

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JUAN DOMINGO URDAMPILLETA



**“ESTUDO CITOTAXONÔMICO EM ESPÉCIES DE
PAULLINIEAE (SAPINDACEAE)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
JUAN DOMINGO URDAMPILLETA
Eliana Regina Forni Martins
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins

Co-Orientadora: Profa. Dra. María Silvia Ferrucci

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Ur2e

Urdampilleta, Juan Domingo
Estudo citotaxonômico em espécies de Paullinieae
(Sapindaceae) / Juan Domingo Urdampilleta. – Campinas,
SP: [s.n.], 2009.

Orientadoras: Eliana Regina Forni Martins, Maria Silvia
Ferrucci.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citotaxonomia vegetal. 2. Citogenética. 3.
Biologia molecular. 4. Sapindaceae. 5. Paullinieae. I.
Forni-Martins, Eliana Regina. II. Ferrucci, Maria Silvia.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Citotaxonomic studies in Paullinieae species (Sapindaceae).

Palavras-chave em inglês: Cytotaxonomy; Cytogenetics; Molecular biology; Sapindaceae; Paullinieae.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Eliana Regina Forni Martins, Cecília Pinto Maglio, Ricardo Augusto Lombello, Luiza Sumiko Kinoshita, Neiva Izabel Pierozzi.

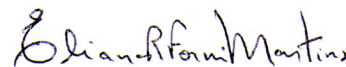
Data da defesa: 09/06/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 9 de Junho de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Neiva Izabel Pierozzi



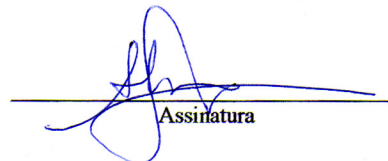
Assinatura

Profa. Dra. Cecília Pinto Maglio



Assinatura

Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita



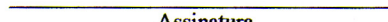
Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello



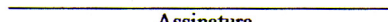
Assinatura

Profa. Dra. Genise Vieira Somner



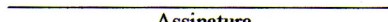
Assinatura

Dra. Ana Paula Moraes



Assinatura

Dra. Vanessa Mancuso de Oliveira



Assinatura

AGRADECIMENTOS

En primer lugar agradezco a mi orientadora, Eliana, no solamente por haberme dado la oportunidad de desarrollar con total libertad este trabajo, sino también por todo el respeto y toda la confianza que deposito en mí, durante el transcurso de estos cuatro años.

A María Silvia por el constante apoyo tanto personal como profesional, durante todos estos años de trabajo.

A la Profa Anete, y a su cuerpo de alumnos, por el gran apoyo en la aplicación de técnicas de biología molecular.

A los miembros de la Banca Examinadora, por el importante aporte otorgado para que este trabajo para salga lo mejor posible.

A las agencias de financiamiento, Capes, CNPq, Fapesp e Faepex por su gran aporte financiero.

A todos los profesores y funcionarios del departamento, que además de contribuir con mi formación, ofrecieron el cariño que siempre me hizo sentir como en casa.

A mis amigos y colegas, de laboratorio y de la vida, que además de compartir algún espacio, compartimos buenos y malos momentos que guardaré muy adentro.

A mi colega de “estrada”, la colombiana, todo lo que compartimos en estos cuatro años fue muy importante para mí.

A la Laurita, por compartir buenísimos momentos, muchas gracias por todo lo que hiciste por mí.

A mi vieja, a mi viejo, a mis hermanos, a mi familia política, a los de Tandil, a los de Posadas, que a pesar de la distancia siempre me apoyaron mucho, los quiero y los extraño mucho.

Y especialmente, y a quien le dedico todo este trabajo que tanto tiempo le ha quitado mi atención, a MI FAMILIA, mi gran tesoro, mi refugio, mi combustible, Nelci, Verena y Elian, los amo muchísimo...

ÍNDICE GERAL

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
CAPÍTULO 1. CHROMOSOMES STUDIES OF SOME <i>THINOUIA</i> SPECIES (SAPINDACEAE) AND ITS TAXONOMIC IMPLICATIONS	32
CAPÍTULO 2. CITOTAXONOMIA EM PAULLINIEAE (SAPINDACEAE): NÚMEROS CROMOSSÔMICOS, POLIPLOIDIA E DISTRIBUIÇÃO DE 18-5,8-26S DNAR	45
CAPÍTULO 3. CITOTAXONOMIA DE ESPÉCIES SUL-AMERICANAS DE <i>CARDIOSPERMUM</i> L. (PAULLINIEAE, SAPINDACEAE)	68
CAPÍTULO 4. DIFFERENCES AND RESEMBLANCES IN BANDING PATTERNS AND RIBOSOMAL DNA DISTRIBUTION IN FOUR SPECIES OF PAULLINIEAE TRIBE (SAPINDACEAE)	97
CAPÍTULO 5. MOLECULAR AND CYTOGENETIC CHARACTERIZATION OF AN AT-RICH SATELLITE DNA FAMILY IN <i>URVILLEA CHACOENSIS</i> HUNZ. (PAULLINIEAE, SAPINDACEAE)	112
CAPÍTULO 6. DISTRIBUIÇÃO DA FAMÍLIA DE DNA SATÉLITE <i>UCH725</i> EM ESPÉCIES DA TRIBO PAULLINIEAE (SAPINDACEAE)	126
CONSIDERAÇÕES FINAIS	144
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
Aspectos gerais da família Sapindaceae	6
A sistemática da tribo Paullinieae	10
<i>Caracterização da tribo Paullinieae Kunth e espécies estudadas</i>	13
Avanços da citogenética molecular nos estudos cromossômicos em plantas	23
DNA satélite como marcador na evolução cariotípica em plantas	25
Objetivos	30
Figura 1. Filogenia de Sapindales e Sapindaceae	9
Figura 2. Espécies estudadas de <i>Thinouia</i> , <i>Serjania</i> e <i>Urvillea</i>	17
Figura 3. Espécies estudadas de <i>Cardiospermum</i>	18
Figura 4. Espécies estudadas de <i>Paullinia</i>	19
Figura 5. Esquema da organização do genoma eucariótico	29
CAPÍTULO 1. CHROMOSOMES STUDIES OF SOME <i>THINOUIA</i> SPECIES (SAPINDACEAE) AND ITS TAXONOMIC IMPLICATIONS	32
Abstract	33
Introduction	33
Materials and Methods	35
Results	36
Discussion	37
Acknowledgments	40
Table 1. Karyotype formula (KF), range of variation (V), mean and standard deviation of chromosome length (CL), total chromosome length (TCL) and standard deviation, long arm mean (L), short arm mean (S), TF%, intrachromosomal asymmetry index (A_1) and interchromosomal asymmetry index (A_2)	41
Figure 1. HCl/Giemsa stained chromosomes of <i>Thinouia</i>	42
Figure 2. Idiograms of the haploid complement of the three species of <i>Thinouia</i>	43
Figure 3. Dispersion of the asymmetry indexes A_1 and A_2 of the <i>Thinouia</i> species analyzed	44
Figure 4. Mean of chromosome length (CL), long arm (L) and short arm (S) of the studied species	44
CAPÍTULO 2. CITOTAXONOMIA EM PAULLINIEAE (SAPINDACEAE): NÚMEROS CROMOSSÔMICOS, POLIPLOIDIA E DISTRIBUIÇÃO DE DNAR	45
Resumo	46
Introdução	46
Materiais e Métodos	48
Resultados	50
<i>Localização de sítios de DNAr 18-5,8-26S e 5S</i>	51
Discussão	52
<i>Os números cromossômicos e a sistemática de Paullinieae</i>	52
<i>A poliploidia em Sapindaceae</i>	54
<i>Distribuição dos genes ribossomais DNAr 18-5,8-26S e 5S em Paullinieae</i>	58
Tabela 1. Detalhe das espécies e gêneros estudadas da tribo Paullinieae, número cromossômico (2n) e localidade de coleta do material	61
Figura 1. Cromossomos mitóticos em espécies do gênero <i>Paullinia</i> corados com HCl/Giemsa	63
Figura 2. Cromossomos mitóticos em espécies de <i>Houssayanthus</i> e <i>Serjania</i> corados com HCl/Giemsa	64
Figura 3. Cromossomos mitóticos em espécies do gênero <i>Urvillea</i> corados com HCl/Giemsa	65

Figura 4. Localização de sítios de DNAr 18-5,8-26S e DNAr 5S em espécies de <i>Paullinia</i> , <i>Serjania</i> e <i>Urvillea</i> através da técnica de FISH.	66
Figura 5. Mapa de distribuição das espécies poliplóides de <i>Paullinia</i> e <i>Urvillea</i>	67
CAPÍTULO 3. CITOTAXONOMIA DE ESPÉCIES SUL-AMERICANAS DE <i>CARDIOSPERMUM</i> L. (PAULLINIEAE, SAPINDACEAE)	68
Resumo	69
Introdução.....	70
Materiais e Métodos	72
Resultados.....	73
Discussão.....	78
<i>Números cromossômicos e a sistemática de <i>Cardiospermum</i></i>	78
<i>A distribuição geográfica, citogenética e caracteres morfológicos</i>	80
<i>Cariomorfologia e a classificação infragenérica de <i>Cardiospermum</i></i>	81
<i>Padrão de bandas e DNA repetitivo</i>	83
<i>A redução cromossômica em <i>C. integerrimum</i></i>	84
Tabela 1. Espécies estudadas de <i>Cardiospermum</i> , códigos e localidades das populações analisadas.	87
Tabela 2. Espécies estudadas de <i>Cardiospermum</i> e caracteres cariotípicos	88
Figura 1. Cromossomos metafásicos de espécies do gênero <i>Cardiospermum</i> corados com HCl/Giemsa.....	89
Figura 2. Comparação de caracteres cariotípicos em <i>Cardiospermum</i>	90
Figura 3. Variação de tipos de núcleos em interphase em espécies de <i>Cardiospermum</i>	90
Figura 4. Variação nos padrões de condensação cromossômica em <i>Cardiospermum</i>	90
Figura 5. Bandamento cromossômico fluorescente (CMA ₃ /DAPI) em algumas espécies de <i>Cardiospermum</i>	93
Figura 6. Localização dos genes de DNAr 18-5.8-26S e 5S em <i>Cardiospermum</i>	94
Figura 7. Idiogramas das espécies estudadas de <i>Cardiospermum</i> , e mapeamento dos sítios de DNAr 18-5,8-26S e 5S.....	95
Figura 8. Localização geográfica e números cromossômicos (2n) das espécies estudadas de <i>Cardiospermum</i> que possuem uma distribuição restrita.....	96
CAPÍTULO 4. DIFFERENCES AND RESEMBLANCES IN BANDING PATTERNS AND RIBOSOMAL DNA DISTRIBUTION IN FOUR SPECIES OF PAULLINIEAE TRIBE (SAPINDACEAE)	97
Summary.....	98
Introduction	99
Materials and Methods	100
Results	102
Discussion.....	104
<i>Chromosome number and karyotypes</i>	104
<i>Heterochromatin and banding patterns</i>	105
Acknowledgments	107
Table 1. Karyotypic description, banding patterns and number of rDNA 45S sites in the all four studied species.....	108
Figure 1. Conventional staining in Paullinieae species.....	109
Figure 2. Chromosome banding and FISH in Paullinieae species.	110
Figure 3. Idiograms of the species of Paullinieae studied.....	111
CAPÍTULO 5. MOLECULAR AND CYTOGENETIC CHARACTERIZATION OF AN AT-RICH SATELLITE DNA FAMILY IN <i>URVILLEA CHACOENSIS</i> HUNZ. (PAULLINIEAE, SAPINDACEAE).....	112
Abstract.....	113
Introduction	113
Material and Methods.....	115
Results	117
<i>Isolation of Uch725 satellite DNA</i>	117
<i>Karyotypical features in <i>U. chacoensis</i></i>	118
Discussion.....	119
Acknowledgments	121
Figure 1. Restriction enzyme analysis of total genomic DNA of <i>U. chacoensis</i>	122

Figure 2. Sequence analysis of the studied clones	123
Figure 3. Alignment of all four subrepetitions of pUch6 and percent identity of sequences of each sub-region	124
Figure 4. Chromosome banding and fluorescence <i>in-situ</i> hybridization in metaphasic chromosome of <i>U. chacoensis</i>	125
CAPÍTULO 6. DISTRIBUIÇÃO DA FAMÍLIA DE DNA SATÉLITE <i>UCH725</i> EM ESPÉCIES DA TRIBO PAULLINIEAE (SAPINDACEAE).....	126
Resumo	127
Introdução.....	127
Materiais e Métodos	129
<i>Extração e quantificação do DNA genômico</i>	129
<i>Digestão e hibridização em membrana de nylon</i>	130
<i>Amplificação de DNA satélite por PCR e sequenciamento</i>	131
<i>Obtenção de sondas marcadas e hibridização in situ fluorescente (FISH)</i>	131
Resultados.....	132
Discussão	134
Tabela 1. Espécies estudadas da tribo Paullinieae com os respectivos dados de coleta	138
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados na análise do DNA satélite em Paullinieae obtidos da sequência original do <i>Uch725</i> de <i>Urvillea chacoensis</i>	139
Figura 1. Hibridização em membrana utilizando DNA genômico de diferentes espécies de Paullinieae.....	140
Figura 2. Esquema de localização de <i>primers</i> utilizados para amplificação do DNA satélite em Paullinieae, sobre a sequência da sonda pUch-6.	140
Figura 3. PCR e FISH utilizando <i>primers pUc6-1 e pUc6-2</i> em <i>C. grandiflorum</i> , <i>P. elegans</i> , <i>U. glabra</i> e <i>U. ulmacea</i>	141
Figura 4. Amplificação de DNA satélite da família <i>Uch725</i> em espécies de <i>Cardiospermum</i> , <i>Paullinia</i> e <i>Urvillea</i> por PCR inversa.....	142
Figura 5. Localização de produtos da PCR (<i>primers Uch725-100</i>) marcados com DIG pela técnica de FISH em <i>C. grandiflorum</i> , <i>U. glabra</i> e <i>P. elegans</i>	143
CONSIDERAÇÕES FINAIS	144
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

Resumo

Diferentes aspectos citotaxonômicos foram explorados em Paullinieae (Sapindaceae). Foram descritas 29 novas contagens cromossômicas estudando 44 espécies sul-americanas de *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania*, *Thinouia* e *Urvillea*. Os cariótipos em *Thinouia* exibiram grande homogeneidade, mas devido a semelhanças com as tribos *Cupanieae*, *Paullinieae* e *Thouineae*, os caracteres cromossômicos não permitiram definir sua posição taxonômica em Sapindaceae. A redução no número cromossômico é uma sinapomorfia em Paullinieae. Os números básicos $x = 14$, 15 e 16 apresentam maior frequência em Sapindaceae, mas em Paullinieae, o $x = 14$ é uma simplesiomorfia unicamente observada em *Thinouia* e *Lophostigma*. O número básico $x = 12$, frequente em Paullinieae, encontra-se presente em *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea*. Particularmente em *Houssayanthus* e *Serjania*, $2n = 24$ é conservado. A redução cromossômica é mais evidente em *Cardiospermum* e *Urvillea*. A classificação infragenérica de *Urvillea* em duas seções é reforçada pela presença de números básicos diferentes. Esta variação no número básico permitiu também caracterizar algumas seções em *Cardiospermum*. A redução no número cromossômico em *Cardiospermum* foi reafirmada com observações em *C. heringeri* ($2n = 24$) e *C. integerrimum* ($2n = 14$), onde a disploidia estaria relacionada à relocalização dos genes de DNA ribossomal. Foram descritos eventos de poliploidia nos três gêneros do “clado *Paullinia*”, *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*, destacando a importância deste processo evolutivo e sua distribuição fitogeográfica. A maior diversidade cariotípica da tribo Paullinieae foi observada em *Cardiospermum*, os números básicos variam de $x = 12$ a $x = 7$ e os comprimentos cromossômicos diferem até seis vezes no valor. O tipo de núcleo em

intérfase e o comportamento dos cromossomos na prófase definem dois grupos principais, parcialmente associados com a classificação infragenérica proposta para *Cardiospermum*. A diversidade cariotípica em *Cardiospermum* é refletida nas diversas adaptações no hábito, distribuição fitogeográfica e variações morfológicas. A localização e número dos loci de DNAr 18-5,8-26S e 5S em Paullinieae é variável e a não-sintenia destes genes foi a característica mais frequente. A sintenia destes genes é um caráter que diferencia unicamente a seção *Carphospermum* em *Cardiospermum*. O número e localização dos loci de DNAr foram marcadores específicos para alguns táxons. Não existe uma relação estritamente linear entre número de loci e nível de ploidia, como esperado em autopoliplóides recentes, indicando possíveis eventos de hibridação e reorganização genômica nos complexos poliplóides. Outra característica cariotípica do “clado *Paullinia*” é a ocorrência de segmentos heterocromáticos nas regiões cromossômicas terminais. Este padrão de bandas mostra uma variação tanto no tipo quanto no tamanho dos blocos (blocos ricos em AT, GC ou neutros). Do genoma de *U. chacoensis* foi isolada e caracterizada sequências de DNA satélite, componente da heterocromatina terminal rica em AT. As técnicas de hibridização (FISH e *Southern-Blotting*) definem a sonda pUch6 como marcador específico do genoma de *U. chacoensis*, mas mediante PCR foram detectadas sequências de DNA satélite Uch725 em várias espécies de *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*, mapeadas nas regiões cromossômicas terminais. A variação qualitativa faz destas sequências ferramentas taxonômicas úteis, combinando marcadores moleculares e cromossômicos em estudos filogenéticos na tribo Paullinieae.

Abstract

Various cytotaxonomic aspects were explored in Paullinieae tribe. New chromosome counts were reported for 29 species, and 44 South American species of *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania*, *Thinouia* and *Urvillea* were studied. Karyotypes in *Thinouia* have shown a great homogeneity, but in spite of their high similarities with Cupanieae, Paullinieae and Thouineae tribes, was not possible to define their taxonomic status in Sapindaceae using only chromosomal characteristics. Reduction at chromosomal number is a synapomorphic condition in Paullinieae. The basic numbers $x = 14$, 15 and 16 have a higher frequency in Sapindaceae, to the opposite of Paullinieae, $x = 14$ is a symplesiomorphic state only observed in *Thinouia* and *Lophostigma*. The basic number $x = 12$, common in Paullinieae, is present in *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania* and *Urvillea*. *Houssayanthus* and *Serjania* have a $2n = 24$ particularly conserved. Reduction in chromosomal number is more marked in *Cardiospermum* and *Urvillea*. Infrageneric classification of *Urvillea* into two sections is enhanced by the presence of different basic numbers. This variation in the basic number also enabled characterization of some sections of *Cardiospermum*. Chromosome number reduction in *Cardiospermum* was confirmed with observations in *C. heringeri* ($2n = 24$) and *C. integerrimum* ($2n = 14$), where the dysploidy could be related to the transposition of ribosomal DNA genes. We describe events of polyploidy in three genera of "Paullinia clade", in *Cardiospermum*, *Paullinia* and *Urvillea*, highlighting the importance of this evolutionary process and its phytogeographic distribution. A highest karyotypic diversity of Paullinieae tribe was observed in *Cardiospermum*, basic chromosomal numbers varie from $x = 12$ to $x = 7$ ($x = 8$ is missing) with chromosomal sizes

varying up to six times their length. Two main groups could be defined based on the morphology of interphasic nucleus and behavior of chromosomes in prophase. Both groups were partially associated with the infrageneric classification proposed for *Cardiospermum*. Karyotypic diversity in *Cardiospermum* is reflected in several adaptations in habits, phytogeographical distribution and morphological characters. Location and number of 18-5.8-26 S and 5S rDNA sites in Paullinieae are variable and the non-synteny of these genes was the most frequent feature observed. Synteny of rDNA is a character that only differentiates the *Carphospemum* section within *Cardiospermum*. Both number and location of rDNA were specific markers to some taxa. There is no strictly linear relationship between number of loci and level of ploidy, as would be expected in recent autopolyploids, indicating events of hybridization and genomic reorganization in complex polyploids as a possibility. Another karyotypic feature of the "*Paullinia* clade" is the occurrence of heterochromatic segments at terminal chromosomal regions. This banding pattern shows both kind of variation, of size and of different types of blocks (blocks rich in AT, GC or neutral). Satellite DNA sequences AT-rich were isolated and characterized of *U. chacoensis* genome, parts of terminal heterochromatin. Hybridization techniques (*FISH* and *Southern-Blot*) defined pUch6 probe as specific marker of *U. chacoensis* genome, but Uch725 satellite DNA sequences were detected in several species of *Cardiospermum*, *Paullinia* and *Urvillea* by PCR, and mapped on chromosomal terminal regions. In summary, studies of molecular and chromosomal markers together, turn out from much utility to evidence qualitative variation of these sequences, and also like a taxonomic tool for phylogenetic studies in the Paullinieae tribe.

Introdução Geral

Aspectos gerais da família Sapindaceae

A ordem Sapindales é considerada um grupo natural, que compreende 9 famílias, 460 gêneros, e cerca de 5670 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Stevens 2001). Uma das famílias mais importantes de Sapindales é a família Sapindaceae Juss. (*soapberry family*) (APG II 2003). Análises filogenéticas recentes utilizando sequenciamento de genes *rbcL* (gene cloroplástico de ribulose-1,6-bifosfato) e *matK* (gene cloroplástico de *maturaseK*) permitiram a delimitação taxonômica de Sapindales e de Sapindaceae (Fig. 1A) (Gadek *et al.* 1996; Harrington *et al.* 2005). Com base nos resultados dos estudos de filogenia molecular, Soltis *et al.* (2005) destacaram que Sapindales é um clado bem definido, coincidindo em termos gerais com a classificação de Cronquist (1981, 1988).

Aceraceae Juss. e Hippocastanaceae A. Rich., inicialmente consideradas como famílias independentes dentro de Sapindales (Cronquist 1981, 1988; Dahlgren 1989; Takhtajan 1987), foram incluídas em Sapindaceae com base em estudos morfológicos, químicos e moleculares (APG II 2003; Gadek *et al.* 1996; Judd *et al.* 1994; Muller & Leenhouts 1976; Thorne 2000; Umadevi & Daniel 1991). Atualmente, Sapindaceae abrange 135 gêneros e inclui ca. 1580 espécies arbóreas, arbustivas, lianas e algumas ervas (Stevens 2001). Possui distribuição cosmopolita, habitando principalmente regiões tropicais e subtropicais, e alguns gêneros ocorrem em regiões temperadas (Judd *et al.* 2002). O sudeste de Ásia e o neotrópico são as regiões de maior diversidade, sendo *Acer* L. (110), *Paullinia* L. (195) e *Serjania* Mill. (230) os gêneros mais importantes em relação ao número de espécies (Ferrucci & Acevedo-Rodríguez 2005; Stevens 2001).

A família Sapindaceae distingue-se por uma série de caracteres, tais como, células secretoras com saponinas triterpenóides, flores usualmente com oito estames, filetes estaminais pubescentes ou papilosos, óvulos sem funículo, amplamente aderidos numa porção da placenta (o obturador), presença de disco nectarífero e embrião curvo com radícula geralmente alojada em uma dobra do tegumento (Soltis *et al.* 2005). Outros caracteres que permitem reconhecer a família são: árvores, arbustos ou lianas com gavinhas, folhas alternas ou opostas, compostas, pinadas ou palmadas, trifolioladas, unifolioladas, raro simples, estípulas presentes ou ausentes, flores usualmente unisexuais (geralmente plantas monóicas), cálice 4 ou 5-mero, corola 4 ou 5-meras, pétalas usualmente com apêndice na face adaxial, grãos de pólen tricolporados, carpelos 2 ou 3, fusionados, ovário súpero, placentação axilar, óvulos 1 (2) por lóculo, óvulos anátropos ou ortótropos, frutos carnosos ou secos e sementes sem endosperma, ariladas ou não. O tratamento taxonômico mais completo em Sapindaceae foi realizado por Radlkofer (1931-1934), que subdividiu a família em duas subfamílias considerando o número de óvulos por lóculo: Sapindoideae Burnett (= Eussapindaceae Radlk.) possui um óvulo por lóculo, geralmente apótropro, Dodonaeoideae Burnett (= Dyssapindaceae Radlk.) contém dois ou mais óvulos por lóculo, geralmente epítropos.

Harrington *et al.* (2005), após análise filogenética com sequências dos genes *rbcL* e *matK*, sugeriram algumas modificações na classificação original de Radlkofer (1931-1934). Propuseram subdividir Sapindaceae em quatro subfamílias: Sapindoideae (incluindo *Koelreuteria* Laxm. e *Ungnadia* Endl.), Hippocastanoideae (incluindo Aceraceae e Hippocastanaceae, com *Handeliidendron* Rehder), Dodonaeoideae (incluindo Dodonaeae, Doratoxyleae e Harpullieae) e Xanthoceroideae (unicamente com *Xanthoceras* Bunge) (Fig. 1B). Particularmente em Sapindoideae, a tribo Thouinieae foi considerada um grupo

parafilética em relação à tribo monofilética Paullinieae, porém foi incluída dentro de Paullinieae, numa única tribo.

Algumas das espécies de Sapindaceae apresentam importância econômica. Algumas são apreciadas pelos frutos comestíveis como: *Litchi chinensis* Sonn. (lichia), *Melicoccus bijugatus* Jacq. (mamoncillo ou lima espanhola), *Nephelium lappaceum* L. (rambutão) e *Talisia esculenta* (A. St. Hil.) Radlk. (pitomba). As sementes de *Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, o guaraná, apresentam importantes quantidades de cafeína e outros alcalóides (Weckerle *et al.* 2003), sendo utilizado pelos aborígenes como estimulante e refrescante. As espécies da tribo Paullinieae, principalmente dos gêneros *Paullinia* L. e *Serjania* Mill. (cipó-timbó) são popularmente conhecidas pelas propriedades medicinais e ictiotóxicas. Espécies de gêneros, como *Acer* (“maple”) e *Koelreuteria* (“goldenrain tree”), são reconhecidas como plantas ornamentais. Algumas espécies arbóreas (*Allophylus* L., *Cupania* L. e *Matayba* Aubl.) brasileiras são apreciadas pela madeira (Guarim Neto *et al.* 2000).

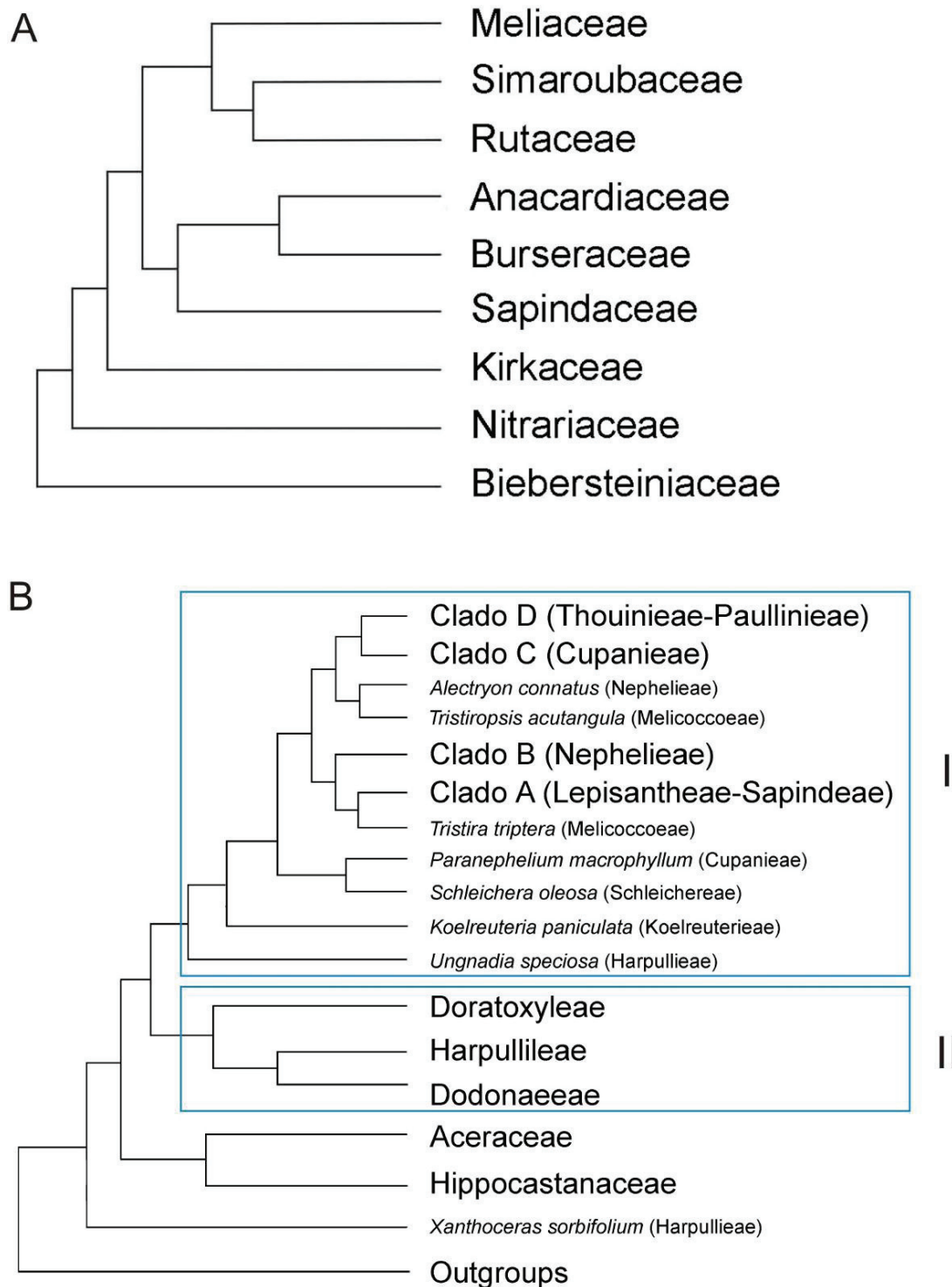


Figura 1. A, Esquema da filogenia proposta para Sapindales baseado no sequenciamento do gene *rbcL* (APG II 2003; Gadek *et al.* 1996). B, Esquema de filogenia proposto para Sapindaceae (Harrington *et al.* 2005), I: Sapindoideae e II: Dodonaeoideae.

A sistemática da tribo Paullinieae

A tribo Paullinieae possui uma distribuição principalmente neotropical, com espécies distribuídas desde o Sul dos EUA até o centro da Argentina. A Amazônia, o Planalto Central e o Litoral do Brasil representam três centros de distribuição importantes, sendo o Brasil o país com maior diversidade (Acevedo-Rodríguez 1993b). Poucas espécies ocorrem fora do continente americano. Além de ocorrer na América, *Paullinia pinnata* L. é uma espécie nativa também na região tropical da África (Simpson 1976) e *Cardiospermum corindum* L., *C. grandiflorum* Sw. e *C. halicacabum* L. ocorrem como plantas invasoras em culturas anuais, como a da soja na África e Oceania (Johnston *et al.* 1979). A grande diversidade na América sugere que a tribo teve origem no novo mundo. O registro fóssil de pólen mais antigo é de *Cardiospermum* L., *Paullinia* e *Serjania* no Eoceno superior e Mioceno, frequentes nas formações do Panamá (Graham 1985, 1991). A comparação do pólen de Paullinieae com registro fóssil de *Cupanieidites cloudi* (Paleoceno, Califórnia), sugere que Paullinieae poderia derivar de um grupo de Cupanieae (Van Der Ham & Tomlik 1994) e ter uma história evolutiva sempre ligada às regiões tropicais (Acevedo-Rodríguez 1993b).

Paullinieae é a tribo com maior diversidade em Sapindaceae, representando um quarto das espécies da família, contando com aproximadamente 430 espécies e 7 gêneros (Hunziker 1978; Radlkofer 1931-1934). É caracterizada principalmente pelas sinapomorfias como hábito trepador, presença de estípulas, flores zigomorfas e nectários formados por normalmente quatro ou raramente dois lóbulos nectaríferos (Acevedo-Rodríguez 1993b). A condição monofilética em Paullinieae foi comprovada nas diferentes análises filogenéticas realizadas utilizando diversos tipos de caracteres (Acevedo-Rodríguez 1993b; Harrington *et al.* 2005),

mas devido ao fato que Thouinieae é parafilética com Paullinieae, Harrington *et al.* (2005) propuseram unir estas taxa.

Baseado em diferenças nos caracteres florais, Radlkofer (1931-1934) classificou a tribo Paullinieae em duas subtribos, Paulliniinae e Thinouiinae. A subtribo Paulliniinae contém os gêneros *Cardiospermum* L., *Lophostigma* Radlk., *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea* Kunth, sendo *Houssayanthus* Hunz. Incorporado posteriormente por Hunziker (1978). Por outro lado, a subtribo Thinouiinae é constituída por um único gênero, *Thinouia* Triana & Planch. Esta classificação foi posteriormente revisada por Acevedo-Rodríguez (1993b). Este autor, com base na presença de flores actinomorfas, disco nectarífero anular e grão de pólen esférico nas espécies de *Thinouia*, sugeriu a sua exclusão da tribo Paullinieae, e transferência para a Cupaninae. Na análise cladística, Acevedo-Rodríguez (1993b) descreveu dois *clados*, o “*clado Serjania*”, formado pelos gêneros *Houssayanthus*, *Lophostigma* e *Serjania*, caracterizados pela presença de fruto tipo esquizocarpo, e o “*clado Paullinia*”, composto por *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*, apresentando fruto tipo cápsula e o maior número de caracteres derivados.

Os gêneros *Paullinia*, com ca. 195 spp, e *Serjania* com ca. 230 spp., apresentam a maior diversidade na tribo Paullinieae. A exceção de *Lophostigma* que conta com duas espécies (Acevedo-Rodríguez 1993a), não existe uma revisão taxonômica atualizada para os gêneros, sendo a obra de Radlkofer (1931-1934) o trabalho mais completo para a tribo Paullinieae e para a família Sapindaceae.

Serjania, o gênero mais importante da família quanto ao número de espécies, foi subdividido por Radlkofer (1931-1934) em 12 seções, baseado em características do fruto, mas existe uma variação gradual entre algumas seções que dificulta sua discriminação. *Serjania* é diferenciado de outros gêneros da tribo pela presença de fruto esquizocárpico com 3

mericarpós samaróides, mantendo porção seminífera na parte distal do mericarpo e alas verticais descendentes (Fig. 2B-2E). Numa revisão parcial do gênero, Acevedo-Rodríguez (1993b) classificou o gênero em seis seções, combinando algumas seções de Radlkofer, embora não tenha esclarecido significativamente a subdivisão no gênero *Serjania*.

Lophostigma é um gênero afim a *Serjania*, diferenciado por características florais e principalmente pelo tipo de pólen. Radlkofer (1931-1934) descreveu uma única espécie para este gênero (*L. plumosum* Radlk.) e, numa revisão recente, Acevedo-Rodríguez (1993a) incluiu uma segunda espécie, *L. schunkei* (Acev.-Rodr.) Acev.-Rodr. As espécies deste gênero são endêmicas da região andina da Bolívia e do Peru.

