

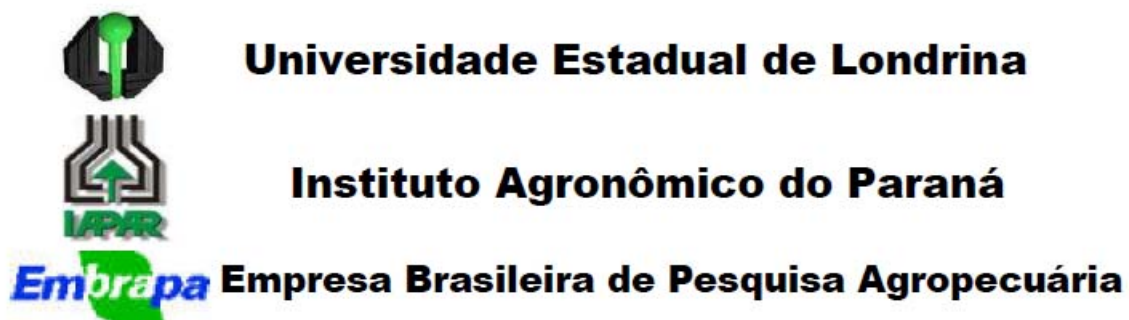


UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JUAN DOMINGO URDAMPILLETA

**“ESTUDO CITOGENETICO EM PAULLINIEAE
(SAPINDACEAE)”**

Londrina
2005



JUAN DOMINGO URDAMPILLETA

**“ESTUDO CITOGENETICO EM PAULLINIEAE
(SAPINDACEAE)”**

Londrina
2005

JUAN DOMINGO URDAMPILLETA

**“ESTUDO CITOGENETICO EM PAULLINIEAE
(SAPINDACEAE)”**

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

Orientador: Profº. Dr. André Luís Laforga Vanzela

Londrina
2005

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

U74e Urdampilleta, Juan Domingo
Estudo citogenético em Paullinieae (Sapindaceae) / Juan Domingo
Urdampilleta – Londrina, 2005.
71f. : il.

Orientador: André Luis Laforga Vanzela.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Instituto Agronômico do Paraná, Empresa Brasileira de
Pesquisa Agropecuária, 2005.

1. Sapindaceae – Teses. 2. Taxonomia vegetal – Teses. 3. Citogenética
vegetal – Teses. 4. Biologia vegetal – Teses. 5 Genética molecular – Teses.
I. Vanzela, André Luis Laforga. II. Universidade Estadual de Londrina. III.
Instituto Agronômico do Paraná. IV. Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária. V. Título.

CDU 577.2

JUAN DOMINGO URDAMPILLETA

**“ESTUDO CITOGENETICO EM PAULLINIEAE
(SAPINDACEAE)”**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela
UEL – Londrina-PR

Prof. Dr. Mario Sergio Mantovani
UEL – Londrina-PR

Profa. Dra. Maria Silvia Ferrucci
Instituto de Botanica del Nordeste, UNNE

Londrina, 17 de fevereiro de 2005.

A meu Pai.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a meu orientador, André L. L. Vanzela, por haver permitido desenvolver esta pesquisa, trabalhando com muito estímulo e compromisso numa área que acho particularmente apaixonante.

À comissão examinadora, Mario S. Mantovani, Rogério F. Sousa, Ana Lucia Dias pelos importantes e construtivos comentários e correções deste trabalho, e em especial a Maria S. Ferrucci pelo constante estímulo e controle deste trabalho, e que sem ela não seria possível.

A todo o pessoal do LABRE, funcionários, pesquisadores, alunos e muitas outras pessoas que passaram por este laboratório, com os quais além de compartilhar o espaço, muitos momentos bons, que não só ficaram em minhas lembranças, também formaram parte de minha formação.

Ao programa e a todos os professores e funcionários do departamento, que formaram parte de minha formação tanto no mestrado como no pessoal, sempre tratado com muito carinho e respeito.

A CAPES e PROPG pelo apoio financeiro na pesquisa.

A todas as pessoas que conheci da UEL, que apesar dos eventos sucedidos na Copa Libertadores de América no ano 2003 onde Boca Junior foi campeão, sempre fui um argentino tratado carinhosamente.

E especialmente a minha família, Nelci e Verena que são as pessoas que amo, e que estimulam todos os dias de minha vida...

URDAMPILLETA, Juan Domingo. **Estudo citogenético em paullinieae (sapindaceae)**. 2005. 71f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

RESUMO

A tribo Paullinieae, de distribuição neotropical, cotem cerca do 25% das espécies da família Sapindaceae, sendo considerada a tribo com um maior número de caracteres derivados dentro da família. *Paullinia* L., *Serjania* Mill. e *Urvillea* Kunth apresentam cerca de 400 espécies representando um total de 20% da família. Quatro espécies de *Paullinia*, quatorze de *Serjania* e 4 de *Urvillea* foram estudadas neste trabalho mediante as técnicas de HCl/Giemsa, bandamentos C e C-CMA₃/DAPI e FISH utilizando a sonda de DNAr 45S, e a sonda de 5S em três espécies de *Urvillea*. *Paullinia* e *Serjania* são caracterizadas pela conservação do número cromossômico $2n= 24$, no entanto, *Urvillea* possui uma diferenciação nos números básicos entre as seções ($x= 11$ e 12) e uma série poliplóide característica da seção *Urvillea* ($2n= 22, 44$ e 88). *Serjania* apresenta uma ligeira diferenciação cariotípica, sendo o padrão de bandas homogêneo, caracterizado somente pela presença de bandas C-CMA₃ associadas aos sítios de DNAr 45S. Em *Paullinia* também existe uma relativa diferenciação cariotípica, mas o padrão de bandas não é homogêneo, já que ocorrem bandas C-Giemsa neutras em algumas espécies do gênero. Em *Urvillea*, o grau de diferenciação cariotípica é ainda maior. Além da variação no número cromossômico, existe uma importante diferenciação cariotípica, tanto na estrutura cariotípica como padrão de bandas. Os padrões de bandas em *Urvillea* são extremamente variáveis entre as espécies sugerindo a existência de um processo de acúmulo de heterocromatina nas regiões cromossômicas terminais, tanto ricas em AT quanto em GC. Em *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea*, os sítios de DNAr 45S são associados a regiões ricas em GC, sendo o número variável entre espécies. Por outro lado os sítios de DNAr 5S, demonstram em *Urvillea* que podem ou não estar associadas aos sítios de 45S. Os resultados mostram que variação na quantidade e na distribuição de DNA repetitivo é significativa na diferenciação cariotípica em Paullinieae, resultando uma nova fonte de informação importante para entender a organização da tribo.

Palavras-chave: Sapindácea. Taxonomia vegetal. Citogenética vegetal. Genética molecular.

URDAMPILLETA, Juan Domingo. **Estudo citogenético em paullinieae (sapindaceae)**. 2005. 71f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

ABSTRACT

The tribe Paullinieae comprises about 25% from species of Sapindaceae family, which are mainly distributed in the neotropical region and considered highly derived within of family. *Paullinia* L., *Serjania* Mill. and *Urvillea* Kunth (Paullinieae: Sapindaceae) genera possess about 400 species representing a 20% of the family. Four species of *Paullinia*, fourteen of *Serjania* and four of *Urvillea* were studied in this work by techniques of HCl/Giemsa, C and C-CMA3/DAPI banding and FISH using DNAr 45S probe, and 5S probe in three species of *Urvillea*. *Paullinia* and *Serjania* are characterized by $2n = 24$ chromosome number conservation, meanwhile *Urvillea* possesses a differentiation in the basic numbers between its sections ($x = 11$ e 12) and a polyploid series typical only of section *Urvillea* ($2n = 22, 44, 88$). *Serjania* presents a light karyomorphological differentiation, with homogeneous banding pattern, characterized for signals C-CMA₃ associated to DNAr 45S loci. *Paullinia* also possesses a relative karyological differentiation, but the banding pattern is not homogeneous, because to that happen bands neutral C-Giemsa in some species of the gender. The degree of karyotypical differentiation is larger in *Urvillea*. Besides its variation in the chromosome number, exists an important karyotypical differentiation, so much in the karyotypic structure as banding pattern. The patterns of bands in *Urvillea* are variable among the species suggesting the existence of a process of heterochromatin accumulation in terminal chromosomal areas, so much rich in bases AT as in GC. In *Paullinia*, *Serjania* and *Urvillea*, the DNAr 45S loci are associated to rich areas in GC, being the variable number among species. On the other hand the DNAr 5S loci, demonstrate in *Urvillea* that can or not to be associated to DNAr 45S loci. The results show that variation in the amount and distribution of repetitive DNA is significant in the karyotypical differentiation in Paullinieae, resulting in a new source of important information to understand the organization of the tribe.

Keywords: Botanical systematists. Plant cytogenetics. Sapindaceae.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema filogenético proposto para Sapindales baseado no seqüenciamento do gene *rbcl* 13
- Figura 2** - Tipos básicos de frutos encontrados em Paullinieae. A, fruto ezquizocarpo (*Houssayanthus*, *Lophostigma* e *Serjania*); B, fruto cápsula (*Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*)..... 17
- Figura 3** - Distintos frutos encontrados em Paullinieae. A, *Cardiospermum grandiflorum*; B, *Paullinia pinnata*; C, *Serjania hebecarpa*; D, *Urvillea chacoensis*..... 17
- Figura 4** – Presença dos números básicos reportados nos distintos gêneros de Sapindaceae.....20
- ARTIGO 1**
- Figura 1** - Metáfases mitóticas de *S. glutinosa* (A), *S. gracilis* (B), *S. platycarpa* (C), *S. larotteana* (D), *S. glabrata* (E), *S. tripleuria* (F) e *S. perulacea* (G). Barra = 10 mm. 36
- Figura 2** - Metáfases mitóticas de *S. crassifolia* (A), *S. fuscifolia* (B), *S. hebecarpa* (C), *S. meridionalis* (D), *S. multiflora* (E), *S. communis* (F) e *S. regnellii* (G). Barra = 10 mm. 37
- Figura 3** - Coloração HCl/Giemsa em *Serjania*, núcleos interfásicos semireticulados (A) e prófase mitótica (B), bandamento C-Giemsa em *S. gracilis* (C). Bandamento C-CMA3 em *S. communis* (D,E), *S. crassifolia* (F), *S. fuscifolia* (G), *S. larotteana* (H), *S. meridionalis* (I), *S. glabrata* (J), *S. perulacea* (K) e *S. platycarpa* (L). Barra = 10 mm. 38
- Figura 4** - Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando pTa71 (DNAr 45S) em A) *S. communis*; B) *S. crassifolia*; C) *S. glabrata*; D) *S. gracilis*; E) *S. hebecarpa*; F) *S. larotteana*; G) *S. perulacea*; H) *S. platycarpa*; I) *S. regnellii*. Barra= 10 mm. 39
- Figura 5** - Ideogramas das espécies estudadas de *Serjania*, classificadas segundo Radlkofer (1931-1934). 40

- Figura 6** - Diagrama de dispersão da assimetria cariotípica, A1 e A2, das espécies estudadas de *Serjania*.40
- Figura 7** - Análise de agrupamento utilizando os caracteres cariotípicos das espécies estudadas do gênero *Serjania*.....41

ARTIGO 2

- Figura 1** - Metáfases mitóticas coradas mediante HCl/Giemsa. A, *P. elegans*; B, *P. meliifolia*; C, *P. pinnata*; D, *P. rhomboidea*. Barra = 10 mm.49
- Figura 2** - Diagrama de dispersão tendo em conta os coeficientes de assimetria, A1 e A2, obtidos nas espécies estudadas de *Paullinia*.49
- Figura 3** - Prometáfases mitóticas coradas com HCl/Giemsa, A, *P. elegans*; B, *P. meliifolia*; C, *P. rhomboidea*. Bandamento C-Giemsa, D-E, *P. elegans*; E-F, *P. meliifolia*. Bandamento C-CMA3, G, *P. elegans*; H, *P. meliifolia*; I, *P. pinnata*; K, *P. rhomboidea*. Barra= 10 mm.50
- Figura 4** - Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando a sonda pTa71 (DNAr 45S). A, *P. elegans*; B, *P. meliifolia*; C, *P. pinnata*; D, *P. rhomboidea*. Barra = 10 mm.....51
- Figura 5** - Ideogramas das espécies estudadas do gênero *Paullinia*. CMA3 +/-DNAr 45S. Barra = 5 mm.52

ARTIGO 3

- Figura 1** - Coloração convencional no gênero *Urvillea*. A-D, metáfases mitóticas e E-H, prometáfases mitóticas evidenciando diferentes centros de condensação (setas). A e E, *U. chacoensis*; B e F, *U. filipes*; C e G, *U. laevis*; D e H, *U. ulmacea*. Escala = 10 mm.63
- Figura 2** - Bandamento cromossômico no gênero *Urvillea*. A, C-Giemsa em *U. chacoensis*; B e C, C-CMA3 e C-DAPI, respectivamente em *U. chacoensis*; D e E, C-Giemsa e CCMA3, respectivamente em *U. filipes*; F, C-Giemsa em *U. laevis*; G e H, C- CMA3 e CDAPI respectivamente em *U. laevis*; I e J, C- CMA3 e C-DAPI, respectivamente em *U. ulmacea*. Barra = 10 mm64
- Figura 3** - Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) no gênero *Urvillea*. A e B, sítios de DNAr 45S e 5S respectivamente em *U. laevis*; C, sítios

de DNAr 45S e 5S (setas) em *U. chacoensis*; D, sítios de DNAr 45S e 5S (setas) em *U. filipes*; E, sítios de DNAr 45S em *U. ulmacea*. Barra = 10 mm64

Figura 4 - Ideogramas das espécies estudadas do gênero *Urvillea*. regiões ricas em AT65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema de classificação da família Sapindaceae	15
Tabela 2 – Número de espécies por gênero que apresentam contagem cromossômica.....	18
 ARTIGO 1	
Tabela 1 – Procedência das espécies estudadas do gênero <i>Serjania</i>	35
Tabela 2 – Cariótipos das espécies e seções estudadas do gênero <i>Serjania</i> . TCM: tamanho cariotípico médio (mm), TCT: tamanho cariotípico total (mm), VCT: volume cariotípico total (mm ³). A1 y A2, índices de assimetria intra- e intercromossômico respectivamente, TF%, assimetria cariotípica (Huziwara, 1962).....	36
 ARTIGO 2	
Tabela 1 - Cariótipos das espécies estudadas do gênero <i>Paullinia</i> . TCM: tamanho cariotípico médio (mm), TCT: tamanho cariotípico total (mm). A1 y A2, índices de assimetria intra- e intercromossômico respectivamente.a Numero de sítios de DNAr 45S.	48
 ARTIGO 3	
Tabela 1 - Caracteres citogenéticos gerais das espécies estudadas de <i>Urvillea</i> . TCT, Tamanho Cariotípico Total (2n).	63

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 SISTEMÁTICA E EVOLUÇÃO DA FAMÍLIA SAPINDACEAE	13
1.2 ASPECTOS TAXONÔMICOS DA TRIBO PAULLINIEAE	15
1.3 CITOTAXONOMIA DA TRIBO <i>PAULLINIEAE</i>	18
1.4 IMPORTÂNCIA DA CITOGENÉTICA NA SISTEMÁTICA DE PLANTAS.....	22
1.5 OBJETIVOS	23
1.5.1 Objetivo Geral	23
1.5.2 Objetivos Específicos	23
2 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	25
2.1 ANÁLISE CITOTAXONÔMICA EM ALGUMAS ESPÉCIES SULAMERICANAS DO GÊNERO <i>SERJANIA</i> MILL. (SAPINDACEAE: PAULLINIEAE)	25
2.2 DIFERENCIAÇÃO CARIOTÍPICA EM QUATRO ESPÉCIES SULAMERICANAS DE <i>PAULLINIA</i> L. (PAULLINIEAE: SAPINDACEAE)	42
2.3 DIFERENCIAÇÃO CARIOTÍPICA EM QUATRO ESPÉCIES SULAMERICANAS DE <i>URVILLEA</i> KUNTH (SAPINDACEAE: PAULLINIEAE).....	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	68

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 SISTEMÁTICA E EVOLUÇÃO DA FAMÍLIA SAPINDACEAE

A família Sapindaceae está incluída dentro da ordem Sapindales, junto com outras nove famílias (APG II, 2003). Esta ordem é considerada um grupo natural que compreende cerca de 5.400 espécies com importantes componentes tropicais e subtropicais, sendo Sapindaceae e Rutaceae as famílias mais numerosas (Cronquist, 1988). Sapindales encontra-se próxima à ordem Rosales, e diferencia-se desta por apresentar os seguintes caracteres: folhas compostas ou fendidas, androceu haplo- ou diplostemone, discos dos nectários bem desenvolvidos, ovário sincarpo com um ou dois óvulos por lóculo.

A análise filogenética feita com dados do seqüenciamento do gene *rbcL* (Gadek *et al.*, 1996) permitiu a delimitação molecular da ordem Sapindales. Neste estudo, foram reconhecidos cinco cladogramas: Sapindaceae, que inclui as famílias Aceraceae, Hippocastanaceae e Sapindaceae, embora Aceraceae e Hippocastanaceae estejam atualmente dentro de Sapindaceae (APG II, 2003). O clado Sapindaceae encontra-se próximo ao clado Anacardiaceae, o qual compreende as famílias Anacardiaceae e Burseraceae (Gadek *et al.*, 1996).

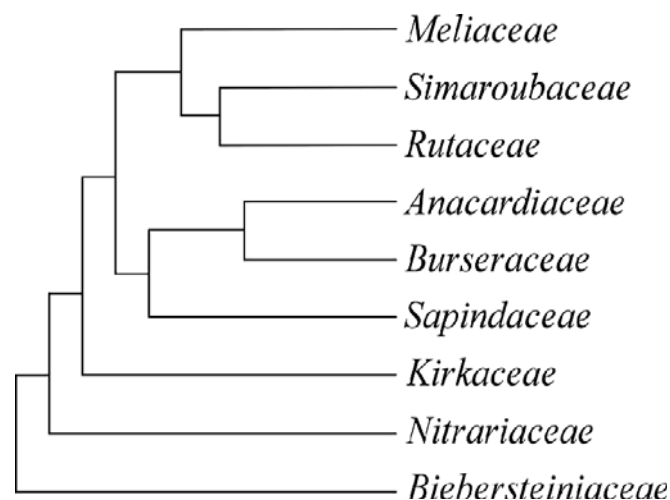


Figura 1 - Esquema filogenético proposto para Sapindales baseado no seqüenciamento do gene *rbcL*

Fonte: Gadek *et al.* (1996); APG II (2003).

Sapindaceae apresenta uma distribuição cosmopolita, e a maioria de suas espécies habita regiões tropicais e/ou subtropicais. A família é distinguida por uma série de caracteres, tanto vegetativos quanto reprodutivos, que em conjunto definem a família Sapindaceae. Estes caracteres são:

- folhas sem estípulas, se presentes são caducas ou pequenas;
- um óvulo por lóculo, raramente dois;
- disco do nectário extra estaminal ou ausente, em geral um;
- óvulo apotropeo;
- em geral oito estames;
- folhas alternas (com algumas exceções);
- flores hipogíneas;
- sementes sem endosperma, com arilo ou sarcotesta.

A família Sapindaceae tem cerca de 2.000 espécies distribuídas em 136 gêneros.

Aproximadamente 430 espécies pertencem à tribo Paullinieae, sendo os gêneros *Serjania* (231), *Paullinia* (150) e *Acer* (110) os mais importantes da família, no que diz respeito ao número de espécies.

Sapindaceae é subdividida em duas subfamílias com base nas características do óvulo. Sapindoideae (*Radlkofer's Eussapindaceae*) apresenta um óvulo por lóculo geralmente apotropeo, enquanto que Dodonaeoideae (*Radlkofer's Dyssapindaceae*) possui dois ou mais óvulos por lóculo, geralmente epítropeo (Radlkofer, 1931-1934; Muller & Leenhouts, 1976). Baseado em caracteres da flor e do fruto, Radlkofer (1931-1934) reconheceu 14 tribos, sendo Paullinieae a única tribo caracterizada pelo hábito trepador. As tribos restantes incluem espécies arbustivas e/ou arbóreas. A subfamília Dodonaeoideae encontra-se representada por cinco tribos, Koelreuterieae, Cossignieae, Dodonaeae, Doratoxyleae e Harpullieae, enquanto que a subfamília Sapindoideae compreende nove tribos, Paullinieae, Thouinieae, Sapindeae, Aphanieae, Lepisantheae, Melicocceae, Schleichereae, Nephelieae e Cupanieae (Tabela 1). A maioria dos gêneros é classificada dentro de Sapindoideae e pertencem ao Velho Mundo, especialmente África, Ásia, Madagascar e Austrália (Croat, 1976). Evidências moleculares e morfológicas indicam que a subfamília Sapindoideae é um grupo monofilético (Judd *et al.*, 1994), ao contrário da Dodonaeoideae, que mostra-se parafilético de natureza polifilética (Klaassen, 1999; Buijsen *et al.*, 2003).

Tabela 1 – Sistema de classificação da família Sapindaceae

Subfamília	Tribo	Nº gêneros	Nº espécies
Dodonaeoideae	Koelreuterieae	3	50
	Cossignieae	2	5
	Dodonaeeae	4	50
	Doratoxyleae	7	10
	Harpullieae	7	30
Sapindoideae	Melicocceae	6	41
	Lepisantheae	11	50
	Sapindeae	7	43
	Cupanieae	37	250
	Schleichereae	3	
	Nephelieae	12	66
	Aphanieae	5	18
	Thouinieae	6	112
	Paullinieae	7	430

Fonte: Radlkofer (1931-1934)

1.2 ASPECTOS TAXONÔMICOS DA TRIBO PAULLINIEAE

As espécies da tribo Paullinieae apresentam uma distribuição exclusivamente neotropical e constituem um importante componente das florestas da América do Sul. São reconhecidos para esta tribo três principais centros de distribuição, Sudeste do México, Planalto Central e Litoral do Brasil (Acevedo-Rodríguez, 1993), sendo este o país com a maior número de representantes.

