacum* Lindl, Solanaceae (SÝKOROVÁ et al., 2003), o qual pode apresentar até dez cromossomos B.

Geralmente, os cromossomos B têm uma composição de DNA similar a encontrada no genoma do organismo hospedeiro, mas suas sequências seguem padrões de evolução diferenciados (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). É comum encontrar nestes cromossomos grandes quantidades de DNA repetitivo, como elementos móveis e DNA satélite. *Brachycome dichromosomatica* é um bom exemplo, pois apresenta um micro B composto principalmente de sequências repetitivas (HOUBEN et al., 2001), como já mencionado. Para Houben e Carchilan (2012), a alta heterocromatinização encontrada nos cromossomos B de diversos organismos se deve a grande quantidade de elementos repetitivos. A heterocromatinização pode ainda ser favorecida pela pressão seletiva diferenciada em relação aos cromossomos A. Em *B. dichromosomatica* foram encontradas também sequências extra-cromossômicas incorporadas nos B. A integração destas sequências pode ser favorecida devido à baixa atividade transcricional deste cromossomo (COHEN; HOUBEN; SEGAL, 2008).

DNAs ribossômicos também foram encontrados nos B de algumas espécies, tais como *Crepis capillaris*, Asteraceae (MALUSZYNSKA e SCHWEIZER, 1989), *Nierembergia aristata*, Solanaceae (ACOSTA e MOSCONE, 2011), *Plantago lagopus*, Plantaginaceae (DHAR et al., 2002), entre outras. Contudo, poucos desses estudos demonstraram a atividade transcricional dessas regiões. Um exemplo foi em *Crepis capillaris*,

onde foi encontrado uma atividade fraca dos genes de rDNA 45S, evidenciada pela técnica de Ag-NOR (MALUSZYN´SKA e SCHWEIZER, 1989). Outro exemplo foi em *Nierembergia aristata*, onde os B com regiões organizadoras de nucléolos (NORs) apresentaram forte atividade nucleolar, exercendo um fenômeno parecido com a anfiplastia (ACOSTA e MOSCONE, 2011). Embora existam evidências da expressão dos DNAr em cromossomos B, para Houben e Carchilan (2012), não existem evidências moleculares diretas que comprovem a transcrição de outros genes “cópia única”.

As evidências indiretas da expressão gênica nos B são baseadas em efeitos fenotípicos, contudo, é difícil estabelecer com certeza se a causa é devido à expressão de genes nos cromossomos B ou a influência destes cromossomos na expressão de genes nos cromossomos A (HOUBEN e CARCHILAN, 2012). Em arroz, o cromossomo B parece ter uma pequena atividade transcricional e uma fraca atuação, regulando *in trans*, a atividade gênica de sequências localizadas nos cromossomos A (CHARCHILAN et al., 2009). No híbrido originado entre o cruzamento de *Lolium temulentum* × *L. perenne* (Poaceae), o cromossomo B parece influenciar no comportamento dos cromossomos do complemento A, prevenindo e suprimindo o pareamento entre homólogos e favorecendo a diploidização nos híbridos aloploplóides (EVANS e DAVIES, 1985). Para Jones (2012) os dados obtidos até então indicam que apesar dos B causarem efeitos fenotípicos, estes cromossomos tendem a ser geneticamente silenciados.

Mesmo quando não apresentam uma vantagem adaptativa, os cromossomos B se mantêm nas populações. Isso deve-se ao fato deles possuírem um padrão de herança não mendeliana que resulta de diversos mecanismos de direcionamento de herança (*drive*). Tais mecanismos provocam instabilidades mitóticas e/ou meióticas levando ao acúmulo dos B em diferentes tecidos somáticos e germinativos (JONES, 1991, 2012; BURT e TRIVERS, 2006). A não disjunção é o mecanismo mais comum de auto-acumulação, podendo criar uma variação no número de B por células. Este desvio de herança ajuda na manutenção desses cromossomos nas populações (BURT e TRIVERS, 2006). *Crepis capillaris* (L.) Wallr, por exemplo, exibiu acúmulo preferencial de B nas células mitóticas destinadas a formar tecidos reprodutivos (PARKER et al., 1989).

Mecanismos que auxiliam a prevalência dos cromossomos B nas populações são melhor evidenciado nas células germinativas. Um exemplo clássico foi descrito em com *Lilium callosum*, onde plantas femininas portando um cromossomo B e masculinas sem B produziram uma progênie com 80% de indivíduos com B. Isto ocorreu devido a um posicionamento preferencial do B univalente na periferia da placa metafásica geralmente no

lado micropilar (KIMURA e KAYANO, 1961). Segundo González-Sánchez et al. (2003), em milho a transmissão dos B pelo parental masculino está ligado a não-disjunção destes formando uma célula germinativa que possui dois B. As células ovo femininas possuem um gene chamado *mBt* que controla a transmissão dos B. Enquanto o alelo *mBt<sup>l</sup>* segue o padrão normal de herança mendeliana, o alelo *mBt<sup>h</sup>* é preferencialmente fecundado por núcleos espermáticos contendo cromossomos B, mecanismo que aumenta a taxa de transmissão deste cromossomo na progênie.

## 2.7 CROMOSSOMOS B EM SOLANACEAE E *CESTRUM*

Levin et al. (2005) reportou que existem ao menos 23 espécies com B na ordem Solanales, sendo 11 destas da família Solanaceae. Algumas das espécies da família que apresentam cromossomos B são *Nierembergia aristata* (ACOSTA e MOSCONE, 2011), *Nicotiana alata* (EL-NAHAS; KHALIFA; ABOU-EL-ENAIN, 2000), o híbrido *Cestrum parqui* × *C. aurantiacum*, *Cestrum intermedium* e *C. strigilatum* e (SÝKOROVÁ et al., 2003; FREGONEZI et al., 2004 respectivamente).

De um modo geral, o tamanho do genoma parece influenciar no acúmulo de cromossomos B, sendo que em grandes genomas a existência de cromossomos B é mais provável (TRIVERS; BURT; PALESTIS, 2004). Os dados para a família Solanaceae parecem apoiar a idéia de que genomas maiores são mais suscetíveis a ocorrência de B. *Cestrum*, com grandes cromossomos (14 µm) e grandes complementos haplóides, é um bom exemplo, já que este gênero é o detentor do maior número de Bs já descrito para família, até dez no híbrido entre *C. parqui* × *C. aurantiacum* (SÝKOROVÁ et al., 2003).

Quanto à composição, os cromossomos B de *Cestrum* parecem acumular DNAs repetitivos de diferentes naturezas. Os Bs do híbrido entre *C. parqui* × *C. aurantiacum* possuem sequências de DNAr 5S, 45S e uma sequência associada a um minisatélite rico em pares de bases AT (SÝKOROVÁ et al., 2003). Em *C. intermedium* e *C. strigilatum*, foi encontrado um acúmulo significativo de heterocromatina de diferentes tipos (C-Giemsa+, C-DAPI+/CMA+) e acúmulo de retroelementos do tipo *Ty3/gypsy-like* (FREGONEZI et al., 2004, 2007).

Em um estudo recente, FERNANDES et al. (2008) verificaram que os cromossomos B de *C. strigilatum* apresentam níveis diferentes de fosforilação na serina 10 da Histona H3 nos cromossomos A e B, na mitose e meiose, os quais sugerem também diferenças na conservação da estrutura univalente do B na primeira fase da meiose e não na

segunda, culminado na perda do B em tétrades na forma de pseudomicrosporócitos. Esses autores sugeriram que os B podem ser acumulados preferencialmente na ginosporogênese e não na androsporogênese.

A literatura ainda está carente de informações sobre a organização desses cromossomos em Solanaceae, sobretudo em *Cestrum* quando comparado com outros grupos de plantas, como *Crepis*, *Brachycome*, *Secale* e *Zea*. Como este gênero é o mais estudado neste aspecto dentre as Solanaceae, este pode ser um bom modelo para investimentos em sequenciamento e mapeamento físico com sondas repetitivas. Analisar mais profundamente esses cromossomos pode ser útil para entender a origem e a composição dos B nas diferentes espécies de *Cestrum*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar os cariótipos, o acúmulo e a distribuição de heterocromatina e de sítios de DNA ribossômico em *C. nocturnum* L. e em quatro populações de *C. mariquitense* Kunth, a fim de contribuir para o conhecimento sobre a evolução cariotípica e o papel dos DNAs repetitivos na diferenciação cariotípica em *Cestrum* (Solanaceae). Ainda com relação aos DNAs repetitivos, este estudo objetiva analisar a contribuição dessas famílias na organização dos cromossomos B de *C. strigilatum*, a fim de entender sua constituição, origem e evolução.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para a caracterização cariotípica das populações de *C. mariquitense* e *C. nocturnum*:

- Determinar os números cromossômicos por coloração convencional, determinar a fórmula cariotípica e construir ideogramas;
- Localizar e caracterizar as regiões de heterocromatina por técnicas de bandeamento cromossômico utilizando os fluorocromos cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI).
- Localizar fisicamente os segmentos de DNAr 45S e 5S por hibridização *in situ*.
- Identificar os mecanismos de diferenciação cariotípica para diferentes populações;

Para a caracterização e investigação do cromossomo B de *C. strigilatum*:

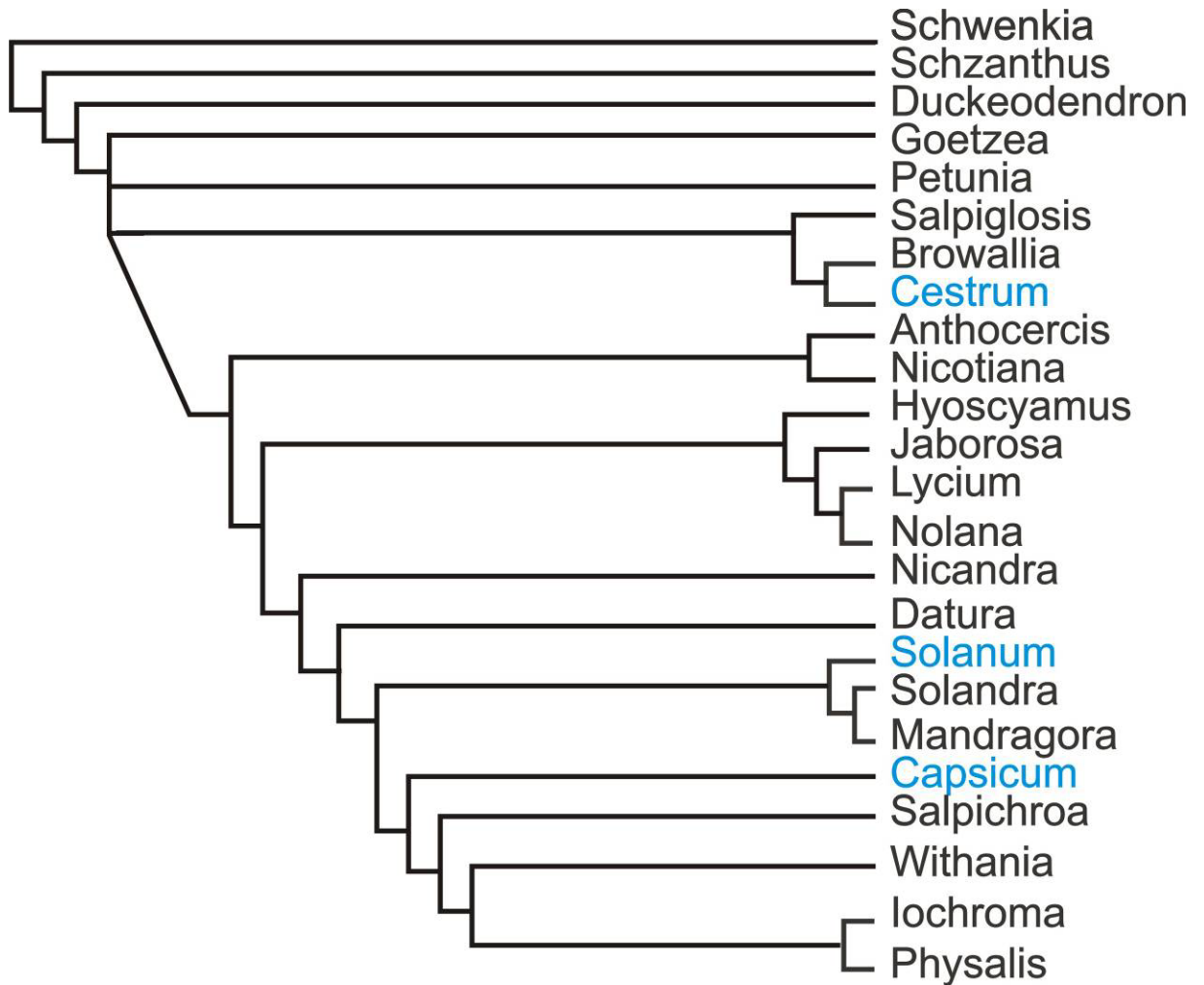
- Obter sondas do cromossomo B por microdissecção e construção de uma microbiblioteca em vetor plasmidial.
- Determinar o padrão de hibridização das sondas obtidas do cromossomo B nos genoma de *C. strigilatum* e *C. mariquitense*;
- Identificar sequências localizadas no cromossomo B e traçar um perfil de sua composição;

- Elaborar hipóteses de possíveis origens deste cromossomo no genoma de *C. strigilatum*.

**Figura 1** - Características botânicas de *Cestrum*. (A) fruto de *C. mariquitense*, (B) ramo de *C. intermedium*, (C) arbusto de *C. nocturnum*, (D) flor de *C. mariquitense* evidenciando a corola tubular-infundibiliforme, (E) esquema da estrutura floral de *C. intermedium* mostrando a presença de cinco estames inclusos soldados ao tubo da corola até o meio ou mais e (F) fruto de *C. nocturnum* com poucas sementes comprimidas.



**Figura 2** - Filogenia de alguns grupos da família Solanaceae (adaptado de Knapp, Bohs e Nee (2004)). Os grupos em azul apresentam gêneros ou algumas espécies com acúmulo de DNA e grandes cromossomos, quando comparados à maioria das espécies da família. Note que a presença de cromossomos grandes ocorre de maneira independente em Solanaceae. E os grupos podem ser próximos, como *Solanum* (*Cyphomandra*) e *Capsicum*, ou distantes como *Cestrum* e *Capsicum*.



