



**Universidade Estadual de Londrina**  
**Instituto Agronômico do Paraná**  
**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

---

**THIAGO FERNANDES**

**“CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DE *CESTRUM*  
(SOLANACEAE): MAPEAMENTO FÍSICO E  
PROTEÍNAS CROMOSSÔMICAS”**

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

**Orientador: *Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela***

---

Londrina  
2007

**THIAGO FERNANDES**

**“CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DE *CESTRUM*  
(SOLANACEAE): MAPEAMENTO FÍSICO E  
PROTEÍNAS CROMOSSÔMICAS”**

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

**Orientador:** *Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela*

Londrina  
2007

**THIAGO FERNANDES**

**“CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DE *CESTRUM*  
(SOLANACEAE): MAPEAMENTO FÍSICO E  
PROTEÍNAS CROMOSSÔMICAS”**

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.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela**  
Universidade Estadual de Londrina

**Profa. Dra. Maria Ap<sup>a</sup> Marin Morales**  
Universidade Estadual Paulista  
Rio Claro

**Profa. Dra. Lúcia Giuliano-Caetano**  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 28 de Fevereiro de 2007

*À minha mãe Márcia Maria Stringheta e familiares dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Sempre é difícil encontrar palavras que possam expressar com clareza sentimentos de agradecimento. Mas, uma vez finalizada essa dissertação de mestrado, não posso deixar de agradecer aqueles que me ajudaram, mesmo que de longe, a concluir esse trabalho da melhor maneira possível.

Meus agradecimentos são dirigidos primeiramente à minha mãe, Márcia Maria Stringheta, sem a qual não poderia ter começado esse trabalho. A educação que me proporcionou, cuidados e atenção, apoio e sacrifício econômico são a base de tudo o que sou agora. Estes agradecimentos se estendem a todos os membros de minha família, especialmente aos meus irmãos Raphael e Carolina.

É claro que essa dissertação não poderia ser terminada sem a ajuda e orientação do Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela, que não apenas tem sido um ótimo referencial em nível científico e profissional, fonte de idéias, de planos e de informações, como também um amigo além do ambiente de trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos às minhas companheiras de Laboratório: Priscila, Mariana e Letícia e ao companheiro Marcos Letaif Gaeta, pela amizade, paciência, disposição e pelo bom ambiente de trabalho que me proporcionaram.

Não poderia deixar de agradecer à melhor “metáfase” encontrada durante esse mestrado: a minha namorada Esther do Lago e Pretti. Seu apoio, companheirismo, carinho e motivação foram, e são, os pilares para cada realização por mim alcançada.

Os conselhos e orientações do Prof. Dr. José Marcelo e da bióloga Alba Lúcia Cavalheiro os quais me foram de valiosa ajuda durante todo esse período.

Ao Prof. Dr. Rogério pelo interesse demonstrado com o encaminhamento da minha tese, como também, pelos inúmeros bate-papos científico-culturais no laboratório.

Agradeço também aos funcionários do LABRE pelas contribuições, instruções e boas conversas, em especial aos funcionários Ed, Odair e “Seu” João.

A Suely pela longa e estimada paciência durante todas as minhas idas e vindas à secretaria do mestrado.

Finalmente agradeço à Universidade Estadual de Londrina e ao Mestrado em Genética e Biologia Molecular que me permitiram a realização desta dissertação.

FERNANDES, Thiago. **Citogenética em espécies de *Cestrum* (Solanaceae): Mapeamento físico e proteínas cromossômicas.** 2007. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

## RESUMO

Os representantes do gênero *Cestrum* são, em sua maioria, arbustos e pequenas árvores distribuídos nas regiões tropical e subtropical das Américas. Nesse trabalho, estudamos três espécies coletadas no Brasil (*C. capsulare*, *C. corymbosum* e *C. megalophyllum*) e uma na Argentina (*C. laevigatum*) utilizando as seguintes ferramentas citogenéticas: i) coloração convencional, ii) bandamento C-CMA<sub>3</sub>/DAPI e iii) hibridação *in situ* com as sondas de DNAr 45S e 5S. As quatro espécies apresentaram cariótipos com  $2n = 2x = 16$  e uma predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, exceto pelo menor par sempre acrocêntrico. Nossos resultados reforçam a idéia desse perfil cariotípico ser uma característica preservada dentro do gênero. O bandamento cromossômico e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) mostraram que a maioria dos segmentos de DNAs repetitivos parece seguir um modelo de dispersão equilocal/equidistante. Isso foi evidenciado principalmente para os blocos C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e para os cistrons de DNAr 45S que apareceram preferencialmente nas regiões terminais dos cromossomos, os blocos C-DAPI<sup>0</sup>/CMA<sub>3</sub><sup>0</sup> e *dots* C-DAPI<sup>+</sup> em regiões intercalares/subterminais e sítios para DNAr 5S sempre na região pericentromérica dos cromossomos. As diferenças encontradas no padrão de bandas entre as espécies aqui estudadas e as outras nove reportadas na literatura sugerem que os segmentos heterocromáticos encontrados em *Cestrum* apresentam uma dispersão por amplificação/contaminação equilocal entre heterólogos ou têm origem a partir de sítios iniciais de amplificação, ou seja, por amplificação não equilocal. Além do mais, o mapeamento físico dos diferentes segmentos heterocromáticos, aliado a outros mapas físicos realizados para *Cestrum*, sugere que as diferenças cariotípicas dentro do gênero ocorreram por mudanças nos diferentes classes de DNAs repetitivos, sem alterações significativas na composição geral dos cariótipos (tamanho e forma). Além do mapeamento físico, outro ponto estudado nesse trabalho foi o comportamento meiótico dos cromossomos Bs encontrados em alguns indivíduos de *Cestrum strigilatum* por coloração convencional e imunodeteção com anticorpos anti-H3 fosforilada. Esses cromossomos parecem ser eliminados durante a microsporogênese dessa espécie, principalmente durante a transição da meiose I para meiose II, ou, durante a formação da tétrade. O motivo de tal comportamento não pôde ser explicado totalmente através do padrão de fosforilação das histonas H3, contudo, evidenciou que tanto os Bs quanto os cromossomos do complemento A possuem um comportamento diferencial dos citados na literatura. Nossos dados reforçam as suposições sobre um possível papel secundário dessas proteínas nas divisões celulares, atuando provavelmente como sinalizadores para a cinética dos cromossomos. Em um estudo complementar, nós verificamos que a presença dos Bs não interfere na viabilidade dos grãos de pólen quando comparados indivíduos portadores e não portadores de Bs.

**Palavras-chave:** *Cestrum*, bandamento cromossômico, C-CMA<sub>3</sub>/DAPI, DNAr 45S e 5S, evolução cariotípica, cromossomos B, histonas H3, meiose e fosforilação.

## ABSTRACT

The representants of *Cestrum* are, in most part small arboreous and shrubs species, distributed in American tropical and subtropical areas. In this paper, three species collected in Brazil (*C. capsulare*, *C. corymbosum* e *C. megalophyllum*) and one in Argentina (*C. laevigatum*) have been studied using the following cytogenetical tools: i) conventional staining, ii) C-CMA<sub>3</sub>/DAPI banding and iii) *in situ* hybridization with 45S and 5S rDNA. Their karyotypes are constituted by  $2n=2x=16$  organized mainly in meta and submetacentric chromosomes, except for the last pair, always acrocentric. Our results strengths the idea that this karyotypic profile is a conserved characteristic in this genus. The chromosomic banding and the fluorescent FISH *in situ* hibridazation showed that most of the repetitive DNA segments follow a model of equidistant distribution. This has been seen mainly in C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> blocks and 45S rDNA cistrons located mainly in terminal chromosomal regions, in C-DAPI<sup>0</sup>/CMA<sub>3</sub><sup>0</sup> and C-DAPI<sup>+</sup> dots in sub terminal chromosomal regions and pericentromeric positions 5s rDNA sites. The differences found in the banding pattern among the species studied, and nine others reported in literature suggests that the heterocromatic segments found in *Cestrum* are dispersed by equilocal amplification/contamination among heterologous or are originated on initial sites of amplification, meaning, by equilocal amplification. Also, the physic mapping of the different heterocromatic segments, allied to other *Cestrum* physic maps , suggests that the karyotypic differences in the genus have occurred because of changes in the repetitive DNA classes, without significant changes in general composition of the karyotypes (size and shape). Beyond physical mapping, this study aimed to investigate the meiotic behavior of B chromosomes, found in some *Cestrum strigilatum* individuals, by conventional staining and imuno detection with fosforilated anti-H3 antibodies. Those chromosomes seem to be eliminated during microsporegenesis in this species, mainly during transition from meiosis I to meiosis II, or during formation of the tetrad. The reason for this behavior could not be totally explained by the pattern of H3 phosphorylation, though it has shown that both B chromosomes and A complement chromosomes have different behavior than those found in literature. Our data strengths the hypothesis of a potential secondary role of those proteins in cellular division, acting probably as signals for chromosome cinetics. In a complementary study, we have verified that Bs presence does not interfere in viability of pollen grains when compared with individuals that don't have them.

**Key-words:** *Cestrum*, chromosome banding, C-CMA<sub>3</sub>/DAPI, DNAr 45S and 5S, karyotypic evolution, B chromosome, histone H3, meiosis and phosphorylation.

## LISTA DE FIGURAS

### **1. Capítulo 1: Mapeamento Físico com DNAs repetitivos em espécies de *Cestrum* (Solanaceae).**

FIGURA 1: Coloração convencional (Giemsa) em <i>Cestrum</i> .....	43
FIGURA 2: Bandamento C-DAPI em <i>Cestrum</i> .....	44
FIGURA 3: FISH com as sondas de DNAr 45S e 5S em <i>Cestrum</i> .....	45
FIGURA 4: Idiogramas e mapeamento físico dos cromossomos de <i>Cestrum</i> .....	46

### **2. Capítulo 2: Transmissão, comportamento meiótico e fosforilação das histonas H3 do cromossomo B de *Cestrum strigilatum* (Solanaceae).**

FIGURA 1: Comparação entre pólen viável e inviável .....	64
FIGURA 2: Fases da meiose de <i>Cestrum strigilatum</i> com cromossomo B .....	66
FIGURA 3: Imunodeteção de H3 fosforilada na meiose de <i>Cestrum strigilatum</i> .....	67
FIGURA 4: Imunodeteção de H3 fosforilada em diferentes bivalentes de <i>Cestrum strigilatum</i> .....	68

## LISTA DE TABELAS

### **1. Capítulo 1: Mapeamento Físico com DNAs repetitivos em espécies de *Cestrum* (Solanaceae).**

TABELA 1: Espécies de *Cestrum* estudadas e os seus locais de coleta.....42

### **2. Capítulo 2: Transmissão, comportamento meiótico e fosforilação das histonas H3 do cromossomo B de *Cestrum strigilatum* (Solanaceae).**

TABELA 1: Números de Bs e proporções em diferentes fases da meiose.....65

TABELA 2: Quantidade de indivíduos portadores de B na progênie.....65

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>10</b>
1.1	A família Solanaceae e o gênero <i>Cestrum</i> .....	10
1.2	Aspectos citogenéticos de Solanaceae e do gênero <i>Cestrum</i> .....	13
1.2.1	Bandamento Cromossômico em Solanaceae .....	15
1.3	Cromossomos B e proteínas cromossômicas .....	21
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>MAPEAMENTO FÍSICO COM DNAs REPETITIVOS EM ESPÉCIES DE <i>CESTRUM</i> (SOLANACEAE).....</b>	<b>29</b>
3.1	Resumo: .....	29
3.2	Introdução .....	30
3.3	Materiais e Métodos .....	32
3.4	Resultados .....	34
3.5	Discussão .....	37
	Agradecimentos .....	41
	Referências .....	47
<b>4</b>	<b>TRANSMISSÃO, COMPORTAMENTO MEIÓTICO E FOSFORILAÇÃO DAS HISTONAS H3 DO CROMOSSOMO B DE <i>CESTRUM STRIGILATUM</i> (SOLANACEAE).....</b>	<b>51</b>
4.1	Resumo .....	51
4.2	Introdução .....	52
4.3	Materiais e Métodos .....	54
4.4	Coleta das amostras .....	54
4.5	Análise meiótica .....	55
4.6	Análise da frequência de Bs nas progênies (F1).....	55
4.7	Viabilidade dos grãos de pólen.....	56
4.8	Imunodeteção das histonas H3 fosforiladas .....	56
4.9	Discussão .....	59
	Agradecimentos .....	63
	Referências .....	69
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

---

### 1.1 A família Solanaceae e o gênero *Cestrum*.

Das ervilhas de Mendel ao tabaco de Alfred Hershey e Marta Chase, espécies vegetais têm participação direta e indireta em diversas descobertas científicas. Algumas espécies foram extremamente úteis para o entendimento de vários mecanismos biológicos, como por exemplo, a *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). Contudo, muito antes de serem importantes para o desenvolvimento científico, os vegetais são essenciais para o estabelecimento e a continuidade da vida no Planeta. As plantas constituem a base de sustentação de diversos ecossistemas e permitem a manutenção da vida de uma grande quantidade de organismos. Além disso, diversas espécies vegetais são importantes como fonte nutricional e para a extração de diversos compostos secundários de interesse ao homem.

A família Solanaceae Juss., como, muitas outras, insere-se perfeitamente nesse contexto. Entre as mais de 3.000 espécies dessa família, algumas são usadas na agricultura, como é o caso da batata (*Solanum tuberosum* L.), da berinjela (*Solanum melogena* L), do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e de vários tipos de pimenta (gênero *Capsicum* L.). Na medicina, a espécie *Atropa belladonna* L. é utilizada para a produção do alcalóide atropina, empregado em tratamentos oftalmológicos (HAWKES *et al.*, 1991), e algumas espécies do gênero *Solanum* são utilizadas para a extração de alguns lipídeos, empregados como agentes anti-tumorais (RODDICK, 1991). Além da utilização medicinal, os compostos extraídos de algumas solanáceas podem ser utilizados na agricultura como bioinseticidas ou no controle de microrganismos fitopatogênicos (HARBONE, 1991).

Representantes da família Solanaceae podem ser encontrados nos mais diversos ambientes e em todos os continentes, exceto no Antártico. No entanto, apesar da ampla distribuição, as espécies desta família ocorrem preferencialmente em regiões tropicais e

subtropicais. A América do Sul é o centro de maior diversidade taxonômica, com cerca de 50 gêneros endêmicos e aproximadamente 400 espécies (D' ARCY, 1991). As espécies de Solanaceae variam desde ervas efêmeras (gêneros *Leptoglossis* e *Schizantus*) encontradas no deserto Chileno, às grandes árvores do gênero *Duckeodron* que habitam a úmida floresta Amazônica. A ocupação de diferentes nichos resultou em uma grande variação morfológica dentro da família, sobretudo no que diz respeito aos tipos de flores e frutos. Com relação à morfologia floral, esta pode ser altamente ou levemente zigomórfica, como as encontradas em *Schizantus pinnatus* e *Hyoscyamus niger*, tubulares (gênero *Cestrum*) ou levemente actinomorfas, como as encontradas no gênero *Solanum* (KNAPP *et al.*, 2002). Os tipos de frutos podem ser, cápsulas, drupas, bagas, e alguns poucos frutos deiscentes não-capsulares podem ser encontrados nos mais de 90 gêneros da família. (KNAPP, 2002).

A família Solanaceae está incluída na subclasse Asteridae, ordem Solanales, sendo distinta das outras famílias que compõem esta ordem por possuir características como: óvulos e semente numerosos, dois carpelos obliquamente orientados, ausência de látex, cotilédones não plicados, estilete simples e estigma único, pouco ou nada lobado (CRONQUIST, 1988). O último tratamento taxonômico completo para a família fora realizado por Dunal (1852). Desde então, a organização filogenética da família sofreu grandes modificações, com gêneros realocados dentro de outras famílias, como também, formando suas próprias famílias. Recentemente, Hunziker (2001) realizou um tratamento completo para os gêneros da família, incluindo um novo sistema de classificação. Segundo o autor, a família pode ser dividida em seis subfamílias: Cestroidea, Juanulloideae, Solanoideae, Salpiglossoideae, Schizanthoideae e Anthocercidoideae.

*Cestrum*, juntamente com os gêneros *Sessea* e *Vestia* formam a tribo Cestreae G. Don (subfamília Cestroideae), a segunda maior tribo da família *Solanaceae*. Os representantes dessa tribo são, em sua maioria, arbustos e pequenas árvores distribuídos nas

regiões tropical e subtropical das Américas (HUNZIKER, 1976), sendo *Cestrum* o maior gênero da tribo, e o terceiro maior da família (JUDD *et al.*, 1999). Smith e Downs (1966) atribuíram como características morfológicas diagnósticas de *Cestrum* a corola tubular-infundibuliforme; a presença de cinco estames inclusos e soldados ao tubo da corola; poucas sementes comprimidas e embrião reto. Contudo, a relação entre *Cestrum* e *Sessea* vem sendo muito discutida pelo fato das espécies destes dois gêneros apresentarem algumas semelhanças morfológicas, diferindo, principalmente, pelo tipo de fruto: bacáceo em *Cestrum* e capsular alado em *Sessea*. Com base nessas semelhanças, Carvalho e Schnoor (1993/1997) transferiram a espécie *Sessea regnelli* Taub. para o gênero *Cestrum*, tratando-a como *Cestrum capsulare* Carvalho & Schnoor. Porém, segundo Sá (2002), esta posição é bastante discutida e talvez, no futuro, a espécie possa apresentar outro tratamento.

O Brasil concentra o maior número de espécies de *Cestrum*, cerca de 50 (HUNZIKER, 2001), das quais seis foram registradas na região da bacia do rio Tibagi, Centro-Norte do Paraná. São elas: *Cestrum amictum* Schlecht., *C. capsulare* Carvalho & Schnoor, *C. corymbosum* Schlecht., *C. intermedium* Sendtn., *C. sendtnerianum* Mart. Ex. Sendtn. e *C. strigilatum* Ruiz & Pav (SÁ, 2002). No entanto, novos levantamentos florísticos são necessários, principalmente em outras regiões do estado do Paraná, pois espécies como *C. laevigatum* Schldtl, *C. bracteatum* Link & Otto e *C. diurnum* L. são encontradas no estado de São Paulo, em áreas próximas ao estado do Paraná (<http://herbario.iac.sp.gov.br>).

Algumas espécies de *Cestrum* são de importância econômica, já que fornecem a base para a extração de compostos ativos como alcalóides, esteróides, saponinas e taninos (SCHULTES e RAFFAUF, 1991). Além disso, algumas espécies (*Cestrum intermedium*, *C. strigilatum* e *C. capsulare*) são utilizadas em programas de reflorestamento, como o desenvolvido pelo Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE), da Universidade Estadual de Londrina. Tais espécies são de estágio inicial de

sucessão florestal, além de possuírem frutos que servem como fonte de alimento para muitas espécies de aves e morcegos. Essa característica é de suma importância em programas de reflorestamento - já que mais de 60% do total das espécies arbóreas em florestas tropicais são zoocóricas (VAN DER PIJL, 1982). Isso favorece a atração de animais de áreas remanescentes vizinhas, possibilitando o fluxo gênico entre populações e a recolonização da área restaurada por mais espécies vegetais (CAVALHEIRO *et al.*, 2002).