Paullinieae é considerada um grupo natural, monofilético e caracterizado por várias apomorfias (Acevedo-Rodríguez, 1993), em relação às

demais tribos da família Sapindaceae. Além de seu hábito trepador, Paullinieae caracteriza-se pela presença de estípulas, flores zigomorfas e nectários formados por normalmente quatro ou raramente duas glândulas.

A tribo Paullinieae apresenta algumas discordâncias entre os sistemas de classificação intergenérica propostos. Radlkofer (1931-1934) classificou a tribo em seis gêneros, distribuídos em duas subtribos, Paulliniinae (*Cardiospermum* L., *Lophostigma* Radlk., *Paullinia* L., *Serjania* Mill. e *Urvillea* Kunth), Hunziquer (1978) incorpora *Houssayanthus* Hunz., e Thinouiinae (*Thinouia* Triana & Planch.), as quais são diferenciadas pelos caracteres florais. Posteriormente, Acevedo-Rodríguez (1993) sugeriu a exclusão do gênero *Thinouia* e sua inclusão na tribo Cupanieae, tornando a tribo Paullinieae representada somente por seis gêneros. Após uma análise filogenética realizada em Paullinieae pelo mesmo autor, o qual utilizou diferentes caracteres morfoanatômicos, foi proposta a existência de dois clados, um formado pelos gêneros *Houssayanthus*, *Lophostigma* e *Serjania*, e o segundo formado por *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*.

A classificação infragenérica conflitante encontrada em *Serjania* e *Paullinia* pode ser resultado da variação gradual dos caracteres utilizados em seu tratamento taxonômico.

Assim sendo, é interessante buscar novas fontes de variação inter- e intraespecífica, antes de qualquer revisão dos sistemas de classificação, com a finalidade de obter agrupamentos mais naturais.

Na tribo *Paullinieae*, a morfologia do fruto é um caráter importante na identificação dos gêneros. Dois tipos básicos de frutos são reconhecidos em Paullinieae, esquizocarpo e cápsula (Figura 2). O fruto cápsula ocorre nos gêneros *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*, sendo este considerado um caráter apomórfico em relação ao fruto esquizocarpo, presente nos gêneros *Houssayanthus*, *Lophostigma* e *Serjania* (Acevedo Rodríguez, 1993).

Serjania e *Lophostigma* apresentam um fruto esquizocarpo samaróide (Figura 3C), cuja porção seminífera localiza-se distalmente, enquanto que em *Houssayanthus* a porção seminífera ocupa a região central. Por outro lado, *Paullinia* possui cápsulas com mericarpos carnosos e avermelhados (Figura 3B), diferentemente de *Cardiospermum* e *Urvillea*, cujos frutos são cápsulas infladas e mericarpos membranosos. *Urvillea* diferencia-se de *Cardiospermum* pela presença de frutos alados (Figura 3A-D).

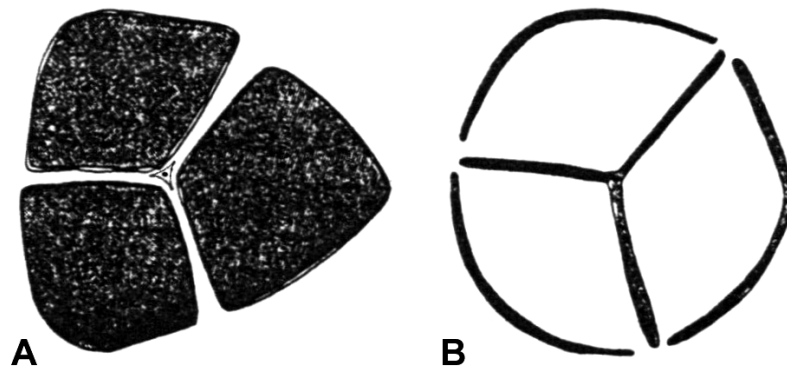


Figura 2 - Tipos básicos de frutos encontrados em Paullinieae. A, fruto ezquizocarpo (*Houssayanthus*, *Lophostigma* e *Serjania*); B, fruto cápsula (*Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*).



Figura 3 - Distintos frutos encontrados em Paullinieae. A, *Cardiospermum grandiflorum*; B, *Paullinia pinnata*; C, *Serjania hebecarpa*; D, *Urvillea chacoensis*.

1.3 CITOTAXONOMIA DA TRIBO PAULLINIEAE

Os estudos citogenéticos realizados em Sapindaceae na última década se destacaram principalmente pelas contagens cromossômicas e pela descrição dos aspectos gerais do cariótipo, como tamanho cromossômico e simetria dos cariótipos (Ferrucci, 1989, 2000; Hemmer & Morawetz, 1990; Nogueira *et al.*, 1995; Ferrucci & Solís Neffa, 1997; Lombello & Forni-Martins, 1998; Solís Neffa & Ferrucci, 1998). Estes estudos permitiram conhecer a variação nos números cromossômicos de aproximadamente 140 espécies pertencentes a 42 gêneros de Sapindaceae, além da descrição dos cariótipos de aproximadamente 35 espécies. Especialmente na tribo Paullinieae, foram reportados os números cromossômicos de 57 espécies (20%), e descritos os cariótipos de somente 32 delas (10%). Neste contexto, Ferrucci (2000) demonstrou uma variação nos números básicos desde $x=7$ até $x=14$ ($x=8$ e $x=13$ estão ausentes). Nestes estudos foram destacadas a conservação de $2n=24$ nos gêneros *Houssayanthus*, *Paullinia* e *Serjania*, bem como variação no nível de ploidia dentro do gênero *Urvillea*, além de uma variação no número básico dos gêneros *Cardiospermum* e *Urvillea* (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de espécies por gênero que apresentam contagem cromossômica

Gêneros	$x=7$	$x=9$	$x=10$	$x=11$	$x=12$	$x=14$
<i>Cardiospermum</i>	1	1	1	3		
<i>Houssayanthus</i>					2	
<i>Lophostigma</i>						1
<i>Paullinia</i>					7	
<i>Serjania</i>					35	
<i>Thinouia</i>						1
<i>Urvillea</i>				4	1	
Total	1	1	1	7	45	2

De um modo geral, a poliploidia teve um papel fundamental na evolução das plantas superiores, sendo estimado que nas Angiospermas aproximadamente 70% das espécies sejam de origem poliplóide (Wendel, 2000). O número básico proposto para as Angiospermas basais, Magnoliales e Laurales, é $x=8$, sendo $2n=16$ o número cromossômico mais freqüente, sugerindo que os números cromossômicos na maioria das Angiospermas sejam derivados por poliploidia ou disploidia/aneuploidia a partir de espécies com $x=8$ (Morawetz, 1986). Os números básicos mais freqüentes na família Sapindaceae são $x=14$, 15 e 16 , estando presentes em 90% dos gêneros que apresentam contagem cromossômica até o momento. De acordo como Morawetz (1986), se $x=8$ for o número básico ancestral das Angiospermas, os números cromossômicos encontrados em Sapindaceae podem ser derivados por poliploidia, compondo um complexo paleotetraplóide.

Somente três gêneros de diferentes tribos em Sapindaceae exibem uma série poliplóide. Partindo dos números básicos descritos anteriormente, são eles: *Urvillea*, *Allophylus* e *Melicoccus* (Ferrucci, 1985; Nogueira, 1995; Ferrucci & Solís Neffa, 1997).

Considerando as informações cromossômicas nesta família relativamente escassas, e a baixa freqüência de eventos de poliploidia recente a partir do número básico proposto, é possível supor que existam outros mecanismos de variação cariotípica atuando na evolução recente de Sapindaceae.

A tribo Paullinieae é caracterizada pelo menor número e pelo maior tamanho cromossômico (Solís Neffa & Ferrucci, 2001), sugerindo que a diminuição do número básico possa ser considerada um caráter derivado em Sapindaceae (Acevedo Rodríguez, 1993), a qual é representada na Figura 4. De acordo com Hemmer & Morawetz (1990) e Lombello & Forni-Martins (1998), a tribo Paullinieae é caracterizada por uma redução no número básico em relação às demais tribos de Sapindaceae. De um modo geral, este evento de redução no número básico pode estar correlacionado com caracteres morfológicos, como hábito trepador, presença de gavinhas, flores zigomorfas e nectários, sugerindo que Paullinieae seja a tribo mais derivada com respeito às tribos restantes da família.

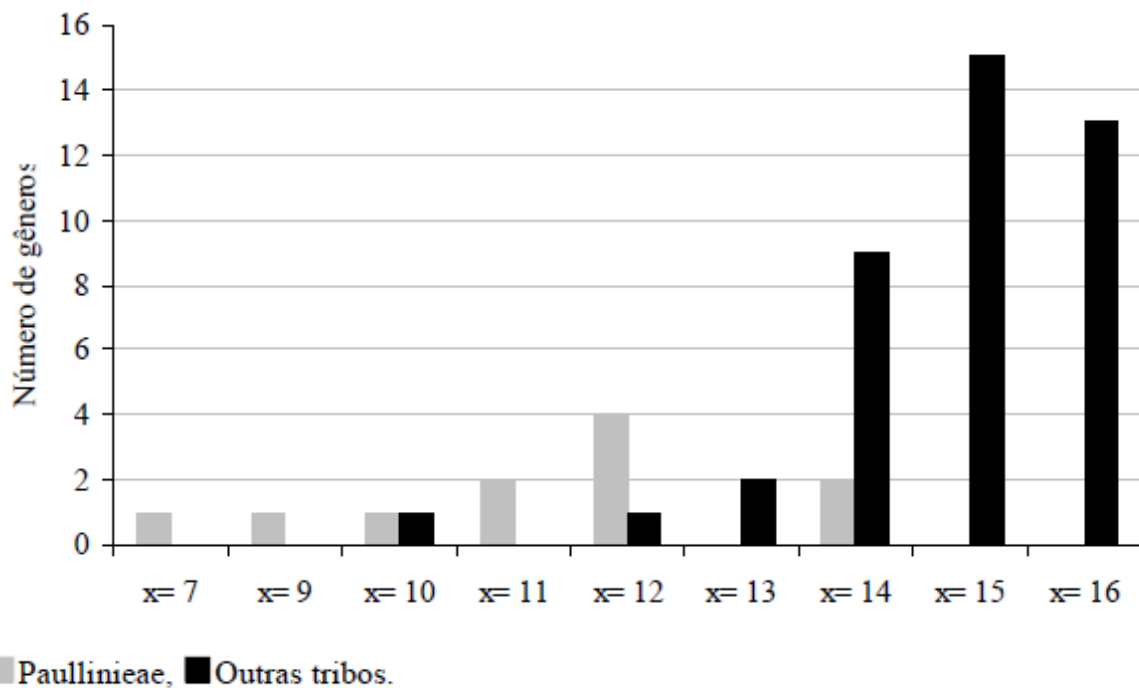


Figura 4 – Presença dos números básicos reportados nos distintos gêneros de Sapindaceae.

Serjania é o gênero mais importante dentro de Sapindaceae no que diz respeito ao número de espécies (231). Como outros grupos da família, também possui classificação infragenérica complexa, Radlkofer (1931) descreveu 12 seções para o gênero. No entanto, Acevedo-Rodríguez (1993) considerou a classificação de Radlkofer pouco prática e pouco precisa quanto às seções do gênero. Este último autor propôs recentemente a existência de seis seções mediante a combinação de algumas seções de Radlkofer, baseado nas variações nos caracteres qualitativos do fruto. Os estudos cromossômicos em *Serjania* incluem contagem para 35 espécies, onde é destacada a conservação do número cromossômico $2n=24$ (Fernández Casas & Fernández Piqueras, 1981; Ferrucci, 1981, 1985; Nogueira *et al.*, 1995; Ferrucci & Solís Neffa, 1997; Solís Neffa & Ferrucci, 1998). Cerca de 20 espécies foram estudadas cariotipicamente, sendo detectadas variações intraespecíficas tomando em conta o tamanho e a morfologia dos cromossomos, sem encontrar ainda uma correlação direta entre a variação cariotípica e as classificações infragenéricas propostas para o gênero (Solís Neffa & Ferrucci, 1997).

Paullinia apresenta aproximadamente 150 espécies distribuídas em 13 seções, sendo a delimitação destas, relativamente conflitivas devido à natureza gradual dos caracteres utilizados nos tratamentos taxonômicos. Em *Paullinia* são

conhecidos os números cromossômicos de sete espécies e os cariótipos de três delas. Todas as espécies analisadas até agora apresentaram $2n = 24$ (Ferrucci & Solís Neffa, 1997; Solís Neffa & Ferrucci, 1998).

Das cerca de 17 espécies conhecidas de *Urvillea*, apenas cinco têm seus números cromossômicos e duas seus cariótipos descritos (Nogueira *et al.*, 1995; Ferrucci, 1997; Lombello & Forni-Martins, 1998). *Urvillea* é o único gênero da tribo *Paullinieae* que apresentou variações no nível de ploidia, $2n = 44$ em *U. uniloba* e $2n = 22$ e 86 em *U. ulmacea* (Ferrucci, 1981; Nogueira *et al.*, 1995). As seções do gênero *Urvillea* diferenciam-se quanto ao número básico, sendo que a seção *Urvillea* apresenta $x = 11$, enquanto que a seção *Stenelytron* possui $x = 12$ (Ferrucci, 2000a). As informações disponíveis até o momento apontam que tanto a aneuploidia/displóidia quanto a poliploidia tiveram um papel importante na evolução deste grupo.

Os gêneros *Cardiospermum* e *Urvillea* compartilham de vários caracteres derivados, tanto morfológicos quanto citológicos. *Cardiospermum* conta com 14 espécies, das quais seis possuem contagem cromossômica e descrição dos cariótipos (Ferrucci, 1989, Hemmer & Morawetz, 1990). Ambos os gêneros apresentam variação nos números básicos de $x = 7, 9, 10$ e 11 (Ferrucci, 1989, Ferrucci, 2000a), sendo a aneuploidia/displóidia fatores importantes na evolução cariotípica de *Cardiospermum*.

Em Sapindaceae, os trabalhos envolvendo análise meiótica, estrutura do núcleo interfásico, técnicas de bandamentos C, NOR, DAPI, CMA₃ e localização física de segmentos de DNA repetitivo por hibridação *in situ* são escassos. Alguns trabalhos abordaram a caracterização da heterocromatina e a identificação da NOR (Hemmer & Morawetz, 1990; Nogueira *et al.* 1995), e destacaram a diferenciação entre gêneros e espécies. Hemmer & Morawetz (1993) estudaram os padrões de bandas de duas espécies de *Serjania* e duas de *Cardiospermum* mediante as técnicas de banda C-Giemsa e CMA₃/DAPI, e revelaram importantes processos na evolução cariotípica de Paullinieae, como a redução no número básico e o acúmulo de heterocromatina rica em AT nas regiões cromossômicas terminais. Por outro lado, espécies de *Koelreuteria* Laxm. (*Koelreuterieae*) foram estudadas comparativamente quanto aos padrões de bandas utilizando técnicas de bandamento C-Giemsa e C-CMA₃, e foi observado que, apesar das similaridades cariotípicas e da presença de um número similar de

bandas terminais CMA₃₊, as espécies *K. bipinnata* Franch. and *K. elegans* (Seem.) A. C. Sm. subsp. *formosana* (Hayata) F. G.

Mey. se diferenciaram pelo tamanho dos blocos ricos em GC (Urdampilleta *et al.*, em prensa).

1.4 IMPORTÂNCIA DA CITOGENÉTICA NA SISTEMÁTICA DE PLANTAS

As informações obtidas de análises citogenéticas são de grande importância na taxonomia, principalmente porque é esperado que os cromossomos ocorram em número definido nas espécies, e que estes apresentem marcas individuais capazes de distinguir os cromossomos individualmente, ao ponto de serem reconhecidos os pares dentro de um complemento. De um modo geral, os cromossomos vêm sendo utilizados como um caráter sistemático adicional, sendo atualmente incorporados em descrições florísticas (Stace, 2000). A sexualidade e a fertilidade dependem de um correto desenvolvimento da meiose e um pareamento regular dos cromossomos homólogos. No entanto, algumas variações cromossômicas estruturais são toleradas justificando as variações inter- como intraespecíficas no número e na estrutura dos cariótipos (Greilhuber & Enrendorfer, 1988).

De acordo com Bennett (1998), apenas 25% das angiospermas possuem contagem cromossômica, e destas, menos de 1% correspondem a espécies da região tropical. A variação no número cromossômico vai desde $2n=4$, como ocorre em espécies de Poaceae, Hyacinthaceae, Cyperaceae e Asteraceae (Vanzela *et al.*, 1996) até $2n=640$ em *Sedum suaveolens* Kimnach, Crassulaceae (Stace, 2000).

O mapeamento físico dos cromossomos de um complemento obtidos, pelas técnicas de bandamento e hibridação *in situ*, é uma ferramenta valiosa para o estudo da organização e da evolução dos genomas em plantas, sendo frequentemente utilizados para complementar os estudos sistemáticos e filogenéticos (Ran *et al.*, 2001; Torrell *et al.*, 2003). Neste contexto, DNAr 45S e 5S, seqüências teloméricas, bem como DNA satélite vêm sendo os segmentos mais empregados no mapeamento físico de seqüências repetitivas, a qual representa

uma marca importante para a identificação cromossômica e estudos evolutivos. Atualmente, trabalhos baseados na citogenética molecular juntamente com o seqüenciamento de DNA têm reforçado ou rejeitado inúmeras propostas de classificação sistemática em muitos grupos de plantas (Zoldos *et al.*, 1999; Benabdelmouna *et al.*, 2001; Ran *et al.*, 2001; Torrell *et al.*, 2003).

Variações envolvendo DNAs repetitivos normalmente estão associados à diferenciação cariotípica independente do grupo de plantas. Assim sendo, é de extrema importância ampliar o conhecimento nesta área da citogenética na família Sapindaceae, justamente devido à estabilidade numérica e a pequena variação em tipos cromossômicos existentes entre espécies próximas. A análise dos cariótipos envolvendo coloração convencional, padrões de bandas e hibridação *in situ* pode fornecer caracteres possivelmente úteis na resolução de problemas sistemáticos e filogenéticos em Sapindaceae, bem como fornecer mais informações sobre a gama de eventos responsáveis pelas variações cariotípicas já apontadas na literatura.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Caracterizar citogeneticamente as espécies da tribo *Paullinieae* com o objetivo de complementar o conhecimento da família, interpretar a evolução cariotípica da tribo em relação ao restante da família, e procurar novas fontes de variação que possam ser utilizadas em futuros tratamentos sistemáticos.

1.5.2 Objetivos Específicos

- 1- Realizar contagem cromossômica de distintas espécies e populações ocorrentes na América do Sul;

2- Descrever comparativamente os cariótipos das espécies estudadas, como também dos núcleos interfásicos e padrões de condensação profásica;

3- Caracterizar comparativamente os padrões de bandas mediante o bandamento C-Giemsa, C-CMA3/DAPI;

4- Localizar fisicamente os segmentos de DNAr 45S e 5S por hibridação *in situ*;

5- Analisar e discutir comparativamente todos os resultados obtidos com uma visão sobre a sistemática da tribo Paullinieae.

2 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

2.1 ANÁLISE CITOTAXONÔMICA EM ALGUMAS ESPÉCIES SULAMERICANAS DO GÊNERO *SERJANIA* MILL. (SAPINDACEAE: PAULLINIEAE)

Trabalho a ser submetido à *Genetics and Molecular Biology*, Sociedade Brasileira de Genética, Brasil

ANÁLISE CITOTAXONÔMICA EM ALGUMAS ESPÉCIES SULAMERICANAS DO GÊNERO *SERJANIA* MILL. (Sapindaceae: Paullinieae)

Juan D. Urdampilleta¹, María S. Ferrucci², André L. L. Vanzela^{1*}

Resumo

Serjania Mill. (Paullinieae: Sapindaceae) é o gênero mais importante da família em número de espécies. Mediante as técnicas de coloração convencional, bandamentos C e CCMA3/DAPI e FISH utilizando a sonda de DNAr 45S, foram analisadas 14 espécies representantes de sete seções (sensu Radlkofer, 1931-1934). Novas contagens para *S. crassifolia*, *S. platycarpa* e *S. regnellii* são reportados neste trabalho, destacando a conservação de $2n=24$ em todas as espécies. Os cariótipos foram moderadamente assimétricos, sendo os de *S. crassifolia*, *S. hebecarpa* e *S. platycarpa*, distinguidos por apresentar alto nível de simetria. O padrão de bandas foi relativamente semelhante entre as espécies estudadas de *Serjania*, bandas C-Giemsa e C-DAPI estiveram ausentes, mas foram observadas variações no número e posição de sítios ricos em GC revelados pelo bandamento C-CMA3. Estes sítios ricos em GC foram associadas aos sítios de DNAr 45S revelados por FISH. Os resultados da análise cariotípica concordam parcialmente com os dois sistemas de classificação infragenérica propostos para o gênero mostrando claramente a necessidade de uma revisão taxonômica, mais apurada buscando novas fontes de variação.

Palavras chave: C-CMA3/DAPI. Citotaxonomía. C-Giemsa. Classificação infraespecífica. Paullinieae. *Serjania*.

Introdução

Serjania Mill. (Paullinieae) é o gênero mais importante da família Sapindaceae quanto ao número de espécies. Este gênero compreende aproximadamente 230 espécies de lianas e trepadeiras nativas de regiões tropicais e subtropicais de América, e sua distribuição geográfica vai desde o Sul de Estados Unidos até o Centro da Argentina (Acevedo-Rodríguez, 1993). A presença de fruto tipo esquizocarpo samaróide distingue *Serjania* dos demais gêneros de Paullinieae.