O gênero *Paullinia* (Sapindaceae) é distribuído na América desde o México até o norte da Argentina. Uma única espécie, *P. pinnata*, ocorre nas regiões tropicais e subtropicais na América e no continente africano. *Paullinia* diferencia-se dos demais gêneros da tribo Paullinieae pelo tipo de fruto, apresentando cápsulas septifragas e sementes com arilo (Weckerle & Rutishauser 2005) (Fig. 4). O gênero é bem delimitado, mas o grande número de espécies e a variação morfológica fazem com que a classificação infragenérica seja complexa. Radlkofer (1931-1934) classificou o gênero em 13 seções baseando-se principalmente nas características do fruto, na mais completa revisão do gênero, abrangendo 123 espécies. Algumas revisões parciais do gênero incluem novas espécies, combinações e atualizações (Simpson 1976; Somner 2001), não obstante seja necessária uma revisão completa do gênero que leve a uma classificação infragenérica natural.

Os gêneros *Cardiospermum* e *Urvillea*, caracterizados pela presença de cápsulas com pericarpo membranáceo ou cartáceo, apresentam uma clara afinidade (Fig. 2G-2I e 3A-3L). Os gêneros vêm sendo revisados por Ferrucci (2000b), incluindo 16 espécies, duas delas inéditas (*Cardiospermum bahianum* Ferrucci & Urdampilleta sp. nov. e *C. cristobalii* Ferrucci

& *Urdampilleta* sp. nov.) (Fig. 3B e 3D), classificadas em 3 seções em *Cardiospermum*, e 17 espécies em 2 seções em *Urvillea*. Foram considerados um grupo monofilético com várias sinapomorfias (Acevedo-Rodríguez 1993b). Particularmente, *Cardiospermum* inclui algumas adaptações ecológicas, como variações no tipo de hábito e sistemas radiculares (Ferrucci 2000b) (Fig. 3J e 3K), e é o único gênero que apresenta espécies invasoras cosmopolitas, como *C. corindum* (Fig. 3C), *C. grandiflorum* (Fig. 3E) e *C. halicacabum* (Fig. 3F).

Estudos palinológicos permitiram diferenciar claramente alguns gêneros e marcar algumas tendências evolutivas na tribo Paullinieae. Pelo tipo de pólen é possível identificar as espécies de *Lophostigma*, *Paullinia* ou *Thinouia*, mas os gêneros *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Serjania* e *Urvillea* compartilham os mesmos caracteres polínicos (Ferrucci & Anzótegui 1993). Desta forma Van Der Ham & Tomlik (1994) determinaram que a variação seja limitada e contínua em *Serjania*, dificultando a diferenciação infragenérica pelas características do pólen. Estes estudos levaram Ferrucci & Anzótegui (1993) a propor o pólen de *Thinouia* como o tipo ancestral para a tribo, presente também em algumas espécies de *Allophylus* L. (Thouinieae). Assim, os ancestrais da tribo Paullinieae poderiam ter relação filogenética com a Thouinieae conforme observado por Harrington *et al.* (2005).

Caracterização da tribo Paullinieae Kunth e espécies estudadas

Paullinieae compreende plantas monóicas, trepadeiras, lenhosas ou herbáceas, raramente ervas, subarbustos eretos ou escandentes, comumente rizomatosos. O caule pode ser simples ou múltiplo pela presença de câmbio supranumerário, latescente ou não. As folhas são imparipinadas, compostas, bicompostas ou recompostas. As estípulas são persistentes ou inconspícuas. As inflorescências são tirso racemiformes, espiciformes ou corimbiformes,

axilares ou terminais, em cuja base da raquis desenvolvem-se duas gavinhas. As flores são zigomorfas ou actinomorfas (em *Thinouia*), com presença de dois a quatro lóbulos nectaríferos (disco nectarífero em *Thinouia*) na base da flor.

No fruto das espécies de Paullinieae, encontram-se as características principais para a classificação e identificação dos gêneros. Pelo tipo de fruto, podemos agrupar as espécies em dois grupos principais, o “clado *Serjania*”, com fruto esquizocarpo e o “clado *Paullinia*” com fruto cápsula (Acevedo-Rodríguez 1993b). Considerando a classificação de Radlkofer (Radlkofer 1931-1934) e a classificação incerta segundo Acevedo-Rodríguez (1993b), neste trabalho o gênero *Thinouia* foi considerado como membro da tribo Paullinieae.

Neste trabalho foram analisadas 44 espécies da tribo Paullinieae pertencentes aos gêneros *Cardiospermum* (12 spp.), *Paullinia* (12 spp.), *Serjania* (11 spp.), *Urvillea* (5 spp.), *Houssayanthus* (1 sp) e *Thinouia* (3 spp.). Alguns aspectos da morfologia que permitem a identificação das espécies estudadas foram fotografados e apresentados em pranchas (Figs. 3-5). Sendo também apresentada uma chave dicotômica dos gêneros estudados (Ferrucci 1991) utilizando características do fruto.

1. Fruto esquizocárpico com 3 mericarpos samaróides.
 2. Mericarpo subsemicircular.....***Houssayanthus* Hunz.**
 - 2'. Mericarpo samaróide
 3. Porção seminífera no ápice do mericarpo.....***Serjania* Mill.**
 - 3'. Porção seminífera da base do mericarpo.....***Thinouia* Triana & Planch**
- 1'. Fruto cápsula.
 4. Pericarpo vermelho, subcarnoso. semente com arilo carnosos.....***Paullinia* L.**
 - 4'. Pericarpo castanho, membranáceo ou cartáceo. Semente com arilo seco.
 5. Fruto alado.....***Urvillea* Kunth**
 - 5'. Fruto não alado ou com três alas muito reduzidas.....***Cardiospermum* L.**

As espécies do gênero *Houssayanthus*, *Serjania* e *Thinouia* apresentam fruto esquizocárpico. O fruto de *Houssayanthus* apresenta mericarpos subsemicirculares, com a porção seminífera no centro do mericarpo. *Serjania* e *Thinouia* apresentam fruto esquizocárpico samaróide. *Thinouia* possui a porção seminífera na base do mericarpo (Fig. 2A), no entanto, em *Serjania*, a porção seminífera está no ápice do mericarpo (Fig. 2B-E). A morfologia da porção seminífera no fruto de *Serjania* é utilizada por Radlkofer (1931-1934) para o reconhecimento das seções.

Cardiospermum e *Urvillea* apresentam fruto cápsula com mericarpos membranáceos ou cartáceos. Em *Urvillea*, as folhas são trifolioladas (Fig. 2G-I) e fruto cápsula com mericarpos alados (Fig. 2G e 2I). As espécies de *Cardiospermum* (Fig. 3A-L) apresentam fruto cápsula não-alada ou curtamente alada, com exceção de *C. cristobalii* Ferrucci & Urdampilleta inéd. e *C. oliveirae* Ferrucci, cujas alas são notavelmente desenvolvidas (Fig. 3D e 3I). A presença de pêlos recobrando o tegumento da semente caracteriza as espécies da seção *Carphospermum*, *C. anomalum* Cambess. e *C. bahianum* Ferrucci & Urdampilleta inéd. (Fig. 3A e 3B). *Cardiospermum corindum*, *C. grandiflorum* Sw. e *C. halicacabum* L. apresentam folhas biternadas e cápsulas cartáceas com mericarpos castanho-avermelhados (Fig. 3C, 3E e 3F). *Cardiospermum heringeri* Ferrucci e *C. integerrimum* Radlk. também apresentam folhas biternadas, mas as cápsulas são sublenhosas castanho-escuras com alas reduzidas (Fig. 3G e 3H). Cápsulas sublenhosas são também observadas em *C. urvilleoides* (Radlk.) Ferrucci, mas esta espécie apresenta folhas trifolioladas e estípulas foliares proeminentes (Fig. 3L). *Cardiospermum procumbens* Radlk. e *C. pterocarpum* Radlk. são hemicriptófitos rizomatosos (Fig. 3J e 3K), sendo *C. procumbens* a única espécie de folha simples profundamente trilobada (Fig. 3J). *Cardiospermum bahianum* e *C. cristobalii* são espécies brasileiras inéditas (Ferrucci & Urdampilleta em preparação)

As espécies de *Paullinia* apresentam fruto tipo cápsula, sendo divididas em dois grandes grupos: cápsulas sem alas ou com alas. No grupo sem alas estão *P. bicorniculata* Somner, *P. carpopoda* Cambess., *P. cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, *P. elegans* Cambess., *P. rubiginosa* Cambess., *P. seminuda* Cambess. e *Paullinia* sp (Fig. 4A, 4B, 4E, 4F, 4H, 4I e 4L). O grupo com alas é ilustrado com *P. coriacea* Casar., *P. cristata* Radlk., *P. racemosa*, *P. thalictrifolia* Juss. e *P. trigonia* Vell. (Fig. 4C, 4D, 4G, 4J e 4K). A semente é sempre preta, com arilo branco cobrindo o tegumento da semente parcialmente (Fig. 4C, 4G, 4H e 4K) ou quase na totalidade (Fig. 4B e 4L). As folhas geralmente são imparipinadas, com 1-4-jugas, geralmente 5-folioladas ou biternadas, mas em *P. thalictrifolia* é característica a presença de folhas recompostas, 5-8 jugas (Fig. 4J). Para *Paullinia* sp. não foram observadas descrições que permitiram identificar esta espécie e, provavelmente, representa um novo táxon para o gênero *Paullinia*, apresentando afinidade com *P. carpopoda* (Obando *et al.* comunicação pessoal).



Figura 2. A, *Thinouia mucronata* Radlk.; B, *Serjania chaetocarpa* Radlk.; C, *S. coradinii* Ferrucci & Somner; D, *S. meridionalis* Cambess.; E, *S. reticulata* Cambess.; F, *S. tripleuria* Ferrucci; G, *Urvillea chacoensis* Hunz.; H, *U. triphylla* (Vell.) Radlk.; I, *U. ulmacea* Kunth.



Figura 3. A, *Cardiospermum anomalum* Cambess.; B, *C. bahianum* Ferrucci & Urdampilleta inéd.; C, *C. corindum* L.; D, *C. cristobalii* Ferrucci & Urdampilleta inéd.; E, *C. grandiflorum* Sw.; F, *C. halicacabum* L. var. *halicacabum*; G, *C. heringeri* Ferrucci; H, *C. integerrimum* Radlk.; I, *C. oliveirae* Ferrucci; J, *C. procumbens* Radlk.; K, *C. pterocarpum* Radlk.; L, *C. urvilleoides* (Radlk.) Ferrucci .



Figura 4. A, *Paullinia bicorniculata* Somner; B, *P. carpopoda* Cambess.; C, *P. coriacea* Casar.; D, *P. cristata* Radlk.; E, *P. cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke; F, *P. elegans* Cambess.; G, *P. racemosa* Wawra; H, *P. rubiginosa* Cambess.; I, *P. seminuda* Radlk.; J, *P. thalictrifolia* Juss.; K, *P. trigonia* Vell.; L, *Paullinia* sp.

A citogenética em Sapindaceae

Os estudos cariológicos em Sapindaceae foram desenvolvidos principalmente na tribo Paullinieae, levando em conta aspectos variados do cariótipo. Os primeiros estudos em Sapindaceae descreveram os números cromossômicos da espécie invasora *Cardiospermum halicacabum* (Sugiura 1931) e da espécie cultivada *Koelreuteria paniculata* Laxm. (Eichhorn & Franquet 1936). Os estudos citotaxonômicos em Sapindaceae têm origem a partir dos estudos citológicos de Guervin (1961, 1964). Este autor comparou várias espécies de diferentes tribos analisando o número cromossômico, o comportamento do cromossomo durante a divisão celular (mitose e meiose) e a estrutura do núcleo interfásico, tentando explicar a evolução da família a partir da cariomorfologia (Guervin 1961, 1964). Posteriormente, o número de trabalhos abordando comparações cariotípicas foi incrementando, obtendo-se importantes resultados que contribuíram para o conhecimento da sistemática da família Sapindaceae (Ferrucci 1989, 2000a; Ferrucci & Solís Neffa 1997; Lombello & Forni-Martins 1998; Nogueira *et al.* 1995; Solís Neffa & Ferrucci 1998). As técnicas de bandamento cromossômico e de citogenética molecular permitiram recentemente aumentar o número de variáveis cromossômicas a ser estudadas, e realizar novas abordagens da evolução cariotípica da família (Hemmer & Morawetz 1990; Urdampilleta 2005; Urdampilleta *et al.* 2005, 2006, 2007).

Em Sapindaceae foram relatados os números cromossômicos de aproximadamente 150 espécies, pertencentes a 42 gêneros e descritos os cariótipos de umas 40 espécies. Os números básicos $x = 14, 15$ e 16 estão presentes em 90% dos gêneros, sendo provavelmente $2n = 28, 30$ ou 32 o número cromossômico ancestral da família (Ferrucci 2000a; Hemmer & Morawetz 1990; Lombello & Forni-Martins 1998). Alguns autores sugerem que os números

cromossômicos na maioria das angiospermas foram derivados por poliploidia ou disploidia/aneuploidia de $x = 8$ (Morawetz 1986). Sendo assim, a maioria das espécies de Sapindaceae seriam paleotetraplóides.

A poliploidia é um dos principais mecanismos de evolução cariotípica em angiospermas (Wendel 2000), promovendo uma rápida reestruturação genômica que favorece a diploidização das novas espécies (Eckardt 2001; Feldman *et al.* 1997; Leitch & Bennett 2004; Soltis & Soltis 1995). No entanto, na literatura, a poliploidia não parece ser um mecanismo importante na evolução recente de Sapindaceae, sendo citadas variações poliplóides unicamente em espécies dos gêneros *Acer*, *Allophylus*, *Melicoccus*, *Paullinia* e *Urvillea*. Na análise filogenética utilizando sequências de DNA, Grimm *et al.* (2006) reconheceram vários poliplóides em *Acer*, entre os quais se encontram tetra-, hexa- e octaplóides. As espécies diplóides em *Allophylus* apresentam $2n = 2x = 28$ enquanto que *A. guaraniticus* (A.St.-Hil.) Radlk. possui $2n = 4x = 56$ (Ferrucci & Solís Neffa 1997). Similarmente em *Melicoccus* a espécie diplóide *M. bijugatus* tem $2n = 2x = 32$ (Simmonds 1954) enquanto *M. lepidopetalus* Radlk. possui $2n = 6x = 96$ (Ferrucci & Solís Neffa 1997). Em *Urvillea*, *U. uniloba* Radlk (Ferrucci 1981) e *U. ulmacea* (Urdampilleta *et al.* 2006) foram tratadas como tetraplóides ($2n = 44$) e octaplóides ($2n = 88$), respectivamente. O único registro de poliploidia no gênero *Paullinia* foi previamente citado para *P. cupana* var. *sorbilis*, o “guaraná”, descrevendo-se o cariótipo com $2n = 210$ cromossomos (Freitas *et al.* 2007).

Em Paullinieae é conhecido o número cromossômico em aproximadamente 20% das espécies, e para 10% é apresentada uma descrição do cariótipo. Os resultados citogenéticos obtidos em Paullinieae foram de grande utilidade nos estudos biossistemáticos, revelando importantes processos evolutivos na diferenciação genética das espécies. Os números cromossômicos em Paullinieae variam de $2n = 14$ em *C. integerrimum* (Ferrucci 1989) a $2n =$

210 em *P. cupana* (Freitas *et al.* 2007). Diferentemente das demais tribos de Sapindaceae, o número cromossômico $2n = 24$ é observado com maior frequência em Paullinieae (Ferrucci 2000a; Hemmer & Morawetz 1990; Lombello & Forni-Martins 1998). Este caráter pode ser considerado uma sinapomorfia nos gêneros *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea*, sendo este caráter notavelmente conservado em *Houssayanthus* e *Serjania*. Esta redução no número cromossômico é ainda mais acentuada em algumas espécies dos gêneros *Cardiospermum* ($x = 7, 9, 10$ e 11) e *Urvillea* ($x = 11$ e 12). Interessantemente, $2n = 28$ é um caráter simplesiomórfico para *Thinouia* e *Lophostigma*, o que permite uma especulação sobre o traçado de uma possível via de redução cromossômica.

Um segundo evento que caracteriza a tribo Paullinieae é o aumento geral no tamanho cromossômico (Hemmer & Morawetz 1990; Lombello & Forni-Martins 1998). Existe uma relação direta entre o tamanho cromossômico e a quantidade de DNA por núcleo interfásico, e vem sendo sugerido que um aumento no tamanho do genoma acompanhou a diferenciação de Paullinieae (Hemmer & Morawetz 1990). O tipo de núcleo interfásico semireticulado é uma característica frequente em Paullinieae, enquanto que o tipo arreticulado é característico das demais tribos de Sapindaceae (Guervin 1961; Hemmer & Morawetz 1990). Em plantas, a variação do tipo de núcleo interfásico está frequentemente relacionada a diferenças nas quantidades de DNA por genoma (Nagl & Fusening 1979), a alta densidade da cromatina no tipo semireticulado indicaria uma maior quantidade de DNA no núcleo interfásico. Hemmer & Morawetz (1990) relacionaram este aumento no tamanho do genoma com o aumento na quantidade de DNA repetitivo; de fato, frequentemente as variações quantitativas no DNA repetitivo e outras sequências não-codificantes explicam as variações no tamanho do genoma de espécies próximas, o chamado “paradoxo do valor C” (Gregory 2001; Pagel & Johnstone 1992). O bandamento cromossômico (C, CMA₃ e DAPI) em Paullinieae permitiu detectar

variações qualitativas e quantitativas nos DNA repetitivos. Estas técnicas permitiram observar diferenças contrastantes no padrão de bandas heterocromáticas (blocos ricos em AT, GC ou neutros) de espécies próximas, como foi observado em algumas espécies de *Cardiospermum*, *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea* (Hemmer & Morawetz 1990; Urdampilleta 2005; Urdampilleta *et al.* 2006, 2007).

Avanços da citogenética molecular nos estudos cromossômicos em plantas

As análises citogenéticas são de grande relevância na taxonomia, sendo as características cromossômicas utilizadas como um caráter sistemático adicional, atualmente incorporadas em descrições florísticas (Stace 2000). De acordo com Bennett (1998), em apenas 25% das angiospermas o número cromossômico é conhecido, e destas, menos de 1% correspondem a espécies da região tropical. Neste limitado conhecimento podemos observar uma variação no número cromossômico em angiospermas de $2n=4$, em espécies de Poaceae, Hyacinthaceae, Cyperaceae e Asteraceae (Vanzela *et al.* 1996) até $2n=640$ em *Sedum suaveolens* Kimmach, Crassulaceae (Stace 2000). Embora a sexualidade e a fertilidade dependam do correto comportamento dos cromossomos, tanto na meiose como na mitose, variações cromossômicas estruturais podem ser toleradas. Estas mutações justificariam a diversidade inter- ou intraespecífica no número e na estrutura dos cariótipos em angiospermas (Greilhuber & Ehrendorfer 1988).

A era da “citogenética molecular” teve início há 40 anos, com o desenvolvimento das técnicas de hibridização *in situ* (ISH). Esta técnica foi primeiramente descrita por Gall & Pardue (1969) e John *et al.* (1969) utilizando sondas de DNA marcadas com radioisótopos. A ISH permitiu pela primeira vez relacionar diretamente as sequências de DNA com a

organização cromossômica, numa interação direta entre a biologia molecular e a citogenética clássica (Schwarzacher 2003). Com este método é possível identificar e caracterizar segmentos cromossômicos, cromossomos inteiros ou complementos cromossômicos, fornecendo marcadores de alta resolução para serem utilizados em estudos de evolução cariotípica entre outros. O mapeamento físico de sequências de DNA em cromossomos mitóticos, faz da técnica hibridização *in situ* uma ferramenta valiosa no estudo da organização e da evolução do genoma em plantas, sendo frequentemente utilizada como complemento de estudos sistemáticos e filogenéticos em plantas (Ran *et al.* 2001; Torrell *et al.* 2003).

Os protocolos de ISH foram modificados objetivando substituir os marcadores radiativos pela marcação com moléculas como a biotina detectada através de uma reação antígeno-anticorpo associada a um corante fluorescente. Estas alterações permitiram o desenvolvimento do FISH (*fluorescent in situ hybridization*) (Langer-Safer *et al.* 1982; Pinkel *et al.* 1986) facilitando a aplicação desta técnica em vários laboratórios. O GISH (*genomic in situ hybridization*), outro método que deriva do ISH, permite identificar complementos cromossômicos completos dos parentais em híbridos naturais e artificiais, obtendo resultados conclusivos em experimentos de hibridação e introgressão gênica (Schwarzacher *et al.* 1989).

Os genes ribossomais, DNAr 18-5,8-26S e DNAr 5S são marcadores cromossômicos utilizados frequentemente em estudos de evolução cariotípica devido a sua abundância e relativa conservação em plantas, mas a localização e o número sítios pode ser um caracter específico de grupo (Schubert 2007; Weiss-Schneeweiss *et al.* 2008). Estes DNAr são sequências repetitivas em *tandem*. A unidade de repetição do DNAr 18-5,8-26S é composta por três genes ribossomais (18S, 5,8S e 26S) separados pelas ITS-1 e ITS-2 (*internal transcribed spacer*) e cada unidade de repetição é separada pelas ETS (*external transcribed spacer*) (Volkov *et al.* 2007). Citologicamente, o DNAr 18-5,8-26S forma parte do nucléolo

no núcleo interfásico; no cromossomo pro- e metafásico constitui a constrição secundária e NOR (*nucleolus organizer region*). O DNAr 5S é composto por um único gene (5S) comumente de 120 pb separado pelo NTS (*non-transcribed spacer*). Citologicamente, em angiospermas é comum que o DNAr 5S ocupe posições diferentes no genoma, mas existem exemplos onde o DNAr 5S ocorre em sintonia (no mesmo cromossomo), próximo ao DNAr 18-5,8-26S (Brown & Carlson 1997; Garcia *et al.* 2007; Muravenko *et al.* 2004; Siroky *et al.* 2001; Youn-Kyu *et al.* 1999) ou inserido no próprio DNAr 18-5,8-26S (Garcia *et al.* 2009). O DNAr, assim como outras sequências repetitivas, apresentam uma evolução em concerto (*concerted evolution*) (Coen *et al.* 1982; Dover & Tautz 1986). Este modelo de evolução tem como base uma série de mecanismos de variação genética não-Mendeliana, como a conversão gênica, intercâmbio desigual, transposição e *slippage replication* (deslizamento da replicação), que caracterizam o processo denominado “*DNA turnover*” (Bostock 1986; Dover & Tautz 1986; Dover 2002). A evolução em concerto apresenta duas conseqüências principais: uma rápida amplificação e dispersão de DNA repetitivo e homogeneização de sequências repetitivas em tandem, incluindo o DNAr 18-5,8-26S e DNAr 5S, porém novas variantes que surgem numa unidade de repetição podem ser rapidamente eliminadas ou dispersadas dentro do genoma (Volkov *et al.* 2007).

DNA satélite como marcador na evolução cariotípica em plantas

O DNA altamente repetitivo é um dos componentes principais do genoma de plantas e modificações e rearranjos são responsáveis por variações no tamanho e estrutura cromossômica durante a evolução e diferenciação cariotípica das espécies (Flavell 1986; Sanmiguel & Bennetzen 1998). O DNA repetitivo não-codificante pode ser classificado em

duas categorias principais, o DNA repetitivo disperso e o DNA repetitivo em tandem (Fig. 5). De acordo com o tamanho da unidade de repetição podemos classificá-los em três categorias: os microssatélites, monômeros de 2-5 pb repetidos de 10 a 100 vezes, os minisatélite, monômeros de 6-100 pb em blocos de 0,5 a 30 kb, e o DNA satélite, monômeros de 150-1500 pb em blocos de mais de 100 Mb (Charlesworth *et al.* 1994). O DNA satélite é um tipo de DNA repetitivo comum dentro do genoma de plantas (Kubis *et al.* 1998). A unidade de repetição do DNA satélite, o monômero, é repetida milhares vezes e frequentemente constitui blocos de heterocromatina (Charlesworth *et al.* 1994). A heterocromatina foi primeiramente descrita por Heitz (1928) como um evento citológico, mas posteriormente verificou-se que ela é associada frequentemente com DNA satélite (Yunis & Yasmineh 1971).

O DNA satélite também evolui pelo modelo de evolução em concerto, e por ser um DNA não-codificante teria uma maior capacidade de acumular mutações e apresentar alta taxa de evolução por deriva gênica. A rápida amplificação e a dispersão do DNA satélite, entre espécies próximas, fazem com que as diferenças quantitativas deste DNA não possam ser consideradas em estudos filogenéticos (Hemleben *et al.* 2007). Entretanto, a análise destas sequências permitiu subsidiar a sistemática em alguns taxons de plantas e animais (De la Herrán *et al.* 2001; Fann *et al.* 2001; Garrido-Ramos *et al.* 1999; Pons & Gillespie 2004; Svitashv *et al.* 1994). A origem do DNA satélite implicaria a existência de um precursor do DNA satélite (pré-DNA satélite) acumulado por processos de amplificação e homogeneização (Hemleben *et al.* 2007). Alguns DNA satélites em plantas apresentam homologia com retrotransposons (Cheng & Murata 2003; Langdon *et al.* 2000; Tek *et al.* 2005) e DNA ribossomais (Lim *et al.* 2004; Macas *et al.* 2003). Esta homologia permite supor que frequentemente o DNA satélite é originado pela dispersão de retrotransposons ou DNA ribossomal. A rápida evolução e homogeneização do DNA satélite fazem destas sequências

ferramentas úteis na identificação genômica de espécies próximas. Além disso elas são frequentemente utilizadas na identificação de parentais em hibridação (Kamm *et al.* 1995; Pehu *et al.* 1990; Schmidt *et al.* 1990). O DNA satélite pode ser um componente espécie-específico ou típico de alguns grupos de espécies (Schmidt *et al.* 1991; Svitashv *et al.* 1994), permitindo complementar estudos biosistemáticos.

De acordo com a posição no cromossomo, as famílias do DNA satélite podem ser classificadas em centroméricas, intercalares, TAS (*telomere-associated sequences*) ou subteloméricas (substituindo o telômero) (Sharma & Raina 2005). Frequentemente o DNA satélite ocupa regiões terminais no cromossomo e apresenta uma riqueza diferencial de bases AT (Macas *et al.* 2002). O tamanho destas TAS é associado com estruturas mono e dinucleossomais (135 - 195 a 315 - 375 pb), sugerindo uma função estrutural no cromossomo, estabilizando regiões teloméricas (Sýkorová *et al.* 2001). Novas seqüências são continuamente relatadas e depositadas em bases de dados, que permitem acrescentar o conhecimento da evolução e distribuição do DNA satélite no genoma de plantas (Macas *et al.* 2002).

A natureza repetitiva do DNA satélite permite o seu isolamento e estudo mediante diversas técnicas. O DNA satélite foi primeiramente isolado por centrifugação em gradiente de densidade utilizando colunas de cloreto de cério (Beridze 1976; Ingle *et al.* 1973), pela diferenciação de “bandas satélites” em relação às do genoma total, separadas pelo gradiente de centrifugação. Uma estratégia diferente é a construção de bibliotecas genômicas da fração de DNA de baixo valor *Cot* (Ho & Leung 2002; Leung 1999; Neumann *et al.* 2001; Sun *et al.* 1999). O valor *Cot* depende da concentração inicial do DNA de fita simples (C_0) e o tempo (t) da reação de renaturação. A cinética da reação de renaturação do DNA é descrita pela curva *Cot* e a morfologia desta curva depende da complexidade do DNA. O DNA altamente ou moderadamente repetitivo representa a fração do DNA com menor valor *Cot*. Outra técnica

que tem como base a velocidade de renaturação é GSP-PCR (*genomic self-priming PCR*), onde o próprio genoma fragmentado é utilizado como *primer* numa reação de PCR. Nesta técnica o DNA satélite teria maior probabilidade de alinhamento que o DNA de cópia única (Buntjer & Lenstra 1998; Macas *et al.* 2000).

Frequentemente a metodologia utilizada para isolar DNA satélite é a construção de bibliotecas genômicas a partir de fragmentos de DNA obtidos por digestão com enzimas de restrição (Ganal & Hemleben 1986; Kato *et al.* 1984; Lakshmikumaran & Ranade 1990; Lorite *et al.* 2001). A técnica tem como base a ocorrência de sítios de restrição dentro da unidade de repetição. Um único sítio de restrição no monômero produz uma grande quantidade de fragmentos de igual sequência depois da digestão. O acúmulo de fragmentos de restrição iguais permite separá-los e isolá-los através de eletroforese em gel de agarose (Hemleben *et al.* 2007).

O isolamento, o sequenciamento, a comparação das bases presentes nas sequências de DNA satélite e a análise da sua distribuição (número e posição) nos cromossomos de espécies da tribo Paullinieae poderão permitir a detecção de diferenças interespecíficas de grande utilidade em estudos filogenéticos. Também possibilitará a observação de aspectos da evolução cariotípica do grupo, como rearranjos e variações no tamanho cromossômico, com alta resolução. Variações envolvendo DNAs repetitivos normalmente estão associadas à diferenciação cariotípica, independente do grupo de plantas estudado. Assim sendo, é de extrema importância ampliar o conhecimento nesta área da citogenética na família Sapindaceae. A análise dos cariótipos envolvendo coloração convencional, padrões de bandas e hibridização *in situ* podem fornecer caracteres possivelmente úteis na resolução de problemas sistemáticos e filogenéticos em Sapindaceae, bem como fornecer mais informações sobre a gama de eventos responsáveis pelas variações cariotípicas já apontadas na literatura.

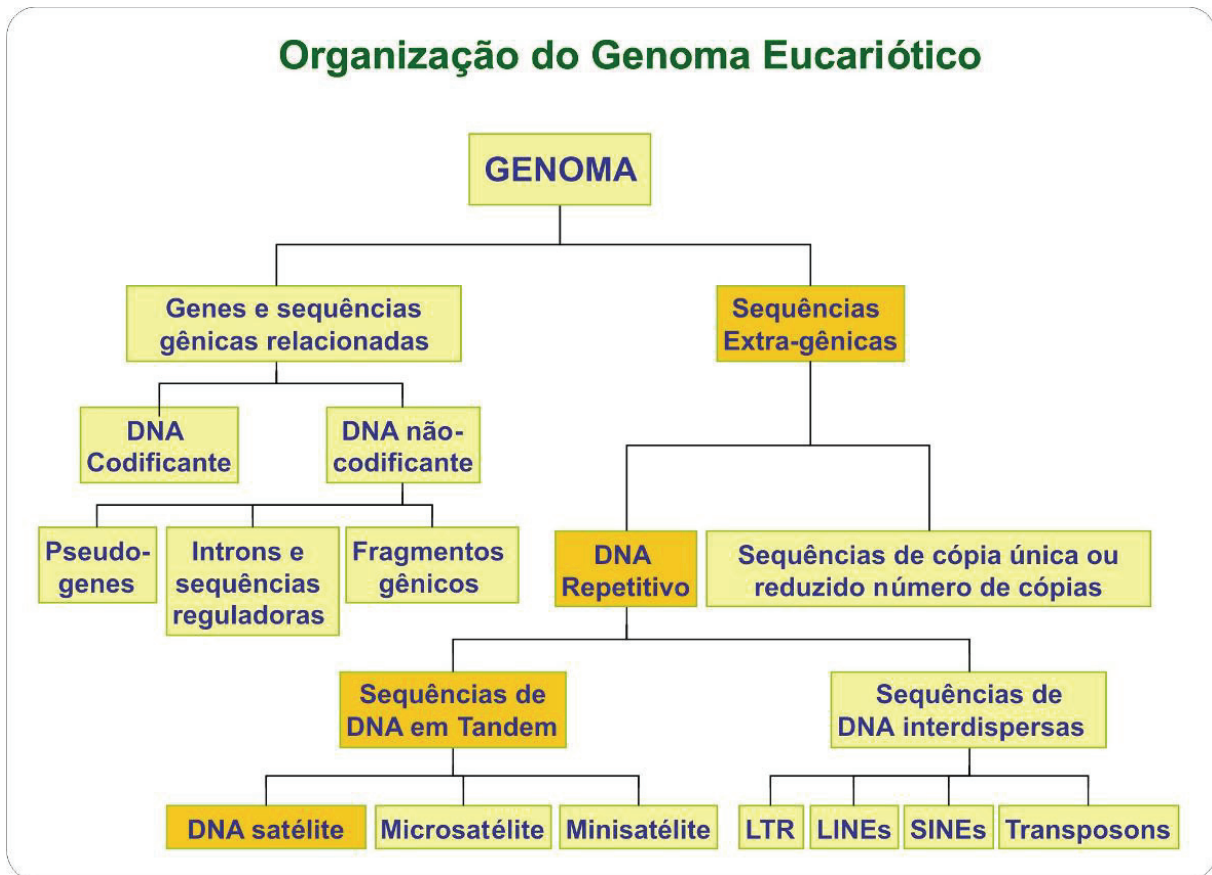


Figura 5. Esquema da organização do genoma eucariótico, levando em consideração a função e a estrutura das seqüências de DNA, destacando qual é a relação do DNA satélite com outras seqüências do genoma eucariótico.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é caracterizar citogeneticamente espécies de diferentes gêneros da tribo *Paullinieae*, presentes principalmente no sudeste do Brasil, a fim de complementar o conhecimento da família Sapindaceae, e interpretar a evolução cariotípica na tribo.

Os objetivos específicos são:

- 1- Incrementar as contagens cromossômicas de distintas espécies e populações.
- 2- Descrever os cariótipos das espécies estudadas e elaborar seus idiogramas.
- 3- Caracterizar os padrões de bandas mediante as técnicas de bandeamento C, CMA₃/DAPI e localização física dos segmentos de DNAr 18-5,8-26S e 5S por hibridização *in situ* fluorescente
- 4- Isolar e caracterizar sequências de DNA satélite em algumas espécies da tribo *Paullinieae*, e construir sondas para sua localização cromossômica.
- 5- Analisar comparativamente as espécies com base nas informações cariotípicas e confrontar os dados cromossômicos aos arranjos taxonômicos propostos.

Para atingir estes objetivos foram desenvolvidos seis capítulos abordando diferentes aspectos citogenéticos:

Capítulo 1, Chromosomes studies of some *Thinouia* species (Sapindaceae) and its taxonomic implications

Capítulo 2, Citotaxonomia em Paullinieae (Sapindaceae): números cromossômicos, poliploidia e distribuição de DNAr

Capítulo 3, Citotaxonomia de espécies sul-americanas de *Cardiospermum* L. (Paullinieae, Sapindaceae)

Capítulo 4, Differences and resemblances in banding patterns and ribosomal DNA distribution in four species of Paullinieae tribe (Sapindaceae)

Capítulo 5, Molecular and cytogenetic characterization of an AT-rich satellite DNA family in *Urvillea chacoensis* Hunz. (Paullinieae, Sapindaceae)

Capítulo 6, Distribuição da família de DNA satélite *Uch725* em espécies da tribo Paullinieae (Sapindaceae)

Capítulo 1.