## 1.2 Aspectos citogenéticos de Solanaceae e do gênero *Cestrum*.

Contagens cromossômicas realizadas por Moscone (1992), mostraram que a família Solanaceae exibe números cromossômicos básicos variando de  $x=7$  a  $x=13$ , sendo  $x=12$  o mais comum, já que ocorre em mais de 50% das espécies estudadas até o momento. Contudo, essa amplitude cromossômica não é encontrada em todas as subfamílias de Solanaceae. Um levantamento realizado por Hunziker (2001) mostrou que a subfamília Cestroideae é a mais heterogênea do ponto de vista cariotípico, com uma amplitude de números básicos variando de  $x=7$  a  $x=13$ , seguida por Solanoideae ( $x=10$ ,  $x=12$ ,  $x=14$ ,  $x=17$ ). Nesse mesmo levantamento, cariótipos com  $x=9$  e  $x=10$  foram reportados para *Anthocercidoideae*, e  $x=11$  e  $x=10$  para as subfamílias *Sapliglosssoideae* e *Schizanthoideae*. Informações sobre a subfamília *Juanulloideae* foram muito fragmentadas para permitir generalizações.

Apesar da grande amplitude de números cromossômicos, a análise cariotípica por coloração convencional de alguns gêneros da família revelou que, independente do número cromossômico, cariótipos simétricos e com a prevalência de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos são comuns na família (BERNARDELLO e ANDERSON, 1990; BERNARDELLO e HEISER, 1994; PILLEN *et al.*, 1996; POZZOBON *et al.*, 2006). Além do mais, Bernardello e Anderson (1990) estudaram 18 das 22 espécies de

*Solanum* da seção *Basarthrum*, e detectaram que as espécies com menores comprimentos cromossômicos tiveram maior simetria cariotípica, enquanto que as espécies com comprimento maior foram mais assimétricas.

Estudos citogenéticos realizados em gêneros da tribo *Cestreae*, mostraram uma constância de cariótipos com  $2n=2x=16$  (BERG e GREILHUBER, 1992, 1993a, b; FREGONEZI *et al.*, 2006; LAS PENAS *et al.*, 2006), sendo a única alteração numérica encontrada dentro da tribo devido à ocorrência de cromossomos Bs em algumas espécies de *Cestrum* (SÝKOROVÁ *et al.*, 2003b; FREGONEZI *et al.*, 2004). Uma característica que chama a atenção em *Cestreae* é que os representantes dessa tribo possuem os maiores cromossomos da família, podendo medir até 14  $\mu\text{m}$  (BERG e GREILHUBER, 1992, 1993a, b; FREGONEZI *et al.*, 2006; LAS PENAS *et al.*, 2006). Em outros gêneros como *Solanum* e *Capsicum* os cromossomos são menores, entre 1,2 - 2,4  $\mu\text{m}$  e 3,5 - 4,0  $\mu\text{m}$ , respectivamente (BERNARDELLO e ANDERSON, 1990; MOSCONE *et al.*, 1993; BERNARDELLO *et al.*, 1994).

Assim, como para os outros gêneros da família, uma predominância de cromossomos meta e submetacêntricos também foram encontradas em *Cestreae*, porém o menor par cromossômico é geralmente submetacêntrico ou subtelocêntrico (BERG e GREILHUBER, 1992, 1993a, b; FREGONEZI *et al.*, 2006; LAS PENAS *et al.*, 2006). Desta forma, cromossomos meta e submetacêntricos parecem ser comuns para a família independente do gênero, do número cromossômico e do tamanho dos cromossomos, como anteriormente citado.

Recentemente, Las Penas *et al.* (2006) estudaram diferentes espécies dos três gêneros de *Cestreae* (*C. bigibosum* Pittier, *C. buxifolium* Kunth, *Sessea corymbiflora* Goudot ex Taylor e Phillips e *Vestia foetida* Ruiz e Pav) quanto ao tamanho, o número cromossômico e a simetria dos cariótipos. Com base nos dados obtidos, estes autores

sugeriram que na diversificação cariotípica em *Cestreae* pode ter ocorrido uma leve assimetria acompanhada pelo aumento do tamanho do genoma. Estes autores ainda sugeriram para *Vestia foetida* uma posição filogenética basal, já que foi a espécie que apresentou o cariótipo menor e mais simétrico. Porém, estes autores não forneceram nenhuma explicação para os possíveis eventos relacionados à manutenção desta simetria, tampouco relacionaram a simetria e o tamanho dos cromossomos com eventos de amplificação e distribuição de DNAs repetitivos.

### **1.2.1 Bandamento Cromossômico em Solanaceae**

A diferenciação linear dos cromossomos por técnicas de bandamento cromossômico tem possibilitado acessar caracteres adicionais e úteis na análise citotaxonômica e no entendimento dos processos de acúmulo e dispersão de heterocromatina em plantas (COSTA, 2002). Tais informações podem ainda indicar mudanças na simetria via alterações nos DNAs repetitivos. A distribuição da heterocromatina no complemento cromossômico é bem variável nas angiospermas, não havendo relação qualitativa e quantitativa segura entre diferentes espécies. Além disso, a quantidade de heterocromatina em uma espécie pode variar independentemente da quantidade de euromatina e do conteúdo de DNA, não havendo também uma relação direta com o tamanho dos cromossomos. Desta forma, aparentemente, a heterocromatina não possui um significado funcional e evolutivo comum para todas as espécies (GUERRA, 2000).

Dentre os estudos citogenéticos que abordaram a heterocromatina em Solanaceae, o realizado por Moscone *et al.* (1993) em espécies de *Capsicum* (pimenta) foi muito ilustrativo. Nesse estudo, esses autores realizaram bandamento C-Giemsa e encontraram diferenças significativas em relação à quantidade e a distribuição de heterocromatina entre as seis espécies de *Capsicum*, o que permitiu separar essas espécies em

dois grupos distintos. O primeiro grupo englobou espécies que apresentaram pequenas bandas terminais e marcações intersticiais raras ou ausentes, formado por *Capsicum chacoense*, *C. parvifolium*, *C. annuum* var *annuum* e *C. baccatum* var *pendulum*. Neste grupo, as proporções de bandas C por complemento apresentaram valores mínimos em *C. chacoense* e máximos em *C. baccatum* var *pendulum*, com 4 e 12% respectivamente. No segundo grupo, foram colocadas *C. pubescens* e *C. campylopodium* já que mostraram 33% do complemento composto por heterocromatina formando grandes blocos terminais e bandas intercalares. Esses padrões de bandamento aliados a dados morfológicos, isoenzimáticos e fitogeográficos permitiram aos autores sugerir que em *Capsicum* o aumento do conteúdo de heterocromatina dentro do gênero representa uma característica apomórfica e possivelmente, *C. chacoense* e *C. parvifolium* são espécies ancestrais na evolução do gênero.

Um grande enriquecimento no conhecimento sobre as regiões heterocromáticas foi dado após a utilização concomitante de fluorocromos como o 4'-6 diamidino - 2 fenilindol (DAPI) e a cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>). Estes corantes fluorescentes tornaram possível a determinação dos tipos de bases presentes em regiões heterocromáticas, uma vez que o DAPI liga-se preferencialmente em regiões ricas em adenina e timina (AT), enquanto que o CMA<sub>3</sub> liga-se preferencialmente em regiões ricas em citosina e guanina (GC) (SHARMA e SEN, 2002).

Além da coloração diferencial por fluorocromos, uma característica peculiar de alguns segmentos heterocromáticos tem se mostrado interessante para a obtenção de marcas cromossômicas. Tais segmentos possuem um comportamento especial quando meristemas são mantidos em baixas temperaturas, aparecendo com um aspecto descondensado, ou fino, e pouco corado, seja com Giemsa, orceína ou outros corantes inespecíficos. Esses segmentos foram primeiramente descritos por Darlington e LaCour (1938) e, devido as suas propriedades, foram chamados de regiões sensíveis ao frio (*cold*

*sensitive regions* ou simplesmente CSRs). Em plantas, CSRs foram encontradas em cerca de 11 gêneros de monocotiledôneas e em apenas três de dicotiledôneas. Até o momento, quatro classes de CSRs foram identificadas: C-Giemsas<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup> (BERG e GREILHUBER, 1992, 1993, a, b; PUNINNA *et al.*, 2001; FREGONEZI *et al.* 2006), C-Giemsas<sup>+</sup>/CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (BENKO-ISEPPONN e MORAWETZ, 1993) C-Giemsas<sup>+</sup>/DAPI<sup>0</sup>/CMA<sub>3</sub><sup>0</sup> e C-Giemsas<sup>+</sup> sem fluorescência (FREGONEZI *et al.* 2006). Desta forma, a sensibilidade ao frio de alguns segmentos heterocromáticos não pode ser um fenômeno relacionado às quantidades de bases AT ou GC, mas talvez da qualidade das proteínas associadas, ou de diferentes níveis de metilação entre os segmentos heterocromáticos (FREGONEZI *et al.*, 2006).

Até o momento, a identificação e o mapeamento físico de diferentes tipos de segmentos heterocromáticos dentro da tribo *Cestreae* foram realizados apenas em poucas espécies do gênero *Cestrum*. Berg e Greilhuber (1992, 1993a, b) estudaram o cariótipo de cinco espécies de *Cestrum* (*C. elegans* (Brong.) Schldtl, *C. fasciculatum* Miers, *C. parqui* L'Herit e *C. strigilatum*) e encontraram quatro tipos diferentes de heterocromatina: i) grandes blocos não relacionados às regiões organizadoras de nucléolos (RONS); (ii) pequenos blocos (*dots*) em regiões intercalares, proximais ou distais (iii) bandas CMA<sub>3</sub> positivas associadas às regiões organizadoras de nucléolo (RON); e (iv) bandas DAPI positivas associadas às regiões sensíveis ao frio. Mais recentemente, Fregonezi *et al.* (2006), encontraram esses mesmos tipos heterocromáticos em *C. amictum*, *C. intermedium*, *C. sendtnerianum* e *C. strigilatum*, além de outros três novos tipos: (i) bandas neutras C-CMA<sub>3</sub><sup>0</sup>/DAPI<sup>0</sup>, (ii) bandas CMA<sub>3</sub> positivas não associadas às RONS, e (iii) bandas C-Giemsas/CSR/DAPI negativo. Assim, todas essas informações indicam que, apesar da grande estabilidade cariotípica encontrada nas espécies de *Cestrum*, quando analisadas por técnicas de coloração convencional, internamente os cromossomos são organizados diferentemente quanto ao tipo e a distribuição dos diferentes segmentos heterocromáticos. Estas informações vão de acordo com o fato da maior fração

genomas de eucariontes superiores ser formada por DNAs repetitivos, os quais podem estar localizados em alguns sítios cromossômicos bem estabelecidos ou dispersos pelo genoma (SCHIMIDT e HELSOP-HARRISON, 1998). Nos cromossomos, a composição, a estrutura, a origem, o aumento e a diminuição dessas seqüências têm sido as principais ferramentas para estudar a evolução dos cariótipos e, por conseqüência, a variabilidade genética (SHARMA E SEN, 2002).

Avanços na área da Biologia Molecular, aliados ao número cada vez maior de informações resultantes do seqüenciamento de DNA, propiciaram a identificação de diversas classes de DNAs em genomas vegetais (HESLOP-HARRISON, 2000). Dentre a as seqüências de DNAs repetitivos melhor estudadas podemos citar: i) seqüências teloméricas - responsáveis pela manutenção de uma unidade linear de replicação e pela proteção das regiões terminais do cromossomo, ii) unidades de DNA ribossomal (DNAr 45S e 5S) as quais codificam RNAs ribossômicos que irão compor a subunidades dos ribossomos e iii) elementos móveis, representados pelos retroelementos (os quais utilizam a transcriptase reversa para produzir uma molécula de DNA complementar que será inserida no genoma, resultando em seqüências dispersas ou agrupadas em regiões cromossômicas distintas) e transposons, em que o efeito de transposição não acarreta no aumento do número de cópias desse segmento no genoma (SCHIMIDT e HELSOP-HARRISON, 1998).

Todos os tipos de seqüências repetitivas, em blocos ou dispersas, podem ser altamente variáveis, e a sua evolução normalmente rápida pode provocar mudanças tanto na distribuição quanto na abundância dessas seqüências em diferentes genomas. Além disso, o grande número de cópias e a tendência à formação de blocos fazem dos DNAs repetitivos sondas ideais para experimentos de hibridação *in situ*, já que fornecem a localização física desses DNAs no complemento cromossômico, o que não pode ser obtido por outras metodologias (SCHWARZACHER, 2003).

Dentre os segmentos de DNA repetitivos empregados em estudos citogenéticos, os mais usados são aqueles que codificam os RNAs ribossomais. Em plantas, os RNAs ribossômicos podem ser classificados de acordo com o seu coeficiente de Svedberg em 5S, 5,8S, 18S e 25S. Os RNAs ribossomais 5,8S, 18S e 25S são originados após o *splicing* de um transcrito primário codificado por um cistron chamado de DNAr 45S, o qual ocorre em grandes blocos de repetições *em tandem* (aproximadamente 10-20 kb) em um ou mais sítios cromossômicos (NEVES *et al.*, 2005). O gene responsável pela transcrição do DNAr 5S (DNAr 5S) também ocorre em repetições *em tandem* e em um ou mais sítios cromossômicos, porém, na maioria das vezes, separados dos DNAr 45S. Tanto as seqüências de DNAr 45S como o 5S são altamente conservadas, permitindo que sondas originalmente isoladas de trigo (GERLACH E BEDBROOK, 1979) possam ser utilizadas na localização desses genes em diferentes espécies de eucariontes. Dessa forma, a característica conservada dessas seqüências e a sua presença em um ou mais sítios cromossômicos fizeram do DNAr 45S e 5S importantes marcas cromossômicas para estudos citogenéticos (HELSOP-HARRISON, 2000)

Em *Cestrum*, o primeiro trabalho envolvendo a localização de DNAs repetitivos por FISH foi realizado em um refinado experimento desenvolvido por Sýkorová *et al.* (2003a). Nesse trabalho, os autores realizaram hibridização *in situ*, PCR, *slot-blot* e *Southern blot*, e encontraram que *Cestrum*, *Vestia* e *Sesseeae* possuem seqüências teloméricas diferentes daquelas presentes em *Aradabidopsis*, comuns para a maioria dos vegetais. Esse foi o primeiro relato da ausência de repetições teloméricas do tipo (TTTAGGG)<sub>n</sub> em dicotiledôneas, e sustentam ainda mais a proposição da tribo como sendo composta somente por *Cestrum*, *Vestia* e *Sesseeae*.

A ausência de seqüências teloméricas do tipo *Aradabidopsis* nos gêneros de *Cestreeae* levou esses autores a realizar um segundo trabalho no qual propuseram a substituição da seqüência telomérica padrão pela seqüência 5'-T<sub>(4-5)</sub>AGCAG-3', a qual teria

assumido a mesma função nos telômeros em um possível ancestral a estes gêneros (SÝKOROVÁ *et al.*, 2003b). Nesse mesmo trabalho, seqüências de DNA repetitivos, entre elas uma família de minissatélites ricas em A/T, foram localizadas por FISH aparecendo dispersas e geralmente associadas com regiões “teloméricas intersticiais” em algumas espécies de *Cestrum*. Para os autores, essas seqüências ricas em A/T podem estar associadas a processos de recombinação e fusão cromossômica, os quais resultaram no aumento do genoma em *Cestrum*. Além disso, esses autores encontraram uma colocação incomum de segmentos de DNAr 45S e 5S no cromossomo B de *C. parqui*. Vale lembrar que a ocorrência de DNAs ribossomais em cromossomos B é pouco comum, sobretudo colocados em uma mesma região cromossômica. Além disso, tais características não foram observadas até o momento em nenhuma outra espécie de Solanaceae.

Fregonezi *et al.* (2006) também realizaram hibridação *in situ* com sondas de DNAr 45S e 5S nas espécies *Cestrum amictum*, *C. intermedium*, *C. sendterianum* e *C. strigilatum*. Nesse estudo, os autores reportaram a presença de sítios de DNAr 45S sempre em posições terminais ou subterminais, com variações no número de sítios e no par cromossômico ocupado. Por outro lado, em todas as espécies, o DNAr 5S apareceu sempre na região pericentromérica do braço longo do par oito. Os dados obtidos por Fregonezi *et al.* (2006), quando analisados juntamente com outros trabalhos, como os desenvolvidos por Berg e Greilhuber (1992, 1993, a, b) e Sýryková *et al.* (2003, a, b), sugerem que a diferenciação cariotípica encontrada entre espécies de *Cestrum* possa ter ocorrido principalmente por alteração dos segmentos de DNA repetitivo. Além do mais, algumas tendências podem ser notadas, como a distribuição equilocal das seqüências entre DNAr 45S (terminais ou subterminais), o sítio de DNAr 5S sempre ocupando a região pericentromérica do par 8 e a prevalência de segmentos heterocromáticos ricos em AT e pequenos *dots* (inconstantes) em regiões intercalares de todas as espécies estudadas. Porém, o pequeno número de espécies

estudadas citogeneticamente (apenas 9) e a escassez de informações filogenéticas dentro da tribo, não permitem dizer se durante a evolução cariotípica de *Cestrum* houve uma tendência ao acúmulo ou à eliminação de segmentos heterocromáticos. Para tal, novas espécies de *Cestrum*, *Sesseae* e *Vestia* necessitam ser citogeneticamente estudadas.

### 1.3 Cromossomos B e proteínas cromossômicas

Além dos segmentos repetitivos encontrados nos genomas eucarióticos (cromossomos A), existem também elementos genéticos que não obedecem às leis Mendelianas de herança. Esses elementos, conhecidos como cromossomos B, ou extranumerários, são reconhecidos porque variam em tamanho, forma e composição do DNA com relação ao complemento normal, e, sobretudo, por não formarem sinapse com os cromossomos do complemento A. Os Bs podem estar presentes ou ausentes em determinados tecidos, indivíduos ou populações, e provavelmente têm sua origem a partir do complemento A através de diferentes mecanismos (CAMACHO *et al.*, 2000). A importância biológica e o significado adaptativo destes cromossomos em populações naturais ainda são incertos. No entanto, é importante ressaltar que tais cromossomos já foram encontrados em dezenas de espécies de angiospermas, gimnospermas, pteridófitas, briófitas e fungos (JONES e HOUBEN, 2003).

Até o momento relatos abordando os efeitos fenotípicos atribuídos à presença de cromossomos Bs são raros. Os principais exemplos encontrados na literatura mostram a alteração de cor em aquênios em *Haplopappus glaberrimus* (JACKSON e NEWMARK, 1960), a resistência a antibióticos no fungo *Nectria haematococca* (MIAO *et al.*, 1991) e a formação de folhas listradas em milho (STAUB, 1987). Contudo, na maioria dos casos, esses cromossomos exercem efeitos negativos sobre caracteres como o vigor, a fertilidade e a fecundidade do organismo hospedeiro, principalmente em indivíduos com um

elevado número de Bs (JONES e REES, 1982; GONZÁLES-SÁNCHEZ *et al.*, 2004). Estes distintos efeitos fenotípicos causados pelos cromossomos Bs deram origem a dois modelos para explicar como esses cromossomos são mantidos em populações naturais. No primeiro modelo, chamado de heterótico, um baixo número de Bs em um indivíduo poderia conferir vantagens adaptativas, e assim aumentar em frequência em algumas populações (WHITE, 1973). Em contraposição ao modelo heterótico, alguns pesquisadores classificam os Bs como cromossomos parasitas (ÖSTERGREN, 1945), ou como um tipo DNA egoísta que se mantém nas populações naturais por mecanismos próprios (JONES, 1985). Contudo, nenhum desses modelos é completamente explicado.

