



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDO GIANETTI FIORIN

**ESTRUTURA CARIOTÍPICA DE DUAS ESPÉCIES DE
Hypochaeris (*H. catharinensis* e *H. lutea*), ASTERACEAE
ENDÊMICAS DO SUL DO BRASIL.**

FERNANDO GIANETTI FIORIN

**ESTRUTURA CARIOTÍPICA DE DUAS ESPÉCIES DE
Hypochaeris (*H. catharinensis* e *H. lutea*), ASTERACEAE
ENDÊMICAS DO SUL DO BRASIL.**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas

Londrina
2008

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F521e Fiorin, Fernando Gianetti.

Estrutura cariotípica de duas espécies de *Hypochaeris* (*H. catharinensis* e *H. lútea*), asteraceae endêmicas do sul do Brasil / Fernando Gianetti Fiorin. – Londrina, 2008.
46 f. il

Orientador: Claudete de Fátima Ruas.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Plantas – Genética molecular – Teses. 2. Plantas – Biologia molecular – Teses. 3. *Hypochaeris* – Cariótipos – Teses. I. Ruas, Claudete de Fátima. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 575.22

FERNANDO GIANETTI FIORIN

ESTRUTURA CARIOTÍPICA DE DUAS ESPÉCIES DE *Hypochoeris* (*H. catharinensis* e *H. lutea*), ASTERACEAE ENDÊMICAS DO SUL DO BRASIL.

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales
UEL – Londrina - PR

Londrina, 14 de abril de 2008.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Romildo Moacir Fiorin e Maria Isabel Fiorin, por todo apoio, carinho e incentivo recebido nesse árduo caminho até aqui percorrido.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Londrina**, e ao **Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, EMBRAPA-Londrina e IAPAR**, pelas oportunidades e pela formação;

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de mestrado;

A Profa. Dra. **Claudete de Fátima Ruas**, minha orientadora que com paciência e energia soube fazer uma mente acostumada a apenas receber o que já estava pronto a começar a questionar e observar não apenas esse mundo repleto de cromossomos, mas toda a vida a sua volta;

Ao Prof. Dr. **Paulo Maurício Ruas**, meu segundo mentor e inspirador a conhecer um pouco mais o que existe de tão interessante nesse mundo que sempre evolui e muda;

Aos amigos de Laboratório **Maikel, Luana, Mayra, Thiago, Eduardo, Mariana, Lucas, André e Cristiano** pelo companheirismo e apoio nos momentos difíceis;

Aos amigos que sempre me acompanharam na graduação **Lúcio, KK, Gerepe, Hanson, Renato, Matheus e Mirian** que sempre foram ótimos companheiros e tornaram minha vida mais alegre e intensa;

Aos meus amigos de República **Vítor e Coxa**, que sempre estão presentes nos bons e maus momentos, e nas festas também;

Aos meus amigos de Uraí **Fernando, Fábio André, Sakai, João, Nill, Rogério, Edgar e Zequinha**, por estarem próximos desde minha infância e permanecerem juntos nos melhores e piores tempos de nossas vidas;

À Profa. Dra. **Gisele Maria de Andrade de Nóbrega**, por ter sido minha primeira orientadora e guiado meus primeiros passos nos caminhos da pesquisa e do conhecimento científico prático;

À Profa. Dra. **Maria Aparecida Marin Morales**, que aceitou fazer parte de minha banca examinadora, trazendo grande contribuição ao meu trabalho;

Aos meus **colegas da turma 2008 de Mestrado em Genética e Biologia Molecular** da Universidade Estadual de Londrina, pela ajuda e companheirismo nunca negados;

Aos meus pais **Romildo e Isabel**, que mesmo que não entendessem meus sonhos e meus desejos souberam apoiá-los e não mediram esforços para terem um filho cientista;

Aos meus irmãos **Gustavo e Ana Carolina**, que estiveram presentes em todo o meu crescimento e desenvolvimento;

À minha primeira e querida professora de Biologia Profa. **Dourra**, grande inspiradora e modelo para se seguir, me ajudou a superar barreiras e acreditar nessa grande ciência chamada Biologia;

MUITO OBRIGADO A TODOS!!!

FIORIN, Fernando Gianetti **Estrutura cariotípica de duas espécies de *Hypochaeris* (*H. catharinensis* e *H. lutea*), Asteraceae endêmicas do sul do Brasil**. 2008. 46 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Mudanças no número e morfologia dos cariótipos são considerados importantes mecanismos, envolvidos na evolução cromossômica de plantas. O gênero *Hypochaeris* (Asteraceae) compreende 50-60 espécies das quais, cerca de 15 estão distribuídas no norte da África, Europa, Ásia e de 40-50 são endêmicas da América do Sul, considerado o centro de diversidade do gênero. *Hypochaeris* representa um sistema que permite o estudo de diferentes modelos de evolução cromossômica. As espécies da América do Sul mostram consistentemente cariótipos bimodais e assimétricos associados com número básico de $x=4$ e poliploidia. O presente estudo tem por objetivo: estudar pela primeira vez o número e estrutura do cariótipo de *H. catharinensis*, espécie endêmica dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina; identificar variações na estrutura cromossômica usando o método de coloração convencional de Feulgen e bandamento com o fluorocromo GC específico CMA₃, em dez populações de *H. catharinensis* e cinco de *H. lutea*. Os cariótipos das duas espécies mostram o padrão típico, com cariótipo bimodal e assimétrico e número básico de $x=4$. Coloração convencional mostra que todas as populações de *H. catharinensis* apresentam dois pares de cromossomos (2 e 3) com constrição secundária e apenas pequenas diferenças entre cromossomos correspondentes de cada população. Entretanto, pequenas diferenças na relação de braços sugerem a ocorrência de rearranjos estruturais. Bandamento com cromomicina (CMA₃) em *H. catharinensis* revela uma distribuição de blocos GC inédita para o grupo sul-americano de *Hypochaeris*. Além de múltiplos sinais CMA-positivos distribuídos entre os cromossomos, três grandes blocos heterocromáticos são vistos nos pares um e dois de *H. catharinensis*. *Hypochaeris lutea* também apresenta poucas variações na estrutura padrão dos cariótipos entre as populações. Esta espécie se caracteriza pela presença de constrição secundária terminal no braço curto dos cromossomos número 3. Pequenas diferenças são observadas na posição dos centrômeros entre cromossomos equivalentes. Uma população de *H. lutea*, com 37 indivíduos analisados, mostra-se totalmente poliplóide, citótipo inédito para esta espécie. Sinais CMA-positivos são menos frequentes em *H. lutea* sendo vistos somente co-localizados à região NOR. As similaridades cariotípicas observadas entre as populações das duas espécies investigadas estão em concordância com todas as espécies sul-americanas. Entretanto, a presença de blocos heterocromáticos não usuais para o gênero sugere que rearranjos estruturais significativos, relacionados com dispersão de blocos de heterocromatina, podem estar ocorrendo no cariótipo de *H. catharinensis*. A identificação de um citótipo poliplóide em *H. lutea* fornece suporte que poliploidia é um evento comum na evolução cariotípica de *Hypochaeris*.

Palavras chave: Asteraceae. Cromomicina A3. Evolução cariotípica. *Hypochaeris*. *H. catharinensis*. *H. lutea*. Poliploidia.

FIORIN, Fernando Gianetti **Karyotypic structure of two species of *Hypochaeris* (*H. catharinensis* and *H. lutea*), Asteraceae endemic to southern Brazil.** 2008. 46 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Changes in chromosome morphology and number play an important role in the karyotype evolution in plants. The genus *Hypochaeris* (Asteraceae) includes 50-60 species, around 15 found northern Africa, Europe, Asia and 40-50 distributed in South America that is considered the center of species' diversity. *Hypochaeris* represents a well suited system to studying different modes of chromosome evolution. All South American species consistently have bimodal and asymmetrical karyotypes, combined with a base number of $x = 4$ and polyploidy. The main objectives of this study are: to study for the first time the karyotype of *H. catharinensis*, an endemic species of Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, in South Brasil; to assess changes on chromosome number and structure of ten different populations of *H. catharinensis* and five of *H. lutea*, by conventional Feulgen staining and the GC-specific fluorochrome CMA-3. The analysis of basic chromosome morphology show that the two species have the same karyotype pattern of all South America species already studied, with bimodal and highly asymmetrical karyotypes and basic chromosome number of $x = 4$. Conventional Feulgen staining shows that all populations of *H. catharinensis* display two pairs of chromosomes (pairs 2 and 3) with secondary constrictions and only small differences in size between corresponding chromosomes among populations. However, some variations are observed in the values of arm ratio, suggesting that structural rearrangements may be occurring in this species. Chromosome banding with CMA₃ in *H. catharinensis* reveals a novel pattern in the distribution of GC-rich heterochromatin in this species. Three strong CMA-positive signals are distinguished on chromosomes two and three of *H. catharinensis* besides many additional and less intense signals. *Hypochaeris lutea* also display small differences on chromosome morphology between populations. This specie is characterized by the presence of a secondary constriction and associated satellite in the small arm of chromosome 3. Small differences in the values of arm ratio between corresponding chromosomes are also observed. One population of *H. lutea*, with 37 individuals analyzed, is completely polyploid adding up a novel cytotype for this species. Blocks of GC-rich heterochromatin (CMA-positive bands) are less frequent in *H. lutea* occurring only adjacent to NOR region and satellites on short arm of chromosome 3. The overall karyotypic similarity of the two species investigated are in compass with all South American *Hypochaeris*. However, the presence of blocks of GC-rich heterochromatin, unusual for the genus, suggests that significant chromosome rearrangements, related to dispersion of heterochromatin, are occurring in the karyotypes of *H. catharinensis*. The identification of a polyploid cytotype in *H. lutea* gives support that polyploidy is a common event in the karyotype evolution of *Hypochaeris*.

Keywords: Asteraceae. Cromomycin A3. Karyotype evolution. *Hypochaeris*. *H. catharinensis*. *H. Lutea*. Polyploidy..

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 – Populações de <i>H. catharinensis</i> e <i>H. lutea</i> , com as respectivas áreas de coleta, com número cromossômico, número de coleta e número de coleção do Herbário FUEL	30
Tabela 2 – Dados morfométricos nas populações de <i>H. catharinensis</i> investigadas. Tamanho total do cromossomo haplóide (HCL) (µm).....	31
Tabela 3 – Medidas dos cariótipos de <i>Hypochaeris catharinensis</i> investigados	32
Tabela 4 – Dados morfométricos das populações de <i>H. lutea</i> investigadas. Tamanho total do cromossomo haplóide (HCL) (µm).....	32
Tabela 5 – dados morfométricos de cromossomos da população poliplóide de <i>H. lutea</i> investigada. Tamanho total do cromossomo haplóide (HCL) (µm).....	33
Tabela 6 – Medidas dos cariótipos das populações diplóides de <i>Hypochaeris lutea</i> investigadas	33
Tabela 7 – Medidas dos cariótipos da população poliplóide de <i>Hypochaeris lutea</i> investigada.....	33
Tabela 8 – Distribuição de bandas de Cromomicina A ₃ em populações de <i>Hypochaeris catharinensis</i>	34
Tabela 9 – Distribuição de bandas de Cromomicina A ₃ em populações de <i>Hypochaeris lutea</i>	34

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

- Figura 1** – Cromossomos das populações de *Hypochoaeris catharinensis*: A - Angelina (SC); B – Bom Jesus (RS); C - Bom Jesus da Serra (SC); D - Bom Retiro (SC); E - Cambará do Sul (RS); F - Lages (SC); G – Monte Alegre dos Campos (RS); H - Pico Monte Negro (RS); I – Rancho Queimado (RS); J – São Joaquim (SC). Barra de escala: 10µm 35
- Figura 2** – Ideograma comparativo das populações de *Hypochoaeris catharinensis*. A - Angelina (SC); B – Bom Jesus da Serra (SC); C – Bom Retiro (SC); D – Cambará do Sul (RS); E – Lajes (SC); F – Monte Alegre dos Campos (RS); G – Pico Monte Negro (RS); H – Rancho Queimando (SC); I – São Joaquim (SC) e J – Bom Jesus (RS) 35
- Figura 3** – Cromossomos das populações de *Hypochoaeris lutea*: A – Bom Jesus da Serra (SC); B – Guaíba (RS); C – Rancho Queimado (SC); D – São Joaquim (SC); E – Serra da Rocinha (RS). Barra de escala: 10µm..... 36
- Figura 4** – Ideograma comparativo das populações de *Hypochoaeris lutea*. A – Bom Jesus da Serra (SC); B - Guaíba (RS); C – Rancho Queimado (SC); D – São Joaquim (SC) e E – Serra da Rocinha (RS)..... 36
- Figura 5** – Metáfases e interfases de populações de *Hypochoaeris catharinensis* coradas com Cromomicina (CMA₃). A – Cambará do Sul (RS); B - Lajes (SC); C – Pico Montenegro (RS); D – Rancho Queimado (SC); E - São Joaquim (SC); F – Rancho Queimado (SC) e G – São Joaquim (SC)..... 37
- Figura 6** – Ideograma mostrando regiões coradas com Cromomicina (CMA₃) nas populações de *Hypochoaeris catharinensis*. A - Cambará do Sul (RS); B - Lajes (SC); C – Pico Montenegro (RS); D – Rancho Queimado (SC) e E - São Joaquim (SC)..... 37
- Figura 7** – Cromossomos metafásicos corados com o fluorocromo Cromomicina (CMA₃) em cinco populações de *Hypochoaeris lutea*. A – Bom Jesus da Serra (SC); B - Guaíba (RS); C – Rancho Queimado (SC); D – São Joaquim (SC); E e F – Serra da Rocinha (RS) 38

