



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAROLINA CRISTINA QUINTAS

**“DISTRIBUIÇÃO DE CROMOSSOMOS BS NA MEIOSE DE *cestrum strigilatum* (SOLANACEAE)”**

---

Londrina

2011

CAROLINA CRISTINA QUINTAS

**DISTRIBUIÇÃO DE CROMOSSOMOS B NA MEIOSE DE**  
***Cestrum strigilatum* (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 Luís Laforga Vanzela*

Londrina

2011

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

### Dados internacional de Catalogação-na-fonte (CIP)

Q78d Quintas, Carolina Cristina.  
Distribuição de cromossomos B na meiose de *Cestrum strigilatum* (Solanaceae)  
/ Carolina Cristina Quintas. – Londrina, 2011.  
40 f. : il.

Orientador: André Luís Laforga Vanzela.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade  
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Biologia Molecular, 2011.  
Inclui bibliografia.

1. Solanaceae – Teses. 2. Citogenética vegetal – Teses. 3. Cromossomos vegetais  
– Teses. 4. Polen – Estudo de viabilidade – Teses. I. Vanzela, André Luís 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

CAROLINA CRISTINA QUINTAS

**DISTRIBUIÇÃO DE CROMOSSOMOS B NA MEIOSE DE *Cestrum strigilatum* (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. Dr. Rogério Fernandes de Souza  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. Andréa B. M. Bonato  
Universidade Estadual de Maringá

---

Profa. Dra. Renata da Rosa  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 15 de setembro de 2011.

*Dedico esse trabalho à minha mãe  
Maria Izabel Quintas e aos meus familiares.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Maria Izabel Quintas, pelo carinho, suporte emocional, apoio, amor, educação, e moral que me foram transmitidos ao longo de todos esses anos, sem os quais certamente não teria chegado aqui.

À minha família por me apoiar, principalmente ao meu avô João que sempre foi meu “pai do coração” e às minhas tias Marlene e Maria Aparecida pelo apoio, “puxões de orelha” e por sempre tentarem fazer as vidas ao seu redor mais felizes.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UEL.

Não posso deixar de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. André L. L. Vanzela pela orientação e conselhos que me foram dados ao longo desses seis anos e meio de orientação.

Ao Prof. Dr. Rogério F. de Souza, por ter aceitado me co-orientar nesse trabalho, por todo carinho, paciência e atenção que me foram dados.

Quero também agradecer à minhas amigas e companheiras de Laboratório: Priscila e Mariana, pelas primeiras lições no LABRE. À Vanessa e à Edihanne, por toda atenção, carinho, troca de idéias, amizade, conversas e abraços quando eu mais precisava além do companheirismo principalmente aos sábados, domingos e feriados que passamos “pipetando”. Assim como aos companheiros Thiago, Marcos e Adriano que também trabalharam com os Bs.

Aos amigos que já estavam presentes em minha vida antes de minha ida para Londrina, principalmente Rê, Raphael, Ká, e Jú. E aos que fiz em Londrina: Kátia, Lya, Izabel, Luiz e Luciana por fazer minha vida mais leve; Virginia, pelos almoços e jantares maravilhosos e ótimos conselhos, Alessandra, Diana e Juceli, pela parceria na turma de mestrado e amizade sincera.

Ao Prof. Dr. José Marcelo, a bióloga Alba e aos funcionários do LABRE, em especial ao Odair e ao Sr. João pelas contribuições, conversas e apoio técnico, sempre cuidando de nossas plantas no viveiro.

À Sueli por sua paciência, sempre auxiliando com um sorriso imenso a cada uma das idas e vindas à secretaria do programa.

À professora Ana Lúcia Dias, por todo o carinho dispensado à minha pessoa, por cada dica, conselhos, pelos abraços e palavras amigas quando eu mais precisava.

Finalmente, gostaria de agradecer a todos os professores do programa Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, principalmente à professora Leda e ao professor Laurival.

*“De tudo, ficaram três coisas:  
A certeza de que estava sempre  
começando,  
A certeza de que era preciso continuar e  
A certeza de que seria interrompido  
Antes de terminar.*

*Fazer da interrupção um caminho novo,  
Fazer da queda um passo de dança,  
Do medo uma escada,  
Do sonho uma ponte,  
Da procura um encontro...”*

*“... das dificuldades, um desafio”*

**Fernando Sabino em “O escolhido”**

QUINTAS, Carolina Cristina. **Distribuição de cromossomos B na meiose de *Cestrum strigilatum* (Solanaceae)**. 2011. 40 fls. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

Os cromossomos B, também chamados de cromossomos supranumerários, são conhecidos por variarem em tamanho, forma e composição do DNA, bem como por não formarem sinapse com os cromossomos do complemento normal, ou cromossomos A. São geralmente heterocromáticos e não contêm muitos genes, exceto por sequências de DNAr observados em algumas espécies. Esse tipo cromossômico pode estar presente ou ausente em determinados tecidos, indivíduos ou populações. Devido ao fato de não seguirem as Leis Mendelianas de herança, são considerados dispensáveis. Os motivos pelos quais os cromossomos B são mantidos em populações naturais permanecem pouco compreendidos e os mecanismos de transmissão e acúmulo desses cromossomos ainda são pouco claros. Neste estudo, por meio de análise meiótica, foi visto que o cromossomo B de *Cestrum strigilatum* exibe um comportamento univalente, segregando de maneira aleatória na meiose. Foi observada uma tendência para a sua eliminação ao final da androsporogênese, já que pseudoandrósporos foram encontrados ao final da meiose. Por outro lado, a análise da prole das plantas portadoras de cromossomos B revelou a presença desses cromossomos. Não foi evidenciada uma relação entre viabilidade de pólen e a presença ou ausência de cromossomos B na planta-mãe, indicando que eles podem ter um efeito neutro sobre a viabilidade do pólen nessa espécie. O número de células com cromossomos B decresce durante a meiose masculina, com algumas indicações sobre sua eliminação na tétrade. Isto pode reforçar a transmissão feminina desses cromossomos.

**Palavras-chave:** Androsporogênese. Cromossomos supranumerários. *Drive*, Viabilidade polínica.

QUINTAS, Carolina Cristina. **Distribution of B chromosomes in meiosis *Cestrum strigilatum* (Solanaceae)**. 2011. 40 fls. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

### ABSTRACT

B-chromosomes do not belong to normal karyotype set and can be present or absent in certain tissues, individuals or populations. Due to do not follow the Mendelian mechanisms of inheritance, these ones are considered expendable. B-chromosomes vary in size, shape and composition of DNA, can be rich in heterochromatic or other repetitive DNA families, or even contain genes. The reasons why B-chromosomes are maintained in natural populations remain poorly understood, however, the mechanisms of transmission and accumulation of these chromosomes are still unclearer. The B-chromosome of *Cestrum strigilatum* exhibits behavior univalent, segregating randomly in meiosis. We observed a trend towards eliminating the end of androsporogenesis since pseudoandrospores were found at the end of meiosis. However, B-chromosomes were observed in the offspring of plants that had such chromosomes. There was no evidence of a relationship between pollen viability and the presence or absence of B-chromosomes in the mother plant, indicating that these chromosomes may have a neutral effect on pollen viability in *C. strigilatum*. The number of cells with B-chromosomes decreases during male meiosis, with some indication of its elimination in the tetrad. This may reinforce the hypothesis of transmission of B-chromosomes through female gametes.

**Key-words:** Androsporogenesis. Supernumerary chromosomes. Drive, pollen viability.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Etapas da meiose de *C. strigilatum* com cromossomos B ..... 33
- Figura 2** – Comparação entre grãos de pólen viáveis e inviáveis..... 34

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Número e proporção de cromossomos B em *Cestrum. strigilatum* (Solanaceae) em diferentes fases da meiose ..... 35
- Tabela 2** – Frequência de descendentes dos indivíduos portadores e não portadores de Bs, contados a partir de células de raízes das sementes originadas dos indivíduos com cromossomos B ..... 35

## SUMÁRIO

<b>1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	12
1.1 A FAMÍLIA SOLANACEAE .....	12
1.2 O GÊNERO <i>CESTRUM</i> .....	13
1.3 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE SOLANACEAE E DO GÊNERO <i>CESTRUM</i> .....	14
1.4 CROMOSSOMOS B: DEFINIÇÃO E ORIGEM .....	16
1.5 CARACTERÍSTICAS E ORGANIZAÇÃO DOS CROMOSSOMOS B .....	19
1.6 COMPORTAMENTO DOS CROMOSSOMOS B NA MEIOSE .....	21
1.7 CROMOSSOMOS B EM SOLANACEAE E <i>CESTRUM</i> .....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 OBJETIVO GERAL .....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3 CROMOSSOMO B EM <i>Cestrum strigilatum</i> (SOLANACEAE): COMPORTAMENTO MEIÓTICO E VIABILIDADE DOS GRÃOS DE PÓLEN</b> .....	27
3.1 INTRODUÇÃO .....	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3.3 RESULTADOS .....	30
3.4 DISCUSSÃO .....	31
3.5 CONCLUSÃO .....	32
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36

# 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 A FAMÍLIA SOLANACEAE

A ordem Solanales, subclasse Asteridae, é constituída por nove famílias botânicas, com aproximadamente 5.000 espécies. Mais de 4/5 dessas espécies pertencem a duas famílias, Convolvulaceae Juss. e Solanaceae Juss. (CRONQUIST, 1988). A família Solanaceae é constituída por cerca de 3.500 espécies distribuídas em cerca de 110 gêneros (OLMSTEAD et al., 1999). Possui distribuição cosmopolita, sendo a América do Sul um dos principais centros de diversidade e endemismo (HUNZIKER, 2001). O Brasil apresenta cerca de 30% dos gêneros (26) e aproximadamente 10% (362) de todas as espécies de Solanaceae do planeta (BARROSO, 1991).

Segundo Souza e Lorenzi (2008), Solanaceae é uma família com grande importância para a alimentação humana, tendo como exemplos os gêneros *Solanum* (berijela e batata), *Lycopersicon* (tomate) e *Capsicum* (pimenta). Essa família também possui espécies usadas para produção de fármacos e de drogas, como o tabaco (*Nicotiana tabacum* L. e *N. rustica* L.), a beladona (*Atropa belladonna* L.) e a mandrágora (*Mandragora officinarum* L.) (HAWKES et al., 1991), bem como uma série de plantas ornamentais.