Se até o momento os motivos pelo quais os Bs são mantidos em populações naturais permanecem pouco compreendidos, os mecanismos de transmissão e acúmulo desses cromossomos parecem estar um pouco mais claros. Tais mecanismos estão relacionados à não-disjunções ocorridas durante a gametogênese, como também, por fecundação preferencial por gametas carregando Bs (BEUKEBOOM, 1994). Mecanismos gênicos controlando a taxa de transmissão de Bs já foram identificados em arroz (PUERTAS *et al.*, 1998) e milho (GONZÁLES-SÁNCHEZ *et al.*, 2003). Em arroz o controle da taxa de transmissão é realizado pelo próprio B, já em milho, o mecanismo é muito mais complexo, sendo realizado por genes autossômicos. Em ambas as espécies, linhagens com alta e baixa transmissão de Bs já foram identificadas (ver Jones e Houben, 2003).

Cromossomos B foram encontrados em *Cestrum parqui*, no híbrido entre *C. parqui* × *C. aurantiacum* (SÝKOROVÁ *et al.*, 2003b), e em *Cestrum strigilatum* e *C. intermedium* (FREGONEZI *et al.*, 2004). Segundo estes autores, os Bs destas quatro espécies são similares em tamanho e forma, quando observados por coloração convencional. Porém, são compostos por diferentes famílias de DNA repetitivo, dentre as quais se destacam os segmentos de DNAr 5S e 45S e um segmento de 405 pb contendo a família de minissatélite

BR23 (5'-A<sub>4-5</sub>CTGCT-3') em *C. parqui* (SÝKOROVÁ *et al.*, 2003b) e bandas C-Giemsa, bandas CMA<sub>3</sub><sup>0</sup>/DAPI<sup>0</sup> e uma família do retroelemento *Ty3-gypsy* em *C. strigilatum* e *C. intermedium* (FREGONEZI *et al.*, 2004). Todavia pouco se conhece a respeito da distribuição e da transmissão desses cromossomos nessas espécies, exceto por variações intra e inter-individuais no número de Bs decorrente da sua eliminação em tecidos somáticos (FREGONEZI *et al.*, 2004).

Independente da espécie hospedeira, e da organização interna dos Bs, parece que as variações observadas na frequência desses cromossomos é devido a uma segregação irregular na meiose e na mitose (CAMACHO *et al.*, 2000). Dessa forma, o comportamento anormal desses cromossomos durante as divisões celulares pode estar relacionado a alterações em eventos cruciais das divisões como: os processos de iniciação, a condensação e a cinética dos cromossomos (SCHWARZACHER, 2003). Alguns processos citológicos das divisões celulares são influenciados e sinalizados por modificações pós-traducionais de proteínas cromossômicas, como por exemplo, as histonas. Trabalhos recentes têm demonstrado que durante as divisões celulares, a condensação e a segregação dos cromossomos e cromátides são influenciadas por fosforilação, acetilação e metilação das proteínas cromossômicas, como as fosforilações nas histonas H3 reportado por Hendzel *et al.* (1997) e Manzanero *et al.* (2000). Essas modificações pós-traducionais são reversíveis e podem ocorrer em diferentes resíduos da cauda N-terminal das histonas (NOWAK e CORSES, 2004) e, geralmente, a modificação em um resíduo leva a modificações no resíduo vizinho (veja PRIGENT e DIMITROV, 2003). Com relação à histona H3, a fosforilação na serina 10 tem sido relacionada à compactação cromossômica durante a mitose de organismos totalmente divergentes como *Tetrahymena thermophila* (protozoário), *Aspergillus nidulans* (fungo), *Caenorhabditis elegans* (nematóide), plantas e vertebrados (ver HANS e DIMITROV, 2001). No entanto, essa relação parece não ser universal, pois mutantes de *Sacharomices cerevisiae*

com ausência de fosforilação na serina 10 da histona H3 (H3/ser10) apresentaram ciclo celular idêntico às linhagens selvagens (HSU *et al.*, 2000). Em *Xenopus*, a fosforilação da H3/ser10 está relacionada com a descondensação cromossômica (PRIGENT e DIMITROV, 2003).

Diferenças no padrão de fosforilação da H3/ser10 foram encontradas na mitose e na meiose de animais e plantas. Na mitose animal, a fosforilação inicia-se na região pericentromérica dos cromossomos no final do período G2 e, durante a prófase, os cromossomos apresentam-se inteiramente fosforilados, sendo mantidos assim até a anáfase, quando começam a desfosforilar (HENDZEL *et al.*, 1997). Esse mesmo padrão de fosforilação também foi encontrado na meiose animal (WEI *et al.*, 1999; COBB *et al.*, 1999). Por outro lado, em plantas, a fosforilação tem início na prófase, também nas regiões pericentroméricas dos cromossomos, porém, este padrão persiste até a metáfase, ou seja, os cromossomos não são inteiramente fosforilados (HOUBEN *et al.*, 1999). Surpreendentemente, durante a meiose I (MI) os cromossomos de algumas espécies vegetais aparecem inteiramente marcados e na meiose II (MII) repete-se o padrão observado durante a mitose (marcações apenas nas regiões pericentroméricas). Do mesmo modo que ocorre em animais, em plantas, a desfosforilação dos cromossomos tem início na transição anáfase/telófase. Contudo, na meiose vegetal a fosforilação da H3/ser10 parece não estar diretamente relacionada com a condensação cromossômica, mas sim com o pareamento e a estabilidade dos bivalentes (KASZÁS e CANDE, 2000; MANZANERO *et al.*, 2000).

Embora ainda não exista uma função bem definida para a fosforilação da H3/ser10 durante as divisões celulares em vegetais, a sua ausência já foi relatada para alguns comportamentos cromossômicos anormais. Brasileiro-Vidal *et al.* (2005) não encontraram sinais de fosforilação em cromossomos formando pontes anafásicas, em cromátides retardatárias e em fragmentos cromossômicos em um híbrido entre *Triticum aestivum* e

*Thinopyrum ponticum*. Além disso, Manzanero *et al.* (2000) demonstraram que quando cromossomos univalentes de trigo e cromossomos Bs de arroz dividem-se equacionalmente em MI (anfitelia) originam cromátides que não fosforilam em MII. Tais informações levaram Manzanero *et al.* (2000) a proporem que a fosforilação da H3/ser10 não esteja relacionada com a cinética dos cromossomos durante a MII, mas sim com separação das cromátides irmãs, já que cromátides originadas por anfitelia ligaram-se normalmente as fibras do fuso.

Até o momento muitas perguntas sobre o efeito da fosforilação das H3/ser10 nas divisões celulares em vegetais necessitam de respostas. As informações até agora obtidas mostram que a imunofluorescência com anticorpos antiproteínas cromossômicas pode ser uma ferramenta útil para a compreensão desses eventos relacionados com as divisões celulares, sobretudo no que diz respeito ao pareamento cromossômico e a separação dos cromossomos homólogos e das cromátides irmãs. Adicionalmente, tais ferramentas parecem ser mais úteis ainda quando se trata dos cromossomos Bs, já que são incompreendidos por alguns e desacreditados por outros. É possível que o uso de anticorpos anti-proteínas cromossômicas forneçam muitas respostas no que diz respeito à segregação não mendeliana e à transmissão materna ou paterna dos cromossomos Bs.

## 2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

---

Até o momento, trabalhos citogenéticos em espécies de *Cestrum* reportaram uma constância cariotípica quando observados convencionalmente. Porém, tais cariótipos exibem uma riqueza qualitativa e quantitativa em famílias de DNA repetitivos distribuídos (dispersos ou em blocos) ao longo de seus cromossomos, sobretudo as famílias heterocromáticas. Apenas nove espécies de *Cestrum* foram estudadas quanto à distribuição desses segmentos e este número reduzido de estudos não permite sugerir modelos de organização e diferenciação cariotípica para o grupo. Desse modo, o mapeamento físico de DNAs repetitivos em novas espécies de *Cestrum* pode trazer uma contribuição extremamente útil para verificar os processos envolvidos na dinâmica dos DNAs repetitivos e sua influência no processo de diferenciação cariotípica no gênero. Tais informações podem também ser de fundamental importância para estudos taxonômicos e evolutivos, já que *Cestrum* é um grupo considerado derivado na família Solanaceae.

Outra característica citológica interessante encontrada em *Cestrum* é a presença de cromossomos Bs em algumas espécies, como por exemplo, em *Cestrum strigilatum*. Variações observadas na frequência de Bs acontecem porque estes cromossomos não segregam regularmente na meiose e na mitose. Para entender esta dinâmica, são necessários estudos sobre fatores que regulam e interferem na segregação dos Bs, bem como os possíveis efeitos desses cromossomos sobre as características reprodutivas das espécies hospedeiras. O fato dos cromossomos Bs não parearem com outros cromossomos e não apresentarem um comportamento tipicamente mendeliano, sugerem que outros fatores podem interferir na cinética destes cromossomos nas divisões celulares, principalmente por modificações pós-tradução de proteínas cromossômicas, como por exemplo, a fosforilação diferencial das histonas H3. Sendo assim, os seguintes objetivos foram traçados para este trabalho:

1) Caracterizar os cariótipos de quatro espécies do gênero *Cestrum*: *C. capsulare* Carvalho & Schoonor, *C. corymbosum* Schlecht, *C. laevigatum* Schltldl. e *C. megalophyllum* Dunal, utilizando as seguintes ferramentas citogenéticas: i) coloração convencional, ii) bandamento C-CMA<sub>3</sub>/DAPI e iii) hibridação *in situ* com as sondas de DNAr 45S e 5S.

2) Utilizar os resultados obtidos pela caracterização cariotípica das quatro espécies para gerar mapas físicos e compará-los com os mapas gerados para as outras nove espécies estudadas anteriormente e com isto contribuir para a elaboração de um modelo de evolução cariotípica para o gênero.

3) Verificar e compreender: (i) o comportamento, a transmissão e a distribuição dos cromossomos B em *Cestrum strigilatum*, utilizando informações sobre a frequência de células com B na meiose, a frequência de Bs nas progênes e o comportamento dos cromossomos As e Bs frente ao padrão de fosforilação das histonas H3 e (ii) verificar o efeito da presença dos cromossomos B sobre a viabilidade dos grãos de pólen em plantas portadoras, em comparação com as não portadoras de Bs.

## CAPÍTULO 1

---

### Mapeamento Físico com DNAs repetitivos em espécies de *Cestrum* (Solanaceae)

\*Este capítulo será enviado para publicação na revista *Plant Systematics and Evolution*.

## Mapeamento Físico com DNAs repetitivos espécies de *Cestrum* (Solanaceae)

### Resumo:

*Cestrum* (Solanaceae) é um gênero com representantes arbóreo-arbustivos, distribuídos pelas Américas tropical e subtropical. Estudos prévios mostraram um número cromossômico  $2n=2x=16$ , com predominância de tipos meta e submetacêntricos, e diversas classes de heterocromatina. Neste estudo, algumas espécies e populações brasileiras do gênero foram caracterizadas citogeneticamente pela primeira vez, através de coloração convencional, com bandamentos C-CMA<sub>3</sub>/DAPI e FISH com as sondas de DNA 45S e 5S. Todas as espécies mostraram  $2n=2x=16$ , com a predominância de cromossomos meta e submetacêntricos, com exceção do menor par cromossômico, o qual foi acrocêntrico. Vários tipos heterocromáticos foram identificados e variaram em tamanho, número, posição e composição dentro e entre as espécies. Blocos C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e cistrons de DNAr 45S apareceram preferencialmente nas regiões terminais dos cromossomos e os blocos C-DAPI<sup>0</sup>/CMA<sub>3</sub><sup>0</sup> e dots C-DAPI<sup>+</sup> em regiões intercalares/subterminais dos cromossomos. Pela primeira vez, sítios para DNAr 5S foram descritos em uma região não correspondente ao último par, embora, como também em outras espécies, foi encontrado na região pericentromérica de um par cromossômico de *C. capsulare*. As diferenças encontradas no padrão de bandas entre as espécies aqui estudadas, e as outras nove reportadas na literatura, sugerem que os segmentos heterocromáticos encontrados em *Cestrum* apresentam uma dispersão por amplificação/contaminação equilocal entre heterólogos ou a partir de sítios iniciais de amplificação (amplificação não equilocal), porém, sem alterações significativas na composição geral dos cariótipos (tamanho e forma).

**Palavras-chave:** *Cestrum*, bandamento cromossômico, C-CMA<sub>3</sub>/DAPI, DNAr 45S e 5S, evolução cariotípica.

## Introdução

A tribo Cestreae G. Don, a segunda maior da família Solanaceae, é formada pelos gêneros *Cestrum*, *Sessea* e *Vestia*. Seus representantes são, na maioria, arbustos e pequenas árvores distribuídos nas regiões tropical e subtropical das Américas (Hunziker 1976). *Cestrum* é o maior gênero da tribo, e o terceiro maior da família (Judd *et al.* 1999), e o Brasil é o país com a maior concentração de espécies deste gênero, com cerca de 50 (Hunziker 2001).

Estudos citogenéticos realizados em Cestreae foram feitos em algumas poucas espécies, as quais abordaram contagens cromossômicas, bandamento, localização física de sítios de DNAr, bem como o isolamento de uma família de microsátelite e outra de retroelemento. O número cromossômico  $2n = 2x = 16$  é constante para a tribo, e os cariótipos são simétricos com a predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. A tribo também é conhecida por apresentar os maiores cromossomos da família, podendo medir até 14  $\mu\text{m}$  (Berg e Greilhuber 1992, 1993a; b; Fregonezi *et al.* 2006; Las Penas *et al.* 2006). Em outros gêneros, como *Solanum* e *Capsicum*, os cromossomos são bem menores, medindo entre 1,2 a 2,4  $\mu\text{m}$  e 3,5 a- 4,0  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Bernardello e Anderson 1990; Moscone 1993; Bernardello *et al.* 1994).

A aplicação de técnicas de bandamento cromossômico em *Cestrum* tem mostrado que a estabilidade cariotípica observada por coloração convencional quanto ao tamanho e à forma dos cromossomos, não é refletida na sua estrutura interna. A literatura traz um registro de pelo menos sete diferentes famílias de DNA repetitivos em nove espécies *Cestrum*, as quais variam qualitativa e quantitativamente entre as espécies. Nos estudos desenvolvidos por Berg e Greilhuber (1993a; b) e Fregonezi *et al.* (2006), foram encontradas: (1) bandas G-Giemsa relacionadas às regiões organizadoras de nucléolos; (2) bandas G-Giemsa diminutas formando *dots* intercalares, proximais ou distais (3) bandas CMA<sub>3</sub> positivas associadas às

regiões organizadoras de nucléolo (RON), (4) bandas DAPI positivas associadas às regiões sensíveis ao frio (CSRs), (5) bandas neutras C-CMA<sub>3</sub><sup>0</sup>/DAPI<sup>0</sup>, (6) bandas CMA<sub>3</sub> positivas não associadas às RONS e (7) bandas C-Giemsa/CSR/DAPI negativo.

Além dos segmentos heterocromáticos, outros DNAs repetitivos também foram reportados em *Cestrum*. Sýkorová *et al.* (2003a) detectou que as seqüências teloméricas (TTTAGGG)<sub>n</sub>, conhecidas como “telômeros do tipo *Arabidopsis*” (Brassicaceae), comumente encontrada em plantas, são ausentes em *Cestrum* e nos dois outros gêneros da tribo Cestreae (*Vestia* e *Sessea*). Logo em seguida, Sýkorová *et al.* (2003b) conseguiram isolar e mapear uma família de minissatélite rica em A/T, chamada de BR23, que apareceram dispersas pelos cromossomos inclusive nas regiões terminais dos cromossomos. Segundo estes autores, essas seqüências de DNAs repetitivos poderiam estar associadas aos processos de recombinação e fusão cromossômica, resultando no aumento do genoma em *Cestrum*. Além deste segmento repetitivo, esses autores encontraram uma colocação incomum de segmentos de DNAr 45S e 5S nos cromossomos Bs de *C. parqui*, até então não observadas em nenhuma espécie de Solanaceae. Posteriormente, Fregonezi *et al.* (2006) utilizaram hibridação *in situ* com fluorocromos (FISH) com as sondas de DNAr 45S e 5S em quatro espécies de *Cestrum* e encontraram que o DNAr 5S apareceu sempre na região pericentromérica do braço longo do menor par cromossômico, enquanto que o DNAr 45S foi mais variável tanto em número quanto em localização, porém aparecendo mais comumente nas regiões terminais dos braços curtos dos cromossomos. Adicionalmente, Fregonezi *et al.* (2007) isolaram um segmento de retrotransposon da família *Ty3-gypsy* que foi localizado disperso pelos cromossomos e também associado às RONS. O acúmulo de DNAs repetitivos encontrado em algumas espécies de *Cestrum* parece concordar com a proposta de Las Penas *et al.* (2006), que sugeriram que a diversificação na assimetria cariotípica encontrada em várias espécies da tribo Cestreae (*C. bigibosum* Pittier, *C. buxifolium* Kunth, *Sessea corymbiflora* Goudot ex

Taylor e Phillips e *Vestia foetida* Ruiz e Pav) pode ter ocorrido pelo aumento do tamanho do genoma.

Com o objetivo de aumentar as informações sobre a ocorrência e a localização física dos segmentos repetitivos de DNA em *Cestrum*, neste trabalho estudamos pela primeira vez o cariótipo convencional, a ocorrência e a distribuição de diferentes famílias de heterocromatina e a localização dos sítios de DNAr 45s e 5S em quatro espécies desse gênero. Tais informações trazem uma nova contribuição para os estudos evolutivos do grupo, sobretudo porque mostram diferenças na localização física de diferentes segmentos de DNA, os quais sustentam novas possibilidades e processos envolvidos na diferenciação cariotípica do gênero *Cestrum*.

## **Materiais e Métodos**

Plântulas de quatro diferentes espécies de *Cestrum* (Tabela 1) foram obtidas, por semeadura direta e/ou estaquia, e cultivadas no viveiro de mudas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE, CCB, UEL, Londrina, Paraná). Para as preparações citogenéticas, pontas de raízes foram pré-tratadas com colchicina 0,05% por quatro horas à temperatura ambiente e fixadas em etanol/ácido acético (3:1, v:v) por até 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as raízes foram diretamente utilizadas no preparo das lâminas ou mantidas a -20 graus até o uso.

Para a coloração convencional as raízes pré-tratadas e fixadas foram digeridas em uma solução composta de 4% de celulase e 40% de pectinase por uma hora a 37°C. Em seguida, foram hidrolisadas em HCl 1M por oito minutos a 60°C, dissecadas em uma gota de ácido acético 45% e as lamínulas retiradas após congelamento em nitrogênio líquido. A coloração das lâminas foi feita em Giemsa 2% e as lâminas permanentes montadas com Entellan. As cinco melhores metáfases de cada espécie foram utilizadas para medições,

utilizando o programa Micro Measure 3.3 (<http://www.biology.colostate.edu/MicroMeasure/>). Os cromossomos foram classificados conforme a nomenclatura proposta por Guerra (1986).

