



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DIANA CRISTINA LAVORATTO FARIAS-MISSÃO

**CARACTERIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE  
RETROTRANSPOSONS TY1-COPIA E TY3-GYPSY NOS  
CROMOSSOMOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO  
*HYPOCHAERIS* (ASTERACEAE)**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**  
**INSTITUTO AGRONÔMICO DO**  
**PARANÁ**  
**EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA**  
**AGROPECUÁRIA**

---

**DIANA CRISTINA LAVORATTO FARIAS-MISSÃO**

**CARACTERIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE**  
**RETROTRANSPOSONS TY1-COPIA E TY3-GYPSY NOS**  
**CROMOSSOMOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO**  
***HYPOCHAERIS* (ASTERACEAE)**

DIANA CRISTINA LAVORATTO FARIAS-MISSÃO

**CARACTERIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE  
RETROTRANSPOSONS TY1-COPIA E TY3-GYPSY NOS  
CROMOSSOMOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO  
HYPOCHAERIS (ASTERACEAE)**

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.

Orientadora: Prof. Dra. Claudete de Fátima Ruas

Londrina  
2012

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

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

F224c Farias-Missão, Diana Cristina Lavoratto.  
Caracterização e distribuição de retrotransposons *Ty1-copia* e *Ty3-gypsy* nos cromossomos de espécies do gênero *Hypochoeris* (Asteraceae) / Diana Cristina Lavoratto Farias-Missão. – Londrina, 2012.  
78 f. : il.

Orientador: Claudete de Fátima Ruas.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Citogenética vegetal – Teses. 2. Compostas – Cariótipos – Teses. 3. Cromossomos – Teses. 4. Plantas – Evolução (Biologia). I. Ruas, Claudete de Fátima. 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 576.312.32

DIANA CRISTINA LAVORATTO FARIAS-MISSÃO

**CARACTERIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE RETROTRANSPOSONS  
TY1-COPIA E TY3-GYPSY NOS CROMOSSOMOS DE ESPÉCIES DO  
GÊNERO *HYPOCHAERIS* (ASTERACEAE)**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Claudicéia Risso Pascotto  
UNIPAR – Paranavaí - PR

---

Profa. Dra. Gislayne F. L. T. Vilas Boas  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 27 de fevereiro de 2012.

Ao meu esposo Marcelo e aos  
meus pais, Sueli e Nelson,  
dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelas oportunidades, força e direcionamento concedidos.

A meu esposo Marcelo, pelo amor, compreensão e companhia.

A meus pais, Sueli e Nelson, pelo incentivo e apoio constante, em meus estudos.

Às agências financiadoras Capes e CNPq.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade.

A minha orientadora Prof. Dra. Claudete de Fátima Ruas pela acolhida, ensinamentos e orientação.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Aos amigos de laboratório (Luana, Bruna, Bruno, André, Camila, Leonardo, Thiago, Marcos, Laís, Carina, Ana Paula e Eduardo) e aos outros amigos do programa de pós-graduação (Alessandra, Juceli, Vivian, Laura, Karen, Rafael, Diego, Ana Paula, Fernanda, Carolina, Edihanne e Vanessa), pela companhia, amizade, conselhos, por dividirem comigo experiências e me ajudarem a terminar esta etapa.

E a todos os familiares e amigos que estiveram comigo nestes anos e direta ou indiretamente me apoiaram, muito obrigada.

FARIAS-MISSÃO, Diana Cristina Lavoratto. **Caracterização e distribuição de retrotransposons Ty1-copia e Ty3-gypsy nos cromossomos de espécies do gênero *Hypochoeris* (Asteraceae)**: 2010-2012. 78f. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

O gênero *Hypochoeris* (Asteraceae) apresenta distribuição disjunta na região Mediterrânea e na América do Sul. Estudos de biogeografia mostram uma conexão clara entre evento de dispersão à longa distância do nordeste da África ao sul da América do Sul e explosivo processo de radiação adaptativa em diferentes habitats no continente sul-americano. A região mediterrânea, onde são conhecidas 15 espécies, representa o centro de diversidade morfológica, citológica, molecular e taxonômica de *Hypochoeris*, enquanto, a América do Sul concentra cerca de 50 espécies, igualmente diversas morfológicamente. Os retrotransposons compõem um grupo de DNA repetitivo disperso, abundante no genoma de plantas e sua diversidade, organização e distribuição nos cromossomos têm grandes implicações na evolução dos genomas. Com o objetivo de compreender os mecanismos de evolução genômica e cariotípica de *Hypochoeris* e investigar a participação dos retrotransposons no processo evolutivo de espécies do gênero, foram investigados os retrotransposons do grupo LTR, Ty1-copia e Ty3-gypsy, pela análise de fragmentos parciais do gene da transcriptase reversa (rt). Utilizando *primers* degenerados e sem degeneração, fragmentos do gene rt foram isolados via PCR e caracterizados para oito espécies de *Hypochoeris*, incluindo uma de origem mediterrânea e *H. angustifolia*, co-irmã do grupo sul-americano. O número de sequências obtidas foi de 96 e 106, para Ty1-copia e Ty3-gypsy, respectivamente. Os dois grupos de elementos foram altamente heterogêneos, tanto entre, quanto dentro de espécies. Entretanto, o grau de heterogeneidade foi maior para elementos Ty1-copia, possivelmente, devido à evolução mais recente dos retrotransposons Ty3-gypsy em *Hypochoeris*. Constatou-se correlação positiva entre heterogeneidade de sequências rt-copia e tamanho do genoma para espécies sul-americanas. A distribuição física dos elementos Ty3-gypsy foi determinada para a espécie sul-americana *H. chillensis*, por meio de técnica de hibridação *in situ* (FISH). Estes elementos encontram-se dispersos de forma desigual nos cromossomos, com maior concentração nos braços longos dos cromossomos 3 e 4, região pericentromérica no braço longo do cromossomo 2, além de forte sinal adjacente à constrição secundária no par 2. Nossos dados sugerem também que os retrotransposons Ty1-copia e Ty3-gypsy evoluíram diferencial e independentemente, dentro do gênero *Hypochoeris*.

**Palavras chave:** Retrotransposons Ty1-copia e Ty3-gypsy. *Hypochoeris*. Gene rt. Evolução do genoma. Hibridação *in situ*.

FARIAS-MISSÃO, Diana Cristina Lavoratto. **Characterization and distribution of retrotransposons Ty1-copia and Ty3-gypsy in the chromosomes of the genus *Hypochoeris* (Asteraceae)**: 2010-2012. 78p. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## ABSTRACT

The genus *Hypochoeris* (Asteraceae) displays a disjunct distribution, in the Mediterranean region and in South America. There is a clear biogeographic connection between long-distance dispersal events from northwestern Africa to southern South America, followed by an explosive radiation into different habitats on the continent. *Hypochoeris* has a center of morphological, cytological, molecular, and taxonomic diversity in the Mediterranean region with 15 known species. The larger concentration of about 50 equally morphologically diverse species, however, occurs in South America. Retrotransposons represent a group of dispersed repetitive DNA that are very abundant in plant genomes and their diversity, organization and chromosomes distribution, play important roles on genome evolution. To understand the mechanisms of genomic and karyotype evolution in *Hypochoeris* and to investigate the contribution of the retrotransposons in the evolutionary processes of the genus we isolate and characterize fragments of the reverse transcriptase (rt) gene of the LTR group retrotransposons, Ty1-copia e Ty3-gypsy. Using universal degenerate and undegenerated primers, fragments of the rt gene were isolated by PCR and characterized for eight *Hypochoeris* species, including six from South America, one of Mediterranean origin and *H. angustifolia*, sister of the South American group of species. The numbers of sequences were 96 and 106, for Ty1-copia and Ty3-gypsy, respectively. The two groups of retroelements were highly heterogeneous both, within and between of species. Nevertheless, the level of heterogeneity was higher for Ty1-copia, possible because the Ty3-gypsy elements have evolved more recently in *Hypochoeris*. A positive correlation was observed between sequence heterogeneity of the Ty-copia elements and genome size for the South American species. The physical distribution of the Ty3-gypsy retrotransposon was determined for *H. chillensis* from South America using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). The Ty3-gypsy elements were found dispersed along all chromosomes, with a higher concentration on large arms of chromosome pairs 3 and 4, besides strong signals at pericentromeric region and adjacent to the secondary constriction on large arms of chromosome pair 2. The present results suggest that Ty1-copia and Ty3-gypsy retrotransposons have evolved different and independently in the genus *Hypochoeris*.

**Keywords:** Retrotransposons Ty1-copia and Ty3-gypsy. *Hypochoeris*. Rt gene. Genome evolution. *In situ* hybridization.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição disjunta do gênero *Hypochaeris* evidenciando o centro de origem e o centro secundário de diversificação..... 16
- Figura 2** - Estrutura de retrotransposons com LTR (Ty1-copia e Ty3-gypsy) (AP=protease, INT=integrase, RT=transcriptase reversa e RNaseH=ribonuclease H)..... 23
- Figura 3** - Características morfológicas das espécies estudadas. (A) e (B) flor e capítulo de *H. albiflora*; (C) e (D) flor e indivíduo em ambiente de ocorrência de *H. catharinensis*; (E) e (F) flor e indivíduo de *H. chillensis*; (G) e (H) flor e indivíduos de *H. glabra* ..... 31

## CAPÍTULO 1

- Figura 1** - Produto de amplificação em gel de agarose 1% mostrando: 1-4: bandas contendo fragmentos rt-gypsy isolados das espécies *H. albiflora*, *H. catharinensis*, *H. chillensis* e *H. glabra*, respectivamente, utilizando primers sem degenerações; 5-8 bandas com fragmentos rt-copia isolados das espécies *H. albiflora*, *H. catharinensis*, *H. chillensis* e *H. glabra*, respectivamente. C1 e C2: controles da reação. M: marcador de peso molecular 50pb (a banda mais forte corresponde a um fragmento de 250pb)..... 45
- Figura 2** - Correlação entre diversidade nucleotídica (Pi) de rt-copia e tamanho do genoma das espécies *Hypochaeris albiflora*, *H. catharinensis* e *H. chillensis*, juntamente com *H. angustifolia* e dez espécies sul-americanas de Ruas et al. (2008)..... 50
- Figura 3** - Dendrograma construído a partir de 96 fragmentos parciais do gene da transcriptase reversa de retrotransposon Ty1-copia isolados de espécies de *Hypochaeris*. Valores de bootstrap (>50%) são mostrados acima dos ramos. A distância genética é indicada pela escala de barra ..... 54

- Figura 4** - Dendrograma construído a partir de 106 fragmentos parciais do gene da transcriptase reversa de retrotransposon Ty3-gypsy isolados de espécies de Hypochaeris. Valores de bootstrap (>50%) são mostrados acima dos ramos. A distância genética é indicada pela escala de barra ..... 57
- Figura 5** - Dendrograma construído a partir de de 202 fragmentos parciais do gene da transcriptase reversa dos retrotransposons Ty1-copia e Ty3-gypsy isolados de espécies do gênero Hypochaeris. A distância genética é indicada pela escala de barra ..... 59
- Figura 6** - Hibridização in situ com clone pHchgy6 rt-gypsy em cromossomos metafásicos de *H. chillensis* ( $2n = 8$ ). (A) coloração DAPI, (B) elemento pHchgy6 rt-gypsy e (C) imagem sobreposta. Bar = 10  $\mu$ m..... 60

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1-</b>	Informações gerais de quatro espécies estudadas: local de coleta, número de coleção no herbário FUEL e coordenadas.....	40
<b>Tabela 2 -</b>	Características dos primers sem degenerações construídos para regiões conservadas do gene da transcriptase reversa de Ty1-copia e Ty3-gypsy .....	44
<b>Tabela 3 -</b>	Produtos de amplificação obtidos a partir de primers para retroelementos dos grupos Ty1-copia e Ty3-gypsy em espécies representantes do gênero Hypochaeris .....	46
<b>Tabela 4 -</b>	Dados de sequências dos dois retroelementos analisados para as espécies do gênero Hypochaeris estudadas .....	49
<b>Tabela 5 -</b>	Divergência par a par das sequências rt-copia e rt-gypsy e média de divergência das sequências dentro das espécies analisadas, do gênero Hypochaeris.....	51

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1	O GÊNERO <i>Hypochaeris</i> .....	16
2.1.1	Estudos Citogenéticos no Gênero <i>Hypochaeris</i> .....	18
2.2	ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS .....	21
2.2.1	Retrotransposons.....	23
2.3	ESPÉCIES ESTUDADAS .....	28
2.3.1	<i>Hypochaeris albiflora</i> (Kuntze) Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher.....	28
2.3.2	<i>Hypochaeris angustifolia</i> (Litard e Maire) Maire .....	28
2.3.3	<i>Hypochaeris catharinensis</i> Cabrera.....	29
2.3.4	<i>Hypochaeris chillensis</i> (Kunth) Britton.....	30
2.3.5	<i>Hypochaeris elata</i> .....	31
2.3.6	<i>Hypochaeris microcephala</i> (Sch. Bip) Cabrera.....	32
2.3.7	<i>Hypochaeris glabra</i> L.....	32
2.3.8	<i>Hypochaeris tenuifolia</i> .....	33
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	34
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
4.1	OBJETIVOS GERAIS .....	35
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	36
	<b>ARTIGO: Caracterização e distribuição de retrotransposons Ty1-copia e Ty3-gypsy nos cromossomos de espécies do gênero Hypochaeris Asteraceae)</b>	
	<b>RESUMO</b> .....	36
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	37
	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
	<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	63
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS GERAIS .....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Hypochaeris* L. (Asteraceae) possui cerca de 15 espécies na Europa central, Região Mediterrânea e Ásia, sendo esta região considerada o centro de origem do gênero, (CABRERA, 1976; STEBBINS, 1971; CERBAH et al., 1995, 1998; BORTIRI, 1999; STUESSY et al., 2003; SAMUEL et al., 2003; WEISS et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005) e mais de 50 espécies na América do Sul, o centro secundário de diversificação (CERBAH et al., 1998; BORTIRI, 1999; STUESSY et al., 2003; SAMUEL et al., 2003; WEISS et al., 2003; RUAS et al. 1995, 2005; TREMETSBERGER et al., 2005; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007).

Estudos têm mostrado que as espécies sul-americanas de *Hypochaeris* representam um grupo monofilético que se originou a partir de um ancestral que chegou ao continente há aproximadamente um milhão de anos, por mecanismos de dispersão à longa distância (CERBAH et al., 1998; SAMUEL, et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005, 2006). A rápida diversificação e especiação no continente ocorreram, possivelmente, devido à grande diversidade e disponibilidade de ambientes (STUESSY et al., 2003; SAMUEL et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005). A espécie *Hypochaeris angustifolia* (Litard e Maire) Maire, endêmica da região do Marrocos, é considerada co-irmã do grupo de espécies sul-americanas de *Hypochaeris* (TREMETSBERGER et al., 2005, 2006; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2008).

As espécies de *Hypochaeris* possuem características muito particulares, associadas a cariótipos simétricos/assimétricos representados por cromossomos grandes e em pequeno número. Essas características permitem que o gênero seja considerado um modelo, tanto para estudos sobre organização e evolução do genoma e estrutura cariotípica (STEBBINS, 1971; CERBAH; COULAUD; SILJAK-YAKOVLEV, 1998; RUAS et al., 1995, 2005, 2008; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2003, 2007, 2008) quanto para estudos filogenéticos, filogeográficos (CERBAH et al., 1998; SAMUEL et al., 2003; STUESSY et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005, 2006; ORTIZ et al., 2009) e de populações (TREMETSBERGER et al., 2003a, 2003b; MUELLNER et al., 2005; BECKER et al., 2006; MIX et al., 2006; ORTIZ et al., 2007; TERRAB et al., 2009).

Estudos realizados até o momento em 39 espécies e dois híbridos naturais do grupo sul-americano de *Hypochaeris* identificaram um número

cromossômico constante de  $2n = 8$ , o que confirma  $x = 4$  como número cromossômico básico para o grupo (RUAS et al., 1995, 2005; CERBAH; COULAUD; SILJAK-YAKOVLEV, 1998), além da ocorrência ocasional de poliploidia (WEISS et al., 2003; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2003, 2007). Das espécies investigadas, 27 foram analisadas quanto a organização e distribuição de rDNA, utilizando FISH (CERBAH; COULAUD; SILJAK-YAKOVLEV, 1998; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2003, 2008; RUAS et al., 2005). Estudos mais detalhados sobre a estrutura cariotípica do gênero foram realizados em apenas quatro espécies (RUAS et al., 2008) demonstrando necessidade de mais estudos no gênero.

Os retrotransposons compõem um grupo de DNA repetitivo, presente no genoma da maioria dos eucariotos (KUBIS; SCHIMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998), que apresentam, como principal característica, a capacidade de transposição de uma região para outra no genoma (KUBIS; SCHIMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998; MCCARTHY et al., 2002; BIÉMONT; VIEIRA, 2006). Esse movimento se dá por meio de transcrição reversa de um RNA intermediário, que produz uma cópia de DNA bifilamentar, que se insere em uma nova posição no genoma (BOEKE; CORCES, 1989; FINNEGAN, 1989; TODOROVSKA, 2007). Os retrotransposons são amplamente distribuídos em genomas de plantas (KUMAR et al., 1997; FLAVELL et al., 1992; MCCARTHY et al., 2002; BIÉMONT; VIEIRA, 2006), sendo mais frequentes os que contêm repetições terminais longas ou LTRs (*Long Terminal Repeats*), representados pelos grupos Ty1- *copia* e Ty3-*gypsy* (FLAVELL et al., 1992; KUMAR, 1996; BENNETZEN, 1996a; KUMAR; BENNETZEN, 1999; MATSUNAGA et al., 2002; KALENDAR et al., 2010).

Os retrotransposons são importantes contribuintes para evolução dos genomas, pois podem ser responsáveis por mutações, reorganização dos genomas e estrutura cromossômica, aumento do conteúdo de DNA e interrupção de sequências gênicas (KUMAR, 1996; KUMAR et al., 1997; BENNETZEN, 2000; NAVARRO-QUEZADA; SCHOEN, 2002; BIÉMONT; VIEIRA, 2006; MIROUZE; PASZKOWSKI, 2011). Estudos que demonstram expressão diferencial, tecido específica (LI et al., 2000; BIÉMONT; VIEIRA, 2006), além de inserção preferencial (MUOTRI et al., 2005) e regulação epigenética destes elementos, evidenciam algumas de suas funções no genoma (LIPPMAN et al., 2004).

Estudos sobre comportamento e evolução do genoma mostram que os retrotransposons são excelentes marcadores para experimentos que combinam

métodos genéticos, moleculares e citogenéticos (FISH), possibilitando detectar variação genética entre e dentro de espécies. Em investigação recente (RUAS et al., 2008) constatou-se que os retrotransposons do grupo Ty1- *copia* são extremamente variáveis entre as espécies sul-americanas de *Hypochaeris*. Utilizando hibridização *in situ* fluorescente (FISH) verificou-se que, em espécies européias do gênero, estes retroelementos encontram-se uniformemente distribuídos nos cromossomos, enquanto nas espécies sul-americanas os dois pares maiores de cromossomos encontram-se enriquecidos em Ty1- *copia* e os braços longos dos dois pares menores de cromossomos mostram-se desprovidos destes elementos. Os resultados sugerem que os retrotransposons Ty1- *copia* devem contribuir de forma expressiva na organização cromossômica e evolução dos genomas do gênero (RUAS et al., 2008).

Ainda não há estudos de distribuição cromossômica de retrotransposons do grupo Ty3- *gypsy* para o gênero *Hypochaeris*. Mas estes elementos foram caracterizados e analisados em vários organismos, como milho, sorgo, *Pinus radiata* e *Lilium henryi* (KUBIS; SCHIMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998), *Manihot esculenta* (GBADEGESIN; BEECHING, 2011), espécies do gênero *Helianthus* (SANTINI et al., 2002; UNGERER et al., 2009; STATON et al., 2009), do gênero *Fritillaria* (AMBROZ`OVA´ et al., 2011), do gênero *Vicia* (HILL et al., 2005) da família Solanaceae (FREGONEZI et al., 2007), da família Asteraceae (NATALI et al., 2006) e em *Copaifera langsdorffii* (GAETA et al., 2010). Estes elementos mostraram distribuição predominantemente dispersa ao longo dos cromossomos (NATALI et al., 2006), sendo também encontrados em região pericentromérica (STATON et al., 2009), com sinais mais acentuados associados a regiões organizadoras de nucléolo (NORs) (FREGONEZI et al., 2007), a regiões ricas em GC e a fragmento de rDNA cloroplástico (GAETA et al., 2010) e região centromérica (NATALI et al., 2006).

Estudos com retrotransposons, em espécies de *Hypochaeris*, são importantes para uma maior compreensão dos processos evolutivos ocorridos no gênero, durante a radiação na América do Sul. Foram escolhidas para este estudo as espécies *H. chillensis* e *H. albiflora* e *H. microcephala*, nativas da flora brasileira e de distribuição ampla na América do sul, *H. catharinensis*, endêmica do sul do Brasil (RUAS et al., 2005; AZEVÊDO-GONÇALVES; MATZENBACHER, 2007; RECK et al. 2011), *H. glabra* de origem mediterrânea e introduzida na América do Sul (CERBAH; COULAUD; SILJAK-YAKOVLEV, 1998; TREMETSBERGER et al., 2004; RUAS et

al., 1995, 2005), *H.angustifolia*, de origem marroquina e co-irmã do grupo sul-americano, além das espécies sul-americanas, *H. elata*, *H. tenuifolia*, ainda pouco estudadas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O GÊNERO *Hypochoeris*

O gênero *Hypochoeris* L. pertence à família Asteraceae, subfamília Cichorioidea K. Tam, tribo Lactuceae Cass, caracterizada por apresentar plantas com látex, subtribo Hypochaerinidinae Less. (BREMER, 1994). O gênero apresenta distribuição cosmopolita, com maior ocorrência nas regiões subtropicais e temperadas (BARROSO, 1991). Suas espécies são encontradas em diferentes ecossistemas como campos, ambientes savânicos e florestas abertas (GARCIA; BOLDRINI; JACQUES, 2000). *Hypochoeris* tem distribuição disjunta bicontinental (Figura 1), com o centro de origem na Europa, Região Mediterrânea e Ásia, onde é representado por cerca de 15 espécies, e a América do Sul, considerada como o centro secundário de diversificação, com mais de 50 espécies descritas (STEBBINS, 1971; CERBAH et al., 1998; RUAS et al., 1995, 2005; SAMUEL et al., 2003; STUESSY et al., 2003; WEISS et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005).