¹ Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

² Instituto de Botánica del Nordeste, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

^{1*} Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil - E-mail: andrevanzela@uel.br

A classificação infragenérica de *Serjania* é relativamente confusa, já que Radlkofer (1931-1934) descreveu 12 seções para o gênero, enquanto que Acevedo-Rodríguez (1993) sugeriu a existência de seis seções mediante a combinação de algumas seções de Radlkofer, sugerindo que esta classificação não é prática e nem define com precisão as seções. Por outro lado, estudos palinológicos mostraram que a variação no tipo de pólen em *Serjania* é limitada e contínua, e não suporta as seções reconhecidas por Acevedo-Rodríguez (Van der Ham *et al.*, 1994).

Os estudos citogenéticos em *Serjania* incluem contagem cromossômica para 35 espécies de 11 seções, destacando-se até o momento a conservação do número cromossômico $2n = 24$ (Fernández Casas & Fernández Piqueras, 1981; Ferrucci, 1981, 1985; Nogueira *et al.*, 1995; Ferrucci & Solís Neffa, 1997; Solís Neffa & Ferrucci, 1997, 1998). Solís Neffa & Ferrucci (1997), estudaram os cariótipos de cerca de 20 espécies e encontraram variações intra e interespecíficas no tamanho e na morfologia de seus cromossomos, no entanto, esta variação não apresentou uma correlação direta com as classificações infragenéricas propostas para o gênero.

Informações sobre bandamento cromossômico e localização de sítios de DNAr são escassos em *Sapindaceae*. Hemmer & Morawetz (1990) estudaram os padrões de bandas C em duas espécies de *Serjania* e duas de *Cardiospermum* L., e mostraram que *Serjania* destaca-se pela ausência de bandas, exceto aquelas associadas às NOR, enquanto que em *Cardiospermum* bandas de heterocromatina ricas em AT apareceram nas regiões terminais de vários cromossomos. Este trabalho tem como objetivo analisar os cariótipos de espécies de *Serjania* que habitam o sul da América do Sul mediante técnicas de coloração convencional, bandamentos C e C-CMA₃/DAPI e FISH utilizando sondas de DNAr 45S. A discussão foi conduzida levando em conta os mecanismos envolvidos na diferenciação cariotípica destas espécies, buscando encontrar caracteres específicos que colaborem na classificação infragenérica do gênero *Serjania*.

Materiais e Métodos

As espécies estudadas neste trabalho, bem como seus dados de coleta são colocados na Tabela 1. As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de meristemas radiculares pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína 2mM por 4-5 h

a 15°C, fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v:v) durante 12 h e conservadas a -20°C. A coloração convencional foi realizada com a técnica HCl/Giemsa (Guerra, 1983). Os ideogramas foram realizados a partir de medições cromossômicas de cinco metáfases completas e com similar condensação, e os cromossomos mitóticos classificados de acordo com a nomenclatura proposta por Levan *et al.* (1964).

Para os bandamentos cromossômicos, as lâminas foram confeccionadas utilizando raízes digeridas em uma solução composta por celulase 4% e pectinase 40% a 37°C durante 2 h. As lâminas foram montadas em ácido acético 45% e a lamínula removida por congelamento em nitrogênio líquido. As lâminas foram tratadas segundo a técnica descrita por Schwarzscher *et al.* (1980), com modificações. Os materiais foram corados com Giemsa 2%, para o bandamento C-Giemsa, ou com CMA₃ (cromomicina A₃) 0,5 mg/ml e DAPI (4-6-diamino-2-fenilindole) 2µg/ml para o bandamento C-CMA₃/DAPI. As lâminas foram montadas em Entellan e em glicerol 50%/ tampão McIlvaine pH 7,0/ 2,5 mM de MgCl₂, respectivamente.

A localização física de DNAr foi realizada mediante a técnica de FISH, segundo a metodologia descrita por Heslop-Harrison *et al.* (1991) e Cuadrado & Jouve (1994), com modificações. A sonda pTa71 contendo seqüências de DNAr 18S-5.8S-26S (Gerlach & Bedbrook, 1979), foram marcadas com biotina-14-dATP por *nick translation* e os sítios de hibridação foram detectados com avidina-FITC. As lâminas foram coradas com 2,5 g/ml de iodeto de propideo e montadas numa solução (1:1, v:v) composta de *antifade* (Vector Labs.) e uma mistura de glicerol 50%/ tampón McIlvaine pH 7,0/ 2,5 mM de MgCl₂.

As fotografias foram feitas utilizando os filmes Kodak Imagelink HQ 25 ISO para a coloração convencional, Kodak T-Max 100 ISO para o bandamento C-CMA₃/DAPI e Fuji Color 100 ISO para FISH.

Os cariótipos das distintas espécies foram comparados utilizando: o tamanho médio dos cromossomos (TMC), o tamanho cariotípico total (TCT), o volume cariotípico total (VCT) segundo Naranjo *et al.* (1998), a relação entre o par cromossômico maior e menor, e os índices de assimetria A₁, A₂ (Romero Zarco, 1986) e TF% (Huziwara, 1962). Estes caracteres foram utilizados numa análise de agrupamento, a qual originou uma matriz básica cujos dados foram padronizados segundo Crisci & López Amengol (1983). Para a análise e a construção do dendrograma foi utilizado o método UPGMA e a distância Euclidiana como

coeficiente de similaridade mediante a utilização de Statistica 6.0 (StatSoft, Inc. 2001).

Resultados

As espécies de *Serjania* estudadas estão organizadas na Tabela 2, onde também estão descritos os cariótipos e seus graus de assimetria. Todas as espécies estudadas apresentaram $2n=24$ (Figura 1 e 2), sendo reportados pela primeira vez o número cromossômico de *S. crassifolia*, *S. platycarpa* e *S. regnellii*.

Os cariótipos das distintas espécies de *Serjania* mostram grandes similaridades nos tamanhos cromossômicos e no tamanho total do cariótipo, variando seus cromossomos de de 3,95 μ m a 1,35 μ m (Tabela 2). *Serjania gracilis* (Figura 1B) é a espécie que apresentou cromossomos de menor tamanho, diferentemente de *S. laruotteana* (Figura 1D), que apresentou cromossomos relativamente maiores (Tabela 2). No que diz respeito à morfologia cromossômica, a maioria das espécies mostrou cromossomos principalmente submetacêntricos e subtelo-cêntricos, com exceção de *S. crassifolia*, *S. hebecarpa* e *S. platycarpa*, devido a maioria dos cromossomos metacêntricos. Exceto em *S. laruotteana*, no restante das espécies o primeiro par cromossômico foi do tipo m, sendo os primeiros quatro pares cromossômicos tipo metacêntricos, submetacêntricos ou subtelo-cêntricos. Os cromossomos telocêntricos foram de tamanho mediano a pequenos e o número varou entre as espécies. *Serjania glutinosa*, *S. platycarpa*, *S. tripleuria*, *S. fuscifolia*, *S. hebecarpa* e *S. meridionalis* apresentaram somente um par de cromossomos telocêntricos, em quanto que cinco pares destes tipo cromossômico foram observados em *S. communis* (Figura 2F).

Serjania perulacea (Figura 1G) mostrou três pares de telocêntricos, enquanto que em *S. gracilis*, *S. laruotteana*, *S. glabrata*, *S. crassifolia* e *S. regnellii* apenas dois pares deste tipo cromossômico foram observados. *Serjania multiflora* (Figura 2E) foi a única espécie sem cromossomos telocêntricos (Tabela 2, Figura 5).

As espécies estudadas variaram quanto à simetria cariotípica, a qual foi refletida pelos distintos coeficientes utilizados. Os cariótipos de *S. crassifolia*, *S. hebecarpa* e *S. platycarpa*, destacaram-se por serem os mais simétricos (Tabela 2), apresentando os menores índices de assimetria intracromossômica A_1 (Figura 6) e maiores TF %. As espécies *S. communis*, *S. gracilis* e *S. regnellii* apresentaram os

menores índices A_2 , enquanto que *S. laruoteana* apresentou níveis altos de assimetria tanto A_1 como A_2 . As espécies restantes exibiram coeficientes de assimetria intermediários com variação gradual (Tabela 2, Figura 6).

De um modo geral, as espécies de *Serjania* caracterizaram-se por núcleos interfásicos semi-reticulados (Figura 3A). O padrão de condensação profásico foi do tipo heterogêneo, constante nas espécies estudadas, exceto por regiões de condensação prematura em regiões proximais, intersticiais ou terminais (Figura 3B).

As espécies estudadas de *Serjania* apresentaram uma ausência de bandas definidas, mas pequenas regiões fortemente coradas dispersas no cariótico e no núcleo interfásico são observadas depois do bandamento C-Giemsa (Figura 3C). Blocos ricos em GC ocuparam regiões terminais dos braços curtos de cromossomos de diferentes tamanhos, em geral nos cromossomos médios e pequenos, com exceção de *S. laruoteana* que exibiu sítios ricos em GC no primeiro par cromossômico (Figura 3D e 5). Variações no número de sítios ricos em GC foram encontradas entre *S. glabrata* e *S. gracilis*, que mostraram apenas um par cromossômico com regiões ricas em GC (Figura 3E), enquanto que *S. meridionalis* que apresentou quatro pares com blocos ricos em GC. Blocos ricos em bases AT não foram observados nestas espécies.

A técnica de FISH utilizando a sonda pTa71 revelou que as espécies do gênero *Serjania* freqüentemente apresentam dois sítios DNAr 45S, mas com algumas variações no número e na posição (Figura 4). *Serjania gracilis*, *S. hebecarpa*, *S. platycarpa* e *S. perulacea* apresentaram quatro sítios de DNAr. *Serjania laruoteana* mostrou seis sítios, sendo quatro maiores e dois menores, *S. regnellii* possui dois sítios e em *S. communis* um par cromossômico portador de pequenos sítios de DNAr pode ser observado.

A análise de agrupamento utilizando sete caracteres cromossômicos destacou *S. glutinosa* e *S. glabrata* como as espécies cariotipicamente mais similares, que junto com *S. perulacea* e *S. fuscifolia* formaram um grupo de alta similaridade cariotípica. Do mesmo modo, *S. tripleuria* e *S. meridionalis* apresentaram cariótipos altamente semelhantes.

Serjania crassifolia e *S. hebecarpa*, juntamente com *S. platycarpa* formam um subgrupo caracterizado por cariótipos com elevado grau de simetria. *Serjania gracilis* foi a espécie mais segregada do grupo devido principalmente ao

menor tamanho cromossômico e a menor variação e relação entre o cromossomo maior e o menor (Figura 7).

Discussão

Paullinieae é a tribo mais conhecida em Sapindaceae quanto às suas características citogenéticas, sendo *Serjania* o gênero mais estudado. Considerando as novas contagens para *S. crassifolia*, *S. platycarpa* e *S. regnellii* apresentadas pela primeira vez neste trabalho, o número de espécie de *Serjania* que apresentam contagem cromossômica subiu a 38, ou seja 17% do total de espécies do gênero. Os resultados mostrados neste trabalho reforçam a conservação do número cromossômico, $2n = 2x = 24$, como característica típica de *Serjania*, a qual também é compartilhada com outros gêneros da tribo Paullinieae, como em *Houssayanthus* Hunz. e *Paullinia* L. (Ferrucci, 1981; Ferrucci & Solís Neffa 1997;

Solís Neffa & Ferrucci 1998). No entanto, diferentemente dos gêneros *Urvillea* Kunth e *Cardiospermum* L. que apresentam variações nos números básicos, $x = 11$ e 12 em *Urvillea* e $x = 7, 9, 10$ e 11 em *Cardiospermum* (Ferrucci, 2000a). *Serjania* relaciona-se taxonomicamente com o gênero *Lophostigma* Radlk., porém diferencia-se quanto ao número cromossômico, já que *Lophostigma* possui $2n = 2x = 28$, sendo considerado, com base nos caracteres florais, um gênero basal na tribo. Diferentemente das demais tribos de Sapindaceae, Paullinieae caracteriza-se por um menor número e um maior tamanho cromossômico (Solís Neffa & Ferrucci, 2001). Tais características sugerem que a redução no número básico pode representar uma característica derivada na tribo Paullinieae com respeito às demais tribos da família (Acevedo-Rodríguez, 1993; Hemmer & Morawetz, 1993). É possível que este evento de redução cromossômica possa ter ocorrido a partir de em algum ancestral comum a *Lophostigma* e aos demais gêneros de Paullinieae. A redução no número básico foi documentada em Canellaceae ($x = 13$), Lauraceae ($x = 12$) e Calycanthaceae ($x = 11$) a partir de ancestrais com $x = 14$, assim como também em alguns gêneros em Apocynaceae (Meira & Bawa, 1969; Morawetz, 1986). No entanto, novas contagens cromossômicas devem ser realizadas a fim de documentar melhor a redução no número básico em Paullinieae.

Trabalhos prévios desatacam a existência de um cariótipo padrão em *Serjania*, o qual seria moderadamente assimétrico, com variações graduais nos

tamanhos cromossômicos e uma tendência à assimetria nas espécies com cromossomos maiores (Solís Neffa & Ferrucci, 1997). Na maioria das espécies estudadas os cariótipos são ricos em cromossomos submetacêntricos e subtelo-cêntricos, com exceção de *S. crassifolia*, *S. hebecarpa* e *S. platycarpa*, as quais contêm um grande número de cromossomos metacêntricos. Autores como, Nogueira *et al.* (1995), não reconheceram a existência de cromossomos telocêntricos em *Serjania*, ao contrário de Solís Neffa & Ferrucci (1997) e Hemmer & Morawetz (1990), que reconheceram 1 ou 2 pares de cromossomos telocêntricos. As espécies estudadas por Nogueira *et al.* (1995) foram revisadas neste trabalho, junto a outras espécies do gênero, e com exceção de *S. multiflora*, todas as espécies apresentaram cromossomos telocêntricos no complemento, variando de 1 a 5 pares, discordando dos resultados obtidos por Nogueira *et al.* (1995).

Serjania crassifolia, *S. hebecarpa* e *S. platycarpa* possuem um alto grau de simetria cariotípica que as distinguem das espécies restantes, sendo os cariótipos de *S. crassifolia* e *S. hebecarpa* notavelmente semelhantes. Nossos resultados concordam com os dados obtidos por Solís Neffa & Ferrucci (1997), que destacam a *S. hebecarpa* como a espécie com cariótipo mais simétrico. Por outro lado, Solís Neffa & Ferrucci (2001) reconheceram uma grande afinidade cariotípica entre *S. cissoides* e *S. hebecarpa* reforçando sua posição sistemática na seção *Syncoccus*. Desta forma *S. crassifolia*, *S. hebecarpa*, *S. platycarpa* e *S. cissoides* parecem formar um grupo de espécies cariotipicamente similares.

A classificação infragenérica proposta por Radlkofer (1931-1934) coloca a *S. crassifolia*, *S. hebecarpa* e *S. platycarpa* em três seções distintas, no entanto, Acevedo-Rodríguez (1993) ubica a *S. crassifolia* e *S. hebecarpa* na seção *Serjania*, cujo agrupamento foi suportado pela grande similaridade cariotípica entre estas duas espécies.

Radlkofer (1931-1934) ubicou a *S. meridionalis* e *S. tripleuria* cujos cariótipos são similares, em seções distintas, entretanto, Acevedo-Rodríguez (1993) as reuniu na seção *Serjania*, embora *S. glabrata* e *S. glutinosa*, que são as espécies que apresentam a maior afinidade cariotípica, sejam classificadas por ambos autores em seções distintas. As espécies restantes possuem cariótipos relativamente assimétricos, e relativamente semelhantes quanto à assimetria intracromossômica (A_1), sendo este parâmetro um reflexo do grau de diferença entre os braços cromossômicos. *Serjania laruottena* mostrou os maiores índices de assimetria

intercromossômica (A_2), parâmetro que reflete a diferença entre os tamanhos cromossômicos no cariótipo, diferentemente de *S. communis*, *S. gracilis* e *S. regnellii* que formaram um subgrupo diferenciado pelos valores baixos de A_2 .

A análise dos padrões de bandas mostrou uma notável homogeneidade em *Serjania* com respeito aos bandamentos C-Giemsa, C-CMA₃/DAPI. Hemmer & Morawetz (1990) destacaram a ausência de bandas C-Giemsa e presença de escassas e pequenas bandas ricas em AT em duas espécies de *Serjania* estudadas, assim como Nogueira *et al.* (1995) demonstrou a ausência de bandas C em seis espécies deste gênero. Os autores anteriormente citados, baseados na existência de núcleos semi-reticulados, sugeriram que DNAs repetitivos poderiam estar dispersos no genoma de *Serjania*. Por outro lado, a descrição e a comparação de 14 espécies de *Serjania* realizada neste trabalho mediante os bandamentos C-CMA₃/DAPI, mostrou variações no número e posição de sítios ricos em GC, as quais não foram congruentes com os sistemas de classificação infragenéricos propostos. De um modo geral, estas bandas CMA₃⁺ são localizadas nos braços curtos de cromossomos medianos e pequenos, com exceção de *S. laruotteana*, que mostrou sítios ricos em GC no maior cromossomo, constituindo este um marcador espécie específico. Por outro lado, estes sítios ricos em GC apareceram freqüentemente heteromórficos, tanto entre pares homólogos como dentro do mesmo par cromossômico, sugerindo uma importante fonte de variação. Freqüentemente, as espécies analisadas neste trabalho apresentaram quatro regiões ricas em GC, mas algumas espécies podem conter somente duas regiões (*S. gracilis* e *S. glabrata*) ou múltiplos sítios, como em *S. meridionalis*. Tal variação pode ocorrer seguindo o modelo de dispersão equilocal proposto por Schweizer & Loidl (1987) para a dispersão de DNA repetitivo.

Em plantas, regiões ricas em GC são freqüentemente associadas aos sítios de DNAr, sendo denominadas NOR-HC (heterocromatina associada a regiões organizadoras de nucléolos), as quais freqüentemente são localizadas em regiões terminais de braços curtos (Guerra, 2000). Em *Serjania* os sítios de DNAr também estão associados a sítios ricos em GC, sendo neste trabalho mapeados pela primeira vez mediante FISH. Nossos dados concordam com os resultados aportados por Hemmer & Morawetz (1990), que destacaram que regiões ricas em GC poderiam estar associadas a sítios NORs nas regiões terminais dos braços curtos de três pares cromossômicos. Estudos cariotípicos prévios destacaram a presença de

satélites em número variável, podendo ser encontrados de um a três pares cromossômicos portadores de satélites (Solís Neffa & Ferrucci, 1997; Ferrucci, 2000a). Hemmer & Morawetz (1990) destacaram a dificuldade no reconhecimento dos satélites, sendo alguns encontrados no braço curto dos telocêntricos. Mediante o bandamento NOR, Nogueira *et al.* (1995) também reportaram dois pares de cromossomos portadores de NOR em *S. laruooteana* e um par em *S. communis*, mas cuja contagem de nucléolos mostrou que *S. multiflora*, *S. glabrata* e *S. gracilis* possuem um máximo de seis nucléolos, em *S. fuscifolia* e *S. communis* cinco nucléolos e em *S. laruooteana* um máximo de quatro nucléolos. Nossos resultados concordam com os resultados aportados pelo bandamento NORs para *S. laruooteana* e *S. communis*, sendo detectado dois pares de sítios de DNAr para *S. laruooteana* e um para *S. communis*, no entanto o número de sítios ricos em GC detectados foi menor que número máximo de nucléolos descrito por Nogueira *et al.* (1995).

De um modo geral, os resultados da análise cariotípica não são integralmente congruentes com os sistemas de classificação infragenérica propostos para o gênero *Serjania*. Alguns aspectos da classificação proposta por Acevedo-Rodríguez (1993) poderiam ser representados na variação cariotípica de algumas das espécies estudadas neste trabalho, mas Solís Neffa & Ferrucci (1997) reconheceram que dentro das seções propostas por Radlkofer (1931-1934), as espécies diferem pouco em alguns parâmetros cromossômicos. Se levarmos em consideração o reconhecimento de Acevedo-Rodríguez (1993) de que a classificação infragenérica de *Serjania* encontra-se caótico, fica claro a necessidade de uma revisão taxonômica detalhada tendo em conta novas fontes de variação. Uma saída seria ampliar as análises cariotípicas, buscando variações em seqüências de DNAs repetitivos a fim de facilitar agrupamentos naturais que sustentem a classificação infragenérica em *Serjania*.