Figura 8 – Ideograma mostrando regiões coradas com Cromomicina (CMA_3) nas populações de *Hypochaeris lutea*. A – Bom Jesus da Serra (SC); B - Guaíba (RS); C – Rancho Queimado (SC); D – São Joaquim (SC) e E – Serra da Rocinha (RS) 38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	17
3	ARTIGO	18
	REFERÊNCIAS GERAIS	43
	CONCLUSÕES GERAIS	46

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae) inclui 50-60 espécies encontradas no norte da África, Europa, Ásia e América do Sul. Embora seja representado por apenas cerca de 15 espécies, o grupo distribuído no Velho Mundo mostra grande diversidade citológica com números básicos variáveis de $x = 3, 4, 5, \text{ e } 6$ (Parker *et al.*, 1976; Mugnier e Siljak-Yakovlev *et al.*, 1987; Barghi *et al.*, 1989; Siljak-Yakovlev *et al.*, 1994; Cerbah *et al.*, 1995, 1998). A variação taxonômica encontra suporte na classificação seccional das espécies, que tem como base caracteres morfológicos (Hoffmann *et al.*, 1893) e em dados cromossômicos e moleculares (Samuel *et al.*, 2003), sendo reconhecidas cinco seções taxonômicas para o grupo europeu: *Seriola*; *Euhypochaeris*; *Metabasis*; *Robertia* e *Achyrophorus*. Entretanto, estudos de filogenética molecular, usando seqüências de regiões internas do rDNA 45S (ITSs) e genes de cloroplastos (*trnL*-intron e espaçador de *trnL/trnF* e *matK*) confirmam que as espécies européias de *Hypochaeris* compreendem um grupo monofilético (Samuel, *et al.*, 2003). Em contraste, o grupo de espécies da América do Sul, com 40-50 espécies (Lack 1979; Bortiri, 1999), mostra-se uniforme, com respeito ao número básico dos cromossomos, com $x = 4$; (Ruas *et al.*, 1995; 2005; Weiss *et al.*, 2003; Tremetsberger *et al.*, 2006; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2007). A seção *Achyrophorus*, que inclui algumas espécies européias, era considerada como a única seção a representar todas as espécies sul-americanas de *Hypochaeris*. Apenas recentemente demonstrou-se que o grupo sul-americano de *Hypochaeris* não é um membro da seção *Achyrophorus*, como sugerido previamente (Hoffmann *et al.*, 1893), sendo considerado um grupo co-irmão de *H. angustifolia*, uma espécie encontrada no Marrocos com $x = 4$ (Oberprieler, 2002) e que não foi ainda incluída em qualquer classificação seccional (Oberprieler e Vogt, 2002; Tremetsberger *et al.*, 2005). Estes relatos têm não apenas permitido que inferências sejam feitas sobre a possível origem das espécies de *Hypochaeris* do Novo Mundo, a partir de um ancestral do nordeste da África, como também sugere uma possível ligação entre $x = 5$ e $x = 4$ (Tremetsberger *et al.*, 2005). Além disso, estes dados concordam com o processo relativamente recente e rápido de diversificação do gênero (Samuel *et al.*, 2003, Tremetsberger *et al.*, 2005). Entretanto, ainda não é clara a delimitação do grupo sul-americano de *Hypochaeris* como um todo, bem como a relação entre taxa morfológica e ecologicamente bem diferenciados, impedindo uma melhor compreensão das causas e mecanismos da radiação na América do Sul.

O gênero *Hypochoeris* é considerado por Stebbins *et al.* (1953) como tendo a maior distribuição geográfica não usual dentro da tribo Lactuceae. De fato, o gênero é considerado um interessante modelo de estudo de biogeografia, pois ainda não foi completamente explicado como este teria chegado da Europa à América do Sul. Alguns pesquisadores acreditam que os possíveis ancestrais das espécies sul-americanas tenham chegado pelo estreito de Bering (ou seja, da Ásia para a América do Norte), já que registros fósseis foram encontrados em ambas as regiões (Cerbah *et al.*, 1998b). Entretanto, pelo fato de não existirem espécies vivas na América do Norte na atualidade, essa teoria não é bem aceita. Outros estudos apontam que possivelmente as espécies ancestrais do grupo sul-americano de *Hypochoeris* possam ser do norte da África e teriam chegado à América do Sul durante o Plioceno ou Pleistoceno (Tremetsberger *et al.*, 2005). Um fator que confirma a ancestralidade das espécies européias está na análise dos fósseis, que mostram existirem muito mais eventos de especiação naquela região, quando se compara a quantidade de espécies de polens já encontrados, demonstrando, portanto, uma maior pressão seletiva (Cerbah *et al.*, 1998b). Evidências encontradas através de fósseis de polens mostram que possivelmente as espécies sul-americanas não tiveram apenas um evento inicial de especiação, mas pelo menos dois (Cerbah *et al.*, 1998b). A princípio se acreditava que o ancestral teria sofrido um processo de aneuploidia originando as espécies sul-americanas, mas as evidências citogenéticas e moleculares mostram que é mais provável ter ocorrido um processo de mudança do tamanho do genoma, dado por elementos de transposição e outros eventos que mudaram a composição cromossômica das espécies ancestrais. Essas evidências encontram suporte nos estudos de distribuição das regiões de rDNA 18-25S e 5S, assim como outros rearranjos na estrutura dos cromossomos (Cerbah *et al.*, 1998a e 1998b; Weiss *et al.*, 2003, 2007; Ruas *et al.*, 2005).

Tendo como base a grande variação morfológica, os diferentes números básicos de cromossomos (de $x = 3$ a $x = 6$) assim como, a pequena quantidade de espécies, a presença de todas as seções e o fato de co-existir com um gênero irmão (*Leontodon*), considera-se que o ancestral do gênero *Hypochoeris* é de origem européia (Cerbah *et al.*, 1998). As espécies sul-americanas seriam, portanto, um grupo secundário derivado de um processo rápido de radiação adaptativa, favorecido pelo grande número de habitats (desde os Andes até regiões de campos ao nível do mar), encontrado por um ancestral hipotético de *Hypochoeris*. Neste processo, foi favorecido o cariótipo padrão com cromossomos grandes e em pequeno número, de cromossomos das espécies sul-americanas (Weiss *et al.*, 2003).

Enquanto as espécies da Europa e do Mediterrâneo de *Hypochaeris* são bem conhecidas citologicamente (Parker *et al.*, 1976; Mugnier e Siljak-Yakovlev *et al.*, 1987; Barghi *et al.*, 1989; Siljak-Yakovlev *et al.*, 1994; Cerbah *et al.*, 1995, 1998; Hall e Parker, 1995), muitas espécies sul-americanas ainda carecem de informações mais detalhadas (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2007). Números cromossômicos já foram determinados para 39 espécies do grupo de *Hypochaeris* do Novo Mundo (Stebbins *et al.*, 1953; Siljak-Yakovlev *et al.*, 1994; Ruas *et al.*, 1995, 2005; Cerbah *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 2003; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2003, 2007). Todos os taxa sul-americanos já analisados mostram cariótipos bimodais e assimétricos muito similares, com dois pares grandes e dois pares pequenos de cromossomos. Entre as espécies já estudadas 25 se mostraram totalmente diplóides, sete apresentaram tanto indivíduos diplóides como poliplóides ($2n = 4x = 16$) na mesma população coletada e uma espécie se mostrou inteiramente tetraplóide, *H. caespitosa* (Weiss *et al.*, 2003).

A aplicação de técnicas convencionais de coloração e citogenética molecular permitiram discriminar sete grupos cariotípicos entre as espécies sul-americanas de *Hypochaeris*, possibilitando a elaboração de hipóteses, relacionadas com as relações entre as espécies. (Cerbah *et al.*, 1998; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2003; 2007; Ruas *et al.*, 1995; 2005). A presença e o número de constrições secundárias associada ao uso de FISH mostra a existência de um ou dois locos de rDNA 18-25S entre as espécies. Estes locos tem sido localizados na região intersticial, no braço curto do cromossomo 2 (loco ausente em algumas espécies) e na região terminal ou intersticial no braço curto do cromossomos 3. Cinco dos sete grupos cariotípicos incluem poliplóides. Dados moleculares em Tremetsberger *et al.* (2006), apontam que grupos de cariótipos com mais de uma espécie não parecem formar grupos monofiléticos, sugerindo que a evolução do gênero na América do Sul caracterizou-se por considerável diferenciação cariotípica, resultante de derivações independentes a partir de um ou poucos cariótipos ancestrais. As derivações mais marcantes estão relacionadas com variações na posição da constrição secundária no braço curto do cromossomo 3, que, provavelmente, envolve inversões e/ou transposições e em mecanismos de inativação e perda de genes de rDNA no cromossomos 2 (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2003; 2007; Ruas *et al.*, 1995; 2005). Entre os diferentes tipos de cariótipos identificados, o grupo Apargioides é o mais representado, com 17 espécies (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2003; 2007). Espécies do grupo Apargioides contém dois pares de locos de rDNA 18-25S, um no braço longo do cromossomo e outro no braço curto do cromossomo 3, ambos formando constrições secundárias. Algumas espécies poliplóides mostram desvios do padrão aditivo, apresentado por este grupo, como perda e inativação aparente do loco presente em um dos pares de

cromossomo 2. O único membro do grupo chondrilloides (*H. chondrilloides*) mostra, o cromossomo 3 do tipo telocêntrico, em lugar do submetacêntrico usual, com satélites facilmente identificados através de coloração de Feulgen (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2007). Dois outros grupos pequenos mostram um único loco de rDNA 18-25S por genoma, localizado no braço curto do cromossomo 3. Este loco é terminal no grupo patagonica que inclui *H. patagonica* e *H. lutea* (Ruas *et al.*, 2005; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2007), ou intersticial no grupo acaulis, que inclui algumas espécies. O último grupo cariotípico caracteriza-se por um único loco de rDNA no cromossomo 2. Este padrão é visto apenas no genoma da espécie tetraploide, *H. caespitosa* (grupo Caespitosa).

O presente trabalho inclui os estudos dos cariótipos de duas espécies de *Hypochoeris* (*H. catharinensis* e *H. lutea*) de ocorrência freqüente no sul do Brasil. *Hypochoeris catharinensis* Cabr. está distribuída em regiões altas (800 a 1400m) e frias, incluindo áreas abertas e pedregosas de campo, em associação com vegetação arbustiva ou ervas, com predominância de gramíneas e em florestas abertas com araucária. Pode também ser encontrada em barrancos de beira de estrada e em ambientes úmidos, sendo considerada uma espécie endêmica do sul do Brasil. Sua área de distribuição inclui duas regiões fisiográficas ao norte e nordeste do Rio Grande do Sul, sendo de distribuição mais ampla no estado de Santa Catarina, com poucos relatos de ocorrência no estado do Paraná (Azevêdo-Gonçalves *et al.*, 2004). *Hypochoeris catharinensis* é uma erva perene, representando a única espécie do gênero a apresentar raiz fasciculada e rizoma horizontal, sendo esta uma característica taxonômica importante para este táxon. As flores apresentam-se liguladas e atravessam pouco ou não atravessam as brácteas que, assim como as lígulas, são amarelas. Apresentam flores e frutos em dezembro e janeiro (Azevêdo-Gonçalves *et al.*, 2004).

Hypochoeris lutea (Vell.) Britton tem distribuição mais ampla, e pode ser encontrada em regiões frias, altas e de extrema umidade (banhados e brejos) no sul do Brasil, em associação com espécies hidrófilas que são encontradas, principalmente, em turfeiras e associadas com *Sphagnum* sp. (Matzernbacher, 1998). É encontrada predominantemente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Porém, alguns relatos (coleções de herbários) mostram ocorrência desta espécie também em regiões montanhosas e de grande umidade nos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, bem como no Uruguai e Argentina (Azevêdo-Gonçalves *et al.*, 2004). *Hypochoeris lutea* é considerada uma erva perene com raiz pivotante profunda com flores de cor amarela e lígulas, também amarelas, que ultrapassam as brácteas involucrais. Apresentam florescimento em fevereiro e julho e

frutificam em fevereiro (Azevêdo-Gonçalvez *et al.*, 2004), porém, em algumas populações, pode-se observar florescimento entre os meses de novembro e janeiro.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho incluem: a) determinar o padrão de cariótipo de *H. catharinensis*, espécie endêmica dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, investigada pela primeira vez em relação aos dados cromossômicos; b) identificar diferenças entre cariótipos de dez populações de *H. catharinensis* e entre cariótipos de cinco populações de *H. lutea*; c) identificar citótipos numéricos e estruturais entre populações das duas espécies investigadas; d) comparar mudanças que podem ser identificadas entre cariótipos, dentro de espécies, com a dinâmica nas mudanças na estrutura cromossômica e localização de regiões organizadoras do nucléolo; e) identificar os mecanismos envolvidos nas mudanças cariotípicas e interpretar tais mudanças em um contexto que permita estabelecer inferências sobre as direções dos mecanismos de evolução cromossômica no gênero; e f) Identificar variações cariotípicas por meio de técnicas de bandeamento com cromomicina (CMA3).