**Figura 1** - Distribuição disjunta do gênero *Hypochoeris* evidenciando o centro de origem e o centro de secundário de diversificação.



Estudos realizados com base em características morfológicas dividiram o gênero *Hypochoeris* em cinco seções taxonômicas: *Seriola*, *Euhypochoeris* (= *Hypochoeris*), *Metabasis*, *Robertia* e *Achyrophorus* (HOFFMANN, 1890). As espécies europeias estão representadas nas cinco seções, enquanto

todas as espécies sul-americanas são classificadas na seção *Achyrophorus* (CABRERA, 1976; CERBAH et al., 1998; BORTIRI, 1999; STUESSY et al., 2003; SAMUEL et al., 2003). Estudos filogenéticos realizados a partir de sequências de regiões ITS (*nuclear internal transcribed spacer*) e genes de cloroplasto (SAMUEL et al., 2003), envolvendo 31 espécies representantes do centro de origem e da América do Sul, mostram baixos níveis de divergência nas sequências de DNA do grupo sul-americano. Estes dados sugerem uma origem monofilética para o grupo, o qual teria, possivelmente, derivado de uma ou poucas introduções (SAMUEL et al., 2003), conforme proposto anteriormente por Cerbah e colaboradores (1998). Contrastando com a maior divergência encontrada nas sequências de DNA das espécies mediterrâneas, a possível monofilia das espécies da América do Sul também argumenta em favor de um padrão de especiação rápida e recente neste continente (CERBAH et al., 1998; SAMUEL et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005, 2006).

Evidências obtidas a partir de estudos de sequências de regiões ITS sugerem que *Hypochoeris angustifolia* (Litard e Maire) Maire, uma espécie endêmica da região do Marrocos, é co-irmã do grupo de espécies sul-americanas de *Hypochoeris* (TREMETSBERGER et al., 2005). Dados de AFLP também mostram que *H. angustifolia* ocupa uma posição filogenética intermediária entre as espécies do mediterrâneo e as da América do Sul (TREMETSBERGER et al., 2006). De acordo com estes estudos, o grupo sul-americano de *Hypochoeris* diversificou-se rapidamente durante o Plioceno-Pleistoceno (cerca de 0,25 a 1 milhão de anos) a partir de um ancestral comum, que chegou ao continente por dispersão a longa distância (TREMETSBERGER et al., 2005). Keeley, Forsman e Chan (2007) também sugerem mecanismos de dispersão à longa distância entre espécies da América do Sul e sul da África para explicar a distribuição de representantes da tribo Vernonieae (Asteraceae). Estudos indicam que a diversificação rápida das espécies do gênero *Hypochoeris* na América do Sul ocorreu devido à grande diversidade e disponibilidade de ambientes que possibilitou a ocorrência de eventos de radiação adaptativa e especiação (STUESSY et al., 2003; SAMUEL et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005). Tremetsberger et al. (2003b) inclusive mencionam que os maiores eventos terrestres que aconteceram na América do Sul, como a formação da bacia Amazônica, formação dos Andes, vulcanismo local e glaciação no Pleistoceno, podem ter contribuído diretamente com a diversificação de diferentes grupos de plantas. Embora os dados de AFLP mostrem a formação de

agrupamentos entre as espécies sul-americanas de *Hypochoeris*, não foi encontrada correlação ecológica para estes *clusters*, o que sugere que mudanças ecológicas tenham ocorrido independentemente dentro de várias linhas, o que retrata a natureza explosiva dos processos de especiação ocorridos após a chegada do gênero neste continente (STUESSY et al., 2003).

A partir de dados de AFLP, Tremetsberger e colaboradores (2006) identificaram seis clados separando as espécies sul-americanas de *Hypochoeris*: o grupo Apargioides com as espécies *H. apargioides*, *H. clarionoides*, *H. gayana*, *H. spathulata* e *H. thrincioides*; o grupo Chondrilloides com as espécies *H. chondrilloides* e *H. patagonica*, o grupo Microcephala com as espécies *H. alba*, *H. albiflora*, *H. argentina*, *H. chillensis*, *H. microcephala* e *H. parodii*, o grupo Pampasica com as espécies *H. megapotamica*, *H. pampasica*, *H. pinnatifida*, o grupo Sessiliflora com as espécies *H. echegarayi*, *H. eremophila*, *H. meyeniana*, *H. sessiliflora* e *H. taraxacoides* e o grupo Tenuifolia com as espécies *H. acaulis*, *H. hookeri*, *H. incana*, *H. palustris* e *H. tenuifolia*. O trabalho de Reck e colaboradores (2011) acrescentou a esta lista de clados filogenéticos, o grupo Lutea com as espécies *H. catharinensis* e *H. lutea*.

### 2.1.1 Estudos Citogenéticos no Gênero *Hypochoeris*

Além das diferenças morfológicas e moleculares encontradas, as espécies de *Hypochoeris* apresentam diferenças cariotípicas marcantes. Resultados sobre número cromossômico reforçam a hipótese de que o gênero teve origem na região Mediterrânea e que a América do Sul é o centro secundário de diversificação. As espécies europeias possuem cariótipos simétricos, e apesar de constituírem um grupo menor, mostram considerável diversidade citológica, apresentando números cromossômicos básicos de  $x = 3, 4, 5$  e eventualmente  $6$ , associados a cariótipos simétricos e cromossomos morfologicamente pouco variáveis (STEBBINS, 1971; CERBAH et al., 1995, CERBAH; COULAUD; SILJAK-YAKOVLEV, 1998; RUAS et al., 1995). Por outro lado, todas as espécies sul-americanas apresentam como padrão, cariótipos altamente assimétricos e bimodais e um único número cromossômico básico de  $x = 4$  (RUAS et al., 1995, 2005; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007). Este cariótipo é compartilhado com *H. angustifolia*, espécie considerada

co-irmã do grupo sul-americano de *Hypochaeris* (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007; 2008).

Investigações sobre a estrutura cromossômica e relação genética entre espécies de *Hypochaeris* reforçam a idéia de que um grande caminho evolutivo foi necessário para a reorganização dos genomas e diferenciação dos cromossomos, que levou à separação das espécies européias e sul-americanas (RUAS et al., 2005). Por outro lado, Weiss-Schneeweiss e colaboradores (2008) afirmam que a grande uniformidade cariotípica, observada entre as espécies sul-americanas de *Hypochaeris*, fornece evidências de que grandes rearranjos estruturais têm sido menos relevantes na evolução deste grupo mas, deixam clara a necessidade de mais estudos, com aplicação de marcadores dispersos para provar tal afirmação.

Até o momento, são conhecidos os números cromossômicos de 39 espécies e dois híbridos naturais de *Hypochaeris* na América do Sul (RUAS et al., 1995, 2005; CERBAH; COULAUD; SILJAK-YAKOVLEV, 1998; WEISS et al., 2003; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2003, 2007). Estudos citogenéticos mais detalhados foram realizados para apenas 27 destas espécies (CERBAH; COULAUD; SILJAK-YAKOVLEV, 1998; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2003, 2008; RUAS et al., 2005, 2008), o que demonstra necessidade de mais estudos para o gênero.

Investigações sobre a distribuição de sítios de DNA ribossômico (DNAr) em *Hypochaeris* mostraram que, associada a grande similaridade cariotípica, as espécies sul-americanas do gênero mostram também, uniformidade quanto a distribuição dos sítios de DNAr 5S, em um único loco no braço curto do cromossomo 2 (RUAS et al., 1995, 2005; CERBAH; COULAUD; SILJAK-YAKOVLEV, 1998; TREMETSBERGER, 2004). Entretanto, diferenças marcantes, relacionadas com número e distribuição de locos de DNAr 35S (18S-25S), possibilitaram a identificação de sete grupos cariotípicos (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007). O maior grupo, Apargioides, inclui 17 espécies as quais, possuem cariótipos com dois sítios intersticiais de rDNA 35S, que formam constrições secundárias nos braços longo e curto dos cromossomos 2 e 3, respectivamente. As espécies do grupo *Tenuifolia* possuem os mesmos sítios de rDNA 35S, porém não possuem constrição secundária visível no cromossomo 2 (rDNA 35S inativo) (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007). Outro grupo (*Sessilifolia*), representado por uma única espécie, *H. sessiflora*, possui sítio de DNAr 35S com localização terminal no cromossomo 3. O

grupo Chondrilloides, representado apenas por *H. chondrilloides*, que não possui dados de FISH, apresenta cromossomo 3 do tipo telocêntrico, diferentemente das outras espécies, que possuem este mesmo cromossomo do tipo submetacêntrico. Entretanto ainda há necessidade de confirmação sobre a presença de um satélite neste cromossomo. As espécies do grupo Patagonica, representado por *H. patagonica* (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007), *H. lutea* (RUAS et al., 2005; RECK et al., 2011) e *H. catharinensis* (RECK et al., 2011) possuem cariótipos com apenas um sítio terminal de rDNA 35S, localizado no braço curto do cromossomo 3. O grupo Acaulis possui o mesmo sítio de rDNA 35S porém, em posição intersticial. E finalmente, o grupo Caespitosa, representado pela espécie tetraplóide *H. caespitosa* é caracterizado por um único sítio de rDNA 35S no cromossomo 2 (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007).

Weiss-Schneeweiss e colaboradores (2008) sugerem que a evolução inicial das espécies sul-americanas de *Hypochaeris* se caracteriza por considerável diferenciação cariotípica resultante de derivações independentes a partir do cariótipo de *H. angustifolia*. Essas derivações levaram a diversificação, com relação à posição e evolução do loco rDNA 35S, provavelmente, envolvendo inversões e transposições no cromossomo 3 e inativação e perda no cromossomo 2 e raramente no 3. Porém, os mecanismos exatos não são bem compreendidos e há necessidade de mais estudos para desvendar se a constituição cariotípica contribuiu para a diversificação das espécies e como isto ocorreu.

Não há evidências de que a poliploidia seja a causa para as mudanças microestruturais, que conduziram para a rápida diversificação morfológica e genética das espécies de *Hypochaeris* na América do Sul, ainda que a ocorrência de poliploides seja um evento relativamente frequente neste grupo (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2008). Eventos de poliploidia têm sido identificados em diferentes grupos cariotípicos e em diferentes clados filogenéticos, sugerindo que a poliploidia é um processo ativo no grupo (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007). Weiss-Schneeweiss e colaboradores (2003, 2007, 2008) verificaram a presença de indivíduos poliplóides dentro de populações diplóides e Fiorin (2008) encontrou uma população de *H. lutea* inteiramente poliplóide. Entretanto, há necessidade de novos estudos nesta área para melhores conclusões sobre a participação da poliploidia na evolução dos cariótipos no gênero.

## 2.2 ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

Os elementos transponíveis (TEs) compõem um grupo de DNA repetitivo disperso, com capacidade de se movimentar (transpor) de uma região para outra no genoma da maioria dos eucariotos, com exceção de alguns eucariotos unicelulares (KUBIS; SCHIMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998; MCCARTHY et al., 2002; BIÉMONT; VIEIRA, 2006). No entanto, a falta de TEs relatada em alguns casos, pode refletir incapacidade de identificação destes elementos, com base em homologia de sequência com os tipos conhecidos de TEs. Ainda, a ausência de TEs pode ser explicada pelo fato destes organismos terem herdado seus genomas de um mesmo ancestral que não os possuía, ou por susceptibilidade à transferência horizontal destes organismos (PRITHAM, 2009).

O primeiro relato sobre a existência dos TEs foi feito por Barbara McClintock para explicar um padrão diferencial de coloração em milho. Em 1983, trinta e cinco anos após a publicação da primeira evidência destes elementos genéticos móveis, a pesquisadora recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina pela sua descoberta (MCCLINTOCK, 1984). Estes elementos são classificados como elementos transponíveis classe II (transposons), que se movem através de DNA dupla fita por mecanismos de recorta-cola, sendo o próprio elemento a molécula de transposição, que se desloca de um local do genoma para outro (FINNEGAN, 1989; BIÉMONT; VIEIRA, 2006; TODOROVSKA, 2007; KALENDAR et al., 2010). Outro grupo de TE, nomeado retrotransposons, é classificado como elementos transponíveis classe I. Os retrotransposons se caracterizam pelo modo específico de reintegração que faz uso de um mecanismo de transcrição reversa de um RNA intermediário, para produzir uma cópia de DNA bifilamentar que se insere novamente no genoma (FINNEGAN, 1989; BOEKE; CORCES, 1989; TODOROVSKA, 2007).

Os TEs podem contribuir significativamente para o tamanho do genoma de seus hospedeiros (PRITHAM, 2009), verificando-se uma correlação positiva entre o tamanho do genoma e quantidade de TEs (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007). Por exemplo, a espécie de sapo *Rana esculenta* possui um genoma com conteúdo de DNA de 5,6-8,0 pg, sendo 77% composto de TEs. O genoma do milho, com 5,0 pg de DNA, possui 60% de TEs, enquanto o genoma humano (conteúdo de DNA de 3,5 pg) tem 45% de TEs, e *Drosophila melanogaster* (0,18pg) tem 15-22%

de TEs (BIÉMONT e VIEIRA, 2006). Estudos mostram que há variação quantitativa, qualitativa e na localização dos TEs dentro e entre genomas. Fatores como a seleção natural podem influenciar a diversidade e o sucesso diferencial dos TEs nos genomas, favorecendo aqueles que são mais adequados. A aptidão dos TEs é vista como uma medida do número de cópias, produzidas sem prejuízo ao hospedeiro ou como a capacidade destes para colonizar novos ambientes (PRITHAM, 2009).

Em razão da abundância e diversidade dos TEs e a descoberta de alguns elementos que não se encaixavam necessariamente nas duas classes propostas desde o primeiro sistema de classificação (FINNEGAN, 1989), foi proposto um novo sistema de classificação unificado e de fácil compreensão para os TEs em eucariotos (WICKER et al., 2007). Neste sistema, o nível hierárquico mais alto (classe) divide os TEs pela presença ou ausência de um RNA intermediário de transposição. Estas classes são subdivididas em subclasses, ordens e famílias. De maneira geral, as subclasses distinguem os elementos que inserem uma nova cópia no genoma, daqueles que deixam o sítio doador para reintegrar-se em outro lugar. As ordens dividem os TEs pelas diferenças no mecanismo de inserção, enquanto as famílias são distinguidas por sequências conservadas de DNA. Consideram-se como pertencentes a uma mesma família, aqueles elementos que possuam 80% ou mais de similaridade de sequência em sua região de codificação (se presente) ou domínio interno ou na região repetida terminal (WICKER et al., 2007).

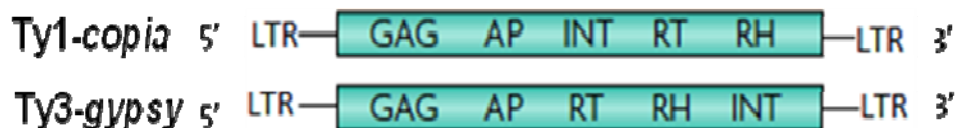
A maioria dos TEs apresenta sua atividade de transposição restrita nos genomas, seja por controle epigenético pós-transcricional ou por inativação da transcrição (MIROUZE; PASZKOWSKI, 2011), devido a mecanismos de metilação, como observado no genoma de *Arabidopsis thaliana* (ZILBERMAN et al., 2006) e em milho (BENNETZEN, 1996b). Em outros casos, o controle na proliferação se dá por remodelação da cromatina pelo gene *Ddm1* (do inglês: *Decrease in DNA methylation*), como observado por Tsukahara e colaboradores (2009) e Lippman e colaboradores (2004). A transposição dos TEs pode ser desencadeada por fatores como o estresse ambiental, que pode agir principalmente nos retrotransposons, induzindo variabilidade genética que pode servir como resposta adaptativa (MIROUZE; PASZKOWSKI, 2011). A diversidade de estruturas e mecanismos de integração respondem pela capacidade de adaptação e mudança destes elementos (PRITHAM, 2009).

### 2.2.1 Retrotransposons

Os retrotransposons são classificados entre aqueles elementos que contêm repetições terminais longas (com LTR), como o grupo *Ty1-copia* e o grupo *Ty3-gypsy*, que podem ser distinguidos pela homologia de sequências e ordem dos genes (Figura 2). Os retroelementos sem LTRs incluem os elementos nucleares longos interespersos (LINEs) e os elementos nucleares curtos interespersos (SINEs) (FLAVELL et al., 1992; BENNETZEN, 1996a; KUMAR, 1996; KUMAR; BENNETZEN, 1999; MATSUNAGA et al., 2002; KALENDAR et al., 2010).

Todos os grupos de retrotransposons são complementados por suas respectivas formas não autônomas, ou seja, àquelas que apresentam falta de um ou mais genes essenciais para a transposição, como os MITES (miniatura de elemento transponível invertido repetido) para a classe II (transposons), SINEs para os retrotransposons sem LTR e TRIMs (retrotransposon terminal-repetido em miniatura) e LARDS (retrotransposon derivado grande) para retrotransposons com LTR (KALENDAR et al., 2010).

**Figura 2** - Estrutura de retrotransposons com LTR (*Ty1-copia* e *Ty3-gypsy*) (AP = protease, INT = integrase, RT = transcriptase reversa e RNaseH = ribonuclease H).



**Fonte:** Adaptado de Wicker et al., 2007.

Os retrotransposons são amplamente distribuídos em genomas de plantas e animais (FLAVELL et al., 1992; KUMAR et al., 1997; MCCARTHY et al., 2002; BIÉMONT; VIEIRA, 2006). Estudos indicam que pelo menos 22% (97 Mb) do genoma do arroz atual é composto de sequências de retrotransposon LTR, e que mais de 190 Mb destas sequências foram excluídas nos últimos 8000 mil anos (MA et al., 2004). Nas espécies *Fritillaria affinis* e *F. imperialis* (Liliaceae), os retrotransposons LTR compõem cerca de 68,4% e 71% do total do genoma, respectivamente, sendo os *Ty3-gypsy* mais abundantes (AMBROZŔOVA' et al., 2011). Na espécie do gênero *Vicia* (Fabaceae), cerca de 20 a 45% do genoma é

composto por retrotransposons (HILL et al., 2005). Os retrotransposons sem LTR são melhores caracterizados em humanos, insetos e outros animais, mas estudos mostram que são amplamente representados também em plantas (KUMAR; BENNETZEN, 1999). Kubis e colaboradores (1998) isolaram e caracterizaram regiões conservadas do gene da transcriptase reversa (rt) presentes em LINES de espécies do gênero *Beta*, comprovando a forte homologia destes elementos com LINES de outras espécies de plantas e de animais.

Acredita-se que os retrotransposons sejam importantes contribuintes para evolução do genoma, pois, devido ao mecanismo de transposição, podem ser responsáveis por um amplo espectro de mutações, promovendo a reorganização dos genomas e o aumento no conteúdo de DNA, pelo aumento rápido do número de cópias (KUMAR, 1996; KUMAR et al.,1997; BENNETZEN, 2000; NAVARRO-QUEZADA; SCHOEN, 2002; BIÉMONT; VIEIRA, 2006; MIROUZE; PASZKOWSKI, 2011). Os retrotransposons podem atuar também na interrupção de funções gênicas, pois podem inserir-se em genes ou regiões de regulação gênica (BENNETZEN, 2000; BIÉMONT; VIEIRA, 2006;). Também contribuem para a estrutura dos cromossomos, pois suas atividades transposicionais e de potencial recombinacional podem resultar em quebras e rearranjos cromossômicos (BENNETZEN, 2000).

O número de cópias de retrotransposons comumente encontrado em genomas de plantas varia de poucas (1 a 100) a muitas (1000 a 1 milhão) cópias, dependendo do tipo de retrotransposon e da espécie hospedeira (KUMAR et al.,1997; KUMAR; BENNETZEN, 1999; LI et al., 2000; FRIESEN; BRANDES; HESLOP-HARRISON, 2001). Além disso, o número de cópias pode variar entre espécies intimamente relacionadas e com o modo de evolução do elemento. Por exemplo, controle da transposição em regiões específicas dos cromossomos, tais como espaços intergênicos e outras regiões repetitivas, evita que o genoma hospedeiro acumule um nível letal de mutações, possibilitando o sucesso na proliferação destes elementos como sequências dispersas altamente repetitivas, medianamente repetitivas e de baixa repetição, sem prejuízo para o genoma hospedeiro (KUMAR et al.,1997).

Como já mencionado, é provável que os retrotransposons desempenhem um papel importante na expansão do genoma hospedeiro, e isto seja resultado de evolução rápida no momento de radiação de espécies. Por outro lado, também é provável que muitas sequências de retrotransposons sejam eliminadas

sob pressão evolutiva por vários mecanismos, tais como *crossing over* desigual e deleções, para racionalizar o genoma hospedeiro. Outra razão possível para a presença de um número limitado de retrotransposons em alguns genomas de plantas pode ser a incapacidade destes, em colonizar e ampliar-se no genoma do hospedeiro (KUMAR et al., 1997).

