



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARCOS LETAIF GAETA

**“DISTRIBUIÇÃO DE DNA REPETITIVO NOS  
CROMOSSOMOS DE *COPAIFERA LANGSDORFFII* DESF.  
(CAESALPINIOIDEAE): UMA IMPORTANTE ÁRVORE  
PRODUTORA DE ÓLEOS ESSENCIAIS”**

MARCOS LETAIF GAETA

**“DISTRIBUIÇÃO DE DNA REPETITIVO NOS  
CROMOSSOMOS DE *COPAIFERA LANGSDORFFII* DESF.  
(CAESALPINIOIDEAE): UMA IMPORTANTE ÁRVORE  
PRODUTORA DE ÓLEOS ESSENCIAIS”**

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

Orientador: Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela

Londrina  
2009

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

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

G129d Gaeta, Marcos Letaif.  
Distribuição de DNA repetitivo nos cromossomos de *Copaifera langsdorffii* Desf.  
(Caesalpinioideae) : uma importante árvore produtora de óleos essenciais / Marcos  
Letaif Gaeta. – Londrina, 2009.  
45 f. : il

Orientador: André Luis Laforga Vanzela.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade  
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Biologia Molecular, 2009.  
Inclui bibliografia.

1. Citogenética vegetal – Teses. 2. Plantas – Biologia molecular – Teses. 3. Cesal-  
pinacea – Mapeamento cromossômico – Teses. I. Vanzela, André Luis Laforga. II.  
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná.  
IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 581.169

MARCOS LETAIF GAETA

**“DISTRIBUIÇÃO DE DNA REPETITIVO NOS CROMOSSOMOS DE  
*COPAIFERA LANGSDORFFII* DESF. (CAESALPINIOIDEAE): UMA  
IMPORTANTE ÁRVORE PRODUTORA DE ÓLEOS ESSENCIAIS”**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Mateus Mondin  
SALQ/USP - SP

Londrina, 19 de fevereiro de 2009.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Eliana e Angelo

## AGRADECIMENTOS

Meus primeiros agradecimentos vão para minha mãe, Eliana, ao meu pai Angelo, ao meu irmão Gustavo e a todos meus familiares que me ajudaram chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela, que não apenas me orientou dentro do LABRE, mas também se tornou um grande amigo.

Às fontes de fomento: CAPES, Fundação Araucária e ProPPG-UEL, pelo auxílio financeiro e concessão de bolsa de estudos.

Aos companheiros: Letícia, Priscila, Carlos, Renata, Vanessa, Carolina, Carolzinha e a todos do LABRE, pela convivência, amizade e pelas ajudas nos momentos de dificuldade.

À Alini, que apareceu para me dar equilíbrio no final deste Mestrado.

Aos ex-companheiros do LABRE, em especial, Thiago, Mariana e Felipe e aos novos companheiros do laboratório.

Ao Prof. Dr. José Marcelo, ao Prof. Dr. Rogério e à bióloga Alba Lúcia Cavalheiro pelos conselhos profissionais.

Ao Ed, Odair, Osmar, Norival e “Seu” João que me ajudaram nas coletas e manutenção das mudas de copaíba.

Ao Dário e Melissa pelo apoio técnico.

À Suely pela simpatia, paciência, ajuda e disposição.

À Prof. Dr. Maria Helena Fungaro, Dani, Roberta, Lara, pelas ajudas com as clonagens, sequenciamento e bioinformática.

Ao Prof. Dr. Cesar Martins por ceder espaço em seu laboratório e à Juliana Mazzuchelli pela ajuda com as clonagens.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Mestrado em Genética e Biologia Molecular.

Enfim, a todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

GAETA, Marcos Letaif. **Distribuição de DNA repetitivo nos cromossomos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinioideae)**: uma importante árvore produtora de óleos essenciais. 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

*Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinioideae, Leguminosae) é uma árvore de grande porte, com ampla distribuição no Brasil. Esta espécie é encontrada em abundância desde a Amazônia até as formações de Cerrado e suas transições. Possui grande importância econômica devido à produção de óleo-resina, bem como em programas de restauração ambiental. Em relação às características citogenéticas, *Copaifera langsdorffii* possui cromossomos grandes, ao contrário da maioria das Caesalpinioideae que possuem cromossomos pequenos, sugerindo uma alta incidência de DNAs repetitivos no genoma. Para verificar o nível de diferenciação cariotípica em populações separadas geograficamente, foram utilizadas ferramentas cito-moleculares (coloração convencional, bandamento CMA/DAPI, isolamento e caracterização de DNAs repetitivos e hibridação *in situ* fluorescente) a partir de indivíduos de cinco populações dos Estados do Mato Grosso do Sul, Bahia, São Paulo e Paraná. Todas as populações mostraram  $2n = 24$ , com predominância de cromossomos meta e submetacêntricos. Não foram encontradas variações cariotípicas contrastantes quanto ao número, tamanho e forma dos cromossomos. O núcleo foi sempre semi-reticulado com pequenas diferenças no tamanho e na porção de cromatina condensada entre as populações. O bandamento cromossômico mostrou um elevado número de blocos terminais e intercalares ricos em GC (CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>), as quais apresentaram algumas diferenças na presença, ausência, tamanho e posição de bandas ricas em GC nos pares 3, 5, 8, 9 e 10, entre as cinco populações. A hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 45S mostrou quatro sinais terminais, coincidentes com blocos CMA<sup>+</sup> nos braços curtos dos pares 7 e 8 (São Jerônimo da Serra - PR, Assaí - PR e São José do Rio Preto - SP), e nos pares 3, 7 e 8, com indício de translocação envolvendo os pares 3 e 8 (Rio de Contas - BA e Três Lagoas - MS). Um segmento de DNA satélite foi isolado por corte de DNA genômico com a enzima de restrição *RsaI*, com o qual foi gerada um fragmento com cerca de 180 pb. Este foi isolado e utilizado como sonda na FISH, sendo localizado em blocos, principalmente nas regiões terminais e subterminais dos cromossomos, coincidindo com parte dos blocos ricos em GC. Isto sugere que parte das bandas CMA<sup>+</sup> encontradas em *C. langsdorffii* podem pertencer a mais de uma família de DNA satélite. Para verificar a importância dos retroelementos no genoma de *C. langsdorffii* em relação aos outros segmentos repetitivos, foram realizadas reações de PCR com *primers* degenerados para elementos das famílias *Ty1-copia* e *Ty3-gypsy*, com posterior sequenciamento e FISH. Para o *Ty1-copia*, foi encontrada uma banda com cerca de 180 pb. Esta banda foi isolada e sequenciada, gerando um segmento de 185 pb, com sequência similar à da transcriptase reversa de *Ipomoea batatas*, o qual apareceu de modo disperso e homogêneo em todos os cromossomos após a FISH, independente da população. Para o *Ty3-gypsy*, foi encontrada uma banda de 410 pb no gel de agarose, que após um *Semi-Nested*-PCR e sequenciamento, revelou um segmento de 308 pb, similar às sequências da transcriptase reversa de *Cycas revoluta*. Na FISH, esta sonda apareceu também de modo disperso, com *dots* nas regiões terminais de alguns pares. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que as populações estudadas mantêm mais similaridades cariotípicas

do que diferenças. Do ponto de vista do DNA repetitivo, os cariótipos das populações de *C. langsdorffii* acumulam algumas diferenças decorrente do isolamento geográfico, se considerarmos a dinâmica dos mecanismos de diferenciação cariotípica envolvendo os segmentos de DNA repetitivos.

**Palavras Chave:** *Copaifera*. Cariótipos. DNAr. DNA satélite. Retroelementos.

GAETA, Marcos Letaif. **Distribution of repetitive DNA in the chromosomes of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinioideae):** na important tree produces essential oils. 2009. 45 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## ABSTRACT

*Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinioideae, Leguminosae) is a large tree, with wide distribution in Brazil. This species occurs from Amazônia until the Cerrado formations. It possesses a great economic importance due to oil-resin production as well as in programs of environmental restoration. *Copaifera langsdorffii* possess large chromosomes when compared to the majority of the Caesalpinioideae, suggesting a high incidence of repetitive DNAs. To verify the level of intraspecific karyotype differentiation, samples geographically separated were investigated by conventional and molecular cytogenetic. Samples were obtained from five populations of Mato Grosso do Sul, Bahia, São Paulo and Paraná States. All the populations showed  $2n = 24$ , with predominance of metacentric and submetacentric chromosomes. High variations in chromosome size and shape were not found. The nuclei were always semireticulated with small differences in the size and the portion of condensed chromatin in the all populations. The chromosome banding showed several GC-rich bands in terminal and intercalary positions, with evident differences in the presence, absence, size and position in few chromosomes when are compared all populations. The *in situ* hybridization with the 45S rDNA probe showed four terminals signals, coincident with CMA<sup>+</sup> blocks in the short arms of the chromosome pairs 7 and 8 (São Jerônimo da Serra - PR, Assaí - PR and São José do Rio Preto - SP), and in the chromosome pairs 3, 7 and 8, with indicative of the translocation in the chromosome pairs 3 and 8 (Rio de Contas - BA and Três Lagoas - MS). A satellite-DNA segment with 180 pb was isolated from genomic DNA with *RsaI* and the FISH located terminal and subterminal signals in seven chromosome pairs, coinciding with part of the GC-rich blocks. This suggests that part of the CMA<sup>+</sup> bands found in *C. langsdorffii* can belong to more than one family of satellite-DNA. To verify the importance of the retroelements on the genome of *C. langsdorffii* PCR with degenerate primers were carried. Internal segments of the reverse transcriptase of *Ty1-copia* and *Ty3-gypsy* families were isolated, sequenced and used to FISH. A segment of *Ty1-copia* with around 185 pb, with similar sequence to a reverse transcriptase of the *Ipomoea batatas*, was located dispersed along of all chromosomes. For the *Ty3-gypsy*, was obtained a segment with 308 pb, similar to reverse transcriptase sequence of *Cycas revoluta*. The probe located dispersed signals along the chromosomes, but with terminal dots in some chromosome pairs. The data gotten in this work suggest that the populations studied retain more karyotypic similarities than differences, and of the point of view of the repetitive DNA, the karyotypes of the populations of *C. langsdorffii* accumulate some differences due to the geographic isolation, if to consider the dynamics of the karyotypic differentiation mechanisms involving the repetitive segments of DNA.

**Keywords:** *Copaifera*. Karyotype. rDNA. Satellite DNA. Retroelements.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Exemplar adulto e croqui de *Copaifera langsdorffii* ..... 14
- Figura 2** – Coloração convencional com Giemsa nas diferentes populações de *Copaifera langsdorffii*. **A-** núcleo interfásico semi-reticulado (Três Lagoas). **B-** pró-metáfase com condensação heterogênea (São Jerônimo da Serra). **C-** pró-metáfase com condensação de proximal a homogênea (São José do Rio Preto). **D-G-** Metáfases com  $2n = 24$  referentes às populações de Assaí (D), São Jerônimo da Serra (E), Três Lagoas (F) e Rio de Contas (G). Barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .....34
- Figura 3** – Bandamento CMA/DAPI e FISH com sonda de DNAr 45S em diferentes populações de *Copaifera langsdorffii*. **A-E e G-** Metáfases bandeadas com CMA nas populações de São Jerônimo da Serra (A), Assaí (B), São José do Rio Preto (C) com seta apontado uma banda intercalar no braço longo em um homólogo do par 10, Rio de Contas (D) e Três Lagoas (E e G) com setas apontando os cromossomos envolvidos com a translocação da região terminal (seta aponta o homólogo do par 8 e a cabeça de seta aponta o homólogo do par 3). A Figura F mostra a ausência de bandas ricas em AT (DAPI) na população de Três Lagoas. **H-** Metáfase da população de Três Lagoas hibridada com a sonda de DNAr 45S (sequencial com a Figura G). Observe a seta apontando para um homólogo do par 8, o qual teve parte do seu braço curto translocado para um dos cromossomos do par 3 (cabeça de seta). (I) FISH com sonda de DNAr na população de São José do Rio Preto mostrando 4 sinais de hibridação. Barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$  .....34
- Figura 4 A -** Resultado da digestão do DNA genômico de *Copaifera langsdorffii* com a enzima de restrição *RsaI*. Na canaleta encontra-se o marcador de peso com 100 pb e na canaleta 2 o produto da digestão. Note as bandas em escada. **B-** Resultados das reações de PCR com os *primers* degenerados para o elemento *Ty1-copia* (canaleta 1) e com os *primers* para o elemento *Ty3-gypsy* (canaleta 2). A canaleta 3 mostra o marcador de peso molecular de 100 pb.....35
- Figura 5 A)** Sequência de nucleotídeos de *Copaifera langsdorffii* obtida a partir da PCR com os *primers* degenerados TAFLHG e YVDDML. B) Alinhamento da sequência de aminoácidos de *Ipomea batatas*, *Solanum demissum* e *Vitis vinifera* com sequências similares putativas a retroelementos. A região destacada (cinza) correspondente aos aminoácidos 24 a 28 representa um motivo localizado na região central característico da transcriptase reversa de

retrotransposons *Ty1-copia*. As regiões destacadas em preto correspondem a aminoácidos conservados. Dos 46 aminoácidos obtidos foi possível verificar que 27 (59%) aminoácidos são idênticos (conservados) a todas as espécies analisadas. As sequências utilizadas no alinhamento, assim como a sequência de aminoácidos do p*CI23* foram obtidas a partir do frame +2, segundo análise no banco de dados do ncbi com a ferramenta *BLAST(X)*. C) A tabela representa os dados referentes a cada sequência utilizada na análise e que apresentou melhor similaridade com a sequência p*CI23* .....36