3 ARTIGO

3.1 ESTRUTURA CARIOTÍPICA DE DUAS ESPÉCIES DE *HYPOCHAERIS* (*H. CATHARINENSIS* E *H. LUTEA*), ASTERACEAE ENDÊMICAS DO SUL DO BRASIL.

A ser submetido ao periódico Genetics and Molecular Biology

ESTRUTURA CARIOTÍPICA DE DUAS ESPÉCIES DE *HYPOCHAERIS* (*H. CATHARINENSIS* E *H. LUTEA*), ASTERACEAE ENDÊMICAS DO SUL DO BRASIL.

Fernando Fiorin e Claudete de Fátima Ruas¹

Resumo

Mudanças no número e morfologia dos cariótipos são considerados importantes mecanismos, envolvidos na evolução cromossômica de plantas. O gênero *Hypochaeris* (Asteraceae) compreende 50-60 espécies das quais, cerca de 15 estão distribuídas no norte da África, Europa, Ásia e de 40-50 são endêmicas da América do Sul, considerado o centro de diversidade do gênero. *Hypochaeris* representa um sistema que permite o estudo de diferentes modelos de evolução cromossômica. As espécies da América do Sul mostram consistentemente cariótipos bimodais e assimétricos associados com número básico de $x = 4$ e poliploidia. O presente estudo tem por objetivo: estudar pela primeira vez o número e estrutura do cariótipo de *H. catharinensis*, espécie endêmica dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina; identificar variações na estrutura cromossômica usando o método de coloração convencional de Feulgen e bandamento com o fluorocromos GC específico CMA_3 , em dez populações de *H. catharinensis* e cinco de *H. lutea*. Os cariótipos das duas espécies mostram o padrão típico, com cariótipo bimodal e assimétrico e número básico de $x = 4$. Coloração convencional mostra que todas as populações de *H. catharinensis* apresentam dois pares de cromossomos (2 e 3) com constrição secundária e apenas pequenas diferenças entre cromossomos correspondentes de cada população. Entretanto, pequenas diferenças na relação de braços sugerem a ocorrência de rearranjos estruturais. Bandamento com cromomicina (CMA_3) em *H. catharinensis* revela uma distribuição de blocos GC inédita para o grupo sul-americano de *Hypochaeris*. Além de múltiplos sinais CMA -positivos distribuídos entre os cromossomos, três grandes blocos heterocromáticos são vistos nos pares um e dois de *H. catharinensis*. *Hypochaeris lutea* também apresenta poucas variações na estrutura padrão dos cariótipos entre as populações. Esta espécie se caracteriza pela presença de constrição secundária terminal no braço curto dos cromossomos número 3. Pequenas diferenças são observadas na posição dos centrômeros entre cromossomos equivalentes. Uma população de *H. lutea*, com 37 indivíduos analisados, mostra-se totalmente poliplóide, citótipo inédito para esta espécie. Sinais CMA -positivos são menos freqüentes em *H. lutea* sendo vistos somente co-localizados à região NOR. As similaridades cariotípicas observadas entre as populações das duas espécies investigadas estão em concordância com todas as espécies sul-americanas. Entretanto, a presença de blocos heterocromáticos não usuais para o gênero sugere que rearranjos estruturais significativos, relacionados com dispersão de blocos de heterocromatina, podem estar ocorrendo no cariótipo de *H. catharinensis*. A identificação de um citótipo poliplóide em *H. lutea* fornece suporte que poliploidia é um evento comum na evolução cariotípica de *Hypochaeris*.

¹ Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, PR.
Endereço para correspondência: Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, PR.
e-mail: ruas@sercomtel.com.br

Palavras chave: Asteraceae. Cromomicina A3. Evolução cariotípica. *Hypochoeris*. *H. catharinensis*. *H. lutea*. Poliploidia.

Abstract

Changes in chromosome morphology and number play an important role in the karyotype evolution in plants. The genus *Hypochoeris* (Asteraceae) includes 50-60 species, around 15 found northern Africa, Europe, Asia and 40-50 distributed in South America that is considered the center of species' diversity. *Hypochoeris* represents a well suited system to studying different modes of chromosome evolution. All South American species consistently have bimodal and asymmetrical karyotypes, combined with a base number of $x = 4$ and polyploidy. The main objectives of this study are: to study for the first time the karyotype of *H. catharinensis*, an endemic species of Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, in South Brasil; to assess changes on chromosome number and structure of ten different populations of *H. catharinensis* and five of *H. lutea*, by conventional Feulgen staining and the GC-specific fluorochrome CMA-3. The analysis of basic chromosome morphology show that the two species have the same karyotype pattern of all South America species already studied, with bimodal and highly asymmetrical karyotypes and basic chromosome number of $x = 4$. Conventional Feulgen staining shows that all populations of *H. catharinensis* display two pairs of chromosomes (pairs 2 and 3) with secondary constrictions and only small differences in size between corresponding chromosomes among populations. However, some variations are observed in the values of arm ratio, suggesting that structural rearrangements may be occurring in this species. Chromosome banding with CMA₃ in *H. catharinensis* reveals a novel pattern in the distribution of GC-rich heterochromatin in this species. Three strong CMA-positive signals are distinguished on chromosomes two and three of *H. catharinensis* besides many additional and less intense signals. *Hypochoeris lutea* also display small differences on chromosome morphology between populations. This specie is characterized by the presence of a secondary constriction and associated satellite in the small arm of chromosome 3. Small differences in the values of arm ratio between corresponding chromosomes are also observed. One population of *H. lutea*, with 37 individuals analyzed, is completely polyploid adding up a novel cytotype for this species. Blocks of GC-rich heterochromatin (CMA-positive bands) are less frequent in *H. lutea* occurring only adjacent to NOR region and satellites on short arm of chromosome 3. The overall karyotypic similarity of the two species investigated are in compass with all South American *Hypochoeris*. However, the presence of blocks of GC-rich heterochromatin, unusual for the genus, suggests that significant chromosome rearrangements, related to dispersion of heterochromatin, are occurring in the karyotypes of *H. catharinensis*. The identification of a polyploid cytotype in *H. lutea* gives support that polyploidy is a common event in the karyotype evolution of *Hypochoeris*.

Keywords: Asteraceae. Cromomycin A3. Karyotype evolution. *Hypochoeris*. *H. catharinensis*. *H. lutea*. Polyploidy.

Introdução

O gênero *Hypochoeris* (Asteraceae, Lactuceae) apresenta dois centros distintos de distribuição, com mais de 15 espécies na Eurásia e norte da África (DeFillips, 1976; Oberprieler, 2002) e 40-50 taxa confinados na América do Sul (Bortiri, 1999). As espécies sul-americanas de *Hypochoeris* são, aparentemente, derivadas de um processo rápido e recente de especiação (Tremetsberger *et al.*, 2005), associado à seleção de cariótipos contendo cromossomos de tamanhos relativamente grandes e em pequeno número. Diferenças no número básico dos cromossomos ($x = 3, 4, 5, \text{ e } 6$) (Parker, 1976; Mugnier e Siljak-Yakovlev, 1987; Barghi *et al.*, 1989; Siljak-Yakovlev *et al.*, 1994; Cerbah *et al.*, 1995, 1998), associado com características morfológicas (Hoffmann *et al.*, 1893), tem sido utilizados para divisão seccional das espécies europeias de *Hypochoeris*, possibilitando a identificação de cinco seções: *Seriola*; *Euhypochoeris*; *Metabasis*; *Robertia* e *Achyrophorus*. Estudos de filogenética molecular usando sequências de regiões ITS e genes de cloroplastos (*trnL*-intron e espaçador de *trnL/trnF* e *matK*) confirmam que as espécies europeias de *Hypochoeris* compreendem a um grupo monofilético (Samuel, *et al.*, 2003). Em contraste, o grupo de espécies da América do Sul, com 40-50 espécies (Lack *et al.*, 1979; Bortiri, 1999) mostra-se uniforme, com respeito ao número básico dos cromossomos, com $x = 4$ (Ruas *et al.*, 1995; 2005; Oberprieler, 2002; Weiss *et al.*, 2003; Tremetsberger *et al.*, 2006; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2007). Estes dados concordam com o processo relativamente recente e rápido de diversificação do gênero (Samuel *et al.*, 2003, Tremetsberger *et al.*, 2005; 2006). Apenas recentemente demonstrou-se que o grupo sul-americano de *Hypochoeris* não é um membro da seção *Achyrophorus*, como sugerido previamente por Hoffmann *et al.* (1893). Análise de sequências de DNA tem mostrado que a espécie *H. angustifolia*, endêmica do Marrocos, é irmã do grupo de *Hypochoeris* da América do Sul, sugerindo que um centro secundário de diversidade surgiu no Novo Mundo após dispersão a longa distância, a partir de um ancestral hipotético do nordeste da África (Tremetsberger *et al.*, 2005). Estes dados encontram suporte também em características morfológicas (Galán de Mera and Vicente Orellana, 1998) e dados de AFLP (Tremetsberger *et al.*, 2006), e características cariotípicas (Oberprieler and Vogt, 2002; Tremetsberger *et al.*, 2005), fornecendo informações importantes que ligam *H. angustifolia* ao grupo de espécies do Novo Mundo. Estes achados têm não apenas permitido que inferências sejam feitas sobre a possível origem das espécies de *Hypochoeris* do Novo Mundo, a partir de um ancestral do nordeste da África, como também sugere uma possível ligação entre $x = 5$ e $x = 4$ (Tremetsberger *et al.*, 2005).

Enquanto as espécies do Velho Mundo de *Hypochaeris* são bem conhecidas citogeneticamente (Parker, 1976; Mugnier e Siljak-Yakovlev, 1987; Barghi *et al.*, 1989; Siljak-Yakovlev *et al.*, 1994; Cerbah *et al.*, 1995, 1998; Hall e Parker, 1995), muitas espécies do grupo sul-americano ainda carecem de informações mais detalhadas. Números cromossômicos foram determinados para 39 espécies e dois híbridos interespecíficos de *Hypochaeris* da América do Sul (Stebbins, 1953; Siljak-Yakovlev *et al.*, 1994; Ruas *et al.*, 1995; 2005; Cerbah *et al.*, 1998, Oberprieler, 2002; Weiss *et al.*, 2003; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2003; 2007). Entretanto, estudos cromossômicos detalhados, incluindo FISH, no grupo são reportados para somente 15 espécies (Cerbah *et al.*, 1998, Ruas *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2003). Todas as espécies sul-americanas já estudadas apresentam cariótipos assimétricos e bimodais, contendo dois pares grandes e dois pares pequenos de cromossomos. A maioria das espécies é diplóide com $2n = 8$ ($x = 4$), com ocasional ocorrência de poliploidia intraespecífica e/ou intrapopulacional (Weiss *et al.*, 2003; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2003; 2007). A aplicação de técnicas citogenéticas tem, entretanto, permitido discriminar sete grupos distintos de cariótipos bem como, desenvolver hipóteses relacionadas com as relações interespecíficas dentro e entre os grupos (Cerbah *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 2003; Ruas *et al.*, 2005).

Os objetivos do presente trabalho incluem: a) determinar o padrão de cariótipo de *H. catharinensis*, espécie endêmica nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, investigada pela primeira vez em relação aos dados cromossômicos; b) identificar diferenças entre cariótipos de 10 populações de *H. catharinensis* e entre cariótipos de cinco populações de *H. lutea*; c) identificar citótipos numéricos e estruturais entre populações das duas espécies investigadas; d) comparar mudanças que podem ser identificadas entre cariótipos, dentro de espécies, com a dinâmica nas mudanças na estrutura cromossômica e localização de regiões organizadoras do nucléolo; e) identificar os mecanismos envolvidos nas mudanças cariotípicas e interpretando tais mudanças em um contexto que permita estabelecer inferências sobre as direções dos mecanismos de evolução cromossômica no gênero e f) Identificar variações cariotípicas através de técnicas de bandeamento com cromomicina (CMA₃).

Materiais e Métodos

Obtenção e Manutenção das Plantas

O presente estudo inclui análise cromossômica de 10 populações de *H. catharinensis* e cinco populações de *H. lutea*, espécies de ocorrência freqüente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. *Hypochaeris catharinensis* Cabr. ocorre em regiões altas (800 a 1400m) e frias, incluindo áreas abertas e pedregosas de campo, em associação com vegetação arbustiva ou ervas, com predominância de gramíneas e em florestas abertas com araucária. Pode também ser encontrada em barrancos de beira de estrada e em ambientes úmidos, sendo considerada uma espécie endêmica do sul do Brasil. Sua área de distribuição abrange também duas regiões fisiográficas ao norte e nordeste do Rio Grande do Sul, com poucos relatos de ocorrência no estado do Paraná (Azevêdo-Gonçalves *et al.*, 2004). *Hypochaeris catharinensis* é uma erva perene, representando a única espécie do gênero a apresentar raiz fasciculada e rizoma horizontal, sendo esta uma característica taxonômica importante para este taxon. As flores apresentam-se liguladas e atravessam pouco ou não atravessam as brácteas que, assim como as lígulas, são amarelas. Apresentam flores e frutos em dezembro e janeiro (Azevêdo-Gonçalves *et al.*, 2004).