Estudos indicam que a expressão dos TEs, ou seja, a produção de seu RNA codificado, é tecido específica, além do que, alguns elementos são altamente expressos durante determinadas fases de vida do hospedeiro. Alguns TEs apresentam expressão diferencial em células reprodutoras masculinas e femininas (BIÉMONT; VIEIRA, 2006). Em *Oryza sativa* L. foi encontrado um fragmento de DNA (nomeado RIRE9), que representou um retrotransposon Ty3-*gypsy* transcricionalmente ativo, expresso em folhas e caules em condições de crescimento normal (LI et al., 2000). Foi também relatado que retrotransposons do grupo LINEs podem ser inseridos preferencialmente em regiões reguladoras específicas de genes neurais em camundongos, causando expressão diferencial destes genes (MUOTRI et al., 2005). Estes padrões específicos de expressão favorecem a afirmação de que os TEs possuem diversas funções no genoma e que não são DNA lixo, assim como se acreditou por um determinado período (BIÉMONT; VIEIRA, 2006). Estudos com *Drosophila* mostraram que os elementos transponíveis também podem atuar na regulação epigenética, quando inseridos dentro ou muito próximo a genes (LIPPMAN et al., 2004).

Os LTRs são os maiores componentes do genoma de plantas e sua distribuição, organização cromossômica e diversidade, bem como sua implicação na evolução do genoma têm sido investigadas em várias espécies (FLAVELL et al., 1992; HIROCHIKA; HIROCHIKA, 1993; PEARCE et al., 1996; BRANDES et al., 1997; HESLOP-HARRISON et al., 1997). Os LTRs mostram uma distribuição uniforme em todo o genoma, embora possa ocorrer variação entre espécies e certas regiões possam apresentar amplificação ou serem desprovidas destes elementos, possivelmente, em consequência de taxas evolucionárias diferentes de amplificação e inserção de sequências (BRANDES et al., 1997).

Retrotransposons com LTR em plantas parecem ser relativamente jovens, com menos de 15 milhões de anos (KUMAR; BENNETZEN, 1999; DEVOS; BROWN; BENNETZEN, 2002). As espécies estudadas por Vitte e Bennetzen (2006) exibiram retrotransposons com LTR de mobilidade recente. Apesar do pouco tempo

evolutivo nas espécies investigadas, análises de diversidade indicam que estes elementos estiveram presentes em todas as linhagens de plantas durante centenas de milhões de anos (KUMAR; BENNETZEN 1999). Estudos mostram que a maioria dos retrotransposons com LTR detectáveis em arroz inseriram-se a menos de 8 milhões de anos, com uma meia-vida inferior a 6 milhões de anos, e que mais de dois terços destes perderam suas sequências codificantes (MA et al., 2004).

Os retrotransposons *Ty1-copia* estão, em geral, distribuídos uniformemente por todo o genoma de plantas, com algumas regiões de concentração e outras de depleção. A dispersão destes elementos tem relação com o modo de replicação, integração e amplificação do elemento. A depleção em algumas regiões cromossômicas, em especial, regiões de DNA ribossômico (rDNA) e em grandes blocos de DNA satélite, é uma característica comum de retroelementos com LTR, e parece ser dependente também do tamanho do genoma hospedeiro (HESLOP-HARRISON et al., 1997; GALASSO et al., 1997; KUBIS et al., 1998). Os retroelementos *Ty1-copia* apresentaram distribuição dispersa na maior parte dos cromossomos de plantas como *Allium cepa*, *Beta vulgaris*, espécies de *Brassica* e de *Vicia*, *Pennisetum glaucum*, *Pinus elliottii*, *Selaginella Apoda*, com exceção de regiões centroméricas, constrições secundárias e sequências repetidas em tandem (BRANDES et al., 1997). Em *Arabidopsis thaliana* e *Cicer arietinum*, os retroelementos *Ty1-copia* foram encontrados, pelos mesmos autores, em região de heterocromatina paracentromérica.

Experimentos de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com retrotransposons do grupo *Ty1-copia* em espécies européias e sul-americanas de *Hypochaeris* revelaram diferenças significativas na distribuição cromossômica destes elementos entre os dois grupos. Em espécies européias, os retroelementos analisados encontraram-se distribuídos por todo o comprimento dos cromossomos, com exceção das regiões de DNA ribossômico e centrômeros. Nas espécies da América do Sul, os dois pares maiores de cromossomos mostraram-se enriquecidos em *Ty1-copia*, enquanto os braços longos dos dois pares menores de cromossomos mostraram-se desprovidos destes elementos. Os resultados sugerem que os retrotransposons *Ty1-copia* devem contribuir de forma expressiva na organização e evolução do gênero (RUAS et al., 2008).

Os retrotransposons *Ty3-gypsy* também são bastante estudados em plantas e foram caracterizados e analisados em vários grupos, como milho, sorgo,

*Pinus radiata*, *Lilium henryi* (KUBIS; SCHIMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998), *Manihot esculenta* (GBADEGESIN; BEECHING, 2011), *Helianthus* (SANTINI et al. 2002; UNGERER et al., 2009; STATON, et al., 2009), *Fritillaria* (AMBROZ'OVA' et al., 2011), *Vicia* (HILL et al., 2005), Solanaceae (FREGONEZI et al., 2007), Asteraceae (NATALI et al., 2006) e *Copaifera langsdorffii* (GAETA et al., 2010). Os elementos Ty3-gypsy apresentam distribuição predominantemente dispersa ao longo dos cromossomos e regiões centroméricas (NATALI et al., 2006), em região pericentromérica (STATON et al., 2009), além de apresentar sinais mais acentuados associados a regiões organizadoras de nucléolo (NORs) (FREGONEZI et al., 2007), a regiões ricas em GC e a fragmento de rDNA cloroplástico (GAETA et al., 2010).

Análise de sequências de retroelementos  *copia*,  *gypsy* e LINE em espécies do gênero  *Brassica* mostram que os dados não permitem inferência filogenética. Entretanto, o conhecimento da evolução destas sequências pode fornecer marcadores moleculares interessantes (ALIX; HESLOP-HARRISON, 2004), permitindo que sejam amplamente utilizados para estudos de diversidade em diferentes grupos de plantas (KALENDAR et al., 2010), além de auxiliarem na interpretação de dados de outras espécies (ALIX; HESLOP-HARRISON, 2004). Assim, análises filogenéticas de sequências rt de Ty1- *copia* mostram, com algumas exceções significativas, que o grau de divergência das sequências entre qualquer par de espécies é geralmente proporcional à distância evolutiva entre estas espécies (FLAVELL et al., 1992; KUMAR et al., 1997).

Conforme exposto acima, as características encontradas no gênero  *Hypochaeris* permitem que este gênero seja considerado um modelo, tanto para estudos que visam análise da evolução do genoma e estrutura cariotípica (STEBINS, 1971; CERBAH; COULAUD; SILJAK-YAKOVLEV, 1998; RUAS et al., 1995, 2005, 2008; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2003, 2007, 2008), quanto para estudos filogenéticos e filogeográficos (CERBAH et al., 1998; SAMUEL et al., 2003; STUESSY et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005, 2006; ORTIZ et al., 2009) e de populações (TREMETSBERGER et al., 2003a, 2003b; MUELLNER et al., 2005; BECKER et al., 2006; MIX et al., 2006; ORTIZ et al., 2007; TERRAB et al., 2009). O foco de estudo tem sido principalmente as espécies sul-americanas, pois representam a maior parte da diversidade genética do gênero (ORTIZ et al., 2009).

## 2.3 ESPÉCIES ESTUDADAS

### 2.3.1 *Hypochaeris albiflora* (Kuntze) Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher

A espécie *H. albiflora* era designada como *H. microcephala* (Sch. Bip.) Cabrera var. *albiflora* (Kuntze) Cabrera até que,

Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher (2007), durante revisão taxonômica do gênero *Hypochaeris* no Rio Grande do Sul, reconheceram a natureza híbrida de *Hypochaeris x microcephala* (Sch.Bip) Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher e elevaram-na à condição de espécie. *Hypochaeris albiflora* é uma erva perene, de 6,5-38 centímetros de altura, com flores brancas (Figura 3), habita ambientes antropizados, cultivos de lavoura, terrenos baldios, barrancos, beira de estradas, borda de mata e local alterado. Floresce e frutifica nos meses de outubro e novembro (AZEVEDO-GONÇALVES; MATZENBACHER, 2007).

Trata-se de espécie nativa da flora brasileira (RUAS et al., 2005), que distribui-se em todas as regiões fisiográficas no Estado do Rio Grande do Sul, exceto nos Campos de Cima da Serra, e no estado de Santa Catarina. A espécie também ocorre na Argentina e no Paraguai (BORTIRI, 1999; CABRERA et al., 2000). Ruas e colaboradores (1995) descrevem o cariótipo da espécie contendo 4 cromossomos metacêntricos, 2 submetacêntricos e 2 subtlocêntricos. Dados sobre a distribuição de sítios de DNAr 35S classificam esta espécie no grupo cariotípico Aspargioides (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007).

### 2.3.2 *Hypochaeris angustifolia* (Litard e Maire) Maire

Trata-se de erva rizomatosa perene, endêmica do Atlas do Marrocos (TREMETSBERGER et al., 2005), onde ocorre em área extensa, em populações isoladas, fragmentadas provavelmente por eventos de vicariância provocados durante atividade vulcânica, no período Quaternário (TERRAB et al., 2009). *Hypochaeris angustifolia* floresce no verão e é polinizada por abelhas solitárias (TREMETSBERGER et al., 2005). Possui cariótipo bimodal, com  $2n = 8$  cromossomos, como as espécies sul-americanas do gênero (TREMETSBERGER et al., 2005). Estudos de sequências de regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e dados de AFLP mostram que *H. angustifolia* ocupa uma posição filogenética

intermediária entre as espécies do mediterrâneo e as da América do Sul (TREMETSBERGER et al., 2006). Devido a estas características *H. angustifolia* é considerada co-irmã do grupo sul-americano de *Hypochaeris*.

### 2.3.3 *Hypochaeris catharinensis* Cabrera

*Hypochaeris catharinensis* é uma erva perene que pode atingir de 15,5-33 cm de altura. Possui flores amarelas (Figura 3), sendo a única espécie do gênero a apresentar raiz fasciculada e rizoma horizontal, uma característica de relevância taxonômica para este táxon. A espécie floresce e frutifica nos meses de dezembro e janeiro (AZEVEDO-GONÇALVES; MATZENBACHER, 2007).

*Hypochaeris catharinensis* é uma espécie endêmica do Sul do Brasil, que ocorre predominantemente em regiões altas (800-1400m) e frias, do norte do Rio Grande do Sul até o sudeste de Santa Catarina. É adaptada a solos secos, rochosos e superficiais de intemperismo basáltico, ocorrendo em áreas abertas e pedregosas de campo, em associação com vegetação arbustiva ou ervas, com predominância de gramíneas. Ocorre também em florestas abertas com *Araucaria angustifolia* e em barrancos de beira de estrada e ambiente úmido (FORTES, 1959; AZEVEDO-GONÇALVES, 2004).

Estudos cromossômicos em *H. catharinensis* mostraram o mesmo padrão cariotípico que caracteriza as espécies sul-americanas do gênero (FIORIN, 2008). Dados de bandamento cromossômico em populações de *H. catharinensis* identificaram uma distribuição de heterocromatina não usual para o gênero. Nesta espécie foram identificados dois grandes blocos heterocromáticos ricos em GC (CMA-positivos), associados a regiões subteloméricas dos braços longo e curto do cromossomo 3 e do braço longo do cromossomo 4, além de sinais mais fracos distribuídos em regiões intersticiais dos cromossomos (FIORIN, 2008; RECK et al., 2011). Outra característica, até então desconhecida para o gênero, foi a presença nesta espécie, de sinal DAPI (4'6-diamino-2-phenylindole) positivo em posição pericentromérica no braço curto do cromossomo 4, evidenciando a presença de DNA repetitivo rico em AT (RECK et al., 2011). Experimentos de FISH identificaram um único sítio de rDNA 35S localizado em posição subterminal no braço curto do cromossomo 3 (RECK et al., 2011), possibilitando a inclusão desta espécie no grupo cariotípico Patagonica, conforme proposto por Weiss-Schneeweiss e colaboradores

2008). Assim como em outras espécies, um único sítio de rDNA 5S ocorre em posição terminal no braço curto do par 2 (RECK et al., 2011).

#### 2.3.4 *Hypochoeris chillensis* (Kunth) Britton

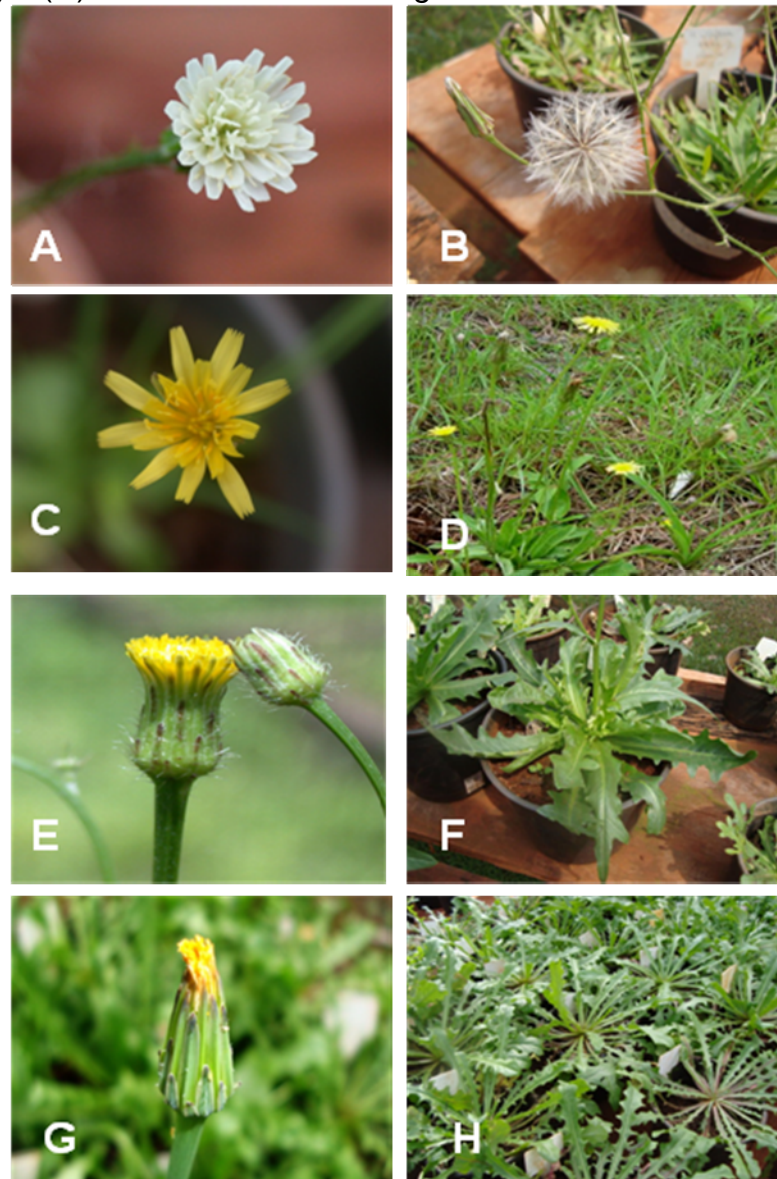
Cabrera (1976) sinonimizou *H. brasiliensis* (Less.) Griseb. e *H. tweediei* (Hook. & Arn.) Cab. em *H. chillensis*. Trata-se de uma erva perene, de 9 a 100 centímetros de altura, com flores amarelas (Figura 3). Pode ser encontrada em campo limpo ou sujo, ambientes antropizados, em cultivo de lavouras, terrenos baldios, em beira de estrada, campo seco de restinga, terrenos pedregosos e ambientes úmidos. Floresce e frutifica entre os meses de março a dezembro (AZEVEDO-GONÇALVES; MATZENBACHER, 2007).

Ruas e colaboradores (2005) descrevem *H. chillensis* como espécie nativa da flora brasileira. Em estudos realizados no Rio Grande do Sul Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher (2007) observaram que *H. chillensis* é a espécie mais comum em todo o estado do Rio Grande do Sul e que apresenta maior variabilidade morfológica. No Brasil, a espécie encontra-se distribuída desde o estado do Rio Grande do Sul até Minas Gerais. Na América do Sul pode ser encontrada por toda a região andina até a Colômbia, além de ocorrer em grande parte da Argentina, Paraguai e Uruguai.

A hibridização pode ser responsável por grande parte da variabilidade morfológica identificada em *H. chillensis* e é favorecida pela sua ocorrência com outras espécies, conforme constatado, pela presença de híbridos naturais entre *H. chillensis* x *H. megapotamica*, *H. chillensis* x *H. albiflora* e *H. chillensis* x *H. microcephala* (AZEVEDO-GONÇALVES; MATZENBACHER, 2007).

O cariótipo de *H. chillensis* possui 4 cromossomos metacêntricos e 4 subtelocêntrico (RUAS et al., 1995). Cerbah; Coulaud e Siljak-yakovlev (1998) observaram dois sítios intercalares de DNAr 35S, um no braço longo do cromossomo 2 e outro no braço curto do par 3. O único sítio de rDNA 5S ocorre em posição terminal no braço curto do par 2. Estes dados foram confirmados na investigação de Ruas e colaboradores (2005). A espécie enquadra-se no grupo cariotípico Tenuifolia (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007).

**Figura 3** - Características morfológicas de quatro espécies estudadas. (A) e (B) flor e capítulo de *H. albiflora*; (C) e (D) flor e indivíduo em ambiente de ocorrência de *H. catharinensis*; (E) e (F) flor e indivíduo de *H. chillensis*; (G) e (H) flor e indivíduos de *H. glabra*.



### 2.3.5 *Hypochaeris elata*

A espécie pertence ao grupo cariotípico aspargioides com dois sítios intersticiais de rDNA 35S que formam constrição secundária, um no braço longo do cromossomo 2 e outro no braço curto do cromossomo 3. Comparado ao tamanho cromossômico de outras espécies do grupo, *H. elata* possui cromossomo menores (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007).

### 2.3.6 *Hypochaeris microcephala* (Sch. Bip) Cabrera

*Hypochaeris microcephala* é uma erva perene de 16 a 28 centímetros de altura, com flores amarelas. Esta espécie habita terrenos baldios, ruas, praças, beira de estrada e distribui-se no Rio Grande do Sul (AZEVEDO-GONÇALVES; MATZENBACHER, 2007), na Argentina, Paraguai e Uruguai (Cabrera, 1976; Bortiri, 1999). O florescimento e a frutificação ocorrem nos meses de setembro, outubro e novembro. *Hypochaeris microcephala* tem status de espécie, apesar de hibridizar facilmente com *H. chillensis* (RUAS et al., 1995; AZEVEDO-GONÇALVES; MATZENBACHER, 2004, 2007)

### 2.3.7 *Hypochaeris glabra* L.

*Hypochaeris glabra* é uma espécie anual (ADAME; TALAVERA, 1980), que mede de 9-64 cm de altura, com flores amarelas (AZEVEDO-GONÇALVES; MATZENBACHER, 2007) (Figura 3). Distribui-se na Europa, Região Mediterrânea e no Norte da África. Estudos recentes em populações do mediterrâneo revelaram semelhanças biogeográficas e no padrão de diversidade genética entre *H. glabra* e *H. radicata* e inferiram uma origem marroquina para as duas espécies. *Hypochaeris glabra* teria se dispersado primeiramente para a região norte do Rio Guadalquivir (sudoeste da Serra Morena, centro de Donana e sudeste da Espanha) e depois para toda a área de distribuição (ORTIZ et al., 2008).

Esta espécie foi introduzida no Brasil, sendo encontrada principalmente, nos estados de Rio Grande do Sul e Santa Catarina (AZEVEDO-GONÇALVES e MATZENBACHER, 2007; RUAS et al., 2005). Distribui-se também na Argentina, Uruguai e Chile (BORTIRI, 1999, CABRERA et al., 2000). Na América do Sul, esta espécie habita campo sujo, praças, ruas, barrancos, local alterado, borda de mata e beira de estradas. Floresce nos meses de setembro a novembro e frutifica em novembro (AZEVEDO-GONÇALVES; MATZENBACHER, 2007).

Estudos cromossômicos em *H. glabra* mostram que a espécie possui cariótipo simétrico, com citótipos  $2n = 10$  (6 cromossomos metacêntricos, 2 submetacêntricos e dois submetacêntrico com satélite) e  $2n = 8$  (4 cromossomos metacêntricos, 2 submetacêntricos e 2 metacêntricos com satélite). A região de rDNA 5S esta localizada no braço curto do cromossomo 4 e um único sítio de rDNA

45S, é localizado em posição terminal no braço curto do cromossomo 2 (CERBAH; COULAUD; SILJAK-YAKOVLEV, 1998; RUAS et al., 1995, 2005; TREMETSBERGER et al., 2004).

#### 2.3.8 *Hypochaeris tenuifolia*

Trata-se de uma espécie herbácea rizomatosa de 10 a 15 centímetros de altura, com flores amarelo-alaranjadas polinizadas por insetos. Ocorre em picos vulcânicos no sul dos Andes, também cresce em topos de montanhas de solo fino de origem vulcânica, misturada com rochas siliciosas em vegetação altoandina. Também é encontrada em regiões mais baixas e floresta. Distribui-se principalmente nos Andes do Chile e Argentina (TREMETSBERGER et al., 2003a).

