



GUILHERME TOMAZ BRAZ

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM *Chamaecrista*
MOENCH (LEGUMINOSAE -
CAESALPINIOIDEAE)**

LAVRAS - MG

2014

GUILHERME TOMAZ BRAZ

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM *Chamaecrista* MOENCH
(LEGUMINOSAE - CAESALPINIOIDEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Giovana Augusta Torres

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Braz, Guilherme Tomaz.

Evolução cariotípica em *Chamaecrista* Moench (Leguminosae -
Caesalpinioideae) / Guilherme Tomaz Braz. – Lavras : UFLA, 2014.
58 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Giovana Augusta Torres.

Bibliografia.

1. DNA ribossomal. 2. Número cromossômico. 3. Cassiinae. 4.
Citometria de fluxo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.3230415

GUILHERME TOMAZ BRAZ

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM *Chamaecrista* MOENCH
(LEGUMINOSAE - CAESALPINIOIDEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 01 de agosto de 2014.

Dra. Mariana Esteves Mansanares UFLA

Dra. Lisete Chamma Davide UFLA

Dra. Giovana Augusta Torres
Orientadora

LAVRAS - MG

2014

A Deus,
OFEREÇO

Aos meus pais, Francisco e Simone, as minhas irmãs, Nayara e Nathália, pelo
exemplo e apoio incondicional.

A Maria Luiza pelo apoio, carinho e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Obrigado primeiramente a Deus, por sempre iluminar meu caminho, pelas oportunidades e pelas pessoas que colocou em minha vida.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia pela estrutura concedida para a realização deste trabalho.

À FAPEMIG obrigado pela concessão da bolsa.

Obrigado a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos transmitidos e por elevarem cada vez mais o nível da pesquisa em nossa Universidade. Dentre esses quero destacar as professoras doutoras Lisete Chamma Davide e Vânia Helena Techio pela participação ativa na minha formação profissional, pelas contribuições e pela atenção. Além dessas, quero agradecer à professora doutora Mariana Esteves Mansanares pela amizade, conselhos e disponibilidade em participar como membro da banca desta defesa.

À professora doutora Giovana Augusta Torres, agradeço pela confiança creditada a mim, pela orientação e, mais do que isso, pelos conselhos e ensinamentos. Tudo que sou hoje profissionalmente, e também como pessoa, devo a essa profissional da qual me orgulho muito de ter sido orientado por quase seis anos.

Ao professor doutor da Universidade Federal de Pernambuco, Luís Gustavo, obrigado pelos conselhos a respeito de algumas metodologias do trabalho.

Agradeço a todos os amigos e amigas do Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Federal de Lavras, pela convivência e auxílio. Certamente cada um contribuiu para que este trabalho fosse possível, o que comprova a importância do trabalho em equipe. Gostaria de destacar a amizade das estudantes de mestrado Aline Silva e Dayana Silva, e de doutorado Natália

Padilha. Às doutorandas Gabriele Barreto e Cristina de Paula, agradeço pelo auxílio na citometria de fluxo. E à doutoranda Laiane Corsini e pós-doutoranda Fernanda Bustamante pela amizade e auxílio no desenvolvimento da hibridização *in situ* fluorescente.

Obrigado àqueles que participaram diretamente do desenvolvimento do trabalho: os estudantes de graduação Felipe Cardoso e Clara Mitre, a doutoranda Ludmila Oliveira e a pós-doutoranda Kátia Ferreira Marques de Resende.

A Ludmila Oliveira e Kátia Ferreira agradeço profundamente todos os ensinamentos, conselhos e amizade, além da atenção e disponibilidade.

Não poderia deixar de agradecer aos meus pais, Francisco Lopes Braz e Simone Alves Tomaz Braz, pela educação dada a mim, pelo exemplo de garra, positivismo e fé. Obrigado também as minhas irmãs, Nayara e Nathália, pelo companheirismo, carinho, apoio e amizade, e a minha namorada, Maria Luiza, pelo carinho, apoio, confiança e compreensão.

E por último e não menos importante gostaria de agradecer a minha família em Lavras, meus amigos-irmãos João Victor, João Pedro, João Luís e Lucas Carvalho.

“... tenha sempre como meta muita força, muita determinação e, sempre, faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus que um dia você chega lá.

De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

RESUMO GERAL

A subtribo Cassiinae (Caesalpinioideae - Leguminosae), formada a partir da subdivisão de *Cassia s. l.*, compreende os gêneros *Chamaecrista*, *Cassia s. stric.* e *Senna*. A subtribo possui espécies distribuídas nas Américas, África e Ásia. *Chamaecrista* Moench é um dos maiores gêneros de Caesalpinioideae com aproximadamente 330 espécies. O Brasil é considerado o centro de diversidade e radiação desse gênero, onde se encontram 232 espécies, das quais 72 são endêmicas de Minas Gerais. Na literatura, existe controvérsia a respeito das relações taxonômicas dentro da subtribo e dentro dos gêneros que a compõem. A citogenética é uma área que pode dar relevante contribuição para essas questões taxonômicas e evolutivas na medida em que as alterações cromossômicas são eventos de diversificação entre as espécies. Sendo assim, o presente trabalho objetivou a caracterização cariotípica de espécies representantes de diferentes seções de *Chamaecrista*. Para isso, nove espécies do gênero foram coletadas na região de Diamantina – MG. Para quatro dessas espécies, a descrição do número cromossômico é inédita. Os resultados sugerem a ocorrência de alterações cromossômicas tanto numéricas quanto estruturais durante a evolução de *Chamaecrista*. O gênero apresenta variabilidade para número e distribuição de sequências de DNA ribossomal, primeira vez relatada através da hibridização *in situ* fluorescente na subtribo. Dados citogenéticos sugerem a segregação dos gêneros de Cassiinae.

Palavras-chave: rDNA. Número cromossômico. Cassiinae.

GENERAL ABSTRACT

The subtribe Cassiinae (Caesalpinioideae - Leguminosae), formed from *Cassia s. l.* subdivision, contains *Chamaecrista*, *Cassia* and *Senna* genera and is composed by species distributed in the Americas, Africa and Asia. Although Cassiinae is considered as monophyletic, the relationships among its genera remain unclear. *Chamaecrista* is one of the biggest Caesalpinioideae genera, containing about 330 species. Brazil is its center of diversity and radiation, where there are 232 species, 72 of them endemic from Minas Gerais state. Since the chromosomal alterations are involved in the species diversification, cytogenetics data can provide relevant taxonomic and evolutionary information. Therefore, this study aimed to characterize the karyotype of species representing different *Chamaecrista* sections. Nine species of the genus were collected in the region of Diamantina-MG. Four of them had their chromosome number determined for the first time. The results suggest the occurrence of either numerical or structural chromosome alterations during *Chamaecrista* evolution. The genus presents variability for number and distribution of ribosomal DNA sequences, first reported by fluorescent in situ hybridization in the subtribe. Cytogenetic data suggest the segregation of Cassiinae genera.

Keywords: rDNA. Chromosome number. Cassiinae.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 11
2	REFERENCIAL TEÓRICO 13
2.1	Aspectos sistemáticos e evolutivos de Cassiinae 13
2.2	Aspectos citogenéticos de Cassiinae 16
3	OBJETIVOS 20
3.1	Objetivo geral 20
3.2	Objetivos específicos 20
	REFERÊNCIAS 21
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO 26
	ARTIGO 1 Evolução cariotípica em espécies de <i>Chamaecrista Moench</i> 26
1	INTRODUÇÃO 28
2	MATERIAL E MÉTODOS 31
2.1	Material botânico 31
2.2	Preparo das lâminas 31
2.3	Número e morfometria cromossômica 33
2.4	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) 34
2.5	Determinação da quantidade de DNA através da citometria de fluxo 35
3	RESULTADOS 37
3.1	Quantidade de DNA e características do complemento cromossômico 37
3.2	Número e distribuição dos locos de DNA ribossomal 42
3.3	Polissomatia em espécies de <i>Chamaecrista Moench</i> 45
4	DISCUSSÃO 47
5	CONCLUSÕES 52
	REFERÊNCIAS 54

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Fabaceae (Leguminosae), a terceira maior família de angiospermas com 19.325 espécies e 727 gêneros (LEWIS et al., 2005), possui hábito variando de herbáceo a arbóreo, e ocupa uma ampla gama de *habitats* que vão desde florestas chuvosas a desertos, e de terras baixas a *habitats* alpinos (DOYLE; LUCKOW, 2003).

Essa família é tradicionalmente subdividida em três subfamílias: Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae. No entanto, essa subdivisão requer estudos filogenéticos para uma melhor classificação para estas subfamílias, já que Caesalpinioideae é considerada um grupo parafilético (BRUNEAU et al., 2001; DOYLE et al., 2000; KAJITA et al., 2001; SOUZA; LORENZI, 2008).

Caesalpinioideae é considerada a subfamília mais primitiva (DOYLE; LUCKOW, 2003), possuindo representantes nos mais variados *habitats*, principalmente no sudeste asiático, na África e na América. No Brasil, ocorrem 2.250 espécies e 154 gêneros (LEWIS et al., 2005), dos quais se destaca *Cassia* L. *sensu lato*, como um dos maiores gêneros de Eudicotiledôneas em todo o mundo (IRWIN; TURNER, 1960; ACHARYA; PANDA, 2010).

Irwin e Barneby (1982) baseados nas características do androceu, corola e arquitetura floral, propuseram a elevação do gênero *Cassia* s.l. a subtribo, sendo essa denominada Cassiinae e constituída pelos gêneros *Cassia* L. *sensu stricto*, *Senna* Mill. e *Chamaecrista* Moench. Esta segregação de *Cassia* s.l. em três gêneros distintos já havia sido proposta por Bentham (1871) e é atualmente reconhecida por estudos com caracteres morfológicos (OWENS; LEWIS, 1989), moleculares com sequências de DNA cloroplastídeos e marcadores (ACHARYA; MUKHERJEE; PANDA, 2011; BRUNEAU et al., 2001; DOYLE

et al., 1997; DOYLE et al., 2000; HERENDEEN; BRUNEAU; LEWIS, 2003; KAJITA et al., 2001; TORRES et al., 2011) e citogenéticos (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005b, BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006; IRWIN; TURNER, 1960; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004). Apesar disso, ainda há controvérsias quanto às relações de parentesco entre os gêneros dentro da subtribo.