Tabela 1 – Procedência das espécies estudadas do gênero *Serjania*

Espécie	Localidade
<i>S. communis</i> Cambess.	BRASIL. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 214, UEL (FUEL).
<i>S. crassifolia</i> Radlk.	BOLÍVIA. Dpto. Santa Cruz. Ferrucci <i>et al.</i> 1923, (CTES); Ferrucci <i>et al.</i> 1904, (CTES).
<i>S. fuscifolia</i> Radlk.	BRASIL. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 111, Fz Conquista (FUEL); Urdampilleta <i>et al.</i> 156, Fz Doralice (FUEL 34740); Urdampilleta <i>et al.</i> 174, UEL (FUEL); Urdampilleta <i>et al.</i> 183, Assai (FUEL).
<i>S. glabrata</i> Kunth	ARGENTINA. Misiones. Urdampilleta <i>et al.</i> 141, Puerto Iguazu (FUEL 34750). BRASIL. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 145, Maua da Serra (FUEL 34734); Urdampilleta <i>et al.</i> 154, Fz Doralice (FUEL 34746); Urdampilleta <i>et al.</i> 175, UEL (FUEL). BOLÍVIA. Dpto. Tarija. Ferrucci <i>et al.</i> 1743, Prov. O'Connor (CTES).
<i>S. glutinosa</i> Radlk.	BRASIL. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 129, Fz Doralice, (FUEL 34790). BOLÍVIA. Dpto. Santa Cruz. Ferrucci <i>et al.</i> 1922, Prov. Chiquitos (CTES).
<i>S. gracilis</i> Radlk.	BRASIL. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 206, Guatela (FUEL), Urdampilleta <i>et al.</i> 217, Guatela (FUEL).
<i>S. hebecarpa</i> Benth.	BOLÍVIA. Dpto. La Paz. Ferrucci <i>et al.</i> 2050, Prov. Larecaja (CTES); Ferrucci <i>et al.</i> 1918, Prov. Chiquitos (CTES).
<i>S. larrotteana</i> Cambess.	BRASIL. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 116, San Luiz (FUEL 34779); Urdampilleta <i>et al.</i> 150, Fz Doralice (FUEL 34739); Urdampilleta <i>et al.</i> 173, UEL (FUEL); Urdampilleta <i>et al.</i> 274, Sapopema (FUEL).
<i>S. meridionalis</i> Cambess.	ARGENTINA. Misiones. Urdampilleta <i>et al.</i> 142, Puerto Iguazu, (FUEL 34751); Urdampilleta <i>et al.</i> 198, Ganipa (FUEL). BRASIL. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 172, 1º Maio (FUEL); Urdampilleta <i>et al.</i> 188, San Luiz (FUEL). São Paulo. Urdampilleta <i>et al.</i> 169, Echapura (FUEL 34729). BOLÍVIA. Dpto. Tarija. Ferrucci <i>et al.</i> 1749, Prov. O'Connor (CTES).
<i>S. multiflora</i> Cambess.	BRASIL. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 133, Arapongas, (FUEL 34757); Urdampilleta <i>et al.</i> 162, Rio Claro (FUEL 34717); Urdampilleta <i>et al.</i> 223, Fz Perdígão (FUEL);
<i>S. perulacea</i> Radlk.	BRASIL. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 179, Assai (FUEL).
<i>S. platycarpa</i> Benth.	BOLÍVIA. Dpto. Tarija. Ferrucci <i>et al.</i> 1836, Prov. Ñuflo de Chavez (CTES).
<i>S. regnellii</i> Schlecht.	BRASIL. São Paulo. Urdampilleta <i>et al.</i> 240, Aguas de Lindoia (FUEL); Urdampilleta <i>et al.</i> 243, Aguas de Lindoia (FUEL).
<i>S. tripleuria</i> Ferrucci	BOLÍVIA. Dpto. Chuquisaca. Ferrucci <i>et al.</i> 1755, Prov. Gran Chaco (CTES); Ferrucci <i>et al.</i> 1767, Prov. Calvo (CTES); Ferrucci <i>et al.</i> 1773, Prov. Cordillera (CTES).

Tabela 2 – Cariótipos das espécies e seções estudadas do gênero *Serjania*. TCM: tamanho cariotípico médio (mm), TCT: tamanho cariotípico total (mm), VCT: volume cariotípico total (mm³). A1 y A2, índices de assimetria intra- e intercromossômico respectivamente, TF%, assimetria cariotípica (Huziwara, 1962).

Espécies	Secc. Radlkofer*	Secc. A. Rodriguez ^b	2n	Fórmula Cariotípica	Varição crom. (µm)	TCM	TCT	VCT	Maior/ Menor	A ₁	A ₂	TF%
<i>S. glutinosa</i>	<i>Eurycoccus</i>	<i>Eurycoccus</i>	24	2 m + 3 sm + 6 st + 1 t	3,12-1,60	2,20	52,8	21,8	1,95	0,525	0,220	47,50
<i>S. gracilis</i>	<i>Eurycoccus</i>	<i>Eurycoccus</i>	24	2 m + 4 sm + 4 st + 2 t	2,37-1,46	1,77	42,4	14,7	1,62	0,497	0,196	49,22
<i>S. platycarpa</i> *	<i>Eurycoccus</i>	<i>Eurycoccus</i>	24	6 m + 5 sm + 1 st	2,72-1,16	1,85	44,5	19,7	2,34	0,303	0,257	71,40
<i>S. laruotteana</i>	<i>Eucoccus</i>	<i>Serjania</i>	24	1 m + 4 sm + 5 st + 2 t	3,95-1,77	2,49	59,6	30,6	2,23	0,533	0,287	47,97
<i>S. glabrata</i>	<i>Holcococcus</i>	<i>Serjania</i>	24	2 m + 3 sm + 5 st + 2 t	3,33-1,75	2,39	48,1	20,6	1,90	0,499	0,233	49,41
<i>S. tripleuria</i>	<i>Holcococcus</i>	<i>Serjania</i>	24	2 m + 4 sm + 5 st + 1 t	3,67-1,95	2,64	63,3	26,6	1,88	0,484	0,224	51,26
<i>S. multiflora</i>	<i>Oococcus</i>	<i>Serjania</i>	24	2 m + 5 sm + 5 st	3,78-1,81	2,65	63,6	20,1	2,09	0,464	0,255	
<i>S. perulacea</i>	<i>Oococcus</i>	<i>Serjania</i>	24	2 m + 4 sm + 3 st + 3 t	2,99-1,59	2,12	50,8	22,3	1,88	0,520	0,251	45,87
<i>S. crassifolia</i> *	<i>Simococcus</i>	<i>Serjania</i>	24	8 m + 1 sm + 1 st + 2 t	2,95-1,35	2,18	52,3	30,3	2,19	0,350	0,232	65,77
<i>S. fuscifolia</i>	<i>Simococcus</i>	<i>Serjania</i>	24	2 m + 4 sm + 5 st + 1 t	3,13-1,51	2,25	54,1	23,9	2,07	0,484	0,239	51,48
<i>S. hebecarpa</i>	<i>Syncoccus</i>	<i>Serjania</i>	24	9 m + 2 st + 1 t	3,17-1,56	2,36	56,7	25,8	2,03	0,323	0,229	67,91
<i>S. meridionalis</i>	<i>Syncoccus</i>	<i>Serjania</i>	24	1 m + 5 sm + 5 st + 1 t	3,65-1,91	2,81	67,5	32,2	1,91	0,488	0,229	49,22
<i>S. communis</i>	<i>Platyococcus</i>	<i>Platyococcus</i>	24	2 m + 2 sm + 3 st + 5 t	3,29-1,68	2,33	55,9	19,0	1,96	0,595	0,203	38,27
<i>S. regnellii</i> *	<i>Platyococcus</i>	<i>Platyococcus</i>	24	2 m + 2 sm + 6 st + 2 t	3,38-1,77	2,45	58,7	32,5	1,91	0,555	0,198	42,79

* Novas contagens cromossômicas. a Classificação por Radlkofer (1931-1934), b classificação por Acevedo Rodríguez (1993).

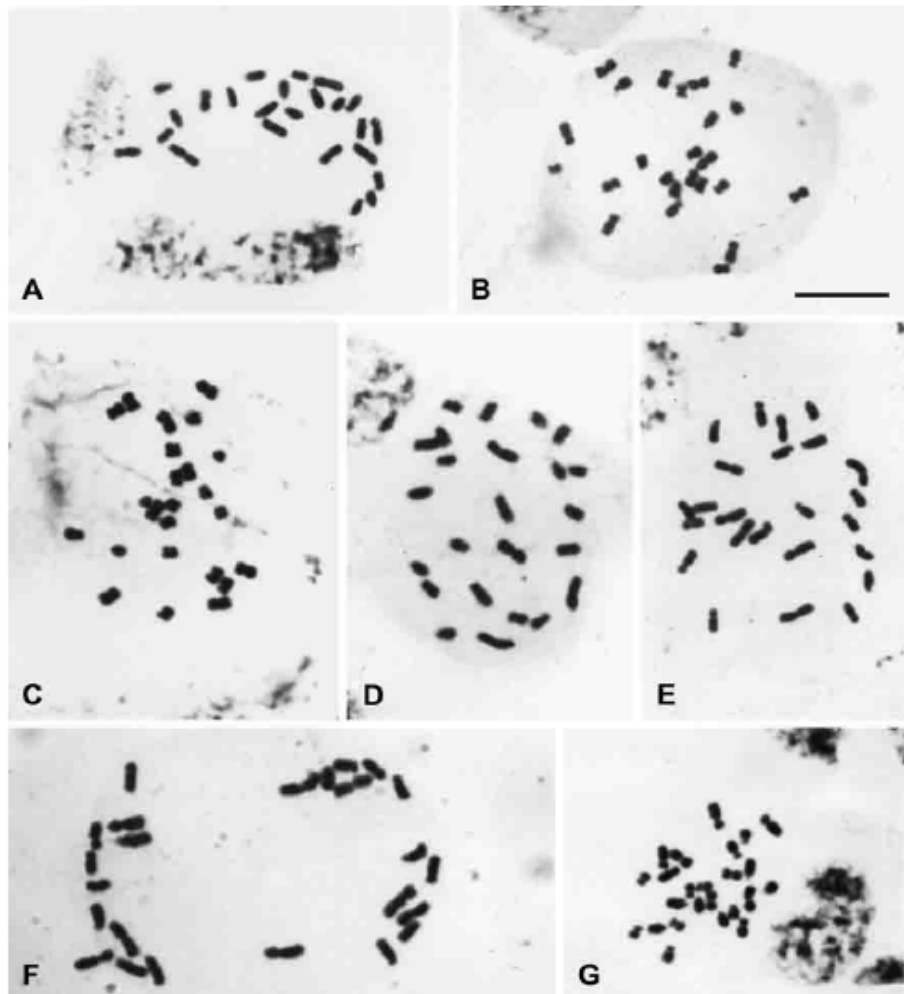


Figura 1 - Metáfases mitóticas de *S. glutinosa* (A), *S. gracilis* (B), *S. platycarpa* (C), *S. laruotteana* (D), *S. glabrata* (E), *S. tripleuria* (F) e *S. perulacea* (G). Barra = 10 µm.

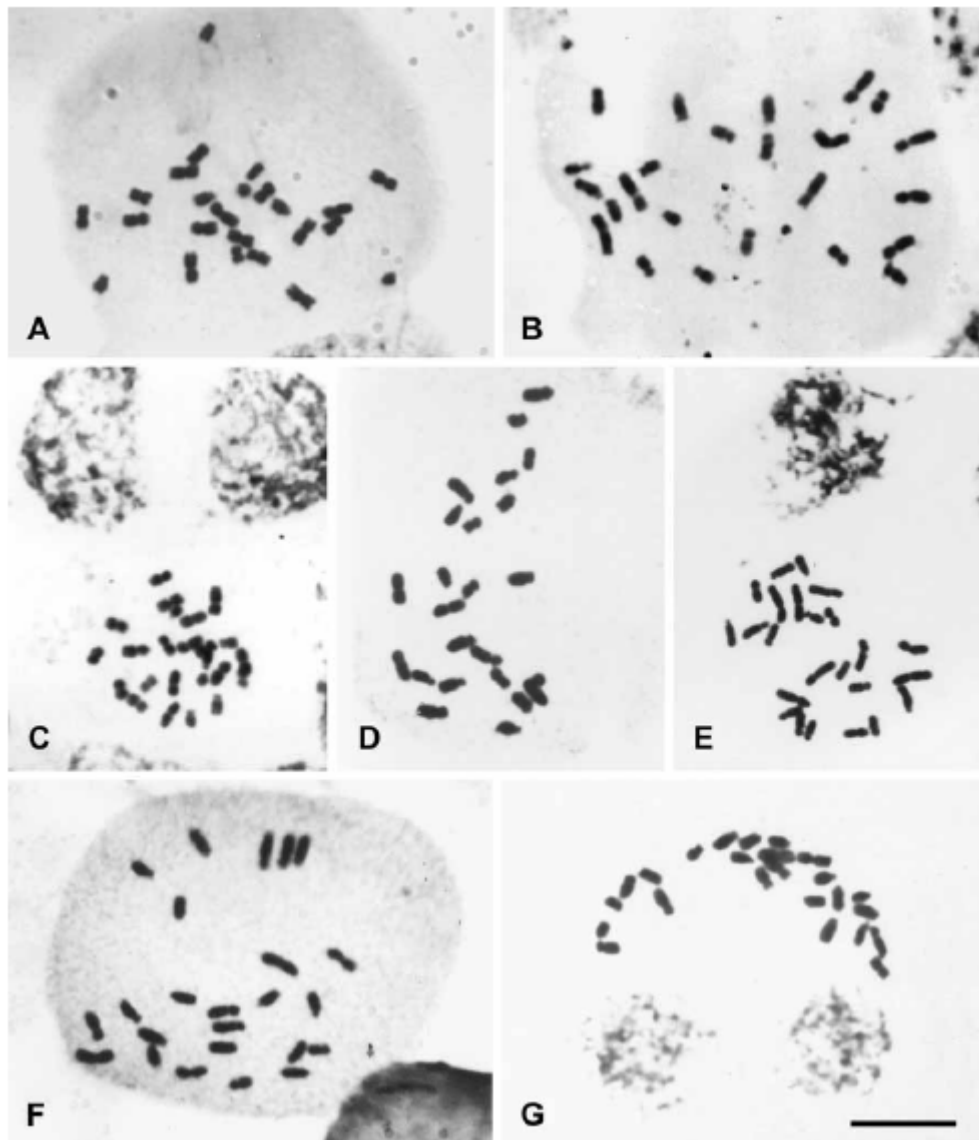


Figura 2 - Metáfases mitóticas de *S. crassifolia* (A), *S. fuscifolia* (B), *S. hebecarpa* (C), *S. meridionalis* (D), *S. multiflora* (E), *S. communis* (F) e *S. regnellii* (G). Barra = 10 mm.

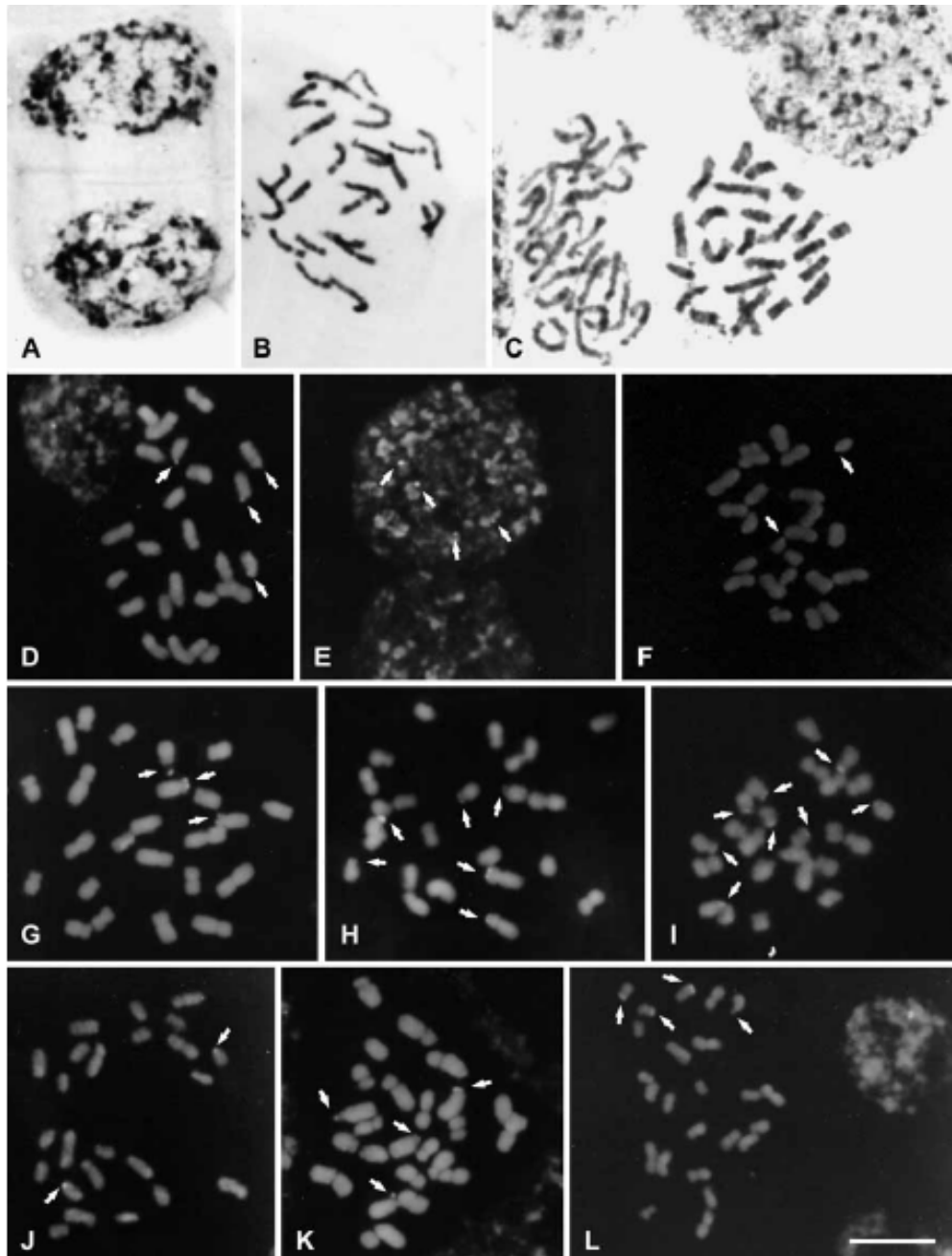


Figura 3 - Coloração HCl/Giemsa em *Serjania*, núcleos interfásicos semireticulados (A) e prófase mitótica (B), bandamento C-Giemsa em *S. gracilis* (C). Bandamento C-CMA3 em *S. communis* (D,E), *S. crassifolia* (F), *S. fuscifolia* (G), *S. larotteana* (H), *S. meridionalis* (I), *S. glabrata* (J), *S. perulacea* (K) e *S. platycarpa* (L). Barra = 10 mm.

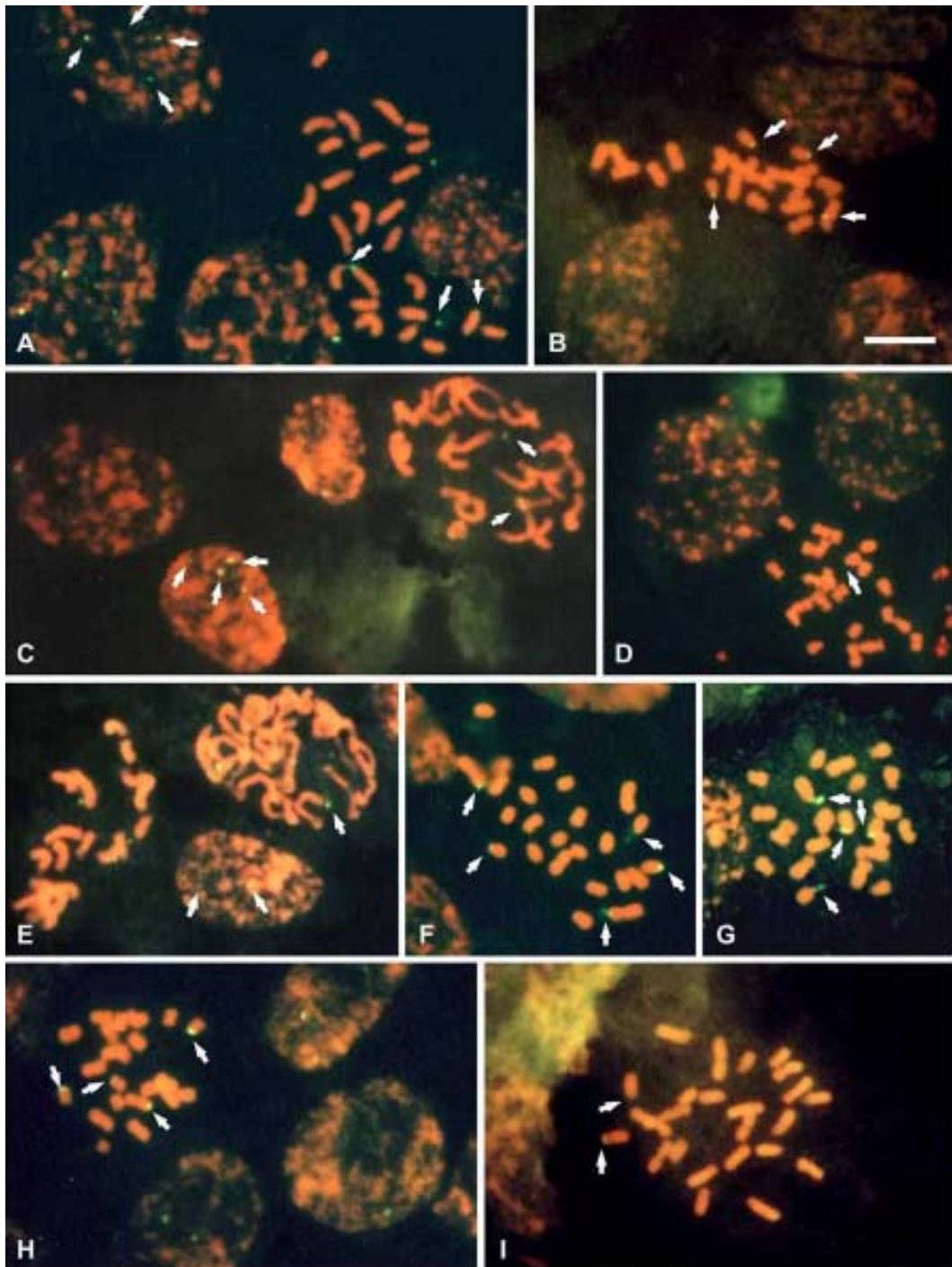


Figura 4 - Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando pTa71 (DNAr 45S) em A) *S. communis*; B) *S. crassifolia*; C) *S. glabrata*; D) *S. gracilis*; E) *S. hebecarpa*; F) *S. laruotteana*; G) *S. perulacea*; H) *S. platycarpa*; I) *S. regnellii*. Barra= 10 μ m.