Esse grupo possui plantas com folhas simples e alternas, glabras ou pilosas, sem estípulas. São plantas arbóreas, arbustos, ervas e raramente lianas. Seu floema é interno. Possui flores pentâmeras, com comprimento variando de 1 a 20 cm. O cálice é persistente, às vezes ampliando-se no fruto. Corola actinomorfa ou levemente zigomorfa, gamopétala, rotácea, campanulada, infundiforme, hipocrateriforme, tubulosa ou urceolada. Androceu com 2, 4 e 5 estames, com filetes livres ou parcialmente soldados entre si, com anteras poricidas (*Solanum*) ou rimosas. Gineceu constituído de ovário súpero, bilocular ou falsamente plurilocular, com muitos óvulos em cada lóculo, dois carpelos obliquamente orientados. O fruto é do tipo baga, drupa ou cápsula (SOUZA e LORENZI, 2008).

A família Solanaceae é subdividida em três subfamílias: Solanoideae (com oito tribos), Nolanoideae (com uma tribo) e Cestroideae (com cinco tribos) (D'ARCY, 1991).

## 1.2 O GÊNERO *CESTRUM*

*Cestrum*, juntamente com os gêneros *Sessea* e *Vestia* formam a tribo Cestreae G. Don. (subfamília Cestroideae), a segunda maior da família Solanaceae (SMITH e DOWNS, 1966). Os representantes desse grupo são, em sua maioria, arbustos e pequenas árvores distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais das Américas (HUNZIKER, 1976). *Cestrum* é o maior gênero de Cestreae e o terceiro maior da família (JUDD et al., 1999). Esse gênero é composto por cerca de 250 espécies, distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais das Américas (SMITH e DOWNS, 1966). O Brasil concentra o maior número de espécies de *Cestrum*, cerca de 50 (HUNZIKER, 2001), das quais seis – *Cestrum amictum* Schlecht., *C. capsulare* Carvalho & Schnoor, *C. corymbosum* Schlecht., *C. intermedium* Sendtn., *C. sendtnerianum* Mart. Ex. Sendtn. e *C. strigilatum* Ruiz & Pav – foram registradas na região da bacia do rio Tibagi, Centro-Norte do Paraná (SMITH e DOWNS, 1966).

Esse gênero possui plantas com folhas em regra solitárias, simples; flores actinomorfas; cálice penta-partido, muito mais curto que a corola; corola tubular-infundibuliforme; lobos conduplicativos em botão; cinco estames inclusos, soldados ao tubo da corola até o meio ou mais; anteras largas, bilobadas; lóculos fendidos longitudinalmente; ovário bilocular; com frutos do tipo baga; poucas sementes comprimidas e embrião reto (SMITH e DOWNS, 1966).

Algumas espécies de *Cestrum* são de importância econômica, já que fornecem a base para a extração de compostos ativos como alcalóides, esteróides, saponinas e taninos, que têm sido utilizados com fins medicinais (SCHULTES e RAFFAUF, 1991). Além disso, algumas espécies, como *Cestrum intermedium*, *C. strigilatum* e *C. capsulare*, são utilizadas em programas de reflorestamento, como aqueles desenvolvidos pelo Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE), da Universidade Estadual de Londrina. Tais espécies são de estágio inicial de sucessão florestal e possuem frutos que servem como fonte de alimento para diversos animais. Essas características favorecem o fluxo de animais entre fragmentos florestais vizinhos, possibilitando a recolonização de áreas de restauração ambiental (CAVALHEIRO et al., 2002).

### 1.3 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE SOLANACEAE E DO GÊNERO *CESTRUM*

Contagens cromossômicas realizadas por Moscone (1992) mostraram que a família Solanaceae exibe números cromossômicos básicos variando de  $x=7$  a  $x=13$ , sendo  $x=12$  o mais comum, já que este ocorre em mais de 50% das espécies estudadas até o momento. Contudo, essa amplitude cromossômica não é encontrada em todas as subfamílias de Solanaceae. Um levantamento realizado por Hunziker (2001) mostrou que a subfamília Cestroideae é a mais heterogênea do ponto de vista cariotípico, com uma amplitude de números básicos variando de  $x=7$  a  $x=13$ , assim como a família Solanaceae, seguida por Solanoideae ( $x=10$ ,  $x=12$ ,  $x=14$ ,  $x=17$ ).

Apesar da grande amplitude de números cromossômicos, análises convencionais sugerem que alguns gêneros da família têm prevalência de cariótipos simétricos, com morfologias cromossômicas similares (BERNARDELLO e ANDERSON, 1990; BERNARDELLO e HEISER, 1994; PILLEN et al., 1996; POZZOBON et al., 2006). Bernardello e Anderson (1990) e Rego et al. (2008) estudaram diversas espécies de *Solanum* e detectaram predominância cariótipos simétricos, com cromossomos pequenos (entre 1 e 3  $\mu\text{m}$ ) e pouca variação na sua morfologia. Estudos citogenéticos realizados em gêneros da tribo *Cestreae* mostraram uma constância de cariótipos com  $2n=2x=16$  (BERG e GREILHUBER, 1992; 1993a, b; FREGONEZI et al., 2006; LAS PENAS et al., 2006; FERNANDES et al., 2008), sendo que a única alteração numérica encontrada dentro da tribo foi devido à ocorrência de cromossomos Bs em algumas espécies de *Cestrum* (SÝKOROVÁ et al., 2003; FREGONEZI et al., 2004). Outra característica que chama a atenção em *Cestreae* é que os representantes dessa tribo possuem os maiores cromossomos da família, que podem medir até 14  $\mu\text{m}$  (BERG e GREILHUBER, 1992, 1993a, b; FREGONEZI et al., 2006; LAS PENAS et al., 2006).

As espécies de *Cestrum* analisadas até o presente apresentam um único número cromossômico de  $2n = 2x = 16$ , com uma predominância de cromossomos meta e submetacêntricos, exceto para o par 8, o qual é geralmente subtlocêntrico (BERG, GREILHUBER 1992, 1993a, b; SYKOROVÁ et al. 2003; FREGONEZI et al. 2004, 2006, 2007; FERNANDES et al. 2008). O gênero é conhecido por ter os maiores cromossomos da família Solanaceae, podendo medir até 14  $\mu\text{m}$  de comprimento (Fregonezi et al. 2006; Fernandes et al. 2008).

Estudos de bandeamento cromossômico em *Cestrum* têm mostrado diferentes tipos de segmentos heterocromáticos dentro da tribo *Cestreae*. Estudos realizados

por Berg e Greilhuber (1992, 1993a, b), Fregonezi et al. (2006) e Fernandes et al. (2008) em oito espécies do gênero *Cestrum* mostraram diferenças na porção heterocromática quanto à organização e localização, sendo: (I) bandas CMA<sub>3</sub> positivas grandes não relacionados às regiões organizadoras de nucléolos (RONs); (II) pequenos blocos (*dots*) CMA<sub>3</sub>/DAPI positivos em regiões intercalares, proximais ou distais (III) bandas CMA<sub>3</sub> positivas associadas às regiões organizadoras de nucléolo (RON); (IV) bandas DAPI positivas associadas às regiões sensíveis ao frio (CSRs), (V) bandas neutras C-CMA<sub>3</sub><sup>0</sup>/DAPI<sup>0</sup>; (VI) bandas DAPI positivas não associadas às CSRs; e (VII) bandas C-Giemsa/CSR/DAPI negativo.

Ao que parece, os cariótipos das espécies de *Cestrum* exibem grande conservação quando analisados por coloração convencional, mas grande variação interna, quando observados por técnicas de bandeamento cromossômico. Estas informações concordam com o fato da maior fração genomas de eucariontes mais derivados até agora estudados ser formada por DNAs repetitivos, tornando esse grupo de plantas excelente para estudos de isolamento e reconhecimento desse tipo de DNA (BERG e GREILHUBER, 1992, 1993a, b; FREGONEZI et al., 2006; FERNANDES et al., 2008).

Com relação a esse aspecto, alguns segmentos de DNA repetitivos já foram localizados por FISH nos cromossomos de *Cestrum*. O primeiro estudo foi realizado por Sýkorová et al. (2003b). Nesse trabalho, os autores realizaram hibridização *in situ*, PCR, *slot-blot* e *Southern blot*, observando que *Cestrum*, *Vestia* e *Sesseae* possuem sequências teloméricas diferentes (TTTAGGG)<sub>n</sub> daquelas presentes em *Arabidopsis*, e que são comuns para a maioria dos vegetais. A ausência deste tipo de sequência telomérica nos gêneros de *Cestreae* levou esses autores a realizar um segundo trabalho no qual propuseram a substituição da sequência telomérica padrão pela sequência 5'-T<sub>(4-5)</sub>AGCAG-3', a qual teria assumido a mesma função nos telômeros em um possível ancestral destes gêneros (Sýkorová et al., 2003a). Nesse mesmo trabalho, sequências de DNA repetitivos, entre elas uma família de minissatélites ricas em AT, foram localizadas por FISH, aparecendo dispersas e geralmente associadas a regiões “teloméricas intersticiais” em algumas espécies de *Cestrum*. Para os autores, essas sequências ricas em AT podem estar relacionadas a processos de recombinação e fusão cromossômica, os quais resultaram no aumento do genoma em *Cestrum*.

Fregonezi et al. (2006) e Fernandes et al. (2008) realizaram hibridação *in situ* com sondas de DNAr 45S e 5S em oito espécies *Cestrum* e notaram algumas tendências de distribuição equilocal das sequências entre DNAr 45S (terminais ou subterminais), com o sítio de DNAr 5S sempre ocupando a região pericentromérica do par 8, bem como a

prevalência de segmentos heterocromáticos ricos em AT e pequenos *dots* inconstantes em regiões intercalares de todas as espécies estudadas.