**Figura 6** A) Sequência de nucleotídeos de *Copaifera langsdorffii* obtida a partir da PCR com os primers degenerados GyRT3 e GyRT4. B) Alinhamento da sequência de aminoácidos de *Vitis vinifera*, *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana* com sequências similares putativas a retroelementos. A região destacada (cinza) correspondente aos aminoácidos 28 a 32 representa uma região terminal conservada característica de transcriptase reversa de retroelementos do tipo *Ty3-gypsy*. As regiões destacadas em preto correspondem a aminoácidos conservados. Dos 44 aminoácidos obtidos foi possível verificar que 22 (50%) aminoácidos são idênticos (conservados) a todas as espécies analisadas. As sequências utilizadas no alinhamento, assim como a sequência de aminoácidos do clone p*CI08* foram obtidas a partir do frame +3, segundo análise no banco de dados do ncbi com a ferramenta *BLAST(X)*. C) A tabela representa os dados referentes a cada sequência utilizada na análise e que apresentou melhor similaridade com a sequência p*CI08* .....37

**Figura 7** – Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda p*CI*Rsa03 marcada com biotina-FITC em *Copaifera langsdorffii*. **A e B**- Núcleo interfásico e pró-metáfase da população de São Jerônimo da Serra. Observe a ocorrência de quatro sinais fortes e 10 fracos sempre na posição terminal e subterminal dos cromossomos. **C e D**- Prófase e metáfase da população de Assaí. Observe a ocorrência de seis sinais fortes. As setas indicam sinais de hibridação mais tênues. **E**- dupla hibridação com a sonda p*CI23* (*Ty1-copia*) marcada com biotina-FITC (verde) e com a sonda p*Ta71* (DNAr 45S) marcada com digoxigenina-rodamina (vermelho). A FISH mostra um perfil disperso de hibridação para o retroelemento e localizado para o DNAr. **F**- FISH com a sonda p*CI08* (*Ty3-gypsy*) marcada com biotina-FITC (verde) na população de São José do Rio Preto As setas apontam os blocos terminais em meio ao padrão disperso deste retroelemento. Barra corresponde a 10 µm .....38

**Figura 8** – Idiogramas e mapeamento físico dos cromossomos das diferentes populações de *Copaifera langsdorffii*. Blocos CMA<sup>+</sup> estão representados em amarelo. FISH com a sonda de DNAr 45S está representada por hachuras. (A) São Jerônimo da Serra. (B) Assaí. (C) São José do Rio Preto. (D) Três Lagoas. (E) Rio de Contas.....39

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	FAMÍLIA LEGUMINOSAE (CAESALPINIOIDEAE).....	13
1.2	CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DE COPAIFERA LANGSDORFFII.....	13
1.3	CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS DO GRUPO .....	15
1.4	CITOGENÉTICA MOLECULAR EM LEGUMINOSAS .....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	18
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>ARTIGO</b> .....	19
3.1	DISTRIBUIÇÃO DE DNAs REPETITIVOS NOS CROMOSSOMOS DE <i>COPAIFERA LANGSDORFFII</i> DESF. (CAESALPINIOIDEAE): UMA IMPORTANTE ÁRVORE PRODUTORA DE ÓLEOS ESSENCIAIS .....	19
3.2	RESUMO.....	20
3.2.1	Introdução.....	21
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.3.1	Material Vegetal e Coloração Convencional.....	22
3.3.2	Bandamento Cromossômico.....	23
3.3.3	Extração de DNA Genômico.....	23
3.3.4	Isolamento, Clonagem e Sequenciamento de Fragmentos de Retroelemento.....	24
3.3.5	Isolamento, Clonagem e Sequenciamento de DNA satélite.....	24
3.3.6	Hibridação In situ com Fluorescência .....	25
3.4	RESULTADOS.....	26
3.4.1	Análise Convencional.....	26
3.4.2	Bandamento Cromossômico.....	26
3.4.3	Localização dos Segmentos de DNAr 45S.....	27
3.4.4	Isolamento, Caracterização e Localização de DNA satélite.....	28
3.4.5	Isolamento, Caracterização e Localização de Retroelementos .....	28
3.5	DISCUSSÃO .....	29
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 FAMÍLIA LEGUMINOSAE (CAESALPINIOIDEAE)

A família Leguminosae é dividida em três subfamílias: Papilionoideae, Mimosoideae e Caesalpinioideae (Biondo et al., 2005a). Possui 18.000 espécies com uma ampla distribuição mundial, sendo a terceira maior das angiospermas, e uma imensa variedade em hábitos, ocorrendo desde ervas anuais a grandes árvores (Ohmido et al., 2007). As leguminosas são mundialmente importantes pelo seu uso. Servem tanto como base alimentar para humanos e outros animais, quanto pela capacidade de aumentar a quantidade de nitrogênio reduzido, através da simbiose com microrganismos (Pedrosa et al., 2002), muito importante para a agricultura sustentável (Ohmido et al., 2007). Exemplos de Leguminosae com grande importância comercial são: *Medicago sativa* L. (alfafa), que é a cultura forrageira mais importante no mundo (Cerbah et al., 1999), e vários gêneros que produzem grãos, como, *Vicia* L., *Lathyrus* L. e *Lens* Miller.

As Caesalpinioideae representam um grupo pantropical que ocorre nos mais variados habitats, com grande variabilidade de estruturas reprodutivas e vegetativas. Os táxons desta subfamília estão amplamente distribuídos em diversas formações vegetais ocorrentes na região sul do Brasil, como, Floresta Estacional, Floresta Estacional Decidual, Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Restingas, Cerrado e Campos Sulinos (Biondo et al., 2005b).

### 1.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DE *COPAIFERA LANGSDORFFII* DESF.

*Copaifera langsdorffii* (Figura 1) apresenta uma ampla distribuição, ocorrendo desde o norte do Brasil até o nordeste da Argentina (Pinto et al., 2004). Essa leguminosa é popularmente conhecida como copaíba. É uma árvore grande, característica de floresta latifoliada, que cresce abundantemente nos estados do Amazonas, Pará e Ceará, São Paulo, Paraná e nos estados da região centro-oeste (Paiva et al., 2004; Carvalho et al., 2006). É uma espécie adaptada a uma grande variedade de ambientes, com ocorrência em florestas

de terra firme, terras alagadas, margens de lagos, igarapés e no Cerrado brasileiro (Rigamonte-Azevedo et al., 2004). Suas folhas apresentam coloração avermelhada quando jovem e com o tempo adquirem coloração verde claro brilhante, chegando à coloração verde escura quando estão completamente desenvolvidas (Pedroni et al., 2002). Suas flores possuem odor adocicado, resistência mecânica, facilidade ao pouso, antese diurna e néctar disponível, sendo desta forma intensamente visitada por diversos insetos, principalmente dos grupos Apidae e Vespidae (Freitas e Oliveira, 2002). A dispersão das sementes de copaíba é feita basicamente por aves (zoocórica), podendo também ser feita pelas águas dos rios (hidrocórica), devido a sua ocorrência junto aos cursos de água (Pinto et al., 2004).

A importância das copaíbas deve-se à madeira de boa qualidade, indicada para construção civil, fabricação de móveis, e à produção de óleo-resina utilizado pelas indústrias farmacêuticas devido às propriedades antimicrobianas (Jeller e Perez, 1997; Gonçalves et al., 2005; Rigamonte-Azevedo, 2006). O óleo também apresenta propriedade repelente contra Diptera-Phoridae, causadores de prejuízos em culturas de *Melipona* (Freire et al., 2006). A exploração do óleo da copaíba por meio de manejo florestal é uma atividade importante para a conservação das formações florestais e para manutenção da tradição extrativista de populações locais, associado à fonte alternativa de renda para pequenos proprietários rurais (Rigamonte-Azevedo, 2006).



**Figura 1** – Exemplar adulto e croqui de *Copaifera langsdorffii*

### 1.3 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS DO GRUPO

Análises citogenéticas e citotaxonômicas em espécies leguminosas arbóreas da Região Sul do Brasil, bem como da subfamília Caesalpinioideae, são escassos (Biondo et al., 2005a), sendo que a maioria está restrita à contagens cromossômicas (Souza e Benko-Iseppon, 2004). Muitas espécies desta subfamília têm seus números cromossômicos incorretos ou até mesmo desconhecidos (Biondo et al., 2005b). Até o momento, apenas 2% das leguminosas brasileiras foram estudadas por meio de técnicas citogenéticas, daí a necessidade de mais estudos com esse amplo grupo vegetal. A maioria das espécies de Caesalpinioideae já analisadas exibem cromossomos pequenos, com cerca de 2  $\mu\text{m}$ , tornando difícil a caracterização dos cromossomos (Biondo et al., 2005a, Ohmido et al., 2007). Os núcleos interfásicos foram caracterizados como arreticulados ou semi-reticulados, com diferenças de tamanho, número, forma e distribuição dos cromocentros (Souza e Benko-Iseppon, 2004; Biondo et al., 2005a). O número cromossômico encontrado com grande frequência para essa subfamília é  $2n = 28$  ( $x = 14$ ), porém, também foram encontrados outros números, como:  $2n = 48, 32, 26, 24$  e  $22$  (Souza e Benko-Iseppon, 2004; Biondo et al., 2005b; Biondo et al., 2006).

### 1.4 CITOGENÉTICA MOLECULAR EM LEGUMINOSAS

Estudos que empregam o bandamento cromossômico em conjunto com FISH para localizar sequências de DNA repetitivo, como os genes de RNAr 18S-5.8S-26S ou 5S, sequências de DNA satélite ou retrotransposons, ou outras, são altamente úteis, não apenas para a caracterização de cariótipos, mas também para entender os mecanismos que envolvem a evolução cariotípica nas leguminosas (Martín et al., 2006). Além disso, a citogenética molecular pode servir como base para a integração de mapas físicos e genéticos, para uma análise mais apurada da estrutura cromossômica (Cerbah et al., 1999), incluindo mutações em genes individuais e para emprego direto em estudos evolutivos e agrônômicos.

As famílias de DNA repetitivo são formadas por sequências que consistem em motivos de nucleotídeos arranjados de 2 a mais de 10.000 pares de bases, repetidas de centenas até mais de milhares de vezes, os quais representam uma grande fração do genoma em todas as plantas (Heslop-Harrison et al., 1997). Essas repetições podem ser localizadas em

poucos sítios definidos nos cromossomos, em blocos, nas regiões: sub-teloméricas, intercalar, centromérica, ou de forma altamente dispersa na maioria ou em todos os cromossomos no genoma. Algumas delas possuem funções conhecidas e bem estabelecidas, como as sequências teloméricas e de DNAr (Schimidt e Heslop-Harrison, 1998), porém, outras não.

Os retrotransposons, também denominados de retroelementos, compreendem as sequências repetitivas de DNA que mais se acumulam nos genomas das plantas. Estes são elementos móveis de DNA que codificam proteínas para transcrição reversa e, onde o RNA deste próprio segmento é utilizado para produzir uma cópia nova de cDNA, o qual é re-integrado no genoma (Heslop-Harrison et al., 1997; Kubis et al., 1998; Kejnovsky et al., 2006). Esses elementos móveis de DNA estão presentes em todos os eucariontes, sendo considerados uma das principais fontes de mutação em uma grande variedade de organismos (Flavell et al., 1997), podendo representar grandes proporções dos genomas da maioria de plantas e animais (Schimidt e Heslop-Harrison, 1998). A abundância e a distribuição dos retrotransposons variam bastante entre as espécies de plantas e parecem estar relacionadas com as diferenças contrastantes nos tamanhos dos genomas (Liu e Wendel, 2000).

Há duas classes diferentes de retrotransposons, os retrotransposons com LTR (terminal longo de repetições), também chamados de retrotransposons virais, e os retrotransposons sem LTR (não virais), sendo que ambos foram identificados em plantas (Brandes et al., 1997). As famílias de elementos transponíveis relacionadas com retrovírus, como a *Ty1-copia* (*copia-like*) e a *Ty3-gypsy* (*gypsy-like*), são as mais importantes dos genomas eucarióticos (Flavell et al., 1992), devido sua frequência e diversificação.

O isolamento de segmentos repetitivos por técnicas moleculares e a localização por FISH dessas sequências são ferramentas úteis para estudar a organização genômica e cariotípica, a localização de genes, bem como seus agrupamentos e territórios funcionais no núcleo interfásico (Schimidt e Heslop-Harrison, 1998). *Primers* degenerados têm sido desenhados como estratégia para o isolamento de regiões gênicas relacionadas com a transcriptase reversa em plantas. Por meio de reações de PCR, é possível isolar segmentos específicos de retroelementos e acompanhar a distribuição e a evolução desses fragmentos gênicos em diferentes genomas.