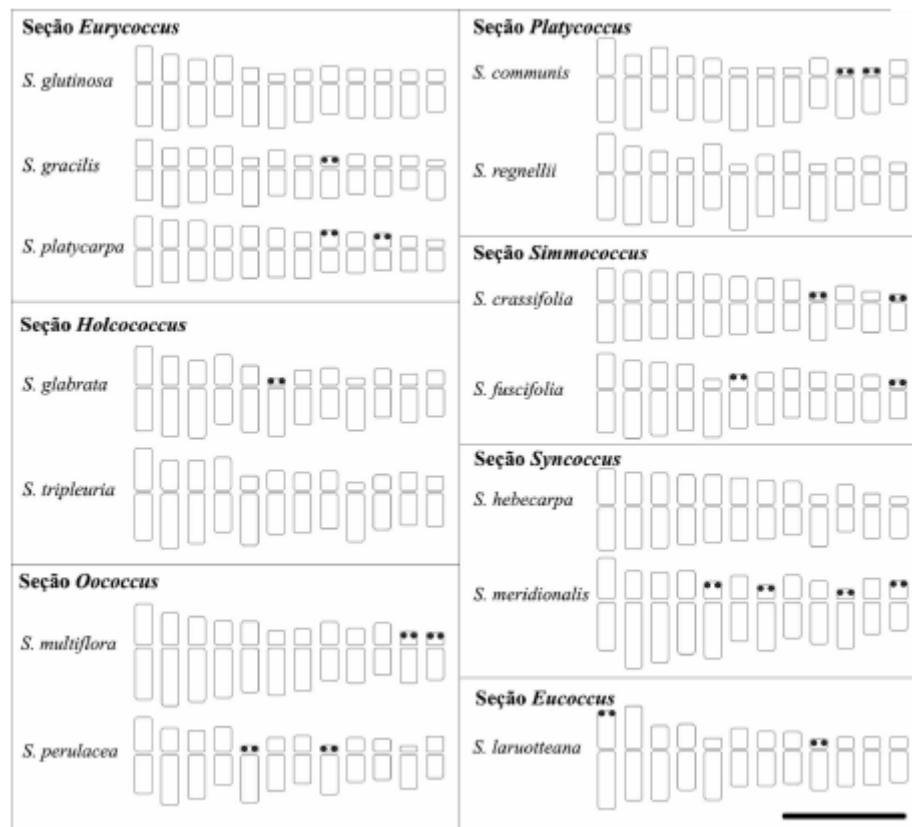


Figura 5 - Ideogramas das espécies estudadas de *Serjania*, classificadas segundo Radlkofer (1931-1934).

● CMA3/ DNAr 45S. Barra = 5 μm.

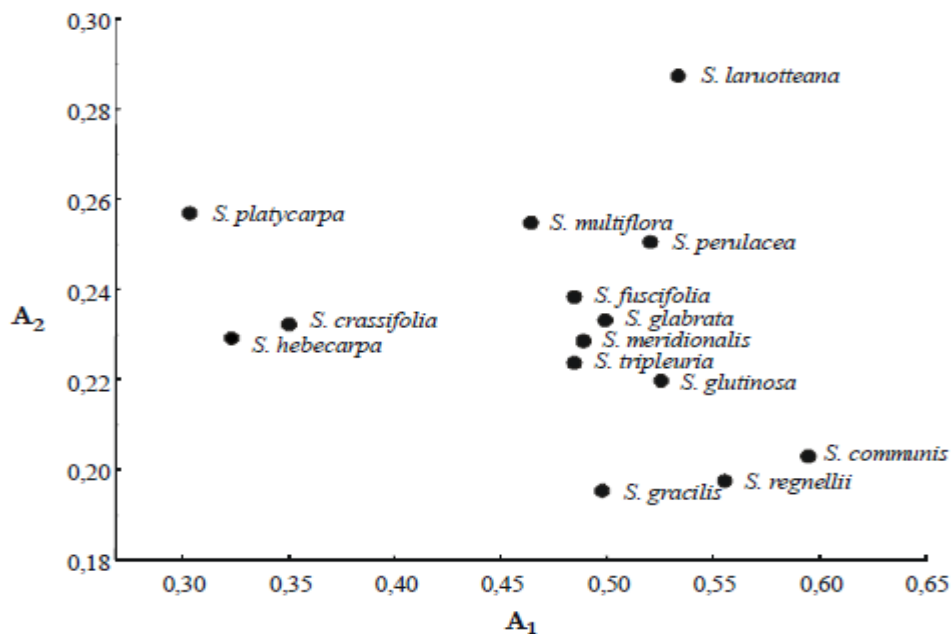


Figura 6 - Diagrama de dispersão da assimetria cariotípica, A1 e A2, das espécies estudadas de *Serjania*.

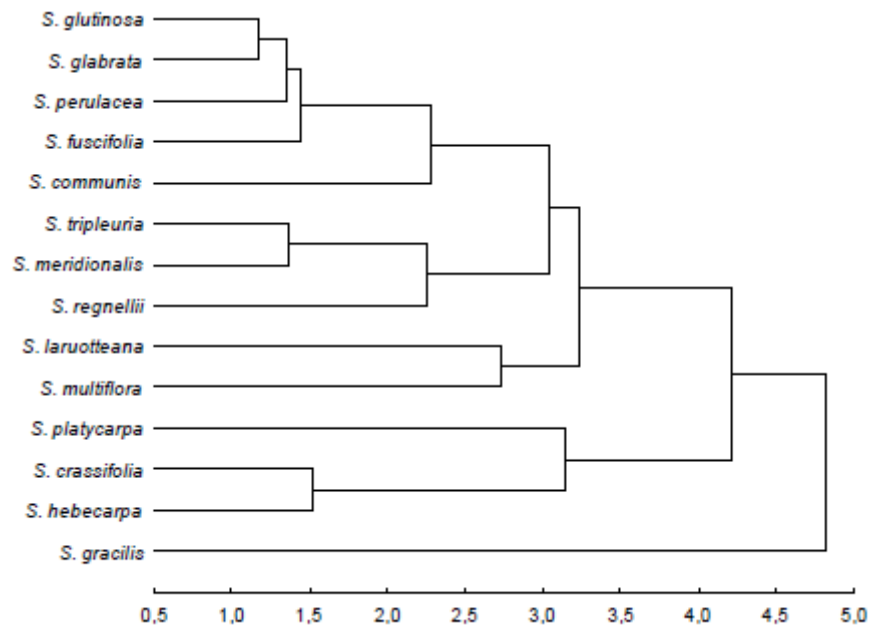


Figura 7 - Análise de agrupamento utilizando os caracteres cariotípicos das espécies estudadas do gênero *Serjania*.

2.2 DIFERENCIAÇÃO CARIOTÍPICA EM QUATRO ESPÉCIES SULAMERICANAS DE *PAULLINIA* L.
(PAULLINIEAE: SAPINDACEAE)

Trabalho a ser submetido à *Canadian Journal of Botany*, NCR Research Press,
Canadá

DIFERENCIAÇÃO CARIOTÍPICA EM QUATRO ESPÉCIES SULAMERICANAS DE *PAULLINIA* L. (PAULLINIEAE: SAPINDACEAE)

Juan D. Urdampilleta¹, María S. Ferrucci², André L. L. Vanzela^{1*}

Resumo

Paullinia L. é o segundo gênero mais importante em número de espécies na família Sapindaceae. Neste trabalho foram estudadas e comparadas quatro espécies, *P. elegans* Cambess., *P. meliifolia* Juss., *P. pinnata* L. e *P. rhomboidea* Radlk. utilizando as técnicas citogenéticas de coloração convencional, bandamento C-Giemsa e C-CMA3/DAPI e hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 45S. As espécies estudadas apresentaram $2n = 24$, destacando a conservação do número cromossômico no gênero. As espécies puderam ser diferenciadas pelo tamanho cromossômico e pela assimetria cariotípica. Os padrões de bandas e a localização física dos sítios de DNAr 45S são reportados pela primeira vez para o gênero. Bandas C-CMA3+ apareceram associadas com os sítios de DNAr 45S e apresentam uma variação entre as espécies. Mas a presença de outras bandas C-Giemsa que não foram reveladas pelo CMA3, sugere que mais de uma família de DNA repetitivo pode estar atuando no processo de diferenciação dos cariótipos destas espécies. As variações nos caracteres estudados concordam com os agrupamentos taxonômicos propostos, reforçando o uso da citogenética na sistemática de *Paullinia*.

Palavras chave: C-CMA3/DAPI. C-Giemsa. Heterocromatina. Hibridação *in situ*. *Paullinia*. Paullinieae. Sapindaceae.

Introdução

O gênero *Paullinia* L. (Paullinieae) é o segundo mais importante da família Sapindaceae em número de espécies, com cerca de 150 espécies distribuídas em 13 seções (Radlkofer, 1931-1934), cuja delimitação é confusa devido à natureza gradual dos caracteres utilizados nos tratamentos taxonômicos. Acevedo-Rodríguez (1993) reconheceu a tribo Paullinieae como um grupo monofilético e agrupou o gênero *Paullinia*, junto com *Cardiospermum* L. e *Urvillea* Kunth, em um clado caracterizado pela presença de caracteres derivados. Dentro da tribo

¹ Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

² Instituto de Botánica del Nordeste, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

^{1*} Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil - E-mail: andrevanzela@uel.br

Paullinieae, *Paullinia* diferencia-se dos demais gêneros pelo fruto em forma de cápsula carnosa de coloração avermelhada, além das sementes ariladas (Acevedo-Rodríguez, 1993).

Estudos citogenéticos no gênero *Paullinia* são escassos, sendo reportados os números cromossômicos de sete espécies, todas com $2n = 2x = 24$, e descritos os cariótipos de três delas (Mangenot & Mangenot, 1958; Semple, 1974; Ferrucci, 1981, 2000; Guerra, 1986; Ferrucci & Solís Neffa 1997; Solís Neffa & Ferrucci, 1998, 2001). Até o momento não são conhecidas informações citogenéticas sobre o padrão de bandas e a localização física de sítios de DNAr em espécies deste gênero. Na procura de novas fontes de variação que colaborem com tratamentos sistemáticos futuros e sobre os aspectos citogenéticos do gênero *Paullinia*, este trabalho tem como objetivo estudar quatro espécies: *P. elegans* Cambess., *P. meliifolia* Juss., *P. pinnata* L. e *P. rhomboidea* Radlk visando uma análise cariotípica convencional, e o mapeamento físico de segmentos repetitivos de DNA por bandamento C-Giemsa e C-CMA₃/DAPI e por hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 45S.

Materiais e Métodos

As espécies de *Paullinia* estudadas neste trabalho, bem como os locais de coleta estão detalhadas na Tabela 1. Na análise citogenética foram utilizadas meristemas radiculares pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína 2mM por 4-5 h a 15°C e fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v:v) durante 12 h e conservadas a -20°C. As preparações cromossômicas foram obtidas pela a técnica HCl/Giemsa (Guerra, 1983). Os ideogramas foram feitos após medições cromossômicas de cinco metáfases completas com similar condensação, e a classificação dos cromossomos mitóticos foi feita segundo Levan *et al.* (1964). Os índices de assimetria, A₁ e A₂ foram calculados segundo Romero Zarco (1986).

Os bandamentos cromossômicos foram realizados a partir de raízes digeridas numa solução de celulase 4% e pectinase 40% a 37°C durante 2 h, e montadas em ácido acético 45%. O tratamento utilizado nas lâminas foi baseado na técnica descrita por Schwarzacher *et al.* (1980), com algumas modificações. Posteriormente os materiais foram corados com Giemsa 2% (bandamento C-Giemsa) ou com CMA₃ (cromomicina A₃) 0,5 mg/mL e DAPI (4-6-diamino-2-fenilindole)

2µg/mL. Por último, as lâminas foram montadas em Entellan (bandamento C-Giemsa) e em glicerol 50%/ tampão McIlvaine pH 7,0/ 2,5 mM de MgCl₂ (bandamento com fluorocromos).

A localização física dos sítios de DNAr 45S foi realizada por FISH segundo a metodologia descrita por Heslop-Harrison *et al.* (1991) e Cuadrado & Jouve (1994), utilizando as sondas pTa71 contendo seqüências de DNAr 18S-5.8S-26S (Gerlach & Bedbrook, 1979). As sondas foram marcadas com biotina-14-dATP por *nick translation*.

Os sítios de hibridação foram detectados com avidina-FITC, as lâminas contra-coradas com 2,5 µg/mL de iodeto de propídeo e montadas numa solução (1:1, v:v) composta de *antifade* (Vector Labs.) e uma mistura de glicerol 50%/ tampão McIlvaine pH 7,0/ 2,5 mM de MgCl₂. As fotografias foram feitas utilizando os filmes Kodak Imagelink HQ 25 ISSO para coloração convencional, Kodak T-Max 100 ISO para bandamento C-CMA₃/DAPI e Fuji Color 100 ISO para FISH.

Resultados e Discussão

Foram estudadas quatro espécies do gênero *Paullinia*: *P. elegans*, *P. meliifolia*, *P. pinnata* e *P. rhomboidea*. O número cromossômico $2n = 2x = 24$ foi confirmado para *P. elegans*, *P. meliifolia*, *P. pinnata* e reportado pela primeira vez para *P. rhomboidea* (Tabela 1, Figura 1). Os cariótipos das quatro espécies encontram-se descritos na Tabela 1 e representados nos ideogramas da Figura 4. *Paullinia elegans* apresentou um cariótipo formado por $2m + 4sm + 4st + 2t$, diferindo apenas em um par mediano e um subtlocêntrico de *P. pinnata* ($3m + 4sm + 3st + 2t$). *Paullinia meliifolia* mostrou um cariótipo mais assimétrico, já que tem um maior número de cromossomos t que os demais cariótipos. Sua fórmula cariotípica foi $2m + 4sm + 3st + 3t$. Diferentemente do resto das espécies, *P. rhomboidea* não apresentou cromossomos t no complemento, contendo um maior número de cromossomos metacêntricos ($4m + 2sm + 6st$). Estes resultados permitiram organizar tais espécies em dois grupos, um formado por *P. elegans*, *P. meliifolia* e *P. pinnata* que apresentam todos os tipos cromossômicos, e o outro por apenas *P. rhomboidea* que destacan-se pela ausência de cromossomos telocêntricos, cuja

característica é comum aos cariótipos de *P. racemosa* Wawra e *P. coriacea* Casar. descritos por Solís Neffa & Ferrucci (1998, 2001).

A análise do tamanho e da simetria cariotípica dessas quatro espécies de *Paullinia* mostrou claramente uma variação interespecífica. *P. meliifolia* foi a espécie com cromossomos de maior tamanho, sendo o tamanho cariotípico total (TCT) igual a 69,3 μm e a variação cromossômica de 3,76 μm a 2,07 μm . A análise da simetria destacou que, *P. meliifolia* possui o maior valor de A1, o que é um reflexo da maior quantidade de cromossomos telocêntricos, e os menores valores de A2 (Tabela 1, Figura 2), como também foi observado por Solís Neffa & Ferrucci (1998). Assim, o cariótipo de *P. meliifolia* pode ser considerado mais assimétrico no que diz respeito aos tipos cromossômicos do que as outras três espécies.

Por outro lado, *P. rhomboidea* destacou-se pelo menor tamanho cromossômico, TCT = 34,9 μm , apresentando uma variação cromossômica de 2,14 a 0,89 μm . Quanto à simetria cariotípica, *P. rhomboidea* apresentou o menor valor A1, dado principalmente pela falta de cromossomos telocêntricos, e o maior valor para A2 dado pela diferença entre o cromossomo maior e os menores (Tabela 1, Figura 2). Este menor tamanho cromossômico em relação às outras espécies de *Paullinia*, é também reportado para *P. racemosa* e *P. coriacea*, característica que junto à falta de cromossomos telocêntricos, reforçam a classificação destas espécies dentro da seção *Phygoptilon* (Radlkofer, 1931-1934).

As espécies *P. elegans* e *P. pinnata* mostraram tamanhos intermediários com TCT de 43,7 e 60,8 μm , sendo a variação cromossômica de 2,57 a 1,18 μm e de 3,43 a 1,78 μm , respectivamente (Tabela 1). Solís Neffa & Ferrucci (1998) descreveram os cariótipos de *P. elegans* e *P. meliifolia*, e apesar de deferirem na fórmula cariotípica, nossos dados concordam com os tamanhos cromossômicos e a assimetria proposta. Na Figura 2 está esquematizada a variação de simetria cariotípica nestas quatro espécies, onde pode ser observada claramente a afinidade sistemática entre *P. elegans* e *P. pinnata*, reforçando a classificação destas espécies dentro da seção *Neurotoechus* (Radlkofer, 1931-1934).

Os núcleos interfásicos apresentam morfologia constante, por outro lado, o padrão de condensação profásico foi variável ao ponto de distinguir *P. rhomboidea* do resto das espécies. *Paullinia elegans*, *P. meliifolia* e *P. pinnata*

mostraram um padrão de condensação heterogêneo, com centros de condensação na região proximal, intersticial e terminal (Figura, 3A-B), enquanto que em *P. rhomboidea* o padrão de condensação foi proximal (Figura 3C), sugerindo uma organização genômica e cromossômica diferenciada do resto das espécies.

Por meio do bandamento C-Giemsa foi possível diferenciar *P. elegans* do resto das espécies, já que esta espécie apresentou blocos de heterocromatina terminais em vários cromossomos de seu complemento, além de algumas bandas intersticiais (Figura 3D-E). As espécies restantes não apresentaram blocos de heterocromatina por meio da técnica empregada neste trabalho, com exceção de *P. meliifolia* que apresentou algumas bandas terminais C-Giemsa pequenas, melhor observadas em prometáfases (Figura 3F-G). A heterocromatina observada em *P. meliifolia*, e principalmente em *P. elegans*, não gerou bandas após a coloração com C-CMA3/DAPI, sendo aqui consideradas bandas neutras (Guerra, 2000). Este tipo de heterocromatina foi recentemente descrita em algumas espécies de palmas, como em *Coccothrinax* Sarg. e *Schippia* Burret (Roser, 1994), como em outras espécies de Angiospermas (Guerra, 2000). Nas quatro espécies estudadas, o bandamento C-CMA3 evidenciou regiões ricas em GC sempre nos braços curtos (Figura 3H-K). No entanto, variações interespecíficas foram observadas no número de blocos e nos tipos cromossômicos. *Paullinia elegans* e *P. pinnata* mostraram seis bandas CMA3+, no entanto, em *P. pinnata* foi diferenciada por possuir uma banda no primeiro par cromossômico, enquanto que todas as bandas em *P. elegans* foram localizadas nos cromossomos de tamanho intermediário e menor (Figura 5). *Paullinia meliifolia* e *P. rhomboidea* apresentaram quatro e duas bandas pequenas ricas em GC, respectivamente.

No entanto, na primeira espécie as bandas apareceram no braço curto dos cromossomos telocêntrico, ao passo que em *P. rhomboidea* as bandas CMA3+ foram visualizadas em um par st (Figura 5). Em relação a *P. meliifolia*, nossos dados concordam com observações feitas por Solís Neffa & Ferrucci (1998) que reconhecem a presença de satélites nos cromossomos telocêntrico.

Como ocorre freqüentemente em plantas, os sítios ricos em GC em *Paullinia*, formam parte de HC-NORs (heterocromatina associada a regiões organizadoras de nucléolos) (Guerra, 2000). Esta relação foi evidenciada por hibridação *in situ* utilizando a sonda pTa71, a qual mostrou que tal relação ocorre não somente no número, mas também na posição dos sítios CMA3+ com os sítios

de DNAr 45S (Tabela 1, Figura, 4). Sendo assim, nossos resultados permitem propor a existência de pelo menos dois tipos de DNA altamente repetitivos para estas espécies de *Paullinia* cuja distribuição segue o padrão de distribuição equilocal: (i) regiões de DNA repetitivo ricos em bases GC associados à NOR e (ii) regiões de heterocromatina revelada por banda C, mas neutra para os fluorocromos CMA3/DAPI.

Tanto a estrutura do cariótipo quanto os padrões de bandas C-CMA3 e sítios de DNAr 45S utilizados neste estudo, demonstram que existe uma concordância entre a variação destes caracteres e os sistemas de classificação propostos, destacando a importante relação sistemática entre *P. elegans* e *P. pinnata*, as quais pertencem à seção *Neurotoechus*. Por outro lado, os padrões de banda C-Giemsa, permitem reconhecer a existência de outros mecanismos de diferenciação cariotípica, relacionados com a dispersão de DNA repetitivo, que atuam no gênero *Paullinia*.

Tabela 1 - Cariótipos das espécies estudadas do gênero *Paullinia*. TCM: tamanho cariotípico médio (mm), TCT: tamanho cariotípico total (mm). A1 y A2, índices de assimetria intra- e intercromossômico respectivamente. a Numero de sítios de DNAr 45S.

Espécies	2n	Fórmula Cariotípica	TCT (σm)	Varição (μm)	TCM	A1	A2	45S ^a	Localidade
Seção <i>Neurotoechus</i>									
<i>P. elegans</i>	24	2m + 4sm + 4st + 2t	43,7 (4,35)	2,57-1,18	1,82	0,48	0,24	6	ARGENTINA. Misiones. Urdampilleta <i>et al.</i> 147, Posadas (FUEL 34728). BRASIL. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 128, Fz Doralice, (FUEL 34789); Urdampilleta <i>et al.</i> 131, 1º Maio (FUEL 34715).
<i>P. pinnata</i>	24	3m + 4sm + 3st + 2t	60,78 (3,85)	3,43-1,78	2,53	0,47	0,20	6	BRASIL. Mato Grosso do Sul. Urdampilleta <i>et al.</i> 231, Pantanal, Paso de Lontra, (FUEL).
Seção <i>Caloptilon</i>									
<i>P. meliifolia</i>	24	2m + 4sm + 3st + 3t	69,3 (4,71)	3,76-2,07	2,88	0,51	0,20	4	BRASIL. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 134, Arapongas (FUEL 34732); Urdampilleta <i>et al.</i> 178, Assai, Café Forte (FUEL); Urdampilleta <i>et al.</i> 186, San Luiz (FUEL)
Seção <i>Phygoptilon</i>									
<i>P. rhomboidea</i>	24	4m + 2sm + 6st	34,92 (2,45)	2,14-0,89	1,45	0,46	0,29	2	BRASIL. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 158, Jataizinho (FUEL 34726); Urdampilleta <i>et al.</i> 185, San Luiz (FUEL), Urdampilleta <i>et al.</i> 233, Parque Arthur Thomas (FUEL).