Chromosomes studies of some *Thinouia* species (Sapindaceae) and its taxonomic implications

Artigo publicado em *Annales Botanicci Fennici* (Finnish Zoological and Botanical Publishing, Helsinki), ISSN: 0003-3847 (print) ISSN: 1797-2442 (online)

Recebido 6 Fevereiro 2007, aceito 21 Fevereiro 2007

Urdampilleta JD, Ferrucci MS & Forni-Martins ER, 2008. Chromosome studies of some *Thinouia* species (Sapindaceae) and the taxonomic implications. *Ann. Bot. Fennici* 45: 68-73.

Chromosomes studies of some *Thinouia* species (Sapindaceae) and its taxonomic implications

Abstract

The karyotypes of three species of the genus *Thinouia* from southern Brazil and Bolivia are analyzed. New counts and karyotypes are reported for the first time for *T. ventricosa* and *T. paraguayensis*, both with $2n = 28$. The karyotype formulae of *T. mucronata*, *T. paraguayensis* and *T. ventricosa* are $8m + 14sm + 6st$, $10m + 8sm + 10st$, and $14m + 4sm + 10st$, respectively. In all the species investigated, the prophase chromosome condensation was always proximal and the pattern of the interphase nuclei was areticolate. These results are discussed in relation to previous chromosome studies for Paullinieae in order to infer the phylogenetic relationships within the tribe.

Key words: cytotaxonomy, interphase nuclei, karyotype, Sapindaceae, *Thinouia*.

Introduction

Thinouia (Sapindaceae) is a small genus of woody vines with a Neotropical distribution ranging from Mexico to northwestern-northeastern Argentina (Ferrucci 1991; Radlkofer 1931-1934). It belongs to the large Neotropical tribe Paullinieae, characterized by a climbing habit. The current tribe classification of the family recognizes two subtribes in Paullinieae: Thinouiinae with one genus (*Thinouia*) and Paulliniinae with *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Lophostigma*, *Paullinia*, *Serjania* and *Urvillea*. The monotypic Thinouiinae

possesses actinomorphic flowers with an annular nectary disk, while in the other subtribe the flowers are zygomorphic with a unilateral nectary disk modified into two or four prominent glands.

As treated by Radlkofer (1978), *Thinouia* consists of two sections based chiefly on petals morphology. The section *Thinouia* (sub *Lepidodine*), with a simple species, *T. myriantha*, is characterized by petals equal to or longer than the petaloid appendage and in section *Petalodine*, which groups seven species (Ferrucci 1991; Radlkofer 1931-1934), the petaloid appendage is longer than the petals; an extra species, *T. obliqua*, has an uncertain position. This genus is easily recognized by its schizocarpic fruits, mericarps with proximal locule and distal wing. In addition, the fused sepals form a cupular 5-lobed calyx, and another remarkable feature is the precocious aperture of the calyx, which is shared with other American genera as *Lophostigma* and *Matayba*.

As for the karyotypic studies of *Thinouia*, only *T. mucronata*, with $2n = 28$, has been cytogenetically studied, suggesting that the basic number of the genus could be $x = 14$ (Ferrucci & Solís Neffa 1997; Solís Neffa & Ferrucci 1998). These works showed the occurrence of small chromosomes and a relatively symmetric karyotype, in contrast to others species of Paullinieae, which frequently present larger chromosomes and lower chromosome numbers with moderately asymmetric karyotypes (Hemmer & Morawetz 1990; Lombello & Forni-Martins 1998). However, within Paullinieae, *Thinouia* shares its chromosomal number and size with *Lophostigma plumosum* (Ferrucci & Solís Neffa 1997).

This paper, which reports the karyomorphological results of *T. mucronata*, *T. paraguayensis* and *T. ventricosa*, aims at contributing to the knowledge on the karyotypic characters of Paullinieae. It comparatively presents their chromosome numbers and karyotypic structures and analyzes their interphase nuclei type and condensation patterns. These results

are discussed in relation to previous studies in the tribe in order to improve our understanding of the Paullinieae evolution.

Materials and Methods

The voucher specimens are deposited at FUEL (Herbarium of the Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil) and CTES (Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina). The species studied and voucher specimens are the following:

T. mucronata. Brazil. Paraná. Londrina, São Luis, J. D. Urdampilleta 153 (CTES, FUEL); Londrina, Fz. Doralice, J. D. Urdampilleta, 230 (CTES, FUEL).

T. paraguayensis. Bolivia. Dpto. Santa Cruz. Prov. Chiquitos. M. S. Ferrucci, M. Dematteis and A. Schinini 1915 (CTES, LPB, SI, USZ).

T. ventricosa. Brazil. Paraná. Londrina, J. D. Urdampilleta 123 (FUEL); Londrina, Fz. Doralice, J. D. Urdampilleta 125 (FUEL); Londrina, São Luis, J. D. Urdampilleta 189 (FUEL).

Chromosome preparations were obtained from root tips proceeding of germinating seeds. After a pretreatment with 2 mM 8-hydroxyquinoline for 4--5 h at 15°C, they were fixed in ethanol: acetic acid (3:1, v:v) for 12 hours and stored at -20°C until use. For conventional chromosome analysis, the HCl/Giemsa technique (Guerra 1983) was used.

The five best metaphases plates, with similar condensations, were selected for making idiograms. Chromosome nomenclature follows Levan *et al.* (1964), the symbols m, sm, and st design metacentric, submetacentric and subtelocentric chromosomes, respectively. The karyotypes were described according to the chromosome morphology determined by the

centromeric index (CI = short arm x 100 / total chromosome length) as suggested by Levan *et al.* (1964) and the total chromosome length (TCL) and mean of chromosome length (CL) was calculated. Karyotype asymmetry was obtained using the average centromeric index, TF% (Huziwara 1962) and the intrachromosomal (A_1), the intrachromosomal (A_2) asymmetry index (Romero Zarco 1986).

In order to evaluate the differences between species according to the TCL, CL, L (long arm) and S (short arm) variables, the mean values of the calculated variables were compared, for each species, with a variance analysis (ANOVA). The differences between each pair of mean were estimated using the test of Tukey ($\alpha= 0.01$). The data were processed with the statistical software InfoStat 2006 p.2.

Results

All the three studied species present $2n = 28$. The chromosome size of these species belongs to the very small to small category according to Lima de Faría (1980), which ranges between 0.64 to 1.46 μm , and the average total chromosome length (TCL) varies between 26 and 30.5 μm (Table 1). The karyotype of *T. mucronata* consists of 8m + 14sm + 6st, differing slightly from the others species by of its smaller chromosome size, that ranges between 0.69 and 1.28 μm , with an average length of 0.93 μm . In *T. paraguayensis*, the karyotype is composed by 10m + 8sm + 10st and the average chromosome size is 1.09 μm , ranging between 0.85 μm and 1.46. In *T. ventricosa*, the karyotype shows 14m + 4sm + 10st, and an average chromosome size of 0.96 μm , varying between 0.64 μm and 1.41. Although the

chromosome size is not useful to distinguish the species, the number of m, sm and st chromosomes might be an important character of diagnostic value.

The intrachromosomal asymmetry index (A_1) indicates little variation among the length of the chromosome arms of the three species (Table 1). On the other hand, the interchromosomal asymmetry index (A_2) shows a more little variation among them (Table 1). The dispersion diagram of asymmetry indices points out that *T. paraguayensis* is the species with the greatest intrachromosomic asymmetry index while *T. ventricosa* presents the greatest interchromosomic value (Fig. 3).

Among the four parameters analyzed (CL, TCL, L and S), significant differences were observed between the species in TCL and L. *T. paraguayensis* presents a TCL 45% significantly smaller and a L 0.75 μm significantly greater than those of the others two species. No significant differences were found for the others variables ($p>0.01$) between the studied species, so that the *Thinouia* species share karyotype similarity (Table1, Fig. 4).

In all the studied species, the interphase nucleus structure is areticate with a finely granulated reticulum, and few, small spheroid chromocenters evenly dispersed throughout the nuclei (Fig. 1). The chromosomal behavior during the prophasic condensation was constant in all the studied species. After the conventional coloration with Giemsa, intensely stained proximal regions were visualized during prophase and prometaphase, while the distal regions of the chromosome arms were extended, showing a typical proximal condensation pattern (Fig. 1).

Discussion

Chromosome numbers and karyotypes of *T. ventricosa* and *T. paraguayensis* are new for the science, while our count on *T. mucronata* ($2n = 28$) confirms the number previously reported for two populations of Argentina. The karyotype formula varies as for the proportional number of the m-type and sm-type chromosomes in relation to earlier works (Ferrucci & Solís Neffa 1997; Solís Neffa & Ferrucci 1998). Such differences could be due to the time used in the root tip pretreatment.

In *Thinouia* species analyzed, the very small to small chromosomes and symmetric karyotypes are features that shares this genus in the tribe with *Lophostigma*. It seems to be primitive in the Paullinieae. In addition, the species studied belong to the same section and these results support the infrageneric classification proposed by Radlkofer (1978). The karyotype variations are important not only as a genetic variability, but also because they represent an important micromorphological feature for this genus and are frequently associated with species differentiation.

According to the results obtained, *T. paraguayensis* can be distinguished from *T. mucronata* and *T. ventricosa* by some karyotypical features such as the total chromosome length and long arm length. *T. paraguayensis* presents the most asymmetric karyotype as for the difference between short and long arms, as shown by a smaller TF % and a greater A_1 . Nevertheless, *T. ventricosa* is the species with the more asymmetric karyotype ($A_2 = 0.227$), considering the size variation between chromosomes. The karyotype symmetry gives an idea of the karyotypic evolution, the general tendency being that the species with more symmetric karyotypes are primitive (Stebbins 1971). In this study *T. paraguayensis* and *T. ventricosa* should thus be considered the most derived species of the three studied taxa.

Results of the studies on the areticate interphase nucleus structure and the proximal chromosomal behavior during the prophasic condensation of *T. mucronata*, *T. ventricosa* and

T. paraguayensis are reported for the first time. Most of the analyzed species belonging to the genera *Cardiospermum*, *Paullinia*, *Serjania* and *Urvillea* have shown a semi-reticulate interphase nuclei (Hemmer & Morawetz 1990; Urdampilleta *et al.* 2006), which suggests that *Thinouia* species might contain a smaller amount of DNA per nucleus than the others species of the tribe (Nagl & Fusening 1979). In Sapindaceae, an areticulate nuclear structure has also been recently recorded for two species of *Koelreuteria* (Urdampilleta *et al.* 2005). In both genera, the areticulate nuclei were associated with small chromosomes.

While the prophasic condensation pattern of *Thinouia* species is always proximal, remarks on other Paullinieae genera demonstrate a varied behavior. Proximal, heterogeneous and terminal condensation patterns are observed in some species of *Urvillea* and *Cardiospermum*, whereas, in genus *Serjania*, the heterogeneous pattern is predominant (Hemmer & Morawetz 1990; Urdampilleta *et al.* 2006).

The following basic numbers, $x = 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15$ and 16 have been reported for the family. Paullinieae thus shows an almost complete aneuploid series from $x = 7$ to $x = 14$. In this tribe, the most advanced of the family, the highest basic chromosome numbers $x = 15$ and $x = 16$ are absent. Considering that $x = 7$ would be the primitive base number in Sapindaceae (Ferrucci 1989), the remaining chromosome numbers would be derived through polyploidy and disploidy/aneuploidy. The genus *Thinouia* is considered the most primitive genus within the tribe (Ferrucci 2000a; Radlkofer 1931-1934). Although, based on cladistic analyses, Acevedo-Rodríguez (1993b) place *Thinouia* in the tribe Cupanieae, macromorphological evidence and pollen type (Ferrucci & Anzótegui 1993) support its basal position within *Paullinieae*.

Thinouia shares its basic chromosome number with *Lophostigma plumosum*, which supports the evolutionary tendency, based in macromorphology and pollen morphology,

proposed for Paullinieae (Ferrucci & Anzótegui 1993). The basic number $x = 14$ in this tribe would represent a plesiomorphic character shared with Thouinieae, Sapindeae, Aphanieae, Cupanieae, Dodonaeae and Harpullieae.

Acknowledgments

The authors greatly thank Ing. Agr. Mercedes Avanza for help with statistic analyses, and the Brazilian agencies CAPES e Fapesp for financial support.

Table 1. Karyotype formula (KF), range of variation (V), mean and standard deviation of chromosome length (CL), total chromosome length (TCL) and standard deviation, long arm mean (L), short arm mean (S), TF%, intrachromosomal asymmetry index (A₁) and interchromosomal asymmetry index (A₂).

Species	2n	KF	Chromosome size		TCL* (SD)	L* (SD)	S* (SD)	TF%	A ₁	A ₂
			V*	CL* (SD)						
<i>T. mucronata</i>	28	8m + 14sm + 6st	1.28-0.69	0.93a (0.16)	26.0a (0.83)	0.62a (0.07)	0.31a (0.12)	33,5	0.498	0.175
<i>T. paraguayensis</i>	28	10m + 8sm + 10st	1.46-0.85	1.09a (0.15)	30,5b (0.69)	0.75b (0.06)	0.34a (0.14)	31,3	0.544	0.142
<i>T. ventricosa</i>	28	14 m + 4sm + 10st	1.41-0.64	0.96a (0.22)	27.0a (1.31)	0.62a (0.08)	0.34a (0.18)	35,7	0.448	0.227

Within each column, means followed by different letters are significant (p<= 0.01). * Value in microns

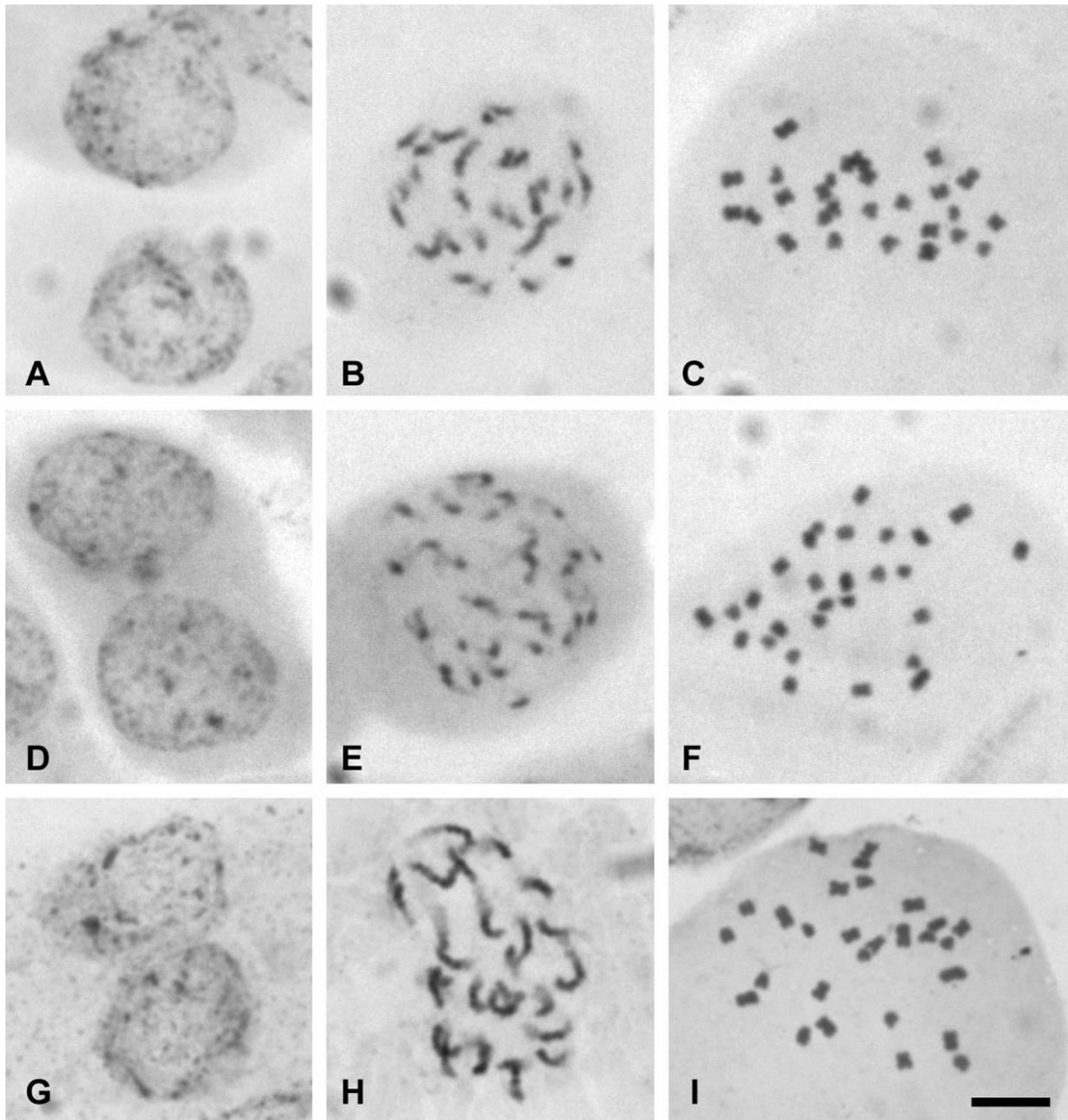


Figure 1. HCl/Giemsa stained chromosomes of *Thinouia*. A-C. *T. mucronata*. D-F. *T. paraguayensis*. G-I. *T. ventricosa*. A, D, G. Interphase nuclei; B, E, H. Prophase nuclei. C, F, I. Metaphase chromosomes. Bar = 5 μ m.

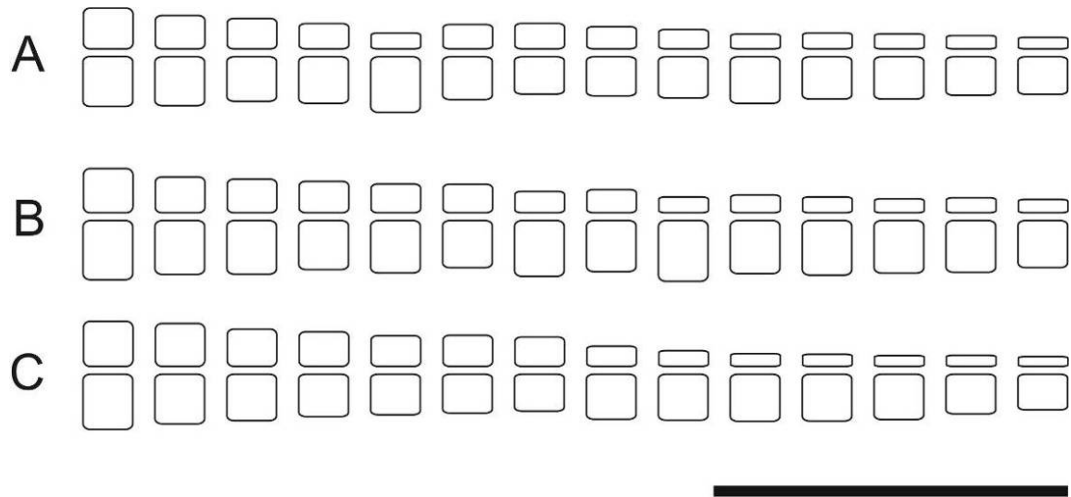


Figure 2. Idiograms of the haploid complement of the three species of *Thinouia*. A. *T. mucronata*. B. *T. paraguayensis*. C. *T. ventricosa*. Bar = 5 μm .

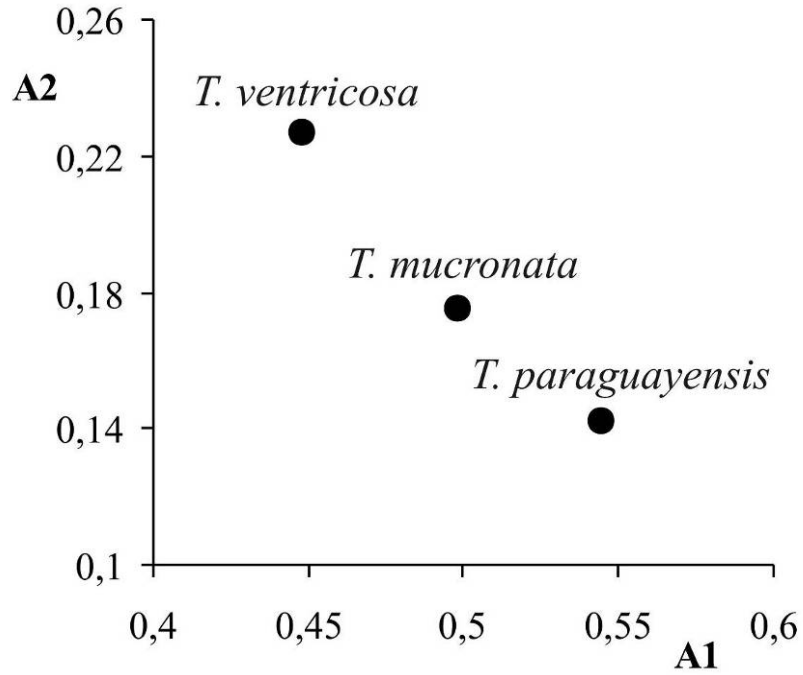


Figure 3. Dispersion of the asymmetry indexes A₁ and A₂ of the *Thinouia* species analyzed.

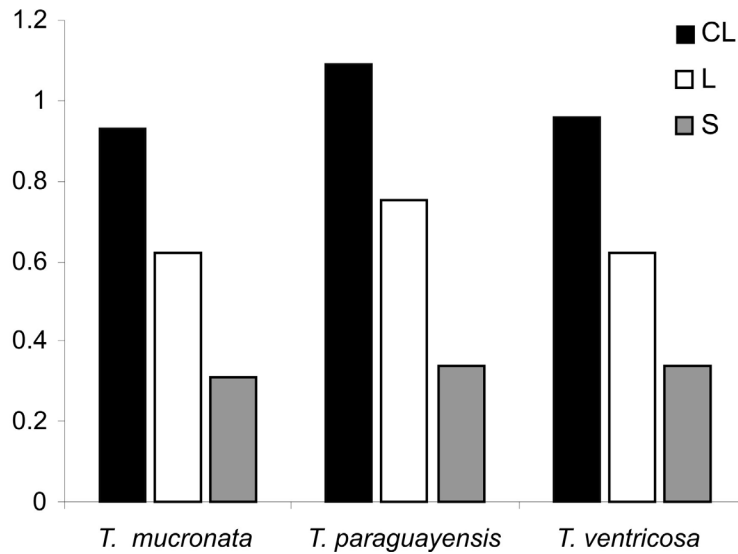


Figure 4. Mean of chromosome length (CL), long arm (L) and short arm (S) of the studied species.

Capítulo 2.

Citotaxonomia em Paullinieae (Sapindaceae): números cromossômicos, poliploidia e distribuição de DNAr

Citotaxonomia em Paullinieae (Sapindaceae): números cromossômicos, poliploidia e distribuição de DNAr.

Resumo

Neste trabalho foram estudadas 29 espécies dos gêneros *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea*, apresentando 20 novas contagens para 18 espécies de Paullinieae, das quais 5 foram de *Urvillea*, 4 de *Serjania*, e 11 de *Paullinia*. A partir dos antecedentes no grupo e de nossos resultados destacamos a conservação de $2n = 24$ em *Houssayanthus* e *Serjania* e a redução no número cromossômico em *Urvillea*. Em *Urvillea*, a ocorrência de dois números básicos ($x = 11$ e 12) reforça a classificação infragenérica em duas seções. Em *Paullinia* e *Urvillea* foram observadas variações intra e interespecíficas no nível de ploidia, sendo a poliploidia um mecanismo de evolução que aparece com frequência nas espécies da Mata Atlântica. Em relação à localização dos sítios de DNA ribossomais, existe uma variação no número de loci, que parcialmente pode ser associada com a sistemática do grupo. Entretanto, a falta de uma relação linear entre o aumento do número cromossômico e o aumento de número de sítios de DNAr sugere possíveis reestruturações genômicas nas espécies poliplóides.

Introdução

A tribo Paullinieae apresenta distribuição principalmente neotropical e é caracterizada por um grande número de apomorfias (Acevedo-Rodríguez 1993b), como o hábito trepador, presença de estípulas, flores zigomorfas e nectários formados por normalmente quatro, ou raramente, dois lóbulos nectaríferos. Paullinieae é um grupo natural, monofilético, mas devido

à condição parafilética com a tribo Thouinieae, Harrington *et al.* (2005) propuseram a fusão destes táxons.

Outro problema enfrentado pelo grupo, é a classificação do gênero *Thinouia* na família Sapindaceae após a exclusão da tribo Paullinieae (Acevedo-Rodríguez 1993b). Radlkofer (1931-1934), com base em diferenças florais classificou a tribo Paullinieae em duas subtribos, Paulliniinae e Thinouiinae. A subtribo Paulliniinae contém os gêneros *Cardiospermum* L., *Lophostigma* Radlk., *Paullinia* L., *Serjania* Mill. e *Urvillea* Kunth, além de *Houssayanthus* Hunz., recentemente incorporado por Hunziker (1978), e a subtribo Thinouiinae é constituída por um único gênero, *Thinouia* Triana & Planch. Com o estudo filogenético em Paullinieae, utilizando 21 caracteres morfológicos, Acevedo-Rodríguez (1993b) sugeriu a exclusão do gênero *Thinouia* e a existência de dois *clados*, o *clado Serjania* (*Houssayanthus*, *Lophostigma* e *Serjania*), caracterizado pela presença de fruto esquizocárpico, e o *clado Paullinia* (*Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*), com fruto capsular.

Os estudos cromossômicos em Paullinieae vêm destacando importantes processos evolutivos na diferenciação cariotípica da tribo. Em Sapindaceae, os números básicos $x = 14$, 15 e 16 são observados em 90% dos gêneros (Ferrucci 2000a; Hemmer & Morawetz 1990). Em Paullinieae o número cromossômico $2n = 24$ ($x = 12$) vem sendo observado com maior frequência e é considerado uma sinapomorfia presente nos gêneros *Cardiospermum* (Urdampilleta *et al.* em preparação, ver capítulo 5), *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea*, sendo notavelmente conservado em *Houssayanthus*, *Paullinia* e *Serjania* (Ferrucci 2000a). A redução no número cromossômico básico é mais acentuada nos gêneros *Cardiospermum* ($x = 7, 9, 10, 11$ e 12) (Urdampilleta *et al.* em preparação, ver capítulo 5) e

Urvillea ($x = 11$ e 12). Interessantemente, $2n = 28$ é um caráter simpliomórfico compartilhado pelos gêneros *Lophostigma* e *Thinouia* (Ferrucci & Solís Neffa 1997; Urdampilleta *et al.* 2008a), permitindo assim inferir possíveis ancestrais que poderiam estar envolvidos na redução no número cromossômico que deu origem à maioria das espécies de Paullinieae.

Outro processo que caracteriza a tribo Paullinieae é o aumento geral no tamanho cromossômico (Lombello & Forni-Martins 1998). Processo observado principalmente em *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea* (Ferrucci 2000a). Isso sugere um aumento no tamanho do genoma possivelmente em função do aumento na quantidade de DNA repetitivo (Hemmer & Morawetz 1990). Os padrões de bandas (C e CMA/DAPI) e distribuição de DNAr 18-5,8-26S foram estudados em algumas espécies de *Paullinia* (Urdampilleta *et al.* 2007), *Serjania* (Urdampilleta 2005) e *Urvillea* (Urdampilleta *et al.* 2006) observando-se diferenciação na distribuição de segmentos heterocromáticos e loci de DNAr entre gêneros e espécies.

O presente trabalho tem como objetivo estudar citogeneticamente espécies da tribo Paullinieae, pertencentes aos gêneros *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea*, utilizando técnicas de coloração convencional com Giemsa e localização dos sítios correspondentes às sequências de DNAr (18-5,8-26S e 5S) mediante hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Os resultados, número cromossômico e distribuição de loci de DNAr, serão discutidos principalmente dentro do enfoque sistemático-evolutivo da tribo Paullinieae.

Materiais e Métodos

As espécies de *Paullinieae* estudadas neste trabalho e os locais de coleta estão detalhados na Tabela 1. As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de meristemas radiculares pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína 2mM por 4-5 h a 15°C, fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v:v) durante 12 h e conservadas a -20°C. A coloração convencional foi feita com a técnica HCl/Giemsa (Guerra 1983): as pontas de raiz foram hidrolisadas em HCl 1N a 60° durante 10 min, esmagadas na lâmina de vidro com uma gota de ácido acético 45% e coradas com Giemsa 2%.

Para a localização física de DNAr mediante a técnica de FISH foram seguidos os procedimentos descritos por Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000). As lâminas foram confeccionadas utilizando raízes digeridas em solução de celulase 4% e pectinase 40% a 37°C durante 2 h, e foram montadas em ácido acético 45%. As lamínulas foram removidas por congelamento em nitrogênio líquido e secas ao ar. Posteriormente as lâminas foram pré-tratadas com RNase 0,1 mg/ml e prefixadas em paraformaldeído 4% e desidratadas com etanol. A mistura de hibridação contendo 4 – 6 ng/μl de sonda (*pTa71*), 50% formamida, 10% dextran sulfato, 3.3 ng/μl of DNA de esperma de salmão, 2xSSC e 0.3% SDS, foi pré-aquecida a 70°C antes da hibridização. O DNA dos cromossomos e sondas foi desnaturalizado tratando as lâminas com 30 μl de mistura de hibridização, a temperaturas de 90°C (10 min), 48°C (10 min) e 38°C (5 min) utilizando termociclador (Mastercycler, Eppendorf), em seguida foram colocadas para hibridização a 37°C durante 12-18 hs, em câmara úmida.

A sonda *pTa71* contendo seqüências de DNAr 18S-5,8S-26S (Gerlach & Bedbrook 1979), foi marcada com biotina-14-dATP por *nick translation* (Bionick, Invitrogen) e os sítios de hibridização foram detectados com avidina-FITC (Sigma-Aldrich). Para a análise dos loci de DNAr 5S, a sonda foi obtida por PCR utilizando *primers* RTPCR5S1 e RTPCR5S2

(Mathieu *et al.* 2003) e o genoma de *Cardiospermum grandiflorum* como molde. Os fragmentos de 5S foram marcados com Digoxigenina-11-dUTP (DIG Nick translation mix, Roche) e detectados com Anti-DIG-Rhodamina (Roche). As lâminas foram contracoradas com solução de Iodeto de propídeo 2,5 µg/ml ou DAPI (4-6-diamino-2-fenilindole) 2µg/ml, e montadas com VectaShield (Vector Labs.). As células selecionadas foram fotografadas utilizando microscópio BX51 (Olympus), equipado com sistema de captura digital de imagem com câmera Evolution MT CCD e software Image ProPlus v6 (Media Cybernetics, Inc.).

Resultados

Os números cromossômicos observados nas 29 espécies (47 populações) estudadas de quatro gêneros variaram de $2n = 22$ a $2n = \sim 216$, observando com maior frequência (>50%) de $2n = 24$ (Tabela 1, Fig. 1-3).

Todas as espécies estudadas de *Serjania* e *Houssayanthus* foram diplóides, mas no gênero *Paullinia* e *Urvillea* foram observadas espécies $2x$, $4x$ e $8x$. Excepcionalmente *P. cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke apresentou $18x$, com aproximadamente $2n = 216$. Nas espécies *P. carpopoda* Cambess., *P. rubiginosa* Cambess. e *U. ulmacea* Kunth foram observados citótipos, indicando variações interespecíficas no nível de ploidia. O citótipo octoplóide ($2n = 96$) de *P. carpopoda* está geograficamente localizado entre os citótipos tetraplóides ($2n = 48$) ao longo da Mata Atlântica (ver Tabela 1 e Fig. 5). Em *P. rubiginosa*, o citótipo octoplóide ($2n = 96$) ocorre no estado da Bahia, ao norte do citótipo tetraplóide ($2n = 48$) do estado de Rio de Janeiro. E em *U. ulmacea*, o citótipo tetraplóide encontra-se no norte do Paraná e o citótipo diplóide no estado da Bahia.

Localização de sítios de DNAr 18-5,8-26S e 5S

Utilizando como sonda pTa71 foram localizados em *P. coriacea* Casar., *P. cristata* Radlk., *P. racemosa* Wawra e *P. trigonia* Vell. dois pares de cromossomos portadores de loci de DNAr 18-5,8-26S e três pares em *P. elegans* Cambess. (Fig. 4A-C e E-F). Estas NORs foram localizadas na região terminal dos braços curtos de cromossomos acrocêntricos de tamanho médio e pequeno. Frequentemente estes sítios apresentaram heteromorfismo quanto ao tamanho do sinal de hibridação. Os genes de DNAr 5S foram identificados em *P. elegans* (Fig. 4D), localizados na região centromérica de um par de cromossomos metacêntricos, não sintênicos com o DNAr 18-5,8-26S.

No gênero *Serjania* foi possível identificar 4 pares de loci de DNAr 18-5,8-26S em *S. caracasana* (Jacq.) Willd., sendo um dos pares localizado na região terminal do primeiro par cromossômico metacêntrico; os três pares restantes ocorrem na região terminal de cromossomos acrocêntricos de tamanho médio e pequeno (Fig. 4G).

Em relação às espécies estudadas de *Urvillea*, em *U. glabra* Cambess. ($2n = 22$) foi possível observar 2 pares de sítios DNAr 18-5,8-26S nas regiões terminais dos braços curtos (Fig. 4H), enquanto que os genes de DNAr 5S foram localizados na região centromérica de cromossomos centroméricos pequenos (Fig. 4I). Os tetraplóides diferenciam-se no número de sítios de DNAr 18-5,8-26S. *Urvillea rufescens* Cambess. ($2n = 44$) apresenta 3 pares de loci DNAr 18-5,8-26S (Fig. 4J) e o citótipo tetraplóide de *U. ulmacea* ($2n = 44$) apresenta 6 pares de DNAr 18-5,8-26S (Fig. 4M); em ambas espécies os sinais foram observados na região terminal do braço curto de cromossomos de tamanho médio e pequeno.

No citótipo diplóide de *U. ulmacea* ($2n = 22$) foi possível localizar três sinais relativos aos genes DNAr 18-5,8-26S e dois ao 5S, sendo estes não-sintênicos (Fig. 4K-L). Os loci de DNAr 18-5,8-26S apresentaram heteromorfia, sendo verificados três sinais de hibridação nos braços curtos de cromossomos metafásicos e quatro sinais no núcleo interfásico. Os loci de DNAr 5S foram localizados em regiões pericentroméricas de um par de cromossomos metacêntricos.