#### 1.4 CROMOSSOMOS B: DEFINIÇÃO E ORIGEM

Os genomas eucarióticos são compostos não somente por sequências repetitivas e por genes encontrados nos cromossomos do complemento regular ou normal, chamado de cromossomos A, mas também por elementos genéticos que não obedecem as Leis Mendelianas de herança. Os cromossomos B ou extranumerários são um exemplo desses elementos, conhecidos por variarem em tamanho, forma e composição do DNA em relação ao complemento A e, sobretudo, por não formarem sinapse com os cromossomos A (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000).

Há sugestões de que esses cromossomos sejam dispensáveis, uma vez que eles não se recombinam com nenhum dos cromossomos do complemento A, são geralmente heterocromáticos e não contêm muitos genes, exceto por sequências de DNA observados em algumas espécies (JONES; VIEGAS; HOUBEN, 2008). Estes mesmo autores reportam que os Bs podem persistir em alta frequência em determinadas populações, por não possuírem elementos essenciais ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos que os mantém. Eles também podem estar presentes ou ausentes em determinados tecidos, indivíduos ou populações (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000).

A primeira descrição desse tipo cromossômico foi feita por Wilson (1907) o qual observou a presença de cromossomos extras nas metáfases em insetos do gênero *Metapodius*. Em 1928, Randolph foi o primeiro a propor o termo “cromossomo B” para designar os cromossomos adicionais àqueles considerados de ocorrência comum, do complemento A, termo muito utilizado atualmente. O uso do termo cromossomo B é recomendado para casos em que os cromossomos extranumerários apresentam uma frequência elevada dentro da população (JONES; REES, 1982).

A origem e evolução dos cromossomos B permaneceram incertas desde sua descrição até as últimas décadas. A partir do desenvolvimento das técnicas de genética e citogenética molecular, foi obtida uma idéia mais clara a respeito dessas questões (BEUKEBOOM, 1994). Estudos citológicos e moleculares têm demonstrado que a maioria dos cromossomos B se origina do complemento A, mas alguns estudos têm demonstrado outros modelos de origem (CAMACHO, 2005).

A visão tradicional, amplamente aceita, é que os cromossomos B são derivados dos cromossomos A. Porém, esses não se recombinam com os cromossomos A e, aparentemente, parecem ter seguido a sua própria evolução. Assim, considera-se que os cromossomos B de diferentes espécies possam ter origens distintas. Essa origem pode ser intra-específica (a partir de quebras nos cromossomos autossômicos ou sexuais), ou interespecífica (transposição ou hibridação interespecífica). Porém, a origem interespecífica é considerada mais rara. Contudo, apontar a origem do DNA progenitor desses cromossomos nem sempre é possível (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Outra hipótese formulada para explicar a possível origem dos cromossomos B, indica que estes seriam formados a partir de rearranjos cromossômicos decorrentes de cruzamentos entre espécies relacionadas, e que, a partir desta origem, seguiriam sua própria evolução (BEUKEBOOM, 1994).

Os resultados dos estudos citogenéticos e moleculares têm levado à formulação de diferentes hipóteses para explicar a origem dos cromossomos B em diferentes espécies. A hipótese mais aceita é a de que eles seriam um simples produto da evolução do cariótipo padrão. Nesse caso, eles poderiam se originar de cromossomos autossômicos, polissômicos ou sexuais, de fragmentos cromossômicos resultantes de translocações Robertsonianas ou ainda da amplificação de regiões paracentroméricas de um cromossomo autossômico fragmentado (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Essa origem pode ser vista em algumas espécies de vegetais como em *Crepis capillaris* (JAMILENA; REJÓN; REJÓN, 1994) e em *Zea mays* (ALFENITO; BIRCHLER, 1993), bem como em répteis da espécie *Dicamptodon tenebrosus* (BRINKMAN et al., 2000).

Em *Brachycome dichromosomatica* os cromossomos B são formados principalmente de sequências repetitivas em *tandem* derivadas de diferentes regiões dos cromossomos A e não poderiam, portanto, terem sido originados por uma excisão simples de um único fragmento desses cromossomos (JONES; HOUBEN, 2003). Os cromossomos B de milho (PAGE; WANOUS; BIRCHLER, 2001; CHENG; LIN, 2003) e de centeio (WILKES et al., 1995 apud JONES, HOUBEN, 2003) também compartilham muitas sequências com os cromossomos A e, provavelmente, tiveram suas origens de forma semelhante à proposta para o cromossomo B de *B. dichromosomatica* (JONES; HOUBEN, 2003).

Segundo Beukeboom (1994), os cromossomos B têm evolução paralela à dos cromossomos A, e passam por algum tipo de alteração que os diferencia dentro do genoma de seus portadores. Outra trajetória para a evolução desses cromossomos seria a aquisição das características dos cromossomos B por meio de modificações nos cromossomos

sexuais (W ou Y), como proposto por Sharbel, Green e Houben (1998) e Green, Zeyl e Scharbel (1993) para sapos (*Leiopelma hochstetteri*) da Nova Zelândia.

Numa hipótese alternativa, Langdon et al. (2000), mostraram que, em *Secale cereale*, os cromossomos B podem estar restritos à tecidos ou à linhagens celulares. Por não estarem presentes em tecidos ligados à reprodução, eles provavelmente seriam gerados “de novo” a cada geração a partir do material genético celular. Poderiam também se tornar unidades independentes se envolvidos com as células da linhagem meiótica, sendo então passíveis de transmissão.

Estudos recentes indicam que, ao se originarem, esses cromossomos modificam rapidamente sua estrutura em algumas gerações, impedindo a sinapse com seu possível “progenitor” de modo a seguir suas próprias vias evolutivas, isolando-se do resto do genoma. Subsequentemente ao isolamento sináptico do cromossomo B e, independente de sua origem, processos de evolução molecular passam a ocorrer, determinando uma morfologia degenerada para estes segmentos genômicos. Desse modo, as suas características morfológicas e estruturais seriam mais um reflexo desses processos de evolução molecular do que da forma como foram originados (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000).

A importância biológica e o significado adaptativo destes cromossomos em populações naturais ainda são incertos. No entanto, é importante ressaltar que tais cromossomos já foram encontrados em fungos, animais, angiospermas, gimnospermas, pteridófitas e briófitas (JONES; HOUBEN, 2003). Estima-se que esse tipo cromossômico ocorra em 15% das espécies vivas descritas, sendo que, a cada ano, são descobertas mais ocorrências (BEUKEBOOM, 1994). Por exemplo, em vespas da espécie *Nasonia vitripenni* foi detectada a presença de cromossomo B associado ao sistema de determinação de sexo haplo-diploide (BEUKEBOOM; WERREN, 2000; PERFECTTI; WERREN, 2001). Em anura, foram encontradas 10 espécies com cromossomos B, distribuídas em seis famílias diferentes. *Dendropsophus nanus*, da família Hylidae, pode apresentar até 3 cromossomos B (MEDEIROS et al., 2006). Em peixes também foram encontrados cromossomos B em diversas ordens. Na ordem Characiformes, esse tipo cromossômico foi encontrado em mais de 30 espécies. Por exemplo, em *Astyanax scabripinnis*, foram reportadas variações no tamanho e no número de Bs, que variou de 0 a 4 (CARVALHO; MARTINS-SANTOS; DIAS, 2008). Já, em *Prochilodus lineatus*, esse número variou de 0 a 7 (CAVALLARO et al, 2000). Na ordem Siluriformes foram descritas mais de 20 espécies com Bs. Por exemplo, na espécie *Rhamdia quelen* os cromossomos B variaram tanto em números (0 a 7) como em tamanho (CARVALHO; MARTINS-SANTOS; DIAS, 2008).

Baseado em um levantamento com 979 espécies de angiospermas com cromossomos B, foi detectada uma disparidade entre sua presença em monocotiledôneas (8%) e em eudicotiledôneas (3%). Essa heterogeneidade também está presente nos grupos basais das monocotiledôneas, sendo encontrados em 27,2% das Commelinales e 4,3% do grupo irmão Zingiberales. Nas eudicotiledôneas, a distribuição de cromossomos B entre os grupos é menos heterogênea. Já, nos grupos basais de angiospermas (Nymphaeaceae, Magnoliales e Laurales), a presença desse tipo cromossômico é baixa (JONES; VIEGAS; HOUBEN, 2008). Porém, é importante destacar que esses cromossomos são mais bem estudados em plantas economicamente importantes, como *Zea mays* (CHENG e LIN, 2003) e *Secale cereale* (PUERTAS, 2002 apud JONES; HOUBEN, 2003).

A distribuição dos cromossomos B em diferentes grupos de angiospermas não é aleatória: existe uma considerável heterogeneidade entre os diferentes grupos e sua presença é correlacionada ao tamanho do genoma. Porém, não está claro porque grandes genomas favorecem a presença de Bs. Todavia, pode-se especular que grandes quantidades de DNA não-codificante podem criar um ambiente propício ou mais tolerante para a origem desses cromossomos (JONES; VIEGAS; HOUBEN, 2008).

### 1.5 CARACTERÍSTICAS E ORGANIZAÇÃO DOS CROMOSSOMOS B

Em geral, os cromossomos B diferem em tamanho e posição do centrômero em relação aos cromossomos A, de modo que são facilmente identificados em células mitóticas. Em apenas alguns casos os cromossomos supranumerários encontrados foram indistinguíveis dos cromossomos do complemento A. Por outro lado, cromossomos B com tamanho muito pequeno (micro) também foram encontrados em alguns organismos (JONES; VIEGAS; HOUBEN, 2008).

Beukeboom (1994) caracterizou os cromossomos B como: (i) sendo morfológicamente diferentes dos cromossomos A (geralmente menores), (ii) herdados a partir de uma segregação não mendeliana, (iii) raramente portadores das regiões organizadoras do nucléolo – RON, (iv) muitas vezes não exibindo não-disjunções na anáfase da mitose e variando entre órgãos do mesmo indivíduo, (v) causadores de redução da fecundidade e do crescimento quando presente em grande quantidade e (vi) sem genes com efeitos importantes.

Na década de 1990 foram realizados trabalhos envolvendo isolamento, clonagem e sequenciamento de DNAs repetitivos dos cromossomos B em várias espécies. As primeiras análises demonstraram que os cromossomos B continham sequências de DNA

semelhantes às encontradas nos cromossomos do complemento A. Algumas destas sequências encontradas se mostraram específicas para os cromossomos B e outras eram compartilhadas com os cromossomos A (BEUKEBOOM, 1994, CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000).