Hypochaeris lutea (Vell.) Britton tem distribuição mais ampla ocorrendo predominantemente e em regiões altas e frias com extrema umidade (banhados e brejos), em associação com espécies hidrófilas que são encontradas, principalmente, em turfeiras e associadas com *Sphagnum* sp., nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Matzernbacher, 1998). Alguns poucos relatos (coleções de herbários) mostram esta espécie também em regiões de montanha e grande umidade nos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, bem como no Uruguai e Argentina (Azevêdo-Gonçalves *et al.*, 2004). *Hypochaeris lutea* é considerada uma erva perene com raiz pivotante profunda com flores de cor amarela e lígulas, também amarelas, que ultrapassam as brácteas involucrais. Apresentam florescimento em fevereiro e julho e frutificam em fevereiro (Azevêdo-Gonçalves *et al.*, 2004), porém, em algumas populações pode-se observar florescimento entre os meses de novembro e janeiro. Amostras de 30 a 40 plantas foram obtidas de dez populações naturais de *H. catharinensis* e de cinco populações de *H. lutea*. As plantas coletadas são mantidas em casa de vegetação para análise (Tabela 1). Amostras de cada espécie por população encontram-se depositadas no Herbário do Departamento de Biologia Animal e Vegetal, na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Preparações Cromossômicas

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de meristemas radiculares coletados de plantas cultivadas em casa de vegetação, ou de sementes germinadas sobre papel de filtro umedecidos e mantidos em placas de petri por alguns dias. As raízes foram pré-tratadas com uma solução saturada de 8-hidroxiquinoleína (0,02g em 100mL de água destilada) por 3:15 horas a 8°C, fixadas em uma solução de etanol:ácido acético (3v:1v) por 24 horas e guardadas a -20°C até a preparação das lâminas.

Os cromossomos metafásicos foram obtidos a partir de raízes submetidas ao método de coloração convencional de Feulgen, com reativo de Schiff. As raízes foram lavadas em água destilada para remover o fixador, hidrolisadas em HCl 1N PA por 11 minutos a 60°C, lavadas e coradas com o reativo de Schiff no escuro por 1–2 horas. Após coloração e lavagem em água destilada, os meristemas radiculares foram esmagados com um bastão de cobre, em uma gota de carmin acético (Riedel) a 1%. As lamínulas foram removidas após congelamento das lâminas em freezer a - 80^o C por 2 horas. A montagem das lâminas permanentes foi feita com uso de Permount (Fisher). Os números cromossômicos por espécie e para cada população foram determinados para pelo menos 20 células.

Para as medidas cromossômicas, pelo menos cinco metáfases bem espalhadas e tomadas aleatoriamente foram examinadas em um fotomicroscópio NIKON Eclipse E600, equipado com uma câmera fotográfica modelo Cool SNAP cf (Photometrics). As imagens fotográficas foram armazenadas em microcomputador e processados usando o programa de imagens Adobe Photoshop C2, usando somente aquelas funções que podem ser aplicadas, uniformemente, em toda a imagem. Os cálculos usados para as medidas cromossômicas foram feitos com recursos do programa Excel (Microsoft). As medidas cromossômicas incluem: medidas do tamanho absoluto de cada cromossomo (em micrometros), tamanho relativo (em porcentagem) também de cada cromossomo, medida do tamanho absoluto do complemento haplóide (em micrometros), determinação do índice de assimetria cariotípica, obtido pelo cálculo da soma dos braços maiores de cada par de cromossomos divididos pelo conjunto haplóide, e relação de braços de cada cromossomo (braço maior / braço menor). Os valores de relações de braços foram usados para classificação dos cromossomos conforme o critério descrito em Levan *et al.* (1964).

Bandamento com Cromomicina (CMA₃)

As preparações cromossômicas usadas para bandamento por fluorescência com CMA₃ seguiram a metodologia utilizada em *Ruas et al 2005* e foram deixadas para envelhecer por três dias e então submetida ao mesmo protocolo utilizado para técnica de Banda C, sendo incubadas em uma solução de ácido acético a 45% a 60 °C por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e tratadas com uma solução de Ba(OH)₂ a 5% por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as preparações foram tratadas com 2x SSC a 60 °C por 1 h e 20 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar. As lâminas foram deixadas para envelhecer por três dias e então incubadas em tampão McIlvaine (ácido cítrico 0,1M, Na₂HPO₄·7H₂O 0,2M, pH 7.0) por 10 minutos e coradas com CMA₃ (0.5mg/mL em tampão McIlvaine com MgCl₂ 2,5 mM) por 1 h e 30 minutos em uma câmara escura. As preparações foram montadas em uma mistura de glicerol e tampão McIlvaine (1:1), sendo as lâminas deixadas para envelhecer por mais três dias. As metáfases foram examinadas em um fotomicroscópio NIKON Eclipse E600, equipado com uma câmera fotográfica modelo Cool SNAP cf (Photometrics) usando filtro seletivo. As imagens fluorescentes foram fotografadas, armazenadas em microcomputador e processados usando o programa de imagens Adobe Photoshop C2, usando somente aquelas funções que podem ser aplicadas, uniformemente, em toda a imagem.

Resultados e Discussão

Coloração convencional

Os dados obtidos com as medidas cromossômicas foram utilizados para identificar a fórmula cariotípica para cada uma das populações de *H. catharinensis* e *H. lutea* (Tabelas 3, 6 e 7). As figuras metafásicas, obtidas pelo método de coloração convencional de Feulgen, e os ideogramas das duas espécies são mostrados nas Figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Microfotografias das metáfases mitóticas e os ideogramas de cada uma das populações de *H. catharinensis* são apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Dados cromossômicos são inéditos para *H. catharinensis* e representam uma importante contribuição

para a compreensão dos mecanismos de diversificação do grupo sul-americano. As medidas cariomorfométricas das populações de *H. catharinensis* são apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

Análises cariotípicas de cada população de *H. catharinensis* permitiu a identificação de diferenças significativas no tamanho absoluto do complemento haplóide, variando de $13,39 \pm 2,57$ para a população do Pico Monte negro (RS) a $22,41 \pm 7,41$ para a população de Bom Retiro (SC) (Tabela 2). Os índices de assimetria são altos em todas as populações (Tabela 3), variando de $71,73 \pm 0,75$ para a população de Rancho Queimado (SC), até $78,72 \pm 0,82$ na população de Bom Retiro (SC). Este é um padrão característico que tem sido, consistentemente, observado nas espécies sul-americanas de *Hypochaeris* (Stebbins, 1953; Siljak-Yakovlev *et al.*, 1994; Ruas *et al.*, 1995; 2005; Cerbah *et al.*, 1998, Oberprieler, 2002; Weiss *et al.*, 2003; Weiss-Schneeweiss, 2003; 2007). Na análise comparativa dos dados cariomorfológicos identifica-se pequenas variações no tamanho absoluto entre cromossomos correspondentes entre as populações analisadas (Figuras 1 e 2). Além disso, variações na relação de braços (Tabela 3) sugerem que rearranjos, como inversões e transposições de segmentos cromossômicos podem estar ocorrendo nestas populações. Eventos que levam a diversificação cariotípica, tem sido relatado em outras espécies de *Hypochaeris* (para revisão ver Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2007) e são considerados como uma característica marcante no grupo sul-americano, que tem mostrado entre outros rearranjos, mudanças súbitas no tamanho dos cromossomos, possivelmente por deleção ou amplificação do DNA satélite, atividades dos retrotransposons ou mesmo reorganização do DNA ribossômico (Ruas *et al.*, 2005; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2007).

Outra característica cromossômica importante observada nestas populações de *H. catharinensis* é a presença de constrições secundárias na região intersticial do braço longo do cromossomo dois e na região próxima do centrômero do cromossomo três. Isso permite classificar a espécie *H. catharinensis* em um dos sete grupos cariotípicos, que tem sido definidos, pelas técnicas convencionais de coloração e citogenética molecular, para separação das espécies sul-americanas (Ruas *et al.*, 1995; 2005; Cerbah *et al.*, 1998; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2003; 2007). Entre os sete grupos existentes *H. catharinensis* se encaixa no grupo aspargioides, que se caracteriza por possuir constrições secundárias no braço longo do cromossomo dois e no braço curto do cromossomo três. Este é o maior grupo dos sete identificados, com dezessete espécies já incluídas por possuírem essas mesmas características.

Os dados das análises cromossômicas para as populações de *H. lutea* são mostrados na Tabela 4. As metáfases mitóticas e ideogramas identificadas para cada população são apresentadas nas Figuras 3 e 4.

As populações de *H. lutea* apresentam menor variação na estrutura cromossômica entre as populações. *Hypochaeris lutea* se caracteriza por apresentar um cariótipo representado pela fórmula $2n = 2x = 4st + 2m\text{-sat} + 2m$, com uma constrição secundária subterminal associada aos satélites no braço curto do cromossomo 3. Este padrão foi descrito para *H. rozenfurtii*, sinônimo de *H. lutea*, por (Ruas *et al.*, 1995, 2005). Comparativamente, o tamanho absoluto do complemento haplóide apresentou pouca variação, sendo o menor ($13,71 \pm 1,60$) e o maior valor ($18,52 \pm 3,48$) identificados para as populações da Serra da Rocinha-RS e para a população de Rancho Queimado-SC, respectivamente (Tabela 4). Os índices de assimetria dessas populações também são valores altos, variando de $73,33 \pm 0,74$, na população de Guaíba-RS até $75,19 \pm 0,75$ na população de São Joaquim-SC (Tabela 5). Os dados de morfologia cromossômica de *H. lutea* mostram um cariótipo mais uniforme, sugerindo que rearranjos cromossômicos são menos freqüentes nesta espécie. Quando classificado dentro dos sete grupos cariotípicos já mencionados, *H. lutea* é classificada dentro do grupo patagonica, que se caracteriza por possuir uma constrição secundária no cromossomo dois e pela presença de satélites no braço curto do cromossomo três. Esse grupo conta com a presença de apenas três espécies: *H. patagonica*, *H. lutea* e *H. alba*.

Neste estudo foi identificada a ocorrência de uma população de *H. lutea*, localizada na Serra do Rio do Rastro, Mun. Bom Jesus da Serra, SC, totalmente poliplóide (Figuras, 3 e 4). A ocorrência de poliploidia é relativamente freqüente entre as espécies de *Hypochaeris* da América do Sul, ocorrendo em vários grupos cariotípicos (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2007), sugerindo que poliploidização é um processo ativo no gênero. Em *Hypochaeris*, citótipos poliplóides tem sido identificados somente ao nível tetraplóide até o momento sendo que, em geral, indivíduos tetraplóides coexistem com diplóides na mesma população (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2007), sugerindo uma origem autopoliplóide. Na população de *H. lutea*, todos os 37 indivíduos analisados foram poliplóides. Este resultado acrescenta um dado inédito para *H. lutea*. Em *Hypochaeris* o número de sítios de rDNA de citótipos poliplóides aumenta aditivamente, assim como observado em outros grupos de plantas (de Melo e Guerra, 2005; Mishima *et al.*, 2002; Clarkson *et al.*, 2005). Entretanto, em algumas espécies, como *H. caespitosa*, ocorre perda total de um dos locus (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2007).

Distribuição de Bandas CMA-Positivas

Preparações cromossômicas de cinco das dez populações de *H. catharinensis* usadas no estudo foram submetidas ao tratamento para banda C e coradas com cromomicina (CMA_3), para identificação de regiões de heterocromatina rica GC (Figura 5, A-G). A análise dos cromossomos metafásicos mostrou, em quatro (Cambará do Sul-RS, Lages-SC, Pico Montenegro-RS, e Rancho Queimado-SC) das cinco populações submetidas ao procedimento, a presença de três blocos CMA-positivos de grande intensidade. Dois destes sinais intensos foram identificados no cromossomo 2, na região subtelomérica no braço longo e adjacente à constrição secundária no braço curto. O outro sinal intenso CMA-positivo foi observado próximo do telômero no braço longo do cromossomo 4. Além disso, vários sinais CMA-positivos adicionais e de menor intensidade foram identificados em regiões intersticiais nos pares 2, 3 e 4. A presença de muitos sinais CMA-positivos pode ser confirmada pela análise dos núcleos interfásicos, como mostrado para a população de Cambará do Sul, RS (Figura 5F). A população de São Joaquim, mostrou poucos sinais CMA-positivos de menor intensidade adjacente à constrição secundária, no cromossomo 3, além de sinais de pouca intensidade em posições intersticiais em outros cromossomos (Figura 5E). Os núcleos interfásicos desta população também mostram que sinais CMA-positivos são menos freqüentes (Figura 5G). A distribuição característica de blocos de heterocromatina rica em GC observada em *H. catharinensis* contrasta com dados descritos para outras espécies do gênero. A associação entre bandas CMA-positiva com constrições secundárias (locos de rDNA) foram descritas para outras espécies de *Hypochoeris* (Cerbah *et al.*, 1995; 1998a; Ruas *et al.*, 2005), bem como em outros grupo de plantas (Galasso *et al.*, 1995, 1998; Fukui and Nakayama, 1996, Vanzela *et al.*, 2002). A quantidade e a intensidade de sinais CMA-positivos, identificados nos cromossomos de *H. catharinensis* mostram que esta espécie apresenta um padrão distinto de heterocromatina, nunca reportado dentro do gênero. Estes dados sugerem a existência de um mecanismo que pode estar atuando na dispersão de segmentos heterocromáticos nesta espécie.