Alguns autores sugerem que *Chamaecrista* seria um clado distinto e irmão do clado *Cassia-Senna* (BRUNEAU et al., 2001; BRUNEAU et al., 2008; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005b; CONCEIÇÃO et al., 2009; MARAZZI et al., 2006; TORRES et al., 2011), enquanto outros estudos indicam *Senna* e *Chamaecrista* como grupos irmãos e distintos do clado *Cassia* (DOYLE et al., 1997; HERENDEEN; BRUNEAU; LEWIS, 2003; KAJITA et al., 2001).

Apesar de sua importância, dados citogenéticos em Cassiinae são escassos, estando relacionados principalmente a contagens cromossômicas, havendo a necessidade de mais informações cariológicas com maior poder informativo para a subtribo. Nesse sentido, dados como número cromossômico, padrão de distribuição das sequências de DNA ribossomal e quantidade de DNA, associados às informações filogenéticas são considerados uma ferramenta valiosa para o entendimento dos mecanismos de evolução cariotípica e suas implicações para a taxonomia dos grupos (GUERRA, 1990; GUERRA, 2008).

Com isso, o presente trabalho visa entender a evolução cariotípica dentro de *Chamaecrista* a fim de contribuir para a definição das relações taxonômicas de Cassiinae.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos sistemáticos e evolutivos de Cassiinae

Nas análises filogenéticas moleculares de Leguminosae, Faboideae e Mimosoideae parecem representar linhagens monofiléticas, significando que todos os descendentes dessas subfamílias compartilham um ancestral comum e exclusivo, no qual táxons não relacionados descendem de outro ancestral (DOYLE et al., 2000; KAJITA et al., 2001).

Entretanto, Caesalpinioideae provavelmente é parafilética (DOYLE et al., 2000; SOUZA; LORENZI, 2008), compreendendo uma reunião de diversas linhagens não relacionadas. A maioria dessas diverge relativamente cedo na história da família e não possui alguns aspectos florais distintivos que são usados para agrupar os gêneros dentro das outras duas subfamílias. Dentre essas linhagens, a tribo Cercideae (Caesalpinioideae) foi a primeira a divergir na família, de acordo com dados moleculares (DOYLE; LUCKOW, 2003).

A subfamília Caesalpinioideae é dividida em quatro ou cinco tribos: Cercideae, Caesalpineae, Cassieae, Detarieae, e Macrolobieae (derivada de Detarieae) (TUCKER, 2003). Cassieae, na qual está inserida a subtribo Cassiinae, é não monofilética. Essa tribo inclui ao menos três linhagens distintas, de acordo com análises filogenéticas moleculares (DOYLE, 1995; DOYLE et al., 2000) e morfológicas (TUCKER, 2003).

Cassiinae é composta pelos gêneros *Cassia* L. *sensu stricto*, *Chamaecrista* Moench e *Senna* Mill, e foi estabelecida a partir da subdivisão do gênero *Cassia* L. *sensu lato*, reconhecida com base nos caracteres de filamentos e na presença ou ausência de bractéolas (IRWIN; BARNEBY, 1982). Os três gêneros apresentam algumas características morfológicas similares e mostram

muitos caracteres especializados, tais como flores de cor amarela, corola pentâmera, heterostemonia dorsiventral e antera com deiscência poricida.

Estudos feitos com proteínas de sementes (GUAREEB; KHALIFA; FAWZI, 1999), caracteres morfológicos, vegetativos e reprodutivos (DULBERGER; SMITH; BAWA, 1994; GOTTSBERGER; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1988; OWENS; LEWIS, 1989; IRWIN; BARNEBY, 1982), características ontogenéticas (TUCKER, 1996), sistemática molecular (BRUNEAU et al., 2001; DOYLE et al., 2000) e citogenética (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005a; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005b; GOLDBLATT, 1981; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004;) corroboram a separação de *Cassia s.l.* proposta por Irwin e Barneby (1982). Apesar disso, esses estudos são controversos em relação à determinação das relações de parentesco entre os três gêneros que compõem a subtribo.

De acordo com Conceição (2006), considerando especificamente o histórico de *Chamaecrista*, o gênero foi estabelecido por Moench em 1794, sendo coincidente com o táxon *Cassia* sect. *Lasiorhegma* proposto por Vogel em 1837. Estudando a filogenia do gênero, Conceição (2006) relata que Bentham (1871) reconheceu três gêneros na tribo Cassieae para a *flora brasiliensis*: *Martia*, *Discorynia* e *Cassia*, tendo descrito nesses últimos três subgêneros: *Fistula*, *Senna* e *Lasiorhegma* (hoje reconhecido como *Chamaecrista*). *Cassia* subg. *Lasiorhegma* sect. *Chamaecrista* foi elevado ao nível genérico por Greene (1897) sendo apoiado por Pollard (1902), Pennel (1917) e Britton e Rose (1930). Finalmente, veio a sua inclusão na subtribo Cassiinae proposta por Irwin e Barneby (1982).

Chamaecrista é um dos maiores gêneros de Caesalpinioideae com aproximadamente 330 espécies distribuídas em seis seções (IRWIN; BARNEBY, 1982; LEWIS, 2005): *Chamaecrista* sect. *Apoucouita* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby, *Chamaecrista* sect. *Absus* (Collad.) H.S. Irwin & Barneby,

Chamaecrista sect. Grimaldia (Schrank) H.S. Irwin & Barneby, *Chamaecrista sect. Chamaecrista* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby, *Chamaecrista sect. Caliciopsis* H.S. Irwin & Barneby e *Chamaecrista sect. Xerocalyx* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby. Destas, apenas as seções *Apoucouita* e *Xerocalyx* foram consideradas monofiléticas em análises de sequências de DNA cloroplastídeos e nucleares (CONCEIÇÃO et al., 2009).

As espécies de *Chamaecrista* são encontradas nas Américas, África e Ásia com hábitos variando de árvores a ervas. Algumas são utilizadas na medicina tradicional, especialmente como laxante, no tratamento de ferimentos e úlcera, e contra picada de cobra e escorpião (LEWIS, 2005). Além disso, suas flores amarelas e grandes possuem um potencial ornamental (SOUZA; LORENZI, 2008).

Algumas espécies do gênero também podem ser utilizadas como forrageiras (ROSITO; BAPTISTA, 1985), na recuperação de áreas degradadas (SPRENT; PEARSONS, 2000) e na fixação de nitrogênio. Essa última característica está associada à formação de nódulos nas raízes (SPRENT, 2000), estrutura exclusiva do gênero dentro de *Cassiinae*.

Na América do Sul, são encontradas 266 espécies nativas (LEWIS, 2005), sendo o Brasil considerado o centro de diversidade e radiação do gênero com 232 espécies (CONCEIÇÃO; QUEIROZ; LEWIS, 2001), onde se destacam os estados de Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso e Goiás (LEWIS, 2005; SOUZA; LORENZI, 2008). Segundo Lewis (2005), existem 72 espécies endêmicas em Minas Gerais, sendo esse estado um dos principais centros de diversidade genética e da radiação explosiva do gênero.

2.2 Aspectos citogenéticos de Cassiinae

A subfamília Caesalpinioideae apresenta variabilidade intergenérica, interespecífica e intraespecífica de números cromossômicos ($2n = 14, 16, 22, 24, 26, 28, 32, 48$ e 52), prevalecendo tetraploides com o número básico $x = 7$ (BANDEL, 1974; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005a, BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005b; BIONDO; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006; FERREIRA et al., 2010; GOLDBLATT, 1981; RESENDE; DAVIDE; TORRES, 2013; RESENDE et al., 2014; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004). *Cercis* L. ($x = 7$) provavelmente é o gênero mais próximo do ancestral comum e mais primitivo que teria dado origem a todos os demais grupos de Caesalpinioideae e, a partir deste, teria se estabelecido o número básico secundário $x = 14$ por poliploidia, a qual teve um papel fundamental na evolução inicial do grupo (IRWIN; TURNER, 1960).

Posteriormente, houve uma diminuição por disploidia (ATCHINSON, 1951; GOLDBLATT, 1981; IRWIN; TURNER, 1960) dando origem aos demais números básicos do grupo ($x = 13, 12, 11$), dos quais ainda existem alguns representantes como *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby ($x = 13$), *S. multijuga* (Rich.) H.S. Irwin & Barneby ($x = 12$) e *S. pilífera* (Vogel) Irwin & Barneby ($x = 11$). No outro extremo, com $x = 7$, estão as espécies de *Chamaecrista* seção *Xerocalyx* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby como as mais derivadas de Caesalpinioideae e representantes finais da série de redução disploide na subfamília (IRWIN, 1964).

Considera-se disploidia como sendo uma mudança gradual do número de cromossomos, tanto de acréscimo quanto de redução, sem alteração na quantidade de DNA (GUERRA, 2008). Em *Cassia* s.l., houve uma redução disploide durante o processo evolutivo o que gerou diferentes números básicos para este gênero (IRWIN; TURNER, 1960; GOLDBLATT, 1981).

Em Cassiinae, alguns trabalhos citogenéticos e citotaxonômicos relatam o número cromossômico das espécies (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005a; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005b; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006; FERREIRA et al., 2010; GOLDBLATT, 1981; IRWIN; TURNER, 1960; RESENDE et al., 2014; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004). Esses estudos geralmente são restritos a contagens cromossômicas, e alguns deles são através de células meióticas (GOLDBLATT, 1981; IRWIN; TURNER, 1960), havendo a necessidade de informações cariológicas adicionais para Cassiinae.

A subtribo possui espécies cujo número básico é $x = 14$, além de $x = 13$, 12 e 11 derivados por disploidia (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005b). Em *Chamaecrista* são observados $x = 8$ característico das seções *Chamaecrista* e *Caliciopsis*, $x = 7$ na seção *Xerocalyx* e $x = 14$ nas seções *Absus* e *Grimaldia* (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006; GOLDBLATT, 1981; IRWIN; TURNER, 1960), não havendo registros para a seção *Apoucouita*.

Stebbins (1971) sugeriu que espécies com números básicos maiores que $x = 12$ cromossomos são poliploides derivados de ancestrais com baixos números básicos. Sendo assim, com exceção de algumas seções *Chamaecrista*, todas as demais espécies da subtribo seriam poliploides, confirmando a importância da poliploidia especialmente na diversificação inicial do grupo.

A maioria das espécies de Cassiinae possui cromossomos pequenos, com cerca de 2,5 μm e predominantemente metacêntricos (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005a; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005b; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004). Apesar disso, diferenças evidentes em relação ao número e tamanho de cromossomos foram relatadas para os três gêneros da subtribo levando Souza e Benko-Iseppon (2004) a considerar *Cassia*

um grupo distinto de *Senna* e *Chamaecrista*. No entanto, Biondo, Miotto e Schifino-Wittmann (2005b) associando dados citogenéticos de número cromossômico com dados moleculares e morfológicos, sugerem a distinção de táxons de *Chamaecrista* dos demais gêneros pertencentes à Cassiinae, enfatizando a necessidade de mais estudos biossistemáticos para a resolução dessa controvérsia.