A espécie é normalmente diplóide, com  $2n = 8$ , com ocorrência ocasional de tetraploidia (WEISS et al., 2003). De acordo com características de citogenéticas de localização de rDNA pertence ao grupo Tenuifolia com dois sítios intersticiais de rDNA 35S que formam constrição secundária no braço curto do cromossomo 3 (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007). Sequências de *rt-copia* isoladas desta espécie foram analisadas por Ruas e colaboradores (2008).

### 3 JUSTIFICATIVA

O gênero *Hypochoeris* (Asteraceae) possui características que fazem dele um excelente modelo para investigações que visam análise da evolução do genoma, estrutura cariotípica, padrões de especiação, biogeografia e radiação adaptativa recente (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2008; STUESSY et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005).

Os estudos sobre comportamento e evolução dos retrotransposons mostram que estes são excelentes marcadores para experimentos que combinam métodos genéticos, moleculares e citogenéticos, incluindo hibridação *in situ*, possibilitando uma melhor compreensão sobre a contribuição destes elementos para organização e evolução genômica em plantas. Em nossa recente investigação, sobre a distribuição de retrotransposons do grupo Ty1-*copia* em 20 espécies sul-americanas e duas espécies européias de *Hypochoeris*, constatamos uma variação considerável nas sequências do gene da rt (transcriptase reversa) tanto dentro como entre espécies, sugerindo que os elementos do grupo Ty1-*copia* têm uma contribuição significativa na evolução dos genomas do grupo. Entretanto, nosso conhecimento é ainda limitado em relação à participação efetiva dos retrotransposons, no processo de especiação das espécies sul-americanas de *Hypochoeris*. Estudos de caracterização, análise de diversidade e distribuição de retrotransposons dos grupos Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy*, precisam ser estendidos para outras espécies do gênero *Hypochoeris*, para permitir inferências significativas sobre a dinâmica dos retroelementos e o seu papel no processo evolutivo de *Hypochoeris*.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar sequências parciais do gene da transcriptase reversa de retrotransposons Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy* e analisar a diversidade das famílias destes dois grupos de retroelementos, no genoma de espécies do gênero *Hypochoeris*, e analisar os padrões de dispersão de elementos Ty3-*gypsy* nos cromossomos de *H. chillensis*, de modo a contribuir para compreensão dos mecanismos de evolução genômica e cariotípica do gênero *Hypochoeris*, bem como para a análise da dinâmica dos retrotransposons e seu papel no processo evolutivo de espécies de plantas.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizar *primers* degenerados para amplificação via PCR, de região do gene da transcriptase reversa (rt) de retrotransposons dos grupos Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy*, em espécies de *Hypochoeris*;

Obter *primers* sem degeneração para domínios conservados do mesmo gene rt de Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy* para espécies de *Hypochoeris*;

Analisar as sequências dos retrotransposons e construir árvores filogenéticas que permitam discussão sobre a evolução e diversificação dos retrotransposons Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy* em *Hypochoeris*;

Investigar a distribuição física e organização dos retroelementos Ty3-*gypsy* em cromossomos metafásicos da espécie *H. chillensis* por meio de experimentos de hibridação fluorescente *in situ*;

Relacionar os resultados com os dados obtidos para outras espécies dentro de um contexto filogenético e usá-los para o entendimento sobre a importância desses elementos na organização genômica e cariotípica de *Hypochoeris*.

## 5 CAPÍTULO 1

### **Caracterização e distribuição de retrotransposons Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy* nos cromossomos de espécies do gênero *Hypochoeris* (Asteraceae)**

Artigo será submetido à revista Genetica

### **Caracterização e distribuição de retrotransposons Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy* nos cromossomos de quatro espécies do gênero *Hypochoeris* (Asteraceae)**

Diana C. L. Farias-Missão<sup>1</sup>, Claudete F. Ruas<sup>2\*</sup>

#### **ABSTRACT**

The genus *Hypochoeris* (Asteraceae) displays a disjunct distribution, in the Mediterranean region and in South America. The primary center of morphological, cytological, molecular, and taxonomic diversity of the genus is in the Mediterranean region with 15 known species, while a larger concentration of about 50 equally morphologically diverse species occurs in South America. Retrotransposons represent a group of dispersed repetitive DNA that are very abundant in plant genomes and their diversity, organization and chromosomes distribution, play important roles on genome evolution. To understand the mechanisms of genomic and karyotype evolution in *Hypochoeris* and to investigate the contribution of the retrotransposons in the evolutionary processes of the genus we isolate and characterize fragments of the reverse transcriptase (rt) gene of the LTR group retrotransposons, Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy*. Using universal degenerate and undegenerated *primers*, fragments of the rt gene were isolated by PCR and characterized for eight *Hypochoeris* species, including six from South America, one of Mediterranean origin and *H. angustifolia*, sister of the South American group of species. The numbers of sequences were 96 and 106, for Ty1-*copia* and Ty3-*gypsy*, respectively. The two groups of retroelements were highly heterogeneous both, within and between of species. Nevertheless, the level of heterogeneity was higher for Ty1-*copia*, possible because the Ty3-*gypsy* elements have evolved more recently in *Hypochoeris*. A positive correlation was observed between sequence heterogeneity of the Ty-*copia* elements and genome size for the South American species. The physical distribution of the Ty3-*gypsy* retrotransposon was determined for *H. chillensis* from South America using fluorescent *in situ* hybridization (FISH).

---

<sup>1</sup> Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade

\* Autor para correspondência: Claudete de Fátima Ruas ruas@uel.br

Telefone: 55 43 33714417

The Ty3-*gypsy* elements were found dispersed along all chromosomes, with a higher concentration on large arms of chromosome pairs 3 and 4, besides strong signals at pericentromeric region and adjacent to the secondary constriction on large arms of chromosome pair 2. The present results suggest that Ty1- *copia* and Ty3-*gypsy* retrotransposons have evolved different and independently in the genus *Hypochaeris*.

**Keywords:** Retrotransposons Ty1-*copia* and Ty3-*gypsy*. *Hypochaeris*. rt gene. Genome evolution. *in situ* hybridization.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Hypochaeris* L. (Asteraceae) é representado por um grupo de plantas herbáceas de distribuição bicontinental, tendo como centro de origem o velho continente, com 15 espécies distribuídas entre os países da Europa, região mediterrânea e Ásia. Entretanto, a maioria de suas espécies (mais de 50) é encontrada no continente sul-americano, considerado como centro secundário de diversificação (Stebbins 1971; Cerbah et al. 1998a; Ruas et al. 1995, 2005; Samuel et al. 2003; Stuessy et al. 2003; Weiss et al. 2003; Tremetsberger et al. 2005).

Assim como em outros grupos de plantas, a história evolutiva do gênero *Hypochaeris* tem um modelo de distribuição associado a eventos de dispersão a longa distância. Neste modelo, sugere-se que a dispersão e diversificação do gênero na América do Sul se deu a partir de uma ou poucas introduções, a cerca de 0,25 a 1 milhão de anos, com uma radiação morfológica explosiva e paralela em diferentes ambientes (Cerbah et al. 1998b; Samuel et al. 2003; Stuessy et al. 2003; Tremetsberger et al. 2005, 2006). Estudos recentes (Tremetsberger et al. 2006) sugerem que *H. angustifolia*, uma espécie endêmica do Marrocos, é co-irmã do grupo sul-americano. Os dois grupos apresentam características morfológicas, filogenéticas e cariotípicas distintas, com as espécies euroasiáticas apresentando cariótipos simétricos e com números básicos distintos ( $x = 3, 4, 5, \text{ e } 6$ ), enquanto as espécies sul-americanas mostram cariótipos altamente assimétricos e bimodais associados a um único número básico (Stebbins 1971; Cerbah et al. 1998a; Ruas et al. 1995, 2005; Weiss-Schneeweiss et al. 2007, 2008; Ortiz et al. 2009). Os padrões de distribuição, bem como as características cariotípicas de *Hypochaeris* o tornam um excelente modelo para estudos de radiação adaptativa e padrões de especiação, evolução do genoma, estrutura

cromossômica e biogeografia (Stuessy et al. 2003; Tremetsberger et al. 2005; Weiss-Schneeweiss et al. 2008).

Os retrotransposons compõem um grupo de DNA repetitivo disperso, com capacidade de transposição por transcrição reversa, amplamente distribuídos em genomas de plantas e animais (Flavell et al. 1992; Kumar et al. 1997; Mccarthy et al. 2002; Hill et al. 2005; Biémont e Vieira 2006; Ambroz'ova' et al. 2011). São considerados importantes contribuintes para evolução do genoma, devido as suas implicações em eventos de mutação, reorganização da estrutura cromossômica, aumento do conteúdo de DNA e interrupção de funções gênicas (Kumar 1996; Kumar et al. 1997; Bennetzen 2000; Navarro-Quezada e Schoen 2002; Biémont e Vieira 2006; Mirouze e Paszkowski 2011). Estudos que demonstram expressão diferencial, tecido específica (Li et al. 2000; Biémont e Vieira 2006), além de inserção preferencial (Muotri et al. 2005) e regulação epigenética destes elementos, evidenciam algumas de suas funções no genoma (Lippman et al. 2004).

Os retrotransposons do grupo *Ty1-copia* e *Ty3-gypsy* contêm repetições terminais longas (LTR) e são distinguidos pela homologia de sequência e pela ordem dos genes (Flavell et al. 1992; Bennetzen 1996; Kumar 1996; Kumar e Bennetzen 1999; Matsunaga et al. 2002; Kalendar et al. 2010). Os retroelementos *Ty1-copia* e *Ty3-gypsy* são os maiores componentes do genoma de plantas e sua distribuição, organização cromossômica e diversidade, bem como sua implicação na evolução do genoma têm sido intensamente investigadas (Flavell et al. 1992; Hirochika e Hirochika 1993; Pearce et al. 1996; Brandes et al. 1997; Heslop-Harrison et al. 1997; Ruas et al. 2008; Ma et al. 2004; Natali et al. 2006; Fregonezi et al. 2007; Staton et al. 2009; Gaeta et al. 2010; Ambroz'ova' et al. 2011). Devido as suas características, os retrotransposons são considerados como excelentes marcadores para experimentos que combinam métodos genéticos, moleculares e citogenéticos (FISH), possibilitando detectar variação genética entre e dentro de espécies.

Experimentos de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com retrotransposons do grupo *Ty1-copia* em espécies européias e sul-americanas de *Hypochaeris*, revelaram diferenças significativas na distribuição cromossômica destes elementos entre os dois grupos de espécies. Em espécies européias os retroelementos analisados encontram-se distribuídos por todo o comprimento dos cromossomos, com exceção das regiões de DNA ribossômico e centrômeros. Nas espécies da América do Sul, os dois pares maiores de cromossomos mostraram-se

enriquecidos em Ty1-*copia*, enquanto os braços longos dos dois pares menores de cromossomos mostram-se desprovidos destes elementos. Os resultados sugerem que os retrotransposons Ty1-*copia* devem contribuir de forma expressiva na organização e evolução do gênero (Ruas et al. 2008).

Os retrotransposons Ty3-*gypsy* ainda não foram estudados no gênero *Hypochoeris*, mas têm sido caracterizados em vários organismos, como milho, sorgo, *Pinus radiata* e *Lilium henryi* (Kubis et al. 1998), *Manihot esculenta* (Gbadegesin e Beeching 2011), do gênero *Fritillaria* (Ambroz'ova' et al. 2011), do gênero *Vicia* (Hill et al. 2005), bem como em outras espécies das famílias Solanaceae (Fregonezi et al. 2007), Asteraceae (Natali et al. 2006), incluindo espécies do gênero *Helianthus* (Santini et al. 2002; Ungerer et al. 2009; Staton et al. 2009), e Leguminosae, *Copaifera langsdorffii* (Gaeta et al. 2010). Estes elementos têm mostrado distribuição predominantemente dispersa ao longo dos cromossomos (Natali et al. 2006), bem como pericentromérica (Staton et al. 2009) e centromérica (Natali et al. 2006), com sinais mais acentuados associados a regiões organizadoras de nucléolo (NORs) (Fregonezi et al. 2007). Ty3-*gypsy* têm sido também identificados associados a regiões ricas em GC e a fragmento de rDNA cloroplástico (Gaeta et al. 2010).

O presente trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar sequências parciais do gene da transcriptase reversa (rt) de retrotransposons dos grupos Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy* em espécies do gênero *Hypochoeris*, para analisar a diversidade destes retroelementos, assim como determinar a localização física de Ty3-*gypsy* nos cromossomos de *H. chillensis*. Os resultados obtidos poderão contribuir para a compreensão dos mecanismos de evolução genômica e cariotípica do gênero *Hypochoeris* e permitirão analisar a dinâmica dos retrotransposons e seu papel no processo evolutivo de espécies de plantas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Espécies de *Hypochoeris***

Foram objeto de estudo as espécies *H. glabra*, representante do grupo mediterrâneo, *H. angustifolia*, originária do Marrocos e considerada como co-irmã do grupo sul-americano (Tabela 1). Seis espécies nativas da América do Sul

foram incluídas no estudo, quatro delas (*H. albiflora*, *H. catharinensis*, *H. chillensis*, *H. microcephala*) pertencentes à flora brasileira. As outras duas espécies, *H. elata* (WU: 18506; TS, KT, RH) e *H. tenuifolia* (WU: 18025; TS, EU, KT) foram obtidas de coleções mantidas no Instituto de Botânica da Universidade de Viena, Áustria, assim como as espécies *H. angustifolia* (WU: 693/03 M; ST) e *H. microcephala* (WU: 160 EU, KT) (Ruas et al. 2008).

A amostragem das espécies *H. glabra*, *H. albiflora* e *H. chillensis* foi realizada a partir de coletas de sementes, germinação e cultivo das plantas em casa de vegetação. Devido à dificuldade na germinação de sementes, exemplares de indivíduos adultos de *H. catharinensis* foram coletados nas áreas de ocorrência da espécie e também cultivados em casa de vegetação. Os espécimes cultivados foram utilizados para preparações cromossômicas e extração de DNA. Exemplares de cada espécie foram depositados no herbário FUEL da Universidade Estadual de Londrina (Tabela 1).

**Tabela 1** - Informações gerais de quatro espécies estudadas: local de coleta, número de coleção no herbário FUEL e coordenadas.

<b>Espécies</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Coordenada</b>
<i>H. albiflora</i>	Porto Alegre (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), RS (FUEL48677)	30° 01' S 51° 13' O
<i>H. catharinensis</i>	Rancho Queimado, SC <sup>1,2</sup> (FUEL40656)	27° 41' S 49° 01' O
<i>H. chillensis</i>	Guaíba (Fazenda São Maximiliano), RS <sup>1,2</sup> (FUEL48683)	30° 06' S 51° 19' O
<i>H. chillensis</i>	Lages (Rodovia entre São José do Cerrito e Campos Novos), SC <sup>1,2</sup> (FUEL48681)	27° 48' S 50° 19' O
<i>H. glabra</i>	Capão da Canoa, RS <sup>3</sup> (FUEL42243)	29° 45' S 50° 00' O

Coletores: <sup>1</sup> Ruas, CF; <sup>2</sup> Ruas, PM; <sup>3</sup> Matzenbacher, NI.  
FUEL – Herbário da Universidade Estadual de Londrina.

## **METODOLOGIA**

### **Extração de DNA e condições da PCR**

A extração de DNA das espécies sul-americanas e de *H. glabra* foi realizada a partir de folhas jovens, seguindo o protocolo descrito por Ruas et al.

(2008). As amostras de DNA de *H. angustifolia*, *H. elata*, *H. microcephala* e *H. tenuifolia* foram obtidas de coleções mantidos na Universidade de Viena, Áustria (ver Ruas et al. 2008). Para avaliar a integridade do DNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, por 45 minutos a uma tensão de 90V, seguida de coloração com brometo de etídio (10 µg/mL). As amostras foram quantificadas em fluorímetro (DyNA Quant 200, Höffer-Pharmacia) e diluídas para 20ng/uL.

As reações de PCR foram realizadas e otimizadas, com amostras de DNA das espécies, usando *primers* universais, desenvolvidos para domínios conservados dos genes *rt* de retrotransposons Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy* (Flavell et al. 1992). Foram também utilizados *primers* sem degeneração, desenhados especificamente para o gênero *Hypochoaeris*, a partir da análise da frequência dos nucleotídeos na região de pareamento dos *primers*. Para este fim, foram utilizadas sequências obtidas previamente, com uso de *primers* degenerados, de elementos Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy* de *H. catharinensis*. O uso de *primers* sem degeneração teve por finalidade facilitar a amplificação destes retroelementos em outras espécies do gênero.

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador utilizando programa *touch down*, segundo Ruas et al. (2008). Para maior especificidade, as reações de amplificação foram realizadas em duas etapas. Na primeira reação foram utilizados 12,5 µL de *GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix* (*GoTaq<sup>®</sup>* DNA polimerase; tampão 2x, pH 8,5; 1600 µM dNTP e 3mM MgCl, Promega), 5 µL de cada *primer* (5 pM), 2 µL (20 ng/µL) de DNA e 0,5 µL de água esterilizada, para um volume final de 25 µL. Na segunda reação foram utilizados 25 µL de *GoTaq Green Master Mix*, 10 µL de cada *primer* (5 pM) e 4 µL do produto da primeira reação, completando com 1 µL de água esterilizada para um volume final de 50 µL. Os produtos da segunda reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídeo (10 µg/mL). As bandas obtidas foram purificadas utilizando *Pure Link Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen).

Os produtos de PCR purificados foram ligados em vetor usando o kit *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector* (Promega) utilizando 2 µL do produto de reação, 10 µL 2X tampão de ligação, 1 µL de T4 DNA ligase, 1 µL do vetor e 6 µL de água esterilizada. A reação de ligação foi incubada a 4° C overnight e utilizada para transformação em bactérias competentes (*Escherichia coli*, cepa JM 109, Promega),

que foram semeadas em meio seletivo LB ágar, contendo 50  $\mu\text{L}$  de IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) e 30  $\mu\text{L}$  de X-gal (bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside) e incubadas a 37° C por 16-18 horas. Para a manutenção das bibliotecas de retrotransposons, as colônias brancas (positivas) foram selecionadas, semeadas em meio líquido 2YT-10HMF, incubadas a 37° C por 18 horas e mantidas a - 80° C até o uso. As reações de sequenciamento foram realizadas a partir de uma alíquota de 6 $\mu\text{L}$  de cada colônia diluída em 14  $\mu\text{L}$  de tampão TE (0,5 mM, pH 8,0) e incubada em termociclador a 99°C por 5 minutos. Estas amostras foram em seguida utilizadas em reação de PCR com *primers* universais M13 direto e reverso para amplificação dos insertos. O produto de amplificação foi purificado utilizando o Kit PCR PureLink™ (Invitrogen) ou, alternativamente, usando o kit ExoSAP-IT (Affymetrix) com incubação das amostras a 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), submetidas à eletroforese por 45 minutos e em seguida, submetidas à reação de sequenciamento com o *primer* universal M13 em uma única direção (forward).

### **Análise de sequências, alinhamento e filogenia**

As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com outras depositadas em banco de dados, utilizando a ferramenta blastn (NCBI, Altschul et al. 1990). Uma vez identificadas como fragmentos parciais de domínios conservados dos genes *rt-copia* e *-gypsy*, as sequências foram nomeadas com a abreviatura do nome da espécie da qual foi isolada, seguida do tipo nome do retrotransposon, isto é, *co* para Ty1-*copia* e *gy* para Ty3-*gypsy*, seguido do número da sequência (Tabela 2). As sequências foram então alinhadas utilizando o programa Bioedit versão 7.0.5.3 (Hall 1999). Quando necessário, foram introduzidos *gaps* para manter as *open reading frames* (quadros abertos de leitura).

O parâmetro diversidade nucleotídica Pi ( $\pi$ ) foi calculado para cada conjunto de sequências, incluindo a região de pareamento dos *primers*, utilizando programa DnaSP 5.10.01 (Librado e Rozas 2009). Os valores de diversidade de nucleotídeos foram usados para cálculo de correlação com o conteúdo de DNA (2C) das espécies. Para esse cálculo foram usados dados de conteúdo de DNA descritos previamente (Cerbah et al 1999, Ruas et al 2008), enquanto as medidas não

disponíveis (espécies *H. albiflora*, *H. catharinensis* e *H. glabra*) foram realizadas por citometria de fluxo, com a colaboração de Dr. Lyderson Facio Viccini e Dr. José Marcello Salabert de Campos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG.

A análise filogenética das sequências foi realizada por meio do software Mega 4 (Tamura et al. 2007). Deleções par a par para dados perdidos, representadas por *gaps* introduzidos nas sequências, foram usadas para computar a matriz de distância, enquanto a análise genética foi realizada por meio do método de *Neighbor joining* com *p*-distances e o suporte nodal foi acessado via *bootstrapping* usando 1000 repetições.

### **Preparações cromossômicas e hibridação *in situ* fluorescente (FISH)**

A técnica de FISH com sonda de retrotransposons Ty3-*gypsy* foi usada para comparar com resultados já disponíveis na literatura, sobre a distribuição de retrotransposons Ty1-*copia* em *Hypochoeris* (Ruas et al. 2008). Para as preparações cromossômicas, foram usados meristemas radiculares de plantas de *H. chillensis*, cultivadas em casa de vegetação. As raízes foram pré-tratadas com solução saturada de 8-hidroxiquinoleína (0,02g em 100 mL de água destilada) por 3:30 horas a 8°C, fixadas em solução de 3 etanol : 1 ácido acético (v:v) por 24 horas e armazenadas a -20°C até a preparação das lâminas. As lâminas foram preparadas após digestão enzimática dos meristemas em mistura de celulase (4%) e pectinase (40%) a 37°C por 50 minutos.