O bandamento cromossômico seguiu o protocolo descrito por Schwarzacher *et al.* (1980), com modificações. Para isto, raízes foram digeridas em solução de celulase/pectinase, como descrito anteriormente, dissecadas em uma gota de ácido acético 45% e, após a retirada das lamínulas, as lâminas foram envelhecidas por três dias. Após o envelhecimento, as lâminas foram incubadas em ácido acético 45%, a 60°C durante 10 minutos, hidróxido de bário 5% à temperatura ambiente (TA) por 10 minutos e 2xSSC, a 60°C por 80 minutos. As lâminas foram coradas com Giemsa a 2% e montadas permanentes em Entellan, ou então, com CMA<sub>3</sub> (0,5 µg/µL) por 90 minutos e, logo em seguida, com DAPI (2 µg/µL) por meia hora. Por fim, as lâminas foram montadas em glicerol/ tampão McIlvaine 1:1 pH 7,0 com 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

A FISH foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Heslop-Harrison *et al.* (1991) e Cuadrado e Jouve (1994), com modificações. Foram utilizadas as sondas de trigo pTa71, contendo a seqüência de DNAr 45S (Gerlach e Bedbrook, 1979) e pTa794 contendo a seqüência de DNAr 5S (Gerlach e Dyer, 1980). As sondas foram marcadas com biotina-14d-ATP ou digoxigenina-11-dUTP por *nick translation*. As lâminas foram preparadas como descrito anteriormente para o bandamento, porém, sem o envelhecimento. Antes da hibridação as lâminas foram tratadas com 50 µL de RNase 1% por 1 hora e lavadas em 2xSSC por 10 min (TA), pós-fixadas em paraformaldeído 4% por 10 min (TA), lavadas novamente em 2xSSC por 10 min (TA) e desidratadas nos álcoois 70% (5 min sob agitação leve) e 100% (5 min sem agitação). Sobre cada lâmina foi aplicado 30 µL de uma mistura de hibridação contendo 100 a 200 ng de sonda marcada (4 µL), formamida a 100% (15 µL), polietilenoglicol a 50% (6 µL), 3 µL de 20xSSC (pH 7,0), 1 µL de DNA de timo de bezerro fragmentado (100 ng) e SDS a 10% (1 µL). A mistura de hibridação foi desnaturada a 70°C

por 10 min e imediatamente colocada no gelo. Os cromossomos e a sonda foram desnaturados simultaneamente em um termociclador a 90°C por 10 min, 50°C por 10min e 38°C por 5min. Em seguida, as lâminas foram colocadas em uma câmara úmida a 37°C por pelo menos 12 horas. As lavagens pós-hibridação foram feitas em 2xSSC a 42°C por 5 min, formamida 20% (20 mL de formamida e 80 mL de 0,1xSSC) a 42°C por 10 min, 0,1xSSC a 42°C por 5 min, 2xSSC a 42°C por 5 min, 4xSSC/Tween 20 0,2% a 42°C por 5 min e 4xSSC/Tween 20 0,2% à temperatura ambiente 5 min, todos feitos sob agitação. As sondas foram detectadas com uma solução de avidina/FITC (verde) 1:100 (em BSA 5%) ou anti-digoxigenina/rodamina (vermelho) 1:100 (em BSA 5%), seguidas por duas lavagens pós-deteção com 4xSSC/Tween20 2%, por 10 min à temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram contracoradas e montadas simultaneamente com antifade: 23 µL de antifade (1,4-diazabicyclo(2.2.2)-octane (2,3%), Tris HCl 20 mM, pH 8.0 (2%) e Glicerol (90%), em água destilada), 1 µL de DAPI (2 µg/mL) e 1 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM).

Todas as imagens foram adquiridas em um microscópio de epifluorescência Leica DM 4500 B, equipado com uma câmera DFC 300FX e com o programa IM50 4.0, também da Leica. O idiograma foi construído com o auxílio do programa Corel Draw 12, a partir de cinco medidas cromossômicas (comprimentos absoluto e relativo) obtidas de metáfases coradas convencionalmente e tratadas para o bandamento e FISH.

## **Resultados**

A análise citogenética por coloração convencional mostrou que número cromossômico  $2n = 2x = 16$  foi constante para as quatro espécies de *Cestrum* estudadas (Figuras 1A, B, C e D). Além da estabilidade cromossômica numérica, todas as espécies apresentaram predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, sendo o menor par sempre acrocêntrico. Do mesmo modo que os números cromossômicos, os núcleos interfásicos

também foram constantes, sendo do tipo reticular (Figura 1A). Diferenças foram encontradas na fórmula cariotípica, bem como no tamanho dos cromossomos e do complemento haplóide (Tabela 1).

*Cestrum capsulare* e *C. megalophyllum* apresentaram os cariótipos mais discrepantes quando comparados às outras duas espécies. *Cestrum megalophyllum* exibiu os maiores cromossomos e, conseqüentemente, o maior complemento haplóide (38,1 $\mu$ m), enquanto que em *C. capsulare* os cromossomos foram menores, com o complemento do lote haplóide também menor, 24 $\mu$ m (Tabela 1). *Cestrum corymbosum* e *C. laevigatum* apresentaram tamanhos cromossômicos e dos lotes haplóides intermediários e semelhantes entre si (Tabela 1). A fórmula cariotípica das quatro espécies apresentou variações, exceto pelo menor par cromossômico (par 8), o qual foi sempre acrocêntrico (Tabela 1, Figuras 1A-D e Figura 4). As variações mais marcantes foram encontradas em *C. megalophyllum* e entre *C. corymbosum* e *C. laevigatum*. Na primeira espécie foi detectado um par heteromórfico formado por um cromossomo metacêntrico pequeno (7,55 $\mu$ m) e um submetacêntrico grande (10,32 $\mu$ m) compondo uma fórmula cariotípica atípica, com 5m + 1sm + 1a + um par heteromórfico: m+sm (Tabela 1 e Figura 4 D). No segundo caso, apesar de ambas as espécies possuírem 6m + 1sm + 1a, a posição do par submetacêntrico variou entre as amostras, já que este foi o terceiro par em *C. corymbosum* e o antepenúltimo em *C. laevigatum* (Tabela 1, Figuras 4B e C).

O bandamento cromossômico C-CMA<sub>3</sub>-DAPI mostrou uma grande variação quantitativa e qualitativa entre as quatro espécies. *Cestrum capsulare* mostrou um grande número de pequenas bandas (*dots*) DAPI+ localizadas preferencialmente nas regiões intercalares a terminais, exceto nos pares 4 e 8, e grandes blocos subterminais nos pares 3, 4 e 7 (Figuras 2A e 4A). Bandas DAPI positivas também foram detectadas nas regiões proximais-centroméricas dos pares 1 e 2. *Cestrum corymbosum* e *C. laevigatum*, apesar de terem os

cariótipos convencionais muito similares, mostraram uma grande variação no padrão de bandas C-DAPI. *Cestrum corymbosum* mostrou bandas C-DAPI somente nas regiões proximais-centroméricas, exceto no par 8 (Figuras 2C e 4B), enquanto que em *C. laevigatum* apenas pequenos *dots* intercalares nos dois braços do par 1 foram encontrados, além de um grande bloco DAPI<sup>+</sup> intercalar no braço curto do par 4. Bandas C-DAPI+ proximais-centroméricas não foram observadas em *C. laevigatum* (Figuras 2E e 4C). Em *C. megalophyllum* foram encontradas bandas C-DAPI nas regiões proximais-centroméricas de todos os cromossomos, exceto no par 8, além de dois grandes blocos nas regiões intercalares-subterminais dos pares 3 e 7 (Figuras 2G e 4D). Bandas C-CMA<sub>3</sub> foram encontradas sempre nas regiões terminais nas quatro espécies, exceto em *C. capsulare* que apresentou três bandas intercalares. Nesta espécie foram encontrados blocos terminais nos pares 6 e 8, além de um bloco intercalar/subterminal no par 3, um *dot* no braço longo (metacêntrico) do par 1 e um bloco centromérico no par 8 (Figuras 2B e 4A). *Cestrum corymbosum* mostrou apenas dois blocos terminais, nos pares 7 e 8 (Figuras 2D e 4B). *Cestrum laevigatum* mostrou também dois blocos terminais, porém, nos pares 3 e 7 (Figuras 2F e 4C). Em *C. megalophyllum* foram encontradas bandas C-CMA<sub>3</sub> nos pares 4 e 7, e um heteromorfismo, com um grande bloco no maior cromossomo do complemento (considerado como cromossomo 1) e a ausência no seu par correspondente (Figuras 2H e 4D). Bandas neutras foram encontradas em *C. capsulare* (região terminal do braço curto do par 2 e um *dot* intercalar no braço longo do par 1), em *Cestrum corymbosum* (região terminal do braço curto do par 3) e *Cestrum laevigatum* (região intercalar do braço curto do par 7), Figuras 2A-F e 4A-C.

A FISH com a sonda de DNAr 45S mostrou quatro sinais de hibridação localizados sempre nas pontas dos braços curtos nas quatro espécies, exceto por um heteromorfismo em *C. megalophyllum*, onde apareceram cinco cromossomos marcados com a sonda de DNAr 45S (Figuras 3 e 4). Em todas as amostras foram encontradas diferenças tanto no tamanho dos

sítios quanto nos pares de ocorrência. Em *Cestrum capsulare*, os sítios de DNAr 45S foram encontrados nos pares 6 e 8 (Figura 3A, Figura 4A), em *C. corymbosum* nos pares 7 e 8 (Figura 3C, Figura 4B), em *C. laevigatum* nos pares 3 e 7 (Figuras 3E e 4C) e em *C. megalophyllum* nos pares 4 e 7 e no cromossomo heteromórfico número 1 (Figura 3F e 4D). A FISH com a sonda de DNAr 5S mostrou sinais de hibridação sempre na região proximal do braço longo do par 8, exceto em *Cestrum capsulare*, aonde os sinais foram detectados na mesma região, porém no par 4 (Figuras 3B, D, E e G, Figura 4A-D).

## Discussão

A análise citogenética, feita pela primeira vez nestas espécies, mostrou que o número cromossômico  $2n = 2x = 16$  foi constante para as quatro espécies de *Cestrum*. Além dessa estabilidade numérica, outras características citogenéticas também foram constantes, como a predominância de cromossomos meta e submetacêntricos, a ocorrência de núcleos interfásicos do tipo reticular, e a presença do par 8 acrocêntrico em todos os cariótipos estudados. Esses resultados estão de acordo com os já descritos para o gênero *Cestrum* (Berg e Greilhuber, 1992, 1993, a, b; Fregonezi *et al.*, 2006) e também para as outras espécies da tribo (Las Penas *et al.*, 2006). Vale lembrar que cariótipos com estabilidade cromossômica numérica e morfológica foram também encontrados em outros gêneros da família *Solanaceae* como *Capsicum* (Pozzobon *et al.*, 2006), *Solanum* (Bernardello e Anderson, 1990) e *Lycopersicum* (Pillen *et al.*, 1996). No entanto, nossos resultados, somados aos obtidos por Berg e Greilhuber (1992, 1993, a, b), Fregonezi *et al.* (2006) e Las Penas *et al.* (2006), indicam que, apesar da estabilidade numérica e morfológica entre os cariótipos desses grupos, algumas variações se destacam. Tais variações estão relacionadas à fórmula cariotípica, sobretudo no que diz respeito ao número e à posição dos pares submetacêntricos, ao tamanho dos cromossomos e do lote haplóide, e à simetria dos cariótipos. Las Penas *et al.* (2006) sugeriram

que o aumento do genoma acompanhado por uma leve assimetria cariotípica seja comum na tribo *Cestreae*. Segundo estes autores, espécies com características morfológicas plesiomórficas, como as do gênero *Vestia*, possuem cariótipos mais simétricos e cromossomos menores, enquanto que nos gêneros *Sessea* e *Cestrum*, mais apomórficos, os cariótipos são menos simétricos e têm cromossomos maiores. Nossos resultados corroboram, em parte, com essa proposta, pois *C. capsulare* teve o cariótipo mais simétrico com os menores cromossomos, ao contrário de *C. megalophyllum*, que apresentou o cariótipo menos simétrico e com os maiores cromossomos. Esta diferença encontrada entre o cariótipo de *C. capsulare* e os cariótipos das demais espécies do gênero até poderia ser respaldada pela taxonomia, já que *C. capsulare* pertencia ao gênero *Sessea* (*S. regnelli*), e foi transferida recentemente para o gênero *Cestrum* (Carvalho e Schnoor, 1993/1997). Contudo, as análises de bandamento cromossômico (discutidas a seguir) mostraram que esta espécie teve um grande acúmulo de heterocromatina. Isto deveria ter gerado um cariótipo mais assimétrico, o que não foi encontrado.

O bandamento cromossômico mostrou diferenças na abundância, no tamanho dos blocos e na localização da heterocromatina, contudo, a distribuição da maioria das bandas parece seguir o modelo de dispersão equilocal/equidistante proposto por Schweizer e Loidl (1987). Isto fica bastante evidente quando comparamos a localização física dos blocos C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, os quais aparecem preferencialmente nas pontas dos cromossomos. O mesmo é encontrado para os blocos intercalares/subterminais C-DAPI<sup>0</sup>/CMA<sub>3</sub><sup>0</sup> e C-DAPI<sup>+</sup>, nas quatro espécies, bem como para os *dots* C-DAPI<sup>+</sup> de *C. capsulare* e *C. laevigatum* e as bandas centroméricas C-DAPI<sup>+</sup> de *C. corybosum* e *C. megalophyllum*, como destacado no idiograma. Esse mesmo padrão de distribuição equilocal dos blocos heterocromáticos foi encontrado nas espécies de *Cestrum* estudadas por Fregonezi *et al.* (2006). Contudo, o padrão de bandas foi bastante diferente entre as espécies estudadas aqui e as outras nove reportadas

na literatura, de modo que cada espécie pode ser facilmente identificada seguindo esse perfil de marcas cromossômicas. Se compararmos os mapas físicos gerados por a Berg e Greilhuber (1992, 1993 a, b) e Fregonezi *et al.* (2006), ainda assim, algumas relações interespecíficas podem ser estabelecidas entre estes cariótipos. Algumas bandas parecem ocupar preferencialmente determinadas áreas cromossômicas, de modo não aleatório, como por exemplo: (i) os *dots* heterocromáticos intercalares encontrados em *C. capsulare* e *C. laevigatum* também foram descritos para as outras espécies, (ii) os grandes blocos C-DAPI<sup>+</sup> são encontrados preferencialmente nas regiões intercalares a subterminais, (iii) as RONS são sempre terminais. De outro modo, outras bandas parecem ocupar determinadas regiões de maneira aleatória, ou seja, sem nenhuma relação eqüilocal/eqüidistante. Assim, nossos dados reforçam os de Fregonezi *et al.* (2006), os quais sugerem que alguns segmentos heterocromáticos têm dispersão por amplificação/contaminação eqüilocal entre heterólogos e outros a partir de sítios iniciais de amplificação, de modo não eqüilocal. Podemos propor, desse modo, que os genomas das espécies de *Cestrum* podem diferir na qualidade, quantidade e localização de ilhas de amplificação de heterocromatina. Adicionalmente a estes eventos de amplificação, outros mecanismos também parecem ocorrer, como é o caso de *C. megalophyllum*. Nesta espécie foi encontrado um par heteromórfico para um segmento C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/RON. Geralmente, heteromorfismos envolvendo estas regiões podem acontecer por crossing-over desigual, translocações não recíprocas ou ainda deleções, contudo, nossos dados ainda não permitem determinar o motivo já que estudos meióticos não foram realizados.

A hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 45S em *Cestrum* revelou um padrão de distribuição comum à maioria das espécies vegetais, ocorrendo sempre nas regiões terminais dos cromossomos (Lima de Faria, 1976). Esse perfil foi também encontrado em *Capsicum* (Moscone *et al.*, 1995) e *Nicotiana* (Yoong Lim *et al.*, 2000). As espécies aqui estudadas apresentaram quatro sítios de DNAr 45S, exceto por um heteromorfismo em *C.*

*megalophyllum*, que mostrou cinco sinais de hibridação. Neste caso, o sítio de DNAr 45S heteromórfico está associado ao segmento C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, e provavelmente sofreu um dos três eventos descritos anteriormente. Além do heteromorfismo numérico, diferenças nos tamanhos dos sítios de DNAr 45S também foram observadas, provavelmente por uma diferença no número de repetições por blocos. O fato mais interessante está relacionado à localização física do segmento de DNAr 5S. Fregonezi *et al.* (2006) localizou este segmento por FISH na região pericentromérica do braço longo do par 8 de quatro espécies de *Cestrum*, e sugeriu que esta região poderia ser conservada no gênero. Nossos resultados mostraram que os sítios de hibridação com a sonda de DNAr 5S também foram coincidentes com a região pericentromérica do braço longo do par 8, exceto em *Cestrum capsulare*, onde a sonda hibridou na região pericentromérica do braço longo do par 4. Como colocado anteriormente, *Cestrum capsulare* pertencia a outro gênero (*Sessea regnelli*), e se o par 8 contendo o DNAr 5S for uma marca para o gênero, nossos dados estão na contramão do diagnóstico baseado na morfologia do fruto que posicionou *S. regnelli* no gênero *Cestrum* (Carvalho e Schonoor, 1993/1997). No entanto, quando consideramos as demais características citogenéticas de *C. capsulare*, o cariótipo não diferiu muito das outras espécies de *Cestrum* quanto à ampla ocorrência de diferentes famílias de heterocromatina distribuídas equilocalmente, à localização terminal dos sítios de DNAr 45S, ao tamanho e simetria dos cariótipos e mesmo a localização pericentromérica do DNAr 5S.

Os mapeamento físico dos diferentes tipos de DNAs repetitivos gerados nesse trabalho, quando comparados a outros mapas realizados para o gênero, reforçam a hipótese de que em *Cestrum* as alterações cariotípicas ocorrem principalmente por mudanças nos padrões de amplificação/dispersão de diferentes segmentos de DNAs repetitivos sem, no entanto, provocar alterações significativas na composição geral dos cariótipos (tamanho e forma). Nossos resultados reforçam a necessidade de um estudo citogenético mais abrangente em

*Cestrum*, tanto no que diz respeito ao número de espécies como nas ferramentas utilizadas para identificação e localização de segmentos de DNAs repetitivos, uma vez que, das 250 espécies existentes desse gênero, apenas 11 foram citogeneticamente estudadas.