Outro tipo de elemento repetitivo bastante comum nos genomas vegetais é o DNA satélite (DNAsat). Este é composto de sequências repetidas em *tandem* com motivos de tamanho de 100 a 1000pb e mais de  $10^5$  cópias por genoma haplóide (Bigot et al., 1990). Essas sequências podem estar localizadas nas diferentes regiões cromossômicas (terminais,

intercalares ou proximais), com blocos em alguns ou todos os cromossomos do cariótipo (De Felice et al., 2004), formando o principal componente da heterocromatina (Bigot et al., 1990). Essas sequências possuem uma rápida dinâmica evolutiva mediada por diferentes mecanismos moleculares (Navrátilová et al., 2005), como amplificação, deleção, dispersão e homogeneização. Famílias de DNA satélite podem ser isoladas a partir da digestão parcial do DNA total com enzimas de restrição, seguido de eletroforese, a fim de obter bandas no gel com padrão em escada. Essas bandas podem ser usadas como sondas após clonagem e marcação para experimentos de hibridação *in situ* (Urdampilleta et al., 2008).

Estudos prévios e não publicados mostraram que *C. langsdorffii* possui cromossomos relativamente grandes quando comparados com os de outras leguminosas nativas e que estes apresentam um elevado número de bandas heterocromáticas. Esta espécie, que ocorre desde a Amazônia até o Sul do Brasil, tem indicações ou suspeitas da existência de subgrupos taxonômicos relacionadas às suas diferentes localizações geográficas. Por estas razões, *C. langsdorffii* é considerada bastante interessante do ponto de vista citogenético, já que a comparação de populações isoladas pode mostrar a dinâmica e o comportamento dos DNAs repetitivos, quando analisados de acordo com modelos propostos para amplificação, deleção, dispersão e distribuição cariotípica de segmentos repetitivos. Assim sendo, as perguntas biológicas deste estudo foram:

1 - Populações isoladas de *C. langsdorffii* e selecionadas para ambientes contrastantes têm variação no acúmulo e distribuição de diferentes famílias de DNA repetitivo?

2 - Diferentes famílias de DNA repetitivo também diferem quanto aos mecanismos de acúmulo e dispersão? Ou seja, há localização cromossômica preferencial para diferentes famílias de DNA repetitivo?

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar por ferramentas citogenéticas e moleculares cinco populações de *Copaifera langsdorffii* coletadas em quatro estados brasileiros com formação de Cerrado e suas transições.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os números cromossômicos de cada população;
- Determinar a estrutura dos núcleos interfásicos e o padrão de condensação profásico;
- Determinar as fórmulas cariotípicas;
- Localizar as regiões de heterocromatina;
- Identificar e localizar as famílias de DNAr 45S por FISH;
- Isolar e caracterizar diferentes famílias de retroelementos e de DNA satélite para mapeamento físico dos cromossomos;
- Representar os cariótipos das cinco populações na forma de idiogramas;
- Identificar os mecanismos de diferenciação cariotípica atuantes em *C. langsdorffii*.

### 3 ARTIGO

3.1 DISTRIBUIÇÃO DE DNAs REPETITIVOS NOS CROMOSSOMOS DE *COPAIFERA LANGSDORFFII* DESF. (CAESALPINIOIDEAE): UMA IMPORTANTE ÁRVORE PRODUTORA DE ÓLEOS ESSENCIAIS.

(será submetido para: *Cytogenetic and Genome Research*: impacto 2,4)

**Título resumido:** Distribuição de DNA repetitivo em *Copaifera*

**Marcos Letaif Gaeta e André Luís Laforga Vanzela**

DISTRIBUIÇÃO DE DNAs REPETITIVOS NOS CROMOSSOMOS DE *COPAIFERA LANGSDORFFII* DESF.  
(CAESALPINIOIDEAE): UMA IMPORTANTE ÁRVORE PRODUTORA DE ÓLEOS ESSENCIAIS.

**Marcos Letaif Gaeta e André Luís Laforga Vanzela<sup>1</sup>**

### 3.2 RESUMO

*Copaifera langsdoffii* Desf. (Caesalpinioideae, Leguminosae) é uma árvore de grande porte, com ampla distribuição no Brasil. Esta espécie é encontrada em abundância desde a Amazônia até as formações de Cerrado e suas transições. Possui grande importância econômica devido à produção de óleo-resina, bem como em programas de restauração ambiental. Em relação às características citogenéticas, *Copaifera langsdoffii* possui cromossomos grandes, ao contrário da maioria das Caesalpinioideae que possuem cromossomos pequenos, sugerindo uma alta incidência de DNAs repetitivos no genoma. Para verificar o nível de diferenciação cariotípica em populações separadas geograficamente, foram utilizadas ferramentas cito-moleculares (coloração convencional, bandamento CMA/DAPI, isolamento e caracterização de DNAs repetitivos e hibridação *in situ* fluorescente) a partir de indivíduos de cinco populações dos Estados do Mato Grosso do Sul, Bahia, São Paulo e Paraná. Todas as populações mostraram  $2n = 24$ , com predominância de cromossomos meta e submetacêntricos. Não foram encontradas variações cariotípicas contrastantes quanto ao número, tamanho e forma dos cromossomos. O núcleo foi sempre semi-reticulado com pequenas diferenças no tamanho e na porção de cromatina condensada entre as populações. O bandamento cromossômico mostrou um elevado número de blocos terminais e intercalares ricos em GC (CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>), as quais apresentaram algumas diferenças na presença, ausência, tamanho e posição de bandas ricas em GC nos pares 3, 5, 8, 9 e 10, entre as cinco populações. A hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 45S mostrou quatro sinais terminais, coincidentes com blocos CMA<sup>+</sup> nos braços curtos dos pares 7 e 8 (São Jerônimo da Serra - PR, Assaí - PR e São José do Rio Preto - SP), e nos pares 3, 7 e 8, com indício de translocação envolvendo os pares 3 e 8 (Rio de Contas - BA e Três Lagoas - MS). Um segmento de DNA satélite foi isolado por corte de DNA genômico com a enzima de restrição *RsaI*, com o qual foi gerada um fragmento com cerca de 180 pb. Este foi isolado e utilizado como sonda na FISH, sendo localizado em blocos, principalmente nas regiões terminais e subterminais dos cromossomos, coincidindo com parte dos blocos ricos em GC. Isto sugere que parte das bandas CMA<sup>+</sup> encontradas em *C. langsdoffii* podem pertencer a mais de uma família de DNA satélite. Para verificar a importância dos retroelementos no genoma de *C. langsdoffii* em relação aos outros segmentos repetitivos, foram realizadas reações de PCR com *primers* degenerados para elementos das famílias *Ty1-copia* e *Ty3-gypsy*, com posterior sequenciamento e FISH. Para o *Ty1-copia*, foi encontrada uma banda com cerca de 180 pb. Esta banda foi isolada e sequenciada, gerando um segmento de 185 pb, com sequência similar à da transcriptase reversa de *Ipomoea batatas*, o qual apareceu de modo disperso e homogêneo em todos os cromossomos após a FISH, independente da população.

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

Para o *Ty3-gypsy*, foi encontrada uma banda de 410 pb no gel de agarose, que após um *Semi-Nested-PCR* e sequenciamento, revelou um segmento de 308 pb, similar às sequências da transcriptase reversa de *Cycas revoluta*. Na FISH, esta sonda apareceu também de modo disperso, com *dots* nas regiões terminais de alguns pares. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que as populações estudadas mantêm mais similaridades cariotípicas do que diferenças. Do ponto de vista do DNA repetitivo, os cariótipos das populações de *C. langsdorffii* acumulam algumas diferenças decorrente do isolamento geográfico, se considerarmos a dinâmica dos mecanismos de diferenciação cariotípica envolvendo os segmentos de DNA repetitivos.

**Palavras Chave:** *Copaifera*.. Cariótipos. DNAr. DNA satélite. Retroelementos.

### 3.2.1 Introdução

*Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinioideae), popularmente chamada de "copaíba", ocorre no Brasil desde a Amazônia até a região Sul. É uma grande árvore alógama, adaptada a uma variedade de formações florestais (Oliveira et al., 2002; Pinto et al., 2004), em regiões secas e alagadas, margens de rios e lagos, além das regiões de Cerrado do Brasil central (Paiva et al., 2004; Rigamonte-Azevedo et al., 2004; Carvalho et al., 2006). *C. langsdorffii* possui flores com odor adocicado e néctar acessível, resistência mecânica e facilidade ao pouso, o que a torna intensamente visitada por insetos. A dispersão de suas sementes ocorre por aves (Freitas e Oliveira, 2002) e pela água (Pinto et al., 2004). A copaíba é intensamente explorada devido à alta qualidade de sua madeira, porém, o óleo-resina é o principal produto de extração por indústrias farmacêuticas (Jeller e Perez, 1997; Rigamonte-Azevedo et al., 2006), devido às propriedades terapêuticas, atividade antimicrobiana (Gonçalves et al., 2005) e repelente contra insetos (Freire et al., 2006).

Estudos citogenéticos prévios mostraram que espécies de Caesalpinioideae possuem cromossomos pequenos com aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  (Biondo et al., 2005a) dificultando a identificação dos pares (Ohmido et al., 2007). As Caesalpinioideae apresentam núcleos arreticulados a semi-reticulados e padrão de condensação profásico proximal (Souza e Benko-Iseppon, 2004; Biondo et al., 2005a). O número  $2n = 2x = 28$  é o mais frequentemente na subfamília, mas os números  $2n = 22, 24, 26, 32$  e  $48$  já foram reportados (Souza e Benko-Iseppon, 2004; Biondo et al., 2005a; Biondo et al., 2006). Estudos de bandamento cromossômico e de citogenética molecular são escassos em leguminosas nativas brasileiras, podendo ser citados os estudos em *Sesbania* (Forni-Martins e Guerra, 1999) e *Crotalaria* (Flores et al., 2006). Contudo, esses estudos foram bastante empregados em leguminosas cultivadas, como em *Vicia sativum*, *Pisum sativum* (Navrátilová et al., 2005), *Arachis*

*hypogaea* (Seijo et al., 2004), *Lens culinaris* (Galasso, 2003) e *Phaseolus vulgaris* (Pedrosa-Harand, 2006). Nestes, estas ferramentas foram empregadas desde a simples localização de bandas e descrição da composição de bases (ricas em AT ou GC) até na integração de mapas físicos e genéticos, e utilizadas para na caracterização cariotípica e no entendimento dos mecanismos evolutivos nas leguminosas (Moscone et al., 1999; Mart•n et al., 2006; Ohmido et al., 2007).

Alguns autores consideram que *C. langsdorffii* forma um complexo de espécies, formas ou variedades, relacionadas principalmente a características de seus óleos essenciais e pequenas mudanças morfológicas, na casca das árvores e folhas (Leite, 2001; Veiga e Pinto, 2002). Por essa razão, é importante buscar novas informações, como as oferecidas pelas ferramentas citogenéticas, para uma melhor compreensão dos processos evolutivos e de diferenciação de *C. langsdorffii*. Nesse estudo, foram coletadas sementes de *C. langsdorffii* em cinco populações geograficamente isoladas de quatro estados brasileiros, incluindo o Bioma Cerrado e suas áreas de transição. Os objetivos foram determinar a estrutura cariotípica, bem como caracterizar e localizar segmentos repetitivos de DNA como: DNAr 45S, famílias de retroelementos e DNA satélite. Essas informações foram empregadas na construção de mapas físicos e utilizadas para comparar e entender as diferenças cariotípicas de *C. langsdorffii* obtidas de populações claramente isoladas e de ambientes contrastantes. Neste sentido, este estudo buscou entender se as variações cariotípicas relacionadas ao acúmulo e a distribuição de diferentes famílias de DNA repetitivo de *C. langsdorffii* respeitam os mesmos mecanismos atuantes para as famílias de DNA repetitivo descritas em outros grupos vegetais.

### 3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.3.1 Material Vegetal e Coloração Convencional

Sementes de *C. langsdorffii* foram coletadas em cinco localidades compreendendo quatro estados brasileiros, sendo: São Jerônimo da Serra - PR (23°42'52''S – 50°43'78''W), Assaí - PR (23°22'21''S – 50°50'27''W), São José do Rio Preto - SP (20°49'11''S – 49°22'42''W), Três Lagoas - MS (20°45'35''S – 51°41'42''W) e Rio de Contas - BA (13°35'01''S – 41°48'36''W). Estas foram germinadas e cultivadas em tubetes e vasos no Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). As exsiccatas foram depositadas no herbário da

Universidade Estadual de Londrina (FUEL). Para o estudo cariotípico, raízes de 10 indivíduos de cada população foram pré-tratadas em solução saturada de paradiclorobenzeno por 6 h a 14 °C e fixadas em etanol absoluto:ácido acético glacial (3:1, v:v) por 12 h e armazenadas a -20 °C até o uso. Pontas de raízes foram digeridas por 3 h em uma mistura de celulase 4% (m/v) e pectinase 40% (v/v), posteriormente hidrolisadas em HCl 1 M a 60 °C por 10 min. Estas foram dissecadas e esmagadas em uma gota de ácido acético 45%, e as lamínulas removidas após o congelamento em nitrogênio líquido. O material foi corado com Giemsa 2% e montadas de forma permanente em Entellan<sup>®</sup>. Cromossomos de cinco metáfases de cada população foram medidos com o programa MicroMeasure version 3.3 (Reeves e Tear, 2000) para determinar o tamanho e a posição dos centrômeros a fim de compor um idiograma básico com o auxílio do programa Corel Draw 12.