Discussão

Os números cromossômicos e a sistemática de Paullinieae

Neste trabalho foram determinadas 20 novas contagens de números cromossômicos para 18 espécies de Paullinieae, das quais 11 foram de *Paullinia*, 4 de *Serjania* e 5 de *Urvillea*. As contagens foram inéditas para *P. bicorniculata* Somner ($2n = 8x = 96$), *P. carpopoda* ($2n = 4x = 48$ e $2n = 8x = 96$), *P. cristata* ($2n = 24$), *P. cupana* var. *sorbilis* ($2n = 18x = \sim 216$), *P. rubiginosa* ($2n = 4x = 48$ e $2n = 8x = 96$), *P. seminuda* Radlk. ($2n = 4x = 48$), *P. thalictrifolia* Juss. ($2n = 24$) e *P. trigonia* ($2n = 24$), *Paullinia* sp. ($2n = 4x = 48$), *S. chaetocarpa* Radlk. ($2n = 24$), *S. rubicaulis* Benth. ex Radlk. ($2n = 24$), *S. sufferruginea* Radlk. ($2n = 24$), *S. tristis* Radlk. ($2n = 24$), *U. andersonii* Ferrucci ($2n = 48$), *U. glabra* ($2n = 22$), *U. rufescens* ($2n = 4x = 44$), *U. triphylla* (Vell.) Radlk. ($2n = 22$) e *U. ulmacea* ($2n = 4x = 44$). O número cromossômico foi confirmado nas espécies restantes de *Houssayanthus*, *Paullinia* e *Urvillea* (Tabela 1, Fig. 1-3)

Os estudos cariológicos em Sapindaceae foram feitos principalmente na tribo Paullinieae, considerando aspectos variados como núcleo em interfase e padrão de

condensação profásica (Eichhorn & Franquet 1936; Guervin 1961; Hemmer & Morawetz 1990), número cromossômico (Ferrucci 2000a; Ferrucci & Solís Neffa 1997), cariótipos (Ferrucci 1989; Lombello & Forni-Martins 1998; Nogueira *et al.* 1995; Solís Neffa & Ferrucci 1998) e padrões de bandas C e CMA/DAPI (Hemmer & Morawetz 1990; Urdampilleta *et al.* 2006, 2007). Estes estudos relataram o número cromossômico de aproximadamente 170 espécies pertencentes a 42 gêneros, representando aproximadamente 10% das espécies da família Sapindaceae.

A redução no número básico é uma característica derivada na tribo Paullinieae em relação às outras tribos de Sapindaceae, sendo $x = 12$ o número básico mais freqüente e altamente conservado em *Houssayanthus*, *Paullinia* e *Serjania* (Ferrucci 2000a). A redução do número básico é destacada nas espécies *Cardiospermum* e *Urvillea*, onde os números básicos observados são $x = 7, 9, 10, 11$ e 12 (Ferrucci 2000; Urdampilleta *et al.* em preparação, ver capítulo 5). A redução no número básico é correlacionada com caracteres morfológicos, como hábito trepador, presença de gavinhas, flores zigomorfas e disco nectarífero fragmentado em 4 ou 2 lóbulos, sugerindo Paullinieae com maior número de caracteres derivados dentre as tribos de Sapindaceae.

Serjania é o gênero com maior riqueza de espécies em Sapindaceae, com aproximadamente 230 espécies, sendo conhecido o número cromossômico para 42 (ca. 20%). O gênero *Houssayanthus* possui só três espécies, conhecendo-se os números cromossômicos de duas delas (*H. incanus* (Radlk.) Ferrucci e *H. monogynus* (Schltdl.) Ferrucci). Nestes gêneros é destacada a conservação no número cromossômico, pois todas as espécies estudadas apresentam $2n = 24$ (Fernández Casas & Fernández Piqueras 1981; Ferrucci 1981, 1985, 2000a; Ferrucci & Solís Neffa 1997; Guervin 1961; Hemmer & Morawetz 1990; Maglio *et al.*

1984; Nogueira *et al.* 1995; Sarkar *et al.* 1982; Solís Neffa & Ferrucci 1998; Urdampilleta 2005).

Paullinia apresenta aproximadamente 195 espécies e só são conhecidos os números cromossômicos de 16 espécies (Ferrucci 1981; Ferrucci & Solís Neffa 1997; Guerra 1986; Mangenot & Mangenot 1958; Semple 1974; Solís Neffa & Ferrucci 1997, 1998; Urdampilleta *et al.* 2007). Em *Paullinia* o número básico $x = 12$ parece ser conservado, mas os eventos de poliploidia, aqui descritos pela primeira vez, caracterizam três das seis seções estudadas do gênero.

Urvillea compreende 17 espécies, sendo conhecidos os números cromossômicos para dez delas (Ferrucci 1997a, 1997b, 2000a; Ferrucci & Solís Neffa 1997; Lombello & Forni-Martins 1998; Nogueira *et al.* 1995; Urdampilleta *et al.* 2006). A variação observada no número básico, $x = 11$ e 12 , sustenta a classificação do gênero em duas seções: seção *Urvillea*, com $x = 11$ e seção *Stenelytron*, com $x = 12$. Os dados demonstram que, tanto a aneuploidia/displóidia como a poliploidia tiveram um papel importante na evolução deste grupo.

A poliploidia em Sapindaceae

A poliploidia é uns dos principais mecanismos de evolução cariotípica em angiospermas (Wendel 2000), promovendo uma rápida reestruturação genômica que favorece a diploidização das novas espécies (Eckardt 2001; Feldman *et al.* 1997; Leitch & Bennett 2004; Soltis & Soltis 1995). A poliploidia é pouco freqüente em Sapindaceae e foi previamente citada para poucos gêneros, como *Acer* L., *Allophylus* L. (*Thouinieae*), *Melicoccus* P. Browne (*Melicocceae*) e *Urvillea*. Na análise filogenética utilizando sequências

de DNA, Grimm *et al.* (2006) reconheceram vários poliplóides em *Acer*, entre os quais se encontram tetra, hexa e octaplóides. As espécies diplóides em *Allophylus* apresentam $2n = 2x = 28$, enquanto que *A. guaraniticus* (A.St.-Hil.) Radlk. possui $2n = 4x = 56$ (Ferrucci & Solís Neffa 1997). Similarmente em *Melicoccus*, *M. bijugatus* Jacq., espécie diplóide tem $2n = 2x = 32$ (Simmonds 1954) e *M. lepidopetalus* Radlk. contem $2n = 6x = 96$ (Ferrucci & Solís Neffa 1997). Em *Urvillea*, *U. uniloba* Radlk (Ferrucci 1981) e *U. ulmacea* (Urdampilleta *et al.* 2006) foram tratadas como tetraplóides e octaplóides, respectivamente.

O único registro de poliploidia no gênero *Paullinia* foi previamente citado para uma espécie economicamente importante, *P. cupana* var. *sorbilis*, o “guaraná” (Medri *et al.* 1980). Medri *et al.* (1980) compararam caracteres anatômicos de plantas supostamente diplóides e com poliplóides obtidas artificialmente, e cultivadas em centros de pesquisa na Amazônia (Embrapa). O nível de poliploidia não foi confirmado pela contagem cromossômica, sendo sugerido que os indivíduos diplóides possuem $2n = 14$ (Medri *et al.* 1980). Este número cromossômico é duvidoso para espécies de *Paullinia*, já que foi observado em Sapindaceae, unicamente numa espécie de *Cardiospermum*, *C. integerrimum* Radlk., endêmica da Bahia (Ferrucci 1989). Posteriormente, a poliploidia do guaraná foi confirmada por Freitas *et al.* (2007) com material proveniente de bancos de germoplasma de cultivos da Amazônia (Embrapa), descrevendo o cariótipo com $2n = 210$ cromossomos, dados que foram sustentados com a estimativa do tamanho do genoma. Considerando-se que o número básico em *Paullinia* seja $x = 12$, o cariótipo do guaraná teria evoluído por poliploidia e disploidia. A partir dos resultados aqui obtidos, estudando o material do mesmo táxon *P. cupana* var. *sorbilis*, cultivado no estado de São Paulo, sugere-se que a espécie apresenta $2n = 18x = \sim 216$. Nota-se que os resultados são semelhantes aos de Freitas *et al.* (2007), porém aproximando-se mais de um múltiplo do $x = 12$. A variação aqui observada decorre das dificuldades técnicas em

individualizar todos os cromossomos na célula somática e em função do alto número de cromossomos. Assim, o número cromossômico do guaraná continua sendo incerto.

A poliploidia estende-se no gênero *Paullinia* a outras cinco espécies ocorrentes na Mata Atlântica, nos estados de Paraná, São Paulo e Bahia, *P. bicorniculata*, *P. carpopoda*, *P. rubiginosa* e *P. seminuda* e *Paullinia sp.* As seções *Diphtherotoechus* Radlk. (*P. rubiginosa* e *P. seminuda*), *Pachytoechus* Radlk. (*P. bicorniculata*, *P. carpopoda* e *Paullinia sp.*) e *Pleurotoechus* Radlk. (*P. cupana* var. *sorbilis*) encontram-se relacionadas pela ocorrência de poliploidia. A ocorrência de poliploidia neste grupo diferencia claramente as seções *Caloptilon* Radlk., *Paullinia* e *Phygoptilon* Radlk., nas quais foi detectado unicamente espécies diplóides, $2n = 24$ (Ferrucci 1981, Ferrucci & Solís Neffa 1997; Guerra 1986; Mangenot & Mangenot 1958; Semple 1974; Urdampilleta *et al.* 2007). Com relação à poliploidia e à classificação infragenérica de *Paullinia*, as seções com espécies poliplóides apresentam em comum os seguintes caracteres: cápsulas ápteras, inermes, com mesocarpo parenquimático com escassa vascularização; quando a cápsula é seca, ela é crustácea, com corpo lenhoso simples, enquanto que as seções diplóides não apresentam um padrão morfológico que permita agrupá-las.

Além da variação no nível de ploidia descrita, o número básico $x = 12$ é conservado em *Houssayanthus*, *Paullinia* e *Serjania*. Todas as espécies estudadas de *Houssayanthus* e *Serjania* apresentam $2n = 24$ (Ferrucci 2000a; Solís Neffa & Ferrucci 1997). Entretanto, no gênero *Urvillea* observamos a presença de dois números básicos, $x = 11$ e 12 . Particularmente, esta variação no número básico sustenta a classificação do gênero em duas seções. As espécies da seção *Urvillea* apresentam $x = 11$, enquanto que as espécies da seção *Stenelytron* Radlk. possuem $x = 12$. A poliploidia é difundida em ambas as seções. Na seção *Urvillea* observamos as espécies diplóides *U. chacoensis* Hunz., *U. filipes* Radlk., *U. glabra*, *U. peruviana* Ferrucci

e *U. triphylla* com $2n = 22$, as espécies tetraplóides *U. rufescens* e *U. uniloba* com $2n = 44$, além de *U. ulmacea* que apresenta três citótipos, diplóide, triplóide e octaplóide (Ferrucci 1981, 1997b; Urdampilleta *et al.* 2006). *Urvillea rufescens*, *U. ulmacea* e *U. uniloba* são espécies afins, e poderiam ser parte de um complexo de espécies poliplóides, onde a poliploidia e hibridação seriam eventos recorrentes que levaram a um aumento da variabilidade genética e morfológica (Stebbins 1985). Os resultados indicam que a poliploidia está presente também na seção *Stenelytron*, tendo sido observada em *U. andersonii* ($2n = 4x = 48$). Junto com os resultados obtidos para *U. laevis* Radlk., com $2n = 2x = 24$ (Ferrucci 1997a) verificamos que o número básico $x = 12$ é característico desta seção.

Existe uma associação fitogeográfica nas espécies ou populações poliplóides de *Urvillea* e *Paullinia*, já que sua distribuição é principalmente na Mata Atlântica (Fig. 5). A citogeografia em poliplóides é frequentemente associada com gradientes geográficos ou ecológicos (Nakagawa 2006; Schlaepfer *et al.* 2008; Solís Neffa & Fernández 2001). Entretanto, os poliplóides em Paullinieae não parecem seguir um gradiente geográfico claramente definido. Por exemplo, em *P. carpopoda*, o citótipo $2n = 8x = 96$ localiza-se numa região geograficamente intermediária (litoral sul de São Paulo), em meio dos citótipos $2n = 4x = 48$ (litoral norte de São Paulo e do norte do Paraná).

As espécies *U. ulmacea* e *P. carpopoda* são poliplóides que apresentam uma ampla distribuição. *Urvillea ulmacea* é distribuída do estado de Texas (EUA) até o norte da Argentina, e *Paullinia carpopoda* ocorre no Brasil, estendendo-se desde Santa Catarina até a Bahia. As duas espécies, *P. carpopoda* e *U. ulmacea*, apresentam variantes morfológicas que motivaram a descrição de diversas formas (Barkley 1956; Radlkofer 1931-1934), mas a natureza gradual da variação dos caracteres morfológicos utilizados não permitiu estabelecer entidades taxonômicas formais. Possivelmente esta variação morfológica esteja relacionada

com a ocorrência de complexos poliplóides. A análise de um número maior de populações, maximizando o número possível de citótipos e de variáveis geográficas e ecológicas, poderia levar a estudos ecológicos que relacionem os diferentes níveis de ploidia com as condições ambientais responsáveis pela distribuição destas espécies.

Distribuição dos genes ribossomais DNAr 18-5,8-26S e 5S em Paullinieae

Os resultados apresentados sobre a distribuição de DNAr 5S e 18-5,8-26S complementam os obtidos previamente para o gênero *Paullinia* (Urdampilleta *et al.* 2007). O número de sítios e a localização de DNAr 18-5,8-26S parece ser uma característica relativamente conservada na seção *Phygoptilon*, onde foi possível observar dois pares de sinais nas espécies *P. coriacea*, *P. cristata*, *P. racemosa* e *P. trigonia*. Entretanto, segundo Urdampilleta *et al.* (2007), *P. rhomboidea*, espécie da mesma seção *Phygoptilon*, apresentou unicamente um par de sítios de DNAr 18-5,8-26S (3 pares), destacando esta redução de número de loci como parte da natureza notavelmente dinâmica destes sítios de DNA repetitivo, observada em taxa de plantas (Datson & Murray 2006; Weiss-Schneeweiss *et al.* 2008). Assim, as espécies *P. elegans* e *P. pinnata* L. que pertencem à mesma seção *Paullinia*, apresentam cariótipos semelhantes e o mesmo número de loci de DNAr 18-5,8-26S, mas a posição deles é diferente, em *P. pinnata* um dos loci ocorre na região terminal do primeiro par cromossômico metacêntrico (Urdampilleta *et al.* 2007).

No gênero *Serjania* existe uma variação no número de loci de DNAr, evidenciados pelo bandamento NOR (Hemmer & Morawetz 1990). Hemmer & Morawetz (1990) detectaram três pares de NOR em *S. subdentata* Juss. ex Poir. e *S. diversifolia* (Jacq.) Radlk., mas Nogueira *et al.* (1995) em seis espécies analisadas, observaram variação, entre um a três

pares. Essa variação também foi observada com a técnica de FISH utilizando a sonda de DNAr 18-5,8-26S. Urdampilleta *et al.* (2005) analisaram 14 espécies de *Serjania*, observando uma variação no número de loci que vai de 1 a 4 pares (Urdampilleta 2005). No presente estudo, *S. caracasana* apresentou 4 pares de sítios DNAr 18-5,8-26S, sendo um par de NOR localizado no primeiro par metacêntrico. A presença do primeiro par cromossômico portador de NOR não é uma característica frequente em Paullinaieae, sendo uma particularidade compartilhada, dentro de *Serjania*, unicamente com *S. laruotteana* Cambess. (Urdampilleta 2005). As duas espécies foram classificadas por Radlkofer (1931-1934) dentro da seção *Eucoccus* Radlk., mas Acevedo-Rodríguez (1993b) propôs a inclusão de *S. laruotteana* na seção *Platyococcus* Radlk., junto com espécies como *S. communis* Cambess. e *S. regnellii* Schltldl. que não compartilham estes caracteres cromossômicos.

Contando com as espécies estudadas neste trabalho, das 17 espécies de *Urvillea*, seis espécies foram estudadas em relação à distribuição de DNAr (Urdampilleta *et al.* 2006). As espécies diplóides apresentam de 2 a 3 pares de cromossomos portadores de NOR. Os citótipos de *U. ulmacea* não apresentaram um aumento linear dos sítios NOR com o nível de ploidia. O citótipo diplóide analisado apresenta 2 pares de sítios, enquanto que o tetraplóide 6 pares de sítios e o octaplóide 12 pares (Urdampilleta *et al.* 2006). Existem diferentes explicações possíveis para esta situação. A primeira hipótese estaria baseada em que o citótipo diplóide apresenta uma ampla distribuição, com polimorfismos em relação ao número de loci de DNAr 18-5,8-26S e que as espécies poliplóides seriam originadas a partir de diplóides com 3 pares de sítios NOR. Possíveis polimorfismos intraespecíficos poderiam ocorrer com base na natureza dinâmica do DNAr, como vem sendo documentado em algumas espécies (Jiang & Gill 1994; Raskina *et al.* 2008). Uma segunda hipótese seria fundamentada em possíveis eventos de hibridação entre espécies com diferentes números de NOR, originando as

populações tetraplóides por aloploidia. E, uma terceira hipótese, onde a autopoliploidia, acompanhada de uma re-estruturação genômica, levaria a um aumento no número de NOR. A reorganização genômica nos poliplóides é um processo que vem sendo reconhecido como de grande importância nas últimas décadas, existindo importantes exemplos de eliminação ou reorganização de sequências de DNA repetitivo que poderiam favorecer a diploidização dos poliplóides (Eckardt 2001; Feldman *et al.* 1997). Esta perda de loci de DNAr foi acentuada em *U. rufescens*.

A localização e número do DNAr 5S foi relativamente conservada; as espécies estudadas apresentaram um loci de DNAr 5S não-sintênico com DNAr 18-5,8-26S. A não-sintenia dos genes ribossomais é uma característica frequente na tribo e comum a muitos vegetais (Cai *et al.* 2006; De Melo & Guerra 2003; Raina & Mukai 1999; Zoldos *et al.* 1999). Entretanto, existem espécies no gênero *Cardiospermum* (seção *Carphospermum* Radlk.) onde os DNAr ocorrem em sintenia (Urdampilleta *et al.* em preparação, ver capítulo 5). Assim como em muitas outras angiospermas (Schubert 2007; Weiss-Schneeweiss *et al.* 2008), em Paullinieae, os genes de DNAr são poderosos marcadores citogenéticos em estudos de evolução cariotípica.

Tabela 1. Detalhe das espécies e gêneros estudadas da tribo Paullinieae, número cromossômico (2n) e localidade de coleta do material.

Espécie	2n	Localidade
<i>Houssayanthus</i> Hunz.		
<i>H. incanus</i> (Radlk.) Ferrucci	24 (Ferrucci 1981)	Argentina, Chaco, 1° de Mayo, Ferrucci <i>et al.</i> 2710 (CTES)
<i>Paullinia</i> L.		
<i>Sect. Diphtherotoechus</i>		
<i>P. rubiginosa</i> Cambess.	96*	Brasil, BA, Jequié, Urdampilleta <i>et al.</i> 303 (UEC)
	48*	Brasil, RJ, Parati, Urdampilleta <i>et al.</i> 297 (UEC)
<i>P. seminuda</i> Radlk.	48*	Brasil, SP, Ubatuba, Sertão de Ubatumirin, Urdampilleta <i>et al.</i> 347 (UEC); Brasil, SP, Ubatuba, Casanga, Obando <i>et al.</i> 331 (UEC)
<i>Sect. Paullinia</i>		
<i>P. elegans</i> Cambess.	24 (Solis Neffa & Ferrucci 1998)	Brasil, SP, Campinas, Guará, Obando <i>et al.</i> 289 (UEC)
<i>Sect. Pachytoechus</i>		
<i>P. bicorniculata</i> Somner	96*	Brasil, RJ, Parati, São Gonçalo, Obando <i>et al.</i> 313 (UEC)
<i>P. carpopoda</i> Cambess.	96*	Brasil, SP, Iguape, Obando <i>et al.</i> 297 (UEC)
	48*	Brasil, PR, Guaraqueçaba, Obando <i>et al.</i> 303 (UEC); SP, Ubatuba, Sertão de Ubatumirin, Urdampilleta <i>et al.</i> 346 (UEC); SP, Ubatuba, Casanga, Urdampilleta <i>et al.</i> 351 (UEC)
<i>Paullinia</i> sp.	48*	Brasil, SP, Ubatuba, Urdampilleta <i>et al.</i> 432 (UEC)
<i>Sect. Phygoptilon</i>		
<i>P. coriacea</i> Casar.	24 (Ferrucci 2000)	Brasil, SP, Ubatuba, Picinguaba, Obando <i>et al.</i> 293 (UEC).
<i>P. cristata</i> Radlk.	24*	Brasil, PR, Guaraqueçaba, Obando <i>et al.</i> 300 (UEC)
<i>P. racemosa</i> Wawra	24 (Solis Neffa & Ferrucci 2001)	Brasil, RJ, Rio de Janeiro, Grumari, Costa <i>et al.</i> 593 (UEC); Brasil, BA, Porto Seguro, Urdampilleta <i>et al.</i> 320 (UEC)
<i>P. thalictrifolia</i> Juss.	24*	Brasil, ES, Santa Teresa, Urdampilleta <i>et al.</i> 372 (UEC)
<i>P. trigonia</i> Vell.	24*	Brasil, SP, Ubatuba, Picinguaba, Obando <i>et al.</i> 292 (UEC); SP, Icapará, Iguape, Obando <i>et al.</i> 298 (UEC); PR, Martinhos, Obando <i>et al.</i> 304 (UEC); BA, Ilheus, Urdampilleta <i>et al.</i> 314 (UEC); BA, Una, Urdampilleta <i>et al.</i> 319 (UEC); SP, Itanhaém, Obando <i>et al.</i> 333 (UEC)

Sect. Pleurotoechus

<i>P. cupana</i> Kunth var. <i>sorbilis</i> (Mart.) Ducke	~216*	Brasil, SP, Piracicaba, ESALQ, Urdampilleta <i>et al.</i> 281 (UEC)
--	-------	---

***Serjania* Will.**

<i>S. caracasana</i> (Jacq.) Willd.	24 (Ferrucci 1981)	Brasil, PR, Londrina, Paiquerê, Urdampilleta <i>et al.</i> 258 (FUEL); RJ, Parati, Urdampilleta <i>et al.</i> 296 (UEC); BA, Barra, Urdampilleta <i>et al.</i> 327 (UEC)
<i>S. chaetocarpa</i> Radlk.	24*	Bolivia, Santa Cruz, Velasco, Ferrucci <i>et al.</i> 2517 (CTES)
<i>S. communis</i> Cambess.	24 (Nogueira 1985)	Brasil, PR, Imbau, Urdampilleta <i>et al.</i> 266 (FUEL)
<i>S. erecta</i> Radlk.	24 (Ferrucci 1985)	Brasil, DF, Brasília, Costa <i>et al.</i> 574 (UEC)
<i>S. fuscifolia</i> Radlk.	24 (Nogueira 1985)	Bolivia, Santa Cruz, Robere, Ferrucci <i>et al.</i> 2614 (CTES). Brasil, BA, Rio de Contas, Urdampilleta <i>et al.</i> 399 (UEC)
<i>S. lethalis</i> A. St.-Hil.	24 (Ferrucci 2000)	Brasil, SP, Aguas de Lindoia, Urdampilleta <i>et al.</i> 241 (FUEL); São Carlos, Urdampilleta <i>et al.</i> 355 (UEC)
<i>S. meridionalis</i> Cambess.	24 (Ferrucci 2000)	Brasil, SP, Campinas, Urdampilleta <i>et al.</i> 280 (UEC)
<i>S. rubicaulis</i> Benth. ex Radlk.	24*	Bolivia, Santa Cruz, Buena Vista, Ferrucci <i>et al.</i> 2331 (CTES)
<i>S. sufferruginea</i> Radlk.	24*	Bolivia, Tarija. Prov. O'Connor, Ferrucci <i>et al.</i> 1739 (CTES).
<i>S. tripleuria</i> Ferrucci	24 (Ferrucci 1985)	Brasil, SP, Mogi Guaçu, Urdampilleta <i>et al.</i> 275 (UEC)
<i>S. tristis</i> Radlk.	24*	Brasil, PR, Londrina, Urdampilleta <i>et al.</i> 282 (UEC)

Urvillea* KunthSect. Urvillea*

<i>U. glabra</i> Cambess.	22*	Brasil, RJ, Parati, Urdampilleta <i>et al.</i> 293 (UEC)
<i>U. rufescens</i> Cambess.	44*	Brasil, RJ, Parati, Urdampilleta <i>et al.</i> 291 (UEC)
<i>U. triphylla</i> (Vell.) Radlk.	22*	Brasil, SP, Ubatuba, Urdampilleta <i>et al.</i> 349 (UEC)
<i>U. ulmacea</i> Kunth	22 (Ferrucci 2000)	Brasil, BA, Morro do Chapéu, Urdampilleta <i>et al.</i> 340 (UEC)
	44*	Brasil, PR, Jaguariaiva, Obando <i>et al.</i> 309 (UEC)
<i>Sect. Stenelytron</i>		
<i>U. andersonii</i> Ferrucci	48*	Brasil, BA, Brumado, Urdampilleta <i>et al.</i> 345 (UEC)

(*) Novas contagens cromossômicas.

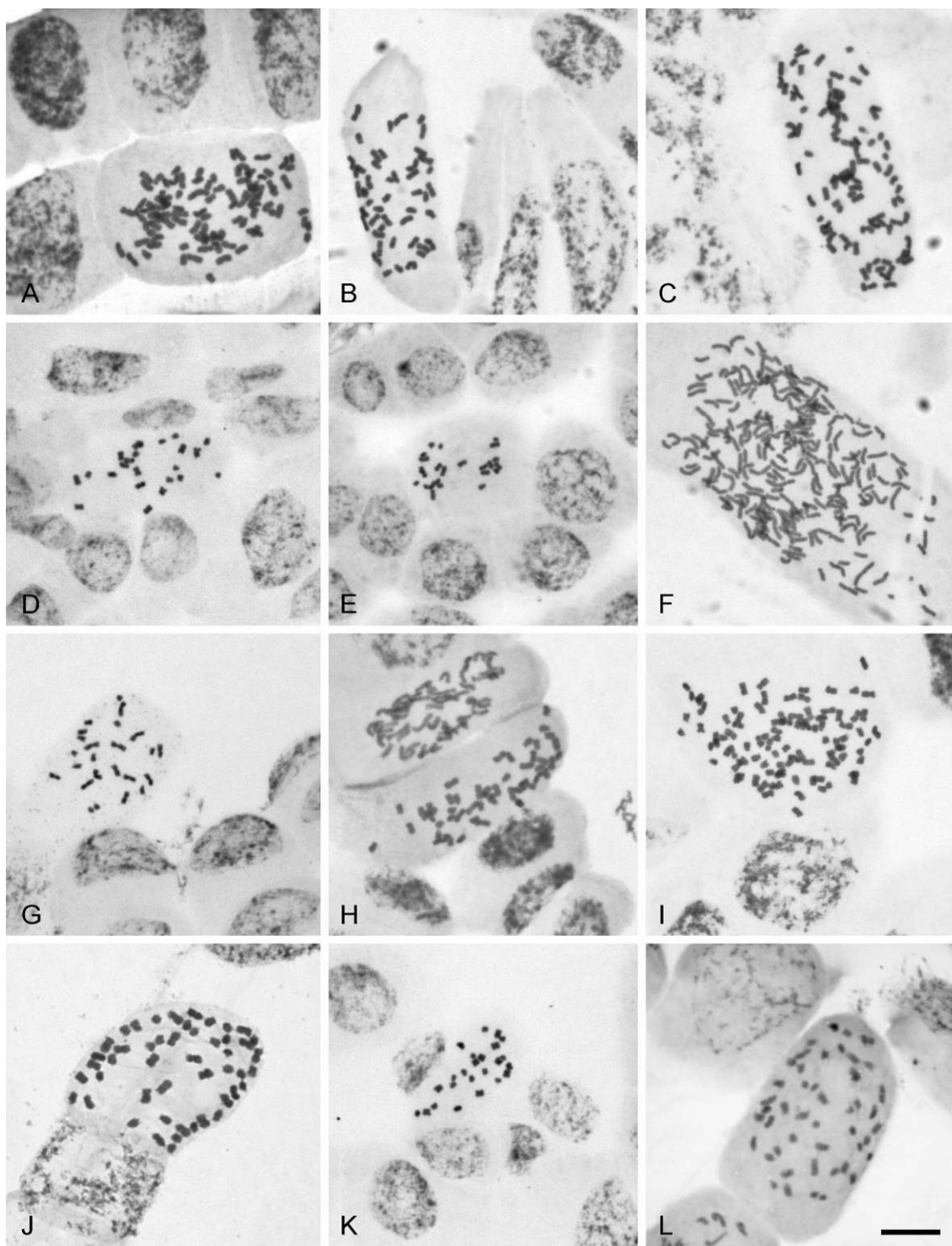


Figura 1. Cromossomos mitóticos em espécies do gênero *Paullinia* corados com Giemsa. A, *P. bicorniculata*, $2n = 96$; B, *P. carpopoda*, $2n = 48$; C, *P. carpopoda*, $2n = 96$; D, *P. coriacea*, $2n = 24$; E, *P. cristata*, $2n = 24$; F, *P. cupana* var. *sorbilis*, $2n = \sim 216$; G, *P. racemosa*, $2n = 24$; H, *P. rubiginosa*, $2n = 48$; I, *P. rubiginosa*, $2n = 96$; J, *P. seminuda*, $2n = 24$; K, *P. trigonia*, $2n = 24$; L, *Paullinia* sp., $2n = 48$. Barra = 10 μm .

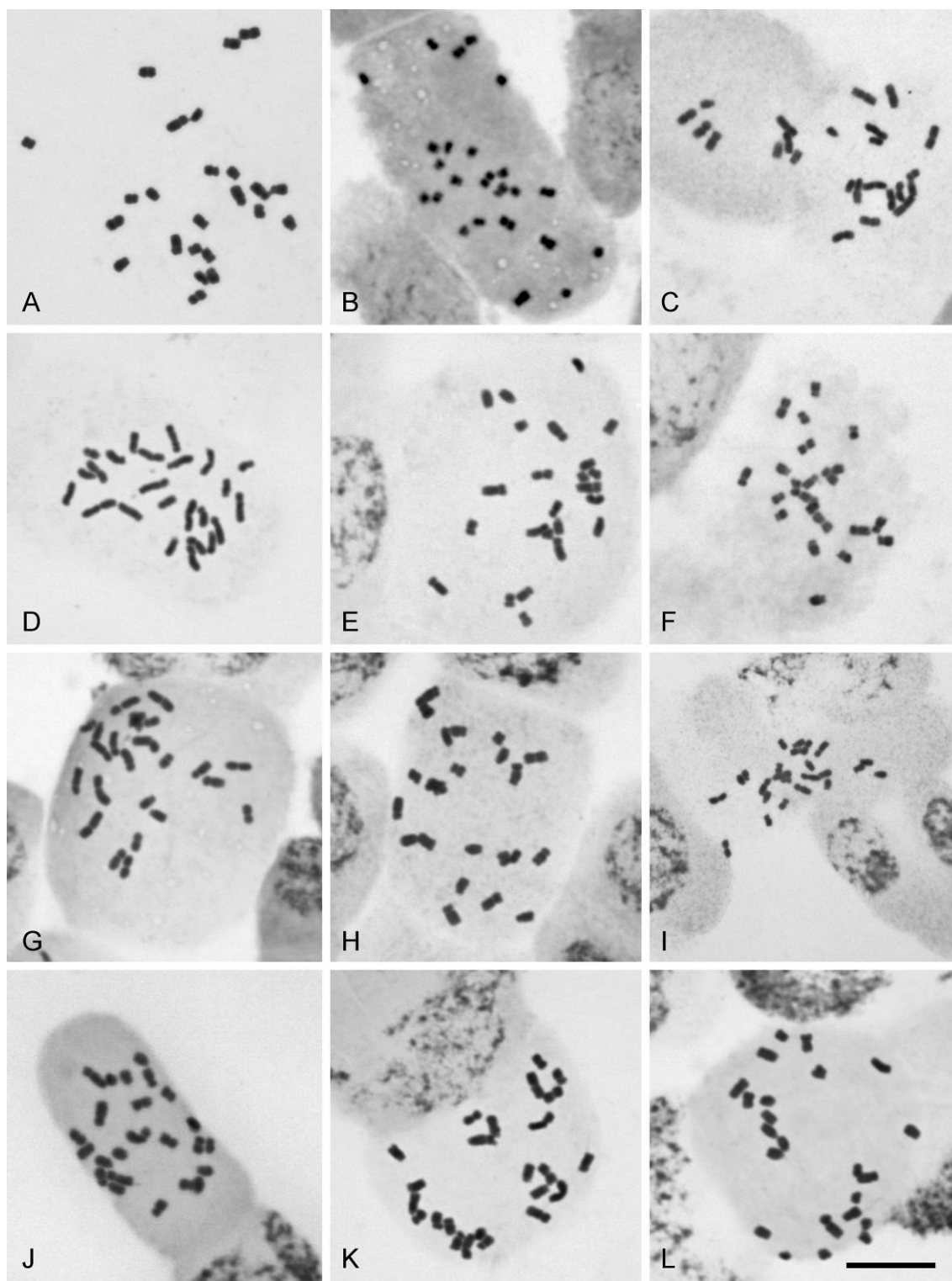


Figura 2. Cromossomos mitóticos em espécies de *Houssayanthus* e *Serjania* corados com Giemsa. (todas $2n = 24$). A, *H. incanus*; B, *S. caracasana*; C, *S. chaetocarpa*; D, *S. communis*; E, *S. erecta*; F, *S. fuscifolia*; G, *S. lethalis*; H, *S. meridionalis*; I, *S. rubicaulis*; J, *S. sufferruginea*; K, *S. tripleuria*; L, *S. tristis*. Barra = 10 μm