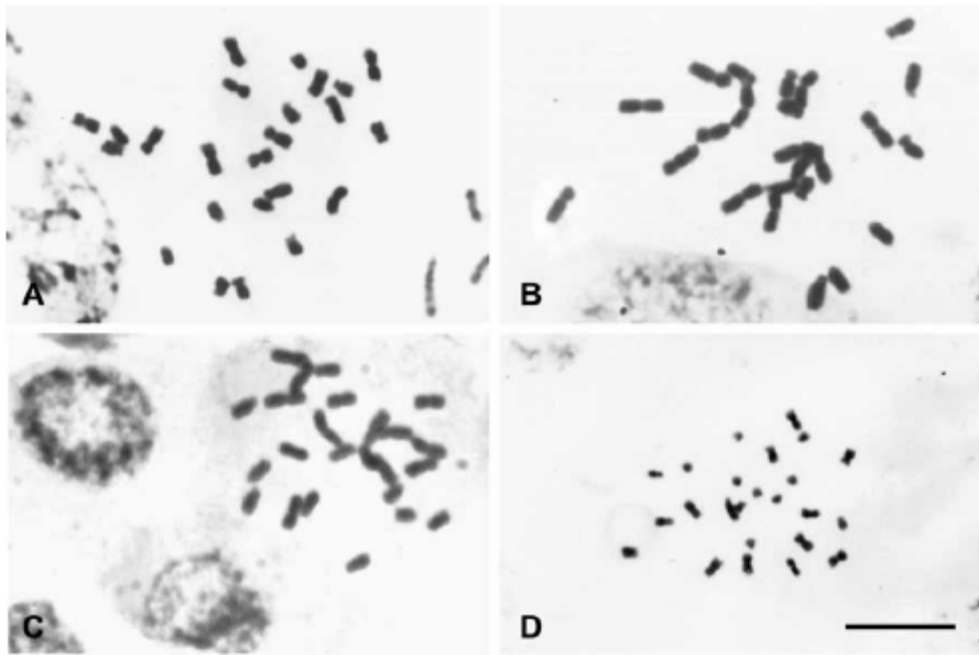


Figura 1 - Metáfases mitóticas coradas mediante HCl/Giemsa. A, *P. elegans*; B, *P. meliifolia*; C, *P. pinnata*; D, *P. rhomboidea*. Barra = 10 mm.

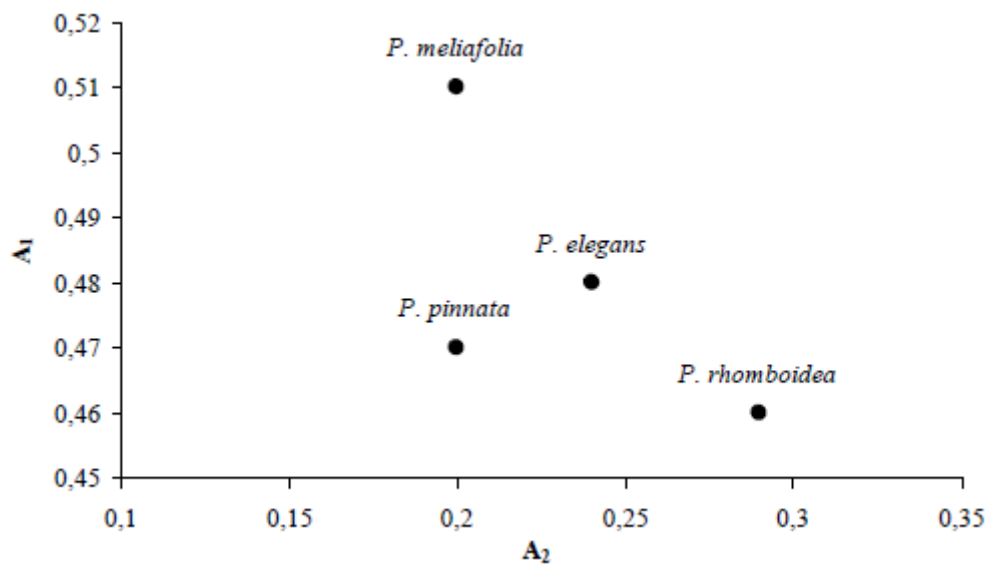


Figura 2 - Diagrama de dispersão tendo em conta os coeficientes de assimetria, A₁ e A₂, obtidos nas espécies estudadas de *Paullinia*.

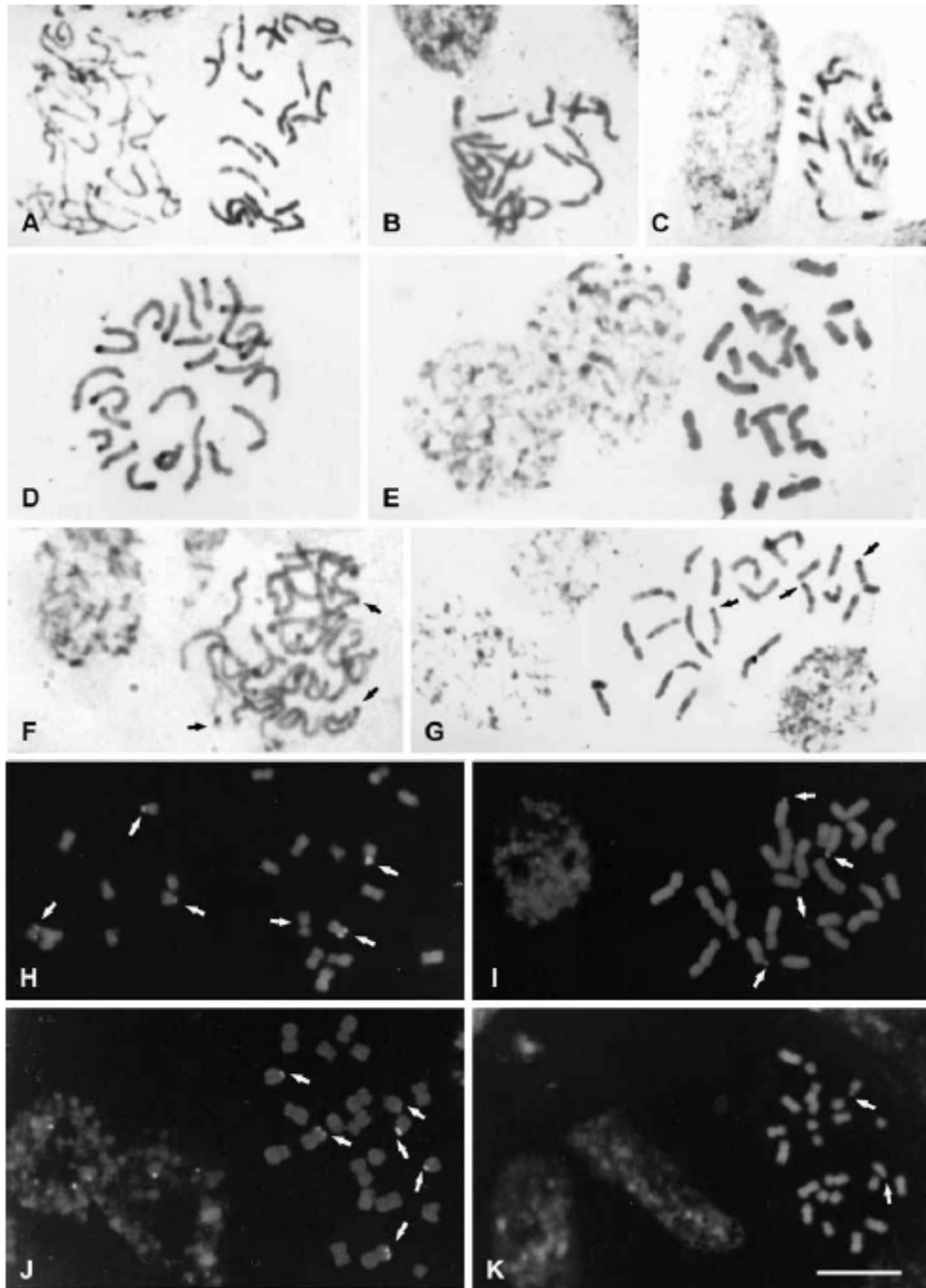


Figura 3 - Prometáfases mitóticas coradas com HCl/Giemsa, A, *P. elegans*; B, *P. meliifolia*; C, *P. rhomboidea*. Bandamento C-Giemsa, D-E, *P. elegans*; E-F, *P. meliifolia*. Bandamento C-CMA3, G, *P. elegans*; H, *P. meliifolia*; I, *P. pinnata*; K, *P. rhomboidea*. Barra= 10 mm.

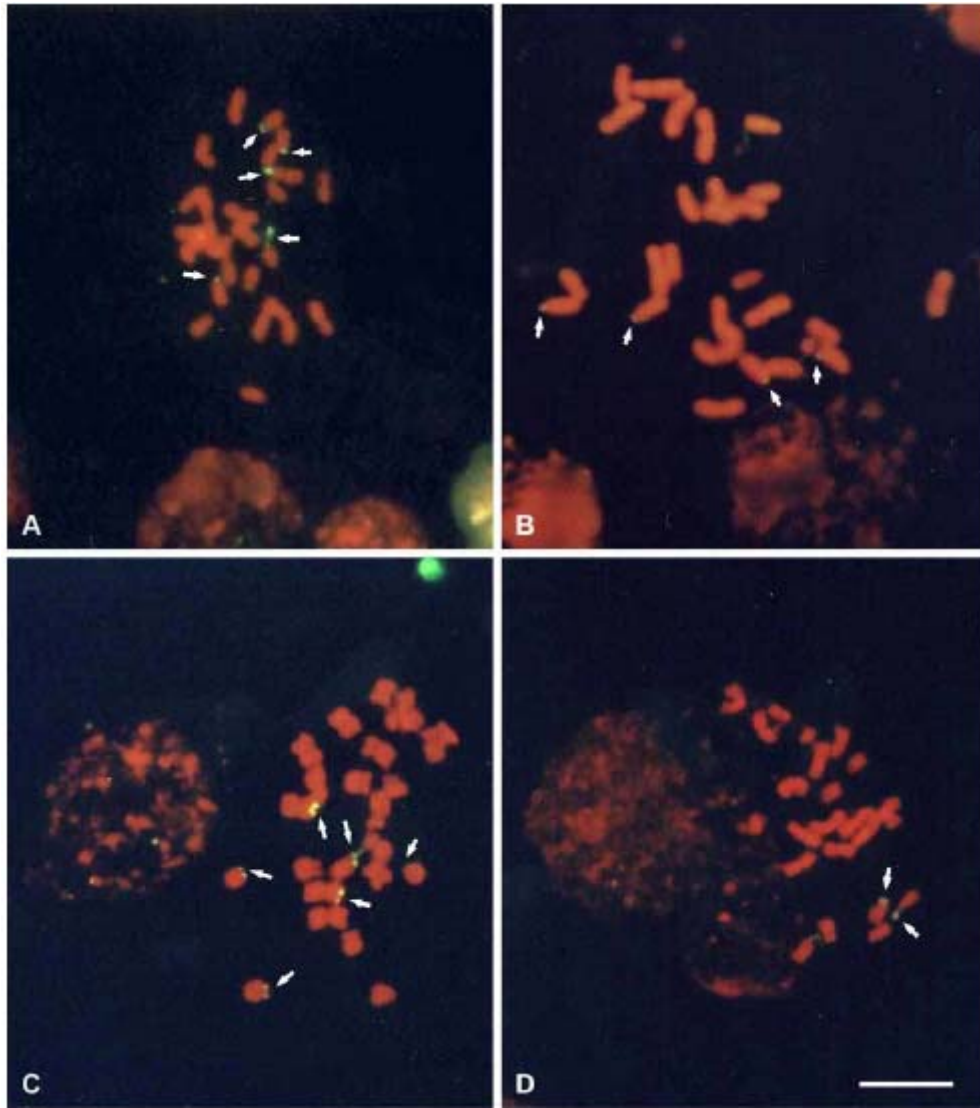


Figura 4 - Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando a sonda pTa71 (DNAr 45S). A, *P. elegans*; B, *P. meliifolia*; C, *P. pinnata*; D, *P. rhomboidea*. Barra = 10 mm.

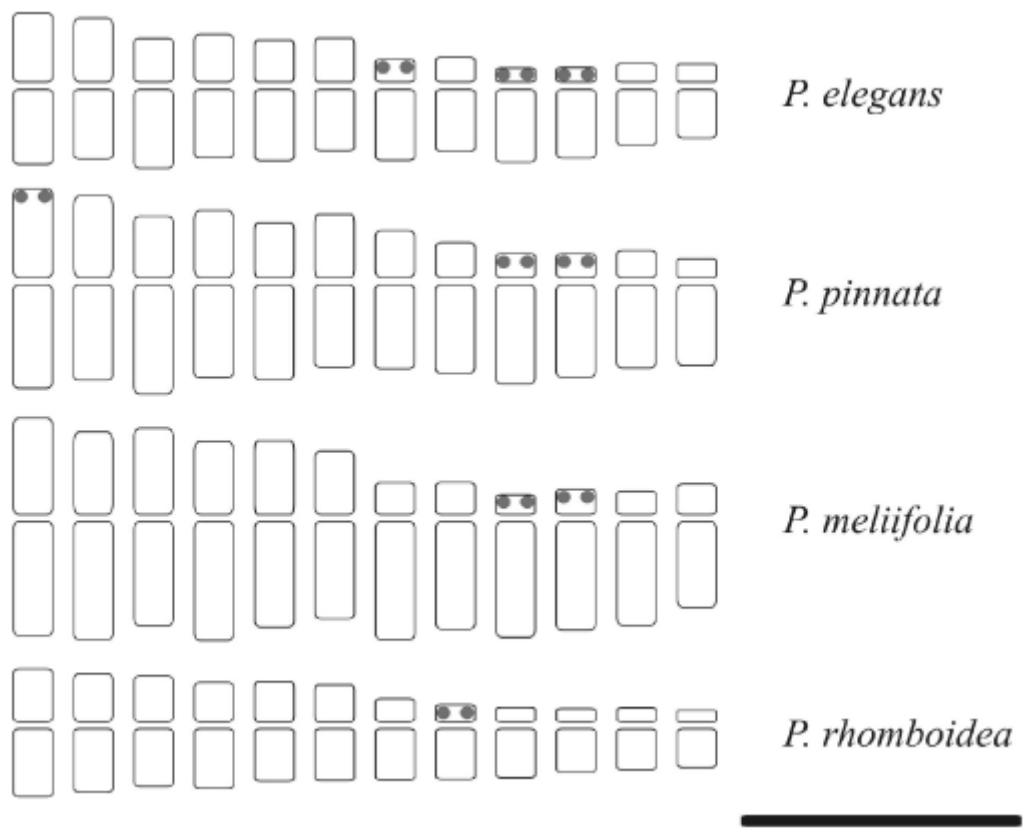


Figura 5 - Ideogramas das espécies estudadas do gênero *Paullinia*. CMA3 +/DNAr 45S. Barra = 5 mm.

2.3 DIFERENCIAÇÃO CARIOTÍPICA EM QUATRO ESPÉCIES SULAMERICANAS DE *URVILLEA*
KUNTH (SAPINDACEAE: PAULLINIEAE)

Trabalho a ser submetido à *Plant Systematics and Evolution*, Springer-Verlag,
Áustria

DIFERENCIAÇÃO CARIOTÍPICA EM QUATRO ESPÉCIES SULAMERICANAS DE *Urvillea* Kunth (Sapindaceae: Paullinieae)

Juan D. Urdampilleta¹. María S. Ferrucci². José M. D. Torezan³. André L. L. Vanzela^{1*}

Resumo

Urvillea Kunth é um gênero neotropical que pertence à tribo Paullinieae (Sapindaceae). Neste trabalho foram estudados por técnicas citogenéticas representantes das duas seções, *U. chacoensis* Hunz., *U. filipes* Radlk. e *U. ulmacea* Kunth da seção *Urvillea*, e *U. laevis* Radlk. da seção *Stenelytron*, caracterizando pela primeira vez o padrão de bandas C-Giemsa, C-CMA₃/DAPI e a localização física dos sítios de DNAr. Novas contagens cromossômicas foram realizadas para *U. filipes* (2n= 22) e *U. ulmacea* (2n= 88), como assim também aspectos inéditos da organização de DNAs repetitivos. As seções de *Urvillea* se diferenciaram por uma variação nos números básicos (x= 11 e 12). A seção *Urvillea* apresentou uma importante diferenciação cariotípica, pois além da presença de uma série poliplóide, as espécies se diferenciam pelo padrão de bandas, *U. chacoensis* mostrou um grande número de bandas heterocromáticas terminais ricas em AT, enquanto que em *U. ulmacea*, foram encontradas bandas tanto ricas em AT quanto em GC. Os resultados sugerem um processo de acúmulo de heterocromatina ricas em AT e GC nas regiões cromossômicas terminais AT como em GC. Sítios de DNAr apareceram associados a regiões ricas em GC, sendo o número variável entre espécies, podendo estar ou não associados aos sítios de DNAr 5S. Os resultados mostram que a variação na distribuição de DNA repetitivo tem um papel importante na diferenciação cariotípica das espécies do gênero *Urvillea*.

Palabras chave: C-CMA₃/DAPI. C-Giemsa. Citotaxonomia. Heterocromatina. Padrões de banda. Paullinieae, *Urvillea*.

¹ Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, Departamento de Biologia - Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil

² Instituto de Botánica del Nordeste, Universidad Nacional del Nordeste, C.C. 209, Corrientes, Argentina

³ Departamento de Biologia Animal e Vegetal, CCB, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

^{1*} Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, Departamento de Biologia - Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil - E-mail: andrevanzela@uel.br

Introdução

O gênero *Urvillea* Kunth pertence à tribo Paullinieae (Sapindaceae), juntamente com os gêneros *Cardiospermum* L., *Houssayanthus* Hunz., *Lophostigma* Radlk., *Paullinia* L., *Serjania* Mill. e *Thinouia* Triana & Planch. (Radlkofer, 1931-1934). Apesar de compartilhar características próprias da tribo, como o hábito trepador e presença de gavinhas, *Cardiospermum* e *Urvillea* são distinguidos por apresentar frutos capsulares geralmente com pericarpo membranoso e sementes com arilo seco.

Urvillea é um gênero de distribuição neotropical, subdividido em duas seções, *Urvillea* e *Stenelytron*, que são diferenciadas pela morfologia do fruto e da semente. A seção *Urvillea* apresenta frutos com lóculos inflados contendo três sementes ovóides por fruto, no entanto, *Stenelytron* possui lóculos comprimidos lateralmente com uma semente trígono-ovóide por fruto (Ferrucci, 2000b). O gênero conta com 17 espécies, sendo algumas de ampla distribuição e outras endêmicas (Ferrucci, 2000b). Destas, cinco foram estudadas citogeneticamente quanto ao número cromossômico e organização do cariótipo (Ferrucci, 1981, 1991, 1997a, 1997b; Lombello & Forni Martins, 1998; Nogueira *et al.*, 1995). O número básico varia entre seções, sendo $x = 11$ para a seção *Urvillea* e $x = 12$ para a seção *Stenelytron* (Ferrucci, 2000a). *Urvillea* é o único gênero da tribo Paullinieae que apresenta variações no nível de ploidia, $2n = 44$ em *U. uniloba* Radlk. e $2n = 22$ e 86 em *U. ulmacea* Kunth (Ferrucci, 1981; Nogueira *et al.*, 1995).

Informações sobre outros aspectos do cariótipo, como o padrão bandas e localização de sítios de DNAr em espécies de *Urvillea* são escassos. Em *Paullinieae*, somente duas espécies de *Cardiospermum* e duas de *Serjania* são conhecidas quanto ao padrão de bandas C, CMA₃ e DAPI, sendo destacada a ocorrência de bandas terminais ricas em bases AT. Segundo Hemmer & Morawetz (1990), a existência de blocos ricos em AT podem representar um caráter derivado em Sapindaceae. Com o objetivo de gerar novos conhecimentos sobre a sistemática do gênero *Urvillea* e obter novas informações sobre a distribuição de seqüências de DNAs repetitivos em *Paullinieae*, foram analisados neste trabalho os aspectos gerais do cariótipo de quatro espécies, *U. chacoensis* Hunz., *U. filipes* Radlk., *U. laevis* Radlk. e *U. ulmacea* Kunth, caracterizando pela primeira vez o padrão de bandas e a localização física dos sítios de DNAr. Os resultados são discutidos levando em

consideração a evolução cariotípica de *Urvillea*, tentando reforçar os aspectos da classificação infragenérica e filogenética do gênero.

Materiais e Métodos

Neste trabalho foram estudadas três espécies da seção *Urvillea* (*U. chacoensis*, *U. filipes* e *U. ulmacea*), e uma espécie da seção *Stenelytron* (*U. laevis*) (Tabela 1). Para as preparações cromossômicas foram utilizados meristemas radiculares pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína 2mM durante 4-5 h a 15°C, fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v:v) por 12 h e conservadas a -20°C. Para a coloração convencional foi realizada a técnica HCl/Giemsa (Guerra, 1983), e a partir de pelo menos cinco metáfases completas de cada uma das espécies foram confeccionados os ideogramas.