### 3.3.2 Bandamento Cromossômico

Lâminas foram obtidas com o uso de pontas de raízes pré-tratadas e fixadas como descrito acima, porém, sem hidrólise. Raízes foram digeridas por 15 h em uma mistura de celulase 4% (m/v) e pectinase 40% (v/v), seguido de dissecação e esmagamento em uma gota de ácido acético 45%. Após a remoção das lamínulas por congelamento em nitrogênio líquido, as lâminas foram envelhecidas por três dias e coradas com fluorocromos: cromomicina A<sub>3</sub> (CMA) 0,5 mg/mL por 1,5 h e 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 2 µg/mL por 30 min. As lâminas foram montadas com 25 µL de antifade, composto de glicerol (90%), 1,4-diaza-bicyclo(2,2,2)-octane (2,3%), Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 (2%), MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM (4%) e água destilada (1,7%). Estas foram envelhecidas por mais três dias e observadas em microscópio de epifluorescência Leica DM 4500 B. Dez metáfases de cada população foram medidas, com auxílio de um compasso de ponta seca e papel milimetrado em fotos ampliadas, para obter o tamanho e posicionamento relativo de cada banda, com a finalidade de enriquecer o idiograma.

### 3.3.3 Extração de DNA Genômico

Folhas jovens de cinco mudas de cada população foram coletadas e usadas para a extração de DNA genômico, conforme Brasileiro e Carneiro (1998), com pequenas modificações. As amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido, tratadas com tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8, PVP 1% e beta-

mercaptoethanol 0,2%) a 65 °C por 30 min e, em seguida, com Proteinase K a 0,01% a 65 °C por 30 min. As amostras foram purificadas com fenol-clorofórmio (1:1; v:v), centrifugadas, purificadas mais duas vezes com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v:v). Estas foram precipitadas com 2 volumes de etanol absoluto, secas a 37°C e eluídas em TE. A concentração do DNA foi estimada por comparação com diluição seriada de padrão de DNA de fago lambda (0,5 µg/µL - Invitrogen Life Technologies, USA) em gel de agarose a 0,8%.

### 3.3.4 Isolamento, Clonagem e Sequenciamento de Fragmentos de Retroelemento

Para o isolamento de retroelementos *Ty3-gypsy* foram usados os *primers* degenerados GyRT1 (5' MRNATGTGYGTNGAYTAYMG) e GyRT4 (5' RCAYTTNSWNARYTTNGCR), conforme Friesen et al. (2001). Após a reação de PCR foram obtidos vários fragmentos, das quais um com cerca de 410 pb foi isolado e purificado com *Kit Concert Rapid Gel Extraction System* (Gibco), e a mostra submetida a uma *Semi-Nested-PCR* com os *primers* GyRT3 (5' YKNWSNGGNTAYCAYCARAT) e GyRT4, para obter um segmento mais interno com cerca de 320 pb.

Para o isolamento de retroelementos da família *Ty1-copia*, foram usados *primers* degenerados TAFLHG (5' ARCATRTRCRTCACRTA) direto e YVDDML (5' TYGTAYAGYAGNTGYAT) reverso, conforme Flavell et al. (1992). O fragmento de cerca de 180 pb obtido foi isolado e purificado com *Kit Concert Rapid Gel Extraction System* (Gibco).

Ambos fragmentos gerados por PCR foram clonados em *E. coli* com o *Kit TOPO TA Cloning for Sequencing* (Invitrogen Life Technologies, USA) e vários clones foram sequenciados com o uso do *Kit DYEnamic ET dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Pharmacia Biotech) em MEGABACE 1000 nas direções direta e reversa, de acordo com instruções do fabricante. As sequências foram analisadas e transformadas em sequências *contig* com o programa PhredPhrapConsed. A sequência consenso foi comparada com outras do *GeneBank* usando o programa *BLAST(X)*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Altschul et al., 1997).

### 3.3.5 Isolamento, Clonagem e Sequenciamento de DNA satélite

Três microgramas de DNA genômico purificado foram cortados com a enzima de restrição *RsaI* (10 U/µL - Gibco), por 14 h a 37 °C. A reação foi composta com

Tampão REact 1× (10 µL), 3 µg de DNA genômico, 7 U de enzima de restrição (0,7 µL) e água ultra pura (quantidade suficiente para 100 µL). Após a digestão, a amostra foi precipitada com etanol absoluto (2:1, v:v) e acetato de sódio 3M (1:10, v:v) por 2 h a -20 °C e centrifugada a 12.000 rpm por 10 min, com secagem do *pellet* a 37 °C e ressuspensão do mesmo em 50 µL de água. A eletroforese da amostra foi feita a 3 V/cm em tampão TEB 0,5× (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM e EDTA 1,25 mM, pH 8,3), com posterior coloração em brometo de etídio. As bandas geradas no gel foram extraídas e purificadas com o *Kit Concert Rapid Gel Extraction System* (Gibco). Os segmentos foram clonados com o *Kit Blunt-Ended PCR Cloning* (GE Healthcare). Os clones foram submetidos a uma nova PCR com os *primers* M13F (5' AGCGGATAACAATTCACACAGG) e M13R (5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG) para a seleção de clones contendo insertos. Destes, o clone pCIRsa03 foi utilizado para hibridação *in situ*.

### 3.3.6 Hibridação In situ com Fluorescência

A FISH foi realizada de acordo com Vanzela et al. (2000). As lâminas foram feitas com pontas de raízes pré-tratadas e fixadas conforme descrito para o bandamento cromossômico. As sondas foram marcadas com biotina-14-dATP ou digoxigenina-11-dUTP por *nick translation* ou *random priming*. As sondas utilizadas foram: pTa71 contendo DNAr 45S de trigo (Gerlach e Bedbrook, 1979), pCI08 contendo a sequência de 308 pb do retroelemento *Ty3-gypsy*, pCI23 contendo a sequência de 185 pb do retroelemento *Ty1-copia* e pCIRsa03 contendo a sequência de DNA satélite de 180pb.

Nas hibridações foram usadas uma mistura composta por formamida 100% (15 µL), polietilenoglicol 50% (6 µL), 20× SSC (3 µL), 100 ng DNA de timo de bezerro (1 µL), SDS 10% (1 µL) e 100 ng de sonda marcada (4 µL) para cada lâmina, sendo que para a dupla hibridação bastou adicionar um volume de cada sonda. A mistura de hibridação foi desnaturada a 70 °C por 10 min e rapidamente colocada em gelo por 5 minutos. Após a adição da mistura sobre o material, ambos foram desnaturados a 95 °C por 10 min, 50 °C por 10 min e a hibridação foi realizada a 37 °C *overnight* em uma câmara úmida. Os banhos pós-hibridação foram feitos na seguinte ordem: 6× SSC por 10 min., 6× SSC por 10 min, e 4× SSC/0,2% Tween 20 por 5 min., todos em temperatura ambiente. As sondas foram simultaneamente detectadas com avidina conjugada com FITC e anti-digoxigenina conjugada com rodamina. As lavagens pós-deteção foram feitas com 2 banhos de 4× SSC em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com 25 µL de antifade, composto por

glicerol (90%), 1,4-diaza-bicyclo(2,2,2)-octane (2,3%), Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (2%),  $MgCl_2$  2,5 mM (4%) e água destilada (1,7%), mais 1  $\mu L$  de  $2 \mu g mL^{-1}$  4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), ou então, 1 de  $\mu L$  de  $2,5 \mu g mL^{-1}$  de iodeto de propídio. 3.3.7 *Obtenção de imagens*

Todas as imagens foram adquiridas separadamente em escala de cinza, com um microscópio de epifluorescência Leica DM 4500 B equipado com uma câmera DFC 300FX. As imagens foram sobrepostas com as cores: azul para DAPI, verde-amarelado para FITC e vermelho para rodamina, com o uso do programa Leica IM50 4.0. As imagens foram otimizadas para brilho e contraste com o programa iGrafx Image.

### 3.4 RESULTADOS

#### 3.4.1 Análise Convencional

A análise citogenética convencional mostrou que as cinco populações estudadas de *Copaifera langsdorffii* apresentaram o número diplóide  $2n = 2x = 24$  (Figura 2). Todas as amostras exibiram núcleos interfásicos do tipo semi-reticulado, sem diferenças contrastantes no tamanho, número, forma e distribuição dos cromocentros (Figura 2A). O padrão de condensação profásico variou entre homogêneo e heterogêneo (Figuras 2B e 2C), mesmo dentro das populações e amostras. Cromossomos meta e submetacêntricos foram predominantes nos cariótipos de *C. langsdorffii*, sendo os menores geralmente acrocêntricos (Figuras 2D, E, F e G). Estes variaram em tamanho de 5,97  $\mu m$  (população de São José do Rio Preto) a 2,60  $\mu m$  (população de Assaí). Nossos resultados mostraram também diferenciação nas fórmulas cariotípicas, sendo  $5m + 5sm + 2a$  para a população de São Jerônimo da Serra,  $6m + 3sm + 3a$  para a população de Assaí,  $5m + 4sm + 3a$  para a população de São José do Rio Preto,  $6m + 3sm + 3a$  para Três Lagoas e  $6m + 5sm + 1a$  para a população de Rio de Contas (Figura 8).

#### 3.4.2 Bandamento Cromossômico

O bandamento CMA/DAPI mostrou bandas ricas em GC em quase todos os pares cromossômicos nas cinco populações (Figura 3), exceto pelos pares 9 e 10 nas populações de São Jerônimo da Serra e Assaí (Figuras 3A, 3B e 8), par 9 da população de São José do Rio Preto (Figura 3C) e 10 nas populações de Rio de Contas e Três Lagoas (Figuras 3D e 3E). Bandas maiores e de brilho mais intenso foram detectadas principalmente nos

braços curtos, quando comparadas com aquelas dos braços longos, que foram mais finas e de brilho menor (Figuras 3 e 8). Bandas DAPI<sup>+</sup> não foram encontradas em *Copaifera langsdorffii* (Figura 3F).

A análise conjunta da coloração convencional e do bandamento cromossômico mostrou que os pares cromossômicos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11 e 12 apresentaram uma maior estabilidade quanto à forma e à localização da heterocromatina em todas as populações (Figura 8). Diferenças marcantes apareceram nos pares 5, 8, 9 e 10. No par 5, foi detectada uma banda no braço menor de quase todas as populações, exceto na de São José do Rio Preto. Além disso, outra banda próxima à região terminal do braço longo foi detectada nas populações de São José do Rio Preto e de Três Lagoas neste mesmo cromossomo, o que não foi observado nas demais (Figuras 3C, 3E e 8). O par 8 exibiu sempre duas bandas no braço longo, sendo uma intercalar e outra proximal, além de uma intercalar no braço curto. A população de Três Lagoas mostrou um heteromorfismo no braço curto do par 8, caracterizado por uma diferença no tamanho das bandas (Figuras 3E, 3G e 8). A população de Rio de Contas também mostrou um heteromorfismo no par 8, caracterizado pela ausência de uma banda no braço curto em um dos homólogos (Figuras 3D e 8). O par 9 das populações de São Jerônimo da Serra, Assaí e São José do Preto não mostrou bandas, enquanto que na população de Três Lagoas e de Rio de Contas foi encontrada uma banda distal no braço longo. Nesta última população, foi observada também outra banda no meio do braço curto do par 9 (Figuras 3D e 8). O par 10 não exibiu bandas, exceto pela população de São José de Rio Preto, a qual mostrou um bloco intercalar de brilho intenso no braço longo (Figuras 3C e 8).

### 3.4.3 Localização dos Segmentos de DNAr 45S

A hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 45S mostrou sempre 4 sinais nas cinco populações estudadas, sendo um menor no par 7 e outro maior no par 8. A Figura 3I representa as populações de São Jerônimo da Serra Assaí e São José do Rio Preto. Contudo, nas populações de Rio de Contas e de Três Lagoas, foi observado uma alteração estrutural relacionada ao par portador do DNAr 45S e ao heteromorfismo no par 8 detectado por bandamento CMA. Nestas populações, um dos homólogos do par 8 translocou de modo recíproco um pedaço de seu braço curto com o braço curto de um dos homólogos do par 3 (Figura 3G e 3H). Como não foram observadas diferenças marcantes no tamanho total dos cromossomos de cada par envolvido com a translocação, é possível que os segmentos

translocados sejam de tamanhos similares (Figura 8), mesmo considerando a ausência de banda no braço curto do homólogo do par 8 da população de Rio de Contas.