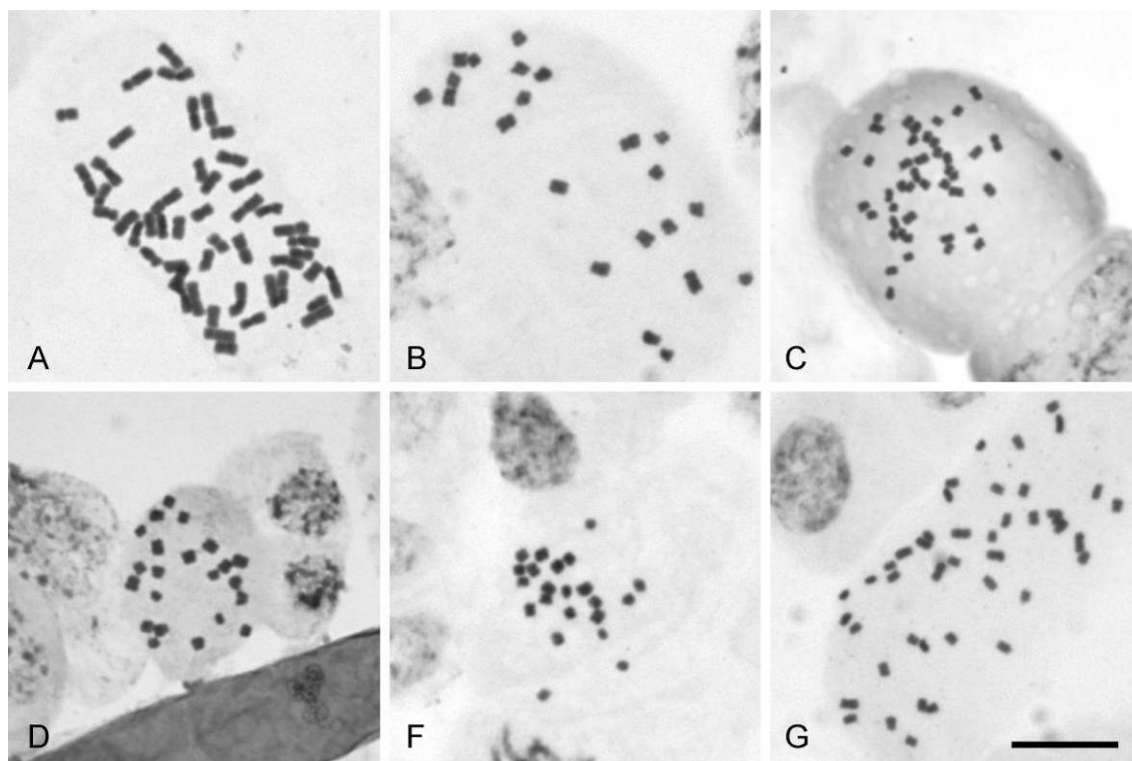


Figura 3. Cromossomos mitóticos em espécies do gênero *Urvillea* corados com Giemsa. A, *U. andersonii*, $2n = 48$; B, *U. glabra*, $2n = 22$; C, *U. rufescens*, $2n = 44$; D, *U. triphylla*, $2n = 22$; E, *U. ulmacea* 340, $2n = 22$; F, *U. ulmacea* 309, $2n = 44$. Barra = 10 μm

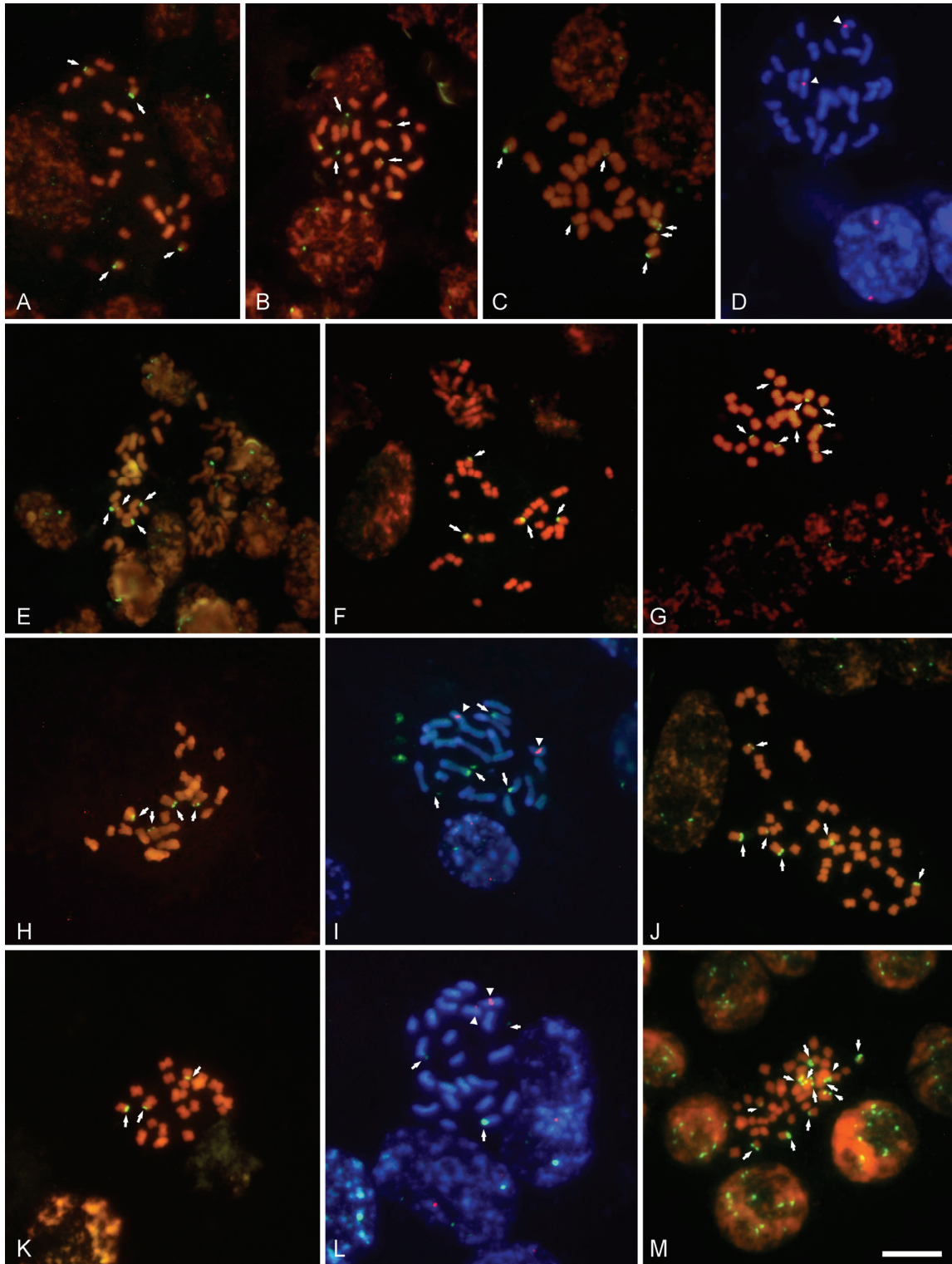


Figura 4. Localização de sítios de DNAr 18-5,8-26S (seta) e DNAr 5S (ponta de seta) em espécies de *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea* através da técnica de FISH. A, *P. coriacea*; B, *P. cristata*; C, *P. elegans*; D, *P. elegans*; E, *P. racemosa*; F, *P. trigonia*; G, *S. caracasana*; H, *U. glabra*; I, *U. glabra*; J, *U. rufescens*; K, *U. ulmacea* ($2n = 22$); L, *U. ulmacea* ($2n = 22$); M, *U. ulmacea* ($2n = 44$). Barra = 10 μ m.

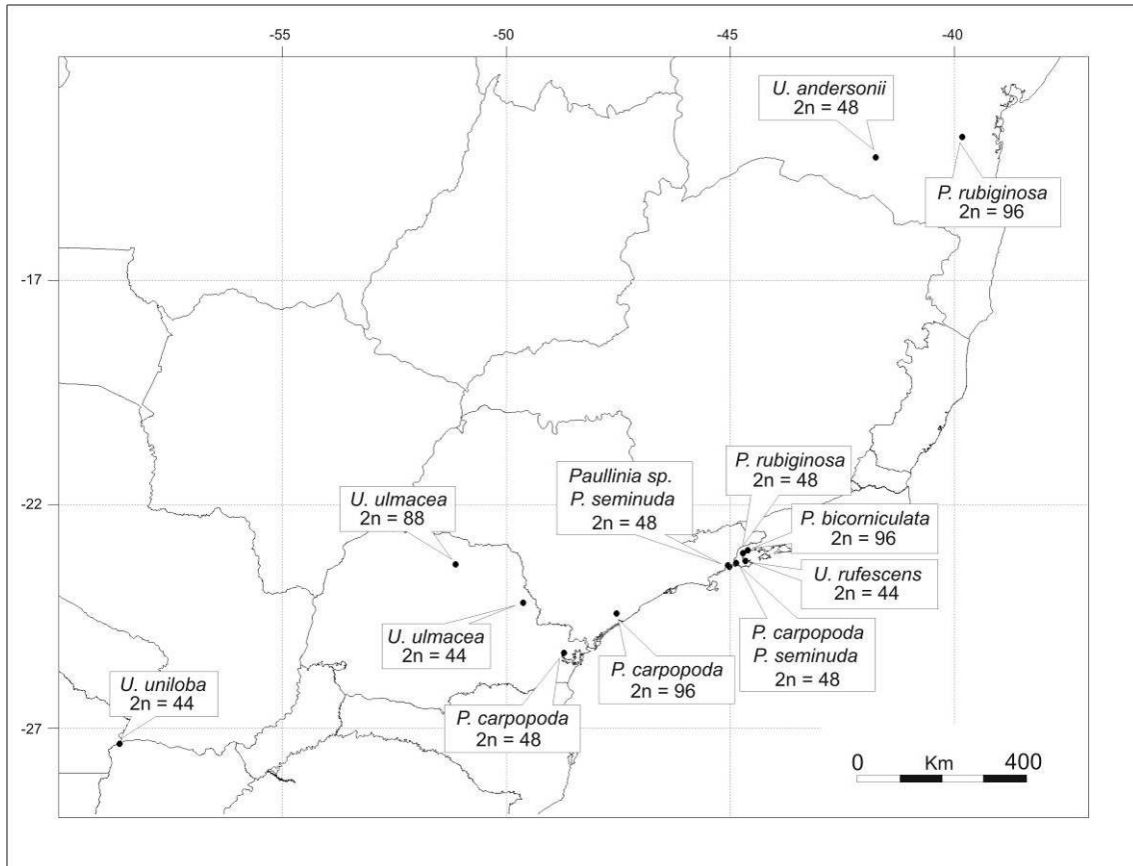


Figura 5. Mapa de distribuição das espécies poliplóides de *Paullinia* e *Urvillea*.

Capítulo 3.

Citotaxonomia de espécies sul-americanas de *Cardiospermum* L. (Paullinieae, Sapindaceae)

Citotaxonomia de espécies sul-americanas de *Cardiospermum* L. (Paullinieae, Sapindaceae)

Resumo

Das 16 espécies descritas para o gênero *Cardiospermum* L., foram estudadas as 12 espécies que ocorrem na América do Sul utilizando métodos de citogenética clássica, bandamentos cromossômicos CMA/DAPI e hibridização *in situ* fluorescente (mapeamento de DNAr 18-5,8-26S e 5S). O gênero apresenta uma grande diversidade cariotípica, produto de diferentes processos de evolução cromossômica, como a poliploidia, disploidia e rearranjos cromossômicos. A poliplidia foi descrita pela primeira vez no gênero, documentada no tetraplóide *C. bahianum* ($2n = 4x = 36$). A disploidia teve um papel fundamental na diferenciação cariotípica de *Cardiospermum*, produzindo os diferentes números básicos observados, $x = 7, 9, 10, 11$ e 12 , destacando o $x = 12$ como número básico inédito no gênero. Esta variação no número básico permitiu caracterizar algumas seções do gênero como *Carphospermum*. A redução no número cromossômico em *Cardiospermum* pode ser sugerida com base nas observações de *C. heringeri* e *C. integerrimum*, onde a disploidia estaria relacionada com a re-localização dos genes ribossômicos. Alternativamente, a análise do núcleo em interfase e o comportamento dos cromossomos na prófase definiram dois grupos principais no gênero, parcialmente associados com a classificação infragenérica proposta para o gênero. A localização e número dos loci de DNAr 18-5,8-26S e 5S foi variável, destacando a sintenia destes genes como característica própria da seção *Carphospermum*. A variação cariotípica observada foi resumida e discutida em relação à sistemática e evolução do gênero *Cardiospermum* e gêneros próximos da tribo Paullinieae.

Palavras-chave: bandamento cromossômico, *Cardiospermum*, citotaxonomia, disploidia, DNA ribossômico, hibridização *in-situ* fluorescente, poliploidia.

Introdução

O gênero *Cardiospermum* L. conta com 16 espécies de distribuição pantropical, sendo que todas ocorrem nas Américas (Ferrucci 2000b). Na América do Sul ocorrem 12 espécies, todas representadas no Brasil: *C. anomalum* Cambess., *C. bahianum* Ferrucci & Urdampilleta sp. nov. inéd., *C. corindum* L., *C. cristobalii* Ferrucci & Urdampilleta sp. nov. inéd., *C. grandiflorum* Sw., *C. halicacabum* L., *C. heringeri* Ferrucci, *C. integerrimum* Radlk., *C. oliveirae* Ferrucci, *C. procumbens* Radlk., *C. pterocarpum* Radlk. e *C. urvilleoides* (Radlk.) Ferrucci. *Cardiospermum grandiflorum*, *C. halicacabum* e *C. corindum* são cosmopolitas, enquanto que as nove espécies restantes possuem distribuição restrita. Dentre estas, *C. bahianum*, *C. cristobalii*, *C. integerrimum*, *C. heringeri*, *C. procumbens* e *C. urvilleoides* são endêmicas. As espécies cosmopolitas foram consideradas espécies invasoras na África, América do Norte e Oceania, produzindo danos nas lavouras de cultivos anuais, como a soja (Johnston *et al.* 1979).

Uma revisão taxonômica vem sendo desenvolvida por Ferrucci (2000b) e novas espécies brasileiras foram recentemente incluídas (Ferrucci & Urdampilleta em preparação). O gênero compreende três seções: *Cardiospermum*, *Carphospermum* e *Ceratadenia*. Os caracteres diagnósticos que permitem reconhecer as seções são a morfologia e o número de lobos nectaríferos florais e os caracteres das sementes. As relações filogenéticas nas espécies

de *Cardiospermum* com os gêneros próximos são pouco esclarecidas, existindo alguns problemas na delimitação com o gênero irmão *Urvillea*. Na análise filogenética da tribo Paullinieae, Acevedo-Rodríguez (1993b) diferenciou o clado *Cardiospermum-Urvillea* dos demais gêneros da tribo pela presença de caracteres derivados como: hábito herbáceo, número cromossômico reduzido, sarcotesta reduzida e frutos com pericarpo membranoso.

Cardiospermum apresenta a maior diversidade de números cromossômicos observada na tribo Paullinieae. Até o presente se conhecem os números cromossômicos de seis espécies de *Cardiospermum*, sendo descritos os cariótipos de quatro delas (Ferrucci 1989; Hemmer & Morawetz 1990). *Cardiospermum* apresenta quatro números básicos, $x = 7$, $x = 9$, $x = 10$ e $x = 11$ (Ferrucci 1989). Portanto, a aneuploidia / disploidia têm um papel importante na evolução cariotípica de *Cardiospermum*, tal como ocorre em *Urvillea* (Ferrucci 2000a). Trabalhos prévios de Hemmer & Morawetz (1990) e Nogueira *et al.* (1995) utilizaram a caracterização da heterocromatina e identificação de NOR para diferenciar gêneros e espécies na tribo Paullinieae. Hemmer & Morawetz (1990) estudaram os padrões de bandas C e CMA/DAPI de duas espécies de *Serjania* e duas de *Cardiospermum*, revelando importantes processos na evolução cariotípica de *Paullinieae*, como uma redução no número básico e o acúmulo de bandas ricas em bases AT.

Este trabalho objetiva caracterizar o cariótipo de espécies de *Cardiospermum* mediante técnicas convencionais e com marcadores cromossômicos, evidenciados pelo bandamento cromossômico CMA/DAPI e hibridização de DNA *in situ*. As informações obtidas foram comparadas com as disponíveis na literatura, objetivando uma melhor compreensão e avaliação da afinidade entre as espécies de *Cardiospermum* e com gêneros próximos, tentando uma melhor interpretação das relações filogenéticas a partir de uma visão citogenética.

Materiais e Métodos

As espécies de *Cardiospermum* estudadas neste trabalho e os dados de coleta são detalhados na Tabela 1. As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de meristemas radiculares pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína 2mM por 4-5 h a 15°C, fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v:v) durante 24 h à temperatura ambiente e conservadas a -20°C até sua utilização. Após a hidrólise com HCl 1N a 60°C durante 10 min, foi feita a coloração convencional utilizando a técnica HCl/Giemsa (Guerra 1983). Os idiogramas foram realizados a partir de medições cromossômicas de cinco metáfases completas e com similar condensação utilizando o *software* MicroMeasure v3.3 (Aaron Reeves, Jim Tear & Colorado State University). A morfologia dos cromossomos mitóticos foi considerada segundo a classificação de Levan *et al.* (1964). Posteriormente, os cariótipos foram comparados utilizando os parâmetros: comprimento cromossômico médio (ACL), comprimento cromossômico total do (TCL) genoma diplóide, relação entre o cromossomo maior e menor (RI), índice centromérico médio (ACI) e índices de assimetria A_1/A_2 (Romero Zarco 1986), TF% (Huziwara 1962) e CVci e CVcl (Paszko 2006).

As lâminas para o bandamento cromossômico fluorescente (CMA₃/DAPI) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foram confeccionadas utilizando raízes previamente digeridas com solução de celulase 4% e pectinase 40% a 37°C durante 2 h e montadas em ácido acético 45%. Em seguida, as lamínulas foram removidas após congelamento em nitrogênio líquido e as lâminas secas ao ar. Para o bandamento fluorescente (Schweizer 1976), as lâminas envelhecidas foram coradas com CMA₃ (Cromomicina A₃) 0,5 mg/ml e DAPI (4-6-diamino-2-fenilindole) 2µg/ml e montadas com uma solução 1:1 (v:v) de glicerol/McIlvaine *buffer* pH 7.0, contendo 2.5 mM MgCl₂.

Os protocolos de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foram desenvolvidos segundo a metodologia descrita por Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000). Para a identificação dos loci de DNAr 18S-5.8S-26S foi utilizado a sonda pTa71 (Gerlach & Bedbrook 1979), marcada com biotina-14-dUTP por *nick translation* (Bionick, Invitrogen) e, posteriormente, detectada com avidina-FITC (Sigma). Para a análise dos loci de DNAr 5S, a sonda foi obtida por amplificação por PCR utilizando os *primers* RTPCR5S1 e RTPCR5S2 (Mathieu *et al.* 2003), usando como molde o genoma de *Cardiospermum grandiflorum*. Os fragmentos de 5S foram marcados com Digoxigenina-11-dUTP (DIG Nick translation mix, Roche) e detectados com Anti-DIG-Rhodamina (Roche). As lâminas foram montadas com *antifade* VectaShield (Vector Laboratories) e as fotografias foram feitas utilizando microscópio BX51 (Olympus), equipado com sistema de captura digital de imagem Evolution MT CCD e software Image ProPlus v6 (Media Cybernetics, Inc.).

Resultados

As espécies aqui estudadas de *Cardiospermum* diferenciaram-se significativamente no número cromossômico, variando de $2n = 14$ a $2n = 36$ (Tabela 2). Os resultados indicaram uma importante diversidade de números básicos, observando-se $x = 7$ (*C. integerrimum*, $2n = 14$), $x = 9$ (*C. anomalum*, $2n = 18$ e *C. bahianum*, $2n = 36$), $x = 10$ (*C. grandiflorum* e *C. oliveirae*, $2n = 20$), $x = 11$ (*C. corindum*, *C. halicacabum* var. *halicacabum*, *C. halicacabum* var. *microcarpum*, *C. procumbens* e *C. pterocarpum*, $2n = 22$) e $x = 12$ (*C. heringerii*, *C. cristobalii* e *C. urvilleoides*, $2n = 24$). *Cardiospermum bahianum* é o único representante poliplóide, sendo um tetraplóide ($2n = 4x = 36$) que compartilha $x = 9$ com *C. anomalum*.

Em *C. corindum* foi observado que após a coloração HCl/Giemsa os seis pares cromossômicos menores apresentaram menor intensidade de coloração que os maiores. O mesmo foi observado em dois pares cromossômicos em *C. halicacabum* var. *microcarpum* e em alguns pares menores de *C. halicacabum* var. *halicacabum* (Fig. 1). As espécies restantes não apresentaram diferenciação na coloração.

As espécies de *Cardiospermum* possuem cromossomos *m* (metacêntricos), *sm* (submetacêntricos) e *st* (subtelocêntricos), sendo os cromossomos *t* (telocêntricos) ausentes no grupo. Particularmente, *C. anomalum*, *C. halicacabum* var. *microcarpum* (Kunth) Blume, *C. cristobalii* e *C. urvilleoides* não apresentaram cromossomos *st*, em contraste com *C. corindum* que é a espécie com maior número de cromossomos *st*. As espécies *C. anomalum*, *C. corindum*, *C. halicacabum* var. *halicacabum*, *C. halicacabum* var. *microcarpum* e *C. oliveirae* possuem cromossomos pequenos, alcançando no máximo 1,5 μm e o TCL variou de 16,0 a 23,6 μm . Por outro lado, *C. bahianum*, *C. cristobalii*, *C. grandiflorum*, *C. heringeri*, *C. integerrimum*, *C. procumbens*, *C. pterocarpum* e *C. urvilleoides* foram diferenciadas por apresentar cromossomos de 1,5 até 6 μm e TCL de 30,3 a 110,6 μm (Tabela 2). *Cardiospermum urvilleoides* apresentou os cromossomos de maior tamanho e maior TCL, superando em seis vezes o tamanho do cariótipo em *C. corindum*. Os cariótipos em *Cardiospermum* são relativamente assimétricos. *Cardiospermum corindum* apresentou o cariótipo com maior índice de assimetria (TF% = 28,2), contrastando com *C. anomalum*, cujo cariótipo foi o mais simétrico (TF% = 40,6). A análise dos índices de assimetria não permitiu agrupamento definido das espécies, e os padrões de dispersão dos índices A_1 vs A_2 e CV_{cl} vs CV_{ci} mostraram algumas diferenças (Fig. 2), sendo possível detalhar alguns aspectos comuns. Baixos valores de assimetria cariotípica foram observados para *C. anomalum* e *C. bahianum*,

em contraste com *C. corindum* que apresenta os valores mais altos nestes índices. No geral, considerando unicamente A_2 ou CV_{cl} ($=A_2 \times 100$), ou seja a assimetria intercromossômica, pode-se observar dois grupos, um grupo de menor assimetria, com as espécies *C. anomalum*, *C. bahianum*, *C. halacacabum* var. *halacacabum* e *C. olivaeirae*, e outro grupo de maior assimetria com as espécies restantes. A dispersão dos índices A_1 e CV_{ci} apresentou diferenças significativas. A diferença maior foi observada em *C. integerrimum*, que apresentou o maior valor de CV_{ci} , mas o índice A_1 é menor que a maioria das espécies estudadas (Fig. 2).

A estrutura dos núcleos em intérfase permitiu diferenciar as espécies de *Cardiospermum* em dois grupos, grupo I e II (Fig. 3). As espécies do grupo I, *C. anomalum*, *C. bahianum*, *C. corindum*, *C. halicacabum* var. *halicacabum*, *C. halicacabum* var. *microcarpum* e *C. oliveirae* possuem núcleo tipo arreticulado, apresentando cromocentros com limites pouco definidos. Neste grupo, *C. corindum* destaca-se por apresentar cromocentros maiores, fortemente corados e em menor número, enquanto as espécies restantes apresentam cromocentros menores e em número variável. O grupo II é caracterizado por ter o núcleo interfásico semi-reticulado, com regiões de cromatina condensada intercalada com cromocentros de bordos definidos. Integram este grupo *C. cristobalii*, *C. grandiflorum*, *C. heringeri*, *C. integerrimum* e *C. urvilleoides*. Na maioria das espécies deste grupo foi observado um núcleo interfásico de tamanho similar e número variável de cromocentros. Particularmente *C. procumbens* (Figura 3J) e *C. pterocarpum* (Figura 3K) apresentam núcleo interfásico intermediário entre o grupo I e o grupo II.

Os padrões de condensação cromossômica observados nas prometáfases coradas com HCl/Giemsa permitiram também diferenciar claramente dois grupos (Fig. 4), similares aos grupos I e II definidos pelos núcleos em intérfase. As espécies do grupo I, formado por *C. anomalum*, *C. bahianum*, *C. corindum*, *C. halicacabum* var. *halicacabum*, *C. halicacabum*

var. *microcarpum* e *C. oliveirae*, incluindo também *C. procumbens* e *C. pterocarpum*, apresentaram um padrão de condensação profásico proximal, onde as regiões pericentroméricas são fortemente condensadas, enquanto que as regiões terminais ainda permanecem descondensadas. As espécies do grupo II, principalmente *C. cristobalii*, *C. grandiflorum*, *C. heringeri*, *C. integerrimum* e *C. urvilleoides*, mostram um padrão de condensação terminal-intersticial, exibindo frequentemente blocos de cromatina condensada nas regiões cromossômicas terminais.

Mediante técnicas de bandamento cromossômico fluorescente (CMA₃/DAPI) foram evidenciadas bandas de heterocromatina ricas em bases AT (DAPI⁺), nas regiões cromossômicas terminais de *C. corindum*, *C. grandiflorum* e *C. urvilleoides* (Fig. 5A, 5B e 5D, respectivamente). Nas espécies restantes não foram observadas bandas ricas em AT (Figura 5E, 5G, 5I e 5K). Regiões ricas em CG (CMA₃⁺) foram observadas em *C. grandiflorum* (Fig. 5C), *C. halicacabum* var. *halicacabum* (Fig. 5F), *C. halicacabum* var. *microcarpum* e *C. integerrimum* (Fig. 5H), mas a localização dos sítios CMA₃⁺ em *C. procumbens* e *C. pterocarpum* foi difícil (Fig. 5J e 5L). Em *C. grandiflorum*, *C. halicacabum* var. *halicacabum* e *C. halicacabum* var. *microcarpum* as bandas CMA₃⁺ são observadas nas regiões terminais do braço curto de dois pares cromossômicos, mas em *C. integerrimum* as regiões ricas em CG foram localizadas nas regiões pericentroméricas de 5 pares cromossômicos (Fig. 5H).

A distribuição dos genes de DNAr 18-5.8-26S e 5S é variável entre as espécies estudadas de *Cardiospermum* (Fig. 6). Os genes de DNAr 18-5.8-26S e 5S apresentam sintenia em *C. anomalum* e *C. bahianum*, ocupando regiões cromossômicas terminais dos braços curtos, sendo o locus DNAr 5S sempre proximal em relação ao DNAr 18-5.8-26S terminal. Em *C. anomalum* foi detectado um par de loci de DNAr 18-5.8-26S e 5S (Fig. 6A),

enquanto que em *C. bahianum* foram observados 3 pares de DNAr 18-5.8-26S e 2 pares de DNAr 5S (Fig. 6B). Nas espécies restantes, os loci de DNAr 18-5.8-26S e 5S não apresentam sintenia. Em *C. corindum* foram detectados 3 pares de loci DNAr 18-5.8-26S (todos terminais) e 3 pares de 5S (2 pares terminais no braço curto e 1 par centromérico) (Fig. 6C). *Cardiospermum grandiflorum*, *C. halicacabum*, e *C. procumbens* apresentam 2 pares de sítios DNAr 18-5.8-26S localizados em regiões terminais de braço curto e 1 par de loci DNAr 5S na região intersticial do braço longo (Fig. 6D, 6E, 6F e 6J). Em *C. oliverae*, também foi detectado um par de loci DNAr 5S na região intersticial do braço longo (Fig. 6I). Em *C. grandiflorum* frequentemente um par de loci DNAr 5S é heteromórfico (Fig. 6D). *Cardiospermum cristobalii* apresenta 3 pares de sítios DNAr 18-5.8-26S localizados em regiões terminais do braço curto e 1 par de loci de DNAr 5S na região pericentromérica (Fig. 6K). *Cardiospermum heringeri* e *C. integerrimum* apresentam um único par de cromossomos portadores de DNAr 5S, mas o sítio em *C. heringeri* ocupa a região terminal do primeiro par cromossômico metacêntrico (Fig. 6G), enquanto que em *C. integerrimum* é mapeado na região intersticial de um cromossomo sub-telocêntrico (Fig. 6H). Entretanto, em *C. urvilleoides* foram observados 3 pares de loci de DNAr 5S em regiões terminais dos braços curtos (Fig. 6L). Particularmente *C. integerrimum* se diferencia das outras espécies estudadas de *Cardiospermum* por apresentar os loci de DNAr 18-5.8-26S localizados em regiões pericentroméricas de 5 pares cromossômicos (Fig. 6H).

De modo geral os sítios ricos em CG observados como bandas CMA_3^+ foram associados aos loci DNAr 18-5.8-26S. Algumas espécies, como *C. corindum*, mostram os loci de DNAr 5S associados ou localizados próximos a regiões ricas em AT (Fig. 7).

Discussão

Dentre as 12 espécies sul-americanas de *Cardiospermum* estudadas, as contagens cromossômicas são inéditas para seis delas. Os resultados complementam alguns resultados previamente obtidos para o gênero (Diers 1961; Ferrucci 1981, 1989, 2000a; Hemmer & Morawetz 1990; Sugiura 1931) e também oferecem dados inéditos em relação ao cariótipo, padrões de bandas e distribuição de seqüências de DNA repetitivo.

Números cromossômicos e a sistemática de *Cardiospermum*

O gênero *Cardiospermum* conta com 16 espécies, sendo conhecidos os números cromossômicos de 12. Neste trabalho são registrados pela primeira vez os números cromossômicos de *C. bahianum* ($2n = 36$), *C. cristobalii* ($2n = 24$), *C. halicacabum* var. *halicacabum* ($2n = 22$), *C. heringeri* ($2n = 24$), *C. oliveirae* ($2n = 20$), *C. procumbens* ($2n = 22$) e *C. urvilleoides* ($2n = 24$). Os números cromossômicos foram confirmados para as demais espécies, *C. anomalum* ($2n = 18$) (Ferrucci 2000a), *C. corindum* ($2n = 22$) (Diers 1961), *C. halicacabum* ($2n = 22$) (Sugiura 1931), *C. halicacabum* var. *microcarpum* ($2n = 22$) (Ferrucci 1981), *C. integerrimum* ($2n = 14$) (Ferrucci 1989) e *C. pterocarpum* ($2n = 22$) (Ferrucci 1989). Para *C. grandiflorum* foram descritos dois números cromossômicos, $2n = 20$ (Ferrucci 1981, 1989) e $2n = 22$ (Dalgaard 1986; Paiva & Leitão 1989). Os dados aqui obtidos para novas populações confirmaram a contagem cromossômica realizada por Ferrucci (1981, 1989).

A redução do número cromossômico é um processo já descrito em Paullinieae, e uma característica que a diferencia das outras tribos da família (Lombello & Forni-Martins 1998). Os números básicos mais frequentes nas tribos arbóreas são $x = 14$, 15 e 16 , mas o número

básico mais frequente na tribo Paullinieae é $x = 12$. O $x = 12$ encontra-se conservado nos gêneros *Houssayanthus* (Ferrucci 1981; Solís Neffa & Ferrucci 1998), *Paullinia* (Urdampilleta *et al.* 2007) e *Serjania* (Ferrucci 2000a), e está presente em *Urvillea* (Ferrucci 2000a). O número básico $x = 12$ foi descrito pela primeira vez para *Cardiospermum* no presente estudo, documentado em *C. cristobalii*, *C. heringeri* e *C. urvilleoides*.

O gênero *Cardiospermum* apresenta a maior variação em relação ao número básico nas espécies da tribo Paullinieae, variando de $x = 7$ até $x = 12$, sendo o $x = 8$ ainda não relatado. O gênero *Urvillea* também apresenta variação de número básico, com $x = 12$ e 11, e essa variação está associada com a subdivisão do gênero em seções (Urdampilleta *et al.* 2006). Entretanto, em *Cardiospermum*, esta variação no número cromossômico apresenta uma relação parcial com a classificação subgenérica (Ferrucci 2000b).

Cardiospermum anomalum ($2n = 18$) e *C. bahianum* ($2n = 36$) pertencem à seção *Carphospermum* Radlk. e compartilham caracteres morfológicos, como sementes com pêlos paleáceos no tegumento (Ferrucci & Urdampilleta em preparação). Nossos resultados sugerem que esta seção também pode ser caracterizada por $x = 9$, sendo provavelmente um caráter adicional que permita uma classificação natural desse agrupamento infragenérico. Por outro lado, números básicos variados foram observados nas seções *Ceratadenia* Radlk ($x = 7$, 10 e 12) e *Cardiospermum* Radlk ($x = 10$, 11 e 12). Morfologicamente, *C. heringeri* e *C. integerrimum* são as espécies mais semelhantes em *Cardiospermum*, e pertencem à mesma seção, mas em relação ao número cromossômico apresentam as maiores diferenças ($2n = 24$ e 14, respectivamente). Particularmente em *C. integerrimum* sugerimos uma significativa redução no número cromossômico provavelmente devido a algum mecanismo de disploidia (ver discussão abaixo).

Cardiospermum bahianum representa o primeiro registro de poliploidia no gênero, neste caso um tetraplóide com $2n = 4x = 36$. A poliploidia em *Cardiospermum* não é freqüente, ocorrendo a evolução cariotípica principalmente por disploidia. A poliploidia surgiu independentemente nos gêneros *Cardiospermum*, *Paullinia* (Urdampilleta *et al.* em preparação) e *Urvillea* (Urdampilleta *et al.* 2006) e poderia ser considerada como caráter derivado na tribo (Acevedo-Rodríguez 1993b). No restante da família Sapindaceae a poliploidia é também pouco frequente, sendo registrados alguns exemplos de poliplóides nos gêneros *Acer* L. (Grimm *et al.* 2006), *Allophylus* L. e *Melicoccus* P. Browne (Ferrucci & Solís Neffa 1997).

A distribuição geográfica, citogenética e caracteres morfológicos

Considerando as espécies de distribuição restrita (não incluindo *C. corindum*, *C. grandiflorum* e *C. halicacabum*), é possível explorar algumas associações entre distribuição geográfica, número cromossômico e caracteres morfológicos (Fig. 8). Neste sentido, as espécies do centro-sul da América do Sul, *C. procumbens* e *C. pterocarpum*, apresentam $2n = 22$, sendo as únicas espécies do gênero que apresentam um arilo carnoso. *Cardiospermum procumbens* é uma espécie endêmica de Mato Grosso do Sul, enquanto que *C. pterocarpum* apresenta uma distribuição maior, desde o norte da Argentina até Mato Grosso do Sul, na denominada “Região Chaqueña”. As espécies *C. cristobalii*, *C. heringeri*, *C. integerrimum* e *C. urvilleoides* se caracterizam por apresentar grandes sementes (1 a 2 cm de diâmetro). As quatro espécies são endêmicas, *C. cristobalii*, *C. heringeri* e *C. urvilleoides* possuem $2n = 24$ e *C. integerrimum* com $2n = 14$. *Cardiospermum heringeri* e *C. integerrimum* são endêmicas na Mata Atlântica no Espírito Santo e Bahia, respectivamente, *C. cristobalii* é endêmica de

campos rupestres do norte de Minas Gerais, e *C. urvilleoides* é endêmica de uma região de transição entre campos rupestres e Mata Atlântica. As espécies com $x = 9$, *C. anomalum* ($2n = 18$) e *C. bahianum* ($2n = 36$), apresentam distribuição na caatinga do nordeste do Brasil, caracterizadas pela presença de pêlos paleáceos no tegumento seminal, caráter que diferencia a seção *Carphospermum*. Junto a estas espécies poderíamos incluir *C. oliverae* ($2n = 20$), também da caatinga, caracterizada pela redução no número básico.