Os cromossomos B são total ou parcialmente constituídos por famílias de DNA repetitivo (CAMACHO, 2005). Cheng e Lin (2003) isolaram 19 sequências de DNA repetitivos microdissecados de um cromossomo B de milho, das quais 18 apresentaram homologias com cromossomos do complemento A de regiões não codificantes e uma sequência B-específica. Além disso, foi demonstrada a presença de genes de RNAr, como em *Brachycome dichromosomatica* (DONALD et al., 1995) e *Crepis capillaris* (JAMILENA; REJÓN; REJÓN, 1994); elementos necessários para sobrevivência do próprio cromossomo B; alguns prováveis genes recém-descobertos; um transcrito hipotético e um oncogene em algumas espécies de plantas e animais (JONES; VIEGAS; HOUBEN, 2008). Aparentemente, a maioria dos genes encontrados não tem sua expressão confirmada. Contudo, Camacho, Sharbel e Beukeboom (2000) afirmam que a inatividade dos cromossomos B não deve ser somente considerada em termos de não codificação ou de não transcrição do DNA, mas também em termos da formação de complexos do DNA com proteínas ou com outras moléculas orgânicas, as quais poderiam afetar e serem afetadas pela estrutura física da cromatina.

Em alguns casos, os cromossomos B são difíceis de serem encontrados entre os indivíduos de uma população; em outros, são detectados baixos números de cromossomos B por indivíduo (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Por outro lado, existem populações onde são encontrados indivíduos apresentando grande quantidade de cromossomos B. Em plantas, foram encontrados 22 cromossomos B em *Centaurea scabiosa* (FRÖST, 1957) e 26 em *Fritillaria japonica* (NODA, 1975), 34 em *Zea mays*, (JONES; REES, 1982) e 31 em *Gibasis karwinskyana* (KENTON, 1991). Estes valores elevados são provavelmente indicativos de uma alta tolerância para estes elementos extras.

Outro fato relevante é a variação numérica de cromossomos B que pode ser observada em diferentes indivíduos de uma mesma espécie. Essa variação pode ser vista em *Silene maritima*, onde são encontrados de 0 a 15; em *Brachycome lineariloba*, de 0 a 22, e em *Zea mays*, onde muitas vezes podem ser encontrados até 34 cromossomos B (JONES; VIEGAS; HOUBEN, 2008). Na maioria dos casos, o número desses cromossomos por indivíduos não é alto e a probabilidade de se encontrar indivíduos, plantas ou animais, com mais de quatro Bs torna-se mais difícil (CAMACHO, 2005).

Os cromossomos B parecem ser responsáveis por alguns efeitos nos indivíduos que os possuem e existem evidências de que indiretamente eles podem afetar processos celulares e fisiológicos, tanto em plantas quanto em animais (CAMACHO et al., 2004). Tem sido verificado que os cromossomos B podem interferir em características críticas para as espécies, como o pareamento entre homólogos do complemento A, a frequência de quiassmas, a fertilidade dos gametas, bem como o aumento no limite de transcrição de RNAs ribossômicos (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Nesses casos, os cromossomos supranumerários poderiam conferir uma desvantagem adaptativa para a espécie (GUERRA, 1988). Além disso, provavelmente devem existir mecanismos capazes de controlar o número de cromossomos B em determinados órgãos ou de favorecer a sua transmissão gamética, mesmo se os mesmos possuírem genes que determinem alterações fenotípicas (CAMACHO, 2005).

#### 1.6 COMPORTAMENTO DOS CROMOSSOMOS B NA MEIOSE

Até o momento, os motivos pelos quais os cromossomos B são mantidos em populações naturais permanecem pouco compreendidos. Contudo, os mecanismos de transmissão e acúmulo desses cromossomos parecem estar um pouco mais claros. Tais mecanismos estão relacionados a não-disjunções ocorridas durante a gametogênese e a fecundação preferencial dos gametas carregando cromossomos supranumerários (BEUKEBOOM, 1994). Esse tipo de acúmulo gera uma tendência de aumento no número de cromossomos B nos gametas, por uma transmissão não mendeliana (LACADENA, 1996).

Como visto no parágrafo anterior, esses cromossomos parecem não seguir o padrão de segregação mendeliana, tendo um comportamento instável durante as divisões mitóticas ou meióticas e, geralmente, apresentando não-disjunção na anáfase (JONES; VIEGAS; HOUBEN, 2008). A variedade de processos incluindo distorção de segregação é usualmente conhecida como “mecanismos de acumulação” ou simplesmente “*drive*”, que pode ocorrer em qualquer estágio durante o ciclo de vida, podendo ser pré-meiótico, meiótico ou pós-meiótico (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000).

Em alguns aspectos, os cromossomos B são bastante similares aos cromossomos sexuais, apresentando processos de condensação/descondensação durante o ciclo meiótico e formação de univalentes. Esses aspectos podem sugerir que os processos de estruturação de ambos os tipos cromossômicos poderiam ser intimamente relacionados.

Porém, o comportamento meiótico é variável entre os diferentes cromossomos B, bem como entre os indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes (CAMACHO, 2005).

Apesar da existência de trabalhos publicados relatando a ocorrência e a frequência dos cromossomos B em fungos, plantas e animais, pouco se sabe sobre seu comportamento meiótico. Todavia, é sabido que durante a meiose de diploides, cada cromossomo A se pareia com seu homólogo para formar um bivalente na primeira divisão, com base nas leis de segregação mendeliana. Porém, os cromossomos B nem sempre formam pares, mantendo um comportamento meiótico univalente. Dessa forma, os univalentes são livres para segregarem preferencialmente para um pólo meiótico específico (CAMACHO, 2005).

O processo de acumulação pré-meiótica acontece devido a não-disjunção do cromossomo B; assim, as duas cromátides são direcionadas para o mesmo pólo, ocorrendo um aumento no número de cromossomos B em células germinativas durante o desenvolvimento, mantendo esses cromossomos em seus descendentes (CHIAVARINO et al., 2000; CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Esses mecanismos de acúmulo de cromossomos supranumerários durante a meiose dependem da assimetria funcional do produto meiótico. Num processo normal de meiose em fêmeas, uma das duas células resultantes da divisão meiótica será inviável, sendo denominada de corpúsculo polar. Logo, os cromossomos de um complemento normal têm 50% de chance de serem eliminados dentro do corpúsculo polar. Porém, os cromossomos B podem controlar esse processo, migrando preferencialmente para pólos meióticos viáveis, assim escapando da eliminação (CAMACHO, 2005).

Segundo Beukeboom e Werren (2000) e Perfectti e Werren (2001) nas vespas da espécie *Nasonia vitripennis*, foi identificado que o cromossomo B pode interferir em muitos processos celulares e fisiológicos. Em algumas populações dessa espécie, o cromossomo B está associado ao sistema de determinação de sexo haplo-diplóide e interfere na proporção entre machos e fêmeas nascidas.

Mecanismos de acúmulo de cromossomos supranumerários podem ser observados também por não-disjunção na mitose pós-meiótica. Em plantas, isso é influenciado pela maturação gametofásica e, dessa forma, as cromátides B irmãs vão para o núcleo gamético (CHIAVARINO et al., 2000). Outras plantas, como o milho, mostram esse mesmo mecanismo somente na androsporogênese (CARLSON; ROSEMAM, 1992). Porém, em alguns casos, eles são transmitidos devido à fertilização com grãos de pólen contendo cromossomos B (ROMAN, 1948).

Mecanismos gênicos controlando a taxa de transmissão de Bs já foram identificados em milho (GONZÁLES-SÁNCHEZ et al., 2003) e arroz (PUERTAS et al., 1998). Em arroz, o controle da taxa de transmissão é realizado pelo próprio B; já em milho, o mecanismo é muito mais complexo, sendo realizado por genes autossômicos. Em ambas as espécies, linhagens com alta e baixa transmissão de Bs já foram identificadas (JONES e HOUBEN, 2003).

Estudos envolvendo a distribuição e ainda a manutenção dos cromossomos B revelam informações interessantes (WHITE, 1973 apud BAKKALI; PERFECTTI; CAMACHO, 2002). Dois modelos para justificar a manutenção desses cromossomos no cariótipo de populações naturais foram descritos: o modelo parasítico e o modelo heterótico. No modelo parasítico, os cromossomos B conservam-se na população por seus próprios meios de acumulação. Sob esse ângulo, esses cromossomos são considerados egoístas ou parasitas, já que sua permanência na população não traz nenhum tipo de vantagem ao seu portador (WRITE, 1973 apud CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). A transição para a neutralidade do “parasitismo” frequentemente é acompanhada pela heterocromatinização dos cromossomos B, podendo esta ser uma trajetória comum na evolução dos cromossomos supranumerários (BAKKALI; PERFECTTI; CAMACHO, 2002). Já, o modelo heterótico, propõe que os cromossomos se manteriam na população graças a algumas vantagens adaptativas que proporcionariam aos seus portadores, quando em números reduzidos no cariótipo. Contudo, o modelo parasítico ainda é considerado o mais aceito (WRITE, 1973 apud CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000).

### 1.7 CROMOSSOMOS B EM SOLANACEAE E *CESTRUM*

Estudos sobre os cromossomos B na família Solanaceae são escassos, assim como em outras espécies arbóreas tropicais (SÝRKOROVÁ et al., 2003). Cromossomos B acrocêntricos foram encontrados em *Cestrum parqui* e no híbrido entre *C. parqui* × *C. aurantiacum*. Esses cromossomos apresentaram sítios de DNA ribossômico 45S e 5S e um segmento de 405 pares de base (pb) composto pelo minissatélite de 9-10 pb BR23 (5'-A<sub>4</sub>-<sub>5</sub>CTGCT-3') (SÝRKOROVÁ et al., 2003).

Em *Cestrum strigilatum* e *C. intermedium* também foram encontrados cromossomos supranumerários acrocêntricos (FREGONEZI et al., 2004). Os cromossomos B dessas espécies são similares em tamanho quando observados por coloração convencional. Porém, apresentaram diferenças nos padrões de bandas C-Giemsa, bandas CMA<sub>3</sub>/DAPI, além

de apresentarem um elemento da superfamília do retroelemento *Ty3-gypsy* (FREGONEZI et al., 2004 e 2007). Fregonezi et al. (2004) observaram uma variação intra-individual no número de cromossomos B, o que provavelmente indicaria instabilidade mitótica.