## 4 ARTIGOS

### CAPÍTULO I

#### **Variabilidade na distribuição de heterocromatina e DNAr em *Cestrum nocturnum* L. e *C. mariquitense* Kunth (Cestroidae, Solanaceae)**

\* Este artigo será submetido à publicação na revista Genetics and Molecular Biology

*Título*

#### **Variabilidade na distribuição de heterocromatina e DNAr em *Cestrum nocturnum* L. e *C. mariquitense* Kunth (Cestroidae, Solanaceae)**

#### **RESUMO**

Alguns grupos de plantas apresentam grande variabilidade no acúmulo e na distribuição de DNAs repetitivos. O gênero *Cestrum* (Solanaceae) é um desses grupos. Embora suas espécies possuam  $2n$  constante (16) e morfologia cromossômica similar com predominância de meta e submetacêntricos, há grande diversidade na distribuição de heterocromatina entre algumas espécies. Neste estudo, foram utilizadas as técnicas de bandeamento cromossômico e hibridização *in situ* com sondas de DNAr para caracterizar os cariótipos de *Cestrum nocturnum* (exótica) e quatro populações de *C. mariquitense* (nativa). Comparativamente, *C. nocturnum* mostrou um acúmulo maior de bandas CMA/DAPI com relação a *C. mariquitense*, cuja distribuição de segmentos heterocromáticos foi mais similar entre as populações de Cianorte e Maringá e entre as populações de Londrina e Faxinal, concordando com a distribuição geográfica. Quanto à localização do DNA ribossômico, as duas espécies apresentaram apenas um sinal de hibridização com a sonda de DNAr 5S, proximal no braço longo do par 8 e co-localizado com uma banda CMA<sup>+</sup>. A sonda de DNAr 45S, embora tenha hibridizado em uma região co-localizada com regiões CMA<sup>+</sup> nas regiões terminais dos menores pares, foram detectadas variações no tamanho e na localização dos sítios, envolvendo os pares 7 e 8 ou 6 e 8 de *C. mariquitense*. A população de *C. mariquitense* de Maringá apresentou o sinal do par 7 maior do que os das demais populações, ocupando quase todo o braço curto. *Cestrum nocturnum* apresentou um sinal de hibridização de DNAr 45S adicional, na região terminal de um cromossomo do par 3, além de um sinal no braço longo do par 5. Os dados apresentados neste trabalho, somado a outros estudos com espécies do gênero, mostram que o acúmulo e a dispersão de diferentes tipos de heterocromatina têm contribuído consideravelmente para o processo de diferenciação cariotípica das espécies de *Cestrum*.

## Introdução

O gênero *Cestrum* possui cerca de 250 espécies e é o terceiro maior da família Solanaceae, uma das maiores no grupo das angiospermas com 2.500 espécies (Hunziker, 1976; Olmstead *et al.*, 2008). A diversidade da família gera incertezas taxonômicas em alguns grupos, como na tribo Cestreae. Para D'Arcy (1991) a tribo é formada pelos gêneros *Cestrum*, *Metternichia*, *Pantacantha*, *Sessea* e *Vestia*, entretanto, Hunziker (2001) considerou que as características morfológicas, a simetria cariotípica e o número cromossômico  $n = 8$  poderiam separar o grupo apenas nos gêneros *Cestrum*, *Sessea* e *Vestia*. Vignoli-Silva (2009) considerou ainda que a uniformidade morfológica interespecífica e a variação morfológica intraespecífica das espécies de *Cestrum* dificultam na identificação dos táxons, bem como na avaliação da amplitude do gênero. Esta dificuldade torna o gênero *Cestrum* ótimo para estudos mais amplos envolvendo diferentes áreas da biologia, como a Genética e a Citogenética.

O Brasil, juntamente com a região que se estende do norte argentino até os Andes venezuelanos, são os principais centros de diversidade do gênero. Suas espécies são reconhecidas pelo porte arbóreo-arbustivo, corola tubular-infundibuliforme, cinco estames inclusos e soldados ao tubo da corola até ao meio ou mais, poucas sementes comprimidas e embrião reto (Smith e Downs, 1966; Hunziker, 1976). Além dessas sinapomorfias, as espécies de *Cestrum* exibem cariótipos com  $2n = 2x = 16$ , com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, grandes, podendo alcançar até 14  $\mu\text{m}$  e 1,36 pg de DNA por cromossomo (Berg e Greilhuber, 1992, 1993a, 1993 b).

A maior porção dos genomas vegetais consiste de sequências repetitivas de DNA e, em geral, espécies com grandes genomas, ou seja, com conteúdo C de DNA elevado, tendem a possuir também grandes quantidades de DNAs repetitivos. *Zea mays* é um bom exemplo, já que nesta espécie ao menos 50% do genoma é representado apenas por retroelementos e o conjunto dos DNAs repetitivos em seu genoma constitui cerca de 80% (Sanmiguel *et al.* 1996).

Os DNAs repetitivos são uma classe de DNA onde um motivo em particular é repetido muitas vezes no genoma, podendo ocorrer dispersos ou em *tandem*, ocupando um pequeno número de loci dentro do genoma (Heslop-Harrison, 2012). Algumas famílias de DNA repetitivos possuem funções conhecidas e bem estabelecidas, como as sequências teloméricas, centroméricas e DNA ribossômico, porém, sendo que outras têm papéis biológicos recentemente investigados, como transposons e retrotransposons. Espécies de

*Cestrum* são interessantes do ponto de vista citogenético por que há evidências do acúmulo e dispersão de diferentes sequências repetitivas em 12 espécies. Todas possuem cariótipos muito similares quando observadas por técnicas convencionais, mas uma grande diversidade quando vistos após técnicas de bandeamento cromossômico (Berg e Greilhuber, 1992, 1993a, 1993 b; Fregonezi *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2009).

Neste trabalho foi caracterizado o cariótipo, o acúmulo e a distribuição do DNAr e da heterocromatina em *Cestrum nocturnum* (espécie exótica) e quatro populações nativas de *C. mariquitense*, a fim de verificar se os mesmos perfis de organização dos cariótipos encontrados previamente para 12 espécies do gênero são similares nessas duas espécies, e se a diferenciação dos cariótipos quanto aos DNAs repetitivos (heterocromatina e DNAr) são uma característica no gênero.

#### *Materiais e métodos*

Cinco exemplares de cada população de *C. mariquitense* utilizados neste estudo foram coletadas em fragmentos florestais nas cidades de Cianorte, Faxinal, Maringá e Londrina no norte/noroeste do estado do Paraná/Brasil. Cinco exemplares de *C. nocturnum* foram obtidos em lojas especializadas e canteiros públicos na cidade de Londrina. Sementes e estacas foram plantadas em potes e cultivadas em vasos no viveiro de mudas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas na Universidade Estadual de Londrina e as exsiccatas das espécies e diferentes populações foram depositados no herbário FUEL (Tabela 1 e Figura 1).

Para obtenção de metáfases, pontas de raízes jovens foram pré-tratadas com uma solução saturada de paradiclorobenzeno por 24 horas sendo 1 hora em temperatura ambiente e 23 horas a 4°C. Essas foram fixadas em etanol:ácido acético (3:1, v:v) por, no mínimo, 12 horas à temperatura ambiente. Lâminas foram preparadas por dissecação e esmagamento de meristemas previamente digeridos em solução de 4% de celulase e 40% de pectinase a 37 °C, hidrolisadas em HCl 1M por 10 minutos a 60 °C. Após o preparo das lâminas, as lamínulas foram removidas por congelamento em nitrogênio líquido e as lâminas secas ao ar e coradas com Giemsa 2%.

Para a técnica de bandeamento-C, as lâminas foram preparadas como descrito anteriormente, porém, sem a hidrólise clorídrica. Estas foram envelhecidas à temperatura ambiente por três dias e então tratadas sequencialmente com i) ácido acético 45% a 60 °C por 10 minutos, ii) solução saturada de hidróxido de bário a 60 °C por 10 minutos e

iii) solução de 2× SSC a 60 °C por 80 minutos. Posteriormente, as amostras foram coradas com 4'6-diamino-2-phenylindole (DAPI) e cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>). Para tal foram aplicados 25 µL de CMA<sub>3</sub> (0,5 mg/mL) por 1h e 30 minutos e 25 µL de DAPI (2 µg/mL) por 30 minutos sequencialmente. As lâminas foram montadas em meio composto por glicerol/McIlvaine pH 7,0 (contendo MgCl<sub>2</sub>) e cobertas com uma lamínula de vidro.

Para a hibridização *in situ*, as lâminas foram pré-tratadas de acordo com o protocolo estabelecido por Heslop-Harrison *et al.* (1991) e Cuadrado e Jouve (1994), com algumas modificações. As lâminas foram tratadas em solução de RNase (1 µg/mL) à 37 °C durante uma hora, lavadas em solução de 2× SSC à temperatura ambiente e desidratadas em uma série alcoólica. Como sondas, foram utilizadas os clones pTa71, que contém a sequência de DNAr 45S de trigo (Gerlach e Bedbrook, 1979) e o clone pTa794, que contém a sequência de DNAr 5S, também de trigo (Gerlach e Dyer, 1980). As sondas foram marcadas com nucleotídeos ligados a moléculas de biotina (DNAr 45S) e digoxigenina (DNAr 5S), pela técnica de *nick translation*. Para a reação da FISH, cada lâmina foi tratada com 30 µL de uma solução de hibridização, contendo 100-150 ng de sonda marcada (4 µL), formamida 100% (15 µL), polietilenoglicol 50% (6 µL), 20× SSC (3 µL), 100 ng de DNA fragmentado timo de bezerro (1 µL) e SDS 10% (1 µL). A solução de hibridização e os cromossomos foram desnaturados e renaturados concomitantemente em um termociclador a 90 °C por 10 minutos, 50 °C por 10 minutos e 38 °C por 10 minutos. Após esse processo lâminas e sondas permaneceram à 37 °C por 12 a 24 horas em uma câmara úmida. Lavagens de pós-hibridização foram realizadas em 2× SSC a 42 °C por 10 minutos agitando, seguido de um banho de 0,1× SSC à 42 °C por 5 minutos agitando, 2× SSC à 42 °C por 5 minutos agitando, 4× SSC/0,2% Tween 20 à 42 °C por 5 minutos agitando e 4× SSC/0,2% Tween 20 à temperatura ambiente por 5 minutos agitando, alcançando 80% de estringência.

As sondas hibridizadas foram detectadas com avidina conjugada com FITC (verde) e anti-digoxigenina conjugada com rodamina (vermelho). Em seguida, foram realizados dois banhos de pós-deteção com a solução de 4× SSC/0,2% Tween 20 a temperatura ambiente por 10 minutos cada. Por fim, as lâminas foram montadas em uma solução composta por 2,3% de 1,4-diaza-bicyclo(2,2,2)-octane (DABCO), 90% de glicerol de baixa fluorescência, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0 (2%), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (4%) e água destilada (1,7%), tendo sido adicionado 4 µL de DAPI a 2 µg/mL.

As imagens foram capturadas em escala de cinza com um microscópio de epifluorescência Leica DM 4500 B equipado com uma câmera DFC 300FX, e posteriormente sobrepostas com o uso do programa Leica IM50 4.0.

## Resultados

### Análise convencional

As duas espécies estudadas apresentaram  $2n = 2x = 16$ , com sete pares metacêntricos e um par menor submetacêntrico, classificados segundo Guerra (1986), (Figura 2). Os cromossomos decresceram gradualmente em tamanho, variando em média de cerca de 11  $\mu\text{m}$  a 7  $\mu\text{m}$  (Tabela 1).

### Bandeamento cromossômico

O bandejamento DAPI/CMA mostrou que tanto em *Cestrum mariquitense* quanto em *C. nocturnum* os maiores blocos foram preferencialmente posicionados nas regiões intersticiais à proximais, em geral nos braços curtos (Figura 3). Contudo, variações nas distribuições das bandas entre os pares foram evidentes, mesmo quando consideradas as quatro populações de *C. mariquitense*. A população de Cianorte apresentou bandas C-DAPI<sup>+</sup> localizadas na região terminal do par 5 e na região subterminal dos braços curtos dos pares 2 e 3. Bandas C-DAPI<sup>+</sup> tênues (observadas como pequenos *dots*) foram encontradas na região subterminal do braço curto dos pares 1 e 5. E nas regiões proximal e subterminal dos braços longos do par 1. Blocos C-CMA<sup>+</sup> grandes foram encontrados na região terminal do braço curto dos pares 7 e 8. Além disso, o par 8 também exibiu uma banda C-CMA<sup>+</sup> na região proximal do braço longo (Figuras 3A e 5A).

A população de Faxinal mostrou um acúmulo de bandas C-DAPI<sup>+</sup> na região subterminal no braço curto dos pares 2 e 4, na região subterminal do braço longo do par 3, nas regiões terminais nos dois braços cromossômicos do par 5 e um bloco tênue próximo na região subterminal do braço curto do par 6. Blocos heterocromáticos C-CMA<sup>+</sup> foram encontrados na região terminal dos pares 6 e 8. Bandas tênues, também CMA<sup>+</sup>, foram observadas nas regiões proximal e subterminal do braço longo do par cromossômico 4, além de um bloco proximal no braço longo do par 8 (Figuras 3B e 5B).

A população de Maringá exibiu segmentos heterocromáticos C-DAPI<sup>+</sup> maiores nos pares 3, 5 e 6 e *dots* no par 4, sempre nos braços curtos. Em geral as bandas apareceram em posições intersticiais, exceto no par 6. Bandas C-CMA<sup>+</sup> foram observadas nas regiões terminais dos braços curtos dos pares 7 e 8. Este último também apresentou uma banda na região proximal do braço longo (Figuras 3C e 5C).

Na população de Londrina, foram encontradas bandas DAPI<sup>+</sup> nas regiões intersticiais dos braços curtos dos pares 2, 3 e 5, no braço longo do par 6 e região terminal braço curto do par 3, contudo este último par exibiu um polimorfismo na localização desta banda (Figura 3D). Bandas DAPI<sup>+</sup> inconstantes e intersticiais foram observadas nos pares 1 e 7 (Figuras 3D e 5D). Bandas C-CMA<sup>+</sup> foram encontrados nas regiões terminais dos braços curtos nos pares 5 e 8, sendo que neste último também foi vista uma banda proximal no braço longo. Bandas inconstantes foram encontradas nas regiões intercalares dos pares 1 e 6 (Figuras 3D e 5D).