Em relação à *Chamaecrista*, cerca de 30% das espécies têm seus números cromossômicos registrados, sendo encontrado $2n = 14, 16, 28, 32$ e 48 cromossomos (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006; CONCEIÇÃO, 2009; IRWIN; TURNER, 1960; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004), todos pequenos, variando de 1 a $2,5 \mu\text{m}$, sem diferença clara de tamanho entre as espécies. Além disso, os cariótipos são simétricos e possuem de um a três pares de constrição secundária, sendo esse último encontrado somente nas espécies poliploides (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004).

O bandeamento com fluorocromos foi feito pela primeira vez em Caesalpinioideae por Souza e Benko-Iseppon (2004). Os autores relacionaram a variação no tamanho de alguns cromossomos entre populações de *Chamaecrista nictitans* (L.) Moench. com o padrão de bandeamento CMA/DAPI. Isso porque a população com maiores cromossomos apresenta maior número de bandas CMA+/DAPI- e CMA-/DAPI+.

São escassos os trabalhos relacionados ao comportamento meiótico das espécies de *Chamaecrista*. Ambos, Irwin e Turner (1960) e Biondo, Miotto e Schifino-Wittmann (2006), relatam uma considerável regularidade na meiose do gênero com índices meióticos acima de 90%. Conseqüentemente, os grãos de pólen são altamente viáveis com aproximadamente 92% de viabilidade (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006), caracterizando plantas férteis. Esses resultados confirmam a tendência de que as populações de

leguminosas naturais geralmente apresentam comportamento regular, alto índice meiótico e alta viabilidade do grão de pólen (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005a). Os autores sugerem ampliação das coletas e análises citogenéticas em mais indivíduos e espécies, de forma a gerar informações adicionais que permitam conclusões mais abrangentes sobre este grupo tão importante.

Biondo, Miotto e Schifino-Wittmann (2006) destaca que técnicas citogenéticas convencionais para a cariotipagem de espécies de *Chamaecrista* não foram suficientes para a diferenciação clara do grupo. Dessa maneira, o presente estudo sugere a utilização de técnicas de hibridização *in situ* para o estudo do gênero.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Entender a evolução cariotípica dentro de *Chamaecrista*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar o complemento cromossômico de espécies representantes de diferentes seções e/ou séries de *Chamaecrista* Moench com relação ao número e morfometria dos cromossomos;
- b) Determinar a quantidade de DNA das espécies representantes de diferentes seções e/ou séries de *Chamaecrista* e verificar sua relação com a ploidia das espécies;
- c) Localizar as regiões codificadoras dos RNAs ribossômicos 45S e 5S nos cromossomos das espécies representantes de diferentes seções e/ou séries de *Chamaecrista* por meio de hibridização fluorescente *in situ* (FISH);
- d) Inferir sobre as alterações cromossômicas numéricas e estruturais que contribuíram para a diversificação das espécies de *Chamaecrista*;
- e) Contribuir com o entendimento da relação entre os três gêneros de Cassiinae.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, L.; MUKHERJEE A. K.; PANDA, C. P. Separation of the genera in the subtribe Cassiinae (Leguminosae: Caesalpinioideae) using molecular markers. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 25, n. 1, p. 223-233, jan./mar. 2011.
- ACHARYA, L.; PANDA, C. P. Validation of generic status of different taxa in the sub-tribe Cassiinae (Leguminosae: Caesalpinioideae) using RAPD, ISSR and AFLP markers. **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, Washington, v. 2, n. 2, p. 18-28, 2010.
- ATCHINSON, E. Studies in Fabaceae VI chromosome number among tropical woody species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 38, p. 538-547, 1951.
- BANDEL, G. Chromosome numbers and evolution in the Fabaceae. **Caryologia**, Firenze, v. 27, n. 1, p. 17-32, 1974.
- BENTHAM, G. Revision of the genus *Cassia*. **Transactions of Linnean Society of London**, London, v. 27, p. 503-591, 1871.
- BIOBRUNEAU, A. et al. Phylogenetic relationships in the caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast trnL intron sequences. **Systematic Botany**, Kent, v. 26, n. 3, p. 487-514, July 2001.
- BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae – Leguminosae do sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 241-248, set. 2005a.
- BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Cytogenetics of species of Chamaecrista (Leguminosae - Caesalpinioideae) native to southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 150, n. 4, p. 429-439, Apr. 2006.
- BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região sul do Brasil. **Brasilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 797-808, out./dez. 2005b.
- BRUNEAU, A. et al. Phylogenetic patterns and diversification in caesalpinoid legumes. **Botany**, Elmsford, v. 86, n. 7, p. 697-718, 2008.

CONCEIÇÃO, A. D. S.; QUEIROZ, L. P.; LEWIS, G. Novas espécies de *Chamaecrista* Moench (leguminosae-caesalpinioideae) da chapada diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus. Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 1, n. 2, p. 112-119, 2001.

CONCEIÇÃO, A. S. **Filogenia do gênero chamaecrista (leguminosae-caesalpinioideae) e taxonomia do grupo baseophyllum**. 2006. 204 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2006.

CONCEIÇÃO, A. S. et al. Phylogeny of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on nuclear and chloroplast DNA regions. **Taxon**, Utrecht, v. 58, n. 4, p. 1168-1180, Nov. 2009.

DOYLE, J. J. DNA data and legume phylogeny: a progress report. In: CRISP, M. D.; DOYLE, J. J. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. Cap. 7, p. 11-30.

DOYLE, J. J. et al. Phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 84, n. 4, p. 541-554, Apr. 1997.

DOYLE, J. J. et al. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. **Advances in Legume Systematics**, Key, v. 9, p. 1-20, 2000.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. A. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, n. 3, p. 900-910, Mar. 2003.

DULBERGER, R.; SMITH, M. B.; BAWA, K. S. The stigmatic orifice in *Cassia*, *Senna*, and *Chamaecrista* (Caesalpinaceae): morphological variation, function during pollination, and possible adaptive significance. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 81, n. 11, p. 1390-1396, 1994.

FERREIRA, K. et al. Karyotype, meiotic behavior and pollen features of *Senna occidentalis*. **Biologia**, Murcia, v. 65, n. 5, p. 789-795, Oct. 2010.

GOLDBLATT, P. Cytology and the phylogeny of Leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. Cap. 2, p. 427-463.

GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. Evolution of flower structures and pollination in neotropical Cassiinae (Caesalpinaceae) species. **Phyton**, Austria, v. 28, n. 2, p. 293-320, 1988.

GUAREEB, A.; KHALIFA, S. F.; FAWZI, N. Molecular systematics of some *Cassia* species. **Cytologia**, Florence, v. 64, n. 1, p. 11-16, 1999.

GUERRA, M. A situação da citotaxonomia de angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 4, n. 2, p. 75-86, 1990.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytogenetics: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 120, n. 3-4, p. 339-350, 2008.

HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A.; LEWIS, G. P. Phylogenetic relationships in caesalpinoid legumes: a preliminary analysis based on morphological and molecular data. In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2003. Cap. 10, p. 37-62.

IRWIN, H. S. **Monographic studies in Cassia (Leguminosae – Caesalpinioideae) I. Section Xerocalyx**: volume 12. New York: Memories of the New York Botanical Garden, 1964.

IRWIN, H. S.; BARNEBY, R. C. **The American Cassiinae**. New York: Memories of the New York Botanical Garden, 1982.

IRWIN, H. S.; TURNER, B. L. Chromosomal relationships and taxonomic considerations in the genus. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 47, n. 4, p. 309-318, Apr. 1960.

KAJITA, T. et al. rbcL and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and Allies. **Systematic Botany**, Kent, v. 26, n. 3, p. 515-536, 2001.

LEWIS, G. P. et al. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

MARAZZI, B. et al. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 93, n. 2, p. 288-303, Feb. 2006.

OWENS, S. J.; LEWIS, G. P. Taxonomic and functional implications of stigma morphology in species of *Cassia*, *Chamaecrista* and *Senna* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 163, n. 1-2, p. 93-105, 1989.

RESENDE, K. F. M.; DAVIDE, L. C.; TORRES, G. A. Chromosome number and meiosis in populations of *Senna* species (Caesalpinioideae – Fabaceae) from Southeast Brazil. **Caryologia**, Firenze, v. 66, n. 1, p. 1–5, 2013.

RESENDE, K. F. M. et al. Polyploidy and apomixis in accessions of *Senna rugosa* (G.DON). **Turkish Journal of Biology**, Tubitak, v. 38, p. 510-515, July 2014.

ROSITO, J. M.; BAPTISTA, L. R. M. Leguminosae Caesalpinioideae e Mimosoideae nativas do RS, com valor forrageiro – uma revisão. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 7, p. 163–180, 1985.

SOUZA, M. G. C.; BENKO-ISEPPON, A. M. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionioideae species of Pará, Amazonas, Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 144, n. 2, p. 181-191, Feb. 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SPRENT, J. I. Nodulation as a taxonomic tool. In: HERENDEEN P. S.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2000. Cap. 9, p. 21-44.

SPRENT, J. I.; PEARSONS, R. Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2-3, p. 183–196, Mar. 2000.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: Addison-Wisley Publishing, 1971.

TORRES, D. C. et al. Phylogenetic relationships within *Chamaecrista* sect. *Xerocalyx* (Leguminosae, Caesalpinioideae) inferred from the cpDNA trnE-trnT intergenic spacer and nrDNA ITS sequences. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 244-251, 2011.

TUCKER, S. C. Trends in evolution of floral ontogeny in *Cassia sensu stricto*, *Senna*, and *Chamaecrista* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae: Cassiinae): a study in convergence. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 83, n. 6, p. 687-711, June 1996.

TUCKER, S. C. Update on floral development floral development in legumes. **Plant Physiology**, Washington, v. 131, p. 911-926, Mar. 2003.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1 Evolução cariotípica em espécies de *Chamaecrista* Moench

Guilherme Tomaz Braz¹

Kátia Ferreira Marques de Resende¹

Ludmila Cristina Oliveira¹

Giovana Augusta Torres¹

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).

¹ Laboratório de Citogenética, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, CEP 32700-000, Lavras, MG, Brasil.