Outras diferenças foram vistas nessas espécies em relação ao tamanho e localização da heterocromatina, que se mostrou mais abundante em *C. intermedium* do que em *C. strigilatum*. Essas diferenças poderiam ser justificadas pelo aparecimento de sequências de DNA repetitivo, seguido de rearranjos no DNA nesses cromossomos B, posteriormente à sua formação. Ou então, uma origem independente desses cromossomos nessas espécies, sendo que as similaridades na forma e no tamanho seriam apenas uma coincidência. Em *C. intermedium* foi também observada a presença de heterocromatina não sensível ao frio no B (FREGONEZI et al., 2004).

Esses trabalhos em *Cestrum*, além de demonstrarem a presença de cromossomos B nesse gênero, mostram a importância dos estudos sobre DNA repetitivo na formação desses cromossomos. Todavia, pouco se conhece a respeito da distribuição e da transmissão desses cromossomos nessas espécies (FREGONEZI et al., 2004).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar por meio de citogenética convencional, citoquímica e de microscopia eletrônica, a frequência e a transmissão dos cromossomos B, bem como a sua interferência na viabilidade polínica em *Cestrum strigilatum*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar, por meio de citogenética convencional, a transmissão dos cromossomos B em células meióticas de *Cestrum strigilatum*;
- Estudar, por meio de citogenética convencional, a frequência de cromossomos B na meiose I e na meiose II de *C. strigilatum*;
- Verificar a viabilidade dos grãos de pólen de *C. strigilatum* em indivíduos com e sem cromossomos B, por meio de coloração de Alexander;
- Verificar a viabilidade dos grãos de pólen de *C. strigilatum* em indivíduos com e sem cromossomos B por meio de microscopia eletrônica.

### 3 CROMOSSOMO B EM *CESTRUM STRIGILATUM* (SOLANACEAE): COMPORTAMENTO MEIÓTICO E VIABILIDADE DOS GRÃOS DE PÓLEN

Carolina Cristina Quintas<sup>1</sup>, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade<sup>2</sup>, Rogério  
Fernandes de Souza<sup>3</sup> e André Luís Laforga Vanzela<sup>1\*</sup>

#### Resumo

Os cromossomos B são reconhecidos por terem comportamento univalente e segregação não-mendeliana, além de serem pobres em genes e ricos em DNA repetitivo. Podem estar presentes ou ausentes em diferentes células, indivíduos, populações e espécies, e são dispensáveis para a sobrevivência do organismo que os possuem. No entanto, como na maioria dos relatos desse tipo cromossômico, pouco é conhecido sobre a sua forma de transmissão. Neste trabalho foi investigada a frequência e a distribuição do B na androsporogênese de *Cestrum strigilatum* (Solanaceae), bem como sua transmissão à prole. Os dados mostraram que o número de células com cromossomos B decresce durante a meiose masculina, com algumas indicações sobre a eliminação de Bs na tétrade, na forma de microandrosporócitos. Esses dados sugerem a possibilidade de manutenção dos Bs via transmissão feminina. As comparações de viabilidade polínica em plantas portadoras ou não de Bs indicam que a sua presença ou ausência parece não afetar a viabilidade dos grãos de pólen.

**Palavras-chave:** Androsporogênese, Cromossomos supranumerários, *Drive*, Viabilidade polínica.

#### 3.1 INTRODUÇÃO

Os cromossomos B geralmente diferem daqueles do complemento normal (A) na forma, tamanho e composição de DNA, apesar de provavelmente sua origem ser a partir dos cromossomos A. É amplamente aceito que os cromossomos B podem estar presentes ou ausentes em diferentes indivíduos de uma população, que esses não possuem herança mendeliana convencional e que eles não se pareiam ou recombinam com qualquer um dos cromossomos do complemento A (Jones e Houben, 2003; Camacho; Sharbel;

---

<sup>1</sup> Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brasil Fone / Fax: +55 43 3371-4509 (e-mail: andrevezela@uel.br).

\* Correspondência: andrevezela@uel.br, Fone / Fax: +55 43 3371 4855

<sup>2</sup> Laboratório de Microscopia Eletrônica e Micro-análise, PROPPG da Universidade Estadual de Londrina, 86051990, Londrina, PR, Brasil (e-mail: cgtardeli@uel.br)

<sup>3</sup> Laboratório de Bioinformática, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brasil (e-mail: rogfs@uel.br)

Beukeboom, 2000). A importância biológica e o significado adaptativo destes cromossomos em populações naturais são incertos, embora eles tenham sido relatados em várias espécies vegetais (Jones, Viegas e Houben, 2008). Efeitos fenotípicos atribuídos à presença de um ou poucos cromossomos B são raros, mas existem relatos associando esses cromossomos a eventos diferentes em grupos distintos de plantas. Por exemplo, os Bs podem ter um efeito negativo sobre a viabilidade do pólen quando presentes em elevado número (González-Sánchez et al., 2004) ou influenciar a frequência de quiasmas em arroz (Jones e Rees, 1982). Também podem atuar como agentes diploidizantes para o pareamento cromossômico em aloploplóides (Jenkins, 1986).

Os mecanismos para a manutenção dos Bs em populações naturais ainda são pouco compreendidos. No entanto, a transmissão e o acúmulo desses cromossomos são os processos mais conhecidos (Jones e Houben, 2003). A ideia de um comportamento parasítico dos cromossomos supranumerários associados com a transmissão por “*drive*” tem sido muito bem aceita. Esse tipo de transmissão pode ocorrer quando os gametas acumulando Bs, mais do que o esperado em modelos mendelianos, participam eficientemente da fecundação (Beukeboom, 1994). Esse acúmulo ocorre provavelmente devido a não-disjunção dos cromossomos B na meiose II ou também na mitose pós-meiótica (Jones e Houben, 2003). Eventos de fertilização preferencial entre gametas contendo Bs, bem como de controle genético de transmissão foram relatados previamente em outros organismos (Beukeboom, 1994; Puertas et al, 1998; González Sánchez et al., 2003).

Independente das espécies em que ocorrem, e da organização interna dos mesmos, é aceito que as variações na frequência dos Bs acontecem devido à não-segregação na meiose e mitose (Camacho et al., 2000). No entanto, para se compreender melhor o processo de não-segregação, são necessários estudos adicionais a fim de se determinar os fatores que regulam e interferem com a cinética dos Bs, bem como os seus possíveis efeitos sobre as características reprodutivas das espécies hospedeiras. O fato dos Bs não se parearem com os cromossomos do complemento A e de apresentarem um comportamento não-mendeliano, sugere que outros fatores podem estar interferindo na sua cinética ao longo das divisões celulares. Uma possibilidade é a modificação pós-traducional das proteínas cromossômicas. Em plantas, alguns estudos relataram que a fosforilação da histona H3 na Serina 10 (H3/Ser10) pode estar relacionada a eventos críticos da divisão celular, tais como a condensação cromossômica (Hendzel et al., 1997), a coesão entre cromátides irmãs na metáfase I (Kaszas; Cande, 2000) e a segregação de cromátides irmãs na segunda fase da meiose (Manzanero et al., 2000). De acordo com Fernandes et al. (2008), os cromossomos B

de *C. strigilatum* exibem super fosforilação nas H3/Ser10 na primeira fase da meiose e não na segunda. Isto poderia ser um dos fatores que os tornariam instáveis na meiose II.

Embora raros em Solanaceae, das vinte espécies do gênero *Cestrum* até agora investigadas citogeneticamente, cromossomos B foram relatados em quatro delas: *Cestrum parqui* e o híbrido *C. parqui* × *C. aurantiacum* (Sýkorová et al, 2003), *C. intermedium* e *C. strigilatum* (Fregonezi et al., 2004, 2006). Estes estudos forneceram informações preciosas sobre a composição diferencial desses cromossomos, como a ocorrência de diferentes famílias de DNA repetitivos, tais como sequências ricas em AT minissatélite; bandas C-Giemesa; bandas C-CMA<sub>3</sub>/DAPI e retroelementos *Ty3-gypsy*. No entanto, há pouca informação sobre a distribuição e transmissão de Bs nessas espécies, exceto por variações intra e inter-individuais no número de cromossomos B e sua eliminação nos tecidos somáticos (Fregonezi et al., 2004, 2007).

O objetivo desse trabalho foi aumentar os conhecimentos sobre o comportamento, a transmissão e a distribuição de cromossomos B na meiose de *Cestrum strigilatum*. Foi determinada a frequência de células com Bs nas meioses I e II (MI e MII) bem como a frequência e a distribuição de Bs na progênie de diferentes indivíduos mantidos em condições naturais. Também foi realizada uma comparação da viabilidade do pólen entre plantas com e sem cromossomos B.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de dois indivíduos de *Cestrum strigilatum* contendo cromossomos B foram coletadas em 2002, em São Jerônimo da Serra, Estado do Paraná no Sul do Brasil (23° 43'37"S, 50° 43'07"W), sendo as exsiccatas depositadas no herbário da FUEL. Sementes foram germinadas e as mudas cultivadas no Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE), da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil. Cinco mudas contendo Bs e três sem Bs, selecionadas aleatoriamente, foram transferidas para jardim arborizado localizado no LABRE, sendo plantadas a uma distância de 2 a 20 metros umas das outras, onde cresceram em condições naturais. Após os arbustos entrarem em fase reprodutiva, várias anteras foram coletadas para análise meiótica. Além disso, sementes provenientes de plantas portadoras de cromossomos B foram colocadas para germinar a fim de se determinar a transmissão dos Bs para a progênie por uma análise mitótica a partir das raízes.