Cariomorfologia e a classificação infragenérica de *Cardiospermum*

Hemmer & Morawetz (1990), trabalhando com *Cardiospermum*, descreveram dois tipos de núcleos interfásicos, o tipo semi-reticulado em *C. grandiflorum* e uma tendência ao tipo arreticulado em *C. halicacabum*. Nossos resultados permitiram confirmar a subdivisão do gênero em dois grupos, um com as espécies com núcleo arreticulado (Grupo I) e outro com as espécies com núcleo mais denso ou semi-reticulado (Grupo II). A maior densidade da cromatina observada na intérfase ocorre por uma maior condensação do DNA, existindo uma relação direta entre o aumento no estado de condensação da cromatina e o aumento na quantidade de DNA por núcleo (Nagl & Fusening 1979). Nossos resultados em relação ao padrão de condensação cromossômica profásica confirmaram os relatos de Hemmer & Morawetz (1990) em *C. grandiflorum* e *C. halicacabum*, observando uma diferenciação nas espécies do gênero. Os grupos decorrentes da variação observada entre os padrões de condensação profásica (Grupo I = proximal e Grupo II = terminal-intersticial) são semelhantes aos resultantes dos tipos de núcleos em intérfase. Assim, a condensação profásica e o tipo de núcleo interfásico são caracteres genéticos que permitem diferenciar as espécies de *Cardiospermum* em dois grupos. Os agrupamentos I e II podem ser associados também ao

tamanho cromossômico, onde a maioria das espécies do Grupo I apresentam cromossomos menores (0,6 μm até 1,9 μm) que as do Grupo II (1 μm até 6 μm). *Cardiospermum procumbens* e *C. pterocarpum* apresentam características do Grupo I considerando o núcleo interfásico e padrões de condensação profásica, mas o tamanho dos cromossomos destas espécies sugere uma posição intermediária entre ambos os grupos. Os agrupamentos de acordo com o padrão de núcleo interfásico e de condensação cromatínica mostaram alguma relação com a subdivisão do gênero *Cardiospermum* em seções. Todas as espécies da seção *Carphospermum* e grande parte das espécies da seção *Cardiospermum* foram enquadradas no grupo I. Por outro lado, as demais espécies da seção *Cardiospermum* e todas as espécies da seção *Ceratadenia* foram classificadas no Grupo II.

Lombello & Forni-Martins (1998) destacaram que a redução no número cromossômico, assim como o aumento no tamanho dos cromossomos, poderia diferenciar a tribo Paullinieae das demais tribos arbóreas da família Sapindaceae. Essa sugestão foi embasada em estudos cariotípicos em espécies de *Urvillea* e de *Serjania*, nas quais os maiores cromossomos atingiam 3-4 μm . Entretanto, o aumento no tamanho cromossômico é uma hipótese de variação cariotípica não-aplicável às espécies de *Cardiospermum* com cromossomos pequenos (0,8-1,5 μm). Os cromossomos de *Cardiospermum* poderiam derivar de outras espécies da tribo Paullinieae com cromossomos maiores, onde a diminuição do tamanho do genoma poderia ter um papel importante na evolução do grupo. A diminuição do tamanho no genoma em *C. halicacabum* foi interpretada por Hemmer & Morawetz (1990) como uma adaptação das espécies herbáceas favorecendo o ciclo de vida curto. Frequentemente plantas invasoras, como *C. halicacabum* e *C. corindum*, apresentam caracteres morfológicos comuns associados a uma diminuição no tamanho do genoma

haplóide (TCL entre 17,8 e 23,6 μm), como ocorre em espécies invasoras das famílias Asteraceae, Brassicaceae, Fabaceae e Liliaceae (Garcia *et al.* 2008; Ni & Guo 2005). Este critério poderia ser aplicado a *C. corindum*, mas não corresponde às espécies não-invasoras, como *C. anomalum* e *C. oliveirae* que possuem genomas pequenos (TCL = 16,0 e 18,5 μm , respectivamente) e apresentam distribuição restrita.

Cariotipicamente, as espécies estudadas de *Cardiospermum* foram muito variáveis. Observamos espécies com cariótipos simétricos como em *C. anomalum* ($2n = 18, 7m + 2 sm$) e *C. bahianum* ($2n = 36, 11m + 7 sm$), que apresentaram pouca variação entre os cromossomos, sendo em sua maioria cromossomos metacêntricos. A variação na simetria do cariótipo não teve relação com a separação em grupos I e II pelo núcleo interfásico e padrões de condensação profásica. *Cardiospermum corindum*, que pertencendo ao mesmo grupo I de *C. anomalum*, apresenta o cariótipo mais assimétrico do grupo. Os diferentes índices de assimetria analisados (A1, A2, CVcl, CVci e TF%) (Tabela 2) permitem diferenciar algumas espécies mas não sustentam a classificação infragenérica proposta.

Padrão de bandas e DNA repetitivo

O padrão de blocos de heterocromatina terminal ricos em AT (DAPI⁺), observados em *C. corindum*, *C. grandiflorum* e *C. urvilleoides* já foi descrito por Hemmer & Morawetz (1990) em *C. grandiflorum*. Bandas ricas em AT também ocorrem em regiões terminais em outras espécies da tribo, como por exemplo no gênero irmão *Urvillea*, permitindo diferenciar algumas espécies (Urdampilleta *et al.* 2006). Em *Cardiospermum* estas bandas DAPI⁺ diferenciam *C. corindum*, *C. grandiflorum* e *C. urvilleoides* das outras espécies, mas a presença destes blocos não está relacionada com agrupamentos subgenéricos. Assim, o

acúmulo de seqüência de DNA satélite formando blocos heterocromáticos ricos em AT poderia ser um evento independente em diferentes espécies da tribo Paullinieae (Urdampilleta *et al.* em preparação).

Os sítios ricos em GC (CMA₃⁺) podem estar em geral associados com loci de DNA ribossômico 18-5.8-26S em plantas (Guerra 2000). Essa associação foi confirmada na tribo Paullinieae (Urdampilleta *et al.* 2006, 2007). Embora o número e localização dos sítios de DNAr 18-5.8-26S seja variável, a localização das NORs na região terminal dos braços curtos é uma característica conservada na maioria das espécies, com a exceção de *C. integerrimum* (ver discussão abaixo).

A sintonia dos genes ribossômicos, a co-localização do DNAr 18-5.8-26S e 5S no mesmo cromossomo, é um caráter adicional que define a seção *Carphospermum* (*C. anomalum* e *C. bahianum*), e que a diferencia das seções restantes. A não-sintonia é a forma mais freqüente da distribuição dos genes de DNA ribossômicos em *Cardiospermum*, sendo compartilhada com algumas espécies de *Paullinia*, *Serjania* (Urdampilleta *et al.* em preparação) e *Urvillea* (Urdampilleta *et al.* 2006). Assim, a sintonia nos genes de DNAr em *C. anomalum* e *C. bahianum* poderia ser considerado um caráter derivado dentro do gênero *Cardiospermum*, assim como um indicador direto da ocorrência de rearranjos cromossômicos ocorridos na evolução cariotípica da seção *Carphospermum*.

A redução no número cromossômico em *C. integerrimum*

Cardiospermum heringeri e *C. integerrimum* são as espécies mais afins do gênero e pertencem à seção *Ceratadenia*. *Cardiospermum heringeri* é endêmica das serras do centro-

oeste do Espírito Santo e sudeste de Minas Gerais, enquanto *C. integerrimum* é endêmica do sudeste da Bahia; até o momento não foi relatada sobreposição na distribuição geográfica destas espécies. *Cardiospermum heringeri* possui $2n = 24$ e *C. integerrimum* $2n = 14$. O número cromossômico $2n = 24$ é compartilhado com espécies de outros gêneros da tribo, como *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea*, e é o número mais frequente em Paullinieae; entretanto o número de cromossomos $2n = 14$ é o único registro para a família, assim como para as Sapindales americanas, o que poderia ser considerado como um possível evento de redução do número cromossômico por disploidia.

A distribuição dos sítios de DNAr 18-5.8-26S na regiões centroméricas é um caráter único que distingue a *C. integerrimum* das demais espécies de *Cardiospermum*. Esta mudança de localização física no cromossomo é uma evidência da ocorrência de rearranjos cromossômicos que originaram o atual cariótipo desta espécie. Com base nos resultados obtidos, sugere-se que o cariótipo de *C. integerrimum* seja derivado por redução no número cromossômico associada a rearranjos cromossômicos, pelo processo evolutivo denominado disploidia, que levou à localização diferencial dos loci de DNAr 18-5.8-26S.

A diversidade cariotípica em *Cardiospermum* é um dado relevante para a sistemática da tribo; em relação à classificação infragenérica, somente a seção *Carphospermum* é sustentada pelo número cromossômico básico $x = 9$. Trabalhos de morfologia e palinologia consideram *Cardiospermum* como um gênero com caracteres derivados (Acevedo-Rodríguez 1993b; Ferrucci & Anzótegui 1993; Van Der Ham & Tomlik 1994), os resultados aqui obtidos em citogenética confirmaram esta posição. Os resultados aqui apresentados sugerem que *Cardiospermum* apresenta uma alta taxa de evolução cariotípica em relação aos outros gêneros da tribo Paullinieae, como *Serjania* e *Houssayanthus*.

Como conclusão, neste trabalho foi possível complementar a caracterização citogenética para as espécies sul-americanas de *Cardiospermum*, destacando a disploidia como o mecanismo evolutivo principal na variação do número cromossômico. Eventos de amplificação/eliminação do DNA repetitivo poderiam ter uma função importante na diferenciação genética das espécies, principalmente na variação do tamanho do genoma. A evolução cariotípica no gênero *Cardiospermum* poderá ser melhor interpretada quando os dados citogenéticos obtidos neste estudo sejam incorporados à análise filogenética morfológica e molecular, auxiliando na interpretação das relações entre as suas espécies, assim como com outros gêneros da tribo Paullinieae.

Tabela 1. Espécies estudadas de *Cardiospermum*, códigos (utilizados na Fig. 2) e localidades das populações analisadas.

Espécie	Código	Localidade
Seção <i>Ceratadenia</i>		
<i>C. grandiflorum</i> Sw.	gra	Brasil, SP, Mogi-Guaçu, Fz. Campininha, Firetti <i>et al.</i> s/n (UEC). PR, Paiquerê, Urdampilleta <i>et al.</i> 213 (FUEL).
<i>C. heringeri</i> Ferrucci	her	Brasil, ES, Venda Nova do Imigrante, Urdampilleta <i>et al.</i> , 363 (UEC); Santa Teresa, Urdampilleta <i>et al.</i> 369 (UEC)
<i>C. integerrimum</i> Radlk.	int	Brasil, BA, Ubaitaba, Urdampilleta <i>et al.</i> 312 (UEC).
Seção <i>Cardiospermum</i>		
<i>C. corindum</i> L. var. corindum	cor	Brasil, BA, Barra, Urdampilleta <i>et al.</i> 328 (UEC). Bolívia, Santa Cruz, Florida, Ferrucci <i>et al.</i> 2660 (CTES); Cordillera, Ferrucci <i>et al.</i> 2261 (CTES).
<i>C. cristobalii</i> Ferrucci & Urdampilleta, sp. nov. inéd.	cri	Brasil, MG, Botumirim, Urdampilleta <i>et al.</i> 421 (UEC).
<i>C. halicacabum</i> L.		
var. <i>halicacabum</i>	hal v. hal	Bolívia, Santa Cruz, Chiquitos, Ferrucci <i>et al.</i> 2525 (CTES)
var. <i>microcarpum</i> (Kunth) Blume	hal v. micr	Brasil, PR, Primeiro de Maio, Urdampilleta <i>et al.</i> 171 (FUEL). Argentina, Misiones, Garupa, Urdampilleta <i>et al.</i> 195 (FUEL)
<i>C. oliveirae</i> Ferrucci	oli	Brasil, BA, Oliveira dos Brejinhos, Urdampilleta <i>et al.</i> 333 (UEC); BA, Itaguaçu da Bahia, Urdampilleta <i>et al.</i> 337 e 338 (UEC).
<i>C. procumbens</i> Radlk.	pro	Brasil, MS, Sidrolândia, Urdampilleta <i>et al.</i> 322 (UEC).
<i>C. pterocarpum</i> Radlk.	pte	Brasil, MS, Sidrolândia, Urdampilleta <i>et al.</i> 321 (UEC).
<i>C. urvilleoides</i> (Radlk.) Ferrucci	urv	Brasil, MG, Itaobim, Urdampilleta <i>et al.</i> 425 (UEC).
Seção <i>Carphospermum</i>		
<i>C. anomalum</i> Cambess.	ano	Brasil, BA, Ibotirama, Urdampilleta <i>et al.</i> 330 (UEC).
<i>C. bahianum</i> Ferrucci & Urdampilleta, sp. nov. inéd.	bah	Brasil, BA, Rio de Contas, Urdampilleta <i>et al.</i> 389 (UEC).

Tabela 2. Espécies estudadas e caracteres cariotípicos: comprimento cromossômico médio (ACL), comprimento cromossômico total do (TCL) genoma diplóide, relação entre o cromossomo maior e menor (RI), índice centromérico médio (ACI), variação entre cromossomos menor e maior (CV) e índices de assimetria A₁/A₂ (Romero Zarco 1986), TF% (Huziwaro 1962), CVci e CVcl (Paszko 2006).

Espécie	2n	Formula Cariotípica	Tamanho Cromossômico (µm)				Assimetria Cariotípica					
			TCL	CV	ACL	RI	ACI	A1	A2	TF%	CVci	CVcl
Seção <i>Ceratadenia</i>												
<i>C. grandiflorum</i>	20	6 m + 2 sm + 2 st	31,0	1,9-1,1	1,5	1,8	37,6	0,37	0,18	37,7	25,8	17,9
<i>C. heringeri</i>	24*	6 m + 5 sm + 1 st	36,6	2,1-1,1	1,5	1,9	36,2	0,41	0,19	37,0	21,4	19,1
<i>C. integerrimum</i>	14	4 m + 1 sm + 2 st	38,9	3,5-2,0	2,8	1,6	36,2	0,38	0,18	37,9	35,4	18,3
Seção <i>Cardiospermum</i>												
<i>C. corindum</i>	22	2 m + 2 sm + 7 st	17,8	1,2-0,6	0,8	2,1	27,3	0,61	0,26	28,2	29,5	25,7
<i>C. cristobalii</i>	24*	5 m + 7 sm	72,6	4,3-1,9	3,0	1,9	34,2	0,46	0,25	35,6	22,7	24,7
<i>C. halicacabum</i>												
var. <i>halicacabum</i>	22*	3 m + 7 sm + 1 st	17,9	1,0-0,7	0,8	1,5	33,1	0,49	0,12	33,6	19,1	12,0
var. <i>microcarpum</i>	22	4 m + 7 sm	23,6	1,5-0,8	1,1	2,1	36,7	0,40	0,21	37,8	19,4	20,6
<i>C. oliveirae</i>	20*	4 m + 5 sm + 1 st	18,5	1,0-0,8	0,9	1,5	30,4	0,55	0,12	30,8	23,2	12,3
<i>C. procumbens</i>	22*	5 m + 2 sm + 4 st	37,7	2,7-1,1	1,7	2,3	34,8	0,43	0,27	37,0	26,6	27,2
<i>C. pterocarpum</i>	22	5 m + 4 sm + 2 st	30,3	2,1-1,0	1,4	2,2	35,1	0,42	0,23	36,7	29,6	23,2
<i>C. urvilleoides</i>	24*	5 m + 7 sm	110,6	6,1-3,3	4,6	1,7	37,1	0,39	0,20	37,8	19,6	19,7
Seção <i>Carphospermum</i>												
<i>C. anomalum</i>	18	7 m + 2 sm	16,0	1,1-0,8	0,9	1,4	40,2	0,31	0,10	40,6	18,9	10,0
<i>C. bahianum</i>	36*	11 m + 7 sm	57,4	1,9-1,2	1,6	1,7	38,1	0,37	0,11	38,5	15,2	11,3

(*) Novas contagens cromossômicas.

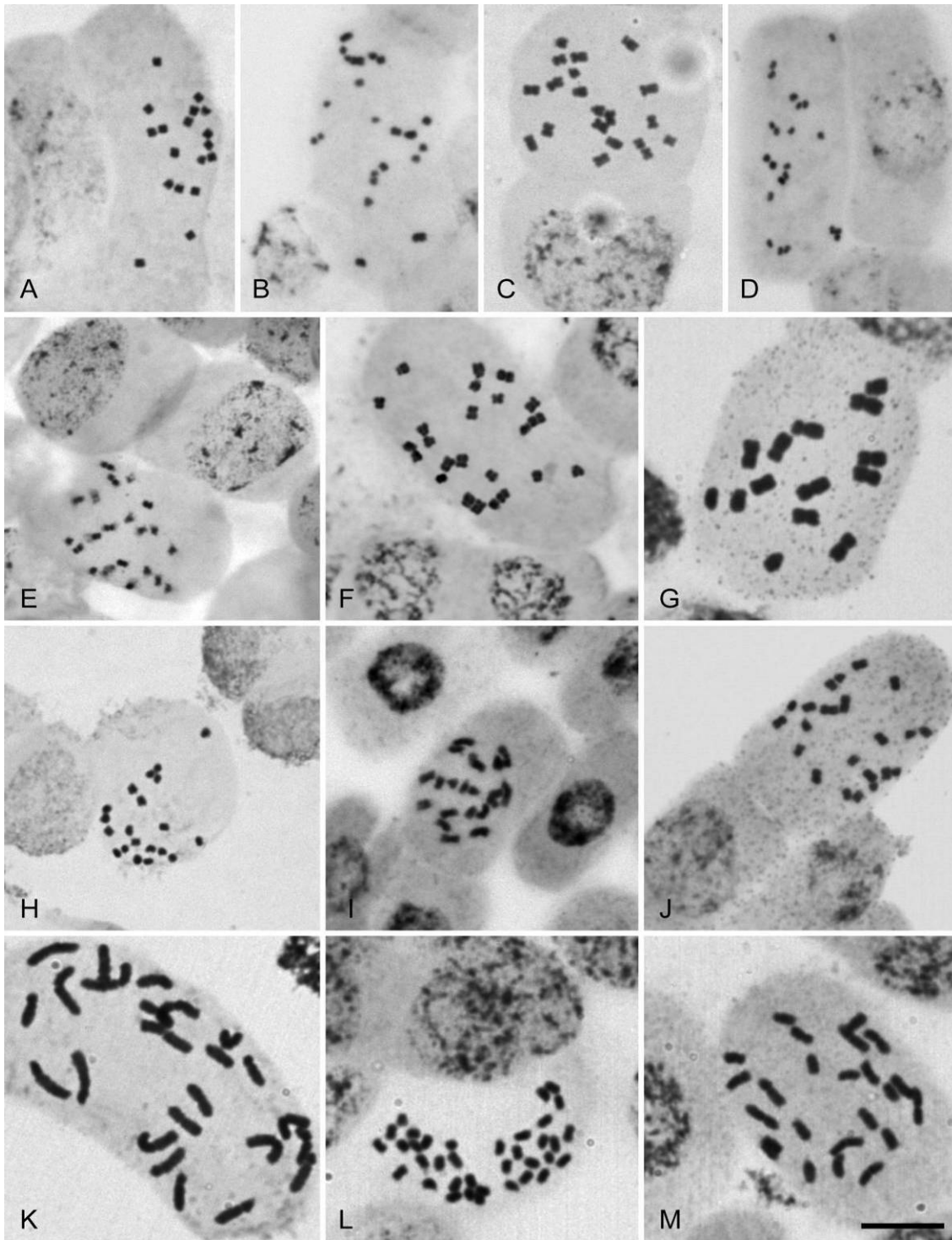


Figura 1. Cromossomos metafásicos de espécies do gênero *Cardiospermum* corados com HCl-Giemsa. A: *C. anomalum* ($2n = 18$), B: *C. corindum* ($2n = 22$), C: *C. grandiflorum* ($2n = 22$), D: *C. halicacabum* var. *halicacabum* ($2n = 22$), E: *C. halicacabum* var. *microcarpum* ($2n = 22$), F: *C. heringeri* ($2n = 24i$), G: *C. integerrimum* ($2n = 14$), H: *C. oliveirae* ($2n = 20$), I: *C. procumbens* ($2n = 22$), J: *C. pterocarpum* ($2n = 22$), K: *C. urvilleoides* ($2n = 24$), L: *C. bahianum* ($2n = 36$), M: *C. cristobalii* ($2n = 24$). Escala: 10 μm .

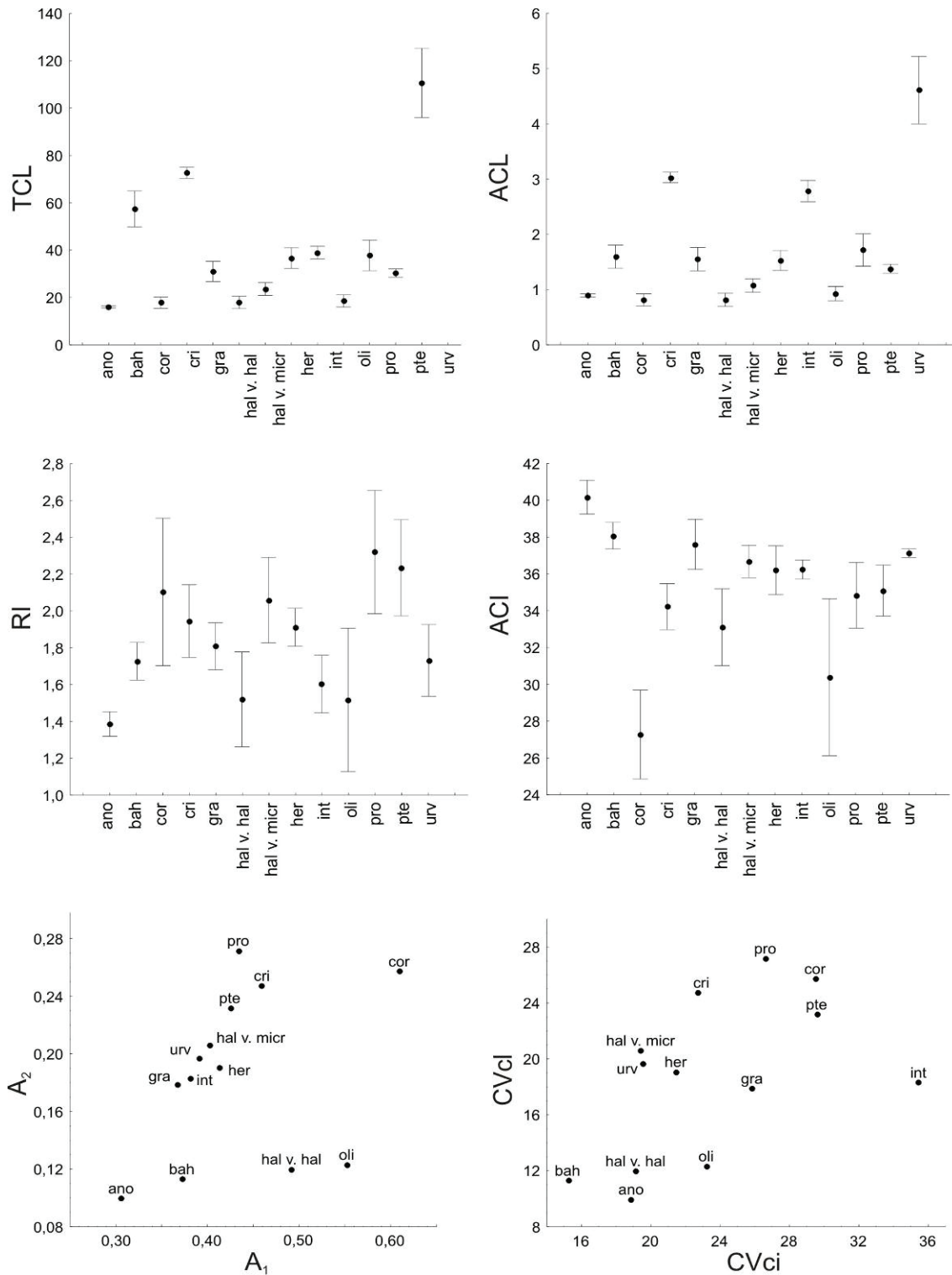


Figura 2. Comparação de caracteres cariotípicos: comprimento cromossômico médio (ACL), comprimento cromossômico total do (TCL) genoma diplóide, relação entre o cromossomo maior e menor (RI), índice centromérico médio (ACI) e índices de assimetria A_1/A_2 (Romero Zarco 1986), CVci e CVci (Paszko 2006).

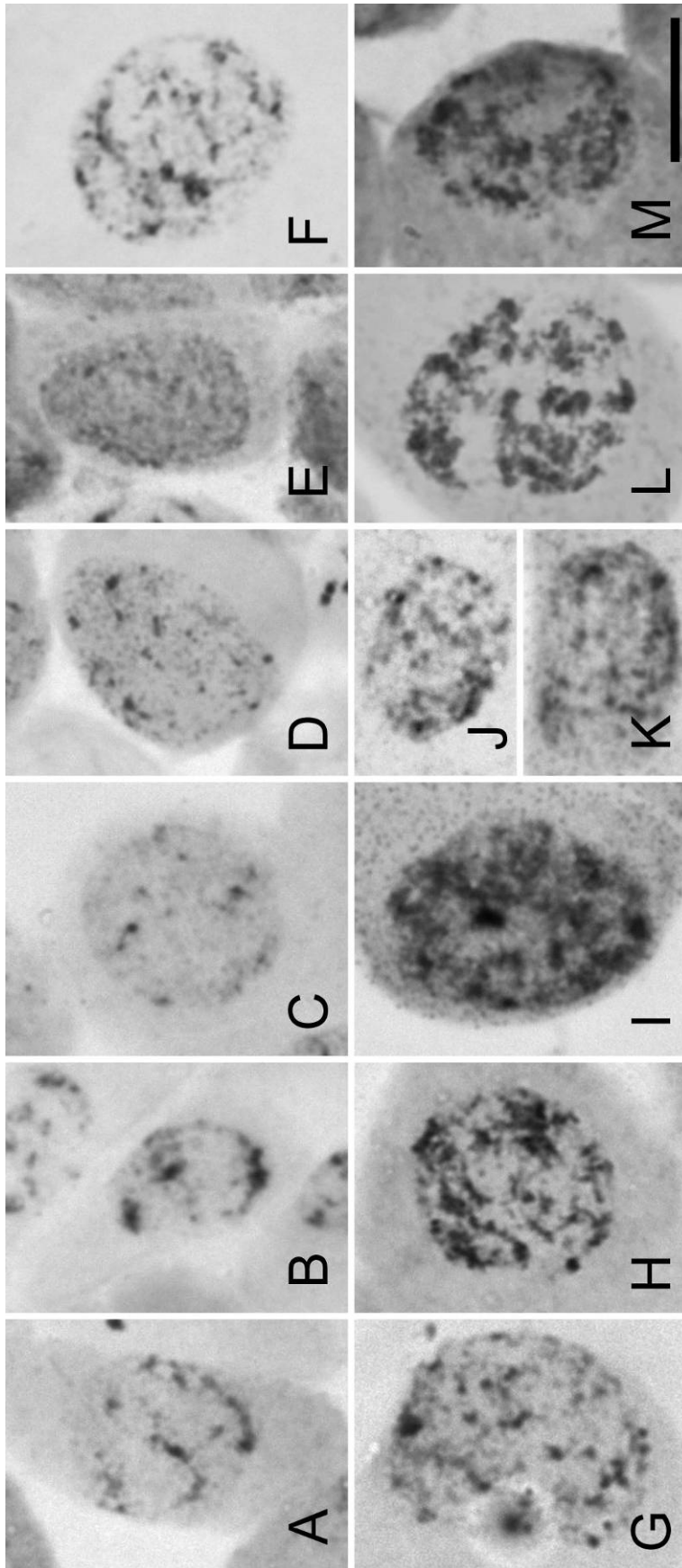


Figura 3. Variação de tipos de núcleos em interfase em espécies de *Cardiospermum* corados com HCl-Giemsa. Grupo I, A: *C. anomalum*, B: *C. corindum*, C: *C. halicacabum* var. *halicacabum*, D: *C. halicacabum* var. *microcarpum*, E: *C. oliveirae*, F: *C. bahianum*, J: *C. procumbens*, K: *C. grandiflorum*, H: *C. heringeri*, I: *C. integerrimum*, L: *C. urvilleoides*, M: *C. cristobalii*. Escala: 10 μ m.

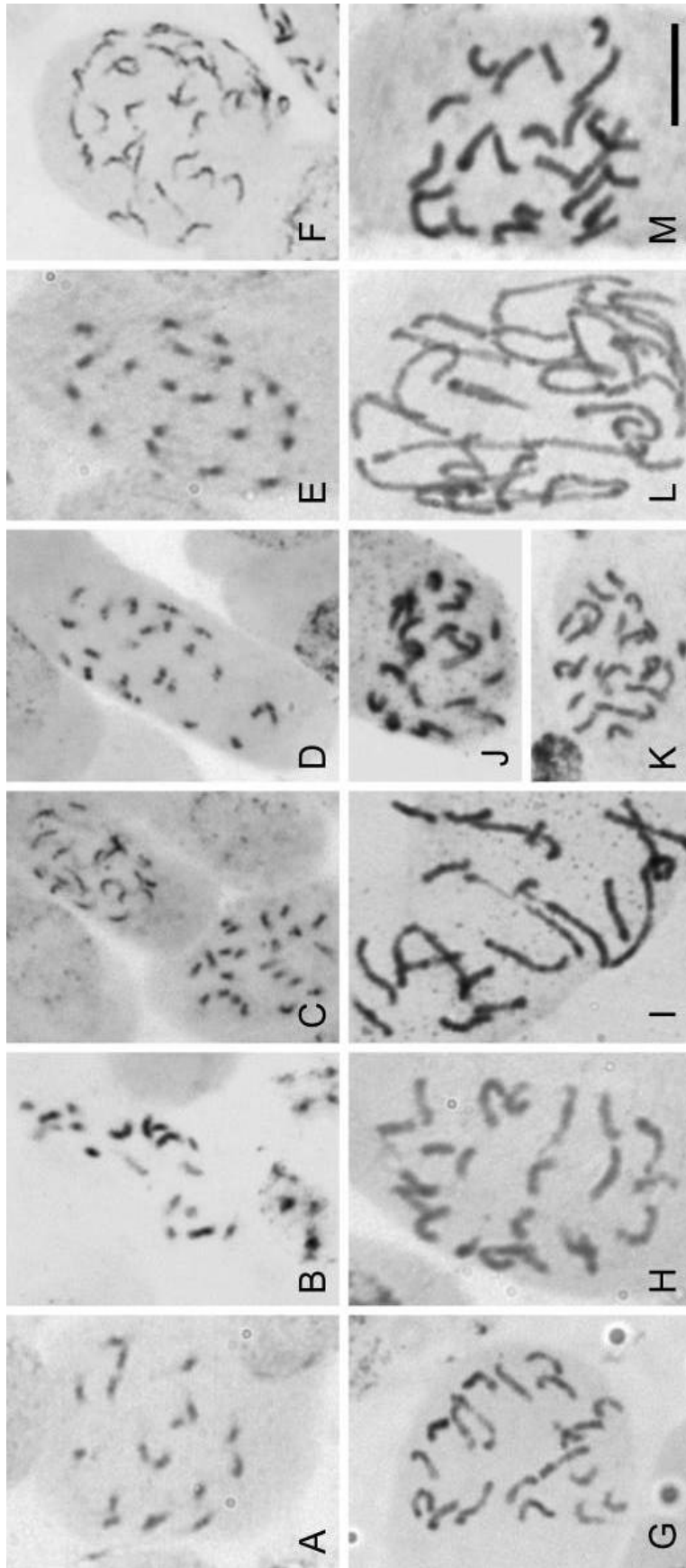


Figura 4. Variação nos padrões de condensação cromossômica observados nas prometáfases coradas com HCl/Giemsa em espécies de *Cardiospermum*. Diferenciação de dois grupos, Grupo I, A: *C. anomalum*, B: *C. corindum*, C: *C. halicacabum* var. *halicacabum*, D: *C. halicacabum* var. *microcarpum*, E: *C. oliveirae*, F: *C. bahianum*, J: *C. procumbens*, K: *C. pterocarpum*. Grupo II, G: *C. grandiflorum*, H: *C. heringeri*, I: *C. integerrimum*, L: *C. urvilleoides*, M: *C. cristobalii*. Escala: 10 µm.

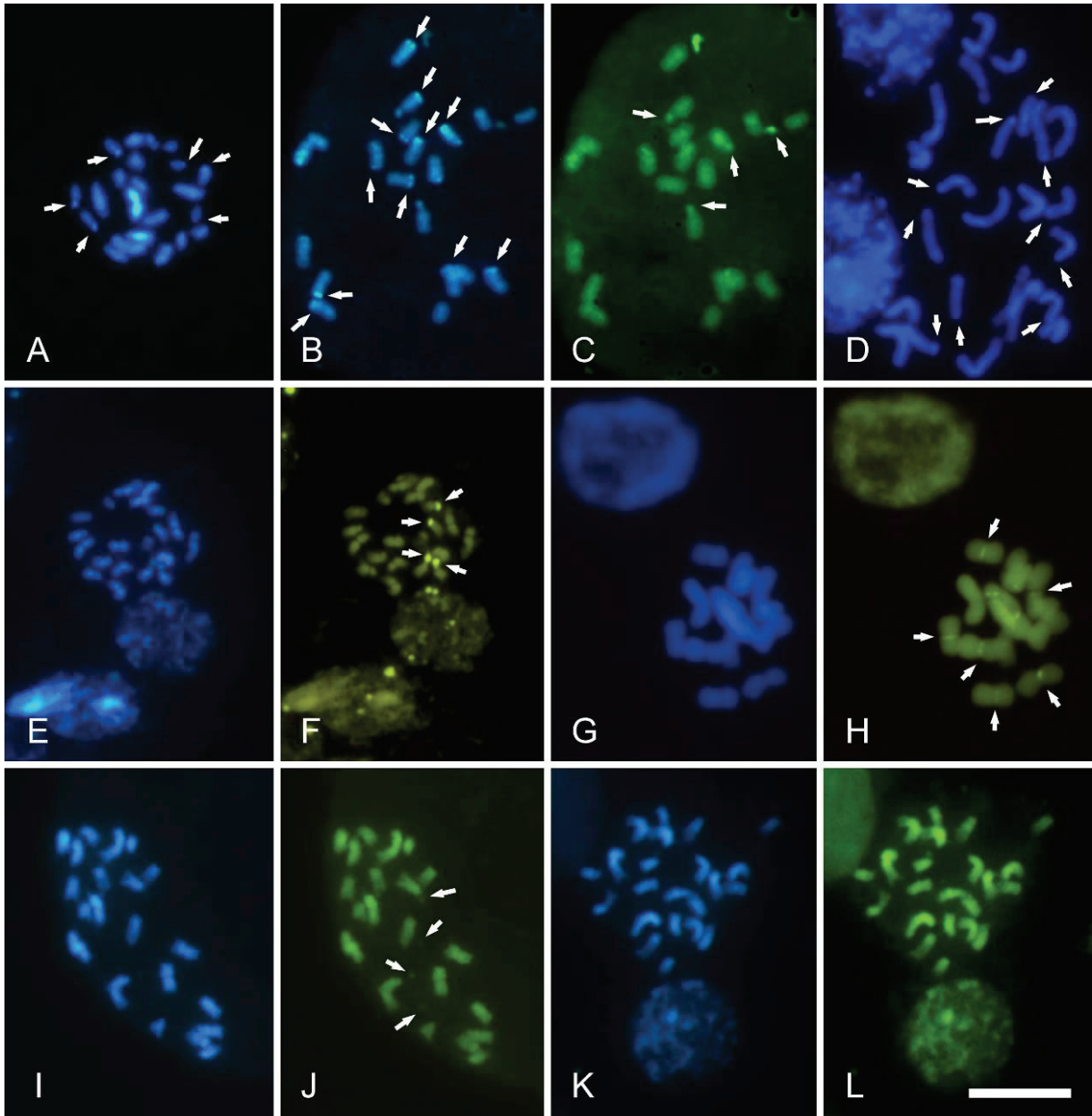


Figura 5. Bandamento cromossômico fluorescente (CMA₃/DAPI, verde/azul) em espécies de *Cardiospermum*. Bandas de heterocromatina ricas em bases AT (CMA₃⁰/DAPI⁺, setas) nas regiões cromossômicas terminais de *C. corindum* (A), *C. grandiflorum* (B-C) e *C. urvilleoides* (D). Regiões ricas em CG (CMA₃⁺/DAPI⁻, setas) foram observadas em *C. grandiflorum* (B-C), *C. halicacabum* var. *halicacabum* (E-F), *C. integerrimum* (G-H), *C. procumbens* (I-J) e *C. pterocarpum* (K-L). Escala: 10 μm.