*Cestrum nocturnum* mostrou bandas C-DAPI<sup>+</sup> maiores na região terminal do par 2 e nas regiões intersticiais dos pares 2, 3 e 7. Bandas inconstantes apareceram em regiões intersticiais do braço longo do par 1. O par 3 também apresentou um polimorfismo entre os homólogos quanto a posição de sua banda DAPI<sup>+</sup> intersticial. (Figura 3E e 4E). Bandas CMA<sup>+</sup> apareceram em maior número com relação às outras amostras de *C. mariquitense*. Estas foram encontradas nas regiões terminais dos pares 2, 3, 7 e 8, na região intersticial do braço curto do par 6 e na região proximal no braço longo do par 8 (Figuras 3E e 5E).

#### FISH com sondas de DNAr

A FISH com a sonda de DNAr 5S mostrou uma estabilidade em tamanho e posição do sítio de hibridização, quando comparado com os blocos heterocromáticos. Em todas as amostras os sinais apareceram sempre na região proximal do braço longo do par 8, co-localizada à banda CMA<sup>+</sup> (Figuras 4 e 5). De outro modo, a FISH com a sonda de DNAr 45S foi mais variável quanto à localização, número e tamanho do sítios de hibridização se comparada ao DNAr 5S. Para *Cestrum marquitense*, a FISH mostrou sítios terminais no braço curto do par 8 de todas as populações (Figura 5) e nos braços curtos dos pares 6 (Faxinal), 5 (Londrina) e par 7 de Cianorte e Maringá. Para esta última população foi observado um sinal de hibridização que ocupou grande parte do braço curto do par 7.

*Cestrum nocturnum* apresentou também um sinal proximal de DNAr 5S no braço curto do par 8, e uma maior variação na localização, número e tamanho dos sítios de hibridização com a sonda de DNAr 45S. Estes foram detectados na região terminal do braço longo do par 5 e em um dos homólogos do par 3 e nos braços curtos dos pares 7 e 8 (Figuras 4E e 5E).

## Discussão

### Diversidade cariotípica

Os resultados obtidos neste estudo, assim como aqueles previamente reportados na literatura (Berg e Greilhuber, 1992, 1993 a, 1993 b; Fregonezi *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2009), mostram que as espécies de *Cestrum* mantém o número cromossômico constante, sempre com  $2n = 2x = 16$ , exceto pela presença de cromossomos B no híbrido *C. parquii* × *C. aurantiacum* (Sýkorová *et al.*, 2003), em *C. strigilatum* e *C. intermedium* (Fregonezi *et al.*, 2004).

A constância no número cromossômico também foi reportada para outras espécies da tribo Cestreae (Las Penas *et al.*, 2006). Sugerindo que rearranjos numéricos, tais como aneuploidias e poliploidias, possuem pouca importância no processo de diferenciação dos cariótipos. Na família Solanaceae a constância numérica também é comum em muitos dos gêneros, como *Solanum* (Rego *et al.*, 2009; Acosta *et al.*, 2012), *Lycium* (Laura, *et al.*, 2010) e *Jaborosa* (Chiarini e Barboza, 2008). Embora a poliploidia tenha sido documentada para espécies de *Solanum* (Melo *et al.*, 2011) e *Nicotiana* (Lim *et al.*, 2000; Kitamura *et al.*, 2001; Chase *et al.*, 2003).

Assim como observado nas 12 espécies de *Cestrum* estudadas anteriormente por Berg e Greilhuber (1992, 1993 e 1993b), Fregonezi (2006) e Fernandes (2009), *C. nocturnum* e *C. mariquitense* apresentaram predominância de cromossomos metacêntricos, sendo o par 8 submetacêntrico. Em geral, esses cromossomos decrescem gradualmente de tamanho e apenas o par 8 é facilmente reconhecido. Esses cromossomos, assim como os das demais espécies de *Cestrum*, são grandes, variando entre 7 e 11 µm, sendo os maiores dentre as Solanaceae, onde foram reportados tamanhos de 8,91 a 14,83 µm em *C. strigilatum* (Berg e Greilhuber, 1993 a), 7,3 a 11,8 µm em *C. intermedium* (Fregonezi *et al.*, 2006). Em geral, espécies com cromossomos grandes tendem a possuir genomas maiores e quantidade maior de DNAs repetitivos (Macgregor, 1978).

### Distribuição da heterocromatina

Os cariótipos das espécies de *Cestrum* descritos na literatura mostram grande variabilidade na qualidade e quantidade de famílias heterocromáticas. Já foram descritas bandas: i) C-Giemsa<sup>+</sup> associadas ou não com regiões sensíveis ao frio (CRS), ii) C-

CMA<sup>+</sup> associadas ou não com NOR, iii) C-DAPI<sup>+</sup> associadas ou não com CRS e iv) C-CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup> (Berg e Greilhuber, 1992, 1993 a, 1993 b; Fregonezi *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2009).

Em *C. nocturnum* e *C. mariquitense* o número de bandas heterocromáticas também variou em composição, quantidade e distribuição não apenas entre as duas espécies estudadas, mas também entre populações de *C. mariquitense*. Assim como nas demais espécies descritas na literatura, toda a variação envolvendo a heterocromatina parece não ter sido suficiente para promover grandes alterações no número e na forma dos cromossomos, haja vista a alta similaridade observada por coloração convencional, a qual também foi comentada por Fregonezi *et al.* (2006) e Fernandes *et al.* (2009).

Os dados obtidos por Las Penas (2006) para espécies da tribo Cestreae reforçam a estabilidade numérica e morfológica nos cromossomos na tribo, e sugerem que o acúmulo e dispersão de heterocromatina é o principal mecanismo de diferenciação cariotípica reconhecido até o momento.

Os cariótipos das populações de *C. mariquitense* mostraram diferenças maiores nos padrões de bandas CMA/DAPI em pelo menos 5 cinco pares (3, 4, 5 6 e 7) e uma alta estabilidade no par 8. A distribuição de bandas neste último par foi muito similar ao de *C. nocturnum*, estudado aqui, ao de *C. amictum* e ao de *C. corymbosum*, estudados por Fregonezi *et al.* (2006) e Fernandes *et al.* (2009), respectivamente

Os resultados indicam também que em *C. mariquitense*, as bandas DAPI são mais variáveis que as CMA. Essas últimas estão normalmente associadas aos DNAs ribossômicos, ocupando sempre as regiões terminais dos pares cromossômicos 7 e 8 nas populações de Maringá e Cianorte, 6 e 8 na população de Faxinal e 5 e 8 nas amostras coletadas em Londrina. A localização de sítios CMA<sup>+</sup>/DNA<sup>r</sup> 45S nos pares 7 e 8 também foi encontrada em *C. fasciculatum*, *C. strigilatum*, *C. intermedium*, *C. corymbosum* estudadas por Berg e Greilhuber (1993a), Fregonezi *et al.* (2006), Fernandes *et al.* (2009).

*Cestrum nocturnum* exibiu um número maior de blocos CMA<sup>+</sup> grandes, sugerindo um acúmulo que pode ser decorrente de amplificação e dispersão terminal para outros pares. Este mecanismo pode também ter sido o responsável pelo aparecimento das bandas CMA<sup>+</sup> tênues (*dots*) presentes em posições intersticiais nas populações de *C. mariquitense* de Faxinal e Londrina.

Estes resultados, quando comparados com os da literatura, sugerem que os maiores blocos heterocromáticos ocorrem preferencialmente nas regiões terminais dos braços curtos dos cromossomos, enquanto pequenos *dots* se distribuem mais amplamente nas regiões

intersticiais de ambos os braços. Esse perfil de distribuição heterocromática concorda com o descrito para a maioria das espécies de *Cestrum*, sendo diferente apenas de *C. megalophyllum*, onde ocorre um acúmulo significativo de heterocromatina na região proximal, porém, mesmo nesta espécie os maiores blocos heterocromáticos se acumulam na região terminal (Berg e Greilhuber, 1992, 1993 a, 1993 b; Fregonezi *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2009).

A distribuição de grandes blocos heterocromáticos nas regiões terminais dos cromossomos é uma característica comum em alguns gêneros da família Solanaceae como *Lycium* (Laura *et al.*, 2010), *Capsicum* (Moscone *et al.*, 1993, 1996, 2007; Scaldaferrero *et al.*, 2012) e *Solanum* (Rego *et al.*, 2009; Acosta *et al.*, 2012). A distribuição das bandas em *Cestrum* segue perfeitamente os dois modelos equidistante e não equidistante de dispersão da heterocromatina. No primeiro, regiões heterocromáticas podem dispersar segmentos repetitivos para os braços de cromossomos heterólogos posicionados à mesma distância do centrômero no campo cromossômico (Schweizer e Loidl, 1987). No segundo, bandas isoladas podem aparecer de sítios iniciais de amplificação (Schweizer e Ehrendorfer, 1976).

Polimorfismo na distribuição da heterocromatina foi detectado no par 3 da população de *C. mariquitense* de Londrina, na qual, a variação aparece no posicionamento terminal e intersticial das bandas, podendo ter ocorrido uma inversão paracêntrica limitada a esta região cromossômica subterminal na população de Londrina.

#### Distribuição de DNA ribossomal

As sondas de DNA ribossômico permitiram detectar tanto estabilidade quanto variação nos cariótipos de *C. nocturnum* e *C. mariquitense*. Os sítios de DNAr 5S foram localizados sempre na região proximal do braço longo do par 8. Este sítio apareceu constante nas 8 espécies estudadas até agora (Fregonezi *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2009), exceto por *C. capsulare* (Fernandes *et al.*, 2009). De acordo com Guerra (2012), os sítios de DNAr 5S são mais estáveis em localização e número nos eucariontes do que os sítios de DNAr 45S. Este padrão também foi encontrado em *Cestrum*, bem como em outras Solanaceae, tais como *Capsicum* (Youn-Kyu *et al.*, 1999; Kwon e Kim, 2009), *Nicotiana* (Kovarik *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2006) e *Solanum* (Rego *et al.*, 2009; Brasileiro-Vidal *et al.*, 2009).

Os sítios de DNAr 45S, embora tenham ocupado preferencialmente as regiões terminais em *C. mariquitense* e *C. nocturnum*, bem como nas outras espécies descritas na literatura, apresentaram uma maior variação quanto ao tamanho e número de sítios e cromossomos portadores. Em *C. mariquitense*, nas populações de Cianorte e Maringá, os

sítios de DNAr nos pares 7 e 8 seguiram a distribuição mais encontrada no gênero, enquanto que nas populações de Londrina e Faxinal houve uma variação da posição no par 7 para os pares 5 e 6, respectivamente. Existem algumas explicações para este evento: i) pode ter havido aumento no tamanho dos cromossomos portadores devido a amplificação de DNAs repetitivos não detectáveis pelo bandamento cromossômico ou ii) rearranjos, como translocações, reposicionaram estes sítios em regiões terminais de cromossomos maiores. Contudo não há evidências fortes que possam apontar preferencialmente para uma ou outra explicação.

A maior variabilidade na distribuição do DNAr 45S aconteceu em *C. nocturnum*. Esta espécie apresentou amostras com sítios localizados nos pares 7 e 8, assim como *C. mariquitense* de Cianorte e Maringá, mas também apresentou amostras com sítios de hibridização localizadas nos pares 7 e 8 também, e sinais fracos no par 5 e em um dos homólogos do par 3. Provavelmente, houve uma dispersão equilocal para as regiões terminais de outros heterólogos, seguida ou não de amplificação dos motivos. O polimorfismo encontrado no par se deu provavelmente por *crossing-over* desigual, já que sinais de hibridização foram encontrados em apenas um dos homólogos. Polimorfismo envolvendo a região terminal contendo DNAr 45S foi descrita anteriormente para *Cestrum megalophyllum* (Fernandes *et al.*, 2009). Estes autores consideraram como possíveis origens um evento de *crossing-over* desigual, de translocação não recíproca ou deleção.

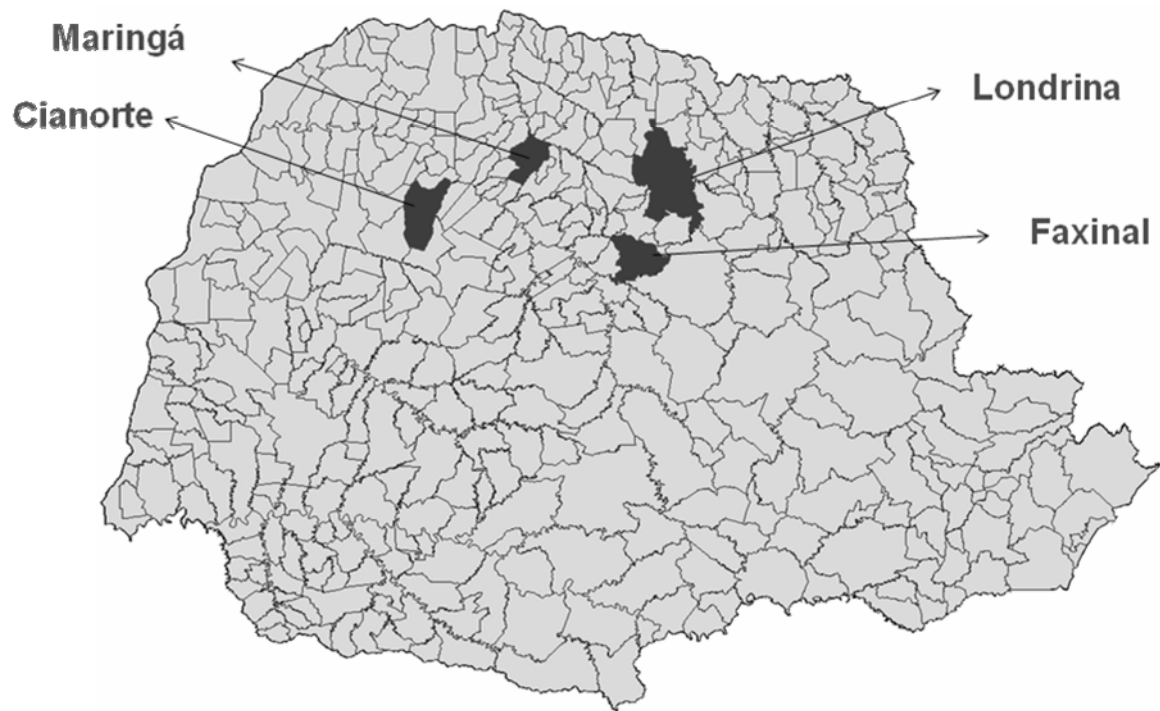
Os dados encontrados neste trabalho, assim como os realizados anteriormente com as espécies do gênero *Cestrum*, mostram que apesar da estabilidade numérica as espécies do gênero apresentam grande acúmulo e variabilidade de bandas heterocromáticas, o que sugere que os DNAs repetitivos são bastante dinâmicos e contribuem significativamente para o processo de diferenciação cariotípica dentro do gênero. Contudo, há a necessidade de caracterizar e estudar outras famílias de DNA repetitivo presentes nos genomas dessas espécies, haja vista que as famílias estudadas até o momento não representam a maior porção desses cromossomos, os quais são considerados como os maiores dentro de Solanaceae.