Anteras jovens de diferentes ramos dos cinco arbustos de *C. strigilatum* contendo Bs foram coletadas e diretamente fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v / v) por 12 horas e armazenadas a -20 °C até o uso. As amostras foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em 1M HCl a 60 °C por 5 minutos. Posteriormente, as anteras foram dissecadas e esmagadas em uma gota de ácido acético 45%, as lamínulas foram removidas após congelamento em nitrogênio líquido e as lâminas coradas com Giemsa 2%. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck). Os meiócitos foram examinados para a presença e ausência de Bs sendo estes agrupados em: (i) meiose I (MI) sem Bs, (ii) MI com Bs, (iii) meiose II (MII) sem Bs e (iv) MII com Bs. As proporções de cromossomos B na MI foram obtidas a partir da divisão do número de células com B em MI pelo número total de células contadas em MI. O mesmo foi aplicado para a ocorrência de cromossomos B na MII.

Para análise mitótica, as raízes foram pré-tradas com colchicina 0,05% por 4 horas à temperatura ambiente, fixadas em etanol/ácido acético (3:1, v:v). As raízes foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1M. O meristema radicular foi dissecado em uma lâmina sob uma gota de etanol 45% e corado com Giemsa 2%.

A viabilidade dos grãos de pólen foi realizada de forma comparativa entre os cinco indivíduos portadores de cromossomos B e os três que não os possuíam, usando a coloração de Alexander (1969). Nesse caso, cinco flores de cada indivíduo na pré-antese (1-2 dias antes da abertura das flores) foram coletadas e suas anteras abertas em uma gota com Alexander 0,5 M para o esmagamento e coloração dos grãos de pólen de forma simultânea. As amostras foram imediatamente cobertas com uma lamínula e montadas de forma semi-permanente com esmalte comercial. A coleta de imagens e a preparação das lâminas foram realizadas no mesmo dia. Foram considerados viáveis os grãos de pólen que exibiram uma coloração intensa do citoplasma, e inviáveis aqueles com citoplasma reduzido ou ausente.

A forma dos grãos de pólen dessas mesmas plantas também foi utilizada para avaliar o estado viável e não viável. Para tal, eles foram avaliados via coloração de Alexander e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Para a coloração de Alexander foram coletadas cinco flores de cada indivíduo na pré-antese (1-2 dias antes da abertura das flores) e suas anteras abertas em uma gota com Alexander 0,5 M para o esmagamento e coloração dos grãos de pólen de forma simultânea. As amostras foram imediatamente cobertas com uma lamínula e montadas de forma semi-permanente com esmalte comercial.

Para a MEV, anteras foram abertas e desidratadas em série alcoólica, secas ao ponto crítico e cobertas com uma fina camada de ouro. As análises foram feitas em um

Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 200. Tanto na coloração de Alexander como na MEV, grãos murchos e túrgidos foram tomados como inviáveis. Todas as imagens adquiridas foram otimizadas para melhor contraste e brilho com o software Image iGrafx.

A coloração com FDA, para verificar a morfologia e a integridade dos grãos de pólen, foi realizada segundo Heslop-Harrison e Heslop-Harrison (1970).

Os dados obtidos foram submetidos a um teste t de Student, com  $p \leq 0,05$ , a fim de se determinar a ocorrência de diferenças estatisticamente significativas.

### 3.3 RESULTADOS

A análise convencional mostrou que o cromossomo B de *Cestrum strigilatum* exibe um comportamento univalente na meiose I e que a sua localização é, em geral, distante dos cromossomos A na primeira e na segunda fase da meiose. Esse comportamento é devido a falhas na orientação, tornando ineficiente sua segregação para os pólos (Figuras 1A-D). As cromátides irmãs do cromossomo B apresentaram comportamento semelhante ao dos cromossomos do complemento A, uma vez que essas aparecem separadas (Figuras 1C-D). Houve uma tendência dos Bs serem eliminados no final da androsporogênese, na transição da telófase para a tétrade (Figuras 1E-G). Contudo, foram observados grãos de pólen com e sem Bs (Figuras 1H-I).

Foram analisados 9.982 meiócitos dos 5 indivíduos portadores de cromossomos B (Tabela 1). Os resultados mostraram que, enquanto que na MI cerca de 35,60% das células analisadas exibiram cromossomos B, na MII estes foram encontrados em apenas 13,75% delas. Já, a análise da presença de Bs na progênie de plantas portadoras desses cromossomos indicou que, das 360 sementes germinadas, 74,16% apresentaram um cromossomo B (Tabela 2). Apenas um descendente exibiu dois cromossomos B (Tabela 2).

Para determinar se a presença de cromossomos B afetou a eficiência reprodutiva em *Cestrum strigilatum*, foi feita uma comparação da viabilidade de pólen entre os portadores e não portadores de Bs. Um total de 37.315 grãos de pólen foi analisado a partir de 40 flores. Neste caso, foram considerados viáveis aqueles grãos com a forma arredondada (Figuras 2A-C) e com citoplasma evidentemente corado após o teste de Alexander (Figuras 2A, imagem da direita). Os grãos de pólen sem citoplasma e evidentemente murchos foram considerados inviáveis (Figuras 2A, esquerda e D). Os dados mostraram uma viabilidade polínica baixa em ambos os grupos de plantas. Nos indivíduos com Bs, esta se situou em  $12,10\% \pm 0,058$  e naqueles sem Bs, em  $11,70\% \pm 0,050$ .

As análises do formato e da integridade da parede de ecsina dos grãos de pólen por meio de coloração por FDA (Fig. 2B) mostraram que apenas aqueles considerados viáveis pela coloração de Alexander apresentaram a parede de ecsina íntegra. Os resultados obtidos pela técnica de microscopia eletrônica de varredura também foram semelhantes, indicando que somente os grãos polens caracterizados como viáveis apresentaram indícios de germinação (Fig. 2C). Em nenhuma das micrografias analisadas foram observados grãos caracterizados como inviáveis em processo de germinação (Fig. 2 D).

### 3.4 DISCUSSÃO

Nesse estudo, o cromossomo B de *Cestrum strigilatum* foi facilmente reconhecido devido ao seu tamanho reduzido (Fregonezi et al., 2004 e Fernandes et al., 2008), que é cerca de três vezes menor do que os dos outros cromossomos, bem como pelo seu comportamento univalente durante a meiose, aparecendo na maioria das células posicionado para o lado e distante dos bivalentes do complemento A.

A análise meiótica sugere que, em *Cestrum strigilatum*, há uma eliminação de cromossomos B durante a androsporogênese, já que a sua frequência foi sempre maior na primeira fase da meiose em relação à segunda, quando todos os indivíduos são considerados. Contudo, não se observou uma relação positiva entre a viabilidade dos grãos de pólen e a presença ou ausência de cromossomos B nas plantas-mãe. Assim, nossos resultados indicam que os cromossomos B podem ter um efeito neutro sobre a viabilidade do pólen em *C. strigilatum*. Por outro lado, 74,16% dos descendentes das plantas portadoras de Bs apresentaram estes cromossomos (Tab. 2). De acordo com Jones e Rees (1982), Beukeboom (1994) e Camacho et al. (2000), o acúmulo de Bs pode ser explicado por mecanismos como a não-disjunção durante a gametogênese e a fertilização preferencial entre gametas carregando Bs. Dessa forma, nossos resultados apontam para três possibilidades: (i) a eliminação de Bs durante a androsporogênese não garantiria uma total ausência de B nos grãos de pólen formados, (ii) a fecundação ocorreria preferencialmente por grãos de pólen contendo Bs, mesmo que estes se encontrem em minoria, ou (iii) a eliminação de Bs na androsporogênese seria compensada pela sua transmissão pelos gametas femininos.

Embora nesse experimento não tenha sido possível estabelecer a presença e/ou ausência de cromossomos B nos grãos de pólen, as evidências de eliminação desses cromossomos na meiose masculina de *C. strigilatum* (Figura 1I), juntamente com a ocorrência de apenas um descendente contendo dois cromossomos B, sugerem que estes podem ser

mantidos em grande parte por transmissão feminina. Entretanto, não se deve descartar a possibilidade de ter ocorrido, nesse caso, uma transmissão de um B por um gameta masculino e outro por um gameta feminino, ou ainda uma transmissão por um gameta masculino ou feminino contendo dois cromossomos B provenientes de uma meiose em que não tenha ocorrido a separação das suas cromátides irmãs.

Uma maneira de verificar a transmissão materna do cromossomo B seria por meio de cruzamentos controlados. Estudos de transmissão de cromossomos B são facilitados quando as espécies possuem flores unissexuais e ciclo de vida curto, uma vez que eles favorecem experimentos desse tipo de experimento (González-Sánchez et al., 2003). No entanto, *C. strigilatum* possui flores hermafroditas, fecundação cruzada e flores muito delicadas, além de um ciclo de vida relativamente longo, quando comparado ao milho e arroz, onde experimentos deste tipo foram realizados com sucesso. Assim, cruzamentos controlados utilizando amostras com e sem Bs em *Cestrum* são mais difíceis. De acordo com Jones e Houben (2003), o “drive” de transmissão de cromossomos B em dicotiledôneas ocorre na meiose feminina, como demonstrado em *Lilium callosum* - Liliaceae. González-Sánchez et al. (2003) realizaram fertilização induzida em milho e observaram que o acúmulo de Bs ocorre na androsporogênese, mas em arroz, Jones e Rees (1982) relataram que a transmissão ocorre em ambos, via gino e androsporogênese.

Dessa forma, seria interessante descobrir se os Bs estariam ou não presentes nos grãos de pólen viáveis, bem como em quais proporções. Uma forma de realização desse tipo de estudo seria a utilização da técnica de hibridização *in situ* com sondas específicas em toda a meiose até o produto final (grãos de pólen), bem como na ginospogênese, algo que ainda não foi realizado em *Cestrum*.