#### 3.4.4 Isolamento, Caracterização e Localização de DNA satélite

A digestão do DNA genômico de *C. langsdorffii* com a enzima *RsaI* gerou bandas, as quais foram observadas como “escada” ou *ladder* após a eletroforese em gel de agarose. A mais leve e mais intensa apresentou aproximadamente 180 pb, seguido de outras bandas mais pesadas e menos intensas, com valores em pares de bases múltiplos da primeira (Figura 4A). O segmento de 180 pb foi isolado, clonado e os clones selecionados para FISH após uma amplificação do inserto por PCR. O clone pCIRsa03 mostrou um padrão de hibridação *in situ* equivalente ao esperado para DNA satélite, com marcação nas regiões terminais de 12 a 14 cromossomos, nos pares 1, 2, 3, 4, 5, 8 e 11 (Figuras 7A-D). Os sinais de hibridação variaram em tamanho, pelo menos nas populações de Assaí, com seis sinais mais fortes e oito muito tênues (Figuras 7C e D), enquanto que na população de São Jerônimo da Serra foram observados quatro sinais mais fortes e 10 mais fracos (Figuras 7A e B).

#### 3.4.5 Isolamento, Caracterização e Localização de Retroelementos

As reações de PCR com *primers* degenerados permitiram o isolamento de retroelementos semelhantes aos das famílias *Ty1-copia* e *Ty3-gypsy*. O jogo de *primers* TAFLHG e YVDDML do retroelemento *Ty1-copia* gerou apenas uma banda de aproximadamente 180 pb (Figura 4B, canaleta 1), a qual foi isolada, clonada e os clones sequenciados. Dos 30 clones gerados, o pCI23 foi selecionado por exibir uma sequência similar ao segmento da transcriptase reversa de vários organismos (Figura 5), como de *Ipomea batatas* com 75% e 73% de identidade (acessos AAF32387.1 e AAF32379.1), *Solanum demissum* com 66% de identidade (acesso AAT38747.2) e *Vitis vinifera* com 71% e 69% de identidade (acesso CAN69688.1 e CAN74388.1). A FISH mostrou um padrão de hibridação com sinais dispersos em todos os cromossomos, sem regiões de brilho mais intenso (blocos) ou negativas, pelo menos para a população de Rio de Contas (Figura 7E).

Na amplificação de retroelementos da família *Ty3-gypsy*, foi obtida inicialmente uma banda de 410 pb com os *primers* GyRT1 e GyRT4. Esta banda foi purificada e serviu como base para uma reação de *Semi-Nested-PCR*, a qual gerou uma banda de cerca de 320 pb com os *primers* GyRT3 e GyRT4. Esta foi clonada e os clones

sequenciados. Dos 35 clones gerados, o pC108 foi selecionado por mostrar uma sequência de 308 pb similar ao da transcriptase reversa de *Vitis vinifera*, com 67%, 66% e 64% de identidade (acessos: CAN83300.1; CAN66228.1; CAN75278.1), *Zea mays*, com 63% de identidade (acesso: AAL75999.1) e *Arabidopsis thaliana* com 63% de identidade (acesso: AAF13073.1) (Figura 6). Também foi encontrada similaridade mais baixa com a sequência de transcriptase reversa de *Cycas revoluta*, com 54% de identidade (acesso: AAX62221.1). A FISH com o clone pC108 também mostrou um padrão disperso em todos os cromossomos, no entanto, foi possível observar alguns *dots* nas regiões terminais, pelo menos para a população de São José do Rio Preto (Figura 7F).

### 3.5 DISCUSSÃO

O número  $2n = 24$  encontrado nas cinco populações estudadas de *Copaifera langsdorffii* já foi relatado para outras espécies de leguminosas arbóreas da subfamília Caesalpinioideae, como *Caesalpinia pulcherrima* (Souza e Benko-Iseppon, 2004), *Senna multijuga* e *Schizolobium parahyba* (Biondo et al., 2005a) e *Pomaria stipularis* (Biondo et al., 2005b). As tribos Cassieae e Caesalpinieae possuem como provável número básico  $x = 12, 13$  e  $14$ , sendo que o *Chamaecrista* é uma exceção com  $x = 7$  e  $8$  (Biondo et al., 2005b). O número cromossômico mais frequente para a subfamília Caesalpinioideae é  $2n = 28$  ( $x = 14$ ), como em algumas espécies do gênero *Senna*, *Apuleia*, *Cassia* e *Chamaecrista*, sendo comuns números como  $2n = 22, 24, 26, 32$  e  $48$ , derivados por poliploidia e disploidia (Souza e Benko-Iseppon, 2004; Biondo et al., 2005b; Biondo et al., 2006). Nossos resultados sugerem que *Copaifera* pode ter como número básico  $x = 6$ , mais baixo que o proposto para o grupo ( $x = 7$ ), já que *Copaifera martii* Hayne exibiu  $n = 12$  (Coleman, 1982).

Os núcleos interfásicos semi-reticulados encontrados nas cinco populações de *C. langsdorffii*, bem como a forma e distribuição dos cromocentros e a condensação profásica, não são novidades para as leguminosas, já que estas características foram descritas em outras espécies de Caesalpinioideae (Souza e Benko-Iseppon, 2004). De acordo com a literatura, existe uma tendência de espécies com cromossomos de tamanho entre  $3,0$  e  $5,0$   $\mu\text{m}$  possuírem núcleos semi-reticulados e com condensação cromossômica homogênea (Guerra, 2000). Os tamanhos dos cromossomos observados em *C. langsdorffii* são semelhantes aos de outras Leguminosae, como *Vicia sativa* (Navrátilová et al., 2003) e algumas espécies de *Sesbania* (Forni-Martins et al., 1994). No entanto, a maioria das espécies de Caesalpinioideae exhibe cromossomos pequenos, com cerca de  $2$   $\mu\text{m}$  (Souza e Benko-Iseppon, 2004; Biondo et

al., 2005a; Biondo et al., 2006). Isto poderia indicar diferenças significativas na ocorrência de DNAs repetitivos entre os diferentes grupos de Leguminosae.

Com relação aos tipos de cromossomos observados em *C. langsdorffii*, os meta e submetacêntricos foram predominantes, sendo os menores cromossomos dos complementos geralmente acrocêntricos. A baixa frequência de acrocêntricos concorda com os resultados obtidos por Kumari e Bir (1989) em 24 espécies de Caesalpinioideae da Índia. Estes autores ainda reportaram cariótipos moderadamente simétricos com predominância de cromossomos meta e submetacêntricos de forma semelhante ao encontrado em *C. langsdorffii*.

O bandamento cromossômico feito em *C. langsdorffii* mostrou apenas blocos ricos em GC e ausência de blocos ricos em AT, similar ao encontrado em *Crotalaria juncea* (Mondin et al., 2007). No entanto, famílias de heterocromatina ricas em AT (DAPI<sup>+</sup>) já foram descritas para outras leguminosas da subfamília Papilionioideae (Souza e Benko-Iseppon, 2004). As bandas ricas em GC (CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>) variaram na ocorrência e posição dentro e entre os cromossomos de cada complemento, bem como entre as diferentes populações, porém não de modo acentuado, já que em todas as populações a heterocromatina representou cerca de 12% do tamanho relativo do lote haplóide. De acordo com Kakeda et al. (1991), as variações envolvendo a heterocromatina podem ser originadas por amplificação diferencial e/ou deleção de sequências de repetitivas, responsáveis por variações entre heterólogos, ou mesmo por *crossing-over* desigual, responsável por variações entre homólogos. As similaridades nos padrões de bandas encontradas nas diferentes populações parecem corresponder com a proximidade geográfica, apenas quando comparamos as populações de floresta de transição de São Jerônimo da Serra e de Assaí (Cerrado para floresta latifoliada e distantes 37 Km). Quando estas populações são comparadas com as de São José do Rio Preto, Três Lagoas (formação de Cerrado e distantes cerca de 200 Km) e Rio de Contas na Bahia (transição de Cerrado para campo de altitude e distante das demais por cerca de 2.000 Km), os cariótipos parecem acumular diferenças em poucas bandas e pares cromossômicos. Isto pode indicar que, apesar da ampla distribuição da espécie e isolamento das populações, há uma tendência geral para manter uma estabilidade relativa da organização e da distribuição da heterocromatina em *C. langsdorffii*.

O perfil de bandamento cromossômico em *C. langsdorffii* segue pelo menos dois princípios básicos comentados por Kenton (1991): (1) cromossomos de tamanhos similares tendem a desenvolver padrões de bandas também similares. Isto pode ser observado

nos braços curtos dos pares 1, 2, 3, 4 e 6, os quais exibem uma grande banda intercalar no braço curto. O mesmo pode ser observado nos braços longos dos pares 7, 8, 11 e 12; (2) em cariótipos com cromossomos meta e submetacêntricos, os braços menores devem conter bandas terminais maiores (como citado anteriormente), enquanto os braços longos tendem a possuir bandas intercalares em posição equidistante dos centrômeros, como nos pares 3, 7, 8, 11 e 12. Neste sentido, boa parte das bandas ricas em GC encontradas nos cariótipos de *C. langsdorffii* mostra um padrão de dispersão equidistante/equilocal (Schweizer e Loidl, 1987), como já observado para outros grupos de plantas (Fregonezi et al., 2006).

As cinco populações de *C. langsdorffii* apresentaram quatro cromossomos marcados pela sonda de DNAr 45S, sempre nas regiões terminais/subterminais do braço curto dos pares 7 e 8, exceto pelas populações de Três Lagoas e Rio de Contas. Nestas populações foi detectada uma translocação do sítio de DNAr 45S entre um dos homólogos do par 8 com um dos homólogos do par 3. Esta translocação foi confirmada após a coloração sequencial FISH/CMA. A aplicação da hibridação *in situ* com a sonda pTa71 (DNAr 45S) coincidiu com os sítios observados pela coloração com CMA nas populações estudadas aqui. Esta localização segue o padrão de distribuição comum à maioria das espécies vegetais, ocorrendo sempre nas regiões terminais/subterminais dos cromossomos (Lima de Faria, 1976). A localização terminal/subterminal dos sítios de DNAr 45S também foi vista em *Lathyrus* (Ali et al., 2000), *Pisum sativum* (Fuchs et al., 1998), *Sorghum Moench* (Sang e Liang, 2000) *Helianthus L.* (Vanzela et al., 2002), *Maxillaria Ruiz & Pav.* (Cabral et al., 2006).

Apesar da localização terminal do DNAr 45S ter sido comum a muitas espécies de plantas, o número de sítios foi variável. Dentro das leguminosas, espécies de *Phaseolus* and *Vigna* são exemplos onde tal variação foi bem documentada (Galasso et al., 1997; Moscone et al., 1999; Pedrosa et al., 2003). No gênero *Arachis* foram observadas variações no número e tamanho dos sítios de DNAr e na localização desses segmentos, tanto dentro quanto entre espécies. A maioria destes blocos foi localizada em regiões proximais de braços longos e alguns sítios estão em regiões terminais dos braços menores de alguns cromossomos (Seijo et al., 2004). Isto pode sugerir a ocorrência de pequenas alterações estruturais envolvendo estes segmentos no início da formação desse gênero frente aos demais da família, já que de 80 a 90% das espécies vegetais têm os sítios de DNAr 45S em posições terminais dos braços curtos (Lima de Faria, 1976). Apesar da alteração estrutural envolvendo os pares 3 e 8 de *C. langsdorffii* aparentemente estar fixada em populações isoladas, parece que ainda houve aumento ou perda de sítios de DNAr 45S e que esta pode ser o passo inicial para futuras variações neste sentido. De acordo com Franz et al. (2000), um dos motivos que

pode levar à mobilidade dos segmentos de DNAr é a associação desses segmentos com elementos transponíveis, como sugerido para *Arabidopsis*.

A digestão do DNA genômico de *C. langsdorffii* com *RsaI* gerou bandas em escada após a eletroforese, sendo um indicativo de que as sequências em questão são repetitivas e possivelmente em *tandem* (Bigot et al., 1990; Shibata et al., 2000). A FISH com a sonda pClRsa03 mostrou sinais de hibridação coincidentes com algumas das bandas terminais ricas em GC, sendo que o número de sítios de hibridação foi bem menor que o número de bandas CMA<sup>+</sup>. Esta evidência foi reforçada pela presença de bandas heterocromáticas reveladas pela contra-coloração com o iodeto de propídio na FISH. Isto indica que, possivelmente, existam outras famílias de DNA satélite no genoma de *C. langsdorffii*, também ricas em GC. A localização terminal de sequências satélites foi relatada na leguminosa *Vicia pannonica* (Neumann et al., 2006) e em outros grupos de plantas, como por exemplo, *Secale* (Cuadrado e Jouve, 2002; Schwarzacher, 2003). Neste grupo foram hibridadas quatro sequências diferentes de DNAsat, as quais foram localizadas preferencialmente em regiões terminais (pSc34, pSc119.2) e subterminais (pSc74, pSc220). Em sete espécies de *Lens*, foram isoladas e hibridadas duas sequências de DNAsat, sendo que cada uma delas hibridou em um sítio independente da outra sonda (Galasso, 2003). O elemento satélite VicTR, isolado em *Vicia*, gerou sinais em locais correspondentes às regiões DAPI<sup>+</sup> das espécies *V. sativa* e *V. pannonica*. (Navrátilová et al., 2003).