Metáfases mitóticas das cinco populações de *H. lutea* coradas com CMA_3 mostram o mesmo padrão já descrito para esta espécie (Ruas *et al.*, 2005). Blocos CMA-positivos de intensidade média foram identificados na constrição secundárias e nos satélites no braço curto do cromossomo 3. Sinais adicionais de pouca intensidade ocorrem em regiões intersticiais nos braços curto e longo do cromossomo 2 (Figura 7, A-F). Entretanto, na população de *H. lutea* da localidade Serra da Rocinha, verificou-se ausência de sinal CMA-positivo no satélite do cromossomo 3, enquanto um grande bloco de heterocromatina rica em

GC foi detectada no braço longo deste mesmo cromossomo, sugerindo a ocorrência de eventos de quebra e transposição de segmentos heterocromáticos no cromossomo 3 (Figura 7E).

Diferenças cariomorfológicas em *Hypochaeris catharinensis* e *H. lutea* incluem pequenas variações no tamanho e na morfologia dos cromossomos entre as populações, além de diferenças mais marcantes nos padrões de distribuição de bandas CMA-positivas. Estes resultados sugerem que rearranjos cromossômicos, envolvendo dispersão de segmentos heterocromáticos, são eventos ativos na evolução dos cariótipos destas espécies. Além disso, a identificação de uma população de *H. lutea* totalmente poliplóide confirma que eventos de poliplodização são de ocorrência comum entre as espécies sul-americanas de *Hypochaeris*.

Agradecimentos

Este teve suporte financeiro do CNPq (Processo no. 47951/04-7) e da Austrian Science Foundation for financial support (FWF projects P15225-BIO and P1844-BO3 to T.F. Stuessy). Os autores agradecem também ao CNPQ bolsa de estudo concedida a Fernando G. Fiorin.

Tabela 1 – Populações de *H. catharinensis* e *H. lutea*, com as respectivas áreas de coleta, número cromossômico, número de coleta e número de coleção do Herbário FUEL.

Espécies	Número de cromossomos (2n)	Origem, número das coleta, úmero de coleção (FUEL) e coletores
<i>H. catharinensis</i> Cabrera	8	Rodovia entre Angelina e Rancho Queimado. Mun. de Angelina, SC, 842m, (350/08), s/n. Collectors: CFR, PMR, EU
	8	Rodovia a 2Km de Bom Jesus da Serra, SC. Bosque com araucárias em direção a São Joaquim, 1214m (356/08), s/n. Coletores: CFR, PMR, EU
	8	Rota Bom Retiro antes de Águas Brancas, RS, 887m (354/08), s/n. Coletores: CFR, PMR
	8	Rodovia entre Cambará do Sul a São Francisco de Paula, 5km de Cambará do Sul, RS, (28/06), FUEL no. 42237. Coletores: NIM, CFR, PMR, MAO
	8	Mun de Lages, SC, (18/06), FUEL: no. 42.228. Coletores: NIM, CFR, PMR, MAO
	8	Mun. de Monte Alegre dos Campos, RS, pradaria modificada, (361/08), s/n. Coletores: CFR, PMR, EU.
	8	Pico Montenegro Mun. São José dos Ausentes, RS, 1403m (19/06), FUEL no. 42239. Coletores: NIM, MAO, CFR, PMR
	8	Rodovia SC 282, Km 82, Mun. de Rancho Queimado, em frente sede Ranchos Rurais. Horf Gottingen (04/07), FUEL n. 40656. Coletores: CFR, PMR, TJN.
	8	Rodovia entrada de São Joaquim, SC, Terreno pedregoso, (08/07), FUEL no. 40.652. Coletores: CFR, PMR, TJN
	8	Mun de Bom Jesus, RS, campo pastoreado, 1km em direção à Vacaria, 1044m, (360/08), s/n. Coletores: CFR, PMR, EU.
<i>H. lutea</i> (Vell.) Britton.	16	Serra do Rio do Rastro, Mun. Bom Jesus da Serra, SC (07/07), FUEL no. 40654. Coletores: CFR, PMR, TJN.
	8	Fazenda São Maximiano, Mun. de Guaíba, RS (02/06), FUEL no. 42235. Coletores: NIM, MAO, CFR, MPR.
	8	Rodovia 282 Mun. Rancho Queimado, SC., (352/08), s/n. Coletores: EU, CFR, PMR
	8	Rodovia entre São Joaquim Bom Jardim da Serra, SC (08/07), FUEL no. 40652. Collectors: CFR, PMR, TJN.
	8	Serra da Rocinha, entre os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, (17/06), FUEL no. 42248 Coletores: NIM, MAO, CFR, PMR

Abreviação do nome de cada coletor: CFR, Claudete de Fátima Ruas; PMR, Paulo Maurício Ruas; TJN, Thiago Jhonas Nakaiama; NIM, Nelson Ivo Matzenbacher, EU, Estrella Uturbey.

Tabela 2 – Dados morfométricos das populações de *H. catharinensis*. Tamanho total do complemento haplóide (HCL) em micrometros.

População	Par cromossômico				HCL ^a
	1	2	3	4	
<i>Tamanho absoluto (µm)</i>					
Angelina (SC)	6,33 ± 1,36	4,89 ± 1,81	2,45 ± 0,21	1,92 ± 0,35	15,59 ± 3,74
Bom Jesus (RS)	8,33 ± 1,15	5,69 ± 1,13	2,77 ± 0,51	2,37 ± 0,46	19,16 ± 3,24
Bom Jesus da Serra (SC)	8,53 ± 1,90	6,30 ± 1,78	3,18 ± 0,74	2,49 ± 0,54	20,51 ± 4,96
Bom Retiro (SC)	8,87 ± 2,49	7,28 ± 2,73	3,46 ± 0,98	2,80 ± 1,21	22,41 ± 7,41
Cambará do Sul (RS)	6,16 ± 1,36	4,27 ± 1,00	2,33 ± 0,47	1,96 ± 0,40	14,72 ± 3,23
Lages (SC)	5,70 ± 1,19	4,00 ± 0,83	2,19 ± 0,41	1,83 ± 0,32	13,72 ± 2,75
Monte Alegre dos Campos (RS)	8,00 ± 1,22	5,57 ± 0,93	2,48 ± 0,56	2,14 ± 0,35	18,19 ± 3,06
Pico Montenegro (RS)	5,63 ± 1,04	3,90 ± 0,79	2,08 ± 0,37	1,78 ± 0,37	13,39 ± 2,57
Rancho Queimado (SC)	6,54 ± 1,44	4,73 ± 0,73	2,56 ± 0,40	2,25 ± 0,40	16,08 ± 3,15
São Joaquim (SC)	6,19 ± 1,44	4,29 ± 0,85	2,23 ± 0,36	1,87 ± 0,32	14,57 ± 2,54
<i>Tamanho relativo (%)</i>					
Angelina (SC)	40,60 ± 2,55	31,37 ± 2,77	15,72 ± 1,97	12,32 ± 2,04	
Bom Jesus (RS)	43,48 ± 2,19	29,70 ± 2,18	14,46 ± 1,87	12,37 ± 1,85	
Bom Jesus da Serra (SC)	41,59 ± 3,43	30,72 ± 3,37	15,50 ± 2,85	12,14 ± 2,75	
Bom Retiro (SC)	39,58 ± 4,95	32,49 ± 5,07	15,44 ± 4,19	12,49 ± 4,31	
Cambará do Sul (RS)	41,85 ± 2,29	29,01 ± 2,11	15,83 ± 1,85	13,32 ± 1,81	
Lages (SC)	41,55 ± 1,97	29,15 ± 1,79	15,96 ± 1,58	13,34 ± 1,53	
Monte Alegre dos Campos (RS)	43,98 ± 2,14	30,62 ± 1,99	13,63 ± 1,81	11,76 ± 1,70	
Pico Montenegro (RS)	42,05 ± 1,80	29,13 ± 1,68	15,53 ± 1,47	13,29 ± 1,47	
Rancho Queimado (SC)	40,67 ± 2,29	29,42 ± 1,94	15,92 ± 1,77	13,99 ± 1,77	
São Joaquim (SC)	42,48 ± 2,29	29,44 ± 1,70	15,31 ± 1,45	12,83 ± 1,43	
<i>Relação de Braços (L/S)</i>					
Angelina (SC)	3,87 ± 0,68	3,56 ± 0,91	1,66 ± 0,11	1,98 ± 0,18	
Bom Jesus (RS)	4,24 ± 0,57	4,81 ± 0,57	1,86 ± 0,26	1,84 ± 0,23	
Bom Jesus da Serra (SC)	3,66 ± 0,95	4,25 ± 0,89	1,97 ± 0,38	1,71 ± 0,27	
Bom Retiro (SC)	4,69 ± 1,25	4,73 ± 1,37	2,43 ± 0,49	2,01 ± 0,61	
Cambará do Sul (RS)	3,88 ± 0,68	3,40 ± 0,50	1,78 ± 0,28	1,43 ± 0,20	
Lages (SC)	3,60 ± 0,59	3,45 ± 0,41	1,67 ± 0,20	1,44 ± 0,16	
Monte Alegre dos Campos (RS)	4,03 ± 0,61	3,80 ± 0,46	1,56 ± 0,28	1,74 ± 0,18	
Pico Montenegro (RS)	3,82 ± 0,52	3,25 ± 0,40	1,54 ± 0,18	1,60 ± 0,18	
Rancho Queimado (SC)	3,27 ± 0,77	3,23 ± 0,45	1,53 ± 0,20	1,54 ± 0,20	
São Joaquim (SC)	3,54 ± 0,50	3,21 ± 0,42	1,64 ± 0,18	1,56 ± 0,16	

^a HCL = sigla em inglês da expressão Total Haploid chromosome length.

Tabela 3 – Medidas dos cariótipos de *Hypochaeris catharinensis* investigados

Populações	Fórmula Cariotípica	AsI ^a	RI ^b
Angelina (SC)	4st + 4m	74,73 ± 0,76	3,30
Bom Jesus (RS)	4st + 4sm	77,20 ± 0,74	3,52
Bom Jesus da Serra (SC)	4st + 4sm	75,49 ± 0,77	3,42
Bom Retiro (SC)	4st + 4sm	78,72 ± 0,82	3,17
Cambará a São Fco de Paula (RS)	4st + 2sm + 2m	73,99 ± 0,79	3,15
Hotel Vale das Trutas - Lages (SC)	4st + 4m	73,22 ± 0,74	3,11
Monte Alegre dos Campos (RS)	4st + 2m + 2sm	75,28 ± 0,74	3,74
Pico Montenegro (RS)	4st + 4m	72,86 ± 0,75	3,16
Rancho Queimado (SC)	4st + 4m	71,73 ± 0,75	2,90
São Joaquim (SC)	4st + 4m	72,58 ± 0,73	3,32

^a AsI = sigla em inglês da expressão Asymmetry index.

^b RI = sigla em inglês da expressão Ratio Longest/Shortest pair.

Tabela 4 – Dados morfométricos das populações de *H. lutea* investigadas. Tamanho total do complemento haplóide (HCL) em micrometros.

População	Par cromossômico				HCL ^a
	1	2	3	4	
<i>Tamanho absoluto (µm)</i>					
Guaíba (RS)	6,16 ± 1,08	4,60 ± 0,84	2,33 ± 0,42	1,92 ± 0,32	15,01 ± 2,66
Rancho Queimado (SC)	8,11 ± 1,45	5,57 ± 1,33	2,58 ± 0,38	2,27 ± 0,32	18,52 ± 3,48
São Joaquim (SC)	6,76 ± 1,01	4,94 ± 0,78	2,65 ± 0,53	2,10 ± 0,51	16,45 ± 2,84
Serra da Rocinha (RS)	5,67 ± 0,45	4,21 ± 0,45	2,13 ± 0,35	1,70 ± 0,36	13,71 ± 1,60
<i>Tamanho relativo (%)</i>					
Guaíba (RS)	41,04 ± 1,87	30,65 ± 1,75	15,52 ± 1,54	12,79 ± 1,49	
Rancho Queimado (SC)	43,79 ± 2,46	30,08 ± 2,40	13,93 ± 1,93	12,26 ± 1,90	
São Joaquim (SC)	41,09 ± 1,92	30,03 ± 1,81	16,11 ± 1,68	12,77 ± 1,67	
Serra da Rocinha (RS)	41,36 ± 1,02	30,71 ± 1,02	15,54 ± 0,97	12,40 ± 0,98	
<i>Relação de braços (L/S)</i>					
Guaíba (RS)	3,72 ± 0,54	3,65 ± 0,42	1,54 ± 0,21	1,70 ± 0,16	
Rancho Queimado (SC)	3,58 ± 0,72	3,32 ± 0,67	1,95 ± 0,19	1,44 ± 0,16	
São Joaquim (SC)	3,75 ± 0,50	4,13 ± 0,36	1,89 ± 0,26	1,70 ± 0,25	
Serra da Rocinha (RS)	3,41 ± 0,22	3,80 ± 0,16	1,68 ± 0,17	1,54 ± 0,18	

^a HCL = sigla em inglês da expressão Total Haploid chromosome length.

Tabela 5 – Dados morfométricos de cromossomos da população poliplóide de *H. lutea* investigada. Tamanho total do cromossomo haplóide (HCL) (μm)

População	Par cromossômico								HCL ^a
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Bom Jesus da Serra (SC)									
Tamanho absoluto (μm)	6,19 \pm 1,09	5,70 \pm 0,99	4,48 \pm 0,86	4,16 \pm 0,82	2,19 \pm 0,37	1,99 \pm 0,36	1,85 \pm 0,32	1,67 \pm 0,30	23,24 \pm 5,10
Tamanho relativo (%)	21,92 \pm 3,09	20,18 \pm 3,04	15,86 \pm 2,98	14,73 \pm 2,98	7,75 \pm 2,73	7,05 \pm 2,73	6,55 \pm 2,71	5,91 \pm 2,70	
Relação de braços (L/S)	3,28 \pm 0,55	3,21 \pm 0,50	3,76 \pm 0,43	3,26 \pm 0,41	1,53 \pm 0,18	1,40 \pm 0,18	1,47 \pm 0,16	1,35 \pm 0,15	

^a HCL= Sigla em inglês da expressão Total chromosome length.