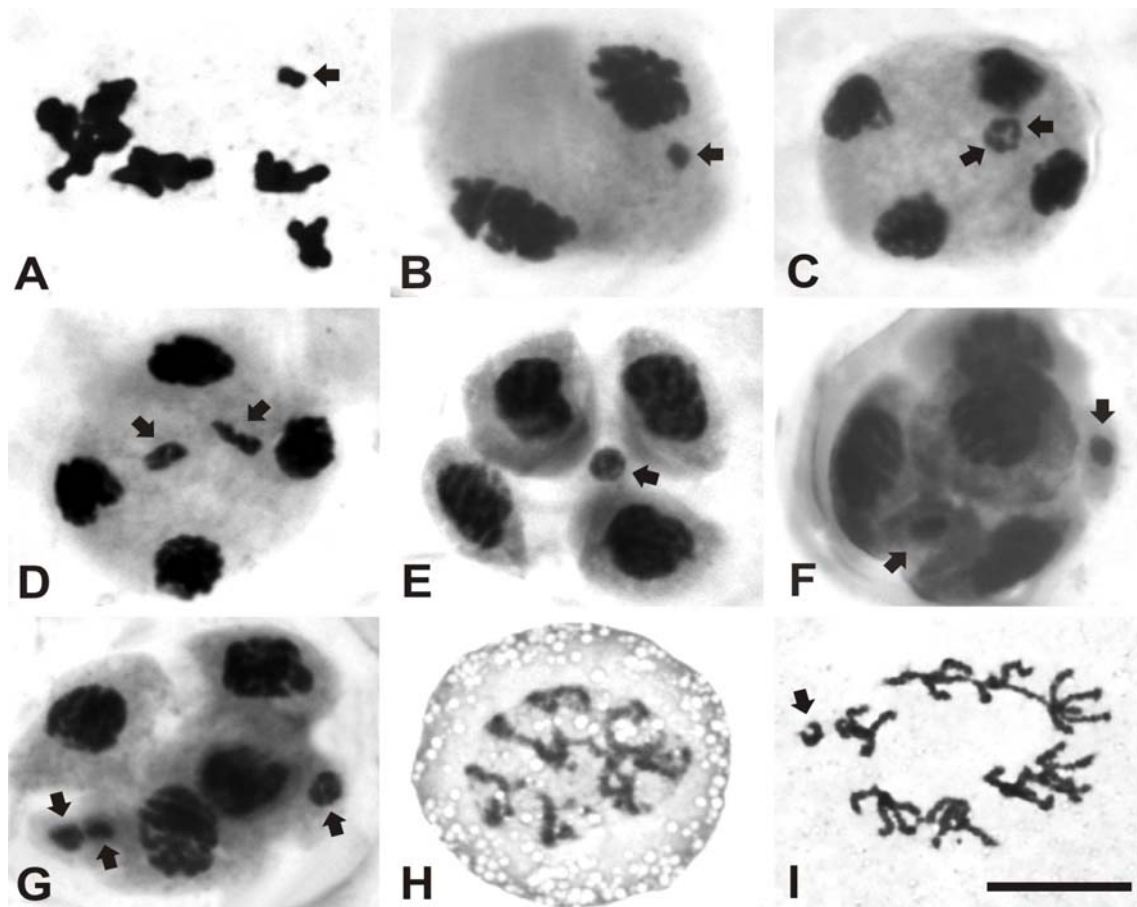
### 3.5 CONCLUSÃO

Existem evidências de eliminação dos cromossomos B na meiose masculina em *C. strigilatum*. Entretanto, uma elevada incidência de descendentes com cromossomos Bs, todos provenientes de plantas portadoras desses cromossomos, indica presença de algum mecanismo de transmissão, provavelmente via meiose feminina. A presença/ausência desses cromossomos nessas plantas não parece influenciar a viabilidade dos grãos de pólen.

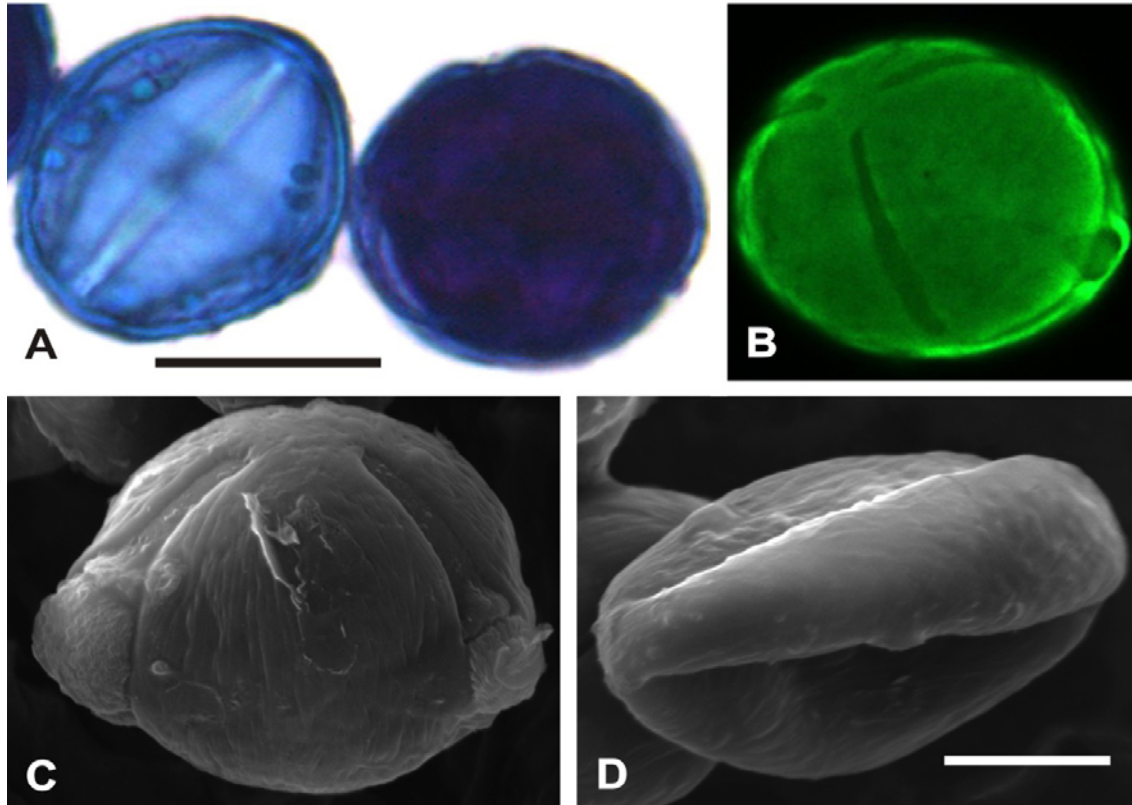
### **Agradecimentos**

Os autores agradecem as agências brasileiras: Fundação Araucária, IAP-SEMA, CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

**Figura 1** - Etapas da meiose de *C. strigilatum* com cromossomos B. **A)** Metáfase I. A seta indica um cromossomo B distante do complemento A. **B)** Telófase I. A seta indica um cromossomo B. **C)** Telófase II. As setas mostram um B com duas cromátides. **D)** Telófase II. As setas mostram dois Bs, cada um com duas cromátides. **E)** Tétrade com um microandrosporócito, seta. **F)** Tétrade com dois microandrosporócitos, setas. **G)** Tétrade com três microandrosporócitos, setas. **H)** Grão de pólen íntegro sem cromossomo B evidente. **I)** Grão de pólen rompido. A seta evidencia um cromossomo B. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 2.** Comparação entre grãos de pólen viáveis e inviáveis de *C. strigilatum*, obtidos após a coloração com Alexander, FDA e tratados para Microscopia Eletrônica de Varredura. **A)** O grão de pólen viável (direita) possui um aspecto turgido, com citoplasma corado, enquanto o grão de pólen inviável (esquerda) aparece murcho, com citoplasma reduzido ou ausente. **B)** Coloração FDA evidenciando a integridade da ecsina e o formato triporado do grão. **C)** Eletromicrografia de grão de pólen viável, apresentando início de germinação do tubo polínico. **D)** Eletromicrografia de grão de pólen inviável. Barra = 10 $\mu$ m.



## TABELAS

**Tabela 1** - Número e proporção de cromossomos B em dois estágios da meiose para 5 plantas de *Cestrum strigilatum* (Solanaceae) portadoras desses cromossomos.

Estágio	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5	Total	Frequência(%)
MI com Bs	364	378	454	306	153	1655	35,60
MI sem Bs	654	483	555	986	316	2994	64,40
<b>Total</b>	<b>1018</b>	<b>861</b>	<b>1009</b>	<b>1292</b>	<b>469</b>	<b>4649</b>	-
MII com Bs	110	124	104	210	185	733	13,75
MII sem Bs	1067	611	376	1058	1488	4600	86,26
<b>Total</b>	<b>1177</b>	<b>735</b>	<b>480</b>	<b>1268</b>	<b>1673</b>	<b>5333</b>	-

MI = meiose I e MII = meiose II

**Tabela 2.** Frequência de descendentes dos indivíduos portadores e não portadores de Bs, contados a partir de células de raízes das sementes originadas dos indivíduos com cromossomos B.

Amostras	sem B	com B	Total	Frequência de Bs (%)
Planta 1	50	129	179	72,06
Planta 2	6	28	34	82,35
Planta 3	25	49	74	66,22
Planta 4	12	61	73	83,56
<b>Total</b>	<b>93</b>	<b>267</b>	<b>360</b>	<b>74,16</b>

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, v, 44, p. 117-22, 1969.
- ALFENITO, M. R.; BICHLER, J. A. Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. **Genetics**, v.135, p. 589-597, 1993.
- BAKKALI, M.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J.P.M. The B-chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa: II. Parasitic and neutralized B1 chromosomes **Heredity**, v. 88, p. 14–18, 2002.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v. 3: Brasil. Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- 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 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 regions and heterochromatin in *Cestrum aurantiacum* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 185, p. 259-273.1993b.
- BERNARDELLO, L.M.; ANDERSON, G.J. Karyotypic studies in *Solanum* section *Basarthrum* (Solanaceae). **American Journal of Botany**, v. 77, p. 420-431, 1990.
- BERNARDELLO, L.M.; HEISER, C.B.;PIAZZANO, M. Karyotypic studies in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae). **American Journal of Botany**, v. 81, p. 95-103, 1994.
- BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. **Heredity**, v. 3. n. 73, p. 328-336, set. 1994.
- BEUKEBOOM, L. W.; WERREN, J. H. The paternal-sex-ratio (PSR) chromosome in natural populations of *Nasonia* (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Journal of Evolution Biology**, v. 13, p. 967-975, 2000.
- BRINKMAN, J.N.; SESSIONS, S.K.; HOUBEN, A.; GREEN, D.M. Structure and evolution of supernumerary chromosomes in the Pacific giant salamander, *Dicamptodon tenebrosus*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 88, p. 124- 129, 2000.
- CAMACHO, J.M.; SHARBEL, T.F.; BEUKEBOOM, L.W. B-Chromosome evolution. **Philosophical Transactions of The Royal Society**, London. n. 355, p. 163-178, 2000.
- CAMACHO, J.P.M. B chromosomes. In: GREGORY, T.R. **The evolution of the genome**. San Diego, California, USA, p. 223-286, 2005.
- CAMACHO, J.P.M.; PERFECTTI, F.; TERUEL, M.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CABRERO, J. The odd-even effect in mitotically unstable B chromosomes in grasshoppers. **Cytoenetic and Genome Research**, v. 106, p. 325-331, 2004.