O FISH foi realizado usando como sonda o clone pHchgy6, representante do retrotransposon Ty3-*gypsy* isolado da espécie *H. chillensis*. Este clone foi amplificado via PCR, com o *primers* M13 direto e reverso, e marcado por *Nick translation* utilizando Kit *Digoxigenin-11-dUTP* (Life Technologies). As preparações tratadas com RNase (100µg/µL) por 1:30 horas foram hibridizadas de acordo com protocolo de Cuadrado e Jouve (1994), detectadas usando antidigoxigenin-Rhodamina (Roche) e contra-coradas com DAPI (4, 6-diamidinophenylindole). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51, equipado com sistema de captura digital Evolution MT CCD, e a análise das imagens foi feita com o software Image ProPlus v6 (Media Cybernetics, Inc.).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização e heterogeneidade de sequências rt de Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy*

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para amplificação de domínios conservados dos genes da transcriptase reversa (rt) de retrotransposons do grupo LTR (Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy*) em espécies do gênero *Hypochoeris*. *Primers* degenerados, desenvolvidos para gerar sequências em outros grupos de plantas superiores (Flavell et al. 1992) amplificaram fragmentos de rt-*copia* em *H. albiflora*, *H. catharinensis*, *H. chillensis* e *H. glabra*, e de rt-*gypsy* também em *H. catharinensis* e *H. chillensis* e em outras quatro espécies do gênero (*H. angustifolia*, *H. elata*, *H. microcephala* e *H. tenuifolia*). Posteriormente, foram utilizados *primers* sem degenerações (Tabela 2) para amplificação de fragmentos rt-*gypsy* nas espécies *H. albiflora*, *H. catharinensis* e *H. chillensis* (Tabela 3).

**Tabela 2** - Características dos *primers* sem degenerações construídos para regiões conservadas dos genes da transcriptase reversa de Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy*.

	<i>Primers</i> sem degenerações	T <sub>A</sub>	Fragmento amplificado (pb)
<b>Ty1-<i>copia</i></b>	HCoRTD:5'TACGTAGACGACATGCTT3'	48	300
	HCoRTR: 5'ACGGCGTTTTTTCATGG3'		
<b>Ty3-<i>gypsy</i></b>	HGyRT1b: 5'AGGATGTGTGTTGATTATC3'	48	270 - 302
	HGyRT4b: 5'TATGCCAAACTCCAAAT3'		

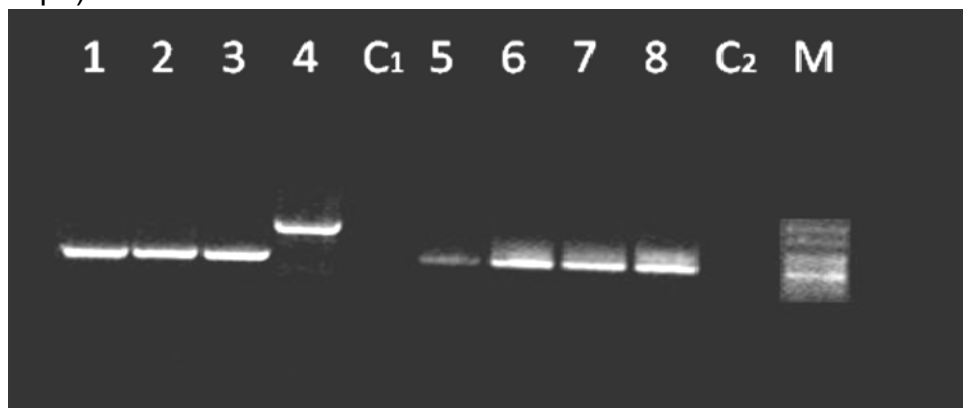
T<sub>A</sub> = temperatura de pareamento em °Celsius.

Os produtos de amplificação apresentaram tamanhos de aproximadamente 300 pb, conforme esperado para domínios conservados do gene rt, tanto de Ty1-*copia* quanto de Ty3-*gypsy* (Figura 1). Os fragmentos amplificados foram clonados, gerando bibliotecas de retrotransposons, contendo 202 e 320 clones com insertos dos genes rt-*copia* e rt-*gypsy*, respectivamente. Destas bibliotecas, foram selecionados e sequenciados 112 clones rt-*copia* e 234 clones rt-*gypsy*, sendo que 96 (85,71%) e 106 (45,3%) apresentaram identidade com uma região parcial do gene da transcriptase reversa dos retrotransposons Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy*, respectivamente. Estes fragmentos foram selecionados para posterior

análise e as sequências *rt-copia* e *rt-gypsy* foram depositadas no banco de dados Genbank. Os números de acesso são mostrados na Tabela 3.

Comparando o número de fragmentos sequenciados e o número de sequências que apresentaram identidade com o domínio do gene *rt* dos retrotransposons *Ty1-copia* (85,7%) e *Ty3-gypsy* (36%), considera-se a obtenção dos amplicons como eficiente, visto que, por se tratarem de regiões altamente heterogêneas, frequentemente existem dificuldades na amplificação. Tem sido verificado que, além das sequências desejadas, ocorre também amplificação de outros retroelementos, transposons e não-transposons (Gbadegesin e Beeching 2011). A maior eficiência observada na obtenção dos elementos *rt-copia* pode ser explicada por uma provável maior representatividade destes elementos no genoma de *Hypochaeris*, como demonstrado para espécies da subfamília *Bambusoideae* (Zhou et al. 2010).

**Figura 1** - Produto de amplificação em gel de agarose 1% mostrando: 1- 4: bandas contendo fragmentos *rt-gypsy* isolados das espécies *H. albiflora*, *H. catharinensis*, *H. chillensis* e *H. glabra*, respectivamente, utilizando *primers* sem degenerações; 5-8 bandas com fragmentos *rt-copia* isolados das espécies *H. albiflora*, *H. catharinensis*, *H. chillensis* e *H. glabra*, respectivamente. C1 e C2: controles da reação. M: marcador de peso molecular 50pb (a banda mais forte corresponde a um fragmento de 250pb).



Comparando o número de fragmentos *rt-gypsy* sequenciados com a porcentagem de sequências obtidas com *primers* degenerados (36%) e sem degenerações (62%), demonstra-se que os problemas de amplificação com *primers* universais derivam das grandes variações nas regiões de pareamento entre diferentes espécies (Tabela 3). Friesen et al. (2001) evidenciam também a

dificuldade de amplificação de elementos Ty3-*gypsy* com uso de *primers* degenerados, devido a diversidade do elemento.

**Tabela 3** -Produtos de amplificação obtidos a partir de *primers* para retroelementos dos grupos Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy* em espécies representantes do gênero *Hypochaeris*.

Espécie / retroelemento	<i>Primers</i> degenerados		<i>Primers</i> sem degenerações	
	Número de clones sequenciados e identificados ( ) como Ty1- <i>copia</i>	Número de clones sequenciados e identificados ( ) como Ty3- <i>gypsy</i>	Número de clones sequenciados e identificados ( ) como Ty3- <i>gypsy</i>	Número de acesso no Genbank rt- <i>copia</i> / rt- <i>gypsy</i>
<i>H. albiflora</i>	32 (29) pHalco 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 31	-	15 (08) pHalgy 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9	JQ399868- JQ399896 /JQ417733 - JQ417740
<i>H. angustifolia</i>	-	25 (11) pHangy 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	-	JQ417762- JQ417772
<i>H. catharinensis</i>	29 (25) pHcaco 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	25 (13) pHcagy 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42	30 (26) pHcagy 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	JQ417773- JQ417797/ JQ411601- JQ411640
<i>H. chillensis</i>	25 (22) pHhco 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22	25 (9) pHhgy 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	20 (18) pHhgy 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	JQ417798- JQ417819/
<i>H. elata</i>	-	25 (8) pHelgy 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	-	JQ417741- JQ417748
<i>H. glabra</i>	26 (20) pHglco 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	-	19 (-)	JQ417820- JQ417839
<i>H. microcephala</i>	-	25 (7) pHmiggy 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	-	JQ417749- JQ417755
<i>H. tenuifolia</i>	-	25 (6) pHtegy 1, 2, 3, 4, 5, 6	-	JQ417756- JQ417761
<b>Total</b>	<b>112 (96)</b>	<b>150 (54)</b>	<b>84 (52)</b>	

Das 96 sequências rt-*copia* selecionadas para análise, 80,4% apresentou maior identidade com estas mesmas sequências, isoladas de outras espécies do gênero *Hypochaeris* e depositadas no Genbank (Ruas et al. 2008).

Outras sequências (19,6%) apresentaram maior identidade com a mesma região *rt-copia*, porém, identificadas em outros grupos de plantas pertencentes a diferentes famílias, como Orobanchaceae, Amarantaceae, Berberidaceae, Malvaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae e espécies do gênero *Helianthus* e *Eleocharis* da família Asteraceae (Blast-NCBI).

As sequências de *rt-gypsy* analisadas apresentaram mais de 70% de identidade com outras sequências parciais, depositadas no Genbank, referentes ao gene *rt* do retrotransposon Ty3-*gypsy*, isoladas dos gêneros *Eleocharis* (*E. Palustris*) e *Helianthus*, como *H. annuus*, *H. petiolares*, *H. paradoxus*, *H. anomalus* e *H. deserticola* (ambos da família Asteraceae). O grau de cobertura de consulta variou de 58% (pHalgy9) a mais de 90% para a maioria das sequências.

A análise das sequências foi realizada separadamente para os dois grupos, Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy*, para determinar o grau de heterogeneidade de cada elemento entre e dentro de espécies bem como entre sequências de cada grupo. Os resultados mostraram que os elementos Ty1-*copia* são altamente heterogêneos, conforme reportado em estudos com outros grupos de plantas como, do gênero *Hypochoeris* (Ruas et al. 2008), em *Malus domestica* (Sun et al. 2008), *Prunus mume* (Wang et al. 2010), e em espécies da subfamília Bambusoidea (Zhou et al. 2010). Estes dados sugerem que a alta heterogeneidade é uma característica das regiões do gene *rt* em retrotransposon Ty1-*copia*. O tamanho dos fragmentos *rt-copia* variou de 138pb (pHchco6) a 267pb (9,37% dos fragmentos), sendo 65,6% das sequências compostas por fragmentos de 264pb e são similares aos tamanhos encontrados por Ruas et al. (2008) em outras espécies de *Hypochoeris*. O tamanho das sequências *rt-gypsy* variou de 270pb (pHcagy40) a 302pb (pHcagy5), sendo que 43,4% delas apresentaram 300pb, 30,2% apresentaram 297pb e 9,43%, 295pb.

Do total de 96 sequências *rt-copia* analisadas (Tabela 3), 12 (11,5%) contêm *stop* códons, 19 (18,2%) contêm quadro de leitura interrompido e duas (1,9%) sequências contêm tanto *stop* códons quanto quadro de leitura interrompido. Destes resultados conclui-se que a maioria das sequências (68,4%) *rt-copia* analisadas apresentam quadros de leitura adequados e podem ser parte de genes para transcriptase reversa potencialmente funcionais. Elevada porcentagem (81,6%) de genes *rt* potencialmente funcionais, também foi encontrado nas sequências de Ty1-*copia* isoladas de espécies do gênero *Hypochoeris* (Ruas et al. 2008). Em *Malus domestica* (Sun et al. 2008) *Prunus mume* (Wang et al. 2010) e espécies da

subfamília Bambusoidea (Zhou et al. 2010) foram encontradas, respectivamente, 65%, 67,7% e 75% de sequências *rt-copia* que podem fazer parte de genes potencialmente funcionais.

Das sequências *rt-gypsy* analisadas, todas apresentaram *stop* códons e/ou quadros de leitura interrompidos, sugerindo que os retrotransposons Ty3-*gypsy* têm menor capacidade de transposição autônoma, quando comparado com os elementos Ty1-*copia*. Análise de sequências *rt-gypsy* de *Helianthus petiolaris* e *H. deserticola* mostrou que 20% e 42%, respectivamente, possuem inserções/deleções e/ou *stop* códons prematuros (Ungerer et al. 2009), enquanto em *Malus domestica* (Sun et al. 2008) e *Prunus mume* (Wang et al. 2010) foram encontrados *stop* códons em 63% e 27,5% das sequências, respectivamente. Estudos experimentais com PCR em tempo real (RT-PCR) na espécie *Prunus mume*, mostraram que a ausência de *stop* códons e quadros de leitura interrompidos no genoma da espécie não indicam, necessariamente, que sequências *rt-copia* potencialmente funcionais mantenham atividade transcricional (Wang et al. 2010).

A diversidade nucleotídica (Pi), calculada para os fragmentos *rt-copia* foi similar para as quatro espécies investigadas, com valores de 0,421, 0,40 e 0,443, respectivamente, para as três espécies sul-americanas (*H. albiflora*, *H. catharinensis* e *H. chillensis*) e de 0,437, para espécie mediterrânea, *H. glabra* (Tabela 4). De acordo com Ruas et al. (2008), espécies com altos valores de diversidade nucleotídica, encaixam-se no grupo de espécies com alta heterogeneidade de sequência, onde estão presentes as espécies sul-americanas *H. microcephala*, *H. spathulata* e *H. tenuifolia*. A média de diversidade par a par entre as sequências destas espécies foi também similar, com variação pouco mais elevada nas sequências de *H. glabra* (0 a 63,1) (Tabela 5).

**Tabela 4** -Dados de sequências dos dois retroelementos analisados para as espécies estudadas.

	Número de sequências analisadas		Diversidade nucleotídica Pi ( $\pi$ )		Conteúdo de DNA (2C) <sup>c</sup> em pg
	Ty1- <i>copia</i>	Ty3- <i>gypsy</i>	Ty1- <i>copia</i>	Ty3- <i>gypsy</i>	
<i>H. albiflora</i>	29	8	0,421	0,074	4,28
<i>H. angustifolia</i>	38*	11	0,229*	0,266	5.81**
<i>H. catharinensis</i>	25	39	0,394	0,171	4,62
<i>H. chillensis</i>	22	27	0,443	0,131	5,45**
<i>H. elata</i>	20*	8	0,373*	0,189	4.11**
<i>H. glabra</i>	20	-	0,437	-	3,06
<i>H. microcephala</i>	20*	7	0,406*	0,201	4.85**
<i>H. tenuifolia</i>	21*	6	0,406*	0,230	5.91**

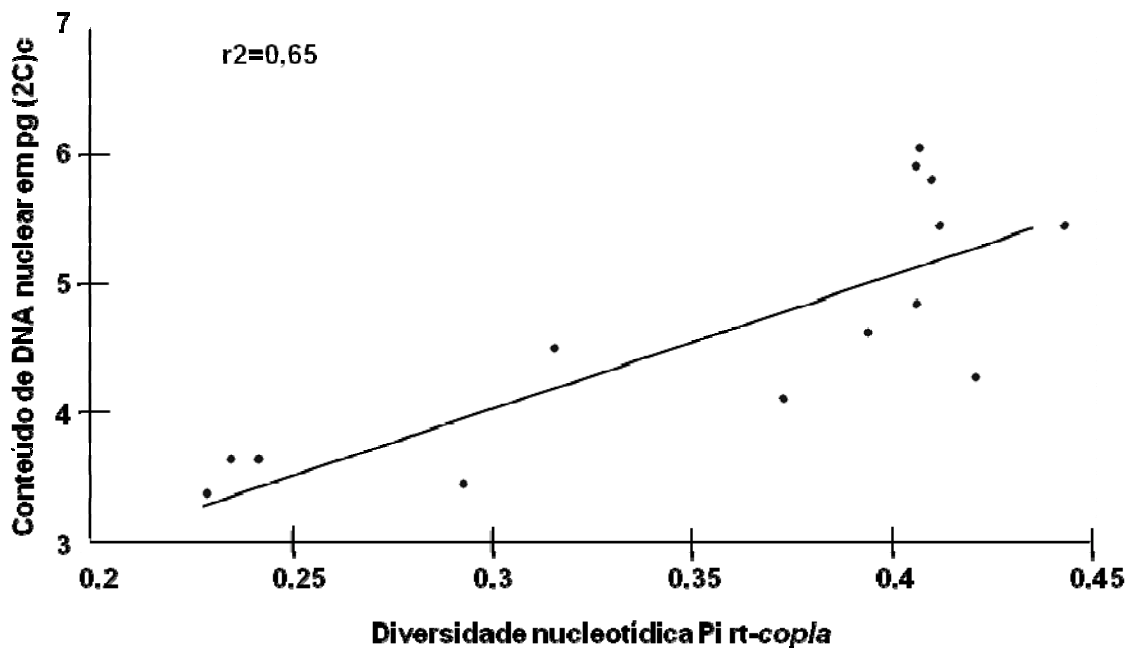
\*, \*\* dados extraídos de Ruas et al (2008).

Nossas estimativas de quantidade de DNA para as espécies analisadas mostraram valores variando de baixo (3,06 pg  $\pm$  0,02), para *H. glabra*, a alto (4,62 pg  $\pm$  0,01), para *H. catharinensis* (Tabela 4). Os dados de diversidade nucleotídica dos fragmentos *rt-copia* e conteúdo de DNA foram comparados aos dados de *H. angustifolia* e de outras dez espécies sul-americanas descritos por Ruas et al. (2008), para verificar uma possível correlação entre a diversidade nucleotídica (Pi) e tamanho do genoma. Estes parâmetros, analisados por meio do teste de correlação linear de Pearson (Figura 2), mostraram uma correlação positiva, considerada de moderada a forte com  $r = 0,8$  ( $r^2=0,65$ ). Estes resultados reforçam a idéia de que, no gênero *Hypochaeris*, quanto maior o tamanho do genoma, maior a heterogeneidade nas sequências de retrotransposons Ty1-*copia*, conforme sugerido previamente no trabalho de Ruas et al. (2008). Uma situação interessante é verificada nos genomas de espécies do gênero *Fritillaria* (Liliaceae), também de distribuição bicontinental como *Hypochaeris*. Neste gênero ocorrem diferenças marcantes no tamanho dos genomas entre espécies, sendo que os genomas gigantes são compostos por famílias muito diversificadas de elementos transponíveis. Os autores sugerem que a obesidade dos genomas pode ser, em parte, determinada pelo fracasso nos mecanismos de remoção, que contrabalançam efetivamente a amplificação dos retrotransposons (Ambrozˇova´ et al. 2011). Por outro lado, estudos com espécies de *Vicia* (Fabacea), revelaram correlação positiva

entre diversidade nucleotídica de fragmentos *rt-copia* e número de sequências, mas ausência de correlação entre o grau de heterogeneidade e conteúdo de DNA (Pearce et al. 1996).

Em contraste ao que foi observado para os fragmentos *rt-copia*, o grau de heterogeneidade foi consideravelmente mais baixo para os fragmentos *rt-gypsy*. Estes resultados foram similares aos observados em outras espécies como *Malus domestica* (Sun et al. 2008) e *Prunus mume* (Wang et al. 2010) e contrastam com o alto grau de heterogeneidade encontrado para os fragmentos *rt-gypsy* isoladas do genoma de *Manihot esculenta* Crantz da família Euphorbiaceae (Gbadegesin e Beeching 2011).

**Figura 2** - Correlação entre diversidade nucleotídica (Pi) de *rt-copia* e tamanho do genoma das espécies *H. albiflora*, *H. catharinensis* e *H. chillensis*, juntamente com *H. angustifolia* e dez espécies sul-americanas de Ruas et al. (2008).



A diversidade nucleotídica (Pi), calculada para os fragmentos *rt-gypsy*, de sete espécies analisadas (Tabela 4), foi maior nas sequências isoladas de *H. angustifolia* e menor nas de *H. albiflora*, assim como a diversidade de sequência par a par destas espécies (Tabela 5). Não foi possível constatar correlação entre diversidade nucleotídica Pi para as sequências *rt-gypsy* analisadas e o conteúdo de DNA das espécies. As sequências *rt-gypsy* analisadas tiveram menor diversidade de sequência par a par quando comparadas às sequências *rt-gypsy* isoladas de cinco

espécies de *Helianthus*, que variaram em até 60% para *H. deserticola* (Ungerer et al. 2009).

**Tabela 5** - Divergência par a par das sequências *rt-copia* e *rt-gypsy* e média de divergência das sequências dentro das espécies de *Hypochaeris* analisadas

	Sequências <i>rt-gypsy</i>		Sequências <i>rt-copia</i>	
	Variação na divergência par a par (%)	Divergência média dentro de espécie (%)	Variação na divergência par a par (%)	Divergência média dentro de espécie (%)
<i>H. albiflora</i>	0,7 a 14,2	7,4	0 a 60,6	42,6
<i>H. angustifolia</i>	7 a 35	26,7	-	-
<i>H. catharinensis</i>	0 a 35,2	16,8	2,7 a 53	40
<i>H. chillensis</i>	0 a 30,3	13,1	0 a 54,3	45,4
<i>H. elata</i>	0 a 30,7	18,9	-	-
<i>H. glabra</i>	-	-	0 a 63,1	43,7
<i>H. microcephala</i>	0 a 29,3	21,6	-	-
<i>H. tenuifolia</i>	0 a 34,5	23,1	-	-

### Análise filogenética

A análise filogenética realizada separadamente para cada conjunto de sequências, compreendendo 96 *rt-copia* e 106 *rt-gypsy*, mostrou níveis variáveis de divergência entre as sequências (Tabela 5). Entretanto, as sequências *rt-copia* apresentaram-se mais divergentes, tanto dentro como entre espécies. Os graus de divergência variaram de 42%, entre *H. albiflora* e *H. catharinensis*, a 48%, entre *H. albiflora* e *H. glabra*. Índices mais altos de divergência foram observados em sequências *rt-copia* entre espécies da família Bambusoidea (37,3 a 100%) (Zhou et al. 2010) e de gimnospermas (28,1 a 85,8%) (Friesen et al. 2001).