RESUMO

Chamaecrista juntamente com *Cassia s. stric.* e *Senna.*, pertencem à Cassiinae, subtribo formada a partir da subdivisão de *Cassia s. l.* Apesar de ser considerada monofilética, as relações entre os gêneros dessa subtribo permanecem indefinidas, bem como as relações entre algumas espécies de *Chamaecrista*. Dados citogenéticos são caracteres que podem contribuir para a elucidação das questões taxonômicas e o entendimento da evolução do gênero. Sendo assim, o presente trabalho objetivou caracterizar o complemento cromossômico (número e morfometria), determinar a quantidade de DNA e localizar as regiões codificadoras dos RNAs ribossômicos 45S e 5S nos cromossomos de espécies representantes de diferentes seções e/ou séries de *Chamaecrista* Moench, coletadas na região de Diamantina – MG. Foram utilizados meristemas radiculares para obtenção de metáfases mitóticas. Para quatro das nove espécies estudadas, o relato de número cromossômico é inédito. Para sete espécies, foi feita a descrição detalhada do complemento cromossômico. A redução dispoloide está envolvida na evolução cariotípica do gênero, como consequência de fusões. Rearranjos do tipo inversão, translocação e deficiência também podem ser considerados como fatores que levaram a alterações estruturais nos cromossomos, diminuição na quantidade de DNA e diminuição no número de locos de rDNA. Os dados citogenéticos corroboram a proposta de exclusão da subseção *Baseophyllum* da seção *Absus* e, a segregação dos três gêneros de Cassiinae.

Palavras-chave: Cariótipo. Valor C. Cromossomos. Cassiinae

1 INTRODUÇÃO

Chamaecrista Moench (Caesalpinioideae - Fabaceae) é um dos maiores gêneros de Caesalpinioideae com aproximadamente 330 espécies, distribuídas nas Américas, África e Ásia, com hábitos variando de arbóreo a ervas (LEWIS, 2005). Na América do Sul, são encontradas 266 espécies nativas (LEWIS, 2005), sendo o Brasil considerado o centro de diversificação e radiação do gênero com 232 espécies (CONCEIÇÃO; QUEIROZ; LEWIS, 2001). Destas, 72 espécies são endêmicas de Minas Gerais, estado considerado um dos principais centros de diversidade genética e da radiação explosiva do gênero (LEWIS, 2005).

Além da importância ecológica, as espécies de *Chamaecrista* possuem potencial ornamental (SOUZA; LORENZI, 2008) e também são utilizadas na medicina popular (LEWIS, 2005). Algumas espécies podem ser utilizadas como forrageiras (ROSITO; BAPTISTA, 1985), na recuperação de áreas degradadas (SPRENT; PEARSONS, 2000) e na fixação de nitrogênio pela formação de nódulos nas raízes (SPRENT, 2000). Essa última característica é exclusiva do gênero dentro de Cassiinae.

Chamaecrista juntamente com *Cassia* L. s. stric. e *Senna* Mill., pertencem à Cassiinae. Irwin e Barneby (1982) baseados em características do androceu, corola e arquitetura floral sugeriram a elevação do gênero *Cassia* s. l. à subtribo, segregando-o nos três gêneros. Caracteres morfológicos (OWENS; LEWIS, 1989), citogenéticos (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005b; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006; IRWIN; TURNER, 1960;

SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004) e moleculares com sequências de DNA cloroplastídeos e marcadores (ACHARYA; MUKHERJEE; PANDA, 2011; BRUNEAU et al., 2001; DOYLE et al., 1997; 2000; HERENDEEN; BRUNEAU; LEWIS, 2003; KAJITA et al., 2001; TORRES et al., 2011) corroboram essa segregação, apesar de serem controversos quanto às relações de parentesco entre os gêneros dentro da subtribo.

Chamaecrista é subdividido em seis seções: *Chamaecrista* sect. *Apoucouita* (Benth.) H. S. Irwin & Barneby, *Chamaecrista* sect. *Absus* (Collad.) H. S. Irwin & Barneby, *Chamaecrista* sect. *Grimaldia* (Schrank) H. S. Irwin & Barneby, *Chamaecrista* sect. *Chamaecrista* (Benth.) H. S. Irwin & Barneby, *Chamaecrista* sect. *Caliciopsis* H. S. Irwin & Barneby e *Chamaecrista* sect. *Xerocalyx* (Benth.) H. S. Irwin & Barneby. Destas, apenas as seções *Apoucouita* e *Xerocalyx* foram consideradas monofiléticas em análises de sequências de DNA cloroplastidial e nucleares (CONCEIÇÃO et al., 2009; TORRES et al., 2011).

Em relação aos estudos citogenéticos no gênero, a maioria se limita às contagens cromossômicas, com cerca de 30% das espécies tendo seus números cromossômicos registrados (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005b; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006; IRWIN; TURNER, 1960). É possível observar que *Chamaecrista* possui diferentes números básicos, sendo $x = 7$ característico da seção *Xerocalyx*, a mais especializada, e que teria se originado por redução dispolide de $x = 8$, encontrado nas seções *Chamaecrista* e *Caliciopsis*. Além desses, nas seções *Grimaldia* e *Absus*, observam-se $x = 14$ cromossomos, não existindo registro na seção

Apoucouita. De acordo com Conceição et al. (2009), $2n = 28$ seria um caráter plesiomórfico, enquanto que $2n = 14$ e 16 seriam apomórficos.

Ampliar as informações sobre o complemento cromossômico no sentido de aumentar a resolução da análise da evolução cariotípica, em associação com as hipóteses filogenéticas já estabelecidas e testadas, tem potencial valioso para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no processo evolutivo do gênero e sua relação com os demais gêneros da subtribo.

Diante disso, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar o complemento cromossômico, determinar a quantidade de DNA e localizar as regiões codificadoras dos RNAs ribossômicos 45S e 5S nos cromossomos das espécies representantes de diferentes seções e/ou séries de *Chamaecrista* Moench.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material botânico

Nove espécies representantes de três seções de *Chamaecrista* Moench foram coletadas em regiões de campo rupestre no Norte do Estado de Minas Gerais (Tabela 1). Ramos férteis foram herborizados segundo técnicas usuais (FIDALGO; BONONI, 1989) para identificação das espécies e inclusão no acervo do Herbário VIC – Universidade Federal de Viçosa, como documentação da pesquisa. Plantas representantes de todas as espécies foram mantidas *in vivo* em casa de vegetação.

2.2 Preparo das lâminas

Para obtenção das metáfases mitóticas, sementes de nove espécies de *Chamaecrista* Moench (Tabela 1) foram submetidas à escarificação mecânica para a quebra da dormência e colocadas para germinar em câmara úmida, a 28-30 °C. Raízes com cerca de 5-8 mm foram coletadas e submetidas ao tratamento com solução de 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 24 horas, a 10 °C. Após o tratamento, as raízes foram fixadas em Carnoy (3 álcool etílico: 1 ácido acético) e mantidas a -20 °C.

As raízes foram digeridas em solução enzimática de pectinase e celulase (100/200 U), a 37 °C, por 30min., sendo as lâminas preparadas pelo método de secagem à chama.

Tabela 1 Espécies de *Chamaecrista* Moench. (Leguminosae - Caesalpinioideae) com seu respectivo local de coleta e número de registro no Herbário VIC – Universidade Federal de Viçosa

SEÇÃO	ESPÉCIE	ORIGEM	VIC	
APOUCOUITA	<i>Chamaecrista ensiformis</i> var. <i>ensiformis</i> (Vell.) H.S. Irwin & Barneby	Serra do Cipó*	36.943	
			36.951	
			36954	
			36.978	
ABSUS	Série Glutinosae	Serra do Cipó*	36.996	
	<i>Chamaecrista semaphora</i> (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby			
	Série Rigidulae	Serra do Cipó*	37.006	
	<i>Chamaecrista cipoana</i> (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby			
	Série Ochnaceae	Santana do Riacho (MG) ****	36.953	
	<i>Chamaecrista ochnacea</i> var. <i>purpurascens</i> (Benth.) H.S. Irwin & Barneby			
	<i>Chamaecrista vauthieri</i> (Benth.) H.S. Irwin & Barneby			
	SUBSEÇÃO BASEOPHYLUM			
	CHAMAECRISTA	<i>Chamaecrista brachystachya</i> (Benth.) Conc., L.P. Queiroz & G.P. Lewis	Diamantina–Biribiri**	-
		<i>Chamaecrista decora</i> (H.S. Irwin & Barneby) Conc., L.P. Queiroz & G.P. Lewis	Diamantina–Biribiri**	36.972
Série Coriaceae		Diamantina (MG) ***	36.998	
<i>Chamaecrista potentilla</i> (Mart. Ex Benth.) H.S. Irwin & Barneby				
	Série Flexuosae	Diamantina–Biribiri**	36.945	
	<i>Chamaecrista flexuosa</i> (L.) Greene			

*S 19°18'45.1'' W 043°37'34.0'', 915m - 1000m altitude; ** S 18°10'54.0'' W 043°33'45.5''; *** 18°24'15.8'' W 043°30'51.6''; ****S 19°08'33.9'' W 043°41'38.9'', 1045m altitude.

2.3 Número e morfometria cromossômica

A determinação do número e morfologia dos cromossomos foi realizada nas mesmas lâminas utilizadas na técnica de hibridização *in situ* fluorescente. A avaliação dessas lâminas foi realizada no microscópio de epifluorescência Nikon eclipse E400, sendo as imagens capturadas no *software* NIS Elements BR e processadas no Adobe Photoshop CS3.

Para cada espécie de *Chamaecrista*, foram selecionadas, no mínimo, 15 metáfases para contagem dos cromossomos. De duas a quatro metáfases foram usadas para a obtenção das medidas do braço curto (c) e longo (l) dos cromossomos, utilizando o programa MicroMeasure 3.3.

A partir das medidas dos braços cromossômicos foram calculados: comprimento total do cromossomo i ($C_{ti} = c + l$); comprimento total do lote haploide ($CTLH = \sum C_{ti}$); relação de braços ($RB = l/c$) e índice centromérico ($IC = c/C_{ti} \times 100$).

A morfologia cromossômica foi determinada a partir dos valores de RB e IC, conforme Guerra (1986) e os índices obtidos foram também usados para construir os kariogramas e os idiogramas das espécies.

Foi feito o gráfico de dispersão a partir dos índices A1, assimetria intracromossômica (referente à posição centromérica), e A2, assimetria intercromossômica (referente ao tamanho), de acordo com Zarco (1986).