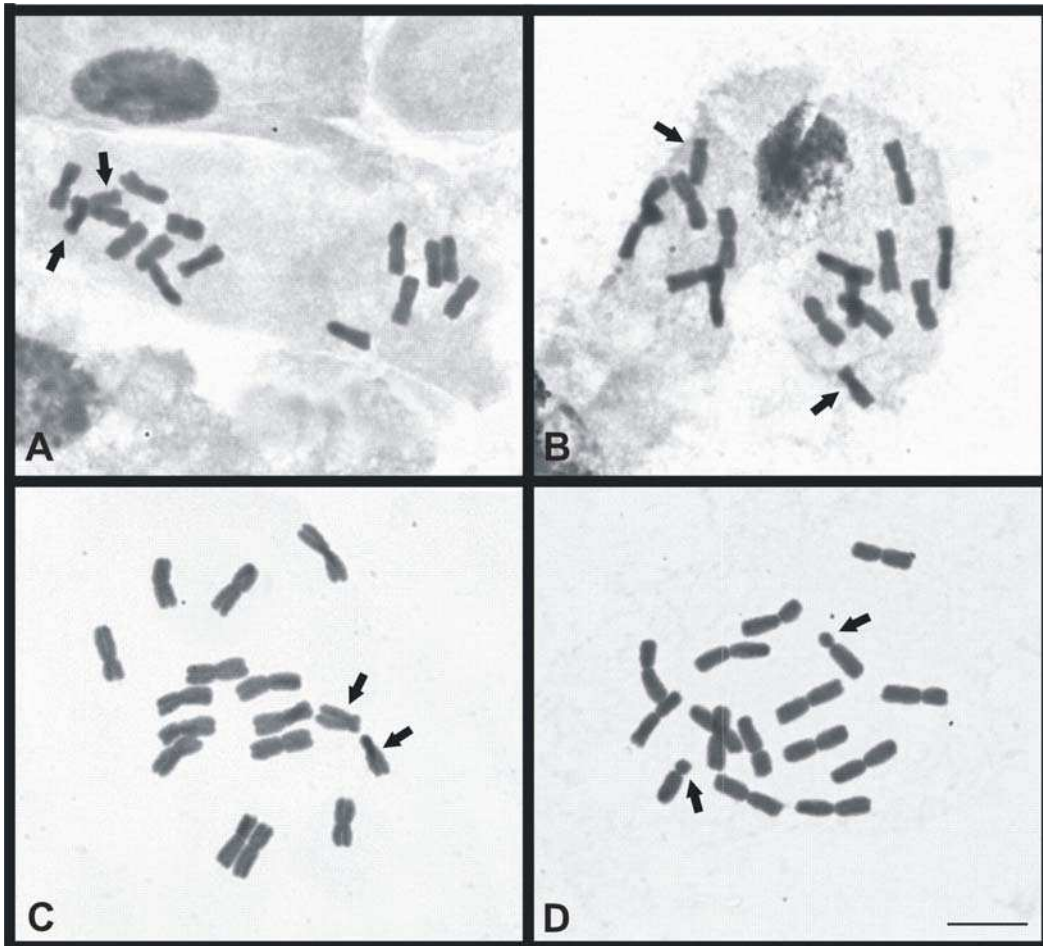
### **Agradecimentos**

Os autores agradecem às agências SEMA-IAP, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

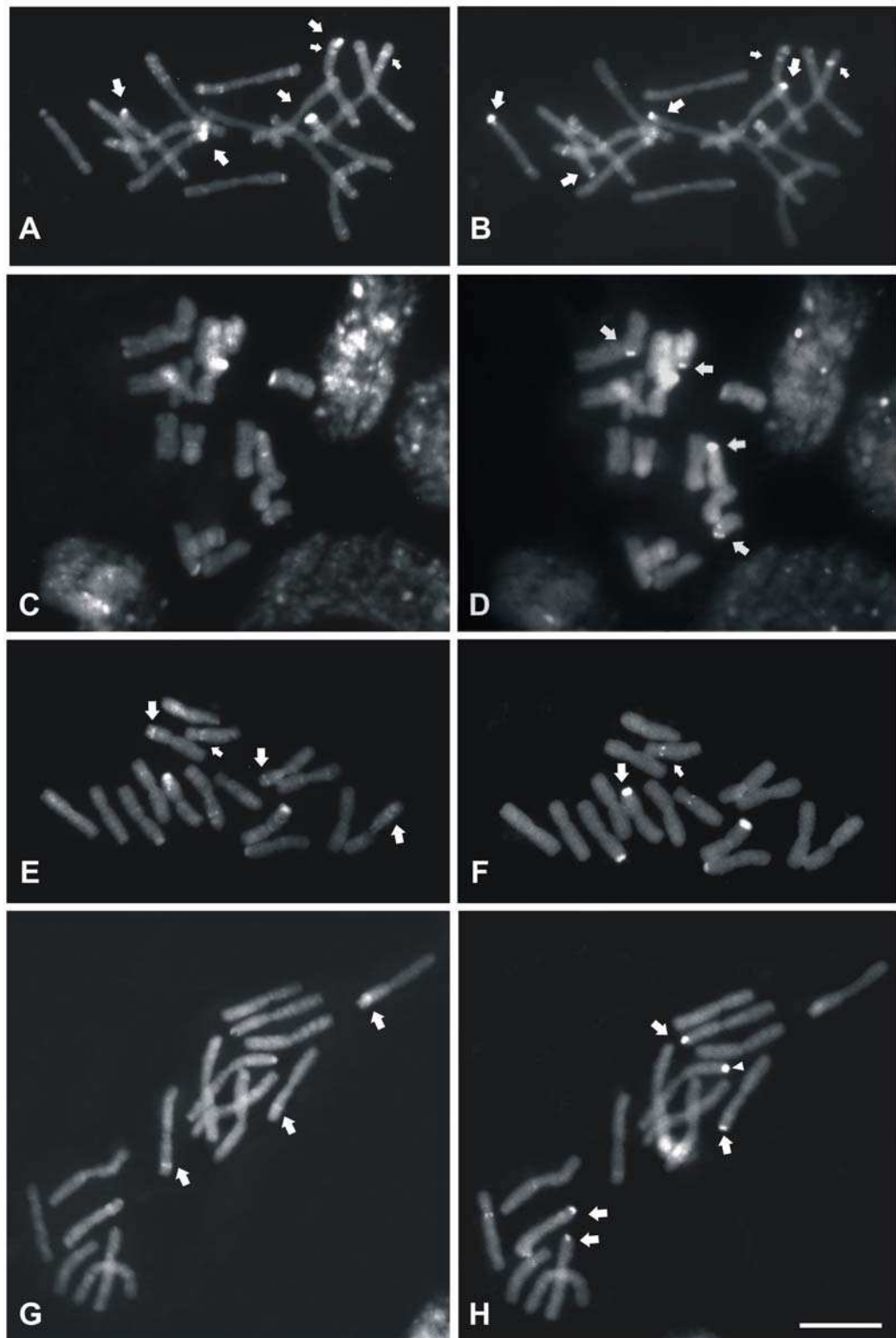
**Tabela 1:** Espécies de *Cestrum* com suas características citogenéticas encontradas e os locais de coleta das espécies.

<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>FCH</b>	<b>VMB (µm)</b>	<b>TC (µm)</b>	<b>TLH (µm)</b>
<i>C. capsulare</i>	Fazenda Califórnia, Curiúva-PR	7m + 1a	27 e 21,10	6,66 e 4,83*	24*
	Ventania Paraná				
<i>C. corymbosum</i>	Bandeirantes-PR	6m + 1sm + 1a	32,5 e 25,2	8,28 e 5,64	28,8
<i>C. laevigatum</i>	Misiones-Argentina	6m + 1sm + 1a	31,89 e 25,48	8,28 e 5,73	28,68
<i>C. megalophyllum</i>	Salvador-Bahia	(m+sm) + 5m + 1sm + 1a	42,4 e 38,8	10,32* e 6,51	38,1*

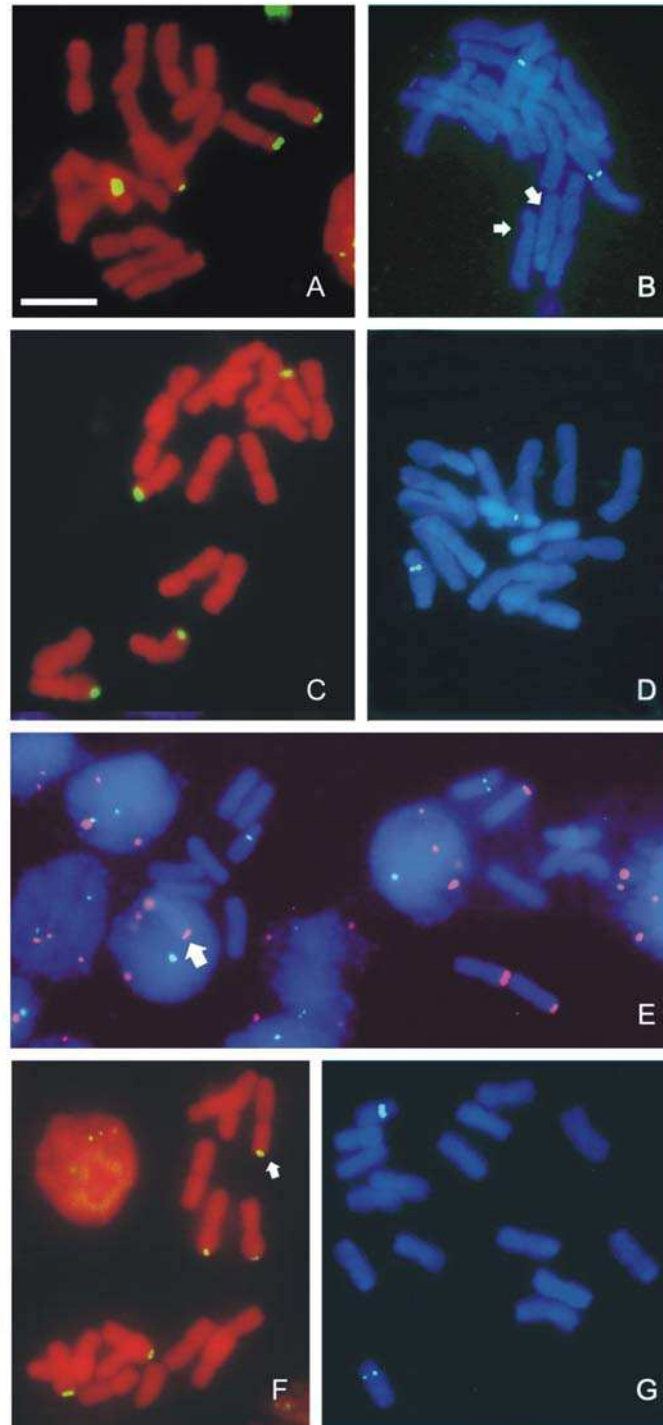
**FCH**= fórmula cariotípica do complemento haplóide, **VMB**= valores médios da soma dos braços longos e curtos, **TC**= **comprimento** total dos cromossomos maior e menor **TLH**= valor da soma de todos os cromossomos por complemento haplóide. Os símbolos \* e ♣ referem-se aos menores e maiores valores encontrados, respectivamente.



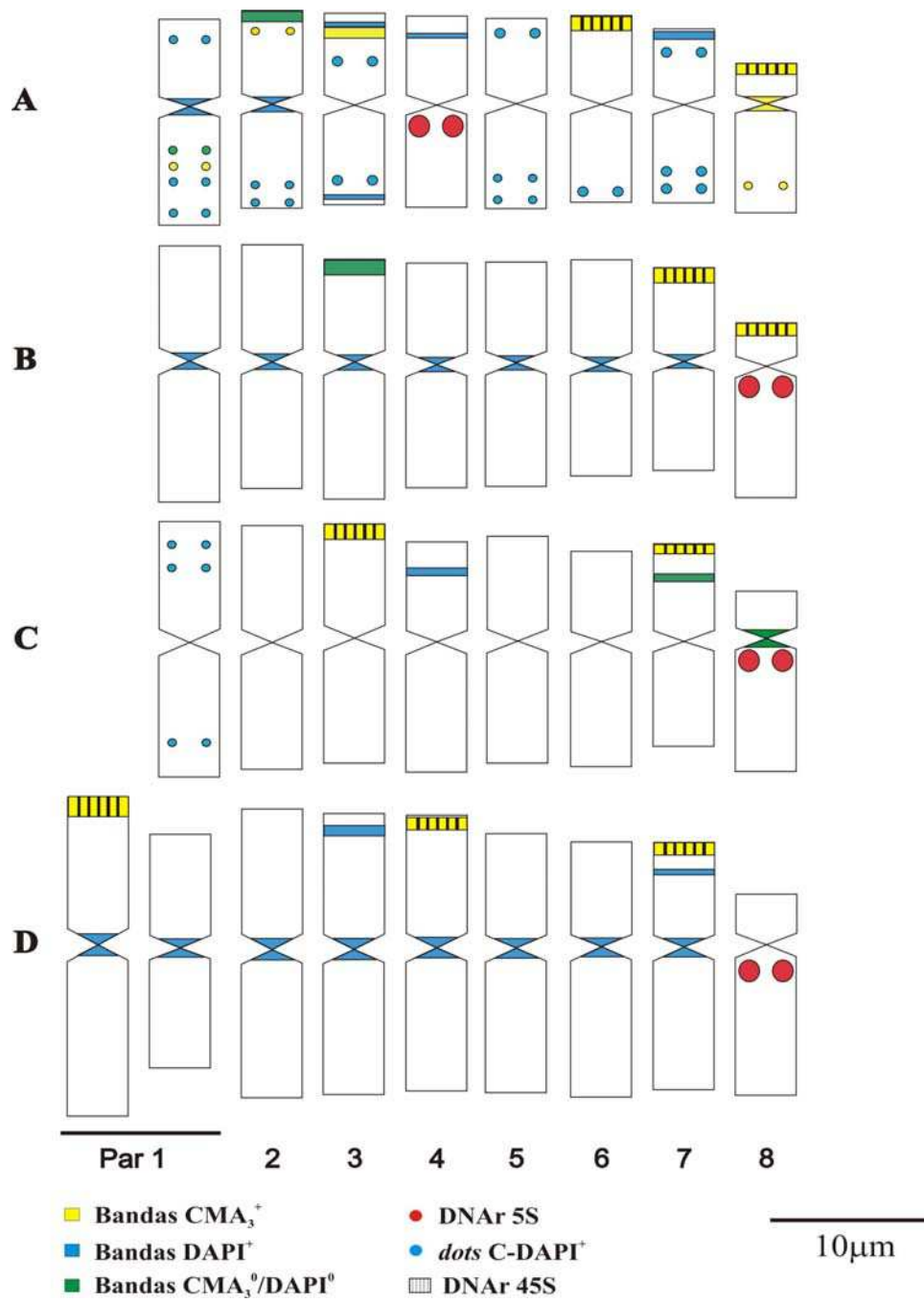
**Figura 1:** Coloração convencional (Giemsa) em *C. capsulare* (A), *C. corymbosum* (B), *C. laevigatum* (C) e *C. megalophyllum* (D). As setas apontam para o par acrocêntrico. Barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.** Bandamento C-DAPI em *C. capsulare* (A), *C. corymbosum* (C), *C. laevigatum* (E) e *C. megalophyllum* (G). As setas grandes apontam para as regiões C-DAPI<sup>+</sup> em alguns cromossomos e as setas menores para as regiões CMA<sup>0</sup>/DAPI<sup>0</sup>. Bandamento C-CMA<sub>3</sub> em *C. capsulare* (B), *C. corymbosum* (D), *C. laevigatum* (F) e *C. megalophyllum* (H). As setas maiores apontam as bandas terminais associadas ao DNAr 45S. As setas menores indicam as bandas C-CMA<sup>0</sup>/DAPI<sup>0</sup>. Barra corresponde a 10  $\mu$ m.



**Figura 3.** FISH com a sonda de DNAr 45S e 5S em *Cestrum*. (A) *Cestrum capsulare* com quatro sítios de DNAr 45S e em (B) as regiões hibridadas com DNAr 5S na mesma espécie (as setas indicam a ausência desse sítio no menor par cromossômico). (C) *C. corymbosum* mostrando quatro sítios de DNAr 45S e em (D) FISH com DNAr 5S na mesma espécie. (E) Hibridação simultânea (*double FISH*) com as sondas DNAr 45S marcada com digoxigenina-rodamina (vermelho) e a sonda de DNAr 5S marcada com biotina-FITC (verde) na espécie *C. laevigatum*. Note que a seta indica um cromossomo com o sítio para DNAr 45S localizado sobre o núcleo interfásico (F) FISH em *C. megalophyllum* com a sonda de DNAr 45S (a seta indica o cromossomo pertencente ao par heteromórfico) e em (G) as regiões hibridadas com DNAr 5S na mesma espécie. Barra corresponde a 10  $\mu$ m.



**Figura 4.** Idiograma e mapeamento físico dos cromossomos de *Cestrum capsulare* (A), *C. corymbosum* (B), *C. laevigatum* (C) e *C. megalophyllum* (D)

## Referências

- Berg C, Greilhuber J. (1992) Cold-sensitive chromosome regions and their relation to constitutive heterochromatin in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Genome*. 35: 921-930.
- Berg C, Greilhuber J (1993a) Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum* (Solanaceae): *C. strigilatum*, *C. fasciculatum*, and *C. elegans*. *Plant Systematic and Evolution*. 185:133-151.
- Berg C, Greilhuber J (1993b) Cold-sensitive regions and heterochromatin in *Cestrum aurantiacum* (Solanaceae). *Plant Systematic and Evolution*. 185: 259-273.
- Bernardello L. M.; Anderson G. J (1990) Karyotypic studies in *Solanum* section *Basarthurum* (Solanaceae). *American Journal of Botany*. 77(3): 420-431.
- Bernardello L. M.; Heiser, C. B.; Piazzano M. (1994) Karyotypic studies in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae). *American Journal of Botany*. 81(1): 95-103.
- Carvalho L. A. F, Schnoor A. (1993/97) *Sessea* Carvalho et Schnoor – nova seção para o gênero *Cestrum* (Solanaceae). *Rodriguésia* 71-75(45-49): 15-24.
- Cuadrado A, Jouve N, (1994) Highly repetitive sequences in B chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence in situ hybridization. *Genome* 37:709-712.
- Fregonezi J. N., Fernandes T., Torezan, J. M. D., Vieira A. O., Vanzela A. L. L (2006). Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on physical mapping of repetitive DNA. *Genetic and Molecular Biology*. 29 (1): 97-104.
- Fregonezi J N., Vilas-Boas L. A., Fungaro M. H. P., Gaeta M. L., Vanzela A. L. L. (2007) Distribution of Ty3/gypsy-like retroelements on the A and B chromosomes of *Cestrum strigilatum* and *C. intermedium* (Solanaceae). *Genetics and Molecular Biology*. no prelo.
- Gerlach W. L., Bedbrook J. R. (1979) Cloning characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research*. 7: 1869-1885.
- Gerlach W. L; Dyer T. A. (1980) Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rDNA genes. *Nucleic Acids Research* .8: 4851-4865.
- Guerra M. (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Revista Brasileira de Genética*. 9 (3): 741-743.
- Heslop-Harrison J. S. (1991) The Molecular cytogenetics of plants. *Journal of Cell Science*.100: 15-21.
- Hunziker A. T. (1976) South American *Solanaceae*; a synoptic survey. In: Hawkes, R. N. Lester and A. D. Skelding (eds.) *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*, 7ed Linnean Society Symposium Series. Academic Press. N.Y.pp 49-85.
- Hunziker, A. T (2001). *The Genera of Solanaceae*. Alemanha: A.R.G Kommanditgesellschaft: 497p.