Análise das sequências *Ty3-gypsy* mostrou que estas são menos variáveis dentro de espécies que as *rt-copia* (Tabela 5). Comparando os graus de divergência das sequências *rt-gypsy* entre as espécies estudadas, nota-se que as sequências de *H. angustifolia* e de *H. elata* são as que mais divergiram (em média 24%) quando comparadas com as outras espécies. Em contrapartida, os menores valores de divergência de sequências *rt-gypsy* (14%) foram observadas entre as espécies *H. albiflora* e *H. catharinensis* e entre *H. albiflora* e *H. chillensis*. Índices mais altos de variação foram observados em fragmentos *rt-gypsy* de espécies de

gimnospermas tanto dentro (41,5 a 99%) quanto entre (37,7 a 99,4%) espécies (Friesen et al. 2001).

As matrizes de distância genética geradas para as sequências *rt-copia* e *rt-gypsy* foram utilizadas para obtenção de dendrogramas que mostram a relação entre os fragmentos. Os elementos *rt-copia* mostraram a formação de seis clusters, identificados como A, B, C, D, E e F, sendo cada cluster composto por um número variado de sequências com grau de heterogeneidade também variável (Figura 3). A análise dos clusters mostra que o grupo A (divergência média = 0,27) inclui 37 sequências, obtidas das três espécies sul-americanas, altamente variáveis (baixo bootstrap) das quais, duas sequências (pHchco1/pHchco3) são idênticas. Destas, 24 sequências foram associadas no subgrupo A1 com 100% de bootstrap (BS), incluindo 10 de *H. catharinensis*, quatro de *H. chillensis* e 10 de *H. albiflora* (Figura 2). Devido à alta similaridade entre as sequências deste subgrupo (divergência média = 0,14), é provável que estas pertençam a uma única família de Ty1-*copia*.

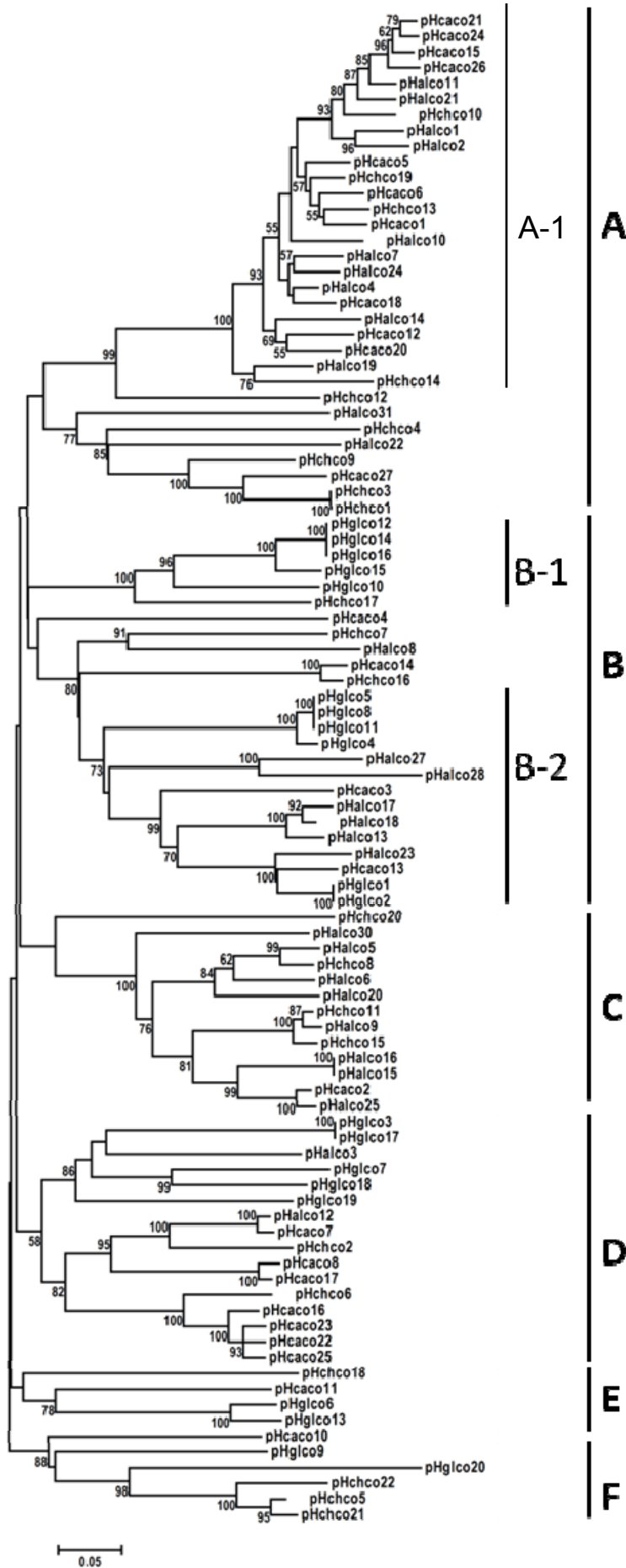
O cluster B associou 25 fragmentos isolados das quatro espécies, sendo 11 de *H. glabra* (55% das sequências isoladas desta espécie), três de *H. chillensis*, quatro de *H. catharinensis* e sete de *H. albiflora*. Devido à heterogeneidade das sequências o cluster B foi dividido em dois subgrupos, B1 e B2. As sequências do subgrupo B1 apresentam divergência média de 0,17 (100% BS) e inclui cinco sequências de *H. glabra*, sendo três (pHglco12, pHglco14 e pHglco16) idênticas e uma sequência de *H. chillensis* (pHchco17), que se mostra a mais divergente do subgrupo. O subgrupo B2 (BS 73%, divergência média de 0,29) agrupou 14 sequências, cinco de *H. albiflora*, duas de *H. catharinensis* e seis de *H. glabra*, sendo as sequências pHglco5, pHglco8 e pHglco11 e pHglco1 e pHglco2 idênticas entre si (Figura 3).

No cluster C, 13 fragmentos, pertencentes apenas a espécies sul-americanas, se associaram com divergência média de 0,25, sendo quatro sequências de *H. chillensis*, oito de *H. albiflora*, com duas delas (pHalco15, pHalco16) idênticas, e uma sequência de *H. catharinensis* (pHcaco2) bem similar (divergência 0,03) à sequência pHalco25 de *H. albiflora* (Figura 3). O grupo D é representado por 16 sequências (com divergência média de 0,33 e 58% BS), isoladas das quatro espécies analisadas, sendo cinco de *H. glabra* (pHglco3 e pHglco17 idênticas), duas de *H. albiflora*, sete de *H. catharinensis* e duas de *H.*

*chillensis*. Este grupo também possui sequências bastante similares (divergência de 0,03 entre pHcaco22, pHcaco23 e pHcaco25) e outras mais divergentes (Figura 3).

O cluster E inclui apenas quatro sequências agrupadas com baixo bootstrap e divergência média de 0,33. Duas sequências de *H. glabra* (pHglco6 e pHglco13) mostram divergência de apenas 0,07 enquanto as outras duas sequências (pHcaco13 e pHchco18) são mais divergentes. O cluster F (BS 88% e média de divergência de 0,31) associa seis sequências, três de *H. chillensis* (pHchco5, pHchco21 e pHchco22), que se agrupam com 100% de bootstrap, uma de *H. catharinensis* e duas de *H. glabra* (Figura 3).

Analisando as distâncias das sequências *rt-copia* entre os clusters, nota-se que D e E são os que menos divergiram entre si, com distância média das sequências entre os clusters = 0,43. O cluster F foi o que apresentou maior valor de distância de sequências *rt-copia* em relação ao cluster C e ao subgrupo B2 (distância média das sequências entre estes clusters = 0,51). Os clusters B e D apresentam sequências isoladas das quatro espécies estudadas. Enquanto os clusters A e C são representados apenas por sequências das espécies sul-americanas (Figura 3), o que concorda com a presença de um agrupamento específico para sequências *rt-copia*, isoladas também de espécies sul-americanas de *Hypochoeris*, nos resultados de Ruas et al. (2008). Estudos de retrotransposons Ty1-*copia* em espécies de gimnospermas mostram que sequências de uma mesma espécie ocorrem preferencialmente associadas em pequenos clados, mas podem também ser vistas sequências similares entre diferentes espécies (Friesen et al. 2001). Estes dados diferem daqueles encontrados para sequências de retrotransposon do grupo LINES em três espécies do gênero *Vicia*, as quais se mostraram altamente heterogêneas e distribuídas por toda árvore filogenética, sugerindo que uma população antiga e diversificada de elementos LINES tenha sobrevivido nas três espécies (Hill et al. 2005). Resultados de análise de sequências *rt-copia* e ITS em espécies de Bambusoideae revelaram incongruência filogenética, mostrando que espécies pertencentes a subtribos diferentes compartilham sequências Ty1-*copia* similares, enquanto, sequências *rt-copia* divergentes são encontradas em espécies da mesma subtribo. Estes dados indicam que os retroelementos Ty1-*copia* evoluíram em um padrão distinto e aparentemente sem relação com a classificação taxonômica destas espécies (Zhow et al. 2010).



**Figura 3** - Dendrograma construído a partir de 96 fragmentos parciais do gene da transcriptase reversa de retrotransposon *Ty1-copia* isolados de espécies de *Hypochoeris*. Valores de bootstrap (>50%) são mostrados acima ramos. Distância genética é indicada pela escala de barra.

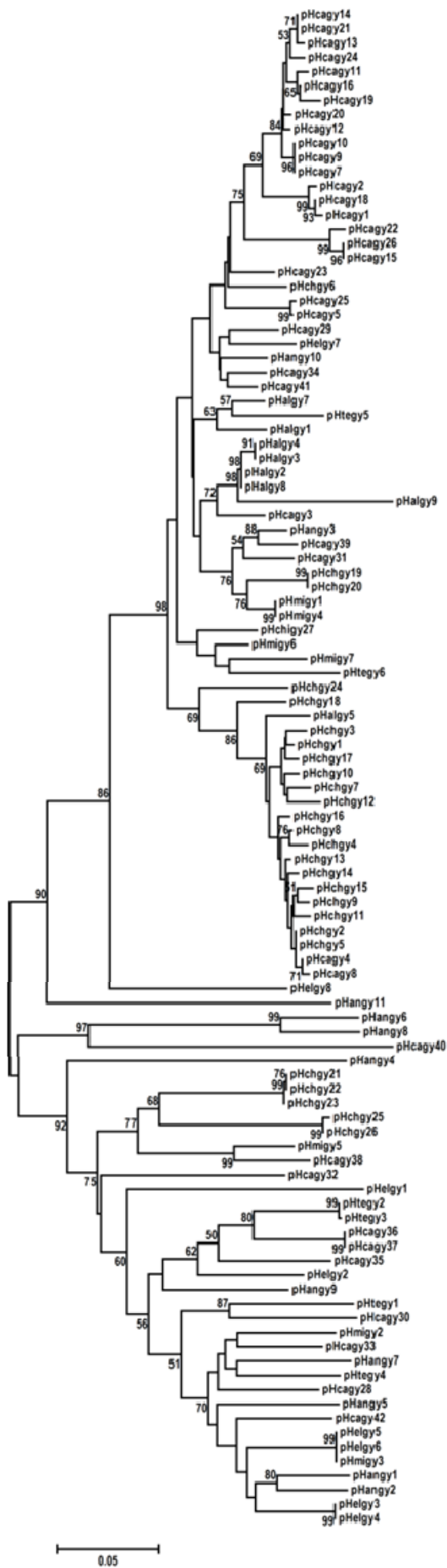
Análise das sequências *rt-gypsy* mostra que estas podem ser divididas em dois clusters, nomeados A e B (Figura 4), com uma distância média entre as sequências de 0,3. O cluster A associa 68 sequências (BS 98%) representando todas as espécies analisadas (divergência média de 0,1), sendo 29 sequências de *H. catharinensis*, que corresponde a 74,3% das sequências isoladas para esta espécie, e 22 de *H. chillensis* (82,5% do total de sequências da espécie). No cluster A, 18 sequências de *H. catharinensis* se associam com um suporte de BS = 75% e divergência média de 0,04. Dezoito sequências de *H. chillensis* se associam com uma de *H. albiflora* (pHalgy5) e duas de *H. catharinensis* (pHcagy4 e pHcagy8) com 69% de bootstrap e média de divergência de 0,03. Ainda no grupo A, são encontradas várias sequências idênticas. O baixo grau de divergência entre essas sequências sugere que todas pertençam a uma única família de retrotransposon Ty3-*gypsy*. Duas outras sequências (pHalgy9 e pHchgy12), embora associadas no grupo A, divergem das demais sequências A em cerca 20% (Figura 4).

O cluster B (BS 92%) apresentou-se mais heterogêneo que o cluster A (divergência média = 0,17), agrupando 33 sequências representantes de todas as espécies estudadas, com exceção de *H. albiflora*, sendo que todas foram amplificadas com *primers* degenerados, o que representa 61,1% do total de sequências amplificadas com estes *primers* (Figura 4).

O dendrograma gerado a partir de sequências de retrotransposons Ty3-*gypsy* evidencia também a presença de elementos mais divergentes que não se associam a nenhum dos grupos (Figura 4). Entre os grupos A e B são encontrados três fragmentos isolados de *H. angustifolia* (pHangy6, pHangy8 e pHangy11), outro fragmento, isolado de *H. tenuifolia* (pHelgy8), um pouco mais similar ao grupo A, e outro isolado de *H. catharinensis* (pHcagy40). Elementos *rt-gypsy* isolados de *Manihot esculenta*, mostraram distribuição em dois grupos, correspondentes a duas famílias monofiléticas (Gbadegesin e Beeching 2011). Os resultados de nossa investigação mostram que sequências de diferentes espécies apresentam altos níveis de similaridade e identificam, provavelmente, uma única família de retrotransposon Ty3-*gypsy*. Ungerer et al. (2009) mostram uma possível origem dos retroelementos Ty3-*gypsy* no gênero *Helianthus*. Os autores evidenciaram a existência de várias sublinhagens de Ty3-*gypsy* em espécies de *Helianthus* e híbridos derivados e sugerem que as sublinhagens do retroelemento que proliferaram nos genomas parentais, foram espécie-específica e serviram como

fonte de proliferação, a cerca de 0,5 a 1 milhão de anos, nos genomas das espécies híbridas. Em *Fritillaria* foi encontrado um grande número de famílias aparentadas de retrotransposons Ty3-*gypsy*, por outro lado, famílias que divergiram parcialmente, compõem a maior parte do genoma das espécies (Ambroz̃ova´ et al. 2011). Árvore filogenética gerada com elementos Ty3-*gypsy* de espécies de gimnospermas mostra elevado bootstrap, suportando uma origem monofilética para estes elementos, mas mostra alta diversidade de *rt-gypsy* dentro de todas as espécies analisadas. Foram observados poucos clusters monofiléticos representados por sequências *rt-gypsy* de apenas uma espécie e alguns clados bem suportados formados de elementos de espécies bem distantes (Friesen et al. 2001).

As sequências dos retrotransposons *rt-copia* e *rt-gypsy* foram também usadas para a construção de uma árvore radial conjunta, contendo as sequências de ambos os elementos. Nesta árvore, evidencia-se dois grandes clusters representados cada um por sequências *rt-copia* e *rt-gypsy* (Figura 5). A análise dos elementos evidencia a maior heterogeneidade dos *rt-copia* em relação aos *rt-gypsy*, o que é verificado também nos valores de distância entre as sequências quando analisadas dentro de cada espécie (Tabela 4), de cada grupo, e entre grupos e espécies. As sequências Ty3-*gypsy* analisadas em três espécies de *Vicia* também mostram menor heterogeneidade quando comparadas às de Ty1-*copia* bem como as de retrotransposons do grupo LINE (Pearce et al. 1996) e às de Ty1-*copia* (Hill et al. 2005).



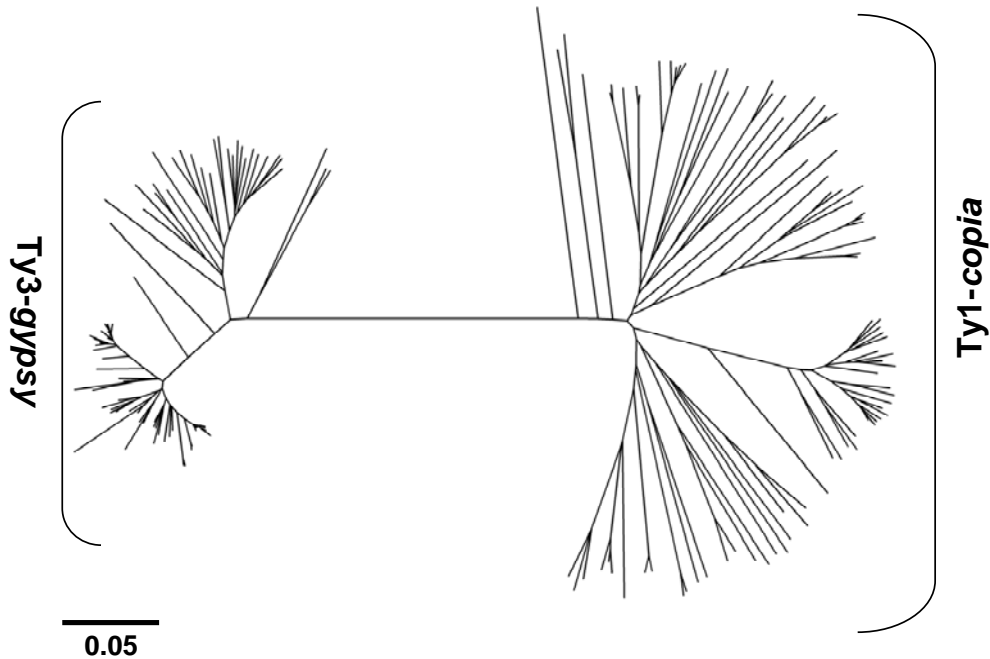
A

B

**Figura 4** - Dendrograma de 106 fragmentos parciais do gene da transcriptase reversa de retrotransposon Ty3-gypsy isolados de espécies de *Hypochoeris*. Valores de bootstrap (>50%) são mostrados acima dos ramos. A distância genética é indicada pela escala de barra.

O alto nível de divergência encontrado entre as sequências *rt-copia* e *rt-gypsy* (Figura 5) sugere que os dois elementos evoluíram de forma independente dentro do gênero *Hypochaeris*, sendo também possível que os elementos Ty3-*gypsy* tenham evoluído mais recentemente que os Ty1-*copia*. Em *Helianthus*, experimentos com fragmentos dos genes da integrase e da RNaseH isolados de Ty3-*gypsy* e Ty1-*copia*, respectivamente, também mostraram diferenças entre estes elementos, sugerindo atividade diferencial e evolução independente das duas famílias de retroelementos, durante especiação de *Helianthus* (Natali et al. 2006). Em contraste, Friesen et al. (2001) encontraram menor nível de divergência entre elementos de espécies de gimnospermas. Estudos com espécies de Asteraceae, por meio de experimentos de *Southern blot* com hibridações específicas de sequências *rt-copia* e *rt-gypsy*, revelam uma alta divergência na sequência de nucleotídeos destes retrotransposons, a qual está, provavelmente, relacionada à natureza retroviral destas sequências, que permite desenvolvimento rápido dentro do genoma hospedeiro (Natali et al. 2006). Estudos com elementos Ty1-*copia*, Ty3-*gypsy* e LINE, em espécies de *Vicia*, mostraram que os três grupos de retrotransposons têm proliferado em diferentes graus em espécies do gênero, e evidenciam alta proliferação associada com a homogeneização da população de retrotransposons Ty3-*gypsy*, os elementos mais frequentes e mais homogêneos do genoma das espécies (Hill et al. 2005).

**Figura 5 -** Dendrograma de 202 fragmentos parciais do gene da transcriptase reversa dos retrotransposons Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy* isolados de espécies do gênero *Hypochaeris*. A distância genética é indicada pela escala de barra.



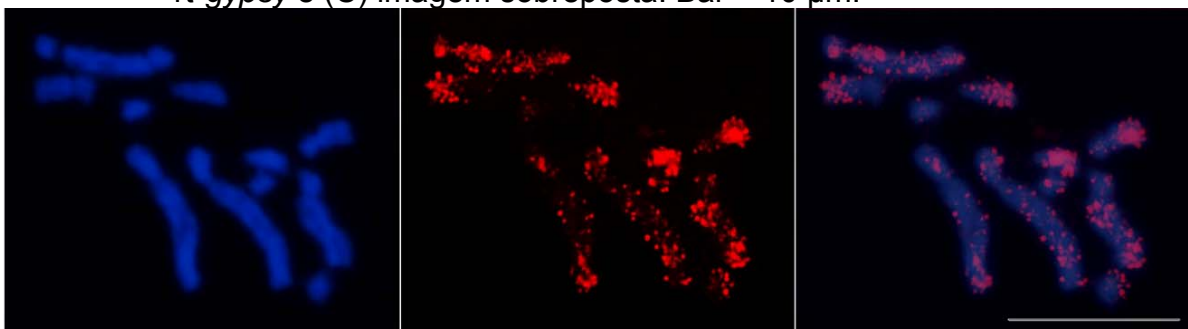
### Distribuição cromossômica de elementos *rt-gypsy* em *H. chillensis*

A distribuição física de elementos Ty3-*gypsy* nos cromossomos da espécie *H. chillensis* foi investigada utilizando hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Foi empregado como sonda o clone pHchgy6, isolado do genoma desta mesma espécie. A escolha deste clone para uso nos experimentos de FISH foi devida ao baixo nível de divergência entre esta e as demais sequências pertencentes ao cluster A, conforme evidenciado no dendrograma (Figura 4). Considerando que as sequências do cluster A podem fazer parte da mesma família de *rt-gypsy*, as marcações geradas com o uso do clone pHchgy6 podem ser capazes de localizar representantes da família de Ty3-*gypsy* nos cromossomos de *H. chillensis*.