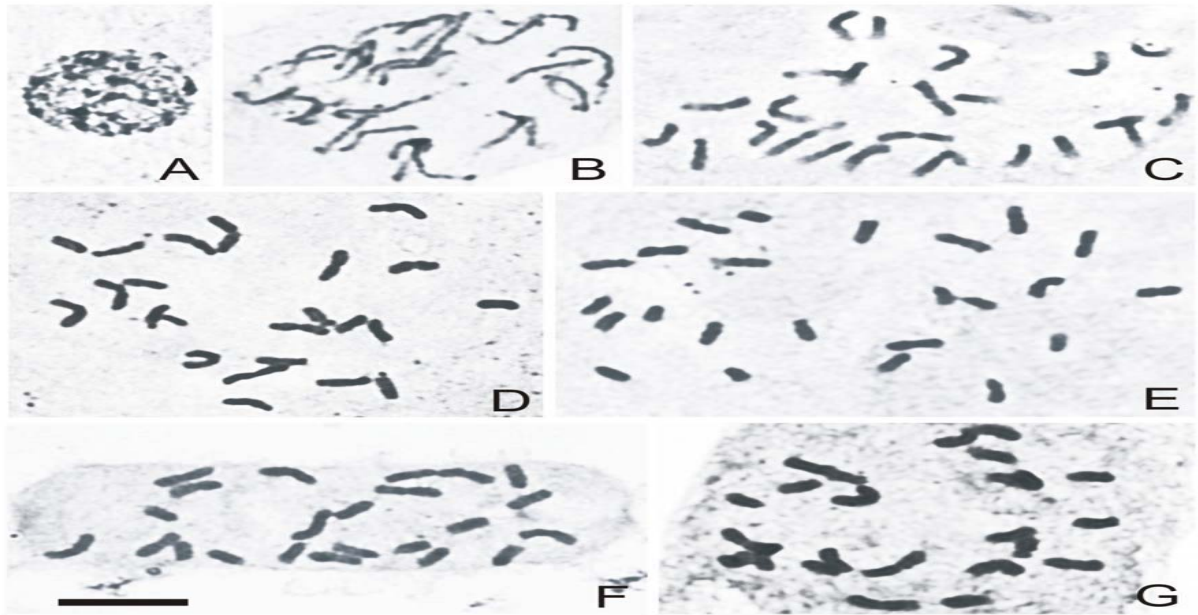
As análises de isolamento, caracterização e localização de retroelementos para *C. langsdorffii* mostraram similaridades com retrotransposons de espécies pertencentes a grupos filogeneticamente distantes. Os clones pCl23, que exibiu uma similaridade de 75% com um fragmento da transcriptase reversa do elemento *Ty1-copia* de *Ipomoea batatas*, e pCl08, que exibiu uma similaridade de 67% com um fragmento da transcriptase reversa do elemento *Ty3-gypsy* de *Vitis vinifera*, indicam que para ambos os casos os segmentos da transcriptase reversa possuem um estado relativamente alto de conservação, o qual provavelmente se mantém desde os ancestrais desses grupos.

A hibridação *in situ* com as sondas pCl08 (*Ty1-copia*) e pCl23 (*Ty3-gypsy*) gerou sinais dispersos ao longo dos cromossomos de *C. langsdorffii*. Resultados similares foram obtidos em *Beta vulgaris*, *Selaginella apoda* (Brandes et al., 1997), *Picea abies* e em *Pinus pinaster* (Friezen et al., 2001). Contudo, a sonda pCl23, diferentemente da pCl08, também gerou sinais terminais na forma de *dots*. Este padrão de localização está em conformidade com o modo de amplificação desses elementos (Heslop-Harrison, 2000), onde

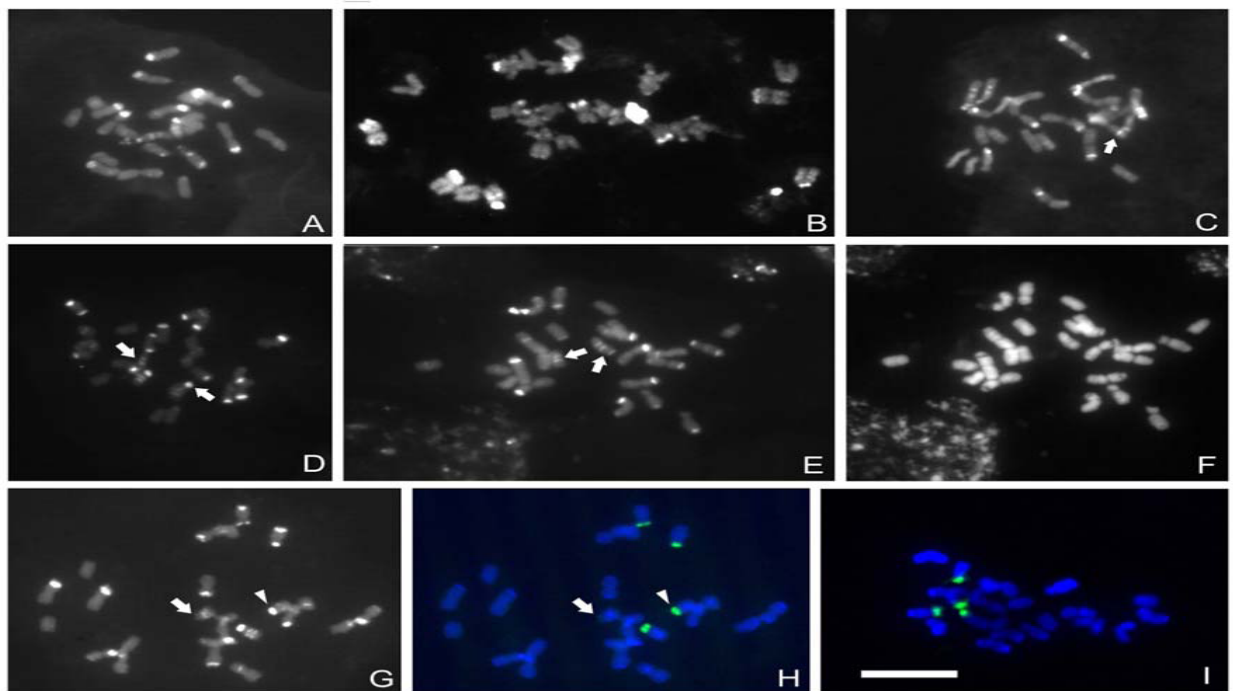
uma cópia do próprio elemento é produzida e reintegrada em *cis* (formando blocos) ou em *trans* (promovendo sua dispersão). Blocos de retroelementos também foram encontrados em *Vigna* (Galasso et al., 1997). Contudo, não há um padrão típico de localização para o elemento *Ty3-gypsy*, já que Neumann et al. (2006), encontraram um padrão disperso de hibridação com retroelementos semelhantes a *Ty3-gypsy* que se estenderam por todos os cromossomos de *Vicia pannonica*, com exceção da região subtelomérica dos braços curtos, no qual apresentavam-se com sinais mais fracos. Outro exemplo é o *Cestrum* L. (Solanaceae) onde foi relatada a presença de sinais de hibridações *in situ* com sondas de retroelementos *Ty3-gypsy*, em regiões terminais, coincidentes com sítios de DNAr 45S (Fregonezi et al., 2007).

Por fim, *C. langsdorffii* é uma espécie de ampla distribuição geográfica no Brasil e que apresenta cariótipos conservados quando vistos por coloração convencional. Seu genoma é rico em blocos GC, os quais ocupam preferencialmente as regiões terminais dos braços curtos e intersticiais dos braços longos. As populações variam de acordo com o perfil de bandas, no que diz respeito à presença ou ausência de uma ou poucas bandas. Tais variações não foram suficientes para afetar significativamente a morfologia das amostras estudadas, a ponto de sugerir a ocorrência de subtipos ou variedades de *C. langsdorffii*. Quanto ao DNA satélite, nossos dados sugerem que a heterocromatina rica em GC é composta por duas ou mais famílias distintas de DNAsat, já que a sonda pCIRsa03 reconheceu segmentos complementares em apenas parte dos cromossomos bandeados pelo fluorocromo CMA. Estes segmentos, juntamente com os retroelementos de caráter disperso, sugerem que as populações aqui estudadas de *C. langsdorffii*, apesar de claramente isoladas e em ambientes contrastantes, mantêm os cariótipos relativamente conservados, mesmo considerando o caráter dinâmico dos DNAs repetitivos. Por fim, as famílias repetitivas de DNA abordadas neste estudo parecem seguir os modelos tradicionais de acúmulo, perda de segmentos e dispersão, como na maioria das plantas. Vale a pena destacar que o rearranjo do tipo translocação foi claramente reconhecido, porém, crossing-over desigual e dispersão equilocal, também puderam ser atuantes no processo de diferenciação dos cariótipos nestas cinco distintas populações, mesmo que de modo pouco acentuado.

**Agradecimentos:** Capes, ProPPG-UEL, CNPq, Fundação Araucária.

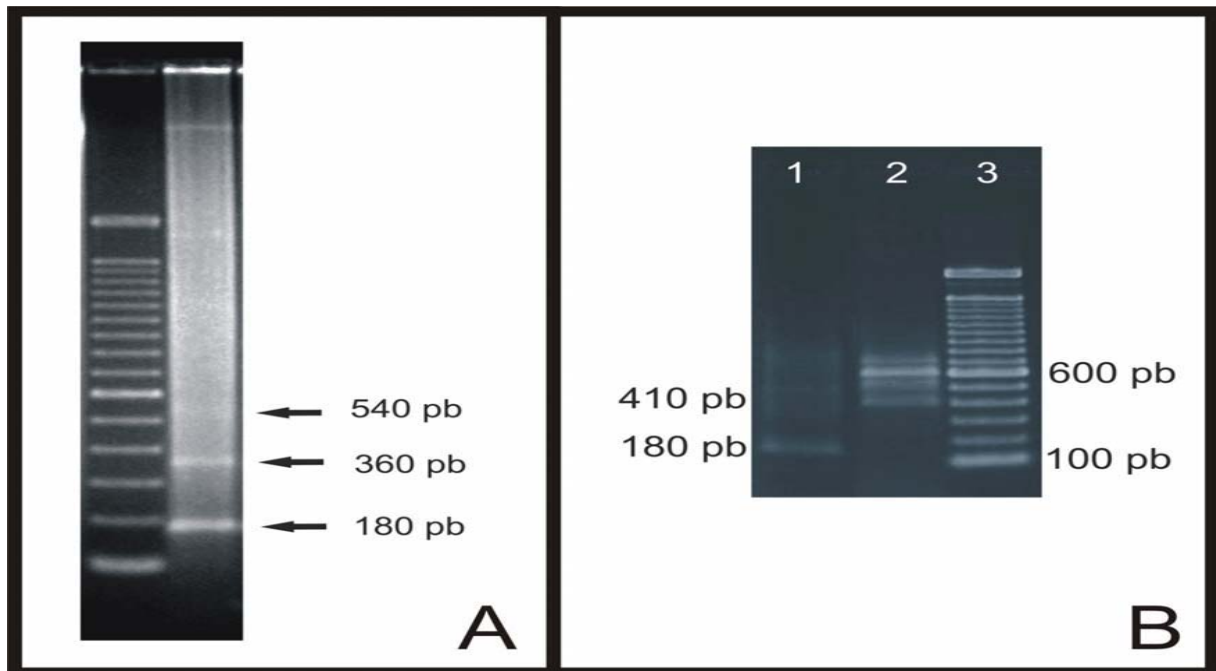


**Figura 2** – Coloração convencional com Giemsa nas diferentes populações de *Copaiфера langsdorffii*. **A**- núcleo interfásico semi-reticulado (Três Lagoas). **B**- pró-metáfase com condensação heterogênea (São Jerônimo da Serra). **C**- pró-metáfase com condensação de proximal a homogênea (São José do Rio Preto). **D-G**- Metáfases com  $2n = 24$  referentes às populações de Assaí (D), São Jerônimo da Serra (E), Três Lagoas (F) e Rio de Contas (G). Barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .



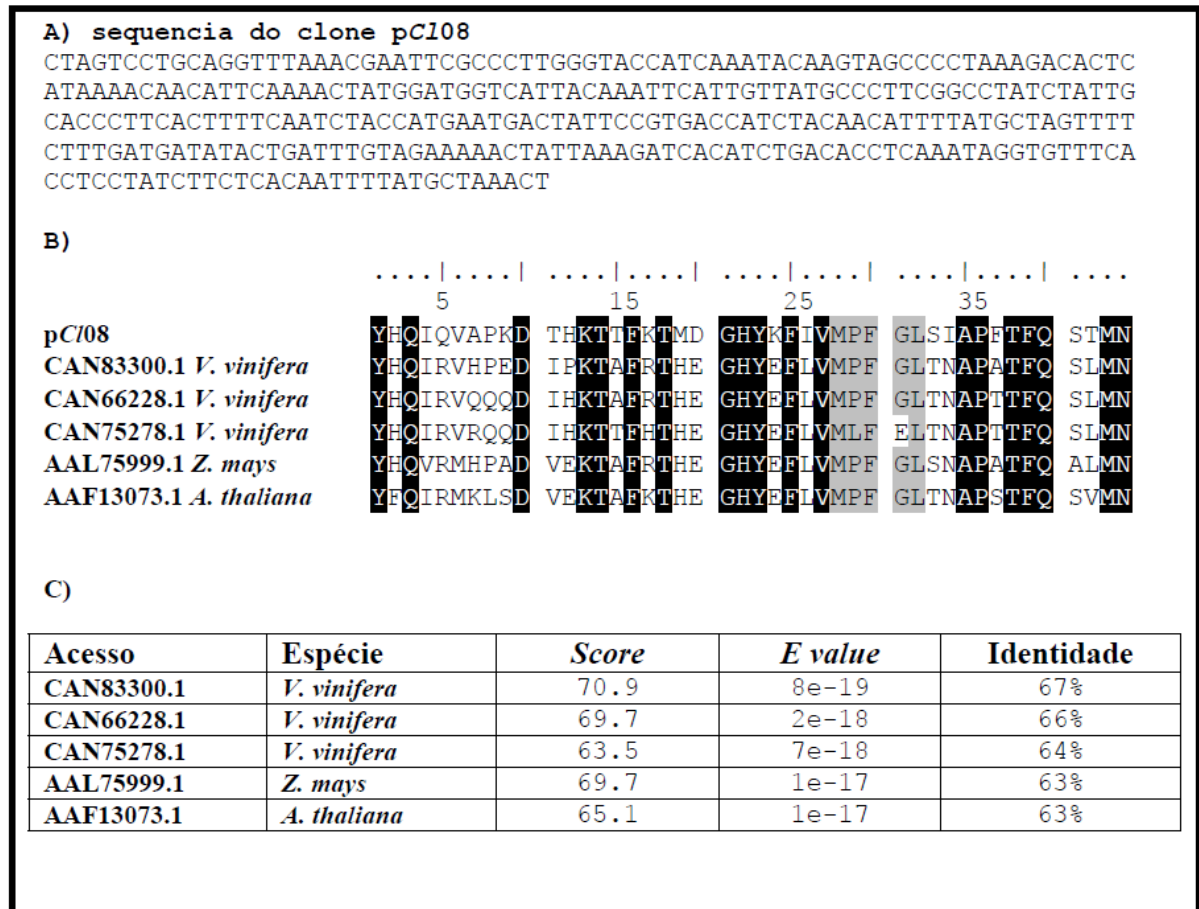
**Figura 3** – Bandamento CMA/DAPI e FISH com sonda de DNaR 45S em diferentes populações de *Copaiфера langsdorffii*. **A-E e G**- Metáfases bandeadas com CMA nas populações de São Jerônimo da Serra (A), Assaí (B), São José do Rio Preto (C) com seta apontado uma banda intercalar no braço longo em um homólogo do par 10, Rio de Contas (D) e Três Lagoas (E e G) com setas apontando os cromossomos envolvidos com a translocação da

região terminal (seta aponta o homólogo do par 8 e a cabeça de seta aponta o homólogo do par 3). A Figura F mostra a ausência de bandas ricas em AT (DAPI) na população de Três Lagoas. **H-** Metáfase da população de Três Lagoas hibridada com a sonda de DNAr 45S (sequencial com a Figura G). Observe a seta apontando para um homólogo do par 8, o qual teve parte do seu braço curto translocado para um dos cromossomos do par 3 (cabeça de seta). (I) FISH com sonda de DNAr na população de São José do Rio Preto mostrando 4 sinais de hibridação. Barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

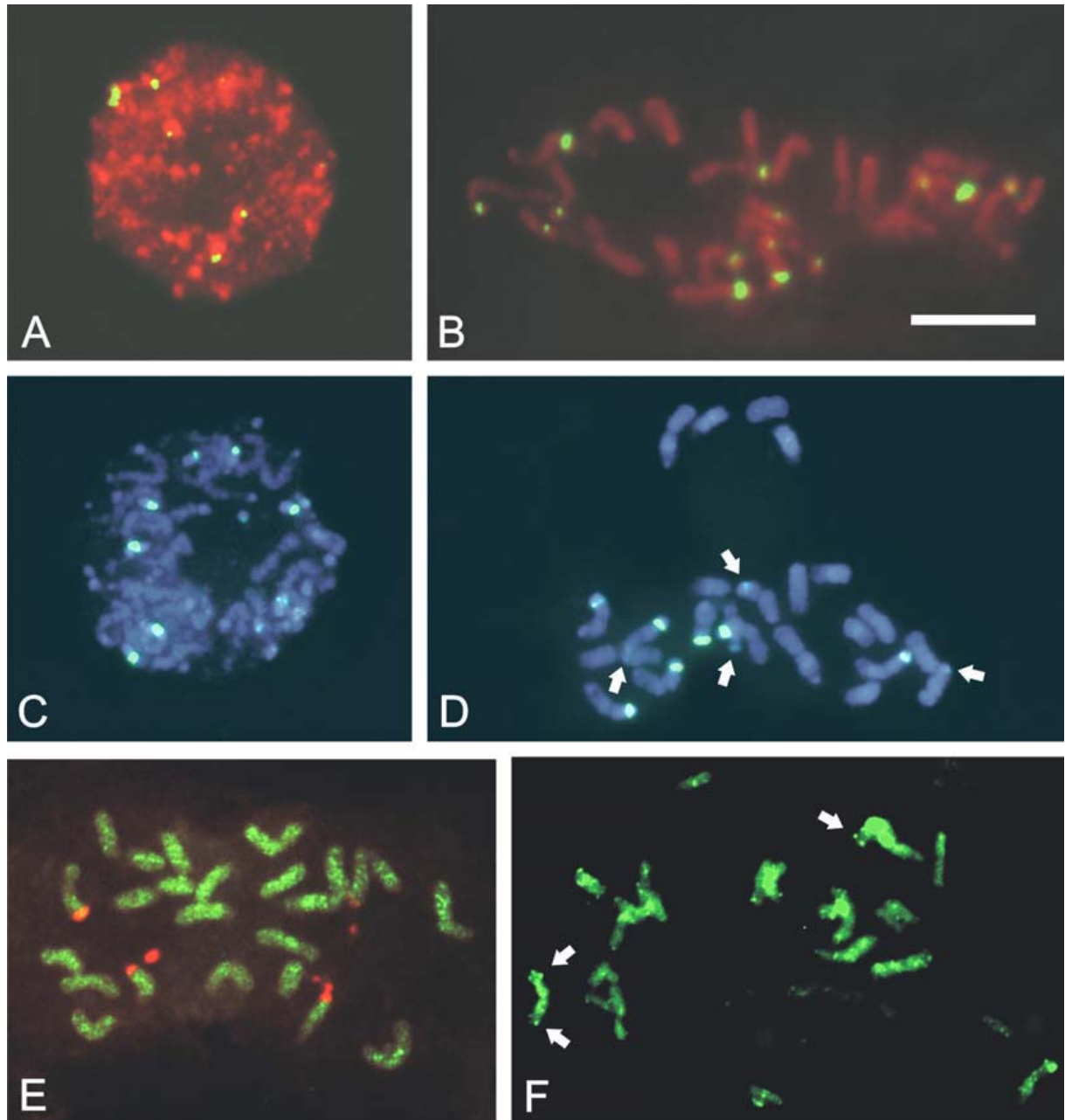


**Figura 4 A -** Resultado da digestão do DNA genômico de *Copaifera langsdorffii* com a enzima de restrição *RsaI*. Na canaleta encontra-se o marcador de peso com 100 pb e na canaleta 2 o produto da digestão. Note as bandas em escada. **B-** Resultados das reações de PCR com os *primers* degenerados para o elemento *Ty1-copia* (canaleta 1) e com os *primers* para o elemento *Ty3-gypsy* (canaleta 2). A canaleta 3 mostra o marcador de peso molecular de 100 pb.

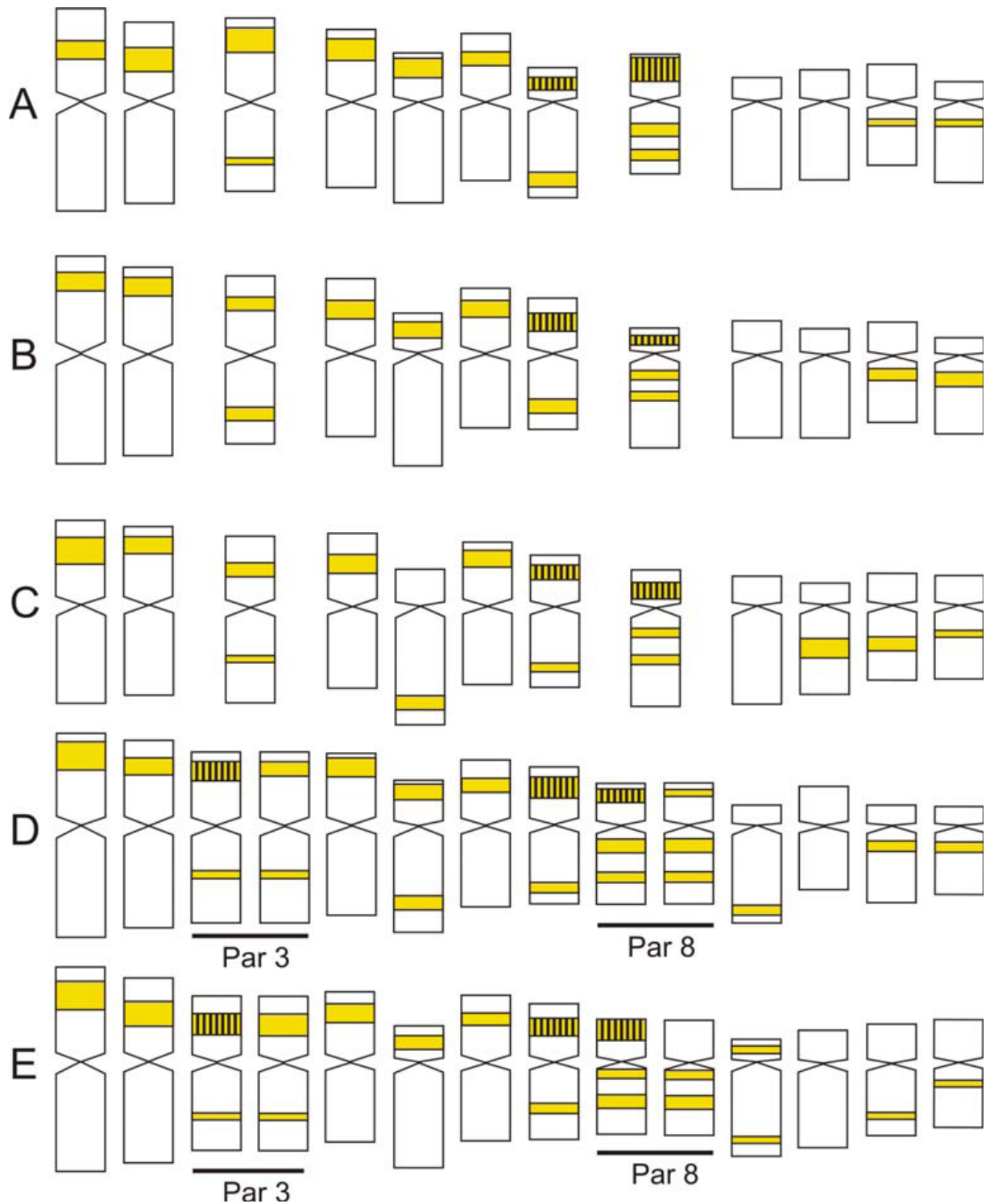




**Figura 6** A) Sequência de nucleotídeos de *Copaifera langsdorffii* obtida a partir da PCR com os primers degenerados GyRT3 e GyRT4. B) Alinhamento da sequência de aminoácidos de *Vitis vinifera*, *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana* com sequências similares putativas a retroelementos. A região destacada (cinza) correspondente aos aminoácidos 28 a 32 representa uma região terminal conservada característica de transcriptase reversa de retroelementos do tipo *Ty3-gypsy*. As regiões destacadas em preto correspondem a aminoácidos conservados. Dos 44 aminoácidos obtidos foi possível verificar que 22 (50%) aminoácidos são idênticos (conservados) a todas as espécies analisadas. As sequências utilizadas no alinhamento, assim como a sequência de aminoácidos do clone pC108 foram obtidas a partir do frame +3, segundo análise no banco de dados do ncbi com a ferramenta *BLAST(X)*. C) A tabela representa os dados referentes a cada sequência utilizada na análise e que apresentou melhor similaridade com a sequência pC108.