- Judd E. S. *et al* (1999) *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Massachusetts U.S.A: Sinauer Associates.
- Las Penas M. L., Chiarini F. E., Bernardello G., Benítez De Rojas C. (2006) Karyotypes of some species of *Cestrum*, *Sessea*, and *Vestia* (tribe Cestreae, Solanaceae). *Caryologia* 59: 131-137.
- Lima De Faria A. (1976) The chromosome field I. Prediction of the location of ribosomal cistrons *Hereditas*. 83: 1-22.
- Moscone E. A. (1993) Estudios cromosomicos en *Capsicum* (Solanaceae) II. Analisis cariotipico de *C. parvifolium* y *C. annuum* var. *annuum*. *Kurtziana*.22: 9-18.
- Moscone E. A., Lambrou M., Hunziker T., Ehrendorfer, F. (1995) Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae) *Plant Syst and Evol*. 186: 213-229.
- Pillen K., Pineda O., Lewis C.B., Tanksley, S. D. (1996) Status of genome mapping tools in the taxon Solanaceae. In *Genome mapping in plants*. A.H. Paterson. R.G. Landes (eds.) Company, Austin, Texas: 281–308.
- Pozzobon M. T., Schifino-Wittmann M. T., Bianchetti L. B. (2006) Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do  $x=12$  and  $x=13$  represent two evolutionary lines? *Bot Jou of the Lin Soc* 151 (2): 259–269.
- Schwarzacher T. P., Ambros P., Schweizer D. (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst Evol* 134: 293-297.
- Schweizer D., Loidl J (1987). A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-banded patterns. *Chromo. Today* 9: 61-74.
- Sýkorová E., Lim Ky., Chase M. W., Knapp S, Leitch I. J, Leitch A. R, Fajkus J (2003a) The absence of *Arabidopsis*-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (Solanaceae); first evidence from eudicots. *Plant Journal*, 34: 283–291.
- Sýkorová E.; Yoong Lim., Fajkus J., Leitch A. R. (2003b) The signature of the *Cestrum* genome suggests an evolutionary response to the loss of (TTTAGGG)<sub>n</sub> telomeres. *Chromosoma*. 112: 164-172.
- Yoong Lim K., Matyasek R., Lichtenstein C. P., Leitch A. R. (2000) Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section Tomentosae. *Chromosoma*. 109: 245-258.

## CAPÍTULO 2

---

**Transmissão, comportamento meiótico e fosforilação das histonas H3 do cromossomo B de *Cestrum strigilatum* (Solanaceae).**

\*Este artigo será enviado para publicação na revista *Annals of Botany*

## **Transmissão, comportamento meiótico e fosforilação das histonas H3 do cromossomo B de *Cestrum strigilatum* (Solanaceae)**

### **Resumo**

Cromossomos B são reconhecidos por não formarem sinapse com os cromossomos do complemento A, e porque possuem comportamento univalente e segregação não Mendeliana. Neste trabalho estudamos a frequência e a distribuição de Bs nas primeira e segunda fase da divisão meiótica masculina (MI e MII) de *C. strigilatum*, pela aplicação de técnica de coloração convencional. Os Bs de *C. strigilatum* foram facilmente reconhecidos por aparecerem como univalentes, e sempre distantes espacialmente dos cromossomos A. A análise convencional mostrou que o número de células com B decresce ao longo da meiose, pois a proporção de Bs foi maior em MI (0,89 em média) do que em MII (0,17 em média). Além disso, a eliminação destes cromossomos foi observada no final da tétrade. A imunodeteção com anti-H3-fosforilada realizada em diferentes fases da meiose mostrou que mesmo não havendo uma relação entre a fosforilação das H3 e a eliminação do B, *Cestrum strigilatum* possui um padrão de fosforilação para essa proteína diferente do encontrado para os cromossomos do complemento A de outras espécies vegetais.

**Palavras-chave:** *Cestrum*, cromossomos B, meiose e fosforilação das histonas H3

## Introdução

Cromossomos acessórios, conhecidos também como cromossomos B, diferem daqueles do complemento normal em tamanho, forma e composição do DNA e não possuem segregação Mendeliana como os demais. Tais cromossomos são facilmente reconhecidos por não formarem sinapse com os cromossomos do complemento A na meiose, apesar de provavelmente serem originados a partir do complemento A, por diferentes mecanismos (Camacho *et al.*, 2000). A importância biológica e o significado adaptativo destes cromossomos em populações naturais ainda são incertos. Contudo, é importante lembrar que os Bs já foram encontrados em dezenas de espécies de angiospermas, gimnospermas, pteridófitas, briófitas e fungos (Jones e Houben, 2003). Efeitos fenotípicos atribuídos à presença de um ou poucos cromossomos Bs são raros. No entanto, parece que na maioria dos casos, esses cromossomos exercem efeitos negativos sobre o organismo hospedeiro, principalmente em indivíduos que possuem uma grande quantidade de Bs (veja Jones e Rees, 1982). Esse efeito negativo foi reportado por Gonzáles-Sánchez *et al.*, (2004) em arroz, aonde os autores mostraram que a fertilidade e a viabilidade dos grãos de pólen viáveis foram afetadas em indivíduos com elevado número de Bs. Porém, esses autores sugeriram que o efeito do B pode ser benéfico ao longo do tempo, pois indivíduos descendentes de plantas mãe com quatro cromossomos B mostraram-se mais férteis do que os originados de plantas mãe sem esses cromossomos.

Até o momento, os motivos pelos quais os Bs são mantidos em populações naturais permanecem pouco compreendidos, porém os mecanismos de transmissão e acúmulo desses cromossomos já são um pouco mais conhecidos. Tais mecanismos estão relacionados à não-disjunções ocorridas durante a gametogênese, como também, por fecundação preferencial por gametas carregando Bs (Beukeboom, 1994). Mecanismos gênicos controlando a taxa de

transmissão de Bs já foram identificados em arroz (Puertas *et al.*, 1998) e milho (González-Sánchez *et al.*, 2003). Em arroz o controle da taxa de transmissão é realizado pelo próprio B. Já em milho, o mecanismo de transmissão parece ser um muito mais complexo, sendo realizado por genes autossômicos. Em ambas as espécies, linhagens com alta e baixa transmissão de Bs já foram identificadas (ver Jones e Houben, 2003).

Cromossomos B foram encontrados em *Cestrum parqui*, no híbrido *C. parqui* × *C. aurantiacum* (Sýkorová *et al.*, 2003), e em *Cestrum strigilatum* e *C. intermedium* (Fregonezi *et al.*, 2004). Apesar de ambos os estudos terem fornecido informações preciosas a respeito da organização interna destes cromossomos, como a ocorrência de segmentos de DNAr 5S e 45S e uma família de minissatélite em *C. parqui* (Sýkorová *et al.*, 2003) e presença de bandas C-Giemsa, bandas CMA<sub>3</sub><sup>0</sup>/DAPI<sup>0</sup> e uma família do retroelemento *Ty3-gypsy* em *C. strigilatum* e *C. intermedium* (Fregonezi *et al.*, 2007), pouco se conhece a respeito da distribuição e da transmissão destes cromossomos nestas espécies, exceto por variações intra e inter-individuais no número de Bs decorrente da eliminação desses cromossomos em tecido somático (Fregonezi *et al.*, 2004).

Independente da espécie hospedeira e da organização interna dos Bs parece que as variações observadas na frequência desses cromossomos acontecem devido à segregação irregular tanto na meiose quanto na mitose (Camacho *et al.*, 2000). Para entender esta dinâmica, são necessários estudos sobre os fatores que regulam e interferem na segregação dos Bs, bem como os possíveis efeitos desses cromossomos sobre as características reprodutivas das espécies hospedeiras. O fato dos cromossomos Bs não parearem com outros cromossomos e não apresentarem um comportamento tipicamente mendeliano, sugerem que outros fatores podem interferir na cinética destes cromossomos nas divisões celulares. Neste contexto, modificações pós-traducionais em proteínas cromossômicas poderiam estar associadas a estes eventos. Trabalhos recentes demonstraram que a fosforilação da histona H3

na serina 10 (H3/ser10) pode estar relacionada a eventos críticos das divisões celulares como: a condensação cromossômica (Hendzel *et al.*, 1997), a coesão entre as cromátides irmãs em metáfase I (Kaszás e Cande, 2000) e a segregação das cromátides irmãs na segunda fase da meiose (Manzanero *et al.*, 2000). Com o objetivo de entender o comportamento, a transmissão e a distribuição dos cromossomos B em *C. strigilatum*, foram estudadas neste trabalho a frequência do cromossomo B na primeira e na segunda divisão meiótica (MI e MII), a frequência e a distribuição desses cromossomos nas progênes, e o comportamento dos cromossomos As e Bs frente ao padrão de fosforilação das H3/ser10, utilizando cinco diferentes indivíduos de *C. strigilatum* portadores de B. Adicionalmente, uma comparação da viabilidade de pólen em plantas portadoras e não portadoras desse cromossomo também foi realizada.

## **Materiais e Métodos**

### ***Coleta das amostras***

Sementes de dois indivíduos de *Cestrum strigilatum* contendo cromossomos B foram coletadas no ano de 2002 em São Jerônimo da Serra, Paraná, Brasil. As exsiccatas foram depositadas no herbário FUEL, do Centro de Ciências Biológicas, da UEL. As sementes foram submetidas à germinação e cultivadas no Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE), da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil. Após a germinação e o cultivo, cinco plântulas contendo cromossomo B e três plântulas sem B foram selecionadas ao acaso e transferidas para um pequeno arboreto localizado no LABRE, onde cresceram distantes umas das outras e em condições naturais. Ao longo dos anos de 2005 e 2006 foram coletadas anteras para a análise da meiose e da viabilidade

polínica. Frutos desses indivíduos também foram utilizados para estimar a taxa de transmissão dos Bs para a sua progênie.

### ***Análise meiótica***

Para a análise convencional, anteras jovens foram coletadas de flores de diferentes ramos dos cinco arbustos de *C. strigilatum* contendo Bs, e diretamente fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v: v) por 12 horas e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As anteras foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em HCl 1M a  $60^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Em seguida, as amostras foram dissecadas e esmagadas em uma gota de ácido acético 45%. Após o congelamento do conjunto lâmina/lamínula em nitrogênio líquido, as lamínulas foram removidas e o material corado com Giemsa 2%. As lâminas foram montadas em Entellan (Merck). Células foram analisadas para a presença de Bs e agrupadas em: (i) meiócitos em MI sem Bs, (ii) meiócitos em MI com Bs, (iii) meiócitos em MII sem Bs e (iv) meiócitos em MII com Bs. A análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney U para valores em proporção (Tabela 1). O cálculo das proporções de cromossomos B em MI foi feito pela divisão do total de células com esse cromossomo nesta fase pelo número total de células em MI. O mesmo procedimento foi adotado para o cálculo da proporção de Bs em MII

### ***Análise da frequência de Bs nas progênies (F1)***

Frutos maduros foram coletados dos cinco indivíduos de *C. strigilatum* contendo Bs, e as sementes retiradas e colocadas para germinar em câmara úmida à temperatura ambiente. Raízes foram coletadas, pré-tratadas com colchicina 0,05% por 4 horas, fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v: v) por 12 horas e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para a confecção das lâminas, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1M a  $60^{\circ}\text{C}$  por 10 min, dissecadas e esmagadas em uma

gota de ácido acético 45%. As lamínulas foram removidas por congelamento em nitrogênio líquido e o material corado com Giemsa 2%. As preparações foram feitas com apenas uma raiz por lâmina, sendo cada raiz considerada como um indivíduo. Após a montagem das lâminas permanentes, estas foram analisadas quanto à presença de cromossomos B e o número de Bs por célula.

### ***Viabilidade dos grãos de pólen***

O estudo da viabilidade polínica foi feito de modo comparativo entre os cinco indivíduos portadores e três não portadores de Bs. A viabilidade foi avaliada pela coloração dos grãos de pólen com corante Alexander (0,5M), o qual permite discriminar os polens viáveis pela coloração púrpura do citoplasma, enquanto que nos polens inviáveis o citoplasma é reduzido ou ausente, e apenas a ecsina aparece esverdeada (Figura 1). Para isto, cinco flores de diferentes ramos de cada indivíduo foram coletadas em pré-antese (um a dois dias antes da abertura da flor) e suas anteras abertas em uma gota de corante, para a liberação dos grãos de pólen. As lâminas foram imediatamente cobertas com lamínula e montadas de modo semi-permanente. A coleta das flores e o preparo das lâminas foram feitos em um único dia e no mesmo período. O critério de análise respeitou a estrutura externa dos grãos de pólen, e a coloração e o tamanho/volume do citoplasma. Ao final da contagem os dados foram submetidos ao Test t utilizando o programa Státistica 6.0.

### ***Imunodeteção das histonas H3 fosforiladas***

A imunodeteção foi feita de acordo com Manzanero *et al.* (2000), com pequenas modificações. Para isto, anteras jovens foram coletadas e diretamente fixadas em formaldeído 4% em tampão PBS 1X (pH 7,0) por 1 hora, lavadas por 20 minutos em tampão PBS 1X e

digeridas em uma mistura de celulase 2% (Onozuka), pectinase 2% (Sigma) e hemicelulase 2% (Carl Roth) em tampão PBS 1X, a 37°C por 3 h. Em seguida, as anteras foram lavadas por 20 min em PBS 1X, dissecadas em uma gota de PBS 1X gelado e esmagadas. Após o congelamento do conjunto lâmina/lâminula em nitrogênio líquido, as lâminulas foram removidas e as lâminas transferidas imediatamente para um frasco contendo PBS 1X gelado. As lâminas foram tratadas com uma solução bloqueadora (BSA 3%, w/v; 0.1% Triton X-100) in PBS 1X por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram tratadas com o anticorpo primário anti-phospho-histone H3 (rabbit polyclonal IgG – Upstate Biotechnology, USA), diluído 1:100 em BSA 3% preparado em PBS 1X (25µL/lâmina), por 12 horas a 4°C e lavadas por 20 min PBS 1X. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário Goat anti-rabbit IgG FITC-conjugated (Sigma) diluído 1:100 em BSA 3% preparado em PBS 1X (25µL/lâmina) por 3 horas a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas em por 10 min, contra-corados com DAPI (2 µg/mL) e as lâminas montadas em antifade [1,4-diaza- bicyclo (2.2.2)-octane-(2.3%), Tris HCl 20 mM, pH 8.0 (2%) e Glicerol (90%), em água destilada].

Todas as imagens foram adquiridas em um microscópio de epifluorescência Leica DM 4500 B, equipado com uma câmera DFC 300FX e com o programa IM50 4.0, também da Leica.

## Resultados

A análise convencional mostrou que o cromossomo B de *Cestrum strigilatum* teve um comportamento univalente durante a meiose e apareceu geralmente distante do complemento A. Esse comportamento foi evidenciado desde os primeiros estágios da meiose (paquíteno e diplóteno) como mostrado nas figuras 2A-B e estendeu-se até o final da meiose, na formação da tétrade (Figuras 2D- I). Além do seu comportamento univalente, o B de *C. strigilatum* não foi orientado e segregado eficazmente para os pólos opostos (Figuras 2F). Suas cromátides irmãs apresentaram um comportamento similar ao encontrado no complemento A, ou seja, separando-se somente na segunda divisão da meiose. (Figuras 2D-G). Adicionalmente, uma tendência à eliminação do B foi vista nos estágios finais da microsporogênese, telófase e tétrade (Figuras 2 G-I). Nos cinco indivíduos portadores de cromossomos B, a proporção de células com B foi, em média, sempre maior na primeira divisão meiótica (MI) do que na segunda (MII), como mostra a Tabela 1. Nas duas divisões meióticas (MI e MII) meiócitos sem cromossomo B foram observados, como mostrado na metáfase I na Figura 2C. A análise da frequência dos Bs na progênie dos cinco indivíduos revelou que 69% das sementes germinadas possuíam cromossomo B (Tabela 2) e apenas um dos 42 indivíduos testados exibiu 2 cromossomos B.

Outro parâmetro analisado neste trabalho foi o comportamento dos cromossomos B e do complemento A na meiose, diante das modificações pós-traducionais das histonas H3. A imunodeteção com o anticorpo anti-H3-fosforilada na Ser 10, realizada em diferentes fases da meiose mostrou que desde paquíteno (Figuras 3A, B e C) até as fases mais avançadas da meiose I (Figuras 3D, E e F), os bivalentes do complemento A fosforilaram na região proximal do bivalente. Diferentemente, o cromossomo B (univalente) foi quase totalmente fosforilado, contudo os sinais de fosforilação foram mais intensos no braço curto e na região pericentromérica do braço longo, e mais fracos na região terminal do braço longo (Figuras

3G, H e I e Figuras 4J, K e L). Na meiose II, os cromossomos As de *C. strigilatum* também fosforilaram apenas nas regiões centromérica/pericentromérica. Porém, em todas as células analisadas nenhum sinal de fosforilação foi encontrado nos cromossomos Bs durante a meiose II (Figuras 3J, K e L). Adicionalmente, averiguamos neste estudo se a fosforilação das histonas H3 estava associada a algum outro evento envolvendo os cromossomos bivalentes, como a ocorrência de quiasmas e as constrições nucleolares. As Figuras 4A a I mostram que a fosforilação ocorreu apenas nas regiões proximais dos bivalentes e não associada com os quiasmas terminais (Figuras 4A, B e C), quiasmas intersticiais (Figuras 4G, H e I), nem com as regiões organizadoras de nucléolos (Figuras 4D, E e F).

Para detectar se a presença dos cromossomos B estava afetando de algum modo a eficiência reprodutiva dos indivíduos portadores destes cromossomos, foi feita uma comparação da viabilidade polínica entre os indivíduos portadores e não portadores de Bs. Nesta comparação foram contados 34.907 grãos de pólen de anteras de flores em pré-antese. A análise estatística através do test T não permitiu traçar qualquer relação entre a viabilidade dos grãos de pólen e a presença de cromossomos B na planta mãe, já que diferenças significativas foram encontradas entre: (i) anteras de um mesmo indivíduo, contendo ou não Bs, (ii) entre indivíduos com cromossomos B, (iii) entre indivíduos sem cromossomos B e (iv) entre indivíduos com e sem Bs ( $p < 0,05$ ).

## **Discussão**

O cromossomo B de *Cestrum strigilatum* teve um comportamento univalente durante a meiose e distante do complemento A desde os primeiros estágios da meiose, sendo facilmente detectável por seu tamanho diminuto quando comparados aos demais cromossomos. Os dados obtidos do comportamento meiótico por coloração convencional permitiram propor que, em *Cestrum strigilatum*, há uma eliminação do cromossomo B durante a microsporogênese, uma

vez que a proporção de Bs foi sempre maior em MI do que em MII. No entanto, quando as progênies oriundas das mesmas plantas utilizadas na análise meiótica foram avaliadas quanto à presença do cromossomo B, uma alta taxa de indivíduos com B foi encontrada (69%). Este fato levantou uma questão: se os cromossomos B de *C. strigilatum* são eliminados durante a microsporogênese, como explicar a taxa de 69% de indivíduos portadores de Bs nas progênies estudadas? Nossos resultados apontam para três possibilidades: (i) o fato de haver eliminação de Bs durante a microsporogênese, não significa que os grãos viáveis gerados sejam destituídos de B, (ii) a fecundação ocorreria preferencialmente por grãos de pólen contendo Bs e (iii) havendo a eliminação dos Bs na microsporogênese, estes seriam transmitidos por gametas femininos. De acordo com Jones e Rees (1982), Beukeboom (1994) e Camacho *et al.* (2000), o acúmulo de Bs poderia ser explicado por mecanismos como não-disjunções na gametogênese e por fecundação preferencial de gametas carregando tais cromossomos. O fato de termos encontrado na progênie apenas um indivíduo contendo 2 cromossomos Bs, aliado a eliminação desse cromossomo na primeira e na segunda divisão meiótica, poderia sugerir que a transmissão desses cromossomos é assegurada pelos gametas femininos, contudo, isto não elimina a possibilidade destes dois cromossomos Bs terem vindo de um gameta masculino contendo dois Bs. Em milho, após fecundação induzida, foi observado que o acúmulo acontece na microsporogênese (González-Sánchez *et al.*, 2003), e em arroz a transmissão ocorre em ambas, micro e megasporogênese (veja Jones e Rees, 1982). Milho e arroz possuem flores unissexuais e ciclo de vida curto, favorecendo ensaios com cruzamentos controlados, o que tornou possível a determinação dos mecanismos e dos padrões de transmissão dos Bs (Puertas *et al.*, 1998; González-Sánchez *et al.*, 2003). Por outro lado, *C. strigilatum* possui flores hermafroditas, fecundação cruzada, flores pequenas e delicadas, além de um ciclo de vida relativamente longo quando, comparado ao milho e ao arroz. Isso torna a

realização de experimentos de cruzamentos controlados entre plantas com Bs e sem Bs laboriosos em virtude dos processos de manipulação.