Para comparação das espécies com relação aos valores de CTLH, foi feita análise de variância e teste de Scott-Knot (5%).

2.4 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Foram utilizadas como sondas as sequências de rDNA 18S-5.8S-25S (unidade de 9,1 kb, rDNA 45S) e de rDNA 5S de trigo, clonadas no plasmídeo pUC8 no sítio Eco RI. Bactérias transformadas com o vetor contendo essas sequências foram cultivadas em meio contendo antibiótico selecionador, o que possibilitou a seleção de uma colônia, da qual foi extraído o plasmídeo com uso do Kit Plasmid Mini (Quiagen).

As sondas 45S e 5S foram marcadas com biotina e digoxigenina, respectivamente, por meio da técnica de “Nick Translation”. Cada reação de marcação teve 1 µg de DNA da sonda, tampão de reação (0.5 M Tris HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂), nucleotídeos (dATP, dCTP e dGTP a 0.5 mM cada), nucleotídeo marcado (0.33 mM dTTP + 0.16 mM dUTP marcado com digoxigenina ou biotina), 0.02 U de DNase I e 0.5 U de DNA Polimerase I em um volume final de 50 µL.

Para a desnaturação cromossômica, foram aplicados 100 µL de solução formamida 70% nas lâminas e essas colocadas em estufa a 85 °C por 1,30min para desnaturação do DNA. Em seguida, as lâminas foram imediatamente imersas em álcool etílico 70% gelado e posteriormente em álcool 90% e 100% e secas ao ar.

A mistura de hibridização constituiu de formamida 50%, tampão SSC 2x, sulfato dextran 10%, 50-100 ng de sonda marcada. As sondas foram desnaturadas a 95 °C, por 8min e imediatamente resfriadas em gelo. Foram aplicadas 30 µL da mistura de hibridização às preparações cromossômicas que foram cobertas com lamínula. A hibridização foi realizada a 37 °C por 48h, seguida por lavagens sob agitação em SSC 2x

por 5 minutos à temperatura ambiente, em SSC 2x a 42 °C por 10 minutos, em SSC 2x por 5 minutos à temperatura ambiente e finalmente em tampão TNT por 5 minutos.

A detecção das sondas foi feita com os anticorpos anti-digoxigenina conjugado com rodamina e antibiotina conjugado com FITC em tampão TNB, por 1 hora, a 37 °C, em câmara úmida. Após remoção da lamínula, as lâminas foram lavadas três vezes, 5 minutos cada, em TNT, à temperatura ambiente, sob agitação. Após secagem ao ar, as lâminas foram expostas em meio de montagem Vectashield contendo DAPI.

As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência Nikon eclipse E400, sendo as imagens capturadas no *software* NIS Elements BR e processadas no Adobe Photoshop CS3.

2.5 Determinação da quantidade de DNA através da citometria de fluxo

Amostras de 20 a 30 mg de folhas jovens em três plantas de cada espécie de *Chamaecrista* Moench e *Pisum sativum* L. (padrão interno de referência) foram trituradas em tampão Marie (MARIE; BROWN, 1993). À solução de núcleos interfásicos obtida após filtragem foram adicionados 25 µL de iodeto de propídeo (1 mg/mL) e 2,5 µL de RNase (50 µg/mL) (DOLEZEL, 1997).

A análise de pelo menos 10.000 núcleos por amostra foi realizada no citômetro FacsCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), permitindo a obtenção dos histogramas através do *software* Cell Quest

(Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA), sendo esses analisados no *software* WinMDI 2.8.

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das amostras foi estimado por meio de comparação com a posição do pico G1 do padrão interno de referência (*Pisum sativum*) usando a relação $Q = (E/S) \times R$, em que Q é a quantidade de DNA da amostra (pg/2C), E é a posição do pico G1 da amostra, S é a posição do pico G1 do padrão de referência e R é o conteúdo de DNA do padrão (9,09 pg/2C).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

Das espécies de *Chamaecrista* Moench estudadas, em sete, foi possível realizar a análise cariotípica detalhada. Mas para *Ch. vauthieri* e *Ch. brachystachya* foi possível realizar apenas a contagem dos números cromossômicos e determinar a quantidade de DNA.

3.1 Quantidade de DNA e características do complemento cromossômico

A estimativa da quantidade de DNA genômico das espécies de *Chamaecrista* por citometria de fluxo apresentou excelente qualidade, com formação de histogramas com picos bem definidos e baixo ruído. Essa qualidade é confirmada pelo baixo coeficiente de variação (CV), que apresentou valores entre 0,32 e 0,88, respectivamente.

As espécies estudadas diferiram significativamente em relação ao tamanho do genoma. *Ch. flexuosa* é a espécie que possui menor quantidade C de DNA, enquanto que *Ch. semaphora* possui o maior genoma entre as espécies estudadas (Tabela 2).

O relato do número cromossômico é inédito para as espécies *Ch. ensiformes*, *Ch. semaphora*, *Ch. cipoana*, e *Ch. vauthieri* (Tabela 2).

Foi constatada a presença de dois números cromossômicos distintos em *Chamaecrista* (Tabela 2; Figura 1). Como previamente relatado para a seção *Absus*, todas as espécies possuem $2n = 28$ cromossomos (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006; CONCEIÇÃO et al., 2009, TORRES et al., 2011). Em *Ch. ensiformes*

também foi observado $2n = 28$ cromossomos, sendo esse, o primeiro registro na seção *Apoucouita*. Já as duas espécies da seção *Chamaecrista*, a mais derivada no estudo, possuem $2n = 16$ cromossomos, mesmo número relatado para a seção por Conceição et al. (2009).

O tamanho médio dos cromossomos de *Chamaecrista* variou entre 2,10 μm em *Ch. decora* e 3,66 μm em *Ch. semaphora* (Tabela 2). Em *Ch. cipoana* e *Ch. Semaphora*, foram observados cromossomos com 5,04 μm e 7,18 μm , respectivamente, o que não confirma a tendência descrita na literatura de que os cromossomos desse gênero são pequenos, com cerca de 2 μm (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005b; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004).

Em relação aos valores de comprimento total do lote haploide (CTLH), *Ch. semaphora* apresentou o maior valor (54,02 μm), enquanto que *Ch. flexuosa* apresentou o menor valor (22,35 μm) (Tabela 2). A espécie que possui menor valor C também possui o menor CTLH estimado. A correspondência entre a ordenação do valor C e do CTLH pode ser observada na maioria das espécies, com exceção de *Ch. ochracea* (Tabela 2), o que pode ser um indicador de confiabilidade dos dados de medição, que estão mais sujeitos à influência de fatores externos, tais como grau de condensação dos cromossomos ou delimitação duvidosa das extremidades cromossômicas.

Tabela 2 Características do complemento cromossômico de espécies de *Chamaecrista* Moench

ESPÉCIE	2n	MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA				TAMANHO DO GENOMA		ÍNDICES DE ASSIMETRIA ²		LOCOS DE rDNA	
		Cti	ma ± s _m	FC	CTLH ¹	C ¹ (pg)	Mb	A1	A2	45S	5S
<i>Ch. ensiformes</i>	28*	2,09-3,80	2,89±0,52	6m+8sm	39,75d	0,85d	826	0,35	0,18	3	3
<i>Ch. cipoana</i>	28*	2,47-5,04	3,42±0,63	9m+5sm	48,54e	1,00f	973	0,40	0,18	2	1
<i>Ch. semaphora</i>	28*	2,05-7,18	3,66±1,16	8m+6sm	54,02f	1,08g	1051	0,34	0,31	2	1
<i>Ch. ochracea</i>	28 [1]	1,96-3,26	2,45±0,38	6m+8sm	35,22c	0,94e	914	0,34	0,15	2	1
<i>Ch. vauthieri</i>	28*	-	-	-	-	0,92e	900	-	-	-	-
<i>Ch. brachystachya</i>	28[3]	-	-	-	-	0,60b	582	-	-	-	-
<i>Ch. decora</i>	28 [2]	1,20-2,96	2,10±0,40	10m+4sm	29,37b	0,67c	650	0,27	0,19	2	2
<i>Ch. flexuosa</i>	16 [3,4]	2,09-3,34	2,84±0,43	1m+7sm	22,35a	0,44a	425	0,51	0,15	2	1
<i>Ch. potentilla</i>	16[3]	2,20-3,48	2,84±0,41	2m+6sm	22,77a	0,59b	577	0,45	0,14	1	1

Comprimento total do cromossomo (Cti); fórmula cariotípica (FC); comprimento total do lote haploide (CTLH); quantidade C DNA (pg); Mb = megabases (1pg = 978Mb); índice de assimetria intracromossômica (A1); índice de assimetria intercromossômica (A2); ma = média aritmética e s_m = desvio padrão da média (µm); sm: submetacêntrico e m: metacêntrico. ² Zarco (1986). * Primeiro relato de números cromossômicos. [1] Irwin e Turner (1960), n = 14. [2] Conceição et al. (2009), 2n = 28; [3] Conceição et al. (2009) 2n = 16. [4] Irwin e Turner (1960), n = 8, 2n = 16. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knot, a 5% de probabilidade.