Tabela 6 – Medidas dos cariótipos das populações diplóides de *Hypochaeris lutea* investigadas

Populations	Karyotype formula	AsI ^a	RI ^b
Guaiba (RS)	4st + 2m-sat + 2m	73,33 \pm 0,74	3,21
Rancho Queimado (SC)	4st + 2sm-sat + 2m	73,76 \pm 0,71	3,57
São Joaquim (SC)	4st + 2sm-sat + 2m	75,19 \pm 0,75	3,22
Serra da Rocinha (RS)	4st + 2m-sat + 2m	73,53 \pm 0,65	3,33

^a AsI = sigla em inglês da expressão Asymmetry index.

^b RI = sigla em inglês da expressão Ratio Longest/Shortest pair.

Tabela 7 – Medidas dos cariótipos da população poliplóide de *Hypochaeris lutea* investigada

Populations	Karyotype formula	AsI ^a	RI ^b
Bom Jesus da Serra (SC)	8st + 4m-sat + 4m	72,12 \pm 0,74	3,7

Tabela 8 – Distribuição de bandas de Cromomicina (CMA_3) em populações de *Hypochoeris catharinensis*

População	número e distribuição das bandas de Cromomicina (CMA_3)
Cambará do Sul (RS)	2 (CS do BL e BC do par 2); 2 (CS do BC e BL do par 3) e 1 (BL do par 4)
Lajes (SC)	2 (CS do BL do par 2); 2 (CS do BC e BL do par 3) e 1 (BL do par 4)
Pico Montenegro (RS)	2 (CS do BL do par 2); 2 (CS do BC e BL do par 3) e 1 (BL do par 4)
Rancho Queimado (SC)	2 (CS do BL e BC do par 2); 2 (CS do BC e BL do par 3) e 1 (BL do par 4)
São Joaquim (SC)	1 (CS do BL do par 2); 2 (CS do BC e BL do par 3) e 1 (BL do par 4)

CS= constrição secundária; BL= Braço Longo e BC= braço curto

Tabela 9 – Distribuição de bandas de Cromomicina A_3 em populações de *Hypochoeris lutea*

Populações	número e distribuição das bandas de Cromomicina (CMA_3)
Bom Jesus da Serra (SC)	2 (BC e BL do par 3); 2 (BC e Bl do par 4); 1 (sat do par 5) e 1 (sat do par 6)
Guaíba (RS)	2 (BC e BL do par 2) e 1 (sat do par 3)
Rancho Queimado (SC)	2 (BC e BL do par 2) e 1 (sat do par 3)
São Joaquim (SC)	2 (BC e BL do par 2) e 1 (sat do par 3)
Serra da Rocinha (RS)	1 (BL do par 3)

sat= Região satélite; BC= Braço Curto e BL= Braço Longo

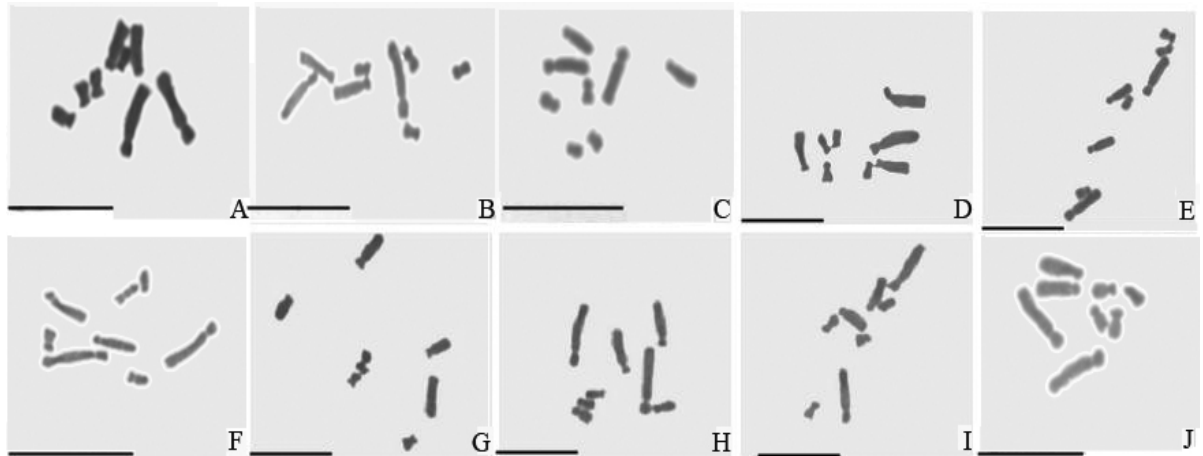


Figura 1 – Cromossomos das populações de *Hypochaeris catharinensis*: A- Angelina (SC); B – Bom Jesus da Serra (SC); C- Bom Retiro (SC); D- Cambará do Sul (RS); E - Lajes (SC); F – Monte Alegre dos Campos (RS); G - Pico Monte Negro (RS); H – Rancho Queimado (RS); I – São Joaquim (SC) e J – Bom Jesus (RS). Barra de escala: 10 μ m

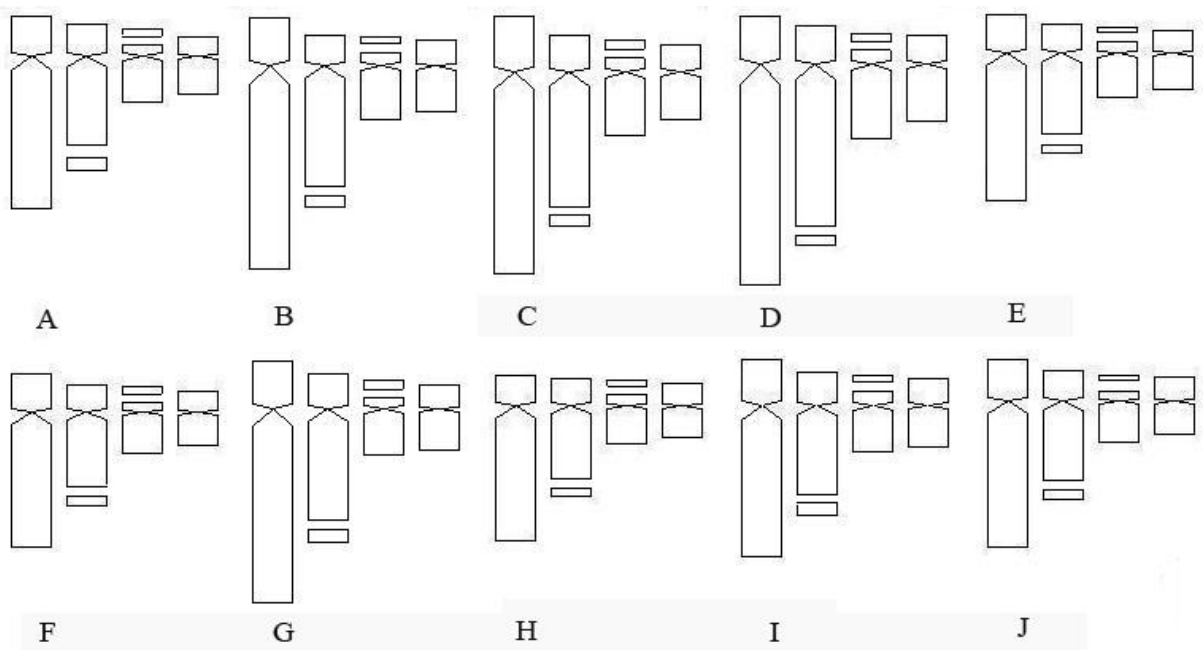


Figura 2 – Ideograma comparativo das populações de *Hypochaeris catharinensis*. A- Angelina (SC); B – Bom Jesus da Serra (SC); C – Bom Retiro (SC); D – Cambará do Sul (RS); E – Lajes (SC); F – Monte Alegre dos Campos (RS); G – Pico Monte Negro (RS); H – Rancho Queimado (SC); I – São Joaquim (SC) e J – Bom Jesus (RS)

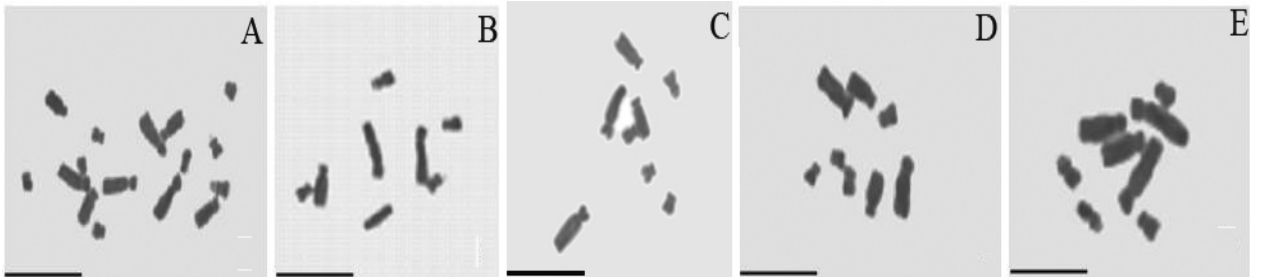


Figura 3 – cromossomos das populações de *Hypochaeris lutea*: A – Bom Jesus da Serra (SC); B – Guaíba (RS); C – Rancho Queimado (SC); D – São Joaquim (SC); E – Serra da Rocinha (RS). Barra de escala: 10µm

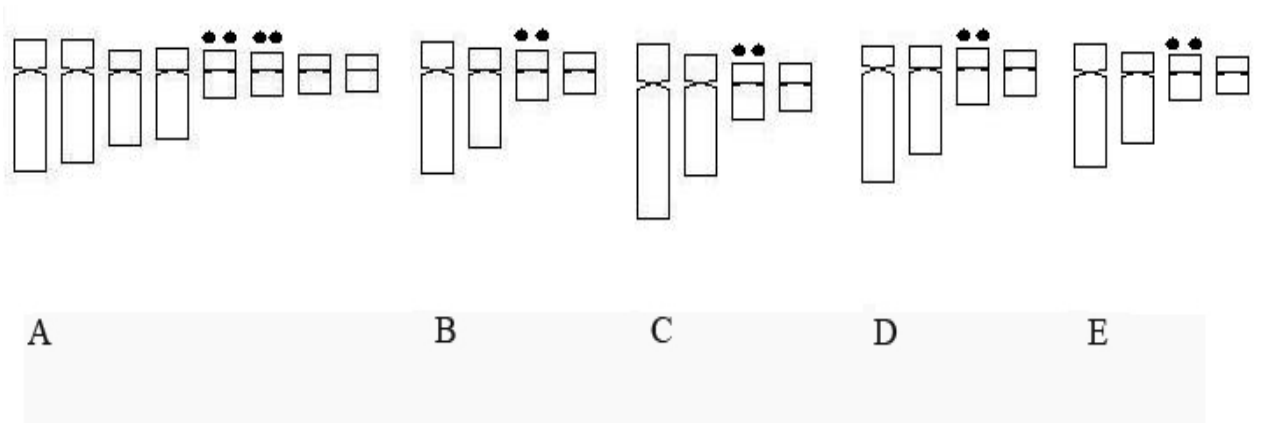


Figura 4 – Ideograma comparativo das populações de *Hypochaeris lutea*. A – Bom Jesus da Serra (SC); B - Guaíba (RS); C – Rancho Queimado (SC); D – São Joaquim (SC) e E – Serra da Rocinha (RS)

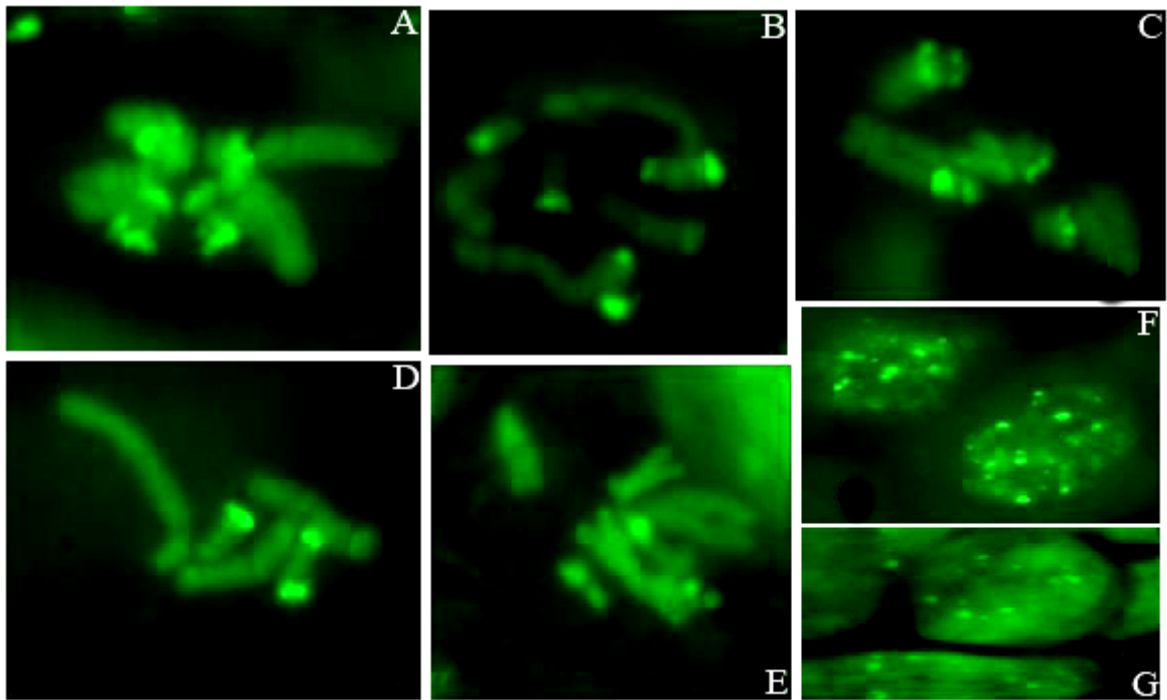


Figura 5 – Metáfases e interfases de populações de *Hypochaeris catharinensis* coradas com Cromomicina (CMA_3). A – Cambará do Sul (RS); B - Lajes (SC); C – Pico Montenegro (RS); D – Rancho Queimado (SC); E - São Joaquim (SC); F – Rancho Queimado (SC) e G – São Joaquim (SC)