Apesar da análise meiótica ter mostrado a eliminação dos cromossomos B na gametogênese masculina, não permitiu explicar porque os Bs não têm herança mendeliana. Uma das saídas para responder esta questão foi analisar estes cromossomos por imunodeteção de histonas H3 fosforiladas, já que a fosforilação dessas proteínas pode estar relacionada com a condensação, a coesão das cromátides irmãs e a segregação. Ao buscarmos repostas sobre o comportamento dos Bs, nossos resultados mostraram diferenças surpreendentes e significativas no padrão de fosforilação dos cromossomos A, bem como dos Bs frente aos cromossomos do complemento A. Em *Cestrum strigilatum*, a fosforilação aconteceu na região centromérica/pericentromérica de todos os cromossomos A na primeira fase da divisão meiótica, similar ao observado na mitose e na segunda fase da fase da divisão meiótica de vários organismos (Wei *et al.*, 1999; Houben *et al.*, 1999; Manzanero *et al.*, 2000). Este fato pode ser considerado incomum, já que trabalhos anteriores (Manzanero *et al.*, 2000), mostram que todos os cromossomos de arroz e trigo são inteiramente fosforilados na meiose I, independente de serem Bs ou pertencentes ao complemento A. O padrão de fosforilação encontrado em *C. strigilatum* trouxe mais dúvidas e não a resposta que estávamos esperando. Se a fosforilação da H3/ser10 está envolvida com o pareamento dos cromossomos e com a coesão das cromátides irmãs, porque então os cromossomos A são fosforilados apenas na região proximal e os Bs em quase toda sua extensão? Nossos resultados indicam que a fosforilação da H3/ser10 nos cromossomos do complemento A pode estar envolvida preferencialmente com o bom funcionamento da região centromérica e não com a condensação e a coesão das cromátides irmãs, diferentemente dos outros grupos vegetais. Contudo, para os cromossomos B, a fosforilação da H3/ser10 pode ter outro papel. As Figuras 2B-G mostram que as cromátides irmãs dos cromossomos B de *C. strigilatum* separam

somente na meiose II. Diante deste fato, se a fosforilação está associada com a coesão das cromátides irmãs, porque o B de *C. strigilatum* fosforila apenas na primeira fase da meiose e não na segunda? Uma das possibilidades é que a fosforilação quase que total dos cromossomos B esteja relacionada com a manutenção das duas cromátides na estrutura univalente. Isto poderia assegurar que suas cromátides sejam separadas somente na segunda fase da meiose, como observado por coloração convencional.

Em um outro estudo Kaszás e Cande (2000), encontraram sinais de fosforilação da H3/ser10 associados a RON e em um ponto de um bivalente de milho. Ao contrário do observado por Kaszás e Cande (2000), em nosso estudo não encontramos nenhuma relação entre a fosforilação da H3/ser10 com as regiões organizadoras de nucléolo ou pontos de quiasma em *C. strigilatum*, como pode ser observado nas Figuras 4A-I. Esses dados vêm a ressaltar as características singulares de *C. strigilatum* quanto ao padrão de fosforilação da H3/ser10 em relação aos demais grupos vegetais estudados.

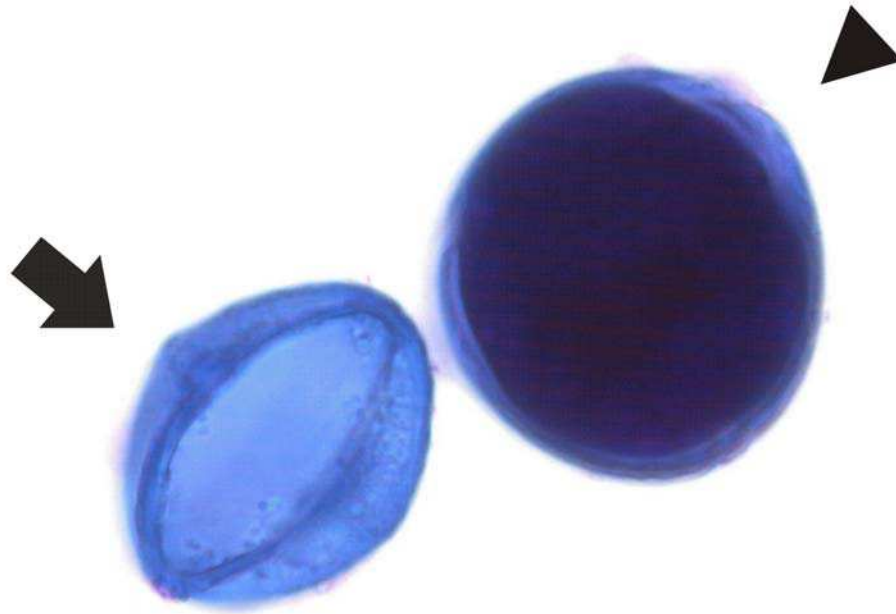
A não fosforilação de cromossomos univalentes e de cromossomos B na meiose II já havia sido reportada na literatura (Manzanero *et al.*, 2000), contudo, neste caso os autores mostraram que houve separação das cromátides irmãs dos univalentes logo na meiose I, ao contrário do que foi observado neste trabalho. Assim, é possível que a não fosforilação dos Bs na meiose II de *C. strigilatum* possa ser um dos fatores relacionados com sua eliminação, como pode ser observado nas Figuras 2G-I, já que suas cromátides, apesar de se separarem, não migraram corretamente para os pólos opostos juntamente com os cromossomos do complemento A. De fato, a não fosforilação dos Bs não explica a diminuição na frequência de Bs na transição MI para MII, mas pode estar relacionado com a eliminação dos Bs na transição de prófase II para grãos de pólen (ver Tabela 2), do mesmo modo que univalentes tendem a ser perdidos por falhas na segregação. Na meiose II, os cromossomos As de *C. strigilatum* também fosforilaram nas regiões centromérica/pericentromérica, concordando

assim com o processo comum encontrado por Wei *et al.* (1999), Houben *et al.* (1999) e Manzanero *et al.* (2000).

Um outro parâmetro analisado foi se a presença de cromossomos B poderia causar algum efeito sobre a viabilidade dos grãos de pólen. Para isto foi comparada a viabilidade polínica entre os indivíduos portadores e não portadores de Bs. Após a contagem de 34.907 grãos de pólen, foi observado que havia diferenças significativas entre: (i) anteras de um mesmo indivíduo, contendo ou não Bs, (ii) entre indivíduos com cromossomos B, (iii) entre indivíduos sem cromossomos B e (iv) entre indivíduos com e sem Bs. Nossos resultados indicam que a presença de cromossomos B nas plantas mãe não interfere na viabilidade dos polens das suas flores. Um resultado oposto foi encontrado em arroz (González-Sánchez *et al.*, 2004). Estes autores reportaram que a viabilidade dos grãos de pólen não está relacionada com a presença de Bs na planta mãe, mas sim com a presença e quantidade desses cromossomos no grão de pólen. Concluindo, seria importante saber se os Bs estão presentes em todos os grãos de pólen produzidos, bem como a relação entre a ocorrência dos Bs e o número de polens viáveis e inviáveis. Para tal, seria importante localizar os Bs por hibridação *in situ* em todas as fases da meiose até o produto final (grãos de pólen).

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem às agências SEMA-IAP, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.



**Figura 1.** Comparação entre pólen viável e inviável. Polens viáveis (cabeça de seta) possuem um aspecto túrgido com citoplasma evidentemente corado, enquanto que os polens inviáveis (seta) aparecem murchos e com o citoplasma reduzido e apenas levemente corado ou ausente.

**Tabela 1. Números de Bs e suas respectivas proporções em diferentes fases da meiose.**

Células	Contagens de Bs na meiose					Total
	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5	
M I com Bs	364	378	454	306	153	1655
M I sem Bs	654	483	555	986	316	2994
M II com Bs	110	124	104	210	185	733
M II sem Bs	1067	611	376	1058	1488	4600
Total	2195	1596	1489	2560	2142	9982
PCB – MI	0,36	0,44	0,45	0,24	0,33	0,55
PCB – MII	0,09	0,17	0,22	0,17	0,11	0,15

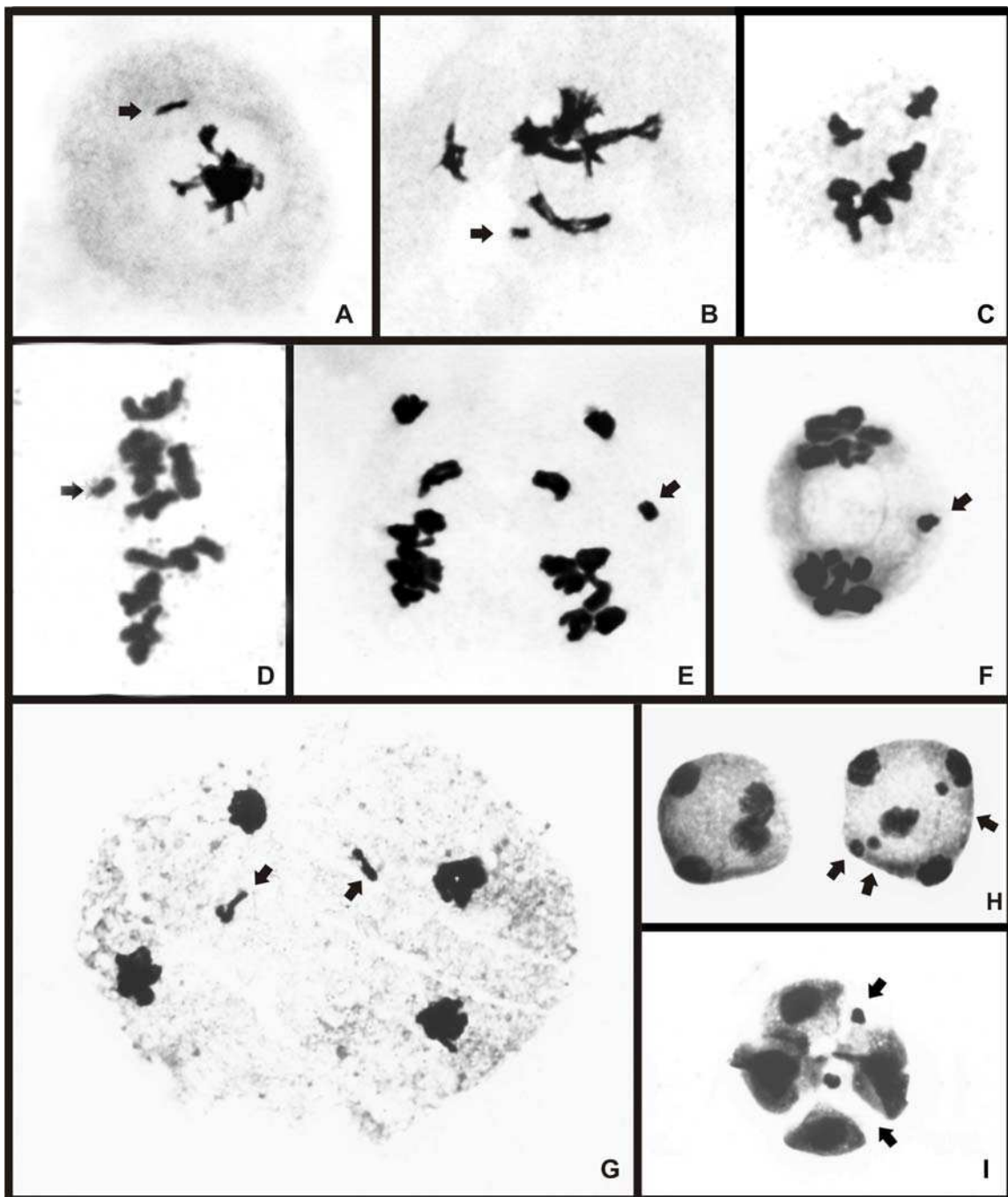
**1 - MI** = meiose I;

**2 - MII** = meiose II

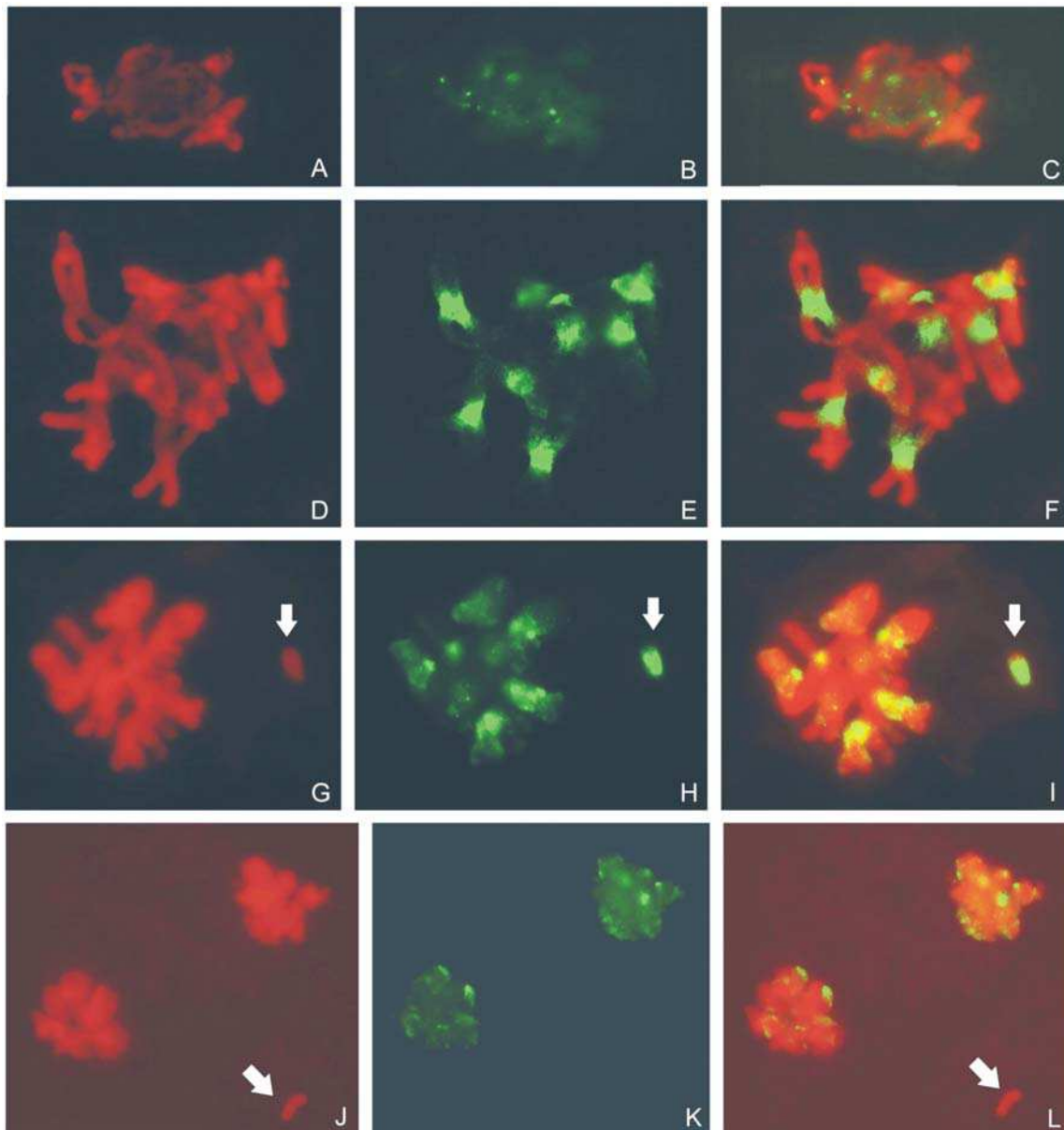
**3 - PCB** = proporção de células com cromossomo B

**Tabela 2: Quantidade de indivíduos portadores de cromossomo B na progênie**

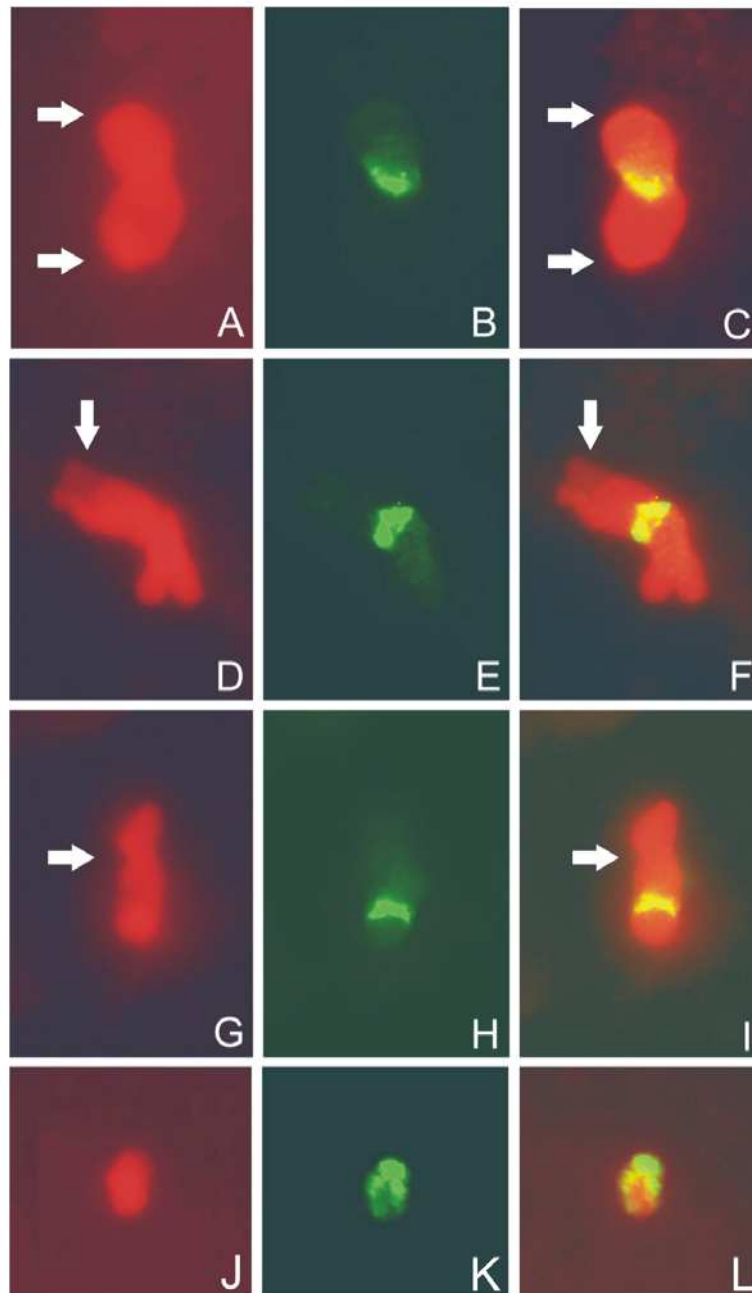
Amostras	Sem B	Com B	Total	Proporção de Bs
Planta 1	4	8	12	0,67
Planta 2	5	3	8	0,38
Planta 3	0	11	11	1,00
Planta 4	4	7	11	0,64
Planta 5	0	0	0	0
Total	13	29	42	0,69



**Figura 2.** Microsporogênese de *C. strigilatum* com B. A) paquíteno, B) diplóteno, C) metáfase I sem Bs, D) metáfase I, E) anáfase I, F) metáfase II, G e H) Telófase II, I) Tétrade com eliminação de Bs. As setas apontam cromossomos B. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 3.** Imunodeteção da H3 fosforilada na meiose de *C. strigilatum*. Os cromossomos corados com DAPI são mostrados em vermelho e a imunodeteção da *H3/ser10* em verde. A coluna da direita apresenta a sobreposição das duas primeiras colunas. A-C) paquíteno com sinais proximais e não ao longo dos bivalentes. D-F) diplóteno sem cromossomo B. G-I) metáfase I com B parcialmente fosforilado e cromossomos A fosforilados apenas na região proximal. J-L) metáfase II com B não fosforilado (seta) e cromossomos A fosforilados na região proximal. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 4.** Imunodeteccção de H3 fosforilada em diferentes bivalentes de *C. strigilatum*, com fosforilação evidentemente na região proximal. Cromossomos corados com DAPI são mostrados em vermelho e a imunodeteccção da *H3/ser10* em verde. As imagens na coluna da direita representam a sobreposição das imagens das duas primeiras colunas. **A-C)** bivalente metacêntrico com quiasmas terminais (setas). **D-F)** bivalente submetacêntrico com a região do satélite não fosforilada (seta). **G-I)** bivalente submetacêntrico com quiasma intersticial (seta). **J-L)** cromossomo B com braço curto fosforilado e o braço longo parcialmente fosforilado.