CARLSON, W. R. & ROSEMAM, R.R. A new property of the maize B chromosome. **Genetics**, v. 13, p. 211-223, 1992.

CARVALHO, R.A.; MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. B-chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**. v. 72, p. 1907-1932, 2008.

CAVALHEIRO, A.L.; TOREZAN, J.M.D.; FADELI, L. Recuperação de áreas degradadas: procurando por diversidade e funcionamento de ecossistemas. In MEDRI, M.E; BIANCHINI, E.; SHIBATA, O.; PIMENTA, J.A. **A bacia do rio Tibagi**, Londrina, Brasil: Edição dos editores, 2002. p.213-214.

CAVALLARO, Z. I.; BERTOLLO, L. A. C.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. M. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. **Chromosome Research**, v. 8, p. 627-634, 2000.

CHENG YM, LIN BY.. Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. **Genetics**, v. 164, p. 299–310, 2003.

CHIAVARINO, A.M.; ROSATO, M.; MANZANERO, S.; JIMÉNEZ, G.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M.; PUERTAS, M.J. Chromosome nondisjunction and instabilities in tapetal cells are affected by B chromosomes in maize. **Genetics**, v. 155, p. 889-897, 2000.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants** 2 ed. New York: The New York Botanical Garden, 1988.

D'ARCY, W.G.. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In HAWKES, J.G.; LESTER, R.N.; NEE, M.; ESTRADA, N. **Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution**, London: Royal Botanic Garden Kew and Linnean Society of London, 1991. p.75-135.

DONALD, T.M.; LEACH, C.R.; CLOUGH, A.; TIMMIS, J.N. Ribosomal RNA genes and the B chromosome of *Brachycome dichromosomatica*. **Heredity**, v. 74, p. 557-561, 1995.

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** n 51, v. 9, p. 772-7, 2008.

FREGNEZI, J.N.; ROCHA, C.; TOREZAN, J.M.D.; VANZELA, A.L.L. Different B-chromosomes in *Cestrum intermedium* and *C. strigilatum* evidenced by chromosome banding. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 106, p. 184-188, 2004.

FREGONEZI, J.N.; FERNANDES, T.; TOREZAN, J.M.D; VIEIRA, A.O.S.; VANZELA, A.L.L.. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on physical mapping of repetitive DNA. **Genetics and Molecular Biology**. v. 29, p. 97-104, 2006.

FREGONEZI, J.N.; VILAS-BOAS, L.; 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, p. 599-604, 2007.

FRÖST, S. The inheritance of the accessory chromosomes in *Centaurea scabiosa*. **Hereditas**, v. 43, p. 403-421, 1957.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ M.; CHIAVARINO, M.; JIMÉNEZ, G.; MANZANERO, S.; ROSATO, M.; PUERTAS, M.J. The parasitic effects of rye B chromosomes might be beneficial in the long term. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 386-393, 2004.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, 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.

GREEN, D.M.; ZEYL, C.W.; SCHARBEL, T.F. The evolution of hypervariable sex and supernumerary (b) chromosomes in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 6, p. 417-441, 1993.

GUERRA, M. **Introdução a Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988.

HAWKES, J.G.; LESTER, R.N.; NEE, M.; ESTRADA, N. **Solanaceae III: taxonomy, chemistry and evolution**. Londres, Inglaterra: The Royal Botanic Gardens Kew, 483 p. 1991.

HENDZEL M.J., WEI, Y.; MANCINI, M.A.; VAN HOOSER, A.; RANALLI, T.; BRINKLEY, B.R.; BAZETT-JONES, D.P.; ALLIS, C.D. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**, v. 106, p. 348-360, 1997.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Stain Technology**, v. 45, n.3, p. 115-120 1970.

HUNZIKER, A.T. South American Solanaceae; a synoptic survey. *In*: HAWKES, R. N.; LESTER, A.; SKELDING, D. **The Biology and Taxonomy of the Solanaceae**. 7 ed. New York: Linnean Society Symposium Series Academic Press, 1976. p. 49-85.

JAMILENA, M.; REJÓN, M.R.; REJÓN, C.R. A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. **Journal of Cell Science**, v. 107, p. 703-708, 1994.

JENKINS G. Synaptonemal complex formation in hybrids of *Lolium temulentum* X *Lolium perenne* (L.) III. Tetraploid. **Chromosoma**, v. 93; p. 413-419, 1986.

JONES R.N.; REES, H. **B chromosomes**. New York: Academic Press. 1982

JONES, R.N.; HOUBEN, A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 417–423, 2003.

JONES, R.N.; VIEGAS, W.; HOUBEN, A. A Century of B Chromosomes in Plants: So What? **Annals of Botany**, n. 6, v. 101, p. 1-9, 2008.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE; M. J. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. Massachusetts U.S.A: Sinauer Associates. 1999.

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

KENTON, A. Heterochromatin accumulation, disposition and diversity in *Gibasis karwinskyana* (Commelinaceae). **Chromosoma**. v. 100, p. 467-478, 1991.

LACADENA, J.R. **Citogenética**. Madri, Espanha: Editorial Complutense, S. A. 1996.

LANGDON, T.; SEAGO, C.; JONES, R.N.; OUGHAM, H.; THOMAS, H.; FORSTER J.W.; JENKINS, G. De novo evolution of satellite DNA on the rye B chromosome. **Genetics**, v. 154, p. 869-884 2000.

LAS PENAS, M.L.; CHIARINI, F.E.; BERNARDELLO, G.; BENÍTEZ DE ROJAS, C. Karyotypes of some species of *Cestrum*, *Sessea*, and *Vestia* (tribe Cestreae, Solanaceae). **Caryologia** v. 59, p. 131-137, 2006.

MANZANERO S., P. ARANA, M.J. PUERTAS; A. HOUBEN. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. **Chromosoma**, v. 109, p. 308-31 , 2000.

MEDEIROS, L.R.; ROSSA-FERES, D.C.; JIM, J.; RECCO-PIMENTEL, S.M. B-chromosomes in two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 257-262, 2006.

MOSCONE, E.A. Estudios de cromosomas meióticos en Solanaceae de Argentina. **Darwiniana** v. 31, p. 261-297, 1992.

NODA, S. Achiasmate meiosis in the *Fritillaria japonica* group. I. Different modes of bivalent formation in the two sex mother cells. **Heredity**, v. 34, p. 373-380, 1975.

OLMSTEAD, R.G.R.; SPRANGLER, E.; BOHS, L. & PALMER, J.D. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: NEE, M.; SYMON, D.E. **Solanaceae IV: Advances in biology and utilization**. Kew, Royal Botanic Gardens, 1999 . p. 111-138.

PAGE, B.T.; WANOUS, M.K.; BIRCHLER, J.A. Characterization of a maize chromosome 4 centromeric sequence: evidence for an evolutionary relationship with the B chromosome centromere. **Genetics**, v. 159, p. 291–302, 2001.

PALESTIS, B.G.; TRIVERS, R.; BURT, A.; JONES, R.N. The distribution of B chromosomes across species. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 106, p. 151-158, 2004.

PERFECTTI, F. & WERREN, J.H. The interspecific origin of B chromosome: experimental evidence. **Evolution**, v. 55, n. 5, p. 1069-1073, 2001.

PILLEN, K.; PINEDA, O.; LEWIS, C.B.; TANKSLEY, S.D. Status of genome mapping tools in the taxon Solanaceae. In **Genome mapping in plants**. PATERSON, A.H.; LANDES, R.G. Company, Austin, Texas, 1996. p 281–308.

- POZZOBON, M.T.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; BIANCHETTI, L.B. 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 Society**, n. 151, p. 259-269, 2006.
- PUERTAS, M. J.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M.; MANZANERO, S.; ROMERA, F.; JIMÉNEZ, M. M. Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. IV. Localization of the genes controlling B transmission rate. **Heredity**, v. 80, p. 209-213, 1998.
- RANDOLPH, L.F. Types of supernumerary chromosomes in maize. **Anatomical Record**. v. 41, p. 102, 1928.
- REGO, L.N.A.A.; DA 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**. n. 279, p. 93-102, 2009.
- ROMAN, H. Directed fertilization in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 34, p. 36-42, 1948.
- SCHULTES, R.E. Solanaceous hallucinogens and their role in the development of New World cultures. In: HAWKES, J.G.; LESTER, R.N.; NEE, M.; ESTRADA, N. **Solanaceae III: Taxonomy, chemistry, evolution**. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, 1991. p. 137-160.
- SHARBEL, T.F.; GREEN, D.M.; HOUBEN, A. B chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. **Genome**, v. 41, p. 14-22, 1998.
- SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Solanáceas. *IN*: REITZ, P.R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Biblioteca Superior de Cultura, 1966. p. 1-32.
- SOUZA, V.C; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado na APG II**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p.402-408, 2008.
- SÝKOROVÁ, E.; YOONG, L.; FAKIJUS, J.; LEITCH, A.R. The signature of the *Cestrum* genome suggests an evolutionary response to the loss of (TTTAGGG)<sub>n</sub> telomeres. **Chromosoma**, n. 112, p. 164-172, 2003.
- TRIVERS R., A. BURT; B.G. PALESTIS. B chromosomes and genome size in flowering plants. **Genome**, v. 47, p. 1-8, 2004.
- WILSON, E.B. Studies on chromosomes. V. The chromosomes of *Metapodius*. A contribution to the hypothesis of genetic continuity of chromosomes. **Journal of experimental Zoology**. v. 6, p. 147-205, 1907.