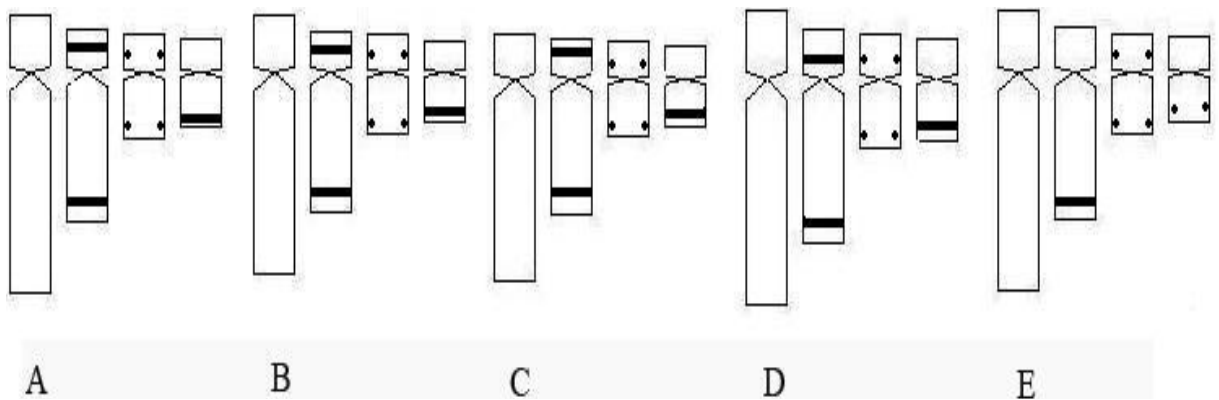


Figura 6 – Ideograma mostrando regiões coradas com Cromomicina (CMA_3) nas populações de *Hypochaeris catharinensis*. A- Cambará do Sul (RS); B - Lajes (SC); C – Pico Montenegro (RS); D – Rancho Queimado (SC) e E - São Joaquim (SC)

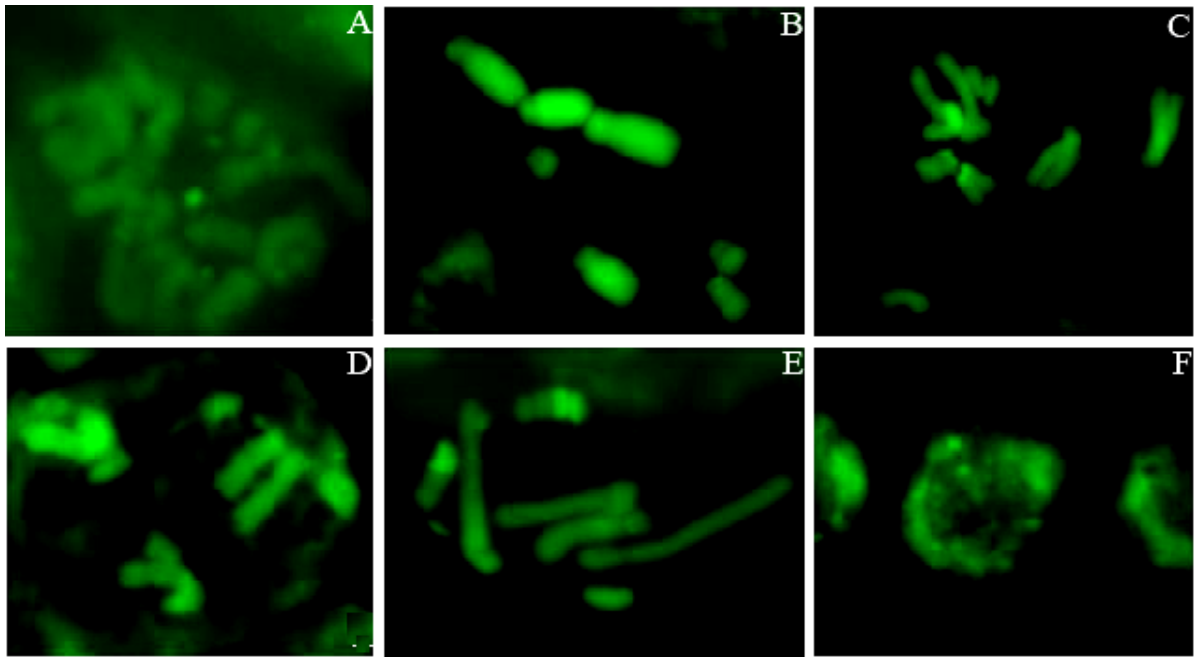


Figura 7 – Cromossomos metafásicos corados com o fluorocromo Cromomicina (CMA_3) em cinco populações de *Hypochaeris lutea*. A – Bom Jesus da Serra (SC); B - Guaíba (RS); C – Rancho Queimado (SC); D – São Joaquim (SC); E e F – Serra da Rocinha (RS)

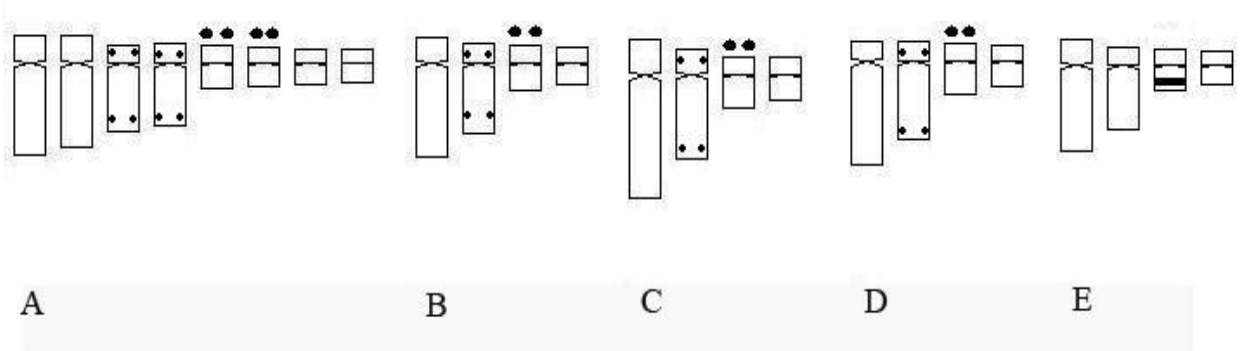


Figura 8 – Ideograma mostrando regiões coradas com Cromomicina (CMA_3) nas populações de *Hypochaeris lutea*. A – Bom Jesus da Serra (SC); B - Guaíba (RS); C – Rancho Queimado (SC); D – São Joaquim (SC) e E – Serra da Rocinha (RS)

REFERÊNCIAS

- Azevêdo-Gonçalves CF (2004) O Gênero *Hypochoeris* L. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Rio Grande do Sul: 3-7, 51-131.
- Barghi N, Mugnier C and Siljak-Yakovlev S (1989) Karyological studies in some *Hypochoeris* species from Sicily. *Plant Systematics and Evolution* 168: 49–57.
- Bortiri E (1999) Asteraceae, parte 14. Tribu XIII. Lactuceae. *Hypochoeris*. *Flora Fanerogâmica Argentina* 63: 1–25.
- Clarkson JJ, Lim KY, Kovarik A, Chase MW, Knapp S and Leitch AR (2005) Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana* section *Repandae* (Solanaceae). *New Phytologist* 168: 241–252.
- Cerbah M, Coulaud J, Brown SC, Siljak-yakovlev S (1998a) Evolutionary DNA variation in the genus *Hypochoeris*. *Heredity* 82: 261-266.
- Cerbah M, Coulaud J, Brown SC and Siljak-yakovlev S (1998b) rDNA organization and Evolutionary relationships in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). *The American Genetic Association* 89: 312-318.
- Cerbah M, Souza-chies T, Jubier M.F, Lejeune B and Siljak-yakovlev S (1998) Molecular phylogeny of the genus *Hypochoeris* using Internal Transcribed Spacers of Nuclear RNA: Inference for Chromosomal evolution. *Mol. Bio. Evol.* 15: 345-354.
- DeFillips RA (1976) *Hypochoeris*. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A., eds. *Flora Europaea*, Vol. 4. Cambridge: Cambridge University Press, 308–310.
- Fukui K and Nakayama S (1996) *Plant Chromosomes: Laboratory methods*. CRC press: 135-140.
- Hall KJ and Parker JS (1995) Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chromosome Research*. 3:417–422
- Hoffmann O (1893) *Hypochoeris* L. In: Die natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten, insbesondere den Nutzpflanzen—Engler A, Prantl K, eds. Leipzig: Wilhelm Engelmann. 361–363. *IV Teil. 5. Abteilung*.
- Lack HW (1979) The subtribe Hypochoeridinae (Asteraceae, Lactuceae) in the tropics and the Southern Hemisphere. In: *Tropical botany*—Larsen K, Holm-Nielsen LB, eds. London: Academic Press. 265–276.
- Levan A, Fredga K and Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosome. *Hereditas* 52: 201-220.
- Melo NF and Guerra M (2005) Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* 92: 309–316.

- Matzernbacher, NI (1998) *O complexo "Senecionioide" (Asteraceae – Senecioneae) no Rio Grande do Sul, Brasil*. Tese de doutorado em Ciências, área de concentração em Botânica. Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 274p., il.
- Mishima M, Ohmido N, Fukui K, Yahara T (2002) Trends in site number change of rDNA loci during polyploid evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae). *Chromosoma* 110: 550–558.
- Mix C, Arens PFP, Ouborg NJ and Smulders M JM (2004) Isolation and Characterization of highly polymorphic microsatellite markers in *Hypochaeris radicata* (Asteraceae). *Molecular Ecology Notes* 4: 656-658.
- Muellner AN, Tremetsberger K, Stuessy T and Baeza CM (2005) Pleistocene refugia and recolonization routes in the Southern Andes, insights from *Hypochaeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology* 14: 203-212.
- Mugnier C and Siljak-Yakovlev S (1987) Karyological study in some Yugoslavian populations of *Hypochaeris* (Compositae). *Caryologia* 40: 319–325.
- Nogueira CZ, Ruas PM, Ruas CF and Ferrucci, MS (1995) Karyotypic study of some species of *Serjania* and *Urvillea* (Sapindaceae; Tribe Paullinieae). *American Journal of Botany* 82: 646-649, 653-654.
- Oberprieler CA (2002) *Hypochaeris* L. In: Valdés B, Rejdali M, Achhal El Kadmiri A, Jury SL, Montserrat JM, eds. *Catalogue des plantes vasculaires du Nord du Maroc, incluant des clés d'identification*, Vol. 2. Madrid: CSIC, 686–687.
- Oberprieler C and Vogt R (2002) *Hypochaeris arachnoidea* Poir., a hitherto neglected species in NW Africa. *Willdenowia* 32, 231–236.
- Parker JS (1976) The B-chromosome system of *Hypochaeris maculata*. I. B-distribution, meiotic behaviour and inheritance. *Chromosoma* 59: 167–177.
- Ruas CF, Ruas PM, Matzenbacher NI, Ross G, Bernini C and Vanzela ALL (1995) Cytogenetic studies of some *Hypochaeris* species (Compositae) from Brazil. *Amer. J. Bot.* 82: 369-375.
- Ruas CF, Vanzela ALL, Santos MO, Fregonezi JN, Ruas PM, Matzenbacher N and Aguiar-Perecin MLR (2005) Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 28: 129-139.
- Samuel R, Stuessy TF, Tremetsberger K, Baeza CM and Siljak-yakovlev S (2003) Phylogenetic relationships among species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Cichorieae) based on ITS, plastid trnL intron, trnL-F spacer, and matK sequences. *American Journal of Botany* 90 (03): 496-507.
- Samuel R, Stuessy TF, and Baeza CM (2002) Phylogeny of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Österreichisches Botanikertreffen* 30: 87-88.
- Siljak-Yakovlev S, Bartoli A, Roitman G, Barghi N and Mugnier CA (1994) Etude caryologique de trois espèces d'*Hypochaeris* originaires d'Argentine: *H. chillensis*, *H.*

microcephala var. *albiflora* et *H. megapotamica*. *Canadian Journal of Botany* 72: 1496–1502.

Stebbins GL, Jenkins JA and Walters M (1953) Chromosomes and phylogeny in the Compositae, tribe Cichorieae. University of California Publications in Botany 26: 401–430.