Os bandamentos cromossômicos foram realizados utilizando lâminas preparadas com ápices radiculares digeridos com celulase 4% e pectinase 40% a 37°C durante 2h e esmagados numa gota de ácido acético 45%. As lâminas foram tratadas segundo a metodologia descrita por Schwarzacher *et al.* (1980), e posteriormente coradas com Giemsa 2% ou com CMA₃ (cromomicina A₃) 0,5 mg/mL e DAPI (4-6-diamino-2-fenilindol) 2 µg/mL, e montadas em Entellan (bandamento C-Giemsa) ou em glicerol 50%/ tampão McIlvaine pH 7,0/ 2,5 mM de MgCl₂ (bandamento C-CMA₃/DAPI).

A detecção dos sítios de DNAr foi realizada mediante a técnica de FISH, como descrita por Heslop-Harrison *et al.* (1991) e Cuadrado & Jouve (1994), com modificações.

Para tal, foram utilizadas as sondas pTa71 contendo seqüências de DNAr 18S-5.8S-26S (Gerlach & Bedbrook, 1979) e pTa794 portando DNAr 5S (Gerlach & Dyer, 1980). Ambas as sondas foram marcadas com biotina-14-dATP por *nick translation* e os sítios de hibridação foram detectados com avidina-FITC. As lâminas foram coradas com 2,5 µg/mL de iodeto de propídeo e montadas numa solução composta por *Antifade* (Vector Labs.) e glicerol 50%/ tampão McIlvaine pH 7,0/ 2,5 mM de MgCl₂ (1:1, v:v). As fotografias foram feitas em filme Kodak Imagelink HQ 25 ISO para a coloração convencional, Kodak T-Max 100 ISO para o bandamento C-CMA₃/DAPI e Fuji Color 100 ISO para a hibridação *in situ*.

Resultados

Uma espécie da seção *Stenelytron*, *U. laevis* e três espécies da seção *Urvillea*, *U. chacoensis*, *U. filipes* e *U. ulmacea*, foram estudadas citogeneticamente, sendo confirmados os números cromossômicos de *U. laevis* ($2n=24$) e *U. chacoensis* ($2n=22$), e descritos pela primeira vez os números para *U. filipes* e *U. ulmacea*, as quais apresentam $2n=22$ e $2n=88$, respectivamente (Tabela 1, Figura 1).

Urvillea laevis apresentou um cariótipo formado por cromossomos que variaram em tamanho desde 3,56 a 1,99 μm , sendo sua fórmula cariotípica $8\text{ m} + 16\text{ sm}$ e o tamanho total do cariótipo de 65,82 μm . *U. chacoensis* apresentou uma variação cromossômica de 2,13-1,15 μm e um tamanho cariotípico total de 35,68 μm , com fórmula $2\text{ m} + 20\text{ sm}$.

Urvillea filipes apresentou uma variação cromossômica de 2,58 a 1,32 μm , sendo o tamanho cariotípico de 45,04 μm e a fórmula dada por $4\text{ m} + 2\text{ sm} + 4\text{ st} + 1\text{ t}$. No caso de *U. ulmacea*, foi encontrado um citótipo poliplóide caracterizado por cromossomos que variaram de 2,07 a 0,71 μm , com tamanho do complemento de 122,92 μm e uma fórmula cariotípica constituída por $1\text{ m} + 23\text{ sm} + 20\text{ st}$ (Tabela 1).

Urvillea laevis mostrou núcleos interfásicos semi-reticulados com pequenos cromocentros de formas irregulares, que muitas vezes fusionaram-se formando regiões de cromatina condensada de tamanhos maiores. O padrão de condensação profásico foi do tipo heterogêneo (Figura 1G). Da mesma forma que *U. laevis*, *U. filipes* apresentou um núcleo semi-reticulado com pequenos cromocentros, porém, esta espécie diferenciou-se por um padrão de condensação profásico do tipo proximal (Figura 1F). *Urvillea chacoensis* apresentou núcleo arreticulado/semi-reticulado com grandes e numerosos cromocentros, porém com padrão de condensação terminal (Figura 1E). Por outro lado, *U. ulmacea* apresentou núcleos interfásicos semi-reticulados de tamanho maior e com pequenos cromocentros, evidenciando um padrão condensação heterogêneo/terminal (Figura 1H).

Quanto ao padrão de bandas, *U. laevis* mostrou pouquíssimas bandas reveladas pelo bandamento C-Giemsa, as quais não permitiram estabelecer precisamente um padrão (Figura 2F). O bandamento C-DAPI mostrou bandas

terminais e intersticiais tênues ricas em AT (Figura 2H, 4) e no bandamento C-CMA₃ foram observadas de quatro a seis sítios ricos em GC nos braços curtos de três pares cromossômicos de tamanho intermediário e menor. Estas regiões de heterocromatina ricas em GC foram heteromórficas, variando no tamanho entre cromossomos homólogos e heterólogos (Figura 2G).

O cariótipo de *U. filipes* foi caracterizado pela ausência de bandas C e C-DAPI.

Esta espécie apresentou áreas de maior condensação nas regiões proximais de cada centrômero, provavelmente correspondente com o padrão de condensação proximal. Mas, quatro pequenos sinais foram observados após a coloração com CMA₃. Tais sítios correspondem à regiões heterocromáticas ricas em GC, localizadas nos braços curtos de dois pares cromossômicos (Figura 2E, 4, Tabela 1).

Urvillea chacoensis apresentou uma grande quantidade de heterocromatina, com bandas C-Giemsa em ambas as regiões terminais dos seis maiores pares cromossômicos do complemento. As bandas C-Giemsa restantes apareceram nas regiões terminais dos braços longos de quatro pares cromossômicos de tamanho intermediário e pequeno (Figura 4). O bandamento C-DAPI mostrou sinais coincidentes com aqueles revelados pelo bandamento C-Giemsa, evidenciando que uma grande parte do genoma desta espécie (43,8% do tamanho cariotípico total) é constituída por heterocromatina rica em bases AT. A coloração com C-CMA₃ revelou regiões de DNA repetitivo rico em GC nos braços curtos de três pares cromossômicos, correspondentes com cromossomos de tamanho intermediário e pequeno. No entanto, vale ressaltar que alguns cromossomos de tamanho intermediário apresentaram bandas ricas em GC na região terminal do braço curto e bandas ricas em AT na extremidade do braço longo (Figuras 2B-C, 4).

Em *U. ulmacea* foi encontrada uma grande quantidade de blocos de heterocromatina terminais em número elevado de cromossomos. A coloração C-DAPI mostrou que o cariótipo é composto por cromossomos com grande quantidade de heterocromatina rica em AT, em regiões terminais e intersticiais. A coloração com CCMA₃ também evidenciou a existência de uma grande quantidade de regiões ricas em GC localizadas nas regiões terminais de alguns cromossomos. Interessantemente, muitos cromossomos exibiram bandas em ambas as regiões

terminais, sendo que alguns blocos ricos em GC apareceram fisicamente adjacentes a blocos ricos em AT. Cerca de 12,9% do tamanho do cariótipo apareceu ocupado por regiões ricas em GC e 10,8% por regiões ricas em AT (Figura 2I-J, Tabela 1).

De um modo geral, em *U. chacoensis*, *U. filipes* e *U. laevis*, o número de sítios de heterocromatina ricos em GC mostraram uma relação direta com os sítios de DNAr 45S (Figura 3). A hibridação com a sonda pTa71 (DNAr 45S) mostrou seis sinais terminais tanto em *U. chacoensis* quanto em *U. laevis* (Figura 3A, 3C). Em *U. laevis*, foram encontradas diferenças no tamanho dos blocos entre pares cromossômicos, sendo quatro maiores e dois menores, diferentemente de *U. chacoensis* que exibiu sítios do mesmo tamanho em todos os pares. A hibridação com a mesma sonda em *U. filipes* mostrou quatro sítios de DNAr 45S, os quais também variaram em tamanho, sendo um par com bloco maior e o outro menor (Figura 3D). Em *U. ulmacea*, foram detectados entre 22 e 24 sítios de DNAr 45S (Figura 3E). A hibridação com a sonda pTa794 em *U. laevis* localizou quatro sítios de DNAr 5S nos mesmos cromossomos e em forma adjacente aos sítios detectados pela sonda de DNAr 45S (Figura 3B). Por outro lado, em *U. chacoensis* e *U. filipes* dois sítios de DNAr 5S foram detectados em outros cromossomos não portadores de sítios de DNAr 45S (Figura 3C, 3D).

Discussão

Das 17 espécies do gênero *Urvillea* somente seis foram estudadas do ponto de vista citogenético. No presente trabalho foi abordado, além da contagem cromossômica inédita para *U. filipes* ($2n = 22$) e *U. ulmacea* ($2n = 88$), aspectos inéditos da organização de DNAs repetitivos (heterocromatina e DNA ribossomal) em quatro espécies ocorrentes na América do Sul.

O caso mais interessante abordado aqui foi o de *U. ulmacea*. Trata-se de uma espécie de ampla distribuição, ocorrendo desde os Estados Unidos de América (Texas) até o Norte da Argentina (Jujuy, Salta e Misiones), cujo politipismo levou alguns autores a reconhecer taxones infraespecíficos (Radlkofer, 1931-1932; Barkley, 1957). As contagens cromossômicas realizadas por Nogueira *et al.* (1995) em uma população de Londrina (PRBrasil) apontaram $2n = 86$ cromossomos para esta espécie, no entanto, uma recontagem em amostras desta e de outras populações do norte do estado de Paraná mostrou $2n = 88$, constituindo um citótipo

poliplóide em relação diplóide com $2n= 22$ (Ferrucci & Solís Neffa, 1997; Ferrucci, 2000a). A fórmula cariotípica de *U. ulmacea* estudada aqui foi $1 m+ 23 sm + 20 st$, que difere significativamente da descrita por Nogueira *et al.* (1995) que é formado por $29 m + 13 sm + 1 t$, mas a variação no tamanho cromossômico foi semelhante.

Ferrucci & Solís Neffa (1997) citam um citótipo com $2n= 22$ proveniente do Departamento de Amambay (Paraguay) e Província de Jujuy (Argentina) que difere significativamente no cariótipo descrito por Solís Neffa & Ferrucci (2001) numa população do Mato Grosso do Sul. Nossos resultados mostram que o complemento poliplóide também difere dos citótipos diplóides, destacando uma notável variabilidade cariotípica intraespecífica em *U. ulmacea*.

É estimado que nas Angiospermas aproximadamente 70% das espécies sejam poliplóides (Wendel, 2000), e o número básico proposto para as Angiospermas ancestrais, Magnoliales e Laurales, é $x= 8$, sugerindo que os números cromossômicos na maioria das Angiospermas foi derivado por poliploidia ou disploidia/aneuploidia a partir de $x= 8$ (Morawetz, 1986). Os números $x= 14, 15$ e 16 presentes em 90% dos gêneros de Sapindaceae, de acordo com Morawetz (1986), poderiam ser derivados por poliploidia, sendo a maioria das espécies desta família paleotetraploides. Somente três gêneros de diferentes tribos em Sapindaceae exibem uma serie poliplóide, *Allophylus* L. (Thinouieae), *Melicoccus* P. Browne (Melicocceae) (Ferrucci & Solís Neffa, 1997), e *Urvillea*. O primeiro poliplóide descrito em *Urvillea* foi *U. uniloba* Radlk., um tetraplóide com $2n=4x= 44$ (Ferrucci, 1981). *Urvillea uniloba* é uma espécie próxima a *U. ulmacea*, o que sugere a possível existência de um complexo de espécies na qual a poliploidia seria o mecanismo evolutivo atuante na diferenciação de espécies e populações.

Os cariótipos das espécies de Paullinieae são diferenciados dos das demais tribos de Sapindaceae pelo menor número e pelo tamanho maior dos cromossomos (Hemmer & Morawetz, 1990; Solís Neffa & Ferrucci, 2001). Dentro de Paullinieae, *Cardiopermum* e *Urvillea* são os únicos que apresentam variação nos números básicos, sendo $x= 11$ e 12 (Ferrucci, 2000a). Estas variações diferenciam as seções do gênero *Urvillea*, sendo $x= 11$ característico da seção *Urvillea* (Ferrucci, 1981; Ferrucci & Solís Neffa, 1997; Nogueira, 1995; Solís Neffa & Ferrucci, 2001), e $x= 12$ característico da seção *Stenelytron* (Ferrucci, 1997b; Lombello & Forni Martins, 1998). Para Acevedo-Rodríguez (1993) e Hemmer & Morawetz (1990), a redução no número cromossômico seria um caráter derivado em *Sapindaceae*. Esta

variação cariotípica em relação às demais tribos de *Sapindaceae* é acompanhada pela ocorrência de outras apomorfias nos caracteres morfológicos, tais como habito trepador, câmbio supranumerários, gavinhas, estípulas e tipo de pólen diferente do restante da família. Para Acevedo-Rodríguez (1993), tais características morfológicas colocam Paullinieae como a tribo mais derivada em Sapindaceae. Mesmo assim, a evolução cariotípica por redução cromossômica em Paullinieae precisa ser confirmada com novas informações citogenéticas para novos membros da família.

Na tribo Paullinieae, $x = 14$ é característico de *Lophostigma* e *Thinouia*, ambos com $2n = 2x = 28$ (Ferrucci & Solís Neffa, 1997; Solís Neffa & Ferrucci, 1998), sendo estes gêneros reconhecidos pela presença de características plesiomórficas em relação aos restantes gêneros da tribo. O número mais freqüente nas espécies estudadas da tribo é $2n = 2x = 24$, e é exclusivo nos gêneros *Houssayanthus*, *Paullinia* e *Serjania* (Ferrucci, 2000a).

Cardiopermum e *Urvillea* possuem alta afinidade morfológica em relação a outros gêneros de Paullinieae, apresentam um número reduzido de espécies e compartilham caracteres morfológicos derivados como cápsula membranosa e nectários biglandulares.

Outra característica citogenética capaz de diferenciar as espécies do gênero *Urvillea*, foi o padrão de condensação profásico. *Urvillea chacoensis* e *U. ulmácea* apresentaram condensação terminal, provavelmente resultado da ocorrência de bandas heterocromáticas em posição terminal, e *U. filipes* condensação proximal, sendo que nesse caso não houve nenhuma relação com o padrão de bandas reveladas pela técnica C-Giemsa e C-CMA₃/DAPI.

Hemmer & Morawetz (1990) destacam que, além do maior tamanho e do número cromossômico reduzido, a tribo *Paullinieae* foi caracterizada pela ocorrência de bandas terminais ricas em AT. Estes autores estudaram os padrões de bandas de espécies do gênero *Cardiospermum* e *Serjania*, e mostraram que além de bandas terminais ricas em AT, bandas terminais ricas em GC também foram freqüentes. Nenhuma das espécies de *Urvillea* foi estudada quanto aos padrões de bandas C, CMA₃ e DAPI até o presente momento. Embora a distinção entre as seções do gênero não possa ser feita pelo padrão de bandas, nas espécies da seção *Urvillea* o padrão de bandas foi notavelmente contrastante. O bandamento C-CMA₃/DAPI colaborou de forma significativa na diferenciação de espécies, já que *U.*

filipes não mostrou bandas ricas em AT, ao passo que *U. chacoensis* mostrou cerca de 43% de seu cariótipo composto por blocos ricos em AT e *U. ulmacea* 12,9% de blocos ricos em GC e 10,8% de blocos ricos em AT. Um fato que chamou a atenção foi a ocorrência de blocos ricos em AT preferencialmente nas pontas dos cromossomos de *U. chacoensis*, e associados ou não a outros blocos ricos em GC, como em *U. ulmacea*. Esses dados concordam com o modelo de distribuição equilocal de bandas Schweizer & Loidl (1987), no que diz respeito aos processos de acúmulo de heterocromatina nas regiões cromossômicas terminais, favorecido pela orientação Rabl que facilitaria a amplificação e transposição de seqüências de DNA entre cromossomos não homólogos durante a interfase mitótica.

Nos vegetais, as regiões ricas em GC são freqüentemente associadas aos sítios de DNAr, sendo denominadas NOR-HC (heterocromatina associada a regiões organizadoras de nucléolos) e freqüentemente são localizadas em regiões terminais de braços curtos (Guerra, 2000). Em *Urvillea* os sítios de DNAr são associados a sítios ricos em GC, com exceção de *U. ulmacea* que apresenta grandes quantidades adicionais de heterocromatina rica em GC não associada a DNAr. Neste trabalho os sítios de DNAr foram mapeados por

FISH pela primeira vez, e os resultados demonstram uma variação interespecífica importante no que diz respeito ao número e a posição destes sítios. O número de sítios de DNAr 45S não concorda com a classificação em seções proposta para o gênero *Urvillea*, já que *U. laevis* e *U. chacoensis*, de seções distintas, compartilham a presença de seis sítios de DNAr 45S, no entanto *U. filipes* apresenta somente quatro sítios. Mas, a localização dos sítios DNAr 5S em relação aos sítios de DNAr 45S parece manter a relação com a sistemática proposta para este gênero, em *U. laevis* os sítios DNAr 45S e DNAr 5S são localizados no mesmo cromossomo, enquanto *U. chacoensis* e *U. filipes* estes sítios são localizados em cromossomos distintos.

Estes estudos comparativos sobre o padrão bandas e distribuição de DNAr sugerem que possa existir uma variação nestes caracteres, os quais acompanhariam a diferenciação cariotípica das espécies do gênero *Urvillea*. Assim, como em outros trabalhos que abordam os padrões de bandas e localização física de DNAr (Kao *et al.*, 2001; Ran *et al.*, 2001;

Torrell *et al.*, 2003), neste trabalho é destacada a importância destes marcadores como ferramenta na sistemática e estudos filogenéticos.

Tabela 1 - Caracteres citogenéticos gerais das espécies estudadas de *Urvillea*. TCT, Tamanho Cariotípico Total (2n).

Espécies	2n	Fórmula cariotípica	Varição (µm)	LCT (µm)	Núcleo interfásico, Padrão de condensação	Bandas AT (%)	Bandas GC	Localidade
Seção <i>Stemelytron</i>								
<i>U. laevis</i>	24	4 m + 8 sm	3,56-1,99	65,8	Semireticulado, Heterogêneo	-	-	BRASIL. Paraná. Urdampilleta 146, Londrina (FUEL 34738); Urdampilleta <i>et al.</i> 149, Ibiopora (FUEL 34745); Urdampilleta <i>et al.</i> 247, Paiquere, (FUEL). BOLÍVIA. Dpto. Santa Cruz. Prov. Chiquitos. Ferrucci <i>et al.</i> 1911 (CTES); Ferrucci <i>et al.</i> 1920 (CTES).
Seção <i>Urvillea</i>								
<i>U. filipes</i>	22	4 m + 2 sm + 4 st + 1 t	2,58-1,32	45,0	Semireticulado, proximal	-	-	BOLÍVIA. Dpto. Santa Cruz. Ferrucci <i>et al.</i> 1783, Prov. Cordillera (CTES); Ferrucci <i>et al.</i> 1789, Prov. Ichilo (CTES); Ferrucci <i>et al.</i> 1906, Prov. Velasco (CTES).
<i>U. chacoensis</i>	22	1 m + 10 sm	2,13-1,15	35,7	Semireticulado, terminal	43,8	4,8	BOLÍVIA. Dpto. Chuquisaca. Ferrucci <i>et al.</i> 1763, Prov. Calvo (CTES); Dpto. Santa Cruz. Ferrucci <i>et al.</i> 1912, Prov. Chiquitos (CTES).
<i>U. ulmacea</i>	88	1 m + 23 sm + 20 st	2,07-0,71	122,9	Semireticulado, heterogêneo/terminal	10,8	12,9	BRASIL. Paraná. Urdampilleta 192, Londrina (FUEL); Urdampilleta <i>et al.</i> 246, Paiquere (FUEL); Urdampilleta <i>et al.</i> 265, Imbau (FUEL).

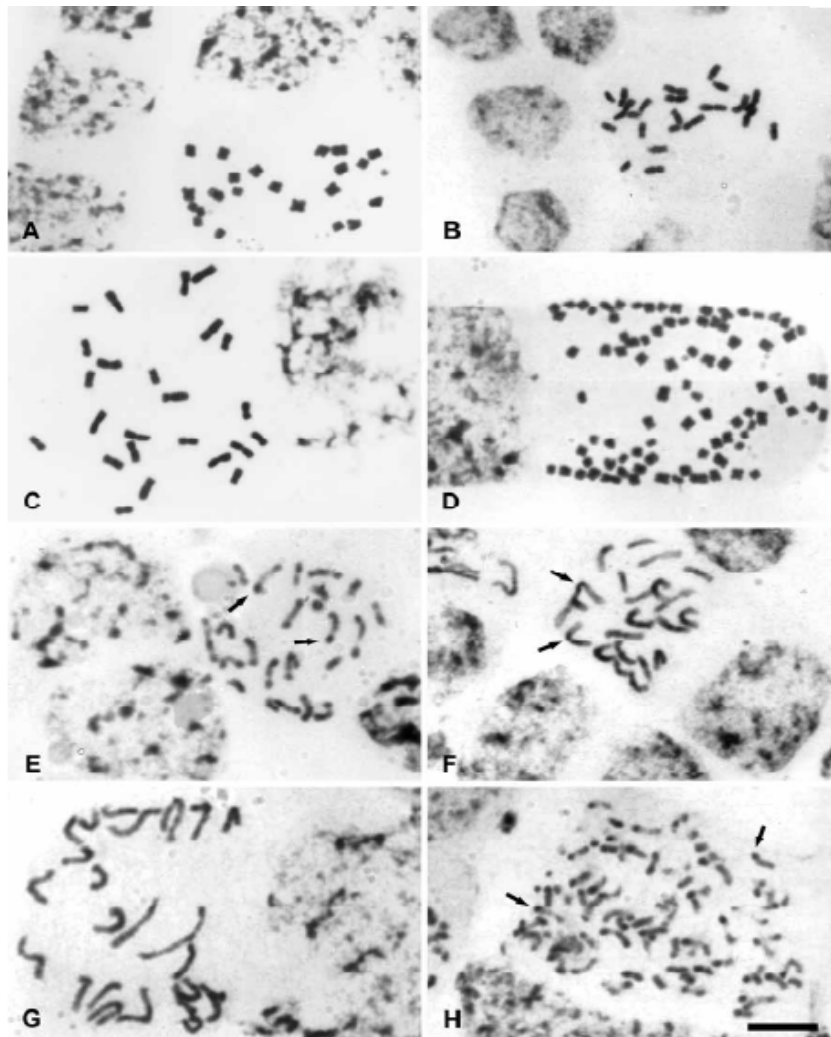


Figura 1 - Coloração convencional no gênero *Urvillea*. A-D, metáfases mitóticas e E-H, prometáfases mitóticas evidenciando diferentes centros de condensação (setas). A e E, *U. chacoensis*; B e F, *U. filipes*; C e G, *U. laevis*; D e H, *U. ulmacea*. Escala = 10 µm.