A espécie *C. mariquitense* mostrou uma variabilidade populacional no acúmulo e distribuição de segmentos heterocromáticos que não havia sido descrita para as outras espécies estudadas de *Cestrum* sugerindo que as populações possam na verdade constituir um complexo de espécies.

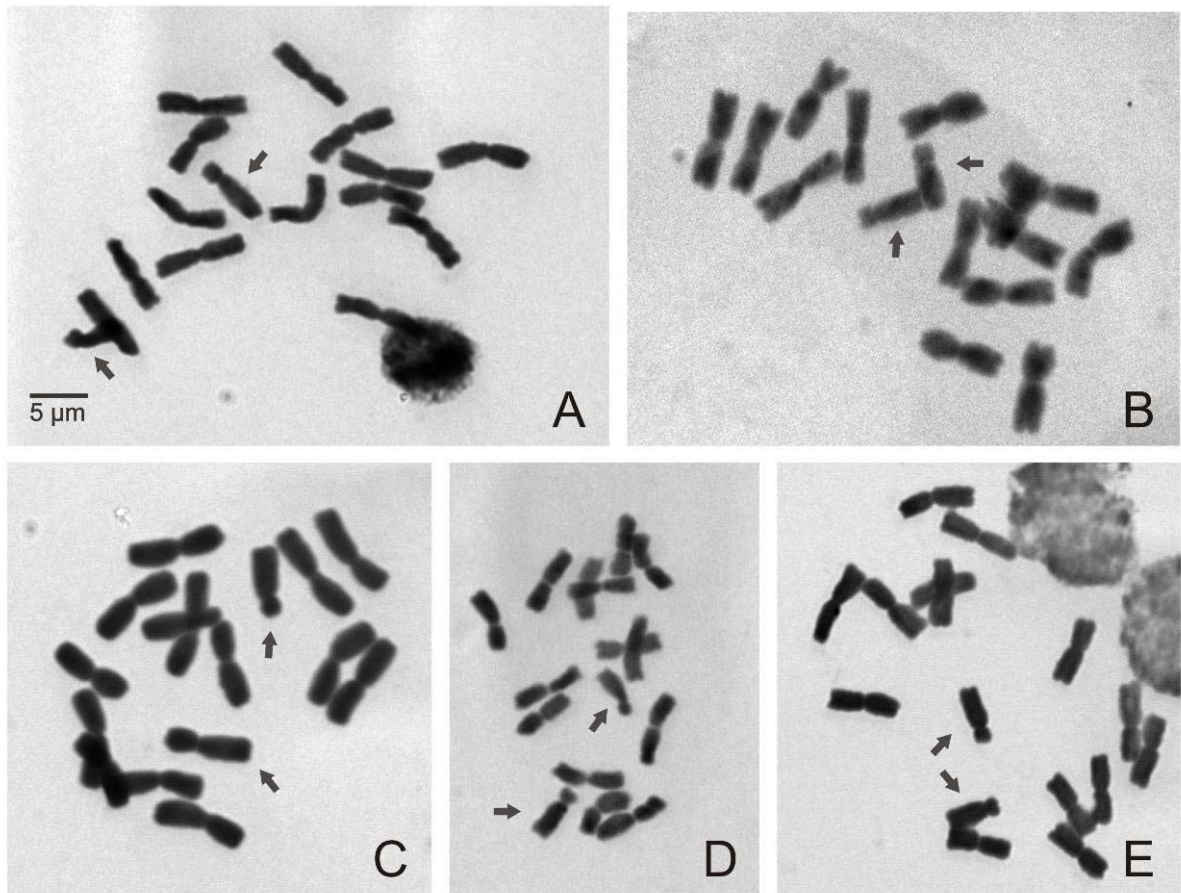
**Tabela 1** – Medidas cromossômicas das amostras analisadas. CP = comprimento dos maiores e menores pares cromossômicos; TCH = tamanhos totais dos complementos haplóides; DP = desvio padrão; FC = fórmulas cariotípicas; FUEL = número da exsicata.

<b>Espécies</b>	<b>Local</b>	<b>CP (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>TCH / DP</b>	<b>FC</b>	<b>FUEL</b>
<i>C. mariquitense</i>	Cianorte	13,27 e 9,49	$89,73 \pm 0,79$	7m + 1sm	49318
	Faxinal	9,79 e 6,60	$66,59 \pm 0,29$	7 m + 1sm	49319
	Maringá	12,95 e 8,61	$90,12 \pm 0,69$	7 m + 1sm	49321
	Londrina	9,61 e 6,37	$67,14 \pm 0,34$	7 m + 1sm	49320
<i>C. nocturnum</i>	Londrina	7,97 e 5,60	$54,89 \pm 0,44$	7 m + 1sm	49323

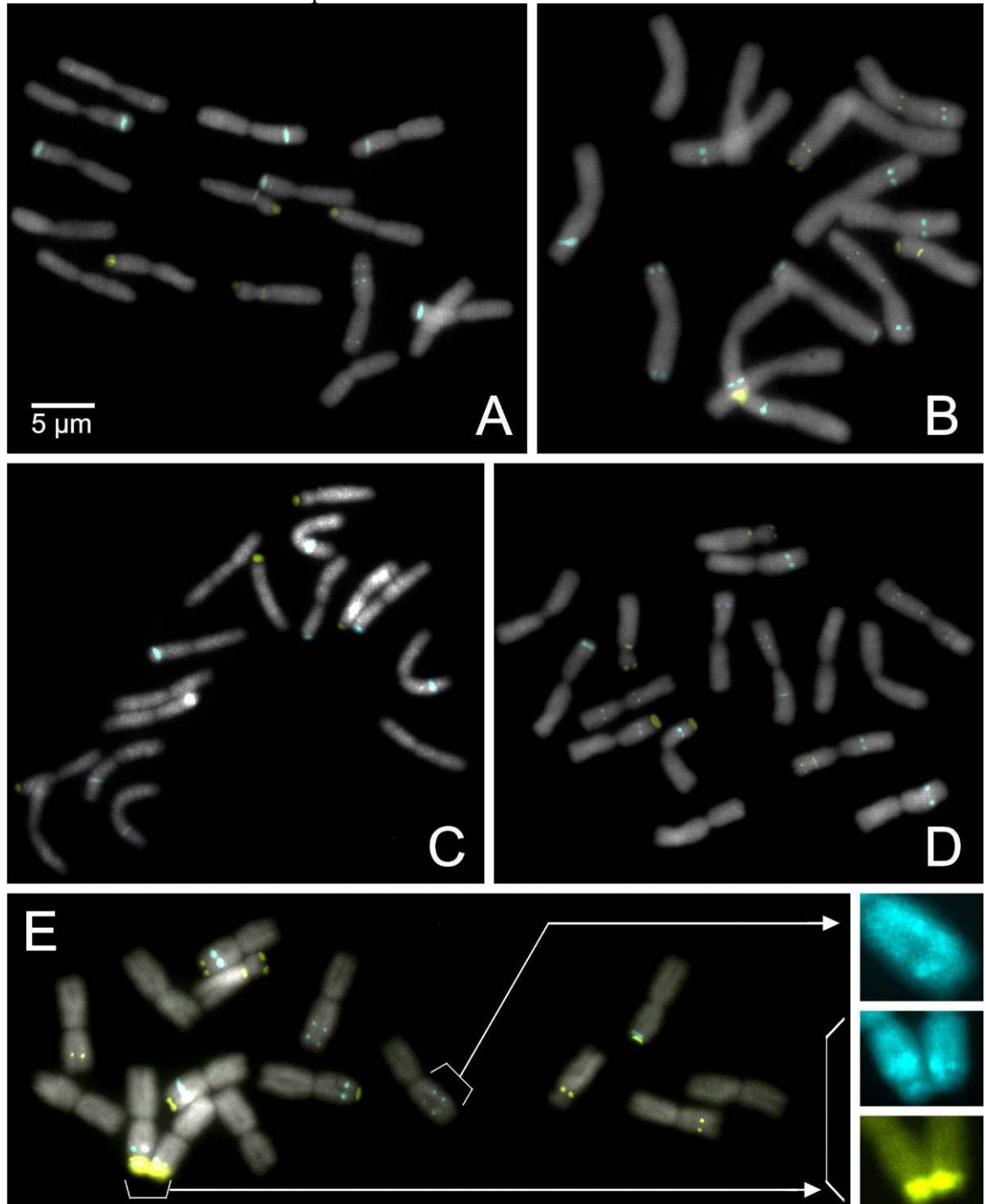
**Figura 1** - Mapa dos locais de coleta no Paraná / Brasil. Populações de *C. mariquitense* foram coletadas nas cidades de Cianorte, Faxinal, Maringá e Londrina. Os exemplares de *C. nocturnum* (exótica) foram coletados em canteiros públicos da cidade de Londrina.



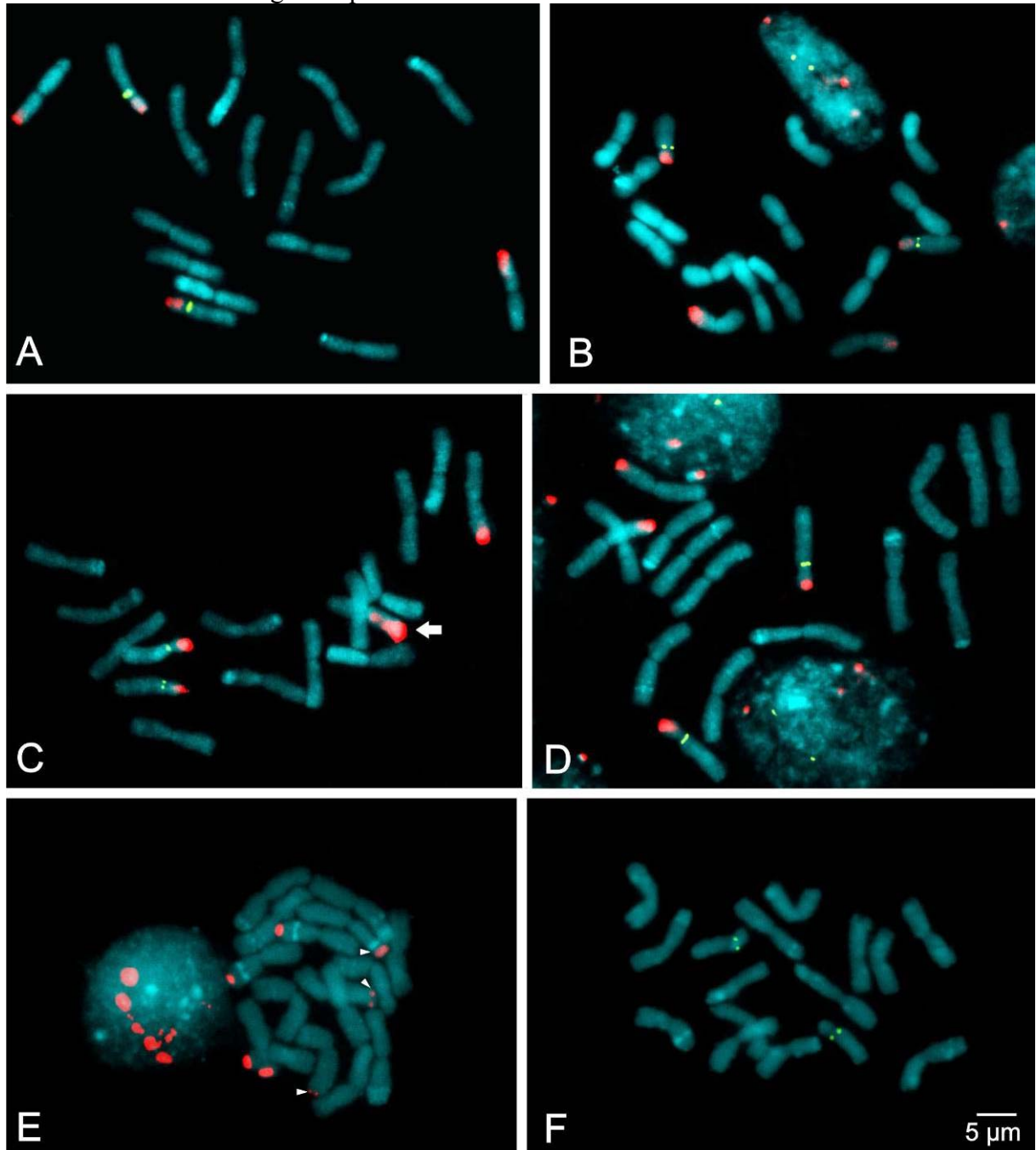
**Figura 2** - Metáfases mitóticas de *Cestrum mariquitense* população de Cianorte (A), Faxinal (B), Maringá (C), Londrina (D) e *C. nocturnum* (E), coradas com Giemsa 2%. As setas apontam para o par 8.