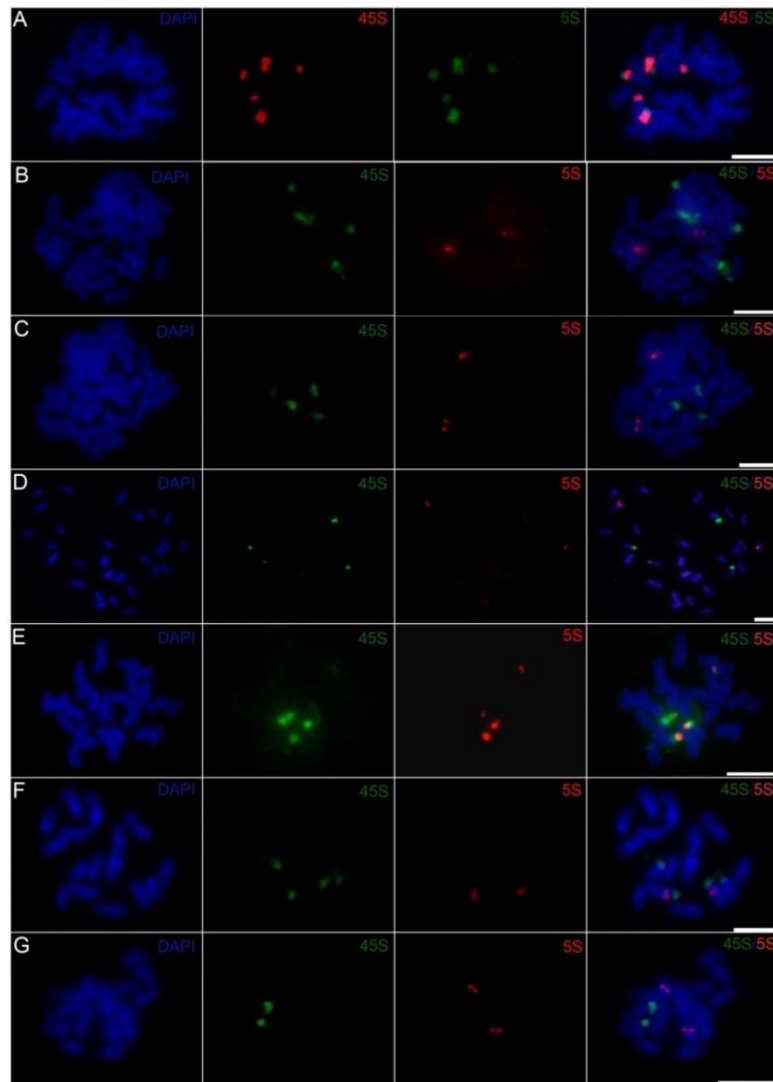


Figura 1 Metáfases mitóticas em espécies de *Chamaecrista* Moench observadas no DAPI, no FITC, no TRITC e sobreposição de imagens. A) rDNA 45S (vermelho) e 5S (verde) e B-I) 45S (verde) e 5S (vermelho). A) *Ch. ensiformes* var. *ensiformes*, seção *Apoucouita*. (B-G) Seção *Absus*. B) *Ch. cipoana*. C) *Ch. semaphora*. D) *Ch. ochracea*. E) *Ch. decora*. F) *Ch. vauthieri*. G) *Ch. brachystachya*. (H-I) Seção *Chamaecrista*. H) *Ch. flexuosa*. I) *Ch. potentilla*. Barra: 5 μ m.

De acordo com a classificação de Guerra (1986), baseado no índice centromérico, a maioria das espécies apresentou cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, sendo esse último predominante na seção *Chamaecrista* (Tabela 2). Com exceção de *Ch. semaphora*, nas demais espécies ocorre uma diminuição gradual de tamanho ou cromossomos de tamanhos similares, caracterizando cariótipos simétricos.

O diagrama de dispersão construído a partir dos índices de assimetria de Zarco (1986), também permitiu observar essa tendência (Figura 2). Nota-se que *Ch. semaphora* possui índice A2 (assimetria intercromossômica) maior que as demais espécies, o que pode ser explicado pelo seu cromossomo 1 ser consideravelmente maior que os demais. Já nas outras espécies, observam-se índices A2 menores, confirmando uma menor assimetria intercromossômica.

O índice A1 (assimetria intracromossômica) revela considerável distanciamento de *Ch. decora*, subseção *Baseophyllum*, das demais espécies da seção *Absus* (Figura 2). A exclusão de *Ch. decora* dessa seção já foi proposta por Conceição et al. (2009), baseados em sequências de DNA nuclear.

Além disso, os índices A1 e A2 agruparam as espécies da seção *Chamaecrista*. Nessas espécies, a assimetria intracromossômica foi maior em relação às outras espécies estudadas em função da predominância de cromossomos submetacêntricos, o que sugere maior frequência de eventos de rearranjos cromossômicos estruturais.

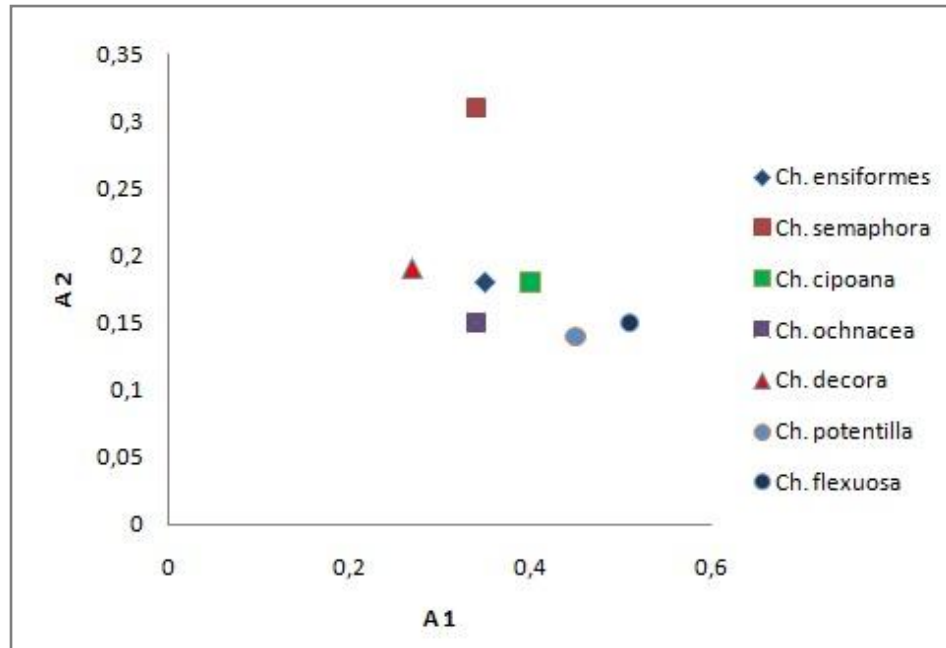


Figura 2 Diagrama de dispersão de acordo com os índices de assimetria A1 e A2 de Zarco (1986) em espécies de *Chamaecrista* Moench., segundo). ◆ Seção *Apoucouita*. □ Seção *Absus*. ▲ Seção *Absus* subs. *Baseophyllum*. ● Seção *Chamaecrista*

3.2 Número e distribuição dos locos de DNA ribossomal

As espécies estudadas apresentaram diferenças significativas em relação ao número e padrão de distribuição das sequências de rDNA.

Em *Ch. Ensiformes*, foram observados três sítios de rDNA 45S e 5S. Essas sequências são terminais e observadas no braço curto do cromossomo 2 e no braço longo dos cromossomos 1 e 7. Dois aspectos observados são incomuns em células de eucariotos superiores, (1) os sítios são contíguos e (2) a sequência 5S é mais terminal que a 45S (Figura 3).

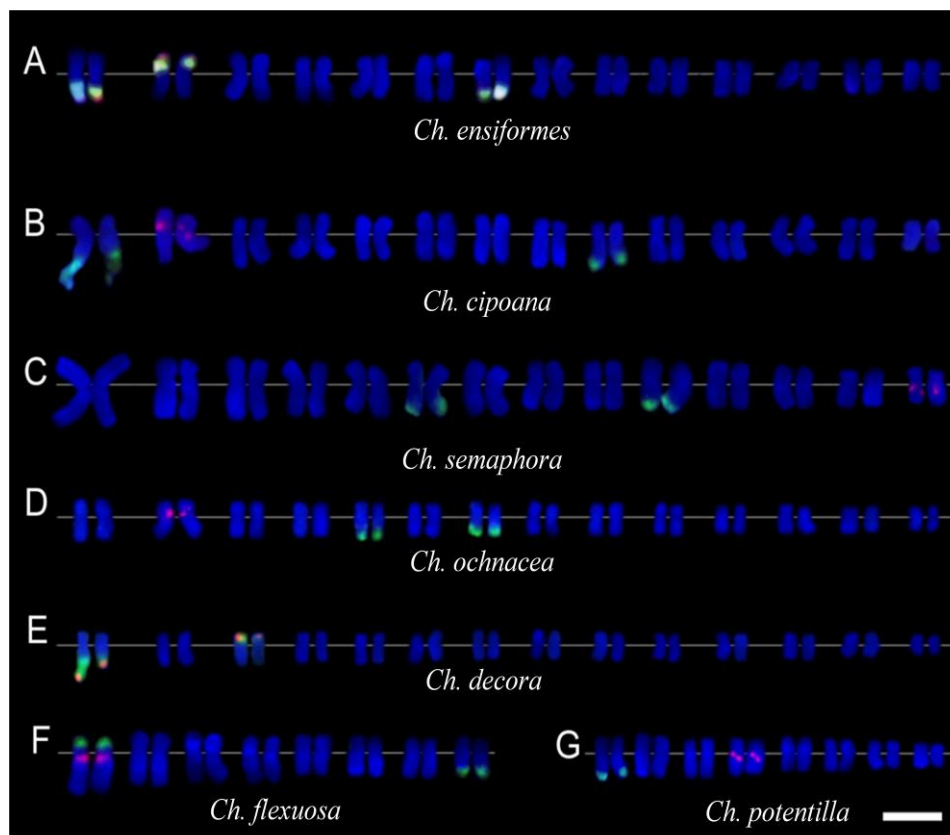


Figura 3 Cariograma de espécies de *Chamaecrista* Moench com distribuição das sequências de rDNA 45S (verde) e 5S (vermelho). A) *Ch. ensiformes* var. *ensiformes*, seção *Apoucouita*. (B-E) Seção *Absus*. B) *Ch. cipoana*. C) *Ch. semaphora*. D) *Ch. ochracea*. E) *Ch. decora*. (F-G) Seção *Chamaecrista*. F) *Ch. flexuosa*. G) *Ch. potentilla*. Barra: 5 μ m

Ch. decora pertencente à seção *Absus* subseção *Baseophyllum*, possui dois sítios de rDNA 45S e dois 5S. Esses sítios, assim como observado em *Ch. ensiformes*, são contíguos e o 5S é mais terminal. Esses sítios se encontram no braço longo do cromossomo 1 e no curto do cromossomo 3, ambos, terminais (Figura 3). Com exceção dessa espécie,

em todas as demais da seção foram observados dois locos de rDNA 45S e um de rDNA 5S. Essa característica, assim como a assimetria cariotípica, revela o distanciamento entre a subseção *Baseophyllum* e o restante da seção *Absus*.

Em *Ch. Ochnacea*, foram observados dois sítios terminais de rDNA 45S localizados nos cromossomos 5 e 7. Além desse, a espécie possui um sítio proximal de rDNA 5S no cromossomo 2 (Figura 3).

Em *Ch. cipoana* e *Ch. Semaphora*, também foram observados dois sítios terminais 45S, sendo que na primeira esses se encontram nos cromossomos 1 e 9, e na segunda, nos cromossomos 6 e 10. Essas espécies ainda possuem um sítio de rDNA 5S localizados nos cromossomos 2 (intersticial) e 14 (proximal), respectivamente (Figura 3).