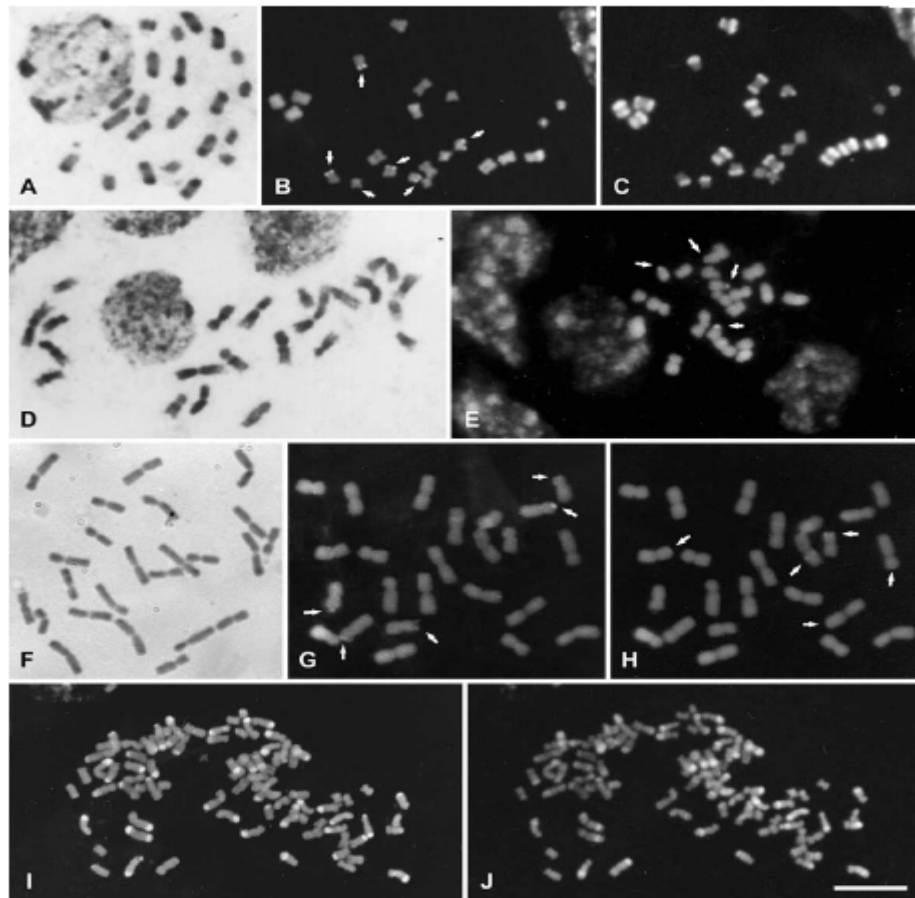


Figura 2 - Bandamento cromossômico no gênero *Urvillea*. A, C-Giemsa em *U. chacoensis*; B e C, C-CMA3 e C-DAPI, respectivamente em *U. chacoensis*; D e E, C-Giemsa e CCMA3, respectivamente em *U. filipes*; F, C-Giemsa em *U. laevis*; G e H, C-CMA3 e CDAPI respectivamente em *U. laevis*; I e J, C- CMA3 e C-DAPI, respectivamente em *U. ulmacea*. Barra = 10 mm

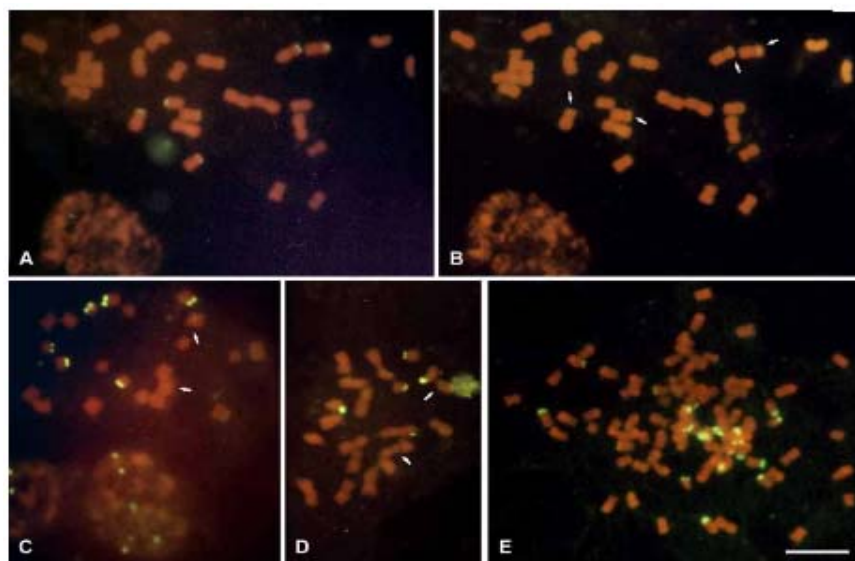


Figura 3 - Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) no gênero *Urvillea*. A e B, sítios de DNAr 45S e 5S respectivamente em *U. laevis*; C, sítios de DNAr 45S e 5S (setas) em *U. chacoensis*; D, sítios de DNAr 45S e 5S (setas) em *U. filipes*; E, sítios de DNAr 45S em *U. ulmacea*. Barra = 10 mm

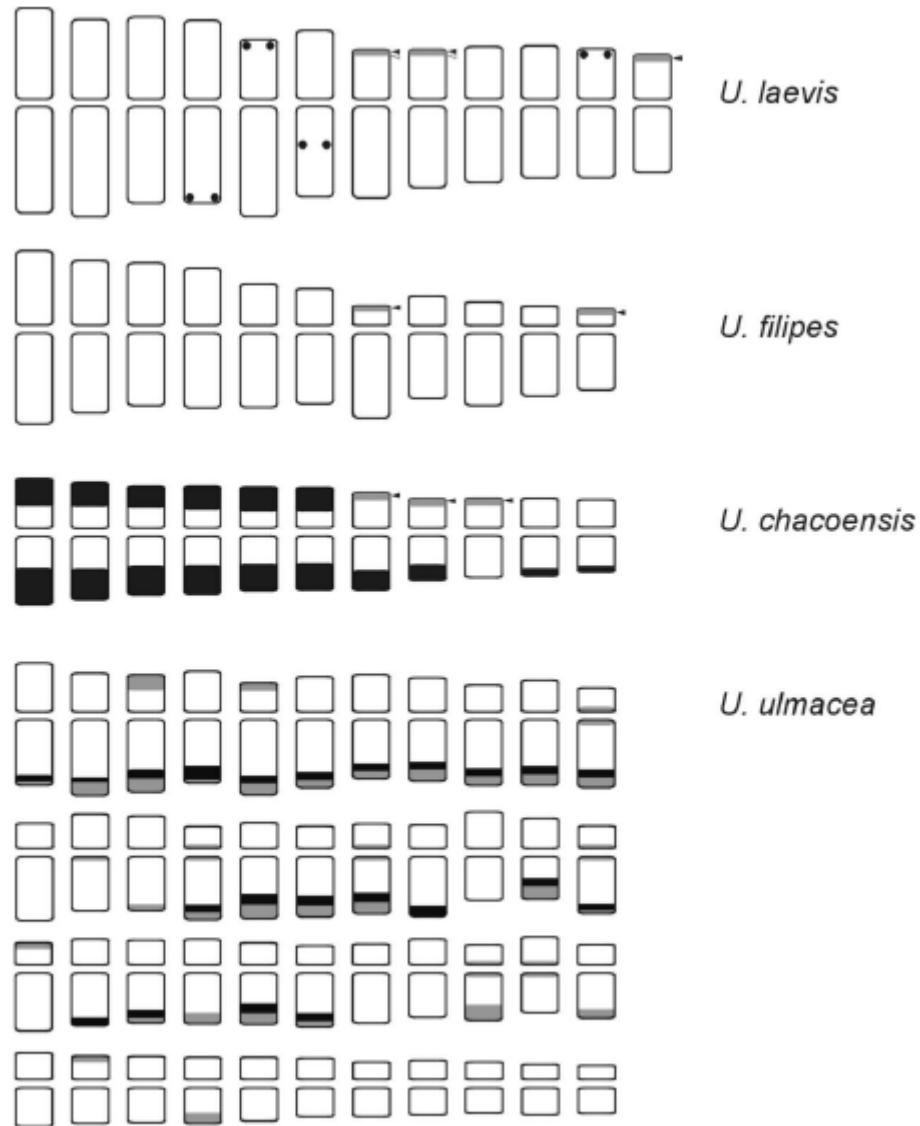


Figura 4 - Ideogramas das espécies estudadas do gênero *Urvillea*. regiões ricas em AT, ■ regiões ricas em GC. ▲ sítios de 45S, sítios de 5S. Barra = 5 µm.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1- Em seis espécies, dos de *Paullinia*, três de *Serjania* e uma de *Urvillea* são reportados novas contagens cromossômicas, além de confirmar os números cromossômicos em outras 16 espécies, onde pode ser destacada conservação do número cromossômico $2n = 24$ nos gêneros *Paullinia* e *Serjania*, como também uma diversificação nos números básicos nos dois gêneros mais derivados da tribo Paulinieae, *Urvillea* e *Cardiospermum*. O que sugere a existência de algum mecanismo relacionado de variação cromossômica numérica.

2- Os padrões de bandas C não são conservados em Paulinieae, onde a ausência de bandas é uma característica presente nos três gêneros estudados, especialmente no gênero *Serjania*. Por outro lado, a ocorrência de bandas C nos gêneros *Paullinia* e *Urvillea* poderia ser considerada um caráter derivado.

3- Os padrões de bandas C-CMA₃/DAPI mostram que na ocorrência de bandas heterocromáticas nos gêneros *Paullinia* e *Urvillea*, distintos tipos de DNA repetitivo são acumulados, bandas ricas em AT, GC e neutra.

4- Por outro lado, em Paulinieae é conservado a ocorrência de bandas C-CMA₃ associadas às NORs, detectados com a sonda de DNAr 45S, os quais variaram no número e posição nos gêneros estudados. Os sítios de DNAr 5S em *Urvillea* demonstraram que podem estar ou não associados fisicamente aos sítios de DNAr 45S.

5- No gênero *Urvillea*, variações cromossômicas numéricas (poliploidia e displóidia/aneuploidia) como assim também eventos de acúmulo de heterocromatina rica em GC ou AT, ocorrem principalmente na seção *Urvillea*, ressaltando deste modo o uso destes caracteres nos estudos sistemáticos.

5- Em *Paullinia*, variações cariotípicas estruturais e diferenciação no padrão de bandas concordam com a classificação infragenérica proposta. As espécies da seção *Phygoptilon* conformam um grupo cariotipicamente homogêneo, entretanto em outras seções como *Neurotoechus* e *Caloptilon* são destacados processos de heterocromatinização.

6- Em *Serjania*, a relativa variação cariotípica como assim também no número de sítios CMA₃/DNAr 45S e parcialmente concordante com as distintas

classificações infragenérica propostas, destacando a necessidade de uma revisão completa no gênero utilizando novas fontes de variação.

7- Nossos dados afirmam que a variação nos caracteres citogenéticos utilizados neste trabalho, principalmente a análise de DNA repetitivo, em relação a outras fontes de variação, resultam de extrema utilidade para futuros estudos biosistemáticos a ser desenvolvidos.

REFERÊNCIAS

- Acevedo Rodríguez, P.**, 1993. Systematics of *Serjania* (Sapindaceae). Part I: A revision of *Serjania* Sect. *Platycoccus*. *Mem. New York Bot. Gard.* 67: 1-93.
- APG II**, 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* 141: 399–436
- Barkley, F. A.**, 1957. Sapindaceae of southern South America. *Lilloa* 28: 111-179.
- Benabdelmouna A., M. Abirached-Darmency & H. Darmency**, 2001. Phylogenetic and genomic relationships in *Setaria italica* and its close relatives based on the molecular diversity and chromosomal organization of 5S and 18S-5.8S-25S rDNA genes. *Theor. Appl. Genet.* 103:668–677.
- Bennett, M. D.**, 1998. Plant genome values: How much do we know? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 2011–2016.
- Buijsen, J. R. M., P. C. Van Welzen & R. W. J. M. Van Der Ham**, 2003. A Phylogenetic Analysis of *Harpullia* (Sapindaceae) with Notes on Historical Biogeography. *Syst. Bot.* 28(1): 106–117.
- Crisci, J. V. & M. F. López Amengol**, 1983. *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. Monografía 26, Serie Biología. O.E.A., Washington, D. C.
- Croat, T. B.**, 1976. Flora de Panamá. Sapindaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 63: 419-540.
- Cronquist, A.**, 1988. The evolution and classification of flower plant. The New York Botanical Garden, USA.
- Cuadrado, A. & N. Jouve**, 1994. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequenses by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-*Triticale*. *Chrom. Res.*, 2: 231-338.
- Fernández Casas, J. & J. Fernández Piqueras**, 1981. Estudio cariológico de algunas plantas bolivianas. *Anales Jard. Bot. Madrid* 38(1): 149-152.
- Ferrucci, M. S.**, 1981. Recuentos cromosómicos en Sapindáceas. *Bonplandia* 5(11): 73-81.
- Ferrucci, M. S.**, 1985. Recuentos cromosómicos en *Allophylus* y *Serjania* (Sapindaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 24 (1-2): 200-202.
- Ferrucci, M. S.**, 1989. Cromosomas en *Cardiospermum* y *Diplokeleba* (Sapindaceae), significado taxonómico y evolutivo. *Bonplandia* 6(3): 151-164.
- Ferrucci, M. S.**, 1997a. *Urvillea peruviana* (Sapindaceae) una nueva especie andina. *Bonplandia* 9: 237-240.

- Ferrucci, M. S.**, 1997b. El número cromosómico de *Urvillea laevis* (Sapindaceae). *Bonplandia* 9(3-4): 305-306.
- Ferrucci, M. S.**, 2000a. Cytotaxonomy of *Sapindaceae* with special reference to the Tribe *Paullinieae*. *Genet. Mol. Biol.* 23(4): 941-946.
- Ferrucci, M. S.** 2000b. Revisión de los géneros de *Cardiospermum* y *Urvillea* para el neotrópico (Sapindaceae). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.
- Ferrucci, M. S. & V. G. Solís Neffa**, 1997. Citotaxonomía de Sapindaceae sudamericanas. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 33(1-2): 77-83.
- Gadek, P. A., E. S. Fernando, C. J. Quinn, S. B. Hoot, T. Terrazas, M. C. Sheahan & M. W. Chase.** 1996. Sapindales: molecular delimitation and infraordinal groups. *Amer. J. Bot.* 83: 802–811.
- Gerlach W. L. & J. R. Bedbrook**, 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* 7: 1869–1885.
- Greilhuber, J. & F. Ehrendorfer**, 1988. Karyological approaches to plant taxonomy. *Plant & Animal Sciences* 1: 289-297
- Guerra, M. S.** 1983. O uso do Giemsa em Citogenética Vegetal: comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Ciência e Cultura* 35: 190-193.
- Guerra, M.**, 1986. Citogenética de Angiospermas representantes de Pernambuco. I. *Revista Brasil. Genét.* 9: 21-40.
- Guerra, M.**, 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Mol. Biol.* 23: 1029-1041.
- Heslop-Harrison J. S., T. Schwarzacheret, K. Anamthewat-Jonsson, A. R. Leitch, M. Shi & I. J. Leitch**, 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome desnaturation. *Technique* 3: 106-109.
- Hemmer, W. & W. Morawetz**, 1990. Karyological differentiation in *Sapindaceae* with special reference to *Serjania* and *Cardiospermum*. *Bot. Acta* 103(4): 372-383.
- Huziwara, Y.**, 1962. Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. *Am. J. Bot.* 49: 116-119.
- Judd, W. S. R., W. Saunders & M. J. Donoghue**, 1994. Angiosperm family pairs: preliminary phylogenetic analyses. *Harvard Papers in Botany* 5: 1-51.
- Kao, Y. Y, S. B. Chang, T. Y. Lin, C. H. Hsieh, Y. H. Chen, W. Chen & C. C. Chen**, 2001. Differential Accumulation of Heterochromatin as a Cause for Karyotype Variation in Phalaenopsis Orchids. *Ann. Bot.* 87: 387±395.

- Klaasen R.** 1999. Wood anatomy of the Sapindaceae. *IAWA Journal, Supplement 2*: 1-214.
- Levan, A., K. Fredga & A. A. Sandberg,** 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lombello, A. R. & E. R. Forni-Martins,** 1998. Chromosomal studies and evolution in Sapindaceae. *Caryologia* 51 (1): 81-93.
- Mangenot, S. & G. Mangenot,** 1958. Deuxième liste de nombres chromosomiques nouveaux chez diverses Dicotylédones et Monocotylédones d'Afrique occidentale. *Bull. Jard. Bot. Etat*, 28: 315-329.
- Meira, P. N. & K. S. Bawa,** 1969. Chromosomal evolution in tropical hardwoods. *Evolution* 23: 466-481.
- Morawetz, W.,** 1986. Remarks on karyological differentiation patterns in tropical woody plants. *Plant Syst. Evol.* 152: 49-100.
- Muller, J. & P. W. Leenhouts,** 1976. A general survey of pollen types in Sapindaceae in relation to taxonomy. Pp. 407-445 in I. K. Ferguson and J. Muller (eds.). The evolutionary significance of the exine. *Linnean Society Symposium Ser.* 1. London: Academic Press.
- Naranjo C. A., M. R. Ferrari, A. M. A. Palermo & A. L. Poggio,** 1998. Karyotype, DNA content and meiotic behaviour in five South American species of *Vicia* (Fabaceae). *Ann. Bot.* 82: 757-764.
- Nogueira Zampieri, C., P. M. Ruas, C. F. Ruas, C. F. & M. S. Ferrucci,** 1995. Karyotypic study of some species of *Serjania* and *Urvillea* (Sapindaceae; Tribe Paullinieae). *Amer. J. Bot.* 82(5): 646-654.
- Ohri, D.,** 1998. Genome size variation and plant systematics. *Ann. Bot.* 82: 75-83.
- Radlkofer, L.,** 1931-1934. Sapindaceae, in Engler, *Pflanzenr.* 98 (IV. 165): 1-1539.
- Ran, Y., K. R.W. Hammett & B. G. Murray,** 2001. Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia* (Amaryllidaceae). *Ann. Bot.* 87: 823-830.
- Romero Zarco, C.,** 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526-530.
- Roser, M.,** 1994. Pathways of karyological differentiation in palms (Arecaceae). *Pl. Syst. Evol.* 189: 83-122.
- Schwarzacher, T. P., P. Ambros & D. Schweizer,** 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst. Evol.* 134: 293-297.
- Schweizer, D. & J. Loidl,** 1987. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chrom. Today* 9: 61-74.

- Semple, J. C.**, 1974. Chromosome numbers of phanerogams. 5. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 61: 902-903.
- Solís Neffa, V. G. & M. S. Ferrucci**, 1997. Cariotipos de especies Sudamericanas de *Serjania* (Sapindaceae, Paullinieae). *Bonplandia* 9(3-4): 265-276.
- Solís Neffa, V. G. & M. S. Ferrucci**, 1998. Cariotipos de Sapindaceae sudamericanas. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 33(3-4): 185-190.
- Solís Neffa, V. G. & M. S. Ferrucci**, 2001. Karyotype analyses of some Paullinieae species (Sapindaceae). *Caryologia* 54: 371-376.
- Stace, C. A.**, 2000. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21th centuries. *Taxon* 49: 451-477.
- Torrell, M., M. Cerbah, S. Siljak-Yakovlev & J. Valle**, 2003. Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescence in situ hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Plant Syst. Evol.* 239: 141-153.
- Urdampilleta, J. D., M. S. Ferrucci, J. M. Torezan & A. L. L. Vanzela**, 2004. Karyotype differentiation between *Koelreuteria bipinnata* and *K. elegans* subsp. *formosana* (Sapindaceae) based on chromosome banding patterns. *Bot. J. Linn. Soc.*, em prensa.
- Van der Ham, R. W. J. M. & A. Tomlik**, 1994. *Serjania* pollen and the origin of the tribe Paullinieae (Sapindaceae). *Rev. Palaeobot. Palynol.* 83: 43-53.
- Vanzela, A. L. L., M. Guerra, & M. Luceño**, 1996. *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes (n= 2). *Cytobios* 88: 213-228.
- Wendel, J. F.**, 2000. Genome evolution in poliploids. *Plant Mol. Biol.* 42: 225-249.
- Zoldos V., D. Papes, M. Cerbah, O. Panaud, V. Besendorfer & S. Siljak-Yakovlev**, 1999. Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theor. Appl. Genet.* 99: 969-977.