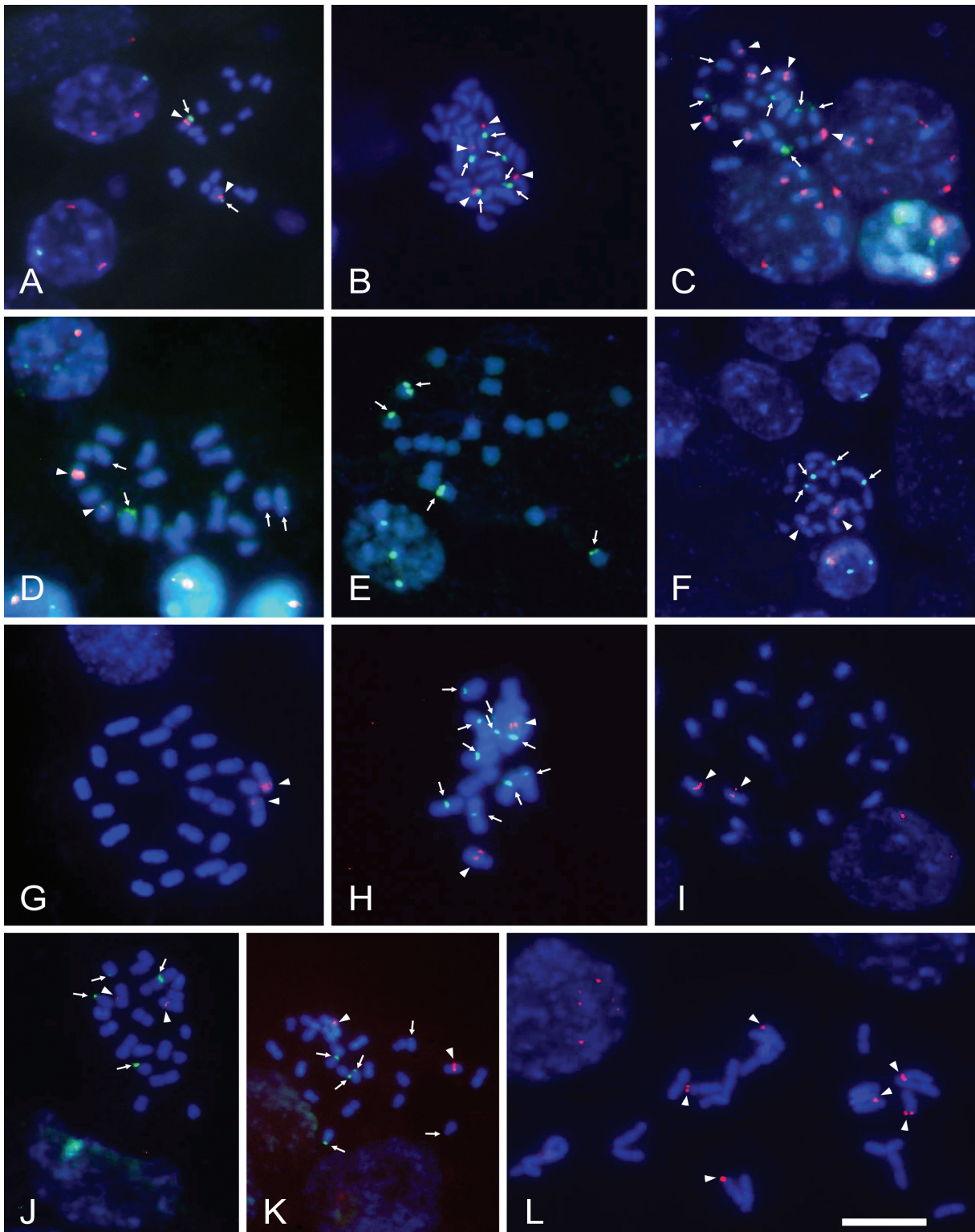


Figura 6. Localização dos genes de DNAr 18-5.8-26S (verde, seta) e 5S (vermelho, cabeça de seta). A-B: genes de DNAr 18-5.8-26S e 5S em sintenia. A: *C. anomalum*, B: *C. bahianum*, C: *C. corindum*, D-E: *C. grandiflorum*, F: *C. halicacabum* var. *halicacabum*, G: *C. heringeri*, H: *C. integerrimum*, I: *C. oliveirae*, J: *C. procumbens*, K: *C. cristobalii*, L: *C. urvilleoides*. Escala: 10 μ m.

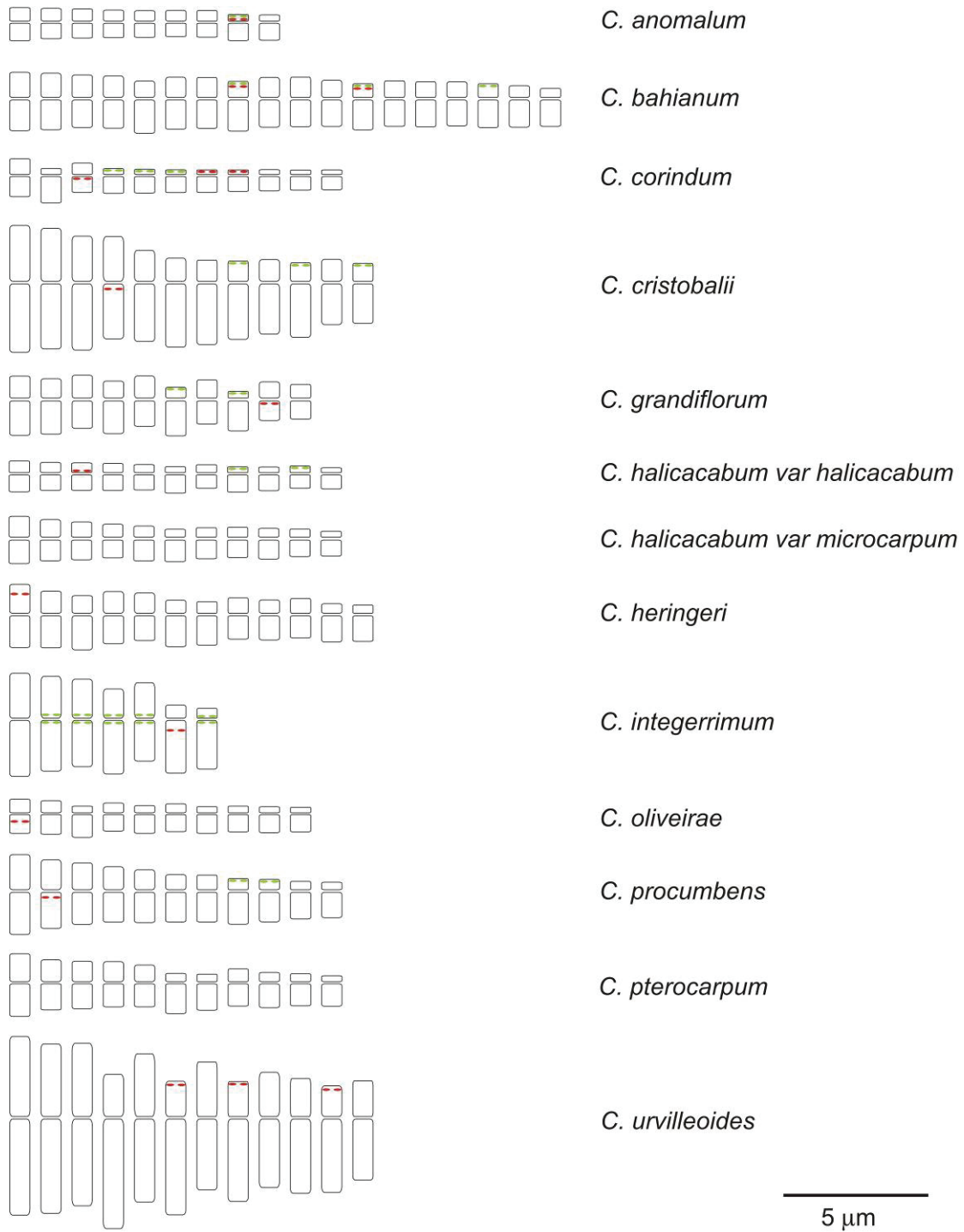


Figura 7. Idiogramas das espécies estudadas de *Cardiospermum*, e mapeamento dos sítios de DNAr 18-5,8-26S (●) e 5S (●).

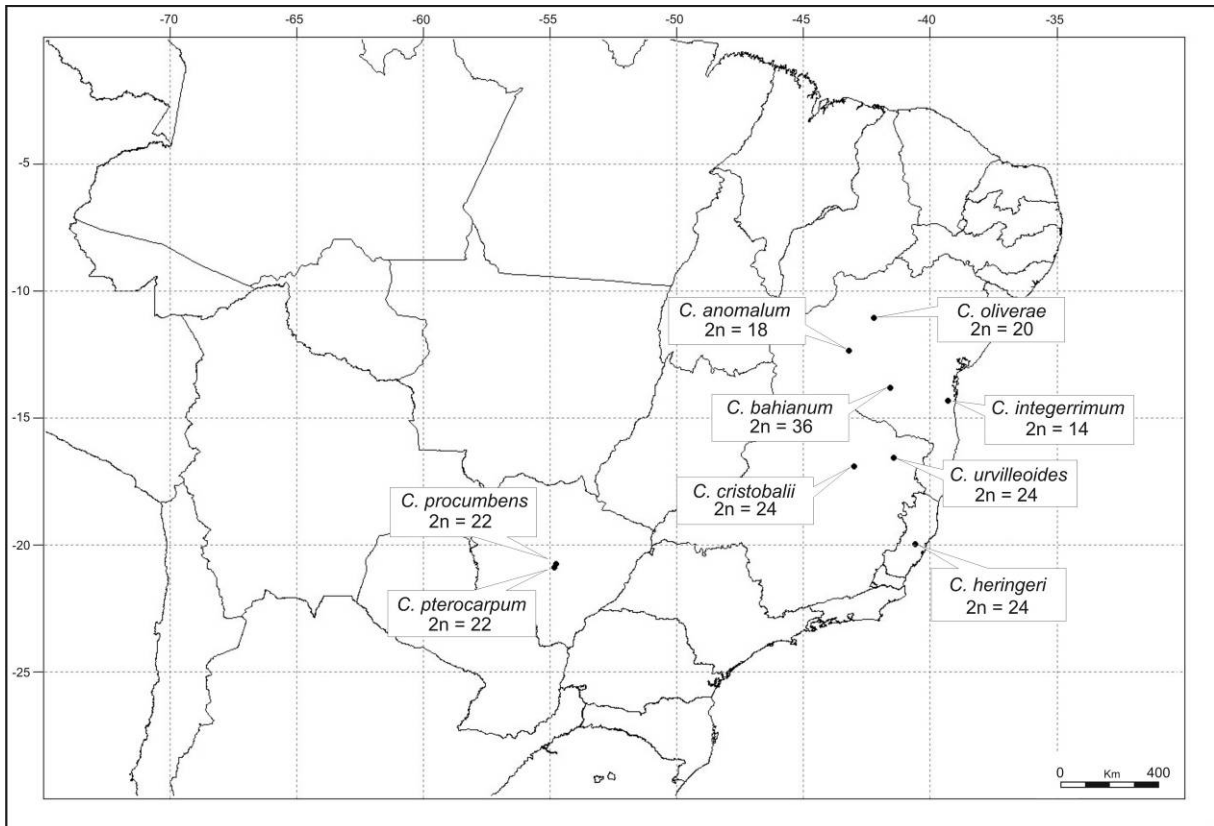


Figura 8. Localização geográfica e números cromossômicos (2n) das espécies estudadas de *Cardiospermum* que possuem uma distribuição restrita.

Capítulo 4.

Differences and resemblances in banding patterns and ribosomal DNA distribution in four species of Paullinieae tribe (Sapindaceae)

Artigo publicado em *Cytologia* (The Japan Mendel Society)

Recebido 11 Junho 2008, aceito 12 Setembro 2008

Urdampilleta JD, Ferrucci MS, Vanzela ALL & Forni-Martins ER, 2008. Differences and Resemblances in Banding Patterns and Ribosomal DNA Distribution in Four Species of Paullinieae Tribe (Sapindaceae). *Cytologia*, 73: 283-291.

Differences and resemblances in banding patterns and ribosomal DNA distribution in four species of Paullinieae tribe (Sapindaceae).

Summary

The tribe Paullinieae (Sapindaceae) is mainly neotropically distributed, and is characterized by apomorphic characters and considered a monophyletic natural group. Recently explored cytogenetical aspects suggest that the disloid chromosomal reduction, the increase in the chromosomal size and the diversification of highly repetitive DNA sequences are associated with the karyotypic evolution of this tribe. This work compares patterns of chromosome banding and the distribution of ribosomal DNA 18S-5.8S-26S in *Cardiospermum grandiflorum* Sw., *Paullinia elegans* Cambess., *Urvillea chacoensis* Hunz. and *U. ulmacea* Kunth. The studied species share the presence of a pattern of terminal C-Giemsa bands, differentiated for characteristics of heterochromatic regions. Terminal AT-rich bands occurred in *C. grandiflorum* ($2n = 2x = 20$) and *U. chacoensis* ($2n = 2x = 22$). Differing from the others, *U. chacoensis* presented prominent bands in the majority of chromosomes. The polyploid cytotype of *U. ulmacea* ($2n = 8x = 88$) possessed terminal bands CMA⁺ and DAPI⁺, forming heterochromatic blocks constituted by GC- and AT-rich repetitive DNA. On the other hand, *P. elegans* ($2n = 2x = 24$) presented a pattern of neutral bands after staining with CMA₃/DAPI. The presence of GC-rich regions associated with 45S rDNA sites was a common characteristic in the studied species, nevertheless, variations in the NOR number might be useful for the differentiation of some species. Our results on karyological differences and resemblances of the studied species are discussed in relation to the systematics of the Paullinieae tribe.

Key words: Banding patterns, heterochromatin, karyosystematics, Paullinieae, rDNA genes, Sapindaceae.

Introduction

The tribe Paullinieae (Sapindaceae), with nearly 430 species, is mainly neotropically distributed, with important distribution centres in the southeast of Mexico, Amazonian, and Brazilian Central and Coast Plateau (Acevedo-Rodríguez 1993b). In relation to other tribes of Sapindaceae, Paullinieae is characterized by a set of apomorphic characters and is considered a monophyletic natural group (Acevedo-Rodríguez 1993b). The monophyletic nature of Paullinieae tribe is confirmed by means of molecular phylogenetics studies, emphasizing the close systematic relationship with the tribe Thouinieae (Harrington *et al.* 2005). According to the classification proposed by Radlkofer (1931-1934), the *Cardiospermum* L., *Houssayanthus* Hunz., *Lophostigma* Radlk., *Paullinia* L., *Serjania* Mill., *Thinouia* Triana & Planch and *Urvillea* Kunth genera are included in the Paullinieae tribe, however Acevedo-Rodríguez (1993b) suggested the inclusion of *Thinouia* in the Cupanieae tribe.

Some cytogenetical studies showing numbers, morphology and chromosomal length permit discussion of the karyotypic evolution in Paullinieae relative to other tribes of Sapindaceae (Ferrucci 2000a; Urdampilleta *et al.* 2006, 2007). These studies suggested that the dispoloid chromosomal reduction and an increase in the chromosomal size would be processes that intervened in the karyotypic evolution of this tribe (Hemmer & Morawetz 1990; Lombello & Forni-Martins 1998). On the other hand, in Sapindaceae, studies involving meiotic analysis, C-, NOR-, DAPI/CMA₃- banding and in situ hybridization to physically

locate repetitive DNA are limited. Previous results demonstrate a diversification in the quantity, type and location of heterochromatin segments in eight species of *Cardiospermum*, *Paullinia* and *Urvillea*, nevertheless, a similar pattern of terminal heterochromatin was observed in *C. grandiflorum* Sw. (Hemmer & Morawetz 1990), *U. chacoensis* Hunz., *U. ulmacea* Kunth (Urdampilleta *et al.* 2006) and *P. elegans* Cambess. (Urdampilleta *et al.* 2007).

In the present study, within the framework of chromosomal differentiation in Sapindaceae, we compare the karyotypes of four Paullinieae species with terminal heterochromatin, characterizing the differences and resemblances in the banding patterns. For this purpose *C. grandiflorum*, *P. elegans*, *U. chacoensis* and *U. ulmacea* were analyzed using fluorochrome banding with CMA₃/DAPI and fluorescence in situ hybridization by using ribosomal DNA as probes. The results obtained permitted continued discussion about chromosomal differentiation in Paullinieae.

Materials and Methods

The species and populations studied (*C. grandiflorum*, *P. elegans*, *U. chacoensis* and *U. ulmacea*) are included in Table 1 and vouchers were deposited at FUEL (Herbarium of the Universidade Estadual de Londrina, PR, Brazil), UEC (Herbarium of the Universidade Estadual de Campinas, SP, Brazil) and CTES (Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina).

Chromosome preparations and karyotype elaboration were made from root tips pretreated with 2 mM 8-hydroxyquinolein for 4-5 h at 15°C, fixed in 3:1 absolute ethanol and acetic acid for 24 h and stored at -20°C until use. Conventional analysis of chromosomes was performed using the HCl/Giemsa technique (Guerra 1983): root tips were hydrolyzed for 10

min in 1N HCl at 60°C and stained in 2% Giemsa at room temperature for 5–10 min. Chromosome measurements were obtained from at least five metaphases to determine karyotype formula (KF), diploid set length (DSL) and karyotype symmetry index (TF%) (Huziwara 1962).

For Giemsa C-banding, a procedure slightly modified according to Schwarzacher *et al.* (1980) was used. Root tips were digested with an enzyme mixture of 4% cellulase and 40% pectinase at 37°C; the chromosome spread was made in a drop of 45% acetic acid and the coverslip was subsequently removed with liquid nitrogen. After three days, slides were treated with 45% acetic acid at 60°C for 10 min, 5% Ba(OH)₂ at 25°C for 10 min, and 2xSSC at 60°C for 1 h 20 min. Some slides were stained with 2% Giemsa and mounted with Entellan (Merck) and other slides were aged for three more days at room temperature and sequentially stained with 0.5 mg/ml CMA₃ for 1.5 h and 2 µg/ml DAPI for 30 min and mounted in a medium composed of glycerol/McIlvaine buffer pH 7.0, 1:1 (v:v), plus 2.5 mM MgCl₂. The cells were photographed with Imagelink HQ ASA 25 or T-max ASA 100, both from Kodak.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) was carried out according to the methods of Heslop-Harrison *et al.* (1991) and Schwarzacher and Heslop-Harrison (2000) with minor modifications using p*Ta71* probe containing the 18S-5.8S-26S rDNA (Gerlach & Bedbrook 1979). This probe was labelled with biotin-14-dUTP (BioNick, Invitrogen) by nick translation. Slides were incubated in 100 µg/ml RNase, post-fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde, dehydrated in a 70 – 100% graded ethanol series and air-dried. In each slide 30 µL of hybridization mixture containing 100 - 200 ng of labelled probe, 50% formamide (15 µL), 50% polyethylene glycol (6 µL), 20xSSC (3 µL), 100 ng of calf thymus DNA (1 µL), and 10% SDS (1 µL) was applied. This hybridization mixture was previously denatured at 70°C for 10 min and immediately chilled on ice. Chromosome denaturation/hybridization was done

at 90°C for 10 min, 48°C for 10 min, and 38°C for 5min, using a thermal cycler (Mastercycler, Eppendorf), and slides were placed in a humid chamber at 37°C overnight. The hybridization sites of rDNA were detected with avidin-FITC and slides were counterstained and mounted with 25 µL of a solution of 50% antifade VectaShield (Vector Laboratories) and 50% glycerol/ McIlvaine buffer, pH 7.0/ 2.5 mM MgCl₂ solution (1:1, v:v), plus 1 µL of 2.5 µg/ml propidium iodide. Metaphases were photographed with Fuji Color 200 ISO film.

Results

Cardiospermum grandiflorum, with $2n = 20$ (Fig. 1A), had the lowest chromosome number in relation to studied species in this work, and it is the only species in the genus with $x = 10$ (Table 1). In *Paullinia elegans* $2n = 2x = 24$ was observed (Fig. 1B), however in the *Urvillea* species studied $x = 11$ was seen, with $2n = 22$ being observed in *U. chacoensis* (Fig. 1C) and $2n = 88$ in *U. ulmacea* (Fig. 1D).

The karyotypes of the studied species demonstrated some differences (Table 1, Fig. 3). The mean chromosomal sizes were similar in *C. grandiflorum* and *P. elegans*. Whereas *U. chacoensis* and *U. ulmacea* presented relatively smaller chromosomes. All four species were characterized by the absence of acrocentric chromosomes. The karyotypes of all four species were moderately asymmetric, and TF % presented a variation from 34 to 41.7 %. *Urvillea chacoensis* is the species with the most symmetric karyotype (TF% = 41,7), having only metacentric chromosomes. *Urvillea ulmacea* had a more asymmetric karyotype, with minor TF value (TF% = 34,0) and metacentric and submetacentric chromosomes (Table 1, Figure 3). Some submetacentric chromosomes were also observed in *C. grandiflorum* and *P. elegans*.

In *C. grandiflorum*, terminal bands in long arms of seven chromosomal pairs were observed after the C-Giemsa banding. These bands corresponded to AT-rich heterochromatin observed after the staining with DAPI (Figs. 2A). On the other hand, GC-rich bands were located in terminal regions of short arms in two chromosomal pairs (Figs. 2B and 3). Several C-Giemsa bands were observed in the *P. elegans* karyotype. These bands were equilocally distributed in terminal regions of the long arms of the majority of the chromosomes, standing out in pair 1 and 2, which possessed bands in the terminal regions of both arms (short and long), and pair 7 that possessed a subterminal band (Figs. 2D and 3). This heterochromatin behaved neutrally after the CMA₃/DAPI staining. On the other hand, GC-rich bands were recognized in the terminal regions of short arms of three chromosomal pairs associated with the NOR (Figs. 2E and 3). A large amount of heterochromatin was found in the *U. chacoensis* karyotype: six chromosomal pairs presented C-Giemsa terminal bands in the short and long arms, and in another two pairs they were presented only in the long arm (Fig. 2G). The heterochromatin, in this species, was constituted by AT-rich repetitive DNA sequences, demonstrated with DAPI staining and it was also possible to detect minute DAPI⁺ bands in minor chromosomes (Fig. 2H). Nevertheless, other GC-rich repetitive DNA sequences were recognized as CMA₃⁺ terminal bands in the short arms of three chromosomal pairs (Figs. 2I and 3). *Urvillea ulmacea* also presented terminal and some proximal heterochromatin blocks, and several GC-rich bands (Fig. 2K) were associated with other AT-rich bands (Fig. 2L) forming heterochromatin blocks (Fig. 3).

Differences were detected for the number of NOR in the studied species. Two pairs of chromosomes carrying 45S rDNA were found in *C. grandiflorum*, whereas *P. elegans* and *U. chacoensis* were differentiated by possessing three pairs of chromosomes carrying NOR. On

the other hand, the *U. ulmacea* octoploid cytotype presented approximately 24 45S rDNA sites. The 45S rDNA sites were associated with GC-rich DNA regions in the studied species.

Discussion

Chromosome number and karyotypes

The chromosome numbers reported in this work confirm previous results in Paullinieae (Ferrucci 1981, 1989, 2000a; Urdampilleta *et al.* 2006). According to previous chromosomal counts, the basic number in the tribe Paullinieae varies among $x = 7$ and $x = 14$ ($x = 8$ and $x = 13$ are absent), always with the conservation of $2n = 24$ ($x = 12$) in *Houssayanthus* and *Serjania* (Ferrucci 2000a).

The reduction of the basic number of chromosomes and the increase in chromosomal size are processes that characterize the tribe Paullinieae, separating it from other tribes of Sapindaceae (Hemmer & Morawetz 1990; Lombello & Forni-Martins 1998), and also represent important chromosomal derivative characters that can be used in phylogenetic studies. *Cardiospermum* and *Urvillea* are very closely related, and this is reflected in their morphological and chromosomal characters. These genera are the only ones that present inflated septifragal capsules with a membranous pericarp and a dry aril (Weckerle & Rutishauser 2005), as well as a diversification in the basic chromosome number ($x = 7, 9, 10$ and 11 in *Cardiospermum* and $x = 11$ and 12 in *Urvillea*) in relation to other genera of the tribe. The occurrence of polyploid series is infrequent in Sapindaceae. *Paullinia* and *Urvillea* are the only genera of Paullinieae in which a polyploid series was reported. Species with $2x$,

4x and 8x were found in *Urvillea* (Ferrucci 1981; Urdampilleta *et al.* 2006) and $2n = 210$ was observed in *P. cupana* (Freitas *et al.* 2007).

Heterochromatin and banding patterns

The banding pattern in the species studied can be classified into two major groups: the first group, with CG rich regions associated with the nucleolar organizer regions (NOR) observed as CMA⁺ bands and detected with the pTa71 probe, which localize 18S-5.8S-26S rDNA, and the second group, with terminal heterochromatin blocks observed with C-Giemsa and CMA₃/DAPI banding not associated with NOR. The CG rich regions associated to NOR contain gene sequences that the term “heterochromatin constitutive” should not be applied to, since they could be active in interphase.

The CG rich regions associated with the nucleolar organizer regions (NOR) were detected with a pTa71 probe, which contains 18S-5.8S-26S rDNA of wheat. This relation was already confirmed in other species of *Paullinia* and *Urvillea* (Urdampilleta *et al.* 2006, 2007). In plants, frequently NOR have being associated with GC-rich DNA regions (Guerra 2000). Although the location and the constitution were preserved, differences in the numbers of NOR were detected. The octoploid cytotype *U. ulmacea* presented approximately 24 sites of 18S-5.8S-26S rDNA and the non-elimination of rDNA loci suggest that this population corresponds to a recent polyploid event (Urdampilleta *et al.* 2006).

The terminal heterochromatin presented in the species studied varied in quantity and affinity for CMA₃/DAPI fluorochromes, which allowed for the distinguishing of the four species studied. Our results agree with the observations of Hemmer and Morawetz (1990) for *C. grandiflorum*, that found AT-rich bands in terminal regions of seven chromosome pairs.

Otherwise, a large amount of AT-rich heterochromatin was also found in the majority of chromosomes in *U. chacoensis*. The banding pattern in *U. ulmacea* is particularly complex, since GC- and AT-rich regions were contiguous, and it was the only species that presented GC-rich regions not associated with NOR. The heterochromatin bands in *P. elegans* were visible with C-Giemsa banding, however no affinity was detected for CMA₃/DAPI fluorochromes which were named neutral bands by other authors (Guerra 2000).

Repetitive DNA can be a major component of the genome of plants, and quantitative changes of these sequences could be responsible for important modifications in the genome size of closely related species (Sanmiguel & Bennetzen 1998). Variations in repetitive DNA are a frequent source of changes in chromosomal size and structure, contributing to the karyotypical differentiation of species (Flavell 1986). The heterochromatin is formed by tandem, highly repeated DNA sequences, called satellite DNA, and their monomers, generally with 150 – 360 bp, that present 10^6 - 10^7 copies in the haploid genome (Macas *et al.* 2002). Different families of satellite DNA can be present in the genome of a species (Kubis *et al.* 1998; Sharma & Raina 2005). Frequently these heterochromatin blocks occupy similar chromosomal positions (patterns of equilocal bands), suggesting that sequences of repetitive DNA might be accumulated preferentially in regions where homologous and non-homologous chromosomes interact physically. Particularly, repetitive DNA is characterized by non-Mendelian heredity, with “rolling circle”, “slippage replication” and “unequal crossing-over” being some of the mechanisms proposed for the amplification of these sequences (Flavell 1986). On the other hand, Schweizer and Loidl (1987) proposed a heterochromatin dispersion model based on amplification and translocation of repetitive DNA between non-homologous chromosomes, which takes place during interface and favoured by Rabl orientation.

The studied species shared a similar pattern of equilocal bands, with the terminal regions being preferential sites for the accumulation of repetitive DNA. Studies in *Koelreuteria* Laxm. (Koelreuterieae) species demonstrated the existence of GC-rich satellite DNA in a pattern of equilocal bands that promoted the karyotypic differentiation of species (Urdampilleta *et al.* 2005). In *U. chacoensis* and *U. ulmacea*, as well as in other species of the Paullinieae tribe, the presence of different heterochromatin types could be a result of the accumulation of different satellite DNA families (Urdampilleta *et al.* 2006). Hemmer and Morawetz (1990) admitted that AT-rich regions could represent a character derived in the tribe. In addition, our results demonstrated differences and resemblances in the pattern of bands in Paullinieae, whereas heterochromatin blocks happened preferentially in terminal regions, but different families of repetitive DNA: AT-, GC-rich and neutral, intervened in the karyological differentiation of species in Paullinieae.

In summary, *C. grandiflorum*, *P. elegans*, *U. chacoensis* and *U. ulmacea* showed the terminal banding pattern and 45S rDNA loci associated with GC-rich regions, however, in these species there are significant differences in quantity and type of heterochromatin. The results obtained in this work suggest that the chromosomal location of repetitive DNA sites can be conserved by existing changes in the constitution and number of chromosomes, and that the dispersion of repetitive DNA occurred between non-homologous chromosomes by making an equilocal band pattern.

Acknowledgments

The authors are grateful to Ben Machado for improving the English version and the Brazilian agencies CAPES, CNPq e FAPESP for financial support.

Table 1. Karyotypic description, banding patterns and number of rDNA 45S sites in the all four studied species. DSL: diploid set length (μm). TF%: karyotype asymmetry index.

Species	2n	Karyotype formulae	DSL (σ)	Size chromosome (μm)		TF (%)	Banding pattern			rDNA 45S	Locality
				Mean	Range		AT rich	GC rich	neutra		
<i>C. grandiflorum</i>	20	6m + 2sm + 2st	36.6 (4.7)	1.8	2.3 - 1.3	36.2	++			2	Argentina. Misiones. Urdampilleta <i>et al.</i> 202, Posadas (FUEL). Brasil. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 213, Paiquerê (FUEL).
<i>P. elegans</i>	24	4m + 4sm + 4st	43.7 (4.4)	1.8	2.6 - 1.2	34.5		++		3	Argentina. Misiones. Urdampilleta <i>et al.</i> 147, Posadas (FUEL 34728). Brasil. Paraná. Urdampilleta <i>et al.</i> 131, 1° de Maio (FUEL 34715). São Paulo, Obando <i>et al.</i> 289, Campinas. (UEC)
<i>U. chacoensis</i>	22	11 m	35.7 (2.7)	1.6	2.1 - 1.2	41.7	+++			3	Bolivia: Dpto. Chuquisaca. Ferrucci <i>et al.</i> 1763, Prov. Calvo (CTES); Dpto. Santa Cruz. Ferrucci <i>et al.</i> 1912, Prov. Chiquitos (CTES).
<i>U. ulmacea</i>	88	15 m + 29 sm	122.9 (3.2)	1.4	2.1 - 0.7	34.0	++	++		~ 12	Brazil: Paraná. Urdampilleta 192, Londrina (FUEL); Urdampilleta <i>et al.</i> 246, Paiquerê (FUEL).

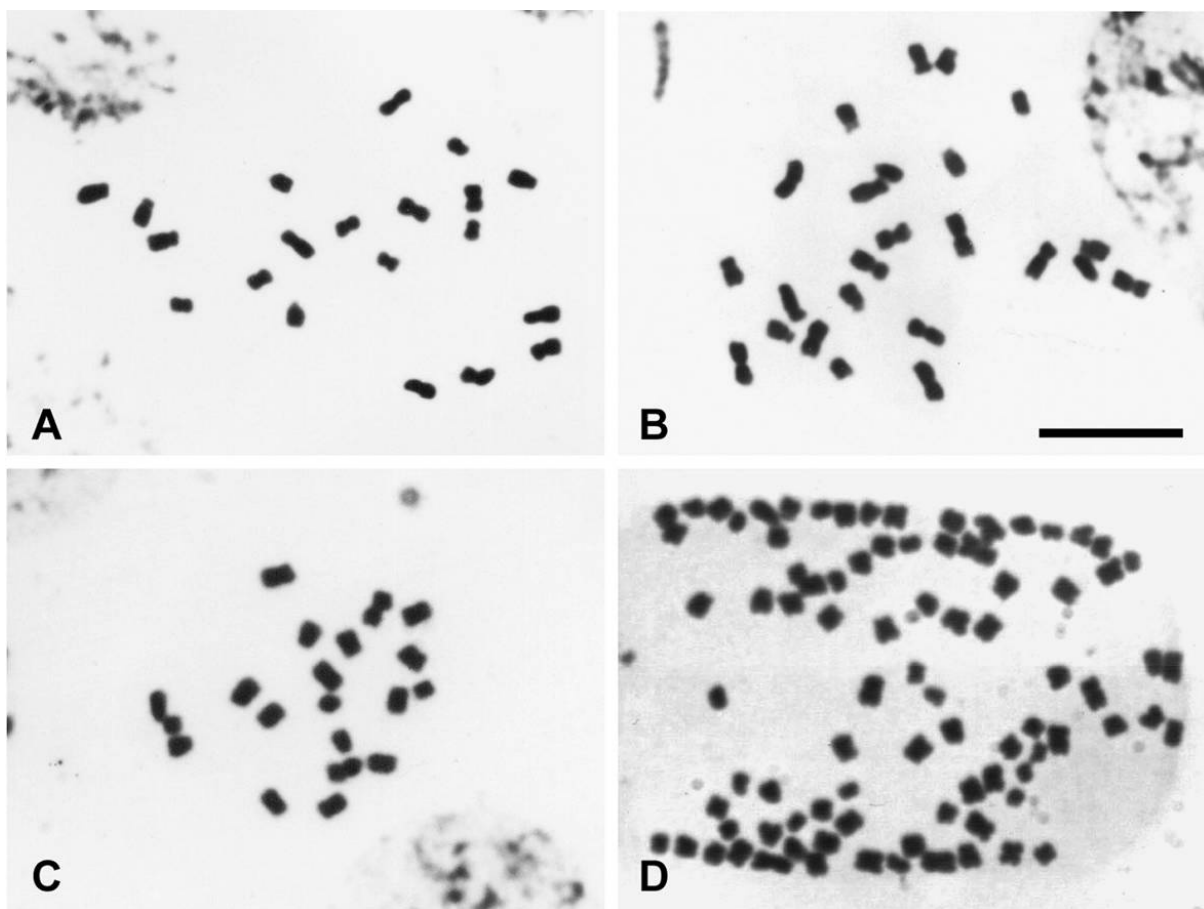


Figure 1. Conventional staining in Paullinieae species. A, *C. grandiflorum* ($2n = 20$); B, *P. elegans* ($2n = 24$); C, *U. chacoensis* ($2n = 22$); D, *U. ulmacea* ($2n = 88$). Bar = 10 μm .