Stuessy TF, Tremetsberger K, Müllner A N, Jankowics J, Guo Y-Ping, Baeza CM and Samuel RM (2003) The melding of systematics and biogeography through investigation at the populational level: Examples from genus *Hypochaeris* (Asteraceae). *Basic Appl. Ecol.* 4: 287–296.

Stuessy TF (2001) La filogenia y biogeografía de *Hypochaeris* (Asteraceae) en América del Sur. *Seminars on Plant Ecology and Evolution*, Universidad de Sevilla.

Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy TF, Ortiz MA and Kadlec G (2004) Relationship of *Hypochaeris salzmannianna* (Asteraceae, Lactuceae), and endangered species of the Iberian Peninsula, to *H. radicata* and *H. glabra* and biogeographical implications. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 146: 79-95.

Tremetsberger K, Weiss-Schneeweiss H, Stuessy T, Samuel R, Kadlec G, Ortiz MA and Talavera S. (2005) Nuclear ribosomal DNA and karyotypes indicate a NW

African origin of South American *Hypochaeris* (Asteraceae, Cichorieae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 102-116.

Tremetsberger K, Stuessy TF, Kadlec G, Urtubey E, Baeza CM, Beck SG, Valdebenito HA, Ruas CF, Matzenbacher NI (2006) AFLP phylogeny of South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Syst. Bot.* 31: 610–626.

Vanzela ALL, Ruas CF, Oliveira MF, Ruas PM (2002) Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. 114:105-111.

Weiss- Schneeweiss H, Stuessy TF, Siljak-yakovlev S, Baeza CM, and Parker J (2003) Karyotype evolution in South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Plant Syst. Evol.* 241: 171-184.

Weiss H, Stuessy TF, Grau J, Baeza CM (2003) Chromosome reports from South American *Hypochaeris* (Asteraceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 90:56–63.

Conclusões

- As duas espécies estudadas e suas populações possuem o padrão cariotípico das espécies sul-americanas com cariótipos assimétricos e bimodais, com pequenas variações no tamanho absoluto entre cromossomos correspondentes. Sugere-se que rearranjos estruturais podem estar ocorrendo nestas populações.

- *H. catharinensis* possui constrições secundárias no braço longo do cromossomo dois e no braço curto do cromossomo três. Isso permite classificar a espécie dentro de um dos sete grupos cromossômicos existentes, conhecido como grupo Aspargióides.

- Coloração com cromomicina em *H. catharinensis* apresentaram mostra presença, não usual para o gênero, de dois grandes blocos heterocroático (CMA-positivos) além de alguns sinais mais fracos em regiões intersticiais dos cromossomos.

- A distribuição de blocos de heterocromatina ricos em GC encontrado *H. catharinensis* sugere a existência de um mecanismo que pode estar atuando na dispersão de segmentos heterocromáticos nesta espécie.

- As populações de *H. lutea* também mostram pouca variação cariotípica e alto índice de assimetria. As poucas variações encontradas derivam possivelmente, de rearranjos estruturais nos cromossomos.

- Dentro dos sete grupos sul-americanos de *Hypochoeris*, *H. lutea* se encontra no grupo patagonica, que se caracteriza por possuir uma constrição secundária no cromossomo dois e DNA satélite no braço curto do cromossomo três.

- Uma das populações de *H. lutea* (Bom Jesus da Serra, SC) apresentou todos os indivíduos estudados poliplóides, fato inédito para essa espécie.

- Sinais CMA-positivos de menor intensidade aparecem na constrição secundária e satélites do cromossomo 3, com poucos sinais adicionais nos demais cromossomos.

REFERÊNCIAS GERAL

- Azevêdo-Gonçalves, C. F. (2004). *O Gênero Hypochaeris L. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil*. Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Rio Grande do Sul: 3-7, 51-131.
- Barghi, N.; Mugnier, C.; Siljak-Yakovlev, S. (1989). Karyological studies in some *Hypochaeris* species from Sicily. *Plant Systematics and Evolution* 168: 49–57.
- Bortiri, E. (1999). Asteraceae, parte 14. Tribu XIII. Lactuceae. *Hypochaeris*. *Flora Fanerogâmica Argentina* 63: 1–25.
- Clarkson, J. J.; Lim, K.Y.; Kovarik, A.; Chase, M.W.; Knapp, S.; Leitch, A.R. (2005). Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana* section *Repandae* (Solanaceae). *New Phytologist* 168: 241–252.
- Cerbah, M.; Coulaud, J.; Brown, S.C.; Siljak-yakovlev, S. (1998a). Evolutionary DNA variation in the genus *Hypochaeris*. *Heredity* 82: 261-266.
- Cerbah, M.; Coulaud, J.; Brown, S.C.; Siljak-yakovlev, S. (1998b). rDNA organization and Evolutionary relationships in the genus *Hypochaeris* (Asteraceae). *The American Genetic Association* 89: 312-318.
- Cerbah, M.; Souza-chies, T.; Jubier, M.F.; Lejeune, B.; and Siljak-yakovlev, S. (1998). Molecular phylogeny of the genus *Hypochaeris* using Internal Transcribed Spacers of Nuclear RNA: Inference for Chromosomal evolution. *Mol. Bio. Evol.* 15: 345-354.
- DeFillips, R. A. (1976). *Hypochaeris*. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A., eds. *Flora Europaea*, v. 4. Cambridge: Cambridge University Press, 308–310.
- Fukui, K.; Nakayama, S. (1996). Plant chromossomes: Laboratory methods. CRC press: 135-140.
- Hall, K. J.; Parker, J. S. (1995). Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chromosome Research*. 3:417–422
- Hoffmann O. (1893). *Hypochaeris* L. In: Die natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten, insbesondere den Nutzpflanzen—Engler A, Prantl K, eds. Leipzig: Wilhelm Engelmann. 361–363. *IV Teil. 5. Abteilung*.
- Lack, H. W. (1979). The subtribe Hypochaeridinae (Asteraceae, Lactuceae) in the tropics and the Southern Hemisphere. In: Larsen K, Holm-Nielsen LB, eds. *Tropical botany*. London: Academic Press. 265–276.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosome. *Hereditas* 52: 201-220.
- Matzernbacher, N. I. (1998). *O complexo “Senecionoide” (Asteraceae – Senecioneae) no Rio Grande do Sul, Brasil*. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 274p., il.

- Melo, N. F.; Guerra, M. (2005). Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* 92: 309–316.
- Mishima, M.; Ohmido, N.; Fukui, K.; Yahara, T. (2002). Trends in site number change of rDNA loci during polyploid evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae). *Chromosoma* 110: 550–558.
- Mix, C.; Arens, P. F. P.; Ouborg, N. J.; Smulders, M. J. M. (2004). Isolation and Characterization of highly polymorphic microsatellite markers in *Hypochaeris radicata* (Asteraceae). *Molecular Ecology Notes* 4: 656–658.
- Muellner, A. N.; Tremetsberger, K.; Stuessy, T.; Baeza, C. M. (2005). Pleistocene refugia and recolonization routes in the Southern Andes, insights from *Hypochaeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology* 14: 203–212.
- Mugnier, C.; Siljak-Yakovlev, S. (1987). Karyological study in some Yugoslavian populations of *Hypochaeris* (Compositae). *Caryologia* 40: 319–325.
- Nogueira, C. Z.; Ruas, P. M.; Ruas, C. F.; and Ferrucci, M. S. (1995). Karyotypic study of some species of *Serjania* and *Urvillea* (Sapindaceae; Tribe Paullinieae). *American Journal of Botany* 82: 646–649, 653–654.
- Oberprieler, C. A. (2002). *Hypochaeris* L. In: Valdés B, Rejdali M, Achhal El Kadmiri A, Jury SL, Montserrat JM, eds. *Catalogue des plantes vasculaires du Nord du Maroc, incluant des clés d'identification*, v. 2. Madrid: CSIC, 686–687.
- Oberprieler, C.; Vogt, R. (2002). *Hypochaeris arachnoidea* Poir., a hitherto neglected species in NW Africa. *Willdenowia* 32, 231–236.
- Parker, J. S. (1976). The B-chromosome system of *Hypochaeris maculata*. I. B-distribution, meiotic behaviour and inheritance. *Chromosoma* 59: 167–177.
- Ruas, C.F.; Ruas, P. M.; Matzenbacher, N. I.; Ross, G.; Bernini, C.; Vanzela, A.L.L. (1995). Cytogenetic studies of some *Hypochaeris* species (Compositae) from Brazil. *Amer. J. Bot.* 82: 369–375.
- Ruas, C. F.; Vanzela, A. L.L.; Santos, M. O.; Fregonezi, J. N.; Ruas, P. M.; Matzenbacher, N.; and Aguiar-Perecin, M. L. R. (2005). Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 28: 129–139.
- Samuel, R.; Stuessy, T. F.; Tremetsberger, K.; Baeza, C. M.; and Siljak-yakovlev, S.. (2003). Phylogenetic relationships among species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Cichorieae) based on ITS, plastid trnL intron, trnL-F spacer, and matK sequences. *American Journal of Botany* 90 3: 496–507.
- Samuel, R.; Stuessy, T. F.; and Baeza, C. M.; (2002). Phylogeny of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Österreichisches Botanikertreffen* 30: 87–88.
- Siljak-Yakovlev S.; Bartoli, A.; Roitman, G.; Barghi, N.; Mugnier, C.A. (1994). Etude caryologique de trois espèces d'*Hypochaeris* originaires d'Argentine: *H. chillensis*, *H.*

microcephala var. *albiflora* et *H. megapotamica*. *Canadian Journal of Botany* 72: 1496–1502.

Stebbins, G. L.; Jenkins, J. A.; Walters, M. (1953). *Chromosomes and phylogeny in the Compositae, tribe Cichorieae*. University of California Publications in Botany 26: 401–430.

Stuessy, T. F.; Tremetsberger, K.; Müllner, A. N.; Jankowics, J.; Guo, Y-Ping; Baeza, C. M.; Samuel, R. M. (2003). The melding of systematics and biogeography through investigation at the populational level: Examples from genus *Hypochaeris* (Asteraceae). *Basic Appl. Ecol.* 4: 287-296.

Stuessy, T.F. (2001). La filogenia y biogeografía de *Hypochaeris* (Asteraceae) en América del Sur. *Seminars on Plant Ecology and Evolution*, Universidad de Sevilla.

Tremetsberger, K.; Talavera, S.; Stuessy, T. F.; Ortiz, M. A.; and Kadlec, G. (2004). Relationship of *Hypochaeris salzmannianna* (Asteraceae, Lactuceae), and endangered species of the Iberian Peninsula, to *H. radicata* and *H. glabra* and biogeographical implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 146: 79-95.

Tremetsberger, K.; Weiss-Schneeweiss, H.; Stuessy, T.; Samuel, R.; Kadlec, G.; Ortiz, M. A.; and Talavera, S. (2005). Nuclear ribosomal DNA and karyotypes indicate a NW African origin of South American *Hypochaeris* (Asteraceae, Cichorieae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 102-116.

Tremetsberger, K., Stuessy, T. F., Kadlec, G., Urtubey, E., Baeza, C. M., Beck, S. G., Valdebenito, H. A., Ruas, C. F., Matzenbacher, N. I. (2006). AFLP phylogeny of South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Syst. Bot.* 31: 610–626.

Vanzela, A. L. L.; Ruas, C. F.; Oliveira, M. F.; Ruas, P. M. (2002). Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. 114:105-111.

Weiss-Schneeweiss, H.; Stuessy, T. F.; Siljak-yakovlev, S.; Baeza, C. M.; and Parker J. (2003). Karyotype evolution in South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Plant Syst. Evol.* 241: 171-184.

Weiss H., Stuessy, T. F.; Grau J.; Baeza, C.M. (2003). Chromosome reports from South American *Hypochaeris* (Asteraceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 90: 56–63.

Weiss-Schneeweiss, H.; Stuessy, T. F.; Tremetsberger, K.; Urtubey, E.; Valdebenito, H. A.; Beck, S. G.; and Baeza, C. M. (2007). Chromosome numbers and Karyotypes of South American species and population of *Hypochaeris* (Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 49-60.

CONCLUSÕES GERAIS

- As duas espécies estudadas e suas populações possuem o padrão cariotípico das espécies sul-americanas com cariótipos assimétricos e bimodais, com pequenas variações no tamanho absoluto entre cromossomos correspondentes. Sugere-se que rearranjos estruturais podem estar ocorrendo nestas populações;

- *H. catharinensis* possui constrições secundárias no braço longo do cromossomo dois e no braço curto do cromossomo três. Isso permite classificar a espécie dentro de um dos sete grupos cromossômicos existentes, conhecido como grupo Aspargioides;

- Coloração com cromomicina em *H. catharinensis* mostram presença, não usual para o gênero, de dois grandes blocos heterocroático (CMA-positivos) além de alguns sinais mais fracos em regiões intersticiais dos cromossomos;

- A distribuição de blocos de heterocromatina ricos em GC encontrado *H. catharinensis* sugere a existência de um mecanismo que pode estar atuando na dispersão de segmentos heterocromáticos nesta espécie;

- Uma das populações de *H. lutea* (Bom Jesus da Serra, SC) apresentou todos os indivíduos estudados poliplóides, fato inédito para essa espécie;

- Sinais CMA-positivos de menor intensidade aparecem na constrição secundária e satélites do cromossomo 3, com poucos sinais adicionais nos demais cromossomos.