Na seção *Chamaecrista*, também foram observadas variações no número e na posição dos locos de DNA ribossomal. *Ch. flexuosa* possui dois sítios de rDNA 45S, ambos terminais e localizados no braço curto do cromossomo 1 e no braço longo do cromossomo 8. Um sítio de rDNA 5S foi observado no braço longo do cromossomo 1, sendo esse proximal (Figura 6 + 4).

Em *Ch. Potentilla*, foram encontrados um sítio de DNA ribossomal 45S e um 5S. Esses se encontram no braço longo do cromossomo 1 (terminal) e no braço longo do cromossomo 4 (proximal), respectivamente (Figura 3).

3.3 Polissomatia em espécies de *Chamaecrista* Moench

Em todas as espécies estudadas no presente trabalho, foram observadas células poliploides esporádicas, com duplicação cromossômica perfeita em meio a células diploides (Figura 4).

Esse evento é conhecido como polissomatia e foi observado no material proveniente de sementes germinadas em câmara de germinação, não sendo observado em meristemas de raízes coletadas de plantas cultivadas em casa de vegetação.

De acordo com Olkoski e Schifino-Wittmann (2011), a duplicação do genoma em algumas células de meristemas radiculares obtidos de sementes germinadas em placas de Petri seria uma estratégia adotada em tecidos jovens. Nesses tecidos, a ampliação da expressão de alguns genes poderia ser necessária para aumentar a síntese de produtos indispensáveis para o desenvolvimento inicial do vegetal. Segundo os autores, esse fato é comprovado pelo evento de endoreduplicação não ser observado em raízes coletadas de plantas mantidas em casa de vegetação, ou seja, em tecidos maduros.

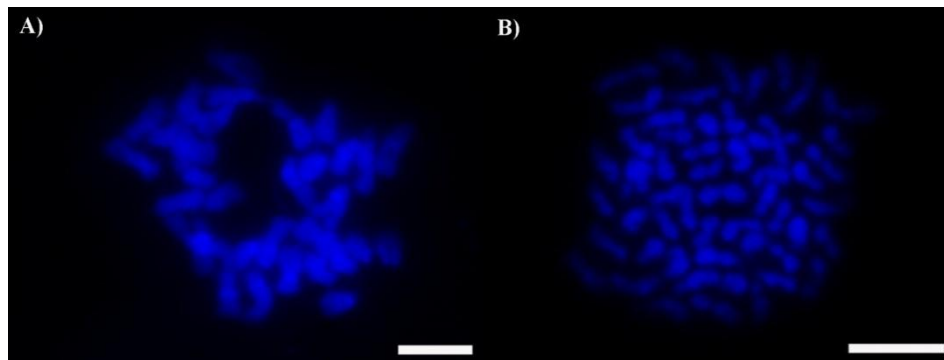


Figura 4 Polissomatia em espécies de *Chamaecrista* Moench. A) *Ch. flexuosa* (2n = 32). B) *Ch. ensiformes* (2n = 56). Barra: 5 μ m

A polissomatia existente entre células meristemáticas de ponta de raiz não foi anteriormente relatada em *Chamaecrista*. No entanto, em *Ch. nictitans* foi observado variação intraespecífica em relação ao número cromossômico, sendo relatado em populações no norte do Brasil, $2n = 48$ cromossomos (SOUZA; BENKO-ISENPPON, 2004), enquanto que no sul do país foi observado $2n = 32$ (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2006).

4 DISCUSSÃO

A variabilidade no número e morfometria cromossômica, número e padrão de distribuição das sequências de DNA ribossomal e no tamanho do genoma revelaram que *Chamaecrista* Moench é um grupo heterogêneo do ponto de vista cariológico.

O tamanho dos cromossomos observados difere esse gênero dos demais da subtribo. Geralmente os cromossomos de *Cassia* L e *Senna* Mill são pequenos (2,5 μm), além disso, as espécies desses gêneros possuem cromossomos predominantemente metacêntricos (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005b; RESENDE; DAVIDE; TORRES, 2013).

No nível infragenérico, o número $2n = 28$ cromossomos encontrado na seção *Apoucouita*, onde se observam espécies exclusivamente de hábito arbóreo, é considerado um caráter plesiomórfico de *Chamaecrista*. Esse fato é suportado pela presença de $2n = 28$ cromossomos na maioria das espécies de *Cassia* e *Senna*, os quais seriam grupos irmãos de *Chamaecrista* em análises de sequências plastidiais e nucleares (CONCEIÇÃO et al., 2009).

Segundo esses autores, a diversificação primária de *Chamaecrista* teria ocorrido em florestas tropicais, onde se encontram espécies de *Cassia*, a maioria também de hábito arbóreo. A partir de um primeiro evento cladogenético teria se originado a seção *Apoucouita* e outro clado composto pelas demais seções de *Chamaecrista*, todas de hábito variando de arbustivo a ervas e encontradas em áreas de Cerrado e vegetação aberta.

As análises prévias de números cromossômicos sugerem uma evolução cromossômica através de redução dispoloide no número básico para o gênero, com $x = 14$ observado nas seções *Apoucouita* (presente estudo), *Absus* e *Grimaldia*, $x = 8$ nas seções *Chamaecrista* e *Caliciopsis*, e $x = 7$ na seção *Xerocalyx* (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005b; IRWIN; TURNER, 1960; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004).

De acordo com Guerra (2008), seja qual for o mecanismo envolvido em uma série dispoloide, todos os números de cromossomos diferentes dessa série devem conter todo ou quase todo conjunto gênico. Isso é evidente no caso de *Ch. potentilla* (seção *Chamaecrista*), $2n = 16$ e $c = 0,59$, e *Ch. brachystachya* (seção *Absus* subseção *Baseophyllum*), $2n = 28$ e $c = 0,60$, em que há redução do número de cromossomos sem a perda de material genético. Alterações como fusões seguidas de rearranjos estruturais como translocações e inversões explicariam essa perda drástica de cromossomos com a manutenção do tamanho do genoma (GUERRA, 2008; STEBBINS, 1971).

Ao se comparar os cromossomos das espécies da seção *Chamaecrista* com a representante da seção *Baseophyllum*, observa-se que houve um incremento no tamanho cromossômico e uma tendência a cromossomos submetacêntricos (Figura 6). Esse fato é mais uma evidência da presença de rearranjos estruturais durante o processo evolutivo do gênero.

Além da dispoloideia, a perda de material genético também está envolvida na evolução cariotípica do gênero. Esse evento, que também pode estar relacionado a rearranjos estruturais, é evidenciado pela redução

no tamanho do genoma das espécies sem a alteração no número cromossômico (Tabela 2), e pela redução no número de sítios de DNA ribossomal em algumas espécies (Tabela 2; Figura 3).

Tomando como referência a filogenia proposta por Conceição et al. (2009), em nível de seção (Figura 6), fica clara a tendência de diminuição do número de locos de rDNA 5S e 45S e a ocorrência de rearranjos estruturais que levaram à alteração na posição desses locos, tanto no que diz respeito ao tamanho do cromossomo em que está localizada como em que região do braço cromossômico.

A única divergência encontrada entre a proposta filogenética e os dados citogenéticos desse trabalho é a posição da subseção *Baseophyllum* da seção *Absus*, que segundo Conceição et al. (2009), deveria ser elevada ao status de seção pertencente ao clado que engloba as seções *Xerocalyx*, *Caliciopsis* (não representadas nesse trabalho) e *Chamaecrista*. Apesar de os dados cariotípicos (Figura 6) indicarem o distanciamento entre o representante da subseção *Baseophyllum* (*Ch. decora*) dos demais representantes da seção *Absus* eles não corroboram o posicionamento proposto por Conceição et al. (2009).

O tamanho cromossômico, o número e, especialmente, o posicionamento contíguo das sequências de rDNA 45S e 5S na extremidade dos cromossomos (Figura 6) indicam maior proximidade entre *Ch. decora* (seção *Absus* subseção *Baseophyllum*) e *Ch. ensiformes* (seção *Apoucouita*). Nesse caso, a hipótese de evolução cariotípica é a de que o primeiro evento cladogenético do gênero originou a seção *Apoucouita* com $2n = 28$, com três locos de rDNA 45S e três de rDNA 5S contíguos e nas extremidades dos cromossomos, e outro clado com as

demais seções. A atual subseção *Baseophyllum* de *Absus* seria então um grupo mais basal desse clado com $2n = 28$ e dois locos de cada um dos rDNAs, ou seja, com a perda de um loco de cada. Um segundo conjunto de alterações cromossômicas levou à perda de uma sequência de rDNA 5S e a um provável reposicionamento dos locos de rDNA, originando espécies representantes da seção *Absus*, com $2n = 28$ e dois locos de rDNA 45S e um loco de 5S. Como representante basal da seção *Chamaecrista* e de transição entre essa e a seção *Absus*, *Ch. flexuosa* se originou com a diminuição no número ($2n = 16$) e aumento no tamanho dos cromossomos, decorrentes de fusões cêntricas e a perda de um loco de rDNA 5S. Posteriormente a perda de outro sítio de rDNA 5S teria originado *Ch. potentilla*, uma espécie mais derivada dessa seção.

As sequências 45S e 5S distribuídas de forma contíguas como observado em *Ch. ensiformes* e *Ch. decora*, seria um caráter plesiomórfico observado durante a evolução cariotípica do gênero. Esse padrão de distribuição é incomum em organismos eucariotos superiores, bem como a posição do loco 5S mais terminal que o 45S (WINTERFELD; RÖSER, 2007). O surgimento desse padrão de distribuição parece não apresentar uma vantagem evolutiva, já que esse evento foi seguido de perda de sequências de DNA ribossomal.

Assim, os marcadores cromossômicos descritos, obtidos a partir da FISH de rDNAs de 45S e 5S mostram-se importantes para o estudo da evolução dos cromossomos de espécies de *Chamaecrista*. Contudo, deve-se avaliar um maior número de espécies, bem como devem ser empregados outros marcadores tal como sequências teloméricas e centroméricas, as quais poderiam evidenciar os eventos de fusão.