Analizando a distribuição dos elementos Ty3-*gypsy* nos cromossomos de *H. chillensis* observa-se que estes se encontram dispersos de

forma desigual por todo o comprimento dos cromossomos, com uma maior concentração nos braços longos dos pares de cromossomos menores (3 e 4) e na região pericentromérica e adjacente à constrição secundária, nos braços longos do par de cromossomos dois. Entretanto, os braços curtos e as regiões próximas à constrição secundária nos braços curtos do par de cromossomos três são desprovidos de Ty3-*gypsy* (Figura 6).

**Figura 6** - Hibridização *in situ* com clone pHchgy6 rt-*gypsy* em cromossomos metafásicos de *H. chillensis* ( $2n = 8$ ). (A) coloração DAPI, (B) pHchgy6 rt-*gypsy* e (C) imagem sobreposta. Bar = 10  $\mu$ m.



A distribuição cromossômica desigual dos elementos Ty3-*gypsy* nos cromossomos de *H. chillensis*, revela que estes elementos têm um padrão de dispersão distinto daquele observado para os retrotransposons do grupo Ty1-*copia*. Ruas et al. (2008) investigaram a distribuição de retrotransposons Ty1-*copia* nos cromossomos de quatro espécies *Hypochaeris*, duas do velho mundo (*H. maculata* e *H. angustifolia*) e duas da América do Sul (*H. aspargiodes* e *H. spathulata*). Os autores observaram que os retroelementos Ty1-*copia* apresentam-se dispersos por todos os cromossomos de *H. maculata* e *H. angustifolia* enquanto apresentam um padrão distinto de distribuição nas espécies sul-americanas, ocorrendo dispersos ao longo dos cromossomos maiores um e dois. Nos pares três e quatro os sinais de Ty1-*copia* concentram-se nos braços curtos, enquanto os braços longos destes mesmos cromossomos estão desprovidos de elementos Ty1-*copia*. As diferenças encontradas nos padrões de distribuição dos retroelementos Ty1-*copia* (Ruas et al., 2008) e Ty3-*gypsy* (no presente estudo) sugerem que estes dois grupos de retroelementos possuam preferências de associação com sequências diferentes do genoma e que evoluíram independentemente nas espécies do gênero *Hypochaeris*. Santini et al. (2002), após analisar o contraste na distribuição de retrotransposons Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy* no genoma de 17 espécies anuais e perenes de *Helianthus*,

também sugerem que estes elementos possuam histórias evolucionárias distintas no gênero. Padrões semelhantes de dispersão dos retroelementos Ty1-*copia* e Ty3-*gypsy* são evidenciados nos cromossomos de várias espécies de Asteraceae, como *Ageratum* ssp., *Leontopodium* ssp., *Tithonia rotundifolia*, *Senecio vulgaris* e *Helianthus annuus* (Natali et al. 2006) e em *Copaifera langsdorffii* (Gaeta et al. 2010). Em espécies do gênero *Cestrum* (*C. strigilatum* e *C. intermedium*) os elementos Ty3-*gypsy* encontram-se dispersos ao longo de todos os cromossomos (Fregonezi et al. 2007).

Os sinais mais fortes de hibridação dos retroelementos Ty3-*gypsy*, observados em regiões adjacente a regiões de rDNA, que se apresentam ricas em GC, (Cerbah et al 1998a; Ruas et al. 2005) em *H. chillensis*, revelam uma maior preferência destes elementos por região de DNA repetitivo. Contrastando com estes resultados, observou-se que em espécies europeias do gênero *Hypochaeris*, os retrotransposons Ty1-*copia* distribuíram-se por todo o comprimento dos cromossomos, com exceção das regiões de DNA ribossômico e centrômeros (Ruas et al. 2008). Observou-se também que os sinais de hibridação com elementos Ty3-*gypsy* são muito mais pronunciados nos braços longos dos cromossomos 3 e 4 de *H. chillensis*, os quais, como mostrado por Ruas et al. (2008) são totalmente desprovidas de retrotransposons Ty1-*copia*. Em *Cestrum strigilatum* e *Cestrum intermedium*, os sinais mais acentuados de hibridação com Ty3-*gypsy* são encontrados em alguns pares de cromossomos associados a regiões organizadoras de nucléolo (Fregonezi et al. 2007). Entretanto, em espécies de *Helianthus* (*Helianthus annuus*, *H. petiolares*, *H. deserticola* e *H. paradoxus*), o retroelemento Ty3-*gypsy* mostrou distribuição em região pericentromérica (Staton et al. 2009). Em *Copaifera langsdorffii*, não foi encontrado co-localização do elemento Ty1-*copia* com outros segmentos repetitivos. Por outro lado, a distribuição dos elementos Ty3-*gypsy* nos cromossomos desta mesma espécie revelou sinais terminais e intercalares mais fortes, coincidentes com várias regiões ricas em GC e com um fragmento ancestral de rDNA de cloroplasto (Gaeta et al. 2010). Natali et al. (2006) identificaram em espécies de Asteraceae (*Ageratum* ssp., *Leontopodium* ssp., *Tithonia rotundifolia*, *Senecio vulgaris* e *Helianthus annuus*) uma localização preferencial de sequências Ty3-*gypsy-like* em região centromérica, enquanto também evidenciou que em *H. annuus*, sequências Ty1-*copia-like* apresentam localização telomérica preferencial.

A localização de retrotransposons em região de DNA repetitivo, como centrômeros (par 2) e de rDNA, pode indicar que a proliferação destes elementos no genoma hospedeiro pode ser tolerada de maneira mais eficiente, quando estes estão incorporados a regiões de DNA desprovidas de genes. Desta forma, a seleção negativa associada à inserção de retroelementos em regiões gênicas seria minimizada quando o alvo dos retrotransposons é a heterocromatina (Gao et al. 2008). Além disso, Staton et al. (2009) sugeriram que o enriquecimento de retrotransposons Ty3-*gypsy* em região pericentromérica em espécies híbridas de *Helianthus*, deve-se a uma menor taxa de recombinação em regiões de DNA repetitivo, favorecendo a transposição destes elementos a uma taxa mais rápida que a remoção por recombinação homóloga.

A maior concentração de Ty3-*gypsy* nos braços longos do par de cromossomos dois em *H. chillensis* é coincidente a um dos sítios de rDNA 35S, que de acordo com pesquisadores como Ruas et al. (2008) e Weiss-Schneeweiss et al. (2007) está sendo evolutivamente inativado nas espécies do gênero *Hypochaeris*. O que permite sugerir que a atividade dos retrotransposons Ty3-*gypsy* pode ser a causa da inativação deste sítio de rDNA 35S nesta espécie.

Os dados de hibridação *in situ* em *H. chillensis* evidenciam que os retroelementos Ty3-*gypsy* apresentam-se distribuídos de forma difusa em regiões eucromáticas, enquanto a sua inserção preferencial ocorre em regiões de DNA repetitivo nos cromossomos desta espécie. Estudos em *Aegilops speltoides* e *Hordeum spontaneum* (espécies de trigo selvagem) mostram que elementos Ty3-*gypsy* distribuíram-se em mini-clusters ao longo dos cromossomos, tanto em regiões de eucromatina quanto de heterocromatina, como região pericentromérica e sítios de rDNA (Belyayev et al. 2001, 2005). Por outro lado, no genoma de *V. faba* foi observada distribuição distinta de Ty1-*copia* em diferentes regiões cromossômicas (Pearce et al. 1996).

Os resultados apresentados estimulam a continuidade dos estudos sobre a participação dos retrotransposons na determinação da estrutura genômica e cariotípica no gênero *Hypochaeris*, de modo a incrementar nosso conhecimento sobre os mecanismos evolutivos ocorridos no gênero, particularmente nas espécies da América do Sul.

## AGRADECIMENTOS

Obrigada ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão de bolsa de mestrado e aos professores Dr. Lyderson Facio Viccini e Dr. José Marcello Salabert de Campos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, pela colaboração no trabalho.

## REFERÊNCIAS

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology* 215:403-410

Ambrozová K, Mandačková T, Bureš P, Neumann P, Leitch IJ, Kobližková A, Macas J, Lysak MA (2011) Diverse retrotransposon families and an AT-rich satellite DNA revealed in giant genomes of *Fritillaria lilies*. *Annals of Botany* 107:255-268

Belyayev A, Raskina O, Nevo E (2001) Chromosomal distribution of reverse transcriptase-containing retroelements in two Triticeae species. *Chromosome Research* 9: 129-136

Belyayev A, Raskina O, Nevo E (2005) Variability of the chromosomal distribution of Ty3-gypsy retrotransposons in the populations of two wild Triticeae species. *Cytogenet Genome Res* 109:43-49

Bennetzen JL (1996) The contribution of retroelements to plant genome organization, function and evolution. *Trends in Microbiol* 4:347-353

Bennetzen JL (2000) Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol. Biol* 42:251-269

Biémont C, Vieira C (2006) Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443:520-524

- Brandes A, Heslop-Harrison JS, Kamm A, Kubis S, Doudrick RL, Schmidt T (1997) Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of *Ty1-copia*-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. *Plant Molecular Biology* 33:11-21
- Cerbah M, Coulaud J, Siljak-Yakovlev S (1998a) rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). *J. Heredity* 89:312-318
- Cerbah M, Souza-Chies T, Jubier MF, Lejeune B, Siljak-Yakovlev S (1998b) Molecular phylogeny of the genus *Hypochoeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution. *Molecular Biology and Evolution* 15:345-354
- Cerbah M, Coulaud J, Brown SC, Siljak-Yakovlev S (1999) Evolutionary DNA variation in the genus *Hypochoeris*. *Heredity* 82: 261-266
- Cuadrado A, Jouve N (1994) Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-triticales. *Chromosome Res* 2:331-338
- Flavell AJ, Dumbbar E, Anderson R, Pearce SR, Hartley R, Kumar A (1992) *Ty1-copia* group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucl. Acids Res* 20:3639-3644
- Fregonezi JN, Vilas-Boas LA, Fungaro MHP, Gaeta ML, Vanzela ALL (2007) Distribution of a *Ty3/gypsy-like* retroelement on the A and B-chromosomes of *Cestrum strigilatum* Ruiz & Pav. and *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae). *Genetics and Molecular Biology* 30:599-604
- Friesen N, Brandes A, Heslop-Harrison JS (2001) Diversity, Origin, and Distribution of Retrotransposons (*gypsy* and *copia*) in Conifers. *Mol. Biol. Evol.* 18(7):1176-1188

Gaeta ML, Yuyama PM, Sartori D, Fungaro MHP, Vanzela ALL (2010) Occurrence and chromosome distribution of retroelements and NUPT sequences in *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinioideae). *Chromosome Research* 18:515-524

Gao X, Hou Y, Ebina H, Levin HL, Voytas DF (2008) Chromodomains direct integration of retrotransposons to heterochromatin. *Genome Research* 18:359–369

Ganko EW, Greene CS, Lewis JA, Bhattacharjee V, McDonald JF (2006) LTR Retrotransposon-Gene Associations in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Evol* 62:111-120

Gbadegesin MA, Beeching JR (2011) Highly heterogeneous *Ty3/Gypsy-like* retrotransposon sequences in the genome of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *African Journal of Biotechnology* 10(20):3951-3963

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucle. Acids Symp. Ser.* 41:95-98

Heslop-Harrison JS, Brandes A, Takeda S, Schmidt T, Vershinin AV, Alkhimova EG, Kamm A, Doudrick RL, Schuwarzacher T, Katsiotis, Kubis SE, Kumar A, Pearce SR, Flavell AJ, Harrison GE (1997) The Chromosomal organization of *Ty1-copia* group retrotransposable elements in higher plants and their implication for genome evolution. *Genetica* 100:197-204

Hill P, Burford D, Martin DMA, Flavell AJ (2005) Retrotransposon populations of *Vicia* species with varying genome size. *Mol Gen Genomics* 273:371-381

Hirochika H, Hirochika R (1993) *Ty1-copia* group retrotransposons as ubiquitous components of plant genomes. *Jpn J Genet.* 68 (1): 35-46

Kalendar R, Flavell AJ, Ellis THN, Sjakste T, Moisy C, Schulman AH (2010) Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers heredity. *Nature* 93:1-11

Kubis SE, Schimidt T, Heslop-Harrison JS (1998) Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Annals of Botany* 82:45-55

Kumar A (1996) The adventure of the Ty1- *copia* group of retrotransposons in plants. *Trends in Genet* 12:41-43

Kumar A, Bennetzen JL (1999) Plant Retrotransposons. *Ann. Rev. Genet* 33: 479-532

Kumar A, Pearce SR, Mclean K, Harrison G, Heslop-Harrison JS, Waugh, Flavell AJ (1997) The Ty1- *copia* group of retrotransposons in plants: genomic organization, evolution, and use as molecular markers. *Genetica* 100:205-217

Li Z, Chen S, Zheng X, Zhu L (2000) Identification and chromosomal localization of a transcriptionally active retrotransposon of Ty3-*gypsy* type in rice. *Genome* 43:404-408

Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5 A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452

Lippman Z, Gendrel A, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, McCombie WR, Lavine K, Mittal V, May B, Kasschau KD, Carrington JC, Doerge RW, Colot V, Martienssen R (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430:471-476

Ma J, Devos KM, Bennetzen JL (2004) Analyses of LTR-Retrotransposon Structures Reveal Recent and Rapid Genomic DNA Loss in Rice. *Genome Research* 14:860-869

Matsunaga S, Yagisawa F, Yamamoto M, Uchida W, Nakao S, Kawano S (2002) LTR retrotransposons in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Genome* 45:745-751

Mccarthy EM, Liu J, Lizhi G, McDonald JF (2002) Long terminal repeat retrotransposons of *Oryza sativa*. *Genome Biology* 3:10

Mirouze M, Paszkowski J (2011) Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Plant Biology* 14:267-274

Muotri AR, Chu VT, Marchetto MCN, Deng W, Moran JV, Gage FH (2005) Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 435:903-910

Natali L, Santini S, Giordani T, Minelli S, Maestrini P, Cionini PG, Cavallini A (2006) Distribution of Ty3-*gypsy*- and Ty1-*cop*ia-like DNA sequences in the genus *Helianthus* and other Asteraceae. *Genome* 49:64-72

Navarro-Quezada A, Schoen DJ (2002) Sequence evolution and copy number of Ty1-*cop*ia retrotransposons in diverse plant genomes. *PNAS* 99 (1):269

Ortiz MA, Tremetsberger K, Stuessy TF, Terrab A, García-Castaño JL, Talavera S (2009) Phylogeographic patterns in *Hypochoeris* section *Hypochoeris* (Asteraceae, Lactuceae) of the western Mediterranean. *Journal of Biogeography* 36:1384-1397

Pearce SR, Harrison G, Li D, Heslop-Harrison JS, Kumar A, Flavell AJ (1996) The Ty1-*cop*ia group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal organization. *Molecular genome genetic* 250:305-315

Ruas CF, Ruas PM, Matzenbacher NI, Ross G, Bernini C, Vanzela ALL (1995) Cytogenetic studies of some *Hypochoeris* species (Compositae) from Brasil. *Amer. J. Bot* 82:369-375

Ruas CF, Vanzela ALL, Santos MO, Fregonezi JN, Ruas PM, Matzenbacher N, Aguiar-Perecin MLR (2005) Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochoeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 28:129-139

Ruas CF, Weiss-Schneeweiss H, Stuessy TF, Samuel R, Pedrosa-Harand A, Tremetsberger K, Ruas PM, Schlüter PM, Ortiz MA, König C, Matzenbacher N I

(2008) Characterization, genomic organization and chromosome distribution of Ty1-*copia* retrotransposons in species of *Hypochaeris* (Asteraceae). *Gene* 412: 39-49

Santini S, Cavallini A, Natali L, Minelli S, Maggini F, Cionini PG (2002) Ty1 - and Ty3/*gypsy* -like retrotransposon sequences in *Helianthus* species. *Chromosoma* 111:192-200

Samuel R, Stuessy TF, Tremetsberger K, Baeza CM, Siljak-Yakovlev S (2003) Phylogenetic relationships among species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae) based on ITS, plastid trnL intron, trnL-F spacer and matK sequences. *Amer. J. Bot.* 90:496-507

Staton SE, Ungerer MC, Moore RC (2009) The genomic organization of Ty3/*gypsy* – like retrotransposons in *Helianthus* (Asteraceae) homoploid hybrid species. *American Journal of Botany* 96 (9):1646-1655

Stebbins GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, London, UK

Stuessy TF, Tremetsberger K, Mullner AN, Jankowicz J, Guo Y-P, Baeza CM, Samuel RM (2003) The melding of systematics and biogeography through investigations at the populational level: examples from the genus *Hypochaeris* (Asteraceae). *Basic. Appl. Ecol.* 4:287-296

Sun H, Dai H, Zhao G, Ma Y, Ou C, Li H, Li L, Zhang Z (2008) Genome-wide Characterization of Long Terminal Repeat -retrotransposons in Apple Reveals the Differences in Heterogeneity and Copy Number between Ty1-*copia* and Ty3-*gypsy* Retrotransposons. *Journal of Integrative Plant Biology.* 50 (9): 1130-1139

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24:1596-1599

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

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

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

Ungerer MC, Strakosh SC, Stimpson KM (2009) Proliferation of *Ty3/gypsy*-like retrotransposons in hybrid sunflower taxa inferred from phylogenetic data. *BMC Biology* 40

Zhou M, Zhong H, Zhang Q, Tang K, Tang D (2010) Diversity and evolution of *Ty1-copia* retroelements in representative tribes of Bambusoideae subfamily. *Genetica* 138:861-868

Wang F, Tong Z, Sun J, Shen Y, Zhou J, Gao Z, Zhang Z (2010) Genome-wide detection of *Ty1-copia* and *Ty3-gypsy* group retrotransposons in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *African Journal of Biotechnology* 9(50): 8583-8596, 2010.

Weiss H, Stuessy TF, Grau J, Baeza CM (2003) Chromosome reports from South American *Hypochaeris* (Asteraceae). *Ann. Missouri Bot. Gard*. 90:53-63

Weiss-Schneeweiss H, Stuessy TF, Tremetsberger K, Urtubey E, Valdebenito HA, Beck SG, Baeza CM (2007) Chromosome numbers and karyotypes of South American species and populations of *Hypochaeris* (Asteraceae). *Bot. J. Linn. Soc*. 153:49-60

Weiss-Schneeweiss H, Tremetsberger K, Schneeweiss GM, Parker JS, Stuessy TF (2008) Karyotype diversification and evolution in diploid and polyploid South American *Hypochaeris* (Asteraceae) inferred from rDNA localization and genetic fingerprint data. *Ann. Bot*. 101:909-918

## 6 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que os retrotransposons do grupo Ty1-*copia* são altamente heterogêneos e que, o nível de heterogeneidade das sequências está positivamente correlacionado com o tamanho do genoma das espécies investigadas. Dendrogramas gerados com base na matriz de distância genética agrupam as sequências em clusters, sugerindo a existência de diferentes famílias de Ty1-*copia* em *Hypochoaeris*. Comparativamente, as sequências dos retrotransposons Ty3-*gypsy* são menos divergentes, tanto dentro de cada espécie, quanto entre sequências das diferentes espécies analisadas.

Os resultados mostram também que há um alto nível de divergência entre as sequências *rt-copia* e *rt-gypsy*, o que sugere que os dois elementos evoluíram de forma independente dentro do gênero *Hypochoaeris*. Os dados sugerem que os elementos Ty3-*gypsy* têm evoluído mais recentemente que os Ty1-*copia* dentro do gênero *Hypochoaeris*.

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente, usando como sonda fragmentos do gene *rt-gypsy* isolado de *H. chillensis*, mostrou que este retroelemento se distribui, preferencialmente, em regiões de DNA repetitivo nos cromossomos de *H. chillensis*. Este padrão de distribuição é distinto daquele observado para retroelementos Ty1-*copia* no gênero, sugerindo que, ambos possuem preferências de associação com sequências diferentes do genoma, reforçando a idéia de que evoluíram independentemente nas espécies do gênero *Hypochoaeris*.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- ADAME, P.; TALAVERA, S. Números cromosômicos para la flora española. **Lagasalia**. v. 9 p. 256-257, 1980.
- ALIX, K.; HESLOP-HARRISON, J.S. The diversity of retroelements in diploid and allotetraploid Brassica species. **Plant Molecular Biology**. v. 54, p. 895-909, 2004.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**. v. 215, p. 403-410, 1990.
- AMBROZŮVA, K.; MANDAŮKOVÁ, T.; BUREŠ, P.; NEUMANN, P.; LEITCH, I. J.; KOBLÍŽKOVÁ, A.; MACAS, J.; LYSÁK, M. A. Diverse retrotransposon families and an AT-rich satellite DNA revealed in giant genomes of Fritillaria lilies. **Annals of Botany**. v. 107. p. 255-268, 2011. doi:10.1093/aob/mcq235.
- AZEVÊDO-GONÇALVES, C. F.; MATZENBACHER, N. I. O Gênero *Hypochoeris* L. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Sér. Bot.* Porto Alegre, v. 62, n. 1-2, p. 55-87, 2007.
- AZEVÊDO-GONÇALVES, C.F. **O Gênero *Hypochoeris* L. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2004. Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Rio Grande do Sul.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiosperma no Brasil. Subclasse VI: Asteridae**. V. F. Viçosa: v.3, 326p. II, 1991.
- BECKER, U.; REINHOLD, T.; MATTHIES, D. Effects of pollination distance on reproduction and offspring performance in *Hypochoeris radicata*: Experiments with plants from three European regions. **Biological conservation**. v. 132, p. 109-118, 2006.
- BELYAYEV, A.; RASKINA, O.; NEVO, E. Chromosomal distribution of reverse transcriptase-containing retroelements in two Triticeae species. **Chromosome Research**. v. 9, p. 129-136, 2001.
- BENNETZEN, J.L. The contribution of retroelements to plant genome organization, function and evolution. **Trends in Microbiol.** v. 4. p. 347-353, 1996a.
- BENNETZEN, J.L. The *Mutator* transposable element system of maize. **Curr Top Microbiol Immunol**. v. 204, p. 195-229, 1996b.
- BENNETZEN, J.L., Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant Mol. Biol.** v. 42, p. 251-269, 2000.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**. v. 443. p. 520-524, 2006.
- BOEKE, J.D.; CORCES, V.G. Transcription and reverse-transcription of retrotransposons. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 43, p. 403-434, 1989.