## Referências

- BEUKEBOOM LW. 1994.** Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. *Heredity* **73**: 328-336.
- CAMACHO JPM, SHARBEL TF, BEUKEBOOM LW. 2000.** B-chromosome evolution. *Phil Trans R Soc Lond B* **355**:163–178.
- FREGONEZI JN, ROCHA C, TOREZAN JMD, VANZELA ALL. 2004.** The occurrence of different Bs in *Cestrum intermedium* and *Cestrum strigillatum* (Solanaceae) evidenced by chromosome banding. *Cytogenetic and Genome Research* **106**: 184-188.
- FREGONEZI JN, VILAS-BOAS LA; FUNGARO MHP, VANZELA ALL. 2007.** Distribution of Ty3/gypsy-like retroelements on the A and B chromosomes of *Cestrum strigillatum* and *C. intermedium* (Solanaceae). *Genetics and Molecular Biology*. **no prelo**.
- GONZALEZ-SANCHEZ M, GONZALEZ-GONZALEZ E, MOLINA F, CHIAVARINO AM, ROSATO M, PUERTAS MJ. 2003** One gene determines maize B chromosome accumulation by preferential fertilization; another gene(s) determines their meiotic loss. *Heredity* **90**: 122–12.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ M, CHIAVARINO M, JIMÉNEZ G, MANZANERO S, ROSATO M, PUERTAS MJ (2004):** The parasitic effects of rye B chromosomes might be beneficial in the long term. *Cytogenetic and Genome Research* **106**:386-393.
- HENDZEL MJ, WEI Y, MANCINI MA., VAN HOOSER A, RANALLI T, BRINKLEY BR, BAZETT-JONES DP, ALLIS C.D. 1997.** Mitosis specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **106**: 348–360.
- HOUBEN A, WAKO T, FURASHIMA-SHIMOGAWARA R, PRESTING G, KUNZEL G, SCHUBERT I e FUKUI K. 1999.** The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *Plant Journal* **18**: 675–679.
- JONES N, HOUBEN A. 2003.** B chromosomes in plants: escapes from de A chromosome genome. *Trends in Plant Science* (8) **9**: 417-421.
- JONES RN, REES H. 1982.** B chromosomes. New York: **Academic Press**.
- KASZÁS E, CANDE WZ. 2000.** Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *Journal Cell Sci* **113**: 3217–3226.
- MANZANERO S, ARANA P, PUERTAS MJ, HOUBEN A. 2000.** The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. *Chromosoma* **109**: 308\_317.
- PUERTAS MJ, GONZÁLEZ-SÁNCHEZ M, MANZANERO S, ROMERA F, JIMÉNEZ MM. 1998.** Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. IV. Localization of the genes controlling B transmission rate. *Heredity* **80**: 209–213.

**SÝKOROVÁ E, YOONG LIM, FAKIJUS J, LEITIC AR. 2003.** The signature of the *Cestrum* genome suggests an evolutionary response to the loss of (TTTAGGG)<sub>n</sub> telomeres. *Chromosoma* **112**:164-172.

**WEI Y, YU L, BOWEN J, GOROVSKY M.A, ALLIS C.D. 1999.** Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **97**: 99–109.

## CONCLUSÕES

---

1. A análise convencional reforçou que as espécies de *Cestrum* possuem estabilidade cromossômica numérica com  $2n=16$  e núcleos interfásicos reticulados.
2. A análise por bandamento cromossômico, ao contrário, mostrou que os cariótipos diferem consideravelmente quanto à ocorrência, distribuição e quantidade de bandas entre as espécies aqui estudadas, do mesmo modo como as descritas na literatura.
3. Os blocos heterocromáticos, independente de suas composições (ricos em AT, GC ou neutros) exibiram distribuição equilocal e equidistante, com sítios preferenciais de ocorrência, como por exemplo os *dots* intercalares e grandes blocos intercalares/subterminais).
4. A hibridação *in situ* mostrou que o DNAr 45S ocorre preferencialmente nas regiões terminais dos braços curtos, com variações no número, tamanho dos blocos e cromossomos de ocorrência.
5. A hibridação *in situ* mostrou que o DNAr 5S ocorre preferencialmente na região pericentromérica do par 8, exceto em *C. capsulare*.
6. O cromossomo B de *C. strigilatum* não obedeceu aos padrões mendelianos de herança, sofrendo eliminação durante a microsporogênese. Este fato, associado à elevada incidência de Bs nas progênies subsequentes, sugere que a transmissão pode ser preferencialmente materna.
7. A análise da fosforilação das histonas H3 na microsporogênese não indicou que este evento está associado à eliminação dos Bs na transição da meiose I para a

meiose II, contudo, evidenciou que tanto os Bs quanto os cromossomos do complemento A possuem um comportamento diferencial dos citados na literatura, mostrando um possível papel secundário como sinalizadores para a cinética dos cromossomos.

8. A presença dos Bs não interferiu na viabilidade dos grãos de pólen quando comparados os indivíduos portadores e não portadores de Bs.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- BENKO-ISEPPON, A. M; MORAWETZ, W. Cold-induced chromosome regions and karyosystematics in *Sambucus* and *Viburnum*. *Bot. Acta* n.106, pp.183-192, 1993.
- BERG, C.; GREILHUBER, J. Cold-sensitive chromosome regions and their relation to constitutive heterochromatin in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Genome* n 35: pp 921-930. 1992.
- BERG C e GREILHUBER J. Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum* (Solanaceae): *C. strigilatum*, *C. fasciculatum*, and *C. elegans*. *Plant Systematic e and Evolution*, n 185, pp133-151, 1993a.
- BERG, C e GREILHUBER, J Cold-sensitive regions and heterochromatin in *Cestrum aurantiacum* (Solanaceae). *Plant Systematic and Evolution*, n 185, pp 259-273, 1993b.
- BERNARDELLO, L. M; ANDERSON, G. J Karyotypic studies in *Solanum* section *Basarthrum* (Solanaceae). *American. Journal of Botany* n 77, v 3, pp 420-431, 1990.
- BERNARDELLO, L. M; HEISER, C. B; PIAZZANO, M. Karyotypic studies in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae). *American. Journal of Botany*. n 81, v 1, pp 95-103, 1994.
- BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. *Heredity* n73, pp 328-336, 1994.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C; BRAMMER, S; PUERTAS, M. J; ZANNATA, A. C; PRESTES, A; MORAES-FERNANDES, M. I. B e GUERRA, M. Mitotic instability in wheat×*Thinopyrum ponticum* derivatives revealed by chromosome counting, nuclear DNA content and histone H3 phosphorylation pattern. *Plant Cell Reports*. v 24 , n3, pp 172-178, 2005.
- CAMACHO J. P. M; SHARBEL T. F; BEUKEBOOM L.W: *B-chromosome evolution*. *Phil Trans R Soc Lond B* 355, pp 163–178. 2000.
- CARVALHO, L. A. F; SCHNOOR A. *Sessea* Carvalho et Schnoor – nova seção para o gênero *Cestrum* (Solanaceae). *Rodriguésia*, 71-75(45-49), pp 15-24. 1993/97.
- CAVALHEIRO, A. L.; TOREZAN, J. M. D; FADELI, L. Recuperação de áreas degradadas: procurando por diversidade e funcionamento de ecossistemas. In *A bacia do rio Tibagi* (eds M.E Medri, E. Bianchini, °A Shibata & J.A. Pimenta), pp 213-214, Edição dos editores, Londrina, 2002.
- COBB, J; MIYAIKE, M; KIKUCHI, A; HANDEL, M. A. Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase II $\alpha$  localization and chromosome condensation. *Chromosoma* 108, pp 412–425. 1999.
- COSTA, J. Y. Estudos cariotípicos na família Alismataceae Vent. no Estado de São Paulo. Mestrado em Ciências Biológicas na Área de Biologia Vegetal. IB-USP, 2002.
- CRONQUIST, A. *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. The New York Botanical Garden, New York, 555 pp. 1988.
- D'ARCY, W. G. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M.and Estrada N (eds) *Solanaceae III – Taxonomy, chemistry,*

- evolution*. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, p 75-137, 1991.
- DARLINGTON, C. D; LACOUR, L. Differential reactivity of the chromosomes. *Ann. Bot.* n. s. 2, pp 615-625, 1938.
- DUNAL, M. F. Solanaceae. In: *A. de Candolle .Prodr.* Paris, v 13, n (1), pp 1-741, 1852.
- FREGONEZI, J. N; ROCHA, C; TOREZAN, J. M. D; VANZELA A. L. L— The occurrence of different Bs in *Cestrum intermedium* and *Cestrum strigillatum* (Solanaceae) evidenced by chromosome banding. *Cytogenetic and Genome Research*, 106, pp 184-188, 2004.
- FREGONEZI, J. N; FERNANDES, T; TOREZAN, J. M. D; VIEIRA, A.O e VANZELA A. L. L. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on physical mapping of repetitive DNA. *Gen Mol Biol*, n 29 (1), pp. 97-104, 2006.
- GERLACH, W. L; BEDBROOK, J. R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* (7), pp 1869-1885, 1979.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M; CHIAVARINO, M; JIMÉNEZ, G; MANZANERO, S; ROSATO, M; PUERTAS, M. J. The parasitic effects of rye B chromosomes might be beneficial in the long term. *Cytogenetic and Genome*, 106, pp 386-393, 2004.
- GONZALEZ-SANCHEZ, M; GONZALEZ-GONZALEZ, E; MOLINA, F; CHIAVARIJNO, A. M; ROSATO, M; PUERTAS, M. J. One gene determines maize B chromosome accumulation by preferential fertilization; another gene(s) determines their meiotic loss. *Heredity* 90, pp 122–129, 2003.
- GUERRA M: Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Gen Mol Biology* 23, pp 1029-1041, 2000.
- HANS, F. e DIMITROV, S.. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* 20, pp 3021-3027, 2001.
- HARBONE, J, B. Systematic Significance of Variations in defense Chemistry in the Solanaceae. IN: D'ARCY, W. *Solanaceae Biology and Systematics*, New York, , pp 328-345. 1991.
- HAWKES, J. G; LESTER, R. N; NEE, M; ESTRADA, N. *Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution*. Kew: The Royal Botanic Gardens/ The Linnean Society of London, 1991.
- HENDZEL MJ et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, pp 348-360, 1997.
- HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative Genome Organization in Plants: From Sequence and Markers to Chromatin and Chromosomes. *The Plant Cell*, v. 12, pp 617–635, may, 2000.
- HOUBEN, A; WAKO, T; FURUSHIMA-SHIMOGAWARA, R; PRESTING, G; KÜNZEL, G; SCHUBERT, I; FUKUI, K. The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *Plant Journal*. 18, pp 675–679. 1999.

HSU, J. Y; SUN, Z. W; LI, X; REUBEN, M; TATCHELL, K; BISHOP, D. K; GRUSHCOW, J. M; BRAME, C. J; CALDWELL, J. A; HUNT, D. F; LIN, R; SMITH, M. M; ALLIS, C. D. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, 102, pp 279-291, 2000.

HUNZIKER, A. T. South American Solanaceae; a synoptic survey. In: Hawkes, R. N. Lester and A. D. Skelding [eds.], *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*, 7ed Linnean Society Symposium Series. Academic Press, N.Y, pp 49-85, 1976.

HUNZIKER, A. T. *The Genera of Solanaceae*. Alemanha: b A.R.G Kommanditgesellschaft, 497 pp, 2001.

JACKSON, R. C. e NEWMARK, K. P. Effects of supernumerary chromosomes on production of pigment in *Haplopappus gracilis*. *Science* 132, pp 1316-1317, 1960.

JONES, N; HOUBEN, A. B chromosomes in plants: escapes from de A chromosome genome. *Trends in Plant Science*, vol 8, no 9, pp 417-421, 2003.

JONES, R. N. Are B chromosomes selfish? In: *The evolution of genome size*. ed. T. Cavalier-Smith, pp. 397-425. London: Wiley, 1985.

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

JUDD, E.S. et al. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Massachusetts U.S.A: Sinauer Associates, 1999.

KANNAP, S. Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *Journal of Experimental Botany*. V 53, n 337, pp 2001-2022, 2002.

KANNAP, S; BOHS, L; NEE, M; SPOONER, D. M. Solanaceae – a model for linking genomics with biodiversity. *Comparative and Functional Genomics*. v 5, pp 285-291. 2002.

KASZÁS, E; CANDE, W. Z. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J. Cell Sci*. 113, pp 3217-3226, 2000.

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

MANZANERO, S; ARANA, P; PUERTAS, MJ; HOUBEN, A. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. *Chromosoma* 109, pp 308-317, 2000.

MIAO, V. P; COVERT, S. F; VANETTEN, H. D. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable B chromosome. *Science* 254, pp 1773-1776, 1991.

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

MOSCONE, E. A.; LAMBROU, M; HUNZIKER, T; EHRENDORFER, F. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Pl. Syst. Evol.* n.186, pp 213-229, 1993.

- NEVES, N; DELGADO, M; SILVA, M; CAPERTA, A; MORAIS-CECÍLIO, L; VIEGAS, W. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenet Genome Res* 109, pp 104–111. 2005.
- NOWAK, S. J. e CORCES, V. G. Phosphorylation of histone H3 of Chromosomes in Trillium, *J. Genet.*, pp 19-40, 2000.
- ÖSTERGREN, G.. Parasitic nature of extra fragment chromosomes. *Bot. Notiser*, **2**, pp 157-163, 1945.
- PILLEN, K; PINEDA, O; LEWIS, C.B; TANKSLEY, S. D. Status of genome mapping tools in the taxon Solanaceae. In Genome mapping in plants. Edited by A.H. Paterson. R.G. Landes Company, Austin, Texas, pp 281–308, 1996.
- POZZOBON, M. T; SCHIFINO-WITTMANN, M. T; BIANCHETTI L. B Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian Capsicum L. (Solanaceae) species: do  $x=12$  and  $x=13$  represent two evolutionary lines? *Botanical Journal of the Linnean Society* 151 (2), pp 259–269, 2006.
- PRIGENT, C.L e DIMITROV, S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of Cell Science* 116, pp 3677-3685, 2003.
- PUERTAS, M. J; GONZALEZ-SANCHEZ, M; MANZANERO, S; ROMERA, F; JIMÉNEZ, M. M. Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. IV. Localization of the genes controlling B transmission rate. *Heredity* 80, pp 209–213, 1998.
- RODDICK, J.G. The Importance of the Solanaceae in Medicine and Drug Therapy. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M. and Estrada N (eds) *Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution*. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, pp 7-20, 1991.
- SÁ, K. L. V. R. A família Solanaceae Juss. *Espécies arbóreo/arbustivas na bacia do rio Tibagi-Pr*. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, UEL, 2002.
- SCHIMIDT, T e HELSOP-HARRISON, J.S. Genomes, genes and junk: the large scale organization of plant chromosomes. *Trends in Plant Science*, v3, n5, 1, pp. 195-199, 1998.
- SCHULTES, R. e RAFFAUF, R. F. Phytochemical and Ethnopharmacological Notes on the Solanaceae of the Northwest Amazon. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M. and Estrada N (eds) *Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution*. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, pp 25-49. 1991.
- SCHWARZACHER, T. DNA, chromosomes, and in situ hybridization. *Genome*, v 46, pp 953-962, 2003.
- SHARMA, A e SEN, S. *Chromosome Botany Science*. Calcutá, Índia, Science Publishers, Inc, 115 pp., 2002
- SMITH LB e DOWNS RJ. Solanáceas. In: Reitz PR (ed) *Flora Ilustrada Catarinense*. Biblioteca Superior de Cultura, Itajaí, pp. 321. 1966
- STAUB, R.W. Leaf striping correlated with the presence of B chromosomes in maize. *J. Hered.* 78, pp 71-74. 1987.

SÝKOROVÁ E., LIM KY., CHASE M. W., KNAPP S., LEITCH I. J., LEITCH A. R., FAJKUS J. The absence of *Arabidopsis*-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (Solanaceae); first evidence from eudicots. *Plant Journal*, v34: pp 283–291, 2003a

SÝKOROVÁ E.; YOONG LIM., FAKIJUS J., LEITIC A. R. The signature of the *Cestrum* genome suggests an evolutionary response to the loss of (TTTAGGG)<sub>n</sub> telomeres. *Chromosoma*. 112: 164-172, 2003b.

VAN DER PIJL, L. *Principles of Dispersal in higher plants*. 2 ed, Springer Verlag, Berlin, pp 214, 1982.

WEI, Y., YU, L., BOWEN, J., GOROVSKY, M.A. e ALLIS, C.D.. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97, pp 99-109, 1999.

WHITE, M.J.D. *Animal Cytology and Evolution*. 3rd ed. Cambridge Univ. Press, London. 1973.