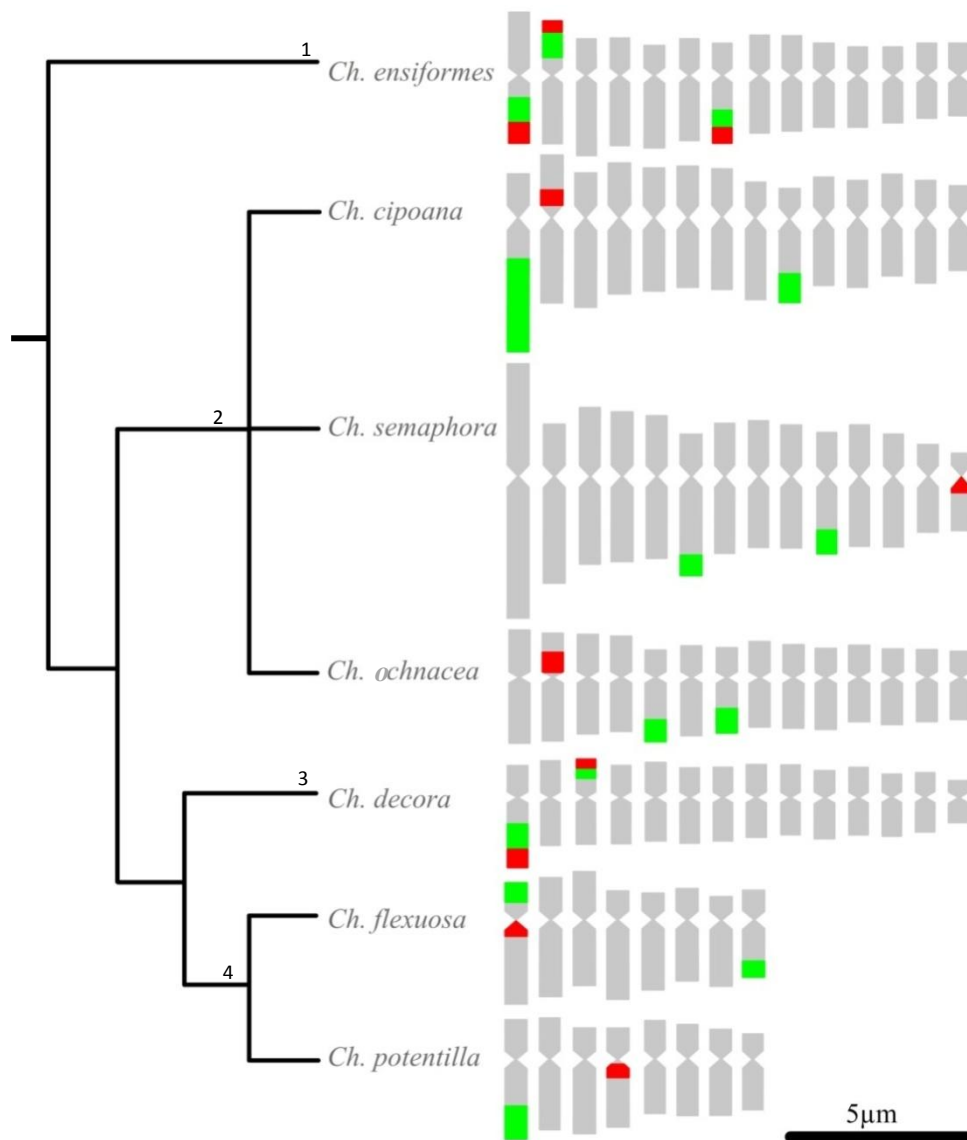


Figura 5 Dendrograma adaptado de Conceição et al. (2009) com distribuição das sequências de rDNA 45S (verde) e 5S (vermelho) em espécies de *Chamaecrista* Moench. 1) Seção *Apoucouita*; 2) Seção *Absus*; 3) Seção *Absus*, subseção *Baseophyllum*. 4) Seção *Chamaecrista*. Barra: 5 μm

5 CONCLUSÕES

A redução disploide está envolvida na evolução cariotípica de *Chamaecrista* Moench, como consequência de fusões centroméricas.

Além da displóidia, rearranjos cromossômicos como translocações, inversões e deficiências tiveram um papel importante na diversificação do gênero, levando a um menor número de locos de rDNA.

Os dados citogenéticos corroboram a proposta de exclusão da subseção *Baseophyllum* da seção *Absus*.

Os dados cariológicos de *Chamaecrista* corroboram a sua segregação em relação aos outros dois gêneros de Cassiinae.

ABSTRACT

Chamaecrista, *Cassia* and *Senna* genera belong to Cassiinae, a subtribe formed from the *Cassia s. l.* subdivision. Although Cassiinae is considered as monophyletic, the relations among its genera remain unclear, as well as the relations among some *Chamaecrista* species. Cytogenetic data can help to clarify taxonomic and evolutionary issues. The objective of this study was to characterize species representing different *Chamaecrista* sections and/or series regarding the karyotype, ribosomal DNAs location and nuclear DNA amount. Root meristems were extracted from nine species collected in Diamantina-MG and were used to obtain metaphasic cells. New chromosome counts for four species were reported. . A detailed description of chromosome complement was made for seven species. The disploidy reduction is involved in the genus karyotype evolution as a result of fusions. Rearrangements like inversions, translocations and deletions can also be considered as factors that led to chromosome structural changes and decrease in DNA amount and number of rDNA loci. Cytogenetic data corroborate the hypothesis of *Baseophyllum* subsection exclusion from *Absus* section and the segregation of the three Cassiinae genera.

Keywords: Karyotype. Contiguous sequences. C-value. Chromosome. Cassiinae.

REFERÊNCIAS

ACHARYA, L.; MUKHERJEE A. K.; PANDA, C. P. Separation of the genera in the subtribe Cassiinae (Leguminosae: Caesalpinioideae) using molecular markers. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 25, n. 1, p. 223-233, jan./mar. 2011.

ACHARYA, L.; PANDA, C. P. Validation of generic status of different taxa in the sub-tribe Cassiinae (Leguminosae: Caesalpinioideae) using RAPD, ISSR and AFLP markers. **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, Washington, v. 2, n. 2, p. 18-28, 2010.

BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae – Leguminosae do sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 241-248, set. 2005a.

BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Cytogenetics of species of Chamaecrista (Leguminosae - Caesalpinioideae) native to southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 150, n. 4, p. 429-439, Apr. 2006.

BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região sul do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 797-808, out./dez. 2005b.

BRUNEAU, A. et al. Phylogenetic patterns and diversification in caesalpinoid legumes. **Botany**, Elmsford, v. 86, n. 7, p. 697–718, 2008.

BRUNEAU, A. et al. Phylogenetic relationships in the caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast trnL intron sequences. **Systematic Botany**, Kent, v. 26, n. 3, p. 487-514, July 2001.

CONCEIÇÃO, A. D. S.; QUEIROZ, L. P.; LEWIS, G. Novas espécies de *Chamaecrista* Moench (leguminosae-caesalpinioideae) da chapada diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus. Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 1, n. 2, p. 112-119, 2001.

CONCEIÇÃO, A. S. et al. Phylogeny of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on nuclear and chloroplast DNA regions. **Taxon**, Utrecht, v. 58, n. 4, p. 1168-1180, Nov. 2009.

DOYLE, J. J. et al. Phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 84, n. 4, p. 541–554, Apr. 1997.

DOYLE, J. J. et al. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. **Advances in Legume Systematics**, Key, v. 9, p. 1-20, 2000.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. A. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, n. 3, p. 900–910, Mar. 2003.

DOLEZEL, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. In: LELLEY, T. **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna: WUV-Universitätsverlag, 1997. p. 80-90.

FERREIRA, K. et al. Karyotype, meiotic behavior and pollen features of *Senna occidentalis*. **Biologia**, Murcia, v. 65, n. 5, p. 789-795, Oct. 2010.

FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1989.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytogenetics: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 120, n. 3-4, p. 339-350, 2008.

GUERRA, M. S. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco - I. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 21-40, 1986.

GUERRA, M. S. Estrutura e diversificação de núcleos interfásicos em plantas. In: COLÓQUIO SOBRE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO DE PLANTAS, 1., 1985, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, 1985. p. 137-153.

HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A.; LEWIS, G. P. Phylogenetic relationships in caesalpinoid legumes: a preliminary analysis based on morphological and molecular data. In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2003. Cap. 10, p. 37-62.

IRWIN, H. S.; BARNEBY, R. C. **The American Cassiinae**. New York: Memories of the New York Botanical Garden, 1982.

IRWIN, H. S.; TURNER, B. L. Chromosomal relationships and taxonomic considerations in the genus. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 47, n. 4, p. 309-318, Apr. 1960.

KAJITA, T. et al. rbcL and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and Allies. **Systematic Botany**, Kent, v. 26, n. 3, p. 515-536, 2001.

LEWIS, G. P. et al. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, n. 1-2, p. 41-51, 1993.

OLKOSKI, D.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Cytogenetics of *Mimosa bimucronata* (DC.) O. Kuntze (Mimosoideae, Leguminosae): chromosome number, polysomaty and meiosis. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 11, n. 1, p. 27-35, Mar. 2011.

OWENS, S. J.; LEWIS, G. P. Taxonomic and functional implications of stigma morphology in species of *Cassia*, *Chamaecrista* and *Senna* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 163, n. 1-2, p. 93-105, 1989.

RESENDE, K. F. M.; DAVIDE, L. C.; TORRES, G. A. Chromosome number and meiosis in populations of *Senna* species (Caesalpinioideae – Fabaceae) from Southeast Brazil. **Caryologia**, Firenze, v. 66, n. 1, p. 1–5, 2013.

ROSITO, J. M.; BAPTISTA, L. R. M. Leguminosae Caesalpinioideae e Mimosoideae nativas do RS, com valor forrageiro – uma revisão. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 7, p. 163–180, 1985.

SOUZA, M. G. C.; BENKO-ISEPPON, A. M. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionioideae species of Pará, Amazonas, Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 144, n. 2, p. 181-191, Feb. 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SPRENT, J. I. Nodulation as a taxonomic tool. In: HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in legume systematic**. Kew: Royal Botanic Gardens. 2000. Cap. 9, p. 21-44.

SPRENT, J. I.; PEARSONS, R. Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2-3, p. 183–196, Mar. 2000.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: Addison-Wisley Publishing, 1971.

TORRES, D. C. et al. Phylogenetic relationships within *Chamaecrista* sect. *Xerocalyx* (Leguminosae, Caesalpinioideae) inferred from the cpDNA trnE-trnT intergenic spacer and nrDNA ITS sequences. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 244-251, 2011.

WINTERFELD, G.; RÖSER, M. Disposition of ribosomal DNAs in the chromosomes of perennial oats (Poaceae: Aveneae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 155, n. 2, p. 193–210, 2007.

ZARCO, C. R. A new method for estimating karyotype asymmetry. **Taxon**, Utrecht, v. 35, n. 3, p. 526-530, Aug. 1986.