BORTIRI, E. Flora Fanerogamica Argentina. Asteraceae, Lactuceae: *Hypochoeris*. **Cordoba: Conicet**. fasc. 63, p. 1-25, 1999.

BRANDES, A.; HESLOP-HARRISON, J. S.; KAMM, A.; KUBIS, S.; DOUDRICK, R.L.; SCHMIDT, T. Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of *Ty1-copia*-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. **Plant Molecular Biology**. v. 33, p. 11-21, 1997.

BREMER, K. Asteraceae – Cladistics & Classification. **Portland: Timber Press**, 1994. 752p.

CABRERA, A. L. Materiales para una revisión Del género *Hypochoeris*. I. *Hypochoeris chilensis* (H. B. K) **Hieron Darwiniana**. San Isidro, Prov. De Buenos Aires, resp. Argentina. Tomo 20, n. 3. v. 4, p. 312-322, 1976.

CABRERA, A. L.; CRISCI, J.V.; DELUCCHI, G.; FREIRE, S.E.; GIULIANO, D.A.; IHARLEGUI, L.; KATINAS, L.; SÁENZ, A.A.; SANCHO, G. & URTUBEY, E. **Catálogo ilustrado de las compuestas (=Asteraceae) de la provincia de Buenos Aires, Argentina: Sistemática, Ecología y Usos**. Buenos Aires: CONICET. 2000. 136p.

CERBAH, M.J.; COULAUD, B.; GODELLE, S.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Genome size fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. **Genome**. v. 38. p. 689-695, 1995.

CERBAH, M.; COULAUD, J.; SILJAK-YAKOVLEV, S. rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). **J. Heredity**. v. 89, p. 312-318, 1998.

CERBAH, M., T. SOUZA-CHIES, M. F. JUBIER, B. LEJEUNE, and S. SILJAKYAKOVLEV. Molecular phylogeny of the genus *Hypochoeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution. **Molecular Biology and Evolution**. v. 15, p. 345-354, 1998.

CUADRADO, A.; JOUVE, N. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-triticales. **Chromosome Res.** v. 2. p. 331-338, 1994.

DEVOS, K. M.; BROWN, J. K. M.; BENNETZEN, J. L. Genome Size Reduction through Illegitimate Recombination Counteracts Genome Expansion in *Arabidopsis*. **Genome Research**. v. 12. p. 1075-1079, 2002.

FESCHOTTE, C; PRITHAM, E. J. Computational analysis and paleogenomics of interspersed repeats in eukaryotes. In: Stojanovic N, editor. **Computational genomics**. Norwich (UK): Horizon Scientific Press. p. 31-53, 2007.

FINNEGAN, D. J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends Genet.** v. 5, p. 103-107, 1989.

FIORIN, F. G. **Estrutura Cariotípica de Duas Espécies de *Hypochoeris* (*H. catharinensis* e *H. lutea*, Asteraceae) endêmicas do Sul do Brasil**. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

- FLAVELL, A.J.; DUMBAR, E.; ANDERSON, R.; PEARCE, S.R.; HARTLEY, R.; KUMAR, A. Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. **Nucl. Acids Res.** v. 20, 3639-3644, 1992.
- FREGONEZI, J. N.; VILAS-BOAS, L. A.; FUNGARO, M. H. P.; GAETA, M. L.; VANZELA, A. L. L. Distribution of a Ty3/gypsy-like retroelement on the A and B-chromosomes of *Cestrum strigilatum* Ruiz & Pav. and *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 30. p. 599-604, 2007.
- FORTES, A. B. **Geografia física do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Livraria do Globo, 1959. 136p,.
- FRIESEN, N.; BRANDES, A.; HESLOP-HARRISON, J.S. Diversity, Origin, and Distribution of Retrotransposons (*gypsy* and *copia*) in Conifers. **Mol. Biol. Evol.** v. 18, n. 7, p. 1176-1188, 2001.
- GAETA, M. L.; YUYAMA, P. M.; SARTORI, D.; FUNGARO, M. H. P.; VANZELA, A. L. L. Occurrence and chromosome distribution of retroelements and NUPT sequences in *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinioideae). **Chromosome Res.** v. 18. p. 515-524, 2010.
- GALASSO, I.; HARRISON, G.E.; PIGNONE, D.; BRANDES, A.; HESLOP-HARRISON, J.S. The distribution and organization of Ty1-copia-like retrotransposable elements in the genome of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (cowpea) and its relatives. **Ann. Bot.** v. 80, p. 327-333, 1997.
- GAO, X.; HOU, Y.; EBINA, H.; LEVIN, H. L.; VOYTAS, D. F. Chromodomains direct integration of retrotransposons to heterochromatin. **Genome Research.** v. 18. p. 359-369, 2008.
- GARCIA, E. N.; BOLDRINI, I. I.; JACQUES, A. V. A. Dinâmica de formas vitais de uma vegetação campestre sob diferentes práticas e exclusão. Iheringia. **Ser Bot. Porto Alegre**, v. 57, n. 2, p. 215-241, 2000.
- GBADEGESIN, M. A.; BEECHING, J. R. Highly heterogeneous *Ty3/Gypsy-like* retrotransposon sequences in the genome of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Biotechnology**. v. 10(20), n. 16, p. 3951-3963, 2011.
- HESLOP-HARRISON, J.S.; BRANDES, A.; TAKEDA, S.; SCHMIDT, T.; VERSHININ, A.V.; ALKHIMOVA, E.G.; KAMM, A.; DOUDRICK, R.L.; SCHUWARZACHER, T.; KATSIOTES, KUBIS, S.E.; KUMAR, A.; PEARCE, S.R.; FLAVELL, A.J.; HARRISON, G.E. The Chromosomal organization of Ty1-*copia* group retrotransposable elements in higher plants and their implication for genome evolution. **Genetica**. v. 100, p. 197-204, 1997.
- HILL, P.; BURFORD, D.; MARTIN, D. M. A.; FLAVELL, A. J. Retrotransposon populations of *Vicia* species with varying genome size. **Mol Gen Genomics**. v. 273. p. 371-381, 2005.
- HIROCHIKA, H.; HIROCHIKA, R. Ty1-copia group retrotransposons as ubiquitous components of plant genomes. **Jpn J Genet.** v. 68. n. 1. p. 35-46, 1993.

HOFFMANN, O. Compositae. In.: ENGLER, A.; PRANTL, E. (Eds.), **Die natürlichen Pflanzenfamilien**, v. 4, n. 5, p. 87-391. *Hypochaeris*, p.361-362, 1890.

KALENDAR, R.; FLAVELL, A. J.; ELLIS, T. H. N.; SJAKSTE, T.; MOISY, C.; SCHULMAN, A. H. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers heredity. **Nature**. v. 93, p. 1-11, 2010.

KEELEY, S. C.; FORSMAN, Z.H.; CHAN, R. A phylogeny of the “evil tribe” (Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: Support from separate and combined congruent datasets (*trnL-F*, *ndhF*, ITS). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 44, p. 89-103, 2007.

KUBIS, S. E.; HESLOP-HARRISON, J. S.; DESEL, C.; SCHMIDT, T. The genomic organization of the non-LTR retrotransposons (LINEs) from three *Beta* species and five other angiosperms. **Plant Mol. Biol.** v. 36, p. 821-831, 1998.

KUBIS, S. E.; SCHIMIDT, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA Elements as a Major Component of Plant Genomes. **Annals of Botany**. (Supplement A). v. 82 p. 45-55, 1998.

KUMAR, A. The adventure of the Ty1-*copia* group of retrotransposons in plants. **Trends in Genet.** v. 12, p. 41-43, 1996.

KUMAR, A.; BENNETZEN, J.L. Plant Retrotransposons. **Ann. Rev. Genet.** v. 33, p. 479-532, 1999.

KUMAR, A.; PEARCE, S. R.; MCLEAN, K.; HARRISON, G.; HESLOP- HARRISON, J. S.; WAUGH, FLAVELL, A. J. The Ty1-*copia* group of retrotransposons in plants: genomic organization, evolution, and use as molecular markers. **Genetica**. v. 100, p. 205-217, 1997.

LI, Z.; CHEN, S.; ZHENG, X.; ZHU, L. Identification and chromosomal localization of a transcriptionally active retrotransposon of Ty3- *gypsy* type in rice . **Genome**. v. 43. p. 404-408, 2000.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**. v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LIPPMAN, Z.; GENDREL, A.; BLACK, M.; VAUGHN, M. W.; DEDHIA, N.; MCCOMBIE, W R.; LAVINE, K.; MITTAL, V.; MAY, B.; KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C.; DOERGE, R. W.; COLOT, V.; MARTIENSSEN, R. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. **Nature**. v. 430, p. 471-476, 2004.

MA, J.; DEVOS, K. M.; BENNETZEN, J. L. Analyses of LTR-Retrotransposon Structures Reveal Recent and Rapid Genomic DNA Loss in Rice. **Genome Research**. v. 14, p. 860-869, 2004.

MATSUNAGA, S.; YAGISAWA, F.; YAMAMOTO, M.; UCHIDA, W.; NAKAO, S.; KAWANO, S. LTR retrotransposons in the dioecious plant *Silene latifolia*. **Genome**. v. 45, p. 745-751, 2002.

MCCARTHY, E. M.; LIU, J.; LIZHI, G.; MCDONALD, J. F. Long terminal repeat retrotransposons of *Oryza sativa*. **Genome Biology**. v. 3, n. 10, 2002.

MCCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. **Science**. v. 226, p. 792-80, 1984.

MIROUZE, M.; PASZKOWSKI, J. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. **Plant Biology**. v. 14. p. 267-274, 2011.

MIX, C.; ARENS, F.P.; RENGELINK, R.; SMULDERS, M.J.M.; VAN GROENENDAEL, J.M.; OUBORG, N.J. Regional gene flow and population structure of the wind-dispersed plant species *Hypochaeris radicata*(Asteraceae) in an agricultural landscape. **Molecular Ecology**. v. 15. p. 1749-1758, 2006.

MUELLNER, A.N.; TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.; BAEZA, C.M. Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochaeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). **Molecular Ecology**. v. 14. p. 203-212, 2005.

MUOTRI, A. R.; CHU, V. T.; MARCHETTO, M. C. N.; DENG, W.; MORAN, J. V.; GAGE, F. H. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. **Nature**. v. 435, p. 903-910, 2005.

NATALI, L.; SANTINI, S.; GIORDANI, T.; MINELLI, S.; MAESTRINI, P.; CIONINI, P. G.; CAVALLINI, A. Distribution of Ty3-*gypsy*- and Ty1-*copia*-like DNA sequences in the genus *Helianthus* and other Asteraceae. **Genome**. v. 49, p. 64-72, 2006. doi:10.1139/G05-058.

NAVARRO-QUEZADA, A.; SCHOEN, D. J. Sequence evolution and copy number of Ty1- *copia* retrotransposons in diverse plant genomes. **PNAS**. v. 99, n.1, p. 269, 2002.

ORTIZ, M.A.; TREMETSBERGER, K. ; TALAVERA, S.; STUESSY, T.F. ; GARCIA-CASTANO, J.L. Population structure of *Hypochaeris salzmanniana* DC. (Asteraceae), an endemic species to the Atlantic coast on both sides of the Strait of Gibraltar, in relation to Quaternary sea level changes. **Molecular Ecology**. v. 16, p. 541-552, 2007.

ORTIZ, M.A.; TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.F.; TERRAB, A.; GARCÍA-CASTAÑO, J.L.; TALAVERA, S. Phylogeographic patterns in *Hypochaeris* section *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae) of the western Mediterranean. **Journal of Biogeography**. v. 36, p. 1384-1397, 2009.

ORTIZ, M.A.; TREMETSBERGER, K.; TERRAB, A.; STUESSY, T.F.; GARCÍA-CASTAÑO, J.L.; URTUBEY, E.; BAEZA, M.; RUAS, C.F.; GIBBS, P.E.; TALAVERA, S. Phylogeography of the invasive weed *Hypochaeris radicata* (Asteraceae): from Moroccan origin to world-wide introduced populations. **Molecular Ecology**. v. 17, p. 3654-3667, 2008.

PEARCE, S. R.; HARRISON, G.; LI, D.; HESLOP-HARRISON, J. S., KUMAR, A.; FLAVELL, A. J. The Ty1-*copia* group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal organization. **Molecular genome genetic**. v. 250, p. 305-315, 1996.

PRITHAM, E. J. Transposable Elements and Factors Influencing their Success in Eukaryotes. **Journal of Heredity**. v. 100, n. 5, p. 648-655, 2009.

RECK, M.; BENÍCIO, L.M.; RUAS, E. A.; RODRIGUES, L. A.; RUAS, P. M.; ORTIZ, M. A.; TALAVERA, S.; URTUBEY, E.; STUESSY, T.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; TREMETSBERGER, K.; MICHELAN, V. S.; MATZENBACHER, N. I.; VANZELA, A. L. L.; TERRAB, A.; SAMUEL, R.; RUAS, C. F. Karyotype and AFLP data reveal the phylogenetic position of the Brazilian endemic *Hypochoeris catharinensis* (Asteraceae). **Plant Syst Evol**, 2011.

RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; METZENBACHER, N. I.; ROSS, G.; BERNINI, C.; VANZELA, A. L. L. Cytogenetic studies of some *Hypochoeris* species (Compositae) from Brasil. **Amer. J. Bot.** v. 82, p. 369-375, 1995.

RUAS, C. F.; VANZELA, A. L. L.; SANTOS, M. O.; FREGONEZI, J. N.; RUAS, P. M.; MATZENBACHER, N.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochoeris* species (Asteraceae) from Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 28, p. 129-139, 2005.

RUAS, C. F.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; STUESSY, T. F.; SAMUEL, R.; PEDROSA-HARAND, A.; TREMETSBERGER, K.; RUAS, P. M.; SCHLÜTER, P. M.; ORTIZ, M. A.; KÖNIG, C.; MATZENBACHER, N. I. Characterization, genomic organization and chromosome distribution of Ty1-copia retrotransposons in species of *Hypochoeris* (Asteraceae). **Gene**. v. 412, p. 39-49, 2008.

SANTINI, S.; CAVALLINI, A.; NATALI, L.; MINELLI, S.; MAGGINI, F.; CIONINI, P. G. *Ty1* - and *Ty3/gypsy* -like retrotransposon sequences in *Helianthus* species. **Chromosoma**. v. 111, p. 192-200, 2002.

SAMUEL, R.; STUESSY, T. F.; TREMETSBERGER, K.; BAEZA, C. M.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Phylogenetic relationships among species of *Hypochoeris* (Asteraceae, Lactuceae) based on ITS, plastid trnL intron, trnL-F spacer and matK sequences. **Amer. J. Bot.** v. 90, p. 496-507, 2003.

STATON, S. E.; UNGERE, M. C.; MOORE, R. C. The genomic organization of *Ty3/gypsy* -like retrotransposons in *Helianthus* (Asteraceae) homoploid hybrid species. **American Journal of Botany**. v. 96, n. 9, p. 1646-1655, 2009.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Edward Arnold, London, UK, 1971.

STUESSY, T.F.; TREMETSBERGER, K.; MULLNER, A.N.; JANKOWICZ, J.; GUO, Y-P.; BAEZA, C.M.; SAMUEL, R.M. The melding of systematics and biogeography through investigations at the populational level: examples from the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). **Basic. Appl. Ecol.** n. 4, p. 287-296, 2003.

SUN, H.; DAI, H.; ZHAO, G.; MA, Y.; OU, C.; LI, H.; LI, L.; ZHANG, Z. Genome-wide Characterization of Long Terminal Repeat -retrotransposons in Apple Reveals the Differences in Heterogeneity and Copy Number between Ty1-copia and Ty3-gypsy Retrotransposons. **Journal of Integrative Plant Biology**. v. 50. n. 9. p. 1130-1139, 2008.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TERRAB, A.; ORTIZ, M.A.; TALAVERA, M.; ARIZA, M.J.; MORIANA, M.C.; GARRCÍA-CATAÑO, J.L.; TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.F.; BAEZA, M.; URTUBEY, E.; RUAS, C.F.; CASIMIRO-SORINGUER, R.; BALAO, F.; GIBBS, P.E.; TALAVERA, S. AFLP and breeding system studies indicate vicariance origin for scattered populations and enigmatic low fecundity in the Moroccan endemic *Hypochaeris angustifolia* (Asteraceae), sister taxon to all of the South American *Hypochaeris* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 53, p. 13-22, 2009.

TODOROVSKA, E. Retrotransposons and their role in plant – genome evolution. **Biotechnol. & Biotechnol.** v. 21, p. 294-305, 2007.

TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.F.; SAMUEL, R.M.; BAEZA, C.M.; FAY, M.F. Genetics of colonization in *Hypochaeris tenuifolia* (Asteraceae, Lactuceae) on Volcán Lonquimay, Chile. **Molecular Ecology**. v. 12, p. 2649-2659, 2003a.

TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.F.; GUO, Y.P.; BAEZA, C.M.; WEISS, H.; SAMUEL, R.M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. **Taxon**. v. 52, p. 237-245, 2003b.

TREMETSBERGER, K.; TALAVERA, S.; STUESSY, T. F.; ORTIZ, M. A.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; KADLEC, G. Relationship of *Hypochaeris salzmänniana* (Asteraceae, Lactuceae), an endangered species of the Iberian, **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 146. p. 79-95, 2004.

TREMETSBERGER, K.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; STUESSY, T.; SAMUEL, R.; KADLEC, G.; ORTIZ, M. A.; TALAVERA, S. Nuclear ribosomal DNA and karyotypes indicate a NW African origin of South American *Hypochaeris* (Asteraceae, Cichorieae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 36, p. 102-116, 2005.

TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.F.; KADLEC, G.; URTUBEY, E.; BAEZA, C.M.; BECK, S.G.; VALDEBENITO, H.; RUAS, C.F.; MATZENBACHER, N.I. AFLP phylogeny of South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). **Syst Bot**. v. 31. p. 610-626, 2006.

TSUKAHARA, S.; KOBAYASHI, A.; KAWABE, A.; MATHIEU, O.; MIURA, A.; KAKUTANI, T. Bursts of retrotransposition reproduced in Arabidopsis. **Nature**. v. 461, n. 17, 2009.

UNGERER, M. C.; STRAKOSH, S. C.; STIMPSON, K. M. Proliferation of *Ty3/gypsy*-like retrotransposons in hybrid sunflower taxa inferred from phylogenetic data. **BMC Biology**, v. 40, 2009.

VITTE, C.; BENNETZEN, J. L. Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution. **PNAS**. v. 103, n. 47, p. 17638-17643, 2006.

ZILBERMAN, D.; GEHRING, M.; TRAN, R. K.; BALLINGER, T.; HENIKOFF, S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. **Nature genetics**. 2006.

WANG, F.; TONG, Z.; SUN, J.; SHEN, Y.; ZHOU, J.; GAO, Z.; ZHANG, Z. Genome-wide detection of *Ty1-copia* and *Ty3-gypsy* group retrotransposons in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). **African Journal of Biotechnology**. v. 9, n. 50, p. 8583-8596, 2010.

WEISS, H.; STUESSY, T. F.; GRAU, J.; BAEZA, C. M. Chromosome reports from South American *Hypochoeris* (Asteraceae). **Ann. Missouri Bot. Gard.** v. 90, p. 53-63, 2003.

WEISS-SCHNEEWEISS, H.; STUESSY, T. F.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BAEZA, C.M.; PARKER, J. Karyotype evolution in South American species of *Hypochoeris* (Asteraceae, Lactuceae). **Plant Syst Evol.** v. 241, p. 171-18, 2003.

WEISS-SCHNEEWEISS, H.; STUESSY, T. F.; TREMETSBERGER, K.; URTUBEY, E.; VALDEBENITO, H.A.; BECK, S.G.; BAEZA, C.M. Chromosome numbers and karyotypes of South American species and populations of *Hypochoeris* (Asteraceae). **Bot. J. Linn. Soc.** v. 153, p. 49-60, 2007.

WEISS-SCHNEEWEISS, H.; TREMETSBERGER, K.; SCHNEEWEISS, G.M.; PARKER, J.S.; STUESSY, T.F. Karyotype diversification and evolution in diploid and polyploid South American *Hypochoeris* (Asteraceae) inferred from rDNA localization and genetic fingerprint data. **Ann. Bot.** v. 101, p. 909–918, 2008.

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MORGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, A. H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Publishing Group**. v. 8, p. 973- 982, 2007.