**Figura 7** – Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda pCIRsa03 marcada com biotina-FITC em *Copaiifera langsdorffii*. **A e B**- Núcleo interfásico e pró-metáfase da população de São Jerônimo da Serra. Observe a ocorrência de quatro sinais fortes e 10 fracos sempre na posição terminal e subterminal dos cromossomos. **C e D**- Prófase e metáfase da população de Assaí. Observe a ocorrência de seis sinais fortes. As setas indicam sinais de hibridação mais tênues. **E**- dupla hibridação com a sonda pC123 (*Ty1-copia*) marcada com biotina-FITC (verde) e com a sonda pTa71 (DNAr 45S) marcada com digoxigenina-rodamina (vermelho). A FISH mostra um perfil disperso de hibridação para o retroelemento e localizado para o DNAr. **F**- FISH com a sonda pC108 (*Ty3-gypsy*) marcada com biotina-FITC (verde) na população de São José do Rio Preto. As setas apontam os blocos terminais em meio ao padrão disperso deste retroelemento. Barra corresponde a 10  $\mu$ m.



**Figura 8** – Idiogramas e mapeamento físico dos cromossomos das diferentes populações de *Copaifera langsdorffii*. Blocos CMA<sup>+</sup> estão representados em amarelo. FISH com a sonda de DNAr 45S está representada por hachuras. (A) São Jerônimo da Serra. (B) Assaí. (C) São José do Rio Preto. (D) Três Lagoas. (E) Rio de Contas.

## REFERÊNCIAS

- Ali HBM, Meiter A, Schubert: DNA content, rDNA loci, and DAPI bands reflect the phylogenetic distance between *Lathyrus* species. *Genome* 43:1027-1032 (2000).
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402 (1997).
- Bigot Y, Hamelin MH, Periquet J: Heterochromatin condensation and evolution of unique Satellite-DNA families in two parasitic wasp species: *Diadromus pulchellus* and *Eupelmus vuilleti* (Hymenoptera). *Molecular Biology and Evolution* 7:351-364 (1990).
- Biondo E, Miotto STS, Schifino-Wittmann MT: Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae - Leguminosae do sul do Brasil. *Ciência Florestal* 15:241-248 (2005a).
- Biondo E, Miotto STS, Schifino-Wittmann MT: Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 28:797-808 (2005b).
- Biondo E, Miotto STS, Schifino-Wittmann MT: Cytogenetics of species of *Chamaecrista* (Leguminosae – Caesalpinioideae) native to southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 150:429-439 (2006).
- Brandes A, Heslop-Harrison JS, Kamm A, Kubis S, Doudrick RL, Schmidt T: Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of *Ty1-copia-like* retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. *Plant Molecular Biology* 33:11-21 (1997).
- Brasileiro ACM, Carneiro VTC: Manual de transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 309p, (1998).
- Cabral JS, Felix PL, Guerra M: Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology* 29: 659-664 (2006).
- Carvalho D, Ferreira RA, Oliveira LM, Oliveira AF, Gemaque RCR: Eletroforese de proteínas e isoenzimas em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae Caesalpinioideae) envelhecidas artificialmente. *Revista Árvore* 30:19-24 (2006).
- Cerbah M, Kevei Z, Siljak-Yakovlev S, Kondorosi E, Kondorosi A, Trinh TH: FISH Chromosome Mapping Allowing Karyotype Analysis in *Medicago truncatula* Lines Jemalong J5 and R-108-1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:947-950 (1999).

- Coleman JR: Chromosome numbers of angiosperms collected in the state São Paulo. *Revista Brasileira de Genética*. 5:533-550 (1982).
- Cuadrado A, Jouve N: Evolutionary Trends of Different Repetitive DNA Sequences During Speciation in the Genus *Secale*. *The Journal of Heredity* 93:339-345 (2002).
- De-Felice B, Wilson RR, Ciamiello L, Conicella C: A novel repetitive DNA sequence in lemon [*Citrus lemon* (L.) Burm.] and related species. *Journal of Applied Genetics* 35:315-320 (2004).
- Flavell AJ, Dunbar E, Anderson R, Peace, SR, Hartley R, Kumar A: *Ty1-copia* group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic Acids Research* 20:3639-3644 (1992).
- Flavell AJ, Pearce SR, Heslop-Harrison JS, Kumar A: The evolution of *Ty1-copia* group retrotransposons in eukaryote genomes. *Genetica* 100:185-195 (1997).
- Flores AS, Corrêa AM, Forni-Martins ER, Tozzi AMGA: Chromosome numbers in Brazilian species of *Crotalaria* (Leguminosae, Papilionoideae) and their taxonomic significance. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151:271-277 (2006).
- Forni-Martins ER, Franchi-Tanibata M, Cardelli-de-Lucena MA: Karyotypes of species of *Sesbania* Scop. (Fabaceae). *Cytologia* 59:479-482 (1994).
- Forni-Martins ER, Guerra M: Longitudinal differentiation in chromosomes of species of *Sesbania* Scop. *Caryologia (Firenze)* 52:97-103 (1999).
- Franz PF, Armstrong S, de Jong H, Parnell LD, Drunen CV, Dean C, Zabel P, Bisseling T, Jones G: Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. *Cell* 100:367-376 (2000).
- Fregonezi JN, Fernandes T, Torezan JMD, Vieira AOS, Vanzela ALL: Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. *Genetics and Molecular Biology* 29:97-104 (2006).
- Fregonezi JN, Vilas-Boas LA, Fungaro MEP, Gaeta ML, Vanzela ALL. Distribution of a *Ty3/gypsy*-like retroelement on the A and B-chromosomes of *Cestrum strigilatum* Ruiz & Pav. and *Cestrum intermedium* Sendtn. *Genetics and Molecular Biology* 30:599-604 (2007).
- Freire DCB, Brito-Filha CRC, Carvalho-Zilse GA: Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa* sp.) e Copaíba (*Copaifera* sp.) sobre forídeo, pragas de colméias, (Diptera: Phoridae) na Amazônia Central. *Acta Amazonica* 36:365-368 (2006).

- Freitas CV, Oliveira PE: Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* 25:311-321 (2002).
- Friesen N, Brandes A, Heslop-Harrison JS: Diversity, Origin, and Distribution of Retrotransposons (*gypsy* and *copia*) in Conifers. *Molecular Biology and Evolution* 18:1176-1188 (2001).
- Fuchs J, Kühne M, Schubert I: Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent in situ hybridization. *Chromosoma* 107:272-276 (1998).
- Galasso I, Harrison GE, Pignone D, Brandes A, Heslop-Harrison JS: The Distribution and Organization of *Ty1-copia*-like Retrotransposable Elements in the Genome of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Cowpea) and its Relatives. *Annals of Botany* 80:327-333 (1997).
- Galasso I: Distribution of highly repeated DNA sequences in species of the genus *Lens* Miller. *Genome* 46:1118-1124 (2003).
- Gerlach WL, Bedbrook JR: Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* 7:1869-1885 (1979).
- Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H: Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arquivos do Instituto de Biologia, São Paulo* 72:353-358 (2005).
- Guerra M: Patterns of heterochromatin distribution in plants chromosomes. *Genetics and Molecular Biology* 23:1029-1041 (2000).
- Heslop-Harrison JS, Brandes A, Taketa S, Schmidt T, Vershinin AV, Alkhimova EG, Kamm A, Doudrick RL, Schwarzacher T, Katsiotis A, Kubis S, Kumar A, Pearce SR, Flavell AJ, Harrison GE: The chromosomal distributions of *Ty1-copia* group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. *Genetica* 100:197-204 (1997).
- Heslop-Harrison JS Comparative Genome Organization in Plants: From Sequence and Markers to Chromatin and Chromosomes. *Plant Cell*. 12:617-635 (2000).
- Jeller H, Perez SCJGA: Efeito da salinidade e sementeira em diferentes profundidades na viabilidade e no vigor de *Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesapiniaceae. *Revista Brasileira de Sementes* 19:218-224 (1997).
- Kakeda K, Fukui K, Yamagata H: Heterochromatic differentiation in barley chromosomes revealed by C-banding techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 81:144-150 (1991).

- Kejnovsky E, Kubat Z, Macas J, Hobza R, Mracek J, Vyskot B: *Retand*: a novel family of gypsy-like retrotransposons harboring an amplified tandem repeat. *Molecular Genetic Genomics* 276:254-263 (2006).
- Kenton A: Heterochromatin accumulation, disposition and diversity in *Gibasis karwinskyana* (Commelinaceae). *Chromosoma* 100:467-478 (1991).
- Kubis SE, Heslop-Harrison JS, Desel C, Schmidt T: The genomic organization of non-LTR retrotransposons (LINEs) from three Beta species and five other angiosperms. *Plant Molecular Biology* 36:821-831 (1998).
- Kumari S, Bir SS: Karyomorphological evolution in Caesalpiniaceae. *Journal of Cytology e Genetics* 24:149-163 (1989).
- Leite A: *Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba*, Rio: UFAC/SEFE, 38p.il. Série: Manejo Sustentável de Florestas Tropicais (2001).
- Lima de Faria A: The chromosome field I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. *Hereditas* 83:1-22 (1976).
- Liu B, Wendel JF: Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants. *Genome* 43:874-880 (2000).
- Martın E, Dınc M, Duran A, Öztürk M: Karyological Studies on *Lotus strictus* Fisher and C.A. Mey. (Leguminosae), *Centaurea amanicola* Hub.-mor. (Compositae) and *Teucrium lamiifolium* D'urv. Subsp. *Lamiifolium* (Labiatae). *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 1:12-17 (2006).
- Mondin M, Santos-Serejo A, Aguiar-Perecin MLR: Karyotype characterization of *Crotalia juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA genes sites. *Genetics and Molecular Biology* 30:65-72 (2007).
- Moscone EA, Klein F, Lambrou M, Fuchs J, Schweizer D: Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* 42:1224-1233 (1999).
- Navrátilová A, Neumann P, Macas J: Karyotype analysis of four *Vicia* species using *in situ* hybridization with repetitive sequences. *Annals of Botany* 91:812-926 (2003).
- Navrátilová A, Neumann P, Macas J: Long-range organization of plant satellite repeats investigated using strand-specific FISH. *Cytogenetics and Genome Research*, 109:58-62 (2005).
- Neumann P, Koblížková A, Navrátilová A, Macas J: Significant expansion of *Vicia pannonica* genome size mediated by amplification of a single type of giant retroelement. *Genetics* 173:1047-1056 (2006).

- Ohmido N, Sato S, Tabata S, Fukui K: Chromosome maps of legumes. *Chromosome Research* 15:97-103 (2007).
- Oliveira AF, Carvalho D, Rosado SCS: Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. *Revista Brasileira de Botânica* 25:331-338 (2002).
- Paiva LAF, Gurgel LA, De Sousa ET, Silveira ER, Silva RM, Santos FA, Rao VSN: Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 93:51-56 (2004).
- Pedroni F, Snchez M, Santos, FAM: Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 25:183-194 (2002).
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A: Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661-1672 (2002).
- Pedrosa A, Vallejos CE, Bachmair A, Schweizer D: Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 205-212 (2003).
- Pedrosa-Harand A, Almeida CCS, Mosielek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M: Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics* 112:924-933 (2006).
- Pinto SIC, Souza AM, Carvalho D: Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. *Scientia Forestalis* 65:40-48 (2004).
- Reeves A, Tear J: MicroMeasure para Windows, versão 3.3, Programa livre distribuído pelos autores no site: <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>. (2000).
- Rigamonte-Azevedo OC, Wadt PGS, Wadt LHO: Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina. EMBRAPA-AC, Documentos 91 (2004).
- Rigamonte-Azevedo OC, Wadt PGS, Wadt LHO: Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. *Revista Árvore* 30:583-591 (2006).
- Sang Y, Liang GH: Comparative physical mapping of the 18S-5,8S-26S rDNA in three sorghum species. *Genome* 43:918-922. (2000).

- Schmidt T, Heslop-Harrison JS: Genomes, genes and junk: the large-scale organization on plant chromosomes. *Trends in Plant Science* 3:1360-1385 (1998).
- Schweizer D, Loidl J: A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosomes Today* 9:61-74 (1987).
- Schwarzacher T: DNA, chromosomes, and in situ hybridization. *Genome* 46:953-962 (2003).
- Seijo JG, Lavia GI, Fernández A, Krapovickas A, Ducasse D, Moscone EA: Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 91:1294-1303 (2004).
- Shibata F, Hizume M, Kuroki Y: Molecular cytogenetic analysis of supernumerary heterochromatic segments in *Rumex acetosa*. *Genome* 43:391-397 (2000).
- Souza MGC, Benko-Iseppon AM: Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionoideae species of Pará, Amazonas, Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 144:181-191 (2004).
- Urdampilleta JD, Souza AP, Schneider DRS, Vanzela ALL, Ferrucci MS, Forni-Martins ER: Molecular and cytogenetic characterization of an AT-rich satellite DNA family in *Urvillea chacoensis* Hunz. (Paullinieae, Sapindaceae). *Genetica* (2008, *on line version*).
- Vanzela ALL, Luceño M, Guerra M: Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 134:557-566 (2000).
- Vanzela ALL, Ruas CF, Oliveira MF, Ruas PM: Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. *Genetica* 114:105-111 (2002).
- Veiga VFJ, Pinto AC: O Gênero *Copaifera* L. *Química Nova* 25:273-286 (2002).