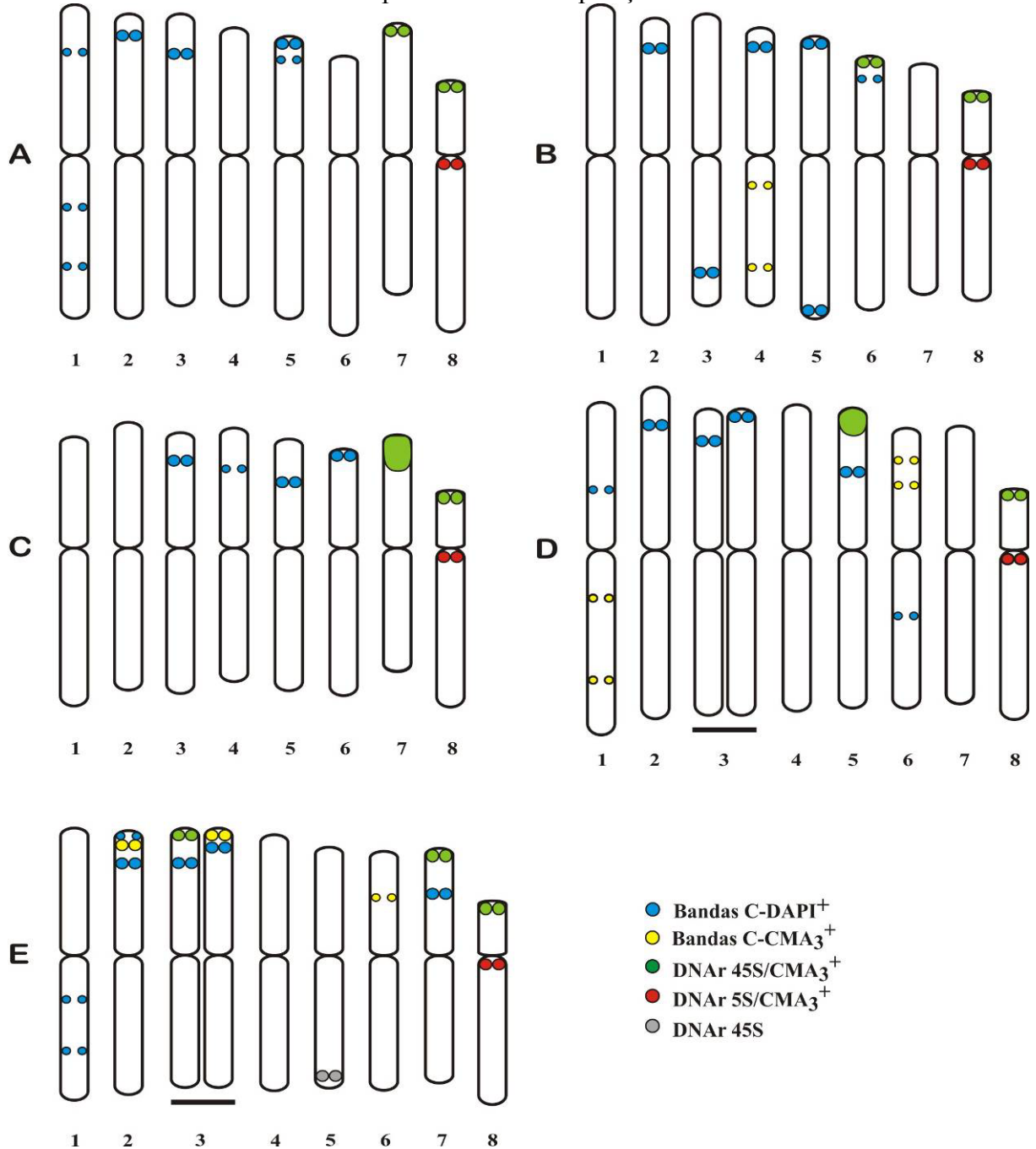
**Figura 3** - Bandeamento C/CMA/DAPI em *Cestrum mariquitense* nas populações de Cianorte (A), Faxinal (B), Maringá (C) e Londrina (D), e em *C. nocturnum* (E). Sinais em amarelo correspondem às bandas CMA<sup>+</sup> e sinais em azul correspondem às bandas DAPI<sup>+</sup>. Caixas laterais mostram detalhes de bandas tênues do par 1 e de bandas intersticiais do par 2 em *C. nocturnum*.



**Figura 4** - FISH com as sondas de DNAr 45S (vermelho) e 5S (verde) de trigo. Em *C. mariquitense* população de Cianorte (A), Faxinal (B), Maringá (C), Londrina (D). E *C. nocturnum* (E, F). Note o sinal proximal do par 8 obtido com a sonda de DNAr 5S em todas as espécies. A seta em C aponta o sinal mais intenso, que se estende por quase todo o braço curto do par 7 da população de Maringá. As cabeças de seta em E indicam sítios hibridização tênues no par 5 e o sítio em um dos homólogos do par 3.



**Figura 5** - Idiogramas dos cromossomos de *Cestrum mariquitense* população de Cianorte (A), Faxinal (B), Maringá (C), Londrina (D) e *C. nocturnum* (E). Note a ausência de blocos centroméricos, a equilocalidade dos blocos e que as bandas maiores são preferencialmente localizadas na região terminal dos braços curtos. No par 3 de D e E foram encontrados polimorfismos de posição.



## REFERÊNCIAS

- Acosta MC, Guerra M, Moscone EA (2012) Karyological relationships among some South American species of *Solanum* (Solanaceae) based on fluorochrome banding and nuclear DNA amount. *Plant Syst Evol* 298:8:1547-1556.
- Berg C e Greilhuber J (1992) Cold-sensitive chromosome regions and their relation to constitutive heterochromatin in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Genome* 35:921-930.
- Berg C e Greilhuber J (1993a) Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum* (Solanaceae): *C. strigilatum*, *C. fasciculatum*, and *C. elegans*. *Plant Syst Evol* 185:133-151.
- Berg C e Greilhuber J (1993b) Cold-sensitive regions and heterochromatin in *Cestrum aurantiacum* (Solanaceae). *Plant Syst Evol* 185:259-273.
- Brasileiro-Vidal AC, Melo-Oliveira MB, Carvalheira GMG, Guerra M (2009) Different chromatin fractions of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and related species. *Micron* 40:851-859.
- Chase MW, Knapp S, Cox AV, Clarkson JJ, Butsko Y, Joseph J, Savolainen V (2003) Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Ann Bot* 92:1:107-127.
- Chiarini FE, Barboza GE (2008) Karyological studies in *Jaborosa* (Solanaceae). *Bot J Linn Soc* 156:3:478-467.
- Cuadrado A, Jouve N (1994) Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential fish and c-banding in 6x-triticale. *Chromosome Res* 2:331-338.
- D'arcy WG (1991) The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M e Estrada N (eds) *Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution*. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew 75-137.
- Fernandes T, Rego LNAA, Nardy M, Yuyama PM, Vanzela ALL (2009) Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) revealed by fluorescent chromosome banding and FISH. *Genet Mol Biol* 32:2:320-327.
- Fregonezi JN, Rocha C, Torezan JMD, Vanzela, ALL (2004) The occurrence of different Bs in *Cestrum intermedium* and *C strigilatum* (solanaceae) evidenced by chromosome banding. *Cytogenet Genome Res* 106:2-4:184-188.
- Fregonezi JN, Rocha C, Torezan JMD, Vieira, AO, Vanzela, ALL (2006) Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on physical mapping of repetitive DNA. *Genet Mol Biol* 29:1:97-104.
- Gerlach WL, Bedbrook JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res* 7:7:1869-1885.
- Gerlach WL, Dyer TA (1980) Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 8:4851-4865.

- Guerra MS (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética* 9:741-743.
- Guerra MS (2012) Cytotaxonomy: The end of childhood, *Plant Biosyst* 3:146:703-710.
- Heslop-Harrison JS (2012) Genome evolution: extinction, continuation or explosion? *Plant Biol* 52:115-121.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Ananthawat-Jonsson K (1991) *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Techniques* 3:1-7.
- Hunziker AT (1976) South American Solanaceae; a synoptic survey. *In*: Hawkes JG, Lester RN e Skelding AD [eds.], *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*, 7ed Linnean Society Symposium Series. Academic Press, New York, NY, 49-85.
- Hunziker AT (2001) *The genera of Solanaceae*. A.R.G. Gantner Verlag K. G, Ruggell, 500pp.
- Kitamura S, Inoue M, Shikazono N, Tanaka A (2001) Relationships among *Nicotiana* species revealed by the 5S rDNA spacer sequence and fluorescence in situ hybridization. *Theor Appl Genet* 103:5:678-686.
- Kovarik A, Dadejova M, Lim YK, Chase MW, Clarkson JJ, Knapp S, Leitch AR (2008) Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: A potential link between rDNA homogenization and epigenetics. Conference: Meeting On Plant Genome Horizons - Vistas And Visions, Royal Bot Gardens, Kew, England, 101:6:815-823.
- Kwon JK, Kim BD (2009) Localization of 5S and 25S rRNA genes on Somatic and meiotic chromosomes in *Capsicum* species of chili pepper. *Mol Cells* 27: 2:205-209.
- Las Penas LM, Chiarini FE, Bernardello G, Rojas CB (2006) Karyotypes of some species of *Cestrum*, *Sessea*, and *Vestia* (tribe Cestreae, Solanaceae). *Caryologia* 59:2:131-137.
- Laura S, Las Penas ML, Bernardello G, Levin RA, Miller JS (2010) Karyotypes and fluorescent chromosome banding patterns in southern African *Lycium* (Solanaceae). *Caryologia* 63:1:50-61.
- Lim KY, Kovarik A, Matyasek R, Chase MW, Knapp S, McCarthy E, Clarkson JJ, Leitch AR (2006) Comparative genomics and repetitive sequence divergence in the species of diploid *Nicotiana* section *Alatae*. *Plant J* 48:6:907-919.
- Lim KY, Matyasek R, Lichtenstein CP, Leitch AR (2000) Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. *Chromosoma* 109:4:245-258.
- Macgregor HC (1978) Some trends in the evolution of very large chromosomes. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B* 238:309-317.
- Melo CAF, Martins MIG, Oliveira MBM, Benko-Iseppon AM, Carvalho R (2011) Karyotype analysis for diploid and polyploidy species of the *Solanum* L. *Plant Syst Evol* 293:227-235.

- Moscone EA, Lambrou M, Hunziker AT, Ehrendorfer F (1993) Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Syst Evol* 86:1:213-229.
- Moscone EA, Lambrou M, Ehrendorfer F Fluorescent (1996) chromosome banding in cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Syst Evol* 202:37-63.
- Moscone EA, Scaldaferrero MA, Grabielle M (2007) The evolution of chili peppers (*Capsicum* - Solanaceae): a cytogenetic perspective. In: Spooner DM, Bohs L e Giovannoni, J (Eds) Proceedings of the VIth International Solanaceae Conference, Solanaceae VI: Genomics Meets Biodiversity , Madison, WI, 745:137-169.
- Mouras A, Wildenstein C, Salesses G (1986) Analysis of karyotype and C-banding pattern of *Nicotiana plumbaginifolia* using two techniques. *Genetica* 68:197-202.
- Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, Santiago-Valentín E, Garcia VFN, Collier SM (2008) A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* 57:4:1159-1181.
- Rego, LNAA, Silva CRM, Torezan JMD, Gaeta ML, Vanzela ALL (2009) Cytotaxonomical study in Brazilian species of *Solanum*, *Lycianthes* and *Vassobia* (Solanaceae). *Plant Syst Evol* 279:1-4:93-102.
- Sanmiguel P, Tikhonov A, Jin YK (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Cytogenet Genome Res* 274:5288:765-768.
- Scaldaferrero MA, Grabielle M, Moscone EA (2012) Heterochromatin type, amount and distribution in wild species of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Genet Resour Crop Evol*, 60:2:693-709.
- Schweizer D, Ehrendorfer F (1976) Giemsa banded karyotypes, systematics, and evolution in *Anacyclus* (Asteraceae-Anthemideae). *Plant Syst Evol* 126:2:107-148.
- Schweizer D, Loidl J, (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of c-band patterns. *Chromosom T* 9:61-74.
- Smith LB, Downs R (1966) Solanáceas. In: R Reitz (ed.). *Flora ilustrada catarinense*. Itajai, Santa Catarina 247-294.
- Sýkorová E, Lim KY, Fajkus J, Leitch AR (2003) The signature of the *Cestrum* genome suggests an evolutionary response to the loss of (TTTAGGG)<sub>n</sub> telomeres. *Chromosoma* 112:164–172.
- Vignoli-Silva M (2009) O gênero *Cestrum* L. (Solanaceae) no Brasil extra-amazônico. 317 p. Tese (Doutorado em Botânica), Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre. 2009.
- Youn-Kyu P, Kim BD, Kim BS, Armstrong KC, Kim NS, (1999) Karyotyping of the chromosomes and physical mapping of the 5S rRNA and 18–26S rRNA gene families in five different species in *Capsicum*. *Genes Genet Syst* 74:4:149-157.

**CAPÍTULO II**  
**ANÁLISE CITO-MOLECULAR DO CROMOSSOMO B DE *CESTRUM***  
***STRIGILATUM* RUIZ ET PAV.**

\* Este artigo será submetido à publicação na revista Cytogenetics and Genome Research

*Título*

**ANÁLISE CITO-MOLECULAR DO CROMOSSOMO B DE *Cestrum strigilatum* RUIZ**  
**ET PAV.**

**RESUMO**

Os cromossomos B são adicionais e dispensáveis aos genomas dos organismos. Descritos para centenas de plantas, esses cromossomos possuem um padrão evolutivo diferente dos cromossomos do complemento A e despertam o interesse dos pesquisadores quanto à sua origem, composição e evolução. O gênero *Cestrum*, Solanaceae, possui atualmente três espécies descritas com cromossomos B, *C. strigilatum*, *C. intermedium* e o híbrido entre *C. parqui* × *C. aurantiacum*. *Cestrum* é um dos gêneros da família que mais acumula conhecimento sobre este tipo de cromossomo, possuindo potencial para se tornar um modelo de estudo sobre cromossomos B na família. Este trabalho empregou técnicas citogenéticas convencionais aliadas à técnicas moleculares como microdissecção, amplificação por *random priming* e hibridização *in situ* a fim de entender a composição, organização e origem do cromossomo B de *C. strigilatum*. Foram encontrados sinais adjacentes às bandas DAPI<sup>+</sup> nos cromossomos A de *C. strigilatum* e sinais nos cromossomos de *C. mariquitense*. Também foi encontrado um sinal forte localizado na região descrita como sítio do DNAr 5S das duas espécies. O padrão de hibridização mostra que o cromossomo B de *C. strigilatum* compartilha sequências com cromossomos A de mais de uma espécie de *Cestrum* o que pode estar associado à sua origem.

*Introdução*

Cromossomos B, também chamados de extranumerários, são cromossomos adicionais ou dispensáveis ao complemento haplóide, que não pareiam na meiose com os cromossomos do complemento A, possuem evolução independente dos demais cromossomos e modos de herança não mendeliana (Jones, 2012). Como possuem uma evolução diferenciada, sua origem é de difícil reconhecimento (Teruel et al., 2010), mas é provável que estes elementos surjam no genoma dos organismos a partir do complemento A (Camacho,

2000; Jones e Houben 2003), por ampliações de partes dos cromossomos (Teruel et al., 2010) ou após eventos de hibridizações interespecíficas (Navabi et al., 2011).

Geralmente, esses cromossomos são associados à efeitos nocivos, neutros e indetectáveis (Jones, 1991). Porém, existem exemplos de efeitos positivos. Um caso clássico foi descrito para *Allium schoenoprasum* onde os indivíduos com B pareciam possuir uma vantagem adaptativa nos primeiros estágios de vida em condições de alta mortalidade (Holmes e Bougourd, 1989). Mas, mesmo quando não há uma vantagem adaptativa, estes cromossomos se mantêm nas populações, muitas vezes, devido ao padrão de herança não mendeliana que resulta de diversos mecanismos herança dirigida (*drive*). Tais mecanismos provocam instabilidades mitóticas e/ou meióticas levando ao acúmulo dos B em diferentes tecidos somáticos e germinativos (Jones, 1991, 2012; Burt e Trivers, 2006).

Em um trabalho com 23.652 angiospermas (cerca de 10 % do grupo), Levin et al. (2005) encontraram que 979 espécies (4,1%) possuíam cromossomos B. Porém, cromossomos B já foram descritos para mais de 1.300 espécies de plantas e foi estimado que este elemento possa ocorrer em até cerca de 15% das plantas superiores (Jones, 1995). Em outra revisão, com 353 espécies de plantas, Trivers et al. (2004) sugeriu que o tamanho do genoma pode influenciar no acúmulo de cromossomos B, sendo que em grandes genomas a existência desses cromossomos é mais provável. Essa sugestão parece legítima em Solanaceae, onde o gênero *Cestrum* (com grandes cromossomos) é detentor do maior número de cromossomos B já descrito para família. Um exemplo foi reportado para o B no híbrido entre *C. parqui* L'Hér × *C. aurantiacum* Lindl., o qual apresentou trechos com DNAr 5S, 45S e uma sequência associada a um minisatélite rico em pares de bases AT (Sýkorová et al., 2003).

Cromossomos B também foram descritos para *C. intermedium* e *C. strigilatum*. Neste caso, foi encontrado um acúmulo significativo de heterocromatina. Em *C. intermedium* foram descritos blocos C-Giemsa<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup> nas regiões terminais dos dois braços enquanto que *C. strigilatum* exibiu três bandas tênues (*dots*) C-Giemsa<sup>+</sup> (Fregonezi et al., 2004). Em outros trabalhos com as espécies *C. intermedium* e *C. strigilatum* foram descritos o acúmulo e dispersão de retroelementos do tipo *Ty3/gypsy-like* nos cromossomos A e B (Fregonezi et al., 2007). Fernandes et al. (2008) mostrou também que níveis pouco comuns de fosforilação na serina 10 da Histona H3 parecem ter envolvimento na conservação da estrutura univalente na primeira fase da meiose e não na segunda em microsporogênese, culminado na perda do B, na forma de pseudomicrosporócitos.

Os conhecimentos acumulados sobre o cromossomo B de *C. strigilatum* o tornam um bom modelo para estudos mais aprofundados sobre o papel de diferentes famílias de DNA na organização desses cromossomos em plantas. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi reconhecer o padrão de hibridização da sonda obtida pela microdissecção do cromossomo B de *C. strigilatum* no próprio B e em cromossomos A desta espécie e de outra espécie do gênero.

### *Materiais e métodos*

#### Coleta e identificação do material

Sementes de *C. strigilatum* e *C. mariquitense* foram coletadas em uma área de floresta sazonal semi-decidual no município de São Jerônimo da Serra e Cianorte, Paraná, Brasil. Exsicatas das espécies e dos indivíduos com cromossomos B foram depositados no herbário FUEL.

#### Confecção das lâminas

Para obtenção de metáfases mitóticas, meristemas radiculares foram pré-tratados com paradiclorobenzeno por 24 horas sendo 1 hora em temperatura ambiente e 23 horas à 4 °C. Os tecidos foram fixados em etanol:ácido acético (3:1, v:v) por uma hora à temperatura e transferidas para álcool 70% e estocadas em *freezer*. Para a meiose, anteras jovens foram coletas e diretamente fixadas como descrito acima. Lâminas foram preparadas por dissecção e esmagamento em raízes previamente digeridas em solução de 4% de celulase e 40% de pectinase à 37 °C. Após o preparo das lâminas, as lamínulas foram removidas por congelamento em nitrogênio líquido, e as lâminas secas ao ar e estocadas em álcool 70%.

#### Microdisseccção e marcação da sonda

Lâminas contendo metáfases meióticas foram utilizadas para a microdissecção usando o microscópio invertido Olympus IX71, equipado com micromanipuladores Narishige (Figura 1A e B). Quinze cromossomos foram retirados das lâminas de metáfases meióticas utilizando-se microcapilares e tubos estéreis. A amostra foi tratada com solução de Proteinase K 1 µg/mL à 60 °C por 1 h e 30 min. Após o tratamento, a

enzima foi inativada à 90 °C e o DNA amplificado por *Random Priming* (Feinberg e Vogelstein, 1983) utilizando o kit BioPrime® da Invitrogen. O produto da amplificação foi submetido a uma nova reação de amplificação na presença de biotina-14-dATP.

#### Hibridização in situ

Para a hibridização *in situ*, as lâminas contendo células mitóticas foram trabalhadas de acordo com o protocolo estabelecido por Heslop-Harrison et al. (1991) e Cuadrado e Jouve (1994) com algumas modificações. As lâminas foram tratadas em solução de RNase (1 µg/mL) à 37 °C durante uma hora, lavadas em solução de 2× SSC à temperatura ambiente e desidratadas em uma série alcoólica. Em seguida receberam 30 µL de solução de hibridização, contendo 100-150 ng de sonda marcada (4 µL), formamida 100% (15 µL), polietilenoglicol 50% (6 µL), 20× SSC (3 µL), 100 ng de DNA fragmentado timo de bezerro (1 µL) e SDS 10% (1 µL). A mistura de hibridização e a amostra na lâmina foram desnaturados e renaturados conjuntamente em termociclador a 90 °C por 10 minutos, 50 °C por 10 minutos e 38 °C por 10 minutos. Após esse processo hibridização aconteceu a 37 °C por 12 horas em uma câmara úmida.

As lavagens de pós-hibridização foram de estringência aproximada a 60% realizadas com banhos de 6× SSC a temperatura ambiente por 10 minutos, seguido de um banho de 6× SSC à temperatura ambiente por 10 minutos e 4× SSC a temperatura ambiente por 10 minutos, todos sob fraca agitação. As sondas foram detectadas com avidina-FITC e as lavagens pós-deteção com 4× SSC/0,2% Tween 20 à temperatura ambiente por 10 minutos cada. Por fim as lâminas foram montadas em uma solução composta por 2,3% de 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-octane (DABCO), 90% de glicerol de baixa fluorescência, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0 (2%), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (4%) e água destilada (1,7%), com 4 µL de DAPI a 2 µg/mL. As imagens foram capturadas em escala de cinza com um microscópio de epifluorescência Leica DM 4500 B equipado com uma câmera DFC 300FX, e posteriormente sobrepostas com o uso do programa Leica IM50 4.0.

#### *Resultados e discussão*

A FISH realizada com o produto total da amplificação do cromossomo B hibridou totalmente no cromossomo B de *C. strigilatum*, porém o sinal foi mais intenso no braço longo deste cromossomo, sendo em algumas metáfases possível visualizar o sinal somente neste braço (Figura 2 G, H, I e K).

Também foi possível visualizar um sinal forte na região pericentromérica do par 8, adjacente a região descrita como sítio de hibridização do DNAr 5S (Fregonezi et al., 2006) e diversos outros sinais mais fracos dispersos por várias regiões dos cromossomos A de *C. strigilatum*, ocorrendo principalmente adjacentes a bandas DAPI (Figura 2 A, B, C e J). A sonda do B também foi usada para buscar similaridades com cromossomos de outra espécie do gênero, neste caso a espécie utilizada foi *Cestrum mariquitense*. Onde a FISH também mostrou um sinal mais evidente na região pericentromérica do par 8, também adjacente ao sítio de DNAr 5S, além de sinais mais tênues dispersos por outros cromossomos do complemento A (Figura 2 D, E e F). Devido à intensidade do sinal e a similaridade com o DNAr 5S é possível que parte da sequência do B ou sequências associadas a este estejam representadas no cluster de DNAr 5S.

Uma possibilidade é que sequências estejam localizados nas regiões espaçadoras transcritas e/ou não transcritas do DNAr 5S. Em camundongo, por exemplo, foram encontrados associados aos espaçadores intergênicos de DNAr até quatro tipos de microsatélites e elementos móveis dos tipos LINEs, SINEs e LTR, sendo que SINEs ocorrem em maior frequência nos espaçadores do DNAr que no resto do genoma (Grozdanov et al., 2003). Também é possível que estas sequências repetitivas façam parte da heterocromatina associada ao DNAr, como em *Tetraodon fluviatilis*, onde um elemento móvel do tipo *mariner* (MLE) foi encontrado preferencialmente em regiões heterocromáticas associadas a DNAr (Mandrioli, 2000). Vale a pena ressaltar que foram detectadas localizadas adjacentes ao DNAr 5S bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup> em *C. laevigatum* e *C. megalophyllum* e CMA<sup>+</sup> em *C. corymbosum*, *C. amictum* e *C. strigilatum* (Fregonezi et al., 2006; Fernandes et al., 2009).

Outra possibilidade é que o DNAr 5S, ou um pseudogene esteja presente em menor número de cópias no cromossomo B de *C. strigilatum*. Segundo Martins et al. (2006), uma vez que um gene é duplicado, suas cópias podem seguir caminhos evolutivos diferentes e sofrer diferentes pressões seletivas, podendo até mesmo assumir novas funções no genoma, em seu trabalho com *Hoplias malabaricus* foram encontradas diversas variantes do rDNA 5S que apresentam uma expansão do microsatélite TAAA e que se associam com as regiões centroméricas de diversos pares cromossômicos.

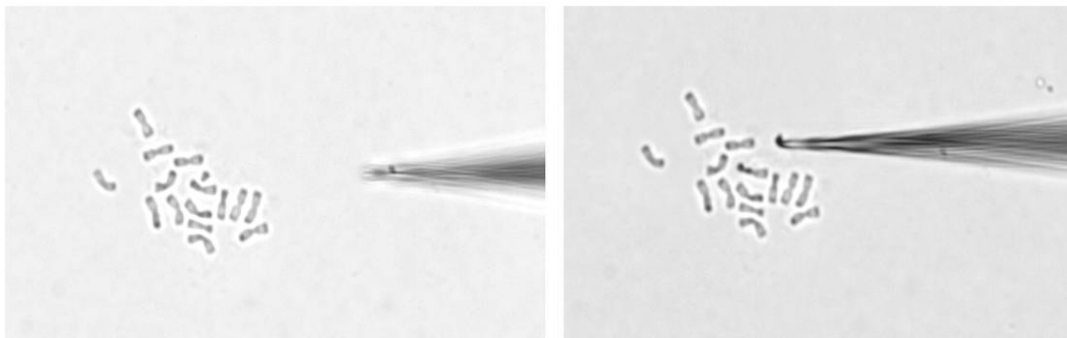
Embora a sonda de trigo não tenha gerado sinais para os B de *Cestrum*, exceto no híbrido *Cestrum parqui* L'Hér × *Cestrum aurantiacum* Lindl (Solanaceae) (Sýkorová et al., 2003) onde foi encontrado o DNAr 45S e 5S. Cromossomos B contendo DNAr são comuns em plantas, como exemplos podemos citar *Crepis capillaris* (Asteraceae)

(Maluszynska e Schweizer, 1989), *Nierembergia aristata* (Solanaceae) (Acosta e Moscone, 2011), *Plantago lagopus* (Plantaginaceae) (Dhar et al., 2002).

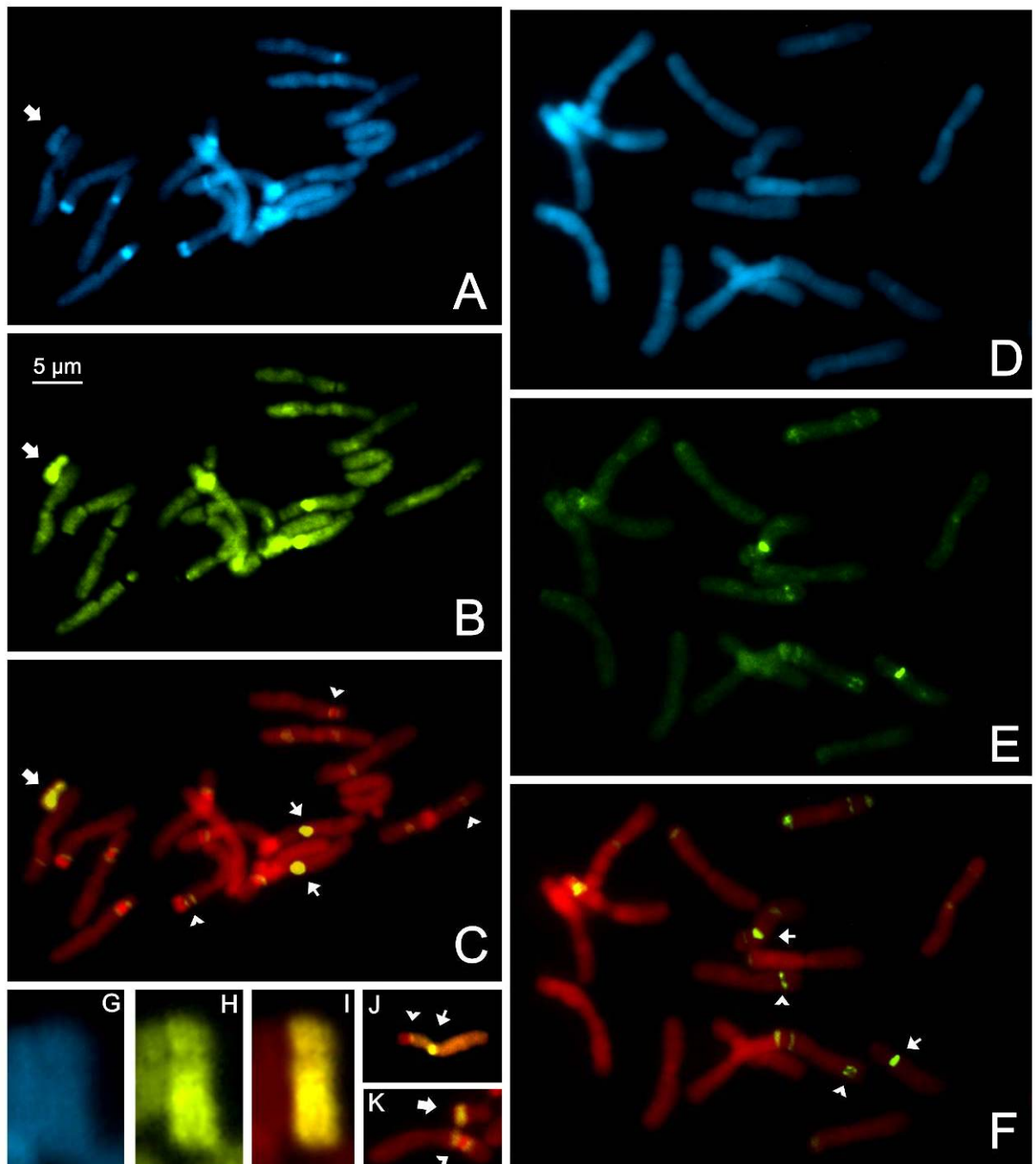
Devido a sua evolução diferenciada, muitas vezes é difícil reconhecer a origem de um cromossomo B (Teruel et al., 2010), porém, devido ao padrão de hibridização com sinais nos cromossomos A, é possível que o cromossomo B de *C. strigilatum* possua uma origem ligada a mais de um cromossomo do complemento A. Em *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae), por exemplo, o micro-cromossomo B exibe uma coleção de sequências repetidas em *tandem* também encontradas em diversos cromossomos do complemento A, e os autores sugerem que este cromossomo não tenha surgido a partir de um único evento dos cromossomos A (Jones e Houben, 2003; Houben et al., 2001).

Este trabalho mostra que, apesar de não ser muito utilizada, a técnica de amplificação por *random priming* (BioPrime®) pode ser eficaz na amplificação de cromossomos microdissectados e também na sua marcação, gerando sinais que podem ser observados em metáfases bem preparadas. O cromossomo B de *C. strigilatum* possui sequências repetitivas reconhecidas na FISH que sugerem parcialmente que na sua origem há a participação de uma ou mais sequências repetitivas que são comuns a mais de uma espécie de *Cestrum*.

**Figura 1** - Exemplo do processo de microdissecção cromossômica em uma célula em metáfase mitótica de *C. strigilatum* observada sob contraste de fase.



**Figura 2 -** Hibridização *in situ* com o produto do cromossomo B de *C. strigilatum* microdissectado e amplificado por *random primers*. FISH em uma metáfase mitótica de *C. strigilatum*: A) DAPI, B) biotina-FITC e C) sobreposição. A seta grande aponta para o cromossomo B. FISH com as sondas do B de *C. strigilatum* em uma metáfase de *C. mariquitense*: D) DAPI, E) biotina-FITC e F) sobreposição. As setas menores indicam o sinal de hibridização localizado adjacente ao DNAr 5S no par 8 das duas espécies. Pontas de seta indicam sinais de hibridização nos cromossomos A de *C. mariquitense* e *C. strigilatum*. Em detalhe (G-I) o cromossomo B aparece em maior ampliação. Note que a FISH gerou sinais mais brilhantes no braço longo do cromossomo B (seta maior). As pontas de seta (J-K) indicam sinais de hibridização nos cromossomos A de *C. strigilatum*, os quais ocorrem preferencialmente adjacentes a heterocromatina DAPI<sup>+</sup>.



## REFERÊNCIAS

- Acosta MC, Moscone EA: B Chromosomes in *Nierembergia aristata* (Solanaceae): Nucleolar Activity and Competition with the A Chromosomes. *Cytogenet Genome Res*, 132:105-112 (2011).
- Burt A, Trivers R: *Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, M.A., London, England, 602 p. (2006)
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW: B chromosome evolution. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B* 355:163-178 (2000).
- Cuadrado A, Jouve N: Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential fish and c-banding in 6x-triticales. *Chromosome Res* 2:331-338 (1994).
- Dhar MK, Friebe B, Koul AK, Gill BS, Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. *Chromosoma* 111:332-340 (2002).
- Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:1:6-13 (1983).
- Fernandes T, Yuyama PM, Moraes AP, Vanzela ALL: An uncommon H3/Ser10 phosphorylation pattern in *Cestrum strigilatum* (Solanaceae), a species with B chromosomes. *Genome* 51:9:772-777 (2008).
- Fernandes T, Rego LNAA, Nardy M, Yuyama PM, Vanzela ALL: Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) revealed by fluorescent chromosome banding and FISH. *Genet Mol Biol* 32:2:320-327 (2009).
- Fregonezi JN, Rocha C, Torezan JMD, Vanzela, ALL: The occurrence of different Bs in *Cestrum intermedium* and *C strigilatum* (solanaceae) evidenced by chromosome banding. *Cytogenet Genome Res* 106:2-4:184-188 (2004).
- Fregonezi JN, Rocha C, Torezan JMD, Vieira, AO, Vanzela, ALL: Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on physical mapping of repetitive DNA. *Genet Mol Biol* 29:1:97-104 (2006).
- Fregonezi JN, Vilas-Boas LA, Fungaro MHP, Gaeta ML, Vanzela ALL: Distribution of a Ty3/gypsy-like retroelement on the A and B-chromosomes of *Cestrum strigilatum* Ruiz & Pav. and *Cestrum intermedium* Sendtn.(Solanaceae). *Genet Mol Biol* 30:3:599-604 (2007).
- Grozdanov P, Georgiev O, Karagyozov L: Complete sequence of the 45-kb mouse ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics* 82:637-643 (2003).
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Ananthawat-Jonsson K: *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Techniques* 3:1-7 (1991).
- Holmes DS, Bougourd SM: B-chromosome selection in *allium schoenoprasum* natural populations. *Heredity* 63:83-87 (1989).

- Houben A, Verlin D, Leach CR, Timmis JN: The genomic complexity of micro B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* 110:451-459 (2001).
- Jones RN: B-chromosome drive. *Am Nat* 137:430-442 (1991).
- Jones RN, Tansley review no 85 - b chromosomes in plants. *Genet Mol Biol* 131:4:411-434 (1995).
- Jones RN: B chromosomes in plants. *Plant Biosyst* 146:3:727-737 (2012).
- Jones RN, Houben A: B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends Plant Sci* 8:9:417-423 (2003).
- Levin DA, Palestis BG, Jones RN, Trivers R: Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. *Evolution* 5:59:962-969 (2005).
- Maluszynska J, Schweizer D, Ribosomal RNA genes in B-chromosomes of *Crepis capillaris* detected by non-radioactive in situ hybridization. *Heredity* 62:59-65 (1989).
- Mandrioli M: *Mariner*-like transposable elements are interspersed within the rDNA-associated heterochromatin of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes), *Chromosome Res* 8:177-179 (2000).
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr PM: A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127:133-141 (2006)
- Navabi ZB, Stead KE, Pires JC, Xiong Z, Sharpe AG, Parkin IAP, Rahman MH, Good AG: Analysis of B-genome chromosome introgression in interspecific hybrids of *Brassica napus* × *B. carinata*. *Genetics* 187:659-673 (2011).
- Sýkorová E, Lim KY, Fajkus J, Leitch AR: The signature of the *Cestrum* genome suggests an evolutionary response to the loss of (TTTAGGG)<sub>n</sub> telomeres. *Chromosoma* 112:164-172 (2003).
- Teruel, M, Cabrero J, Perfectti F: B chromosome ancestry revealed by histone genes in the *migratory locust*. *Chromosoma* 119:2:217-225 (2010).
- Trivers R, Burt A, Palestis BG: B chromosomes and genome size in flowering plants. *Genome*, 47:1-8 (2004).

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

Os dados encontrados demonstram que o acúmulo e a dispersão de DNAs repetitivos, em especial a heterocromatina, são dois mecanismos importantes na diferenciação cariotípica das espécies e até mesmo populações de *Cestrum*. O cromossomo B de *C. strigilatum* possui sequências repetitivas compartilhadas por outros cromossomos do complemento, inclusive em outras espécies, sugerindo que este cromossomo tenha sua origem ligada aos cromossomos A. De maneira geral se destacam as seguintes considerações:

- Os cariótipos de *C. nocturnum* e das quatro populações de *C. mariquitense* apresentam 16 cromossomos grandes que decrescem em tamanho. Os sete maiores pares são metacêntricos e o menor par varia de submetacêntrico a acrocêntrico.
- As regiões heterocromáticas em *C. nocturnum* e *C. mariquitense* variam em composição, quantidade e distribuição, porém sem promover grandes alterações na forma dos cromossomos.
- Os resultados mostram que os blocos DAPI são mais variáveis que os blocos CMA e que o par cromossômico 8 é mais conservado em relação aos demais pares nas duas espécies.
- As espécies estudadas não apresentam acúmulo de heterocromatina na região centromérica e os maiores blocos heterocromáticos ocorrem preferencialmente na região terminal dos cromossomos.
- O DNAr 45S também ocorre nas regiões terminais dos cromossomos nas duas espécies, o DNAr 5S é mais conservado, ocupando a região proximal do braço longo do menor par.
- As sondas produzidas pela microdissecção e amplificação do cromossomo B de *C. strigilatum* hibridizaram no cromossomo B da espécie, sobretudo na maior parte do braço longo.
- As sondas produziram ainda sinais localizados nos cromossomos A de *C. strigilatum* e *C. mariquitense*. Em *C. strigilatum* estes sinais são adjacentes a bandas DAPI.
- As sondas de B também produziram um sinal forte na região descrita como sítio de ocorrência do DNAr 5S nas espécies de *C. strigilatum* e *C.*

*mariquitense*. Este sinal indica que o cromossomo B de *C. strigilatum* pode possuir sequências que ocorrem na heterocromatina associada a este DNAr.

- O padrão de hibridação das sondas de B nos cromossomos A indicam que sua origem está associada à sequências repetitivas comuns a mais de uma espécie de *Cestrum*.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, M C; A MOSCONE, E. B Chromosomes in *Nierembergia aristata* (Solanaceae): Nucleolar Activity and Competition with the A Chromosomes. **Cytogenetic And Genome Research**, v. 132, p.105-112, 2011.
- ACOSTA, M. C.; GUERRA, M.; MOSCONE, E. A.. Karyological relationships among some South American species of *Solanum* (Solanaceae) based on fluorochrome banding and nuclear DNA amount. **Plant Systematics And Evolution**, v. 298, n. 8, p.1547-1556, 2012.
- BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C.M.C.; PINHEIRO, C.; LOPES, C.T.A.; MARQUIORE, D.; BRITO, M.F.; YAMASAKI, E.M.; TOKARNIA, C. H. Poisoning by *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) in buffaloes. **African Journal Of Biotechnology**, v. 30, n. 12, p.1049-1052, dez. 2010.
- BEDINI, G.; GARBARI, F.; PERUZZI, L.; Karyological knowledge of the Italian vascular flora as inferred by the analysis of “Chrobase.it”, **Plant Biosystems**, p. 1-11, set. 2011.
- BERG, C. e GREILHUBER, J. Cold-sensitive chromosome regions and their relation to constitutive heterochromatin in *Cestrum parqui* (Solanaceae). **Genome** v. 35, p.921-930, 1992.
- BERG, C.; GREILHUBER, J. Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum* (Solanaceae): *C. strigilatum*, *C. fasciculatum*, and *C. elegans*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 185, p. 133-151, 1993a.
- BERG, C.; GREILHUBER, J. Cold-sensitive regions and heterochromatin in *Cestrum aurantiacum* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 185, p. 259-273, 1993b.
- BHATTACHARJEE, I; GHOSH, A; CHANDRA, G. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cestrum diurnum* (L.) (Solanales : Solanaceae). **African Journal Of Biotechnology**, v. 4, n. 4, p.371-374, abr. 2005.
- BOHS, L. Transfer of *cyphomandra* (solanaceae) and its species to *solanum*. **Taxon**, v. 44, n. 4, p.583-587, nov. 1995.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; MELO-OLIVEIRA, M. B.; CARVALHEIRA, G. M. G.; GUERRA, M. Different chromatin fractions of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and related species. **Micron**, v. 40, p.851-859, 2009.
- BURT, A.; TRIVERS. R; **Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements**. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, M.A., London, England, 602 pp, 2006.
- CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W.. B chromosome evolution. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B**, v. 355, p.163-178, 2000.
- CHASE, M. W.; KNAPP, S.; COX, A. V.; CLARKSON, J.J.; BUTSKO, Y.; JOSEPH, J.; SAVOLAINEN, V. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). **Annals Of Botany**, v. 92, n. 1, p.107-127, jul. 2003.

- CHARCHILAN, M.; KUMKE, K.; MIKOLAJEWSKI, S.; HOUBEN, A. Rye B chromosomes are weakly transcribed and might alter the transcriptional activity of A chromosome sequences, **Chromosoma**, v. 118, p. 607-616, 2009.
- CHIARINI, F. E.; BARBOZA, G. E.. Karyological studies in *Jaborosa* (Solanaceae). **Botanical Journal Of The Linnean Society**, v. 156, n. 3, p.478-467, mar. 2008.
- COHEN, S.; A.HOUBEN; SEGAL, D.. Extrachromosomal circular DNA derived from tandemly repeated genomic sequences in plants. **The Plant Journal**, v. 53, p.1027-1034, 2008.
- CRONQUIST, A. **The evolution and Classification of Flowering Plants**. New York: The New York Botanical Garden, p. 423-424, 1988.
- CUADRADO, A.; JOUVE, N.. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential fish and c-banding in 6x-triticale. **Chromosome Research**, v. 2, p.331-338, 1994.
- D'ARCY, W. G. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M. e Estrada N. (eds) **Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution**. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, p. 75-137, 1991.
- DHAR, M. K.; FRIEBE, B.; KOUL, A. K.; GILL, B. S. Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. **Chromosoma**, v. 111, p.332-340, out. 2002.
- EL-NAHAS, A. L.; KHALIFA, S. F.; ABOU-EL-ENAIN, M. M. Kariological studies on the Solanaceae, **Pakistan Journal of Biological Sciences**, n.3, v. 5, p. 717-720, 2000.
- EVANS, G.M.; DAVIES, E. The genetics of meiotic chromosome pairing in *Lolium temulentum* x *Lolium perenne* tetraploids, **Theoretical and Applied Genetics**, V. 71, p. 185–192, 1985.
- FERNANDES, T.; REGO, L. N. A. A.; NARDY, M.; YUYAMA, P.M.; VANZELA, A. L. L. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) revealed by fluorescent chromosome banding and FISH. **Genetics And Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p.320-327, 2009
- FERNANDES, T.; YUYAMA, P.M.; MORAES, A.P.;; VANZELA, A. L. L. An uncommon H3/Ser10 phosphorylation pattern in *Cestrum strigilatum* (Solanaceae), a species with B chromosomes. **Genome**, v. 51, n. 9, p.772-777, 2008.
- FREGONEZI, J. N.; ROCHA, C.; TOREZAN, J. M. D. VANZELA, A. L. L. The occurrence of different Bs in *Cestrum intermedium* and *C strigilatum* (solanaceae) evidenced by chromosome banding. **Cytogenetic And Genome Research**, v. 106, n. 2-4, p.184-188, 2004.
- FREGONEZI, J. N.; TOREZAN, J. M. D.; VIEIRA, A. O.; VANZELA, A. L. L. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on physical mapping of repetitive DNA. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 97-104, 2006.

- FREGONEZI, J. N.; VILAS-BOAS, L.A.; FUNGARO, M.H.P.; GAETA, M.L.; VANZELA, A.L.L. Distribution of a Ty3/gypsy-like retroelement on the A and B-chromosomes of *Cestrum strigilatum* Ruiz & Pav. and *Cestrum intermedium* Sendtn.(Solanaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 599-604, 2007.
- GERLACH, W. L.; BEDBROOK, J. R.. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 7, p.1869-1885, 1979.
- GERLACH, W. L.; DYER, T. A.. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p.4851-4865, 1980.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E; MOLINA, F;CHIAVARINO, A. M.; ROSATO, M.; PUERTAS, M.J. One gene determines maize B chromosome accumulation by preferential fertilisation; another gene(s) determines their meiotic loss. **Heredity**, v. 90, p.122-129, 2003.
- GROZDANOV, P.; GEORGIEV, O.; KARAGYOZOV, L. Complete sequence of the 45-kb mouse ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. **Genomics**, v. 82, p. 637-643, 2003.
- GUARIDO, P. C. P.;DE PAULA, A. A.; SILVA, C. R. M.; RODRIGUEZ, C.;VANZELA, A. L. L. Hypomethylation of cytosine residues in cold-sensitive regions of *Cestrum strigilatum* (Solanaceae). **Genetics And Molecular Biology**, v. 35, n. 2, p.455-459, 2012.
- GUERRA, M.S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**, v.9, p.741-743, 1986.
- GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology** v. 23, p. 1029-1041, 2000.
- HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative Genome Organization in Plants: From Sequence and Markers to Chromatin and Chromosomes. **The Plant Cell**, v. 12 p. 617-635, 2000.
- HOUBEN, A.; VERLIN, D.; LEACH, C. R.; TIMMIS, J. N. The genomic complexity of micro B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosoma**, v. 110, p.451-459, nov. 2001.
- HOUBEN, A.; NASUDA, S.; Endo, T. R.; Plant B chromosomes. *In*: James A. Birchler [ed.], **Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols**, Methods in Molecular Biology, vol. 701, Humana Press, New York, N.Y., p. 97-111, 2011
- HOUBEN, A.; CARCHILAN, M. Plant B Chromosomes: What Makes Them Different? *In*: BASS, H. W. e BIRCHLER, J. A. (eds.) **Plant Cytogenetics**, Plant Genetics And Genomics: Crops And Models, v. 4, Springer, New York, N.Y., p.59-77, 2012.
- HUNZIKER, A. T. South American Solanaceae; a synoptic survey. *In*: Hawkes JG, Lester R.N. e Skelding A.D. (eds.) **The Biology and Taxonomy of the Solanaceae**, 7ed Linnean Society Symposium Series. Academic Press, New York, N.Y., p. 49-85, 1976.
- HUNZIKER, A.T. **Genera Solanacearum**. Ruggell, A.R.G. Gantner, 2001.

- JOACHIMIAK, A.; KULA, A.; GRABOWSKA-JOACHIMIAK, A.. On heterochromatin in karyosystematic studies. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 29, p.69-77, 1997.
- JONES, R. N.. B-chromosome drive. **The American Naturalist**, v. 137, p.430-442, 1991.
- JONES, R.N. Tansley review no 85 - b chromosomes in plants. **Genetics And Molecular Biology**, v. 131, n. 4, p.411-434, dez. 1995.
- JONES, N. B chromosomes in plants. **Plant Biosystems**, v. 146, n. 3, p.727-737, set. 2012.
- JONES, N.; HOUBEN, A.. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? **Trends In Plant Science**, v. 8, n. 9, p.417-423, set. 2003.
- KIDWELL, M. G.. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, p.49-63, 2002.
- KIMURA, M. KAYANO, H. Maintenance of supernumerary chromosomes in wild populations of *Lilium callosum* by preferential segregation. **Genetics** v. 46, p. 1699-1712, 1961.
- KNAPP, S.; BOHS, L; NEE, M. Solanaceae - a model for linking genomics with biodiversity. **Comparative And Functional Genomics**, v. 5, n. 3, p.285-291, abr. 2004.
- KITAMURA, S.; INOUE, M.; SHIKAZONO, N.; TANAKA, A. Relationships among *Nicotiana* species revealed by the 5S rDNA spacer sequence and fluorescence in situ hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, n. 5, p.678-686, fev. 2001.
- KOVARIK, A.; DADEJOVA, M.; LIM, Y. K.; CHASE, M.W.; CLARKSON, J. J.; KNAPP, S.; LEITCH, A. R. Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: A potential link between rDNA homogenization and epigenetics. **Conference: Meeting On Plant Genome Horizons - Vistas And Visions**, Royal Bot Gardens, Kew, England, v. 101, n. 6, p.815-823, abr. 2008.
- KWON, J. K.; KIM, B. D.. Localization of 5S and 25S rRNA genes on Somatic and meiotic chromosomes in *Capsicum* species of chili pepper. **Molecules And Cells**, v. 27, n. 2, p.205-209, fev. 2009.
- LAS PENAS, L. M.; CHIARINI, F. E.; BERNARDELLO, G.; ROJAS, C.B. Karyotypes of some species of *Cestrum*, *Sessea*, and *Vestia* (tribe Cestreae, Solanaceae). **Caryologia**, v. 59, n. 2, p.131-137, jun. 2006.
- LAURA, S.; LAS PENAS, M. L.; BERNARDELLO, G.; LEVIN, R. A.; MILLER, J. S. Karyotypes and fluorescent chromosome banding patterns in southern African *Lycium* (Solanaceae). **Caryologia**, v. 63, n. 1, p.50-61, mar. 2010.
- LEVIN, D. A.; PALESTIS, B. G.; JONES, R. N.; TRIVERS, R. Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. **Evolution**, v. 59, n. 5, p.962-969, 2005.
- LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; MATYASEK, R.; CHASE, M. W.; KNAPP, S.; MCCARTHY, E.; CLARKSON, J. J.; LEITCH, A. R. Comparative genomics and repetitive sequence

- divergence in the species of diploid *Nicotiana* section *Alatae*. **Plant Journal**, v. 48, n. 6, p.907-919, dez. 2006.
- LIM, K. Y.; MATYASEK, R.; LICHTENSTEIN, C. P.; LEITCH, A.R. Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. **Chromosoma**, v. 109, n. 4, p.245-258, jul. 2000.
- MACGREGOR, H. C. Some trends in the evolution of very large chromosomes. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B**, v. 238, n. , p.309-317, 1978.
- MALUSZYNSKA, J.; SCHWEIZER, D. Ribosomal RNA genes in B-chromosomes of *Crepis capillaris* detected by non-radioactive in situ hybridization. **Heredity**, v. 62, p.59-65, 1989.
- MANDRIOLI, M. *Mariner*-like transposable elements are interspersed within the rDNA-associated heterochromatin of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes), **Chromosome Research**, v. 8, p. 177-179, 2000.
- MARTINS, C.; FERREIRA, I.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; GALETTI Jr, P.M. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica** v. 127 p. 133-141, 2006.
- MELO, C.A.F.; MARTINS, M.I.G.; OLIVEIRA, M.B.M.; BENKO-ISEPPON, A.M.; CARVALHO, R. Karyotype analysis for diploid and polyploidy species of the *Solanum* L. **Plant Systematics and Evolution**, v. 293, p. 227-235, 2011.
- MOSCONE, E. A.; LAMBROU, M.; HUNZIKER, A. T.; EHRENDORFER, F. Giemsa C-banded karyotypes in *Caspicum* (Solanaceae). **Plant Systematic Evolution**, v. 86, n. 1, p.213-229, 1993.
- MOSCONE, E. A.; LAMBROU, M.; EHRENDORFER, F. Fluorescent chromosome banding in cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Systematic Evolution**, v. 202, p.37-63, 1996.
- MOSCONE, E. A.; SCALDAFERRO, M. A.; GRABIELE, M. The evolution of chili peppers (*Capsicum* - Solanaceae): a cytogenetic perspective. In: SPOONER, D.M.; BOHS, L.; Giovannoni, J. (Eds) Proceedings of the VIth International Solanaceae Conference, **Solanaceae VI: Genomics Meets Biodiversity** , Madison, WI , n. 745, p.137-169, 2007.
- MOURAS, A.; WILDENSTEIN, C.; SALESSES, G. Analysis of karyotype and C-banding pattern of *Nicotiana plumbaginifolia* using two techniques. **Genetica**, v. 68, p.197-202, 1986.
- OLMSTEAD, R.G.; BOHS, L.; MIGID, H.A.; SANTIAGO-VALENTÍN, E.; GARCIA, V.F.N.; COLLIER, S.M. A molecular phylogeny of the Solanaceae. **Taxon**, v. 57, n. 4, p. 1159-1181, 2008.
- OUYANG, S.; BUELL, C. R.. The TIGR Plant Repeat Databases: a collective resource for the identification of repetitive sequences in plants. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p.360-363, jan. 2004.

- PARDUE, M. L.; HENNIG, W.. Heterochromatin: junk or collector's item? **Chromosoma**, v. 100, p.3-7, 1990.
- PARK, M.; JO, M.; Kwon, J. K.; PARK, J.; HWAAHN, J.; KIM, S.; LEE, Y. H.; YANG, T. J.; HUR, C-G.; KANG, B-C.; KIM, B-D.; CHOI, D. Comparative analysis of pepper and tomato reveals euchromatin expansion of pepper genome caused by differential accumulation of *Ty3/Gypsy*-like elements. **Biomed Central Genomics**, v. 12, jan. 2011.
- PARKER, J.S.; JONES, G.H.; EDGAR, L.; WHITEHOUSE, C. The population cytogenetics of *Crepis capillaris*. II The stability and inheritance of B-chromosomes. **Heredity**, v.63, p. 19-27, 1989.
- POZZOBON, M. T.; SCHIFINO-WITTMAN, M. T.; BIANCHETTI, L. D. Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do  $x=12$  and  $x=13$  represent two evolutionary lines? **Botanical Journal Of The Linnean**, v. 151, n. 2, p.259-269, jun. 2006.
- PRINGLE, G J; MURRAY, B G. Karyotype diversity and nuclear DNA variation in *Cyphomandra*. In: HAWKES, G.; LESTER, R. N.; NEE, M.; ESTRADA, N. (eds), **Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution**: Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, Uk, p.247-252, 1991.
- REGO, L. N. A. A.; SILVA, C. R. M.; TOREZAN, J. M. D.; GAETA, M. L.; VANZELA, A. L. L. Cytotaxonomical study in Brazilian species of *Solanum*, *Lycianthes* and *Vassobia* (Solanaceae). **Plant Systematics And Evolution**, v. 279, n. 1-4, p.93-102, maio 2009.
- SANMIGUEL, P.; TIKHONOV, A.; JIN, Y. K.. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. **Cytogenetic And Genome Research**, v. 274, n. 5288, p.765-768, nov. 1996.
- SCALDAFERRO, M. A.; GRABIELE, M.; MOSCONE, E. A.. Heterochromatin type, amount and distribution in wild species of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). **Genetic Resources And Crop Evolution**, v. 60, n. 2, p. 693-709, jul. 2012.
- SCHWEIZER, D.; EHRENDORFER, F.. Giemsa banded karyotypes, systematics, and evolution in *Anacyclus* (Asteraceae-Anthemideae). **Plant Systematics And Evolution**, v. 126, n. 2, p.107-148, 1976.
- SCHWEIZER, D.; LOIDL, J.. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of c-band patterns. **Chromosomes Today**, v. 9, p.61-74, 1987.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. Solanáceas. In: R Reitz (ed.). **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí, Fascículo SOLA, p. 247-294, 1966.
- SÝKOROVÁ, E.; LIM, K.Y.; FAJKUS, J.; LEITCH, A.R. The signature of the *Cestrum* genome suggests an evolutionary response to the loss of (TTTAGGG) $n$  telomeres. **Chromosoma**, v. 112, p. 164–172, 2003.
- TRIVERS, R.; BURT, A.; PALESTIS, B. G. B chromosomes and genome size in flowering plants. **Genome**, v. 47, p.1-8, 2004.

- VIGNOLI-SILVA, M. **O gênero *Cestrum L. (Solanaceae) no Brasil extra-amazônico***. 2009. 317 p. Tese (Doutorado em Botânica), Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre. 2009.
- WU, F.; TANKSLEY, S. D.. Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. **Biomed Central Genomics**, X, v. 11, n. 182, p.1-11, mar. 2010.
- YOUN-KYU, P.; KIM, B. D.; KIM, B. S., ARMSTRONG, K. C.; KIM, N. S. Karyotyping of the chromosomes and physical mapping of the 5S rRNA and 18–26S rRNA gene families in five different species in *Capsicum*. **Genes And Genetic Systems**, v. 74, n. 4, p.149-157, 1999.