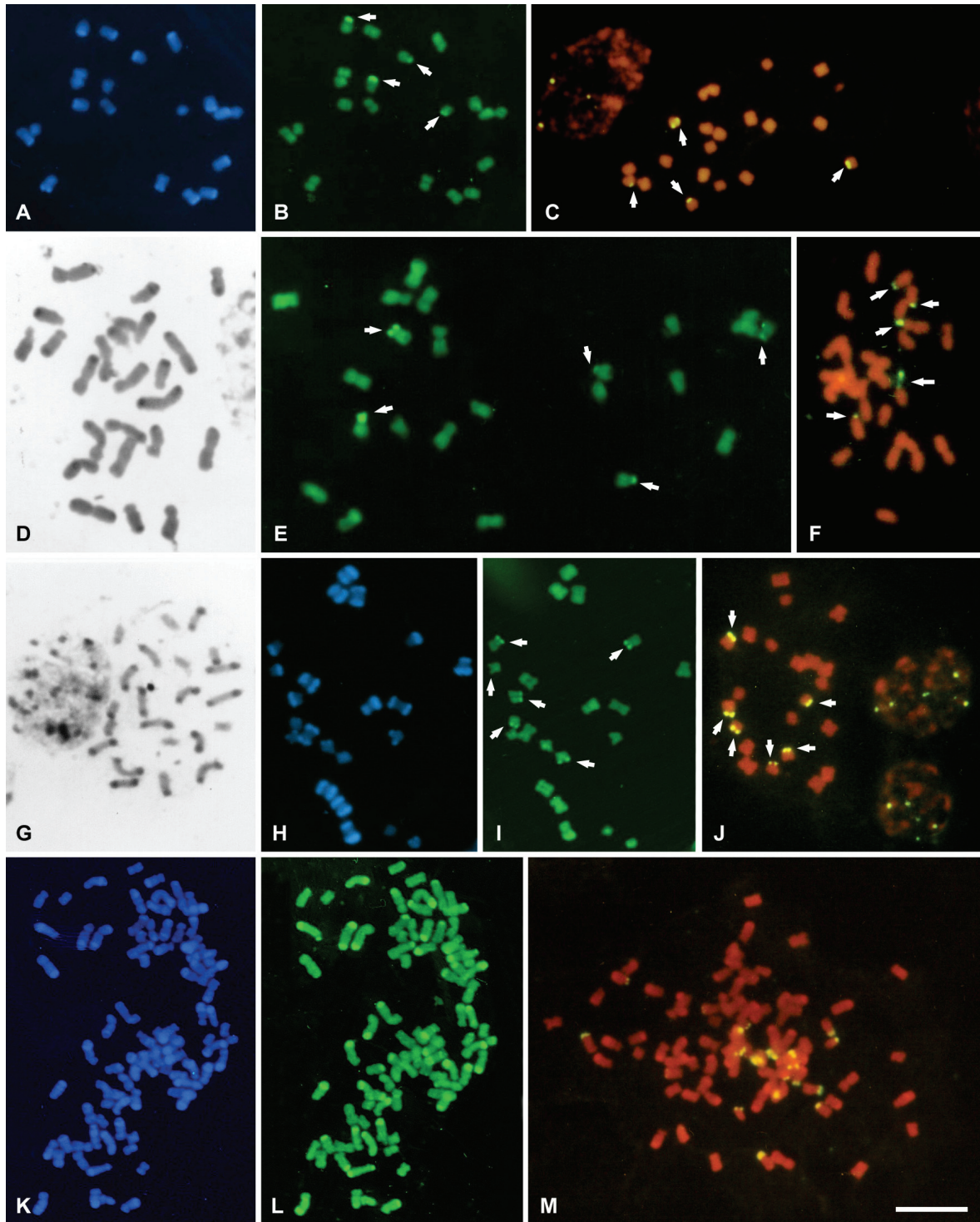


Figure 2. Chromosome banding and FISH in Paullinieae species. C-DAPI banding (A), C-CMA₃ banding (B) and FISH with pTa71 probe (C) in *C. grandiflorum*. Giemsa C-banding, (D), C-CMA₃ banding (E) and FISH with pTa71 probe (F) in *P. elegans*. Giemsa C-banding, (G), C-DAPI banding (H), C-CMA₃ banding (I) and FISH with pTa71 probe (J) in *U. chacoensis*. C-DAPI banding (K), C-CMA₃ banding (L) and FISH with pTa71 probe (M) in *U. ulmacea*. Bar = 10 μ m.

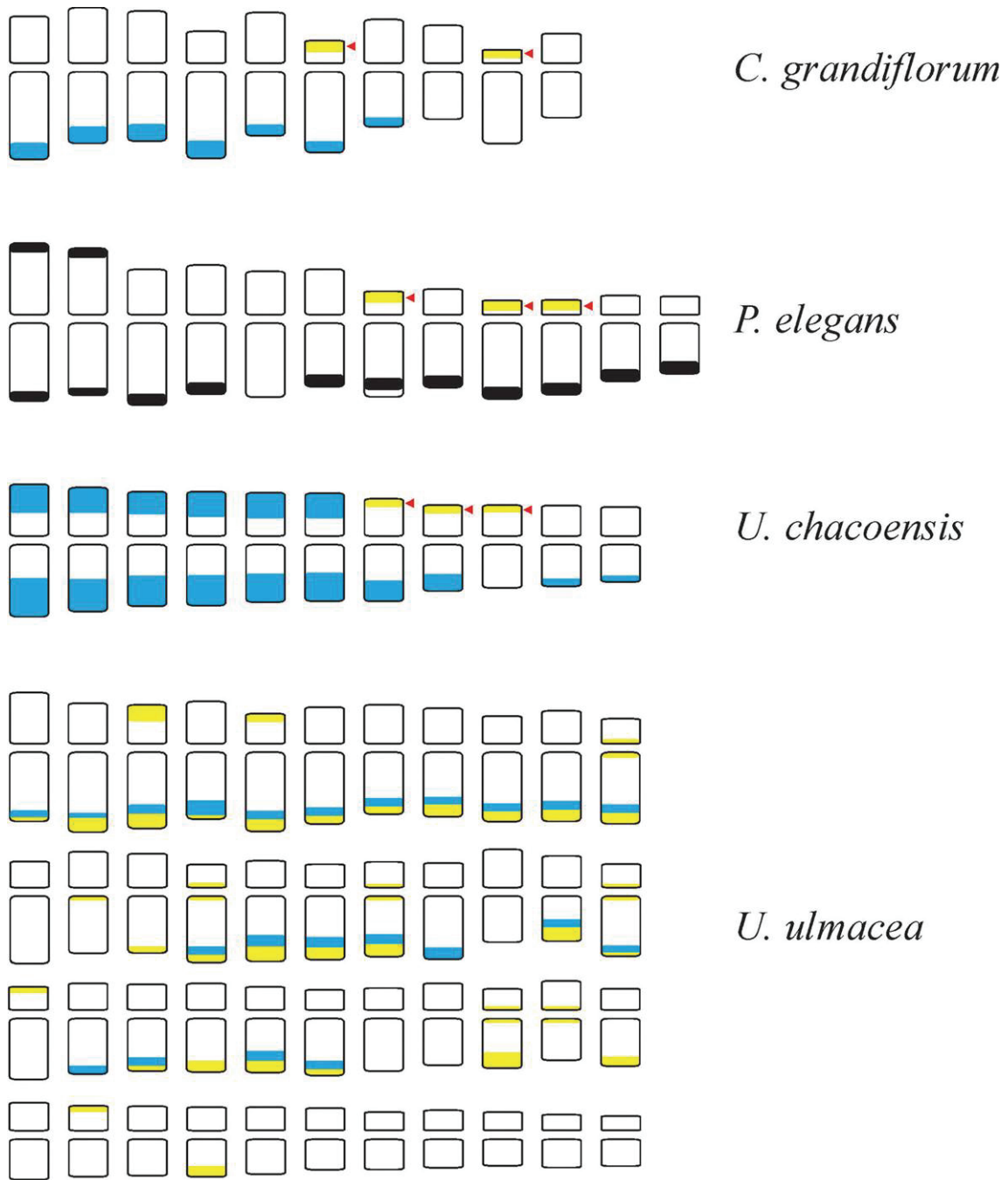


Figure 3. Idiograms of the species of Paullinieae studied: ■ = AT rich regions; ■ = GC rich regions; ■ = neutral C-bands; ▲ = 45S rDNA sites. Bar = 5 μm.

Capítulo 5.

Molecular and cytogenetic characterization of an AT-rich satellite DNA family in *Urvillea chacoensis* Hunz. (Paullinieae, Sapindaceae)

Artigo publicado em *Genetica* (Springer, Netherlands), ISSN: 0016-6707 (print version)
ISSN: 1573-6857 (electronic version)

Recebido 14 Fevereiro 2008, aceito 1 Novembro 2008.

Urdampilleta JD, de Souza AP, Schneider D, Vanzela ALL, Ferrucci MS & Forni-Martins ER, 2008. Molecular and cytogenetic characterization of an AT-rich satellite DNA family in *Urvillea chacoensis* Hunz. (Paullinieae, Sapindaceae). *Genetica*, DOI 10.1007/s10709-008-9332-0.

Molecular and cytogenetic characterization of an AT-rich satellite DNA family in *Urvillea chacoensis* Hunz. (Paullinieae, Sapindaceae)

Abstract

Urvillea chacoensis is a climber with $2n = 22$ and some terminal AT-rich heterochromatin blocks that differentiate it from other species of the genus. The AT-rich highly repeated satellite DNA was isolated from *U. chacoensis* by the digestion of total nuclear DNA with *Hind*III and *Xba*I and cloned in *E. coli*. Satellite DNA structure and chromosomal distribution were investigated. DNA sequencing revealed that the repeat length of satDNA ranges between 721 and 728 base pairs, the percentage of AT-base pairs was about 72-73% and the studied clones showed an identity of 92.5-95.9%. Although this monomer has a tetranucleosomal size, direct imperfect repetitions of approximately 180 bp subdividing it in four nucleosomal subregions were observed. The results obtained with FISH indicate that this monomer usually appears distributed in the terminal regions of most chromosomes and is associated to heterochromatin blocks observed after DAPI staining. These observations are discussed in relation to the satellite DNA evolution and compared with other features observed in several plant groups.

Keywords: DAPI, FISH, heterochromatin, karyotype, satellite DNA, *Urvillea*.

Introduction

Urvillea Kunth (Paullinieae, Sapindaceae) comprises 17 species and is widely distributed in the neotropical regions of America, from southern United States to northern Argentina (Ferrucci 2006). *Urvillea* has two basic chromosome numbers, $x = 12$ (*Stenelytron*), with a single diploid level, and $x = 11$ in section *Urvillea*, with diploid, tetraploid and octaploid levels (Ferrucci 2000a; Lombello & Forni-Martins 1998; Urdampilleta *et al.* 2006). *Urvillea chacoensis* Hunz. is a climber that occurs in “*chaqueña*” regions from Argentina, Brazil and Paraguay. As the other species of the *Urvillea* section, its diploid number is $2n = 22$ (Ferrucci 2000a; Urdampilleta *et al.* 2006), but it is cytogenetically differentiated by the presence of large terminal AT-rich heterochromatin blocks and three chromosome pairs bearing NOR (Urdampilleta *et al.* 2006).

Highly repetitive DNA appears to be one of the main components of plant genomes, and changes in these sequences may be responsible for the variations in genome size and karyotypical features (Flavell 1986; Sanmiguel & Bennetzen 1998). Different types of repetitive DNA exist within each genome, and the satellite DNA (satDNA), which is formed by tandemly arranged monomers of tens to thousands base pairs (Charlesworth *et al.* 1994), often constitutes heterochromatin blocks up to 100 Mb. Additionally, the whole heterochromatin of a genome can be composed of different families of satellite DNA (Kubis *et al.* 1998; Sharma & Raina 2005), which can also be located or accumulated in specific chromosomal positions (Flavell 1986). Some new sequences of satDNA have recently been reported and a database was created to understand the evolution and distribution of satDNA in plant genomes (Macas *et al.* 2002). Since satDNA can be species-specific or typical to some groups of species (Schmidt *et al.* 1991; Svitashv *et al.* 1994), it represents a useful tool in the field of taxonomy.

Different techniques can be used to isolate Satellite DNA, as centrifugation in density gradients (Deumling 1981), screening of fractions referred to as low C_0t DNA (Ho & Leung 2002; Neumann *et al.* 2001), purification and cloning of band fragments obtained by gel electrophoresis of enzyme-digested genomic DNA (Ganal & Hemleben 1986; Kato *et al.* 1984; Lakshmikumaran & Ranade 1990; Lorite *et al.* 2001) and genomic self-priming PCR (GSP-PCR) (Buntjer & Lenstra 1998; Macas *et al.* 2000). Since we intended to characterize and localize a satellite DNA family of *U. chacoensis in situ*, we isolated and characterized satDNA sequences by purifying and cloning fragments of enzyme-digested genomic DNA. To do so, this marker was FISH mapped and the results were matched with the distribution of 45S rDNA loci and the heterochromatin pattern obtained with DAPI.

Material and Methods

Plant material. Seeds of *U. chacoensis* obtained from the voucher specimen *U. chacoensis*: Bolivia. Dpto. Chuquisaca. Prov. Calvo, 22 km N de Tarairí camino a Boyuibe, 18VII 2003, Ferrucci *et al.* 1763, deposited at the herbarium of the Instituto de Botánica del Nordeste (CTES), Argentina, were collected and cultivated in pots under greenhouse conditions.

Isolation of genomic DNA, cloning and sequencing of repetitive DNA fragments. Leaf genomic DNA was isolated according to the method described by Hoisington *et al.* (1994) and digested with *Hind*III and *Xba*I. The selected bands of about 750 bp were eluted and purified from the agarose gel. The fragments of repetitive DNA were cloned using *Escherichia coli* DH5 α as host and pBluescript KS plus (Stratagene) as vector. Colonies containing

recombinant plasmids were identified for selection on LB agar medium supplemented with X-gal and IPTG. Recombinant plasmid was isolated using alkaline miniprep procedure and the insert nucleotide sequences were determined with an ABI377 automated DNA sequencer (Applied Biosystems). Sequences were analysed with Lasergene 7 (DNASar, Madison, WI) and aligned by using the ClustalW option of the MegAlign program.

Preparation of mitotic chromosomes. Root tips were pretreated with 2 mM 8-hydroxyquinolin for 4-5 h at 15°C, fixed in ethanol-acetic acid (3:1, v:v) and digested at 37°C in a solution composed of 2% cellulase and 20% pectinase. After squashing the meristems in a drop of 45% acetic acid, the preparations were frozen in liquid nitrogen and the coverslips were removed. To identify AT-rich heterochromatin blocks, slides were stained with 2 mg/ml DAPI for 30 min and mounted with glycerol/McIlvaine buffer pH 7.0, 1:1 (v:v), plus 2.5 mM MgCl₂.

Fluorescent in situ hybridization. To compare the distribution of satDNA sequences in relation to genes of rDNA and to DAPI heterochromatin pattern, we used probes marked with nick translation. Recombinant plasmids isolated by alkaline miniprep containing 18S-5.8S-26S rDNA of wheat (p*Ta71*) (Gerlach & Bedbrook 1979) was labeled with biotin-14-dUTP (Bionick, Invitrogen) and the cloned fragments of satDNA were labeled with DIG (DIG Nick translation mix, Roche). *In situ* hybridization followed the protocols of Heslop-Harrison *et al.* (1991) and Schwarzacher and Heslop-Harrison (2000). Slides were incubated in 100 µg/ml RNase, post-fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde, dehydrated in a 70 – 100% graded ethanol series and air-dried. Later, 30 µl of the hybridization mixture (4 – 6 ng/µl of probe, 50% (v/v) formamide, 10% (w/v) dextran sulfate, 3.3 ng/µl of calf thymus DNA, 2xSSC and 0.3% (w/v) SDS), previously denatured at 70°C for 10 min, were applied. Samples were

denatured/hybridized at 90°C for 10 min, 48°C for 10 min and 38°C for 5 min, using a thermal cycler (Mastercycler, Eppendorf) and the slides were kept overnight in a humid chamber at 37°C. Hybridization signals were detected with avidin-FITC (Sigma) for p*Ta71* and anti-DIG-Rhodamine (Roche) for satDNA. The slides were counterstained with DAPI and mounted with 25 µl of VectaShield (Vector Laboratories). Photomicrographies were obtained with a BX51 Olympus coupled to an Evolution MT CCD photosystem and Image ProPlus v6 software was used to capture the images.

Results

Isolation of *Uch725* satellite DNA

The genomic DNA of *U. chacoensis* digested with *Hind*III and *Xba*I showed clear electrophoretic bands at approximately 750 and 1500 bp (Fig. 1), indicating the presence of tandemly arranged repetitive elements in the genome. Such band pattern suggested the presence of satDNA with a site for *Hind*III and another one for *Xba*I in the same repetitive units. The 750 bp repetitive DNA fragments cloned and sequenced represent monomers of satDNA with approximately 725 bp, since they ranged between 721 to 728 bp in all the studied clones. The p*Uch1*, p*Uch6* and p*Uch8* clones contained the monomer element digested with *Hind*III, and the p*Uch11*, p*Uch13* and p*Uch15* clones contained the monomer element digested with *Xba*I. Fig. 2 shows the aligned nucleotide sequences of the studied clones and a sequence analysis revealed some differential characteristics of these sequences. The satDNA family was thus named *Uch725*. This repetition unit possesses a restriction site for *Hind*III and another one for *Xba*I, separated by 53 to 54 bp, which allows to obtain fragments of equal size

after the digestion of the genomic DNA. The analyzed sequences were highly AT-rich, with 72.1 to 73.2% of A or T, and an identity of 92.5 - 95.9% was observed in the studied clones.

Although no significant inverted repetition was detected within the repetition units, we observed direct imperfect repetitions of approximately 180 bp. These subrepetitions allow to divide the monomer in four sub-regions (Fig. 2). The alignment of these sub-regions (Fig. 3A) showed an identity of about 70 – 80% (Fig. 3B).

Karyotypical features in *U. chacoensis*

Urvillea chacoensis, with $2n = 22$ chromosomes, which are mostly metacentrics, showed several large terminal heterochromatic blocks after DAPI staining (Fig. 4A). The six longest chromosome pairs showed heterochromatin blocks in both terminal regions, while the smallest chromosomes showed small bands at their tips or no band at all. This banding pattern indicates the presence of a high proportion of AT-rich heterochromatin, usually located in the subtelomeric regions. FISH using the p*Ta71* probe (18-5.8-26S rDNA) located terminal signals in the short arms of three chromosome pairs (five sites were observed in Fig. 4B, 4D). DAPI⁺ bands were not observed in the short arms in NOR carrier chromosomes.

The DAPI banding pattern coincided with the hybridization sites of the p*Uch6* probe (Fig. 4). The hybridization signals with the p*Uch6* probe were detected in the two terminal regions of the six largest chromosome pairs. Two chromosome pairs exhibited p*Uch6* signals in the terminal region of the long arm, and of three small chromosome pairs, only one showed reliable hybridization signals in both terminal regions. Some chromosomes presented hybridization signals with both the p*Uch6* and p*Ta71* probes, but p*Ta71* hybridized at terminal regions of short arms, while p*Uch6* hybridized at long arms (Fig. 4B, 4C and 4D).

Discussion

The results obtained with DAPI banding and *in situ* hybridization with the pTa71 probe coincide with the observations by Urdampilleta *et al.* (2006) for *U. chacoensis*. In addition, in our study, the coincident DAPI banding pattern and FISH with satDNA probes suggest that this satellite DNA represents a structural component of the heterochromatin blocks within the *U. chacoensis* genome. Our results confirmed the presence of a high proportion of subterminal AT-rich heterochromatin with an equilocal distribution.

According to Urdampilleta *et al.* (2006), some karyotypical features in *U. chacoensis* are important and allow to distinguish this species from other species of the *Urvillea* genus. *Urvillea laevis* and *U. filipes*, for example, do not present C-bands, but these authors reported small, scarce DAPI⁺ sites in *U. laevis*. On the other hand, *U. ulmacea* showed abundant terminal C-bands constituted by CMA₃⁺, and DAPI⁺ bands in several chromosomes. GC-rich terminal regions (CMA₃⁺) may be associated to NORs in *U. chacoensis*, but not in *U. ulmacea* (Urdampilleta *et al.* 2006). These results also confirm that the heterochromatin is not homogeneous and can vary both qualitatively and quantitatively among the species, within a same group (Guerra 2000), valuing these features as taxonomic markers.

The occurrence of AT-rich terminal repeated sequences is a frequent characteristic in plant genomes (Flavell 1986; Kubis *et al.* 1998; Sanmiguel & Bennetzen 1998). The sequence analysis of plant genomes also emphasizes that approximately 60% of the satDNA families studied are AT-rich sequences (Macas *et al.* 2002) and the comparison of banding patterns in different plant groups suggests that the proportion of species with AT-rich heterochromatin is even higher (Guerra 2000). These data thus suggest that the distribution and chemical

composition of these sequences are not casual and might be related to still unknown functions of the genome structure.

In plants, the size of the satellite DNA usually varies between 135 - 195 and 315 - 375 pb, corresponding to the length of mono- and dinucleosomes (Macas *et al.* 2002; Sharma & Raina 2005). However, some plants have satellite DNA with monomers longer than 600 bp. *Secale cereale*, for example, presents satDNA with units of repetition of 3900 bp (Langdon *et al.* 2000). In *U. chacoensis*, monomers of the *Uch725* family show a size similar to that of the satDNA found in *Aegilops speltoides* (Anamthewat-Jonsson & Heslop-Harrison 1993), *Rumex acetosa* (Shibata *et al.* 2000), *Sinapis arvensis* (Kapila *et al.* 1996). Nevertheless, no homology was found in the GenBank and EMBL databases for *Uch725*, indicating that these sequence may be typical of *Urvillea* group.

Heterochromatin was first identified by Heitz (1928) as a cytological event to describe condensed regions in the interphase. Although these structures have long been considered to be DNA without any function, different functions have been attributed to them these last decades (Sýkorová *et al.* 2001; Yunis & Yasmineh 1971), which guarantees their maintenance. Both in mammalian and plant cells, bulk chromatin presents a nucleosome periodicity of 180 ± 5 bp (Kralovics *et al.* 1995; Vershinin & Heslop-Harrison 1998) and the satDNA monomers often correspond to mono- or dinucleosomes (135 and 195 or 315 and 375 bp) (Macas *et al.* 2000; Sharma & Raina 2005). Therefore, the satDNA could provide structural genetic codes for the chromatin packing (Trifonov 1989). Sýkorová *et al.* (2001) found that satDNA sequences favor the transition between telomeric domains and internal chromosomal regions, acting directly in the telomeric stabilization and regulation of genes from subterminal regions. As in *U. chacoensis*, various families of repetitive DNA occur in the subterminal regions of plants and constitute the so called telomere-associated sequences or

TASs (Sharma & Raina 2005). In *U. chacoensis*, the presence of four subrepetitions of approximately 180 bp (tetranucleosome) within the satDNA monomer suggests that this substructure may be directly related to the establishment and packing of chromatin in terminal regions.

The phylogeny within Sapindaceae is not well resolved, since the tribal classification of many genera is confuse (Harrington *et al.* 2005). Studies on the presence and distribution of satellite DNA can contribute to understand the evolutionary aspects of the genome and thus to establish the taxonomy of some groups (Schmidt *et al.* 1991; Svitashv *et al.* 1994). The pUch6 probe, isolated from *U. chacoensis*, has being previously tested in other species of *Urvillea* and genera of Sapindaceae, tribe Paullinieae. For the time being no signals were displayed after of hybridization with pUch6 probe in *Cardiospermum grandiflorum* Sw., *Paullinia elegans* Cambess. and *U. ulmacea* Kunth. However by mean of PCR and by using primers designed from pUch6 were detected some products possibly related to Uch725 (Urdampilleta *et al.* ver Capítulo 6). As the genomic studies on this family are scarce, the isolation of Uch725 satellite DNA in *U. chacoensis* offers an important chromosomal marker, whose presence and distribution in related species and genera might contribute to the systematic of Paullinieae.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Brazilian agencies CNPq, CAPES, and FAPESP for financial support.

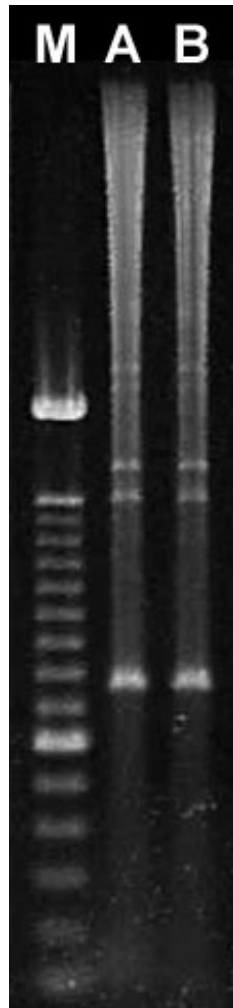


Figure 1. Restriction enzyme analysis of total genomic DNA of *U. chacoensis*. Genomic nuclear DNA digested with *Hind*III (A) and *Xba*I (B) and restriction fragments resolved on 1% agarose gel. M, 100 bp leader.

A

```

pUch6 I   CTTTTCTCCTAAGAATCCATAGTAATGGAATCTACTGAAATTTCCGTACAAGTATTTGAATT 62
pUch6 II  .....T.....C.....G....A...G.T.A.T..... 62
pUch6 III .....T.TT.....A..C.....TA..A..G.....A..A.T...T..... 62
pUch6 IV  .....A.....C..ATTCCT.....AA....A....G...A.T.T....GG..... 62

pUch6 I   TT-TTTT---CGCAATTCACTACAAGCAAAGCATAAATTCGGAAACCCTAATTGCACAGATT 120
pUch6 II  ..T....TTTT...T...G....G.....C.C.....T.....TG.....A.G.A..C 124
pUch6 III ..A.....--T...T...G..GT.T.....C.C.....T..T..A.....G.A..C 121
pUch6 IV  ..G.....--A.....G.....C.C.....T.....C.....A.A..C 121

pUch6 I   AGGAAATCTTAATATTTAATGTTCTTAAAATAAATCCCAAACCATTTTATTTATTTTATA 181
pUch6 II  T.....C.C.....G.A.....C...CA----.TA.C..A..C...G.CCGA. 181
pUch6 III .....CAC.....G.A.....G...A.T...TA.A.CA..C.....GA. 182
pUch6 IV  TA....C.....G.AT...CC...C...AA.T...TA.A.A.....C.AG 182
    
```

B

	I	II	III	IV
I	***	70.2	75.1	76.2
II		***	79.6	76.2
III			***	74.7
IV				***

Figure 3. Alignment of all four subrepetitions of *pUch6* (A) and percent identity of sequences of each sub-region (B).

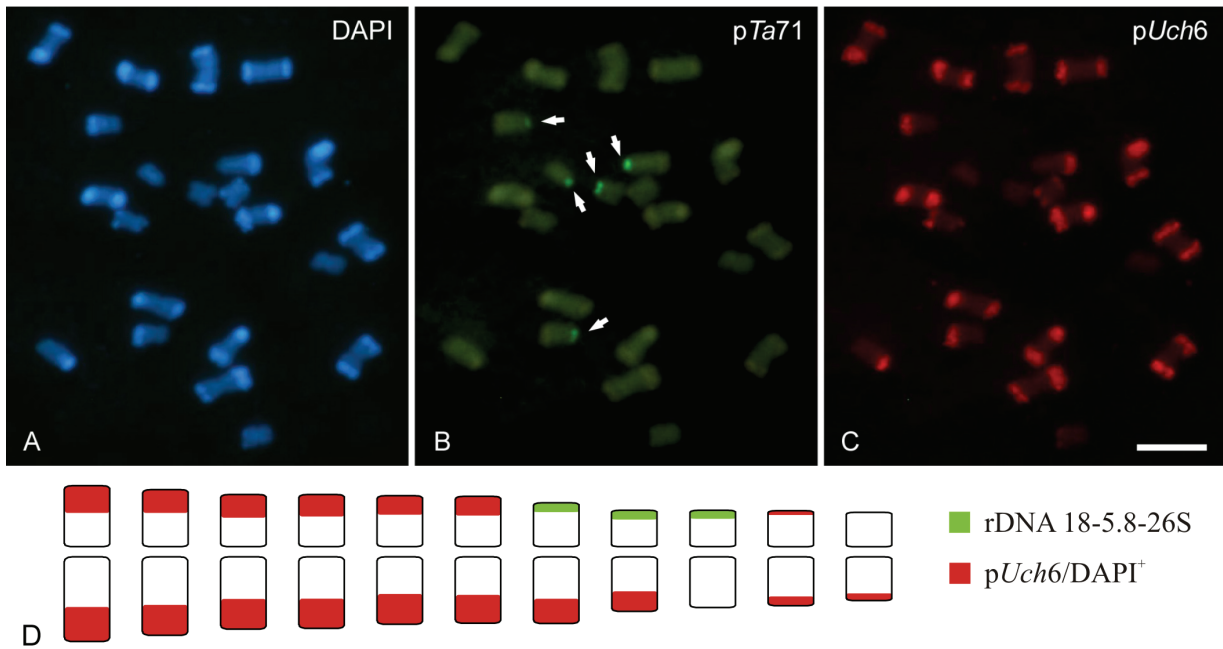


Figure 4. Chromosome banding and fluorescence *in-situ* hybridization in metaphasic chromosome of *U. chacoensis*. A, AT-rich heterochromatin terminal blocks observed with DAPI staining; B, localization of rDNA 18-5.8-26S using pTa71 probe; C, terminal distribution of *Uch725* family observed for FISH with pUch6 probe; and D, idiograms by indicating the localization of rDNA and satDNA. Bar = 5 μ m.

Capítulo 6.

Distribuição da família de DNA satélite *Uch725* em espécies da tribo Paullinieae (Sapindaceae)

Distribuição da família de DNA satélite *Uch725* em espécies da tribo Paullinieae (Sapindaceae)

Resumo

Paullinieae, a tribo com maior riqueza e diversidade em Sapindaceae, apresenta várias sinapomorfias em caracteres morfológicos e genéticos. É um grupo monofilético caracterizado por dois clados, o “clado *Serjania*” e o “clado *Paullinia*”. No clado *Paullinia* existe uma grande diversidade cariotípica, que combina a poliploidia, disploidia e variação no padrão de bandas. Estudos prévios em *Urvillea chacoensis* permitiram observar uma grande quantidade de heterocromatina e isolar sequências da família DNA satélite *Uch725* por digestão com enzimas de restrição. As seqüências de DNA satélite, ricas em bases AT, constituem blocos de heterocromatina que ocupam regiões cromossômicas terminais. As técnicas de hibridação (FISH e *Southern Blotting*) permitiram definir a sonda *pUch6* como um marcador específico do genoma de *U. chacoensis*. Mas, utilizando a técnica de PCR foram detectadas sequências de DNA satélite da família *Uch725* em outras espécies de tribo dos gêneros *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*, localizadas preferencialmente em regiões cromossômicas terminais, apresentando variabilidade qualitativa e quantitativa. A variação qualitativa faz destas sequências ferramentas taxonômicas úteis, combinando marcadores moleculares e cromossômicos em estudos filogenéticos na tribo Paullinieae

Introdução

Paullinieae é a tribo com maior riqueza e diversidade em Sapindaceae, representando um quarto das espécies da família. É caracterizada principalmente por várias sinapomorfias, como hábito trepador, presença de estípulas, flores zigomorfas e nectários florais formados por normalmente quatro ou raramente dois lóbulos nectaríferos (Acevedo-Rodríguez 1993b). A monofilia em Paullinieae é comprovada nas diferentes análises filogenéticas realizadas utilizando diversos tipos de caracteres (Acevedo-Rodríguez 1993b; Harrington *et al.* 2005). O estudo filogenético em Paullinieae realizado por Acevedo-Rodríguez (1993b) mostrou dois *clados* monofiléticos, o “*clado Serjania*”, formado pelos gêneros *Houssayanthus* Hunz., *Lophostigma* Radlk. e *Serjania* Mill, caracterizados pela presença de fruto tipo esquizocarpo, e o “*clado Paullinia*”, composto por *Cardiospermum* L., *Paullinia* L. e *Urvillea* Kunth, apresentando fruto tipo cápsula e o maior número de caracteres derivados.

Diferentemente das demais tribos de Sapindaceae, o número cromossômico $2n = 24$ é observado com maior frequência em Paullinieae (Ferrucci 2000a) e é considerado uma sinapomorfia nos gêneros *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea*, sendo este caráter notavelmente conservado em *Houssayanthus* e *Serjania*. Esta redução cromossômica é ainda mais acentuada em algumas espécies dos gêneros *Cardiospermum* ($x = 7, 9, 10, 11$ e 12) e *Urvillea* ($x = 11$ e 12). Interessantemente, $2n = 28$ é um caráter simplesiomórfico para *Thinouia* Triana & Planch. e *Lophostigma*, o que permite uma especulação sobre o traçado de uma possível via de redução cromossômica. Um segundo evento que caracteriza a tribo Paullinieae foi o aumento geral no tamanho cromossômico, sugerindo que um aumento no tamanho do genoma acompanhou a diferenciação deste táxon (Hemmer & Morawetz 1990; Lombello & Forni-Martins 1998). Esta variação do tamanho do genoma poderia estar relacionada com diferenças quali- e quantitativas nas seqüências de

DNA repetitivos (Hemmer & Morawetz 1990; Nagl & Fusening 1979). A partir do bandamento cromossômico é possível comprovar uma importante variabilidade em relação ao padrão de bandas heterocromáticas entre espécies próximas (Hemmer & Morawetz 1990; Urdampilleta *et al.* 2005, 2006, 2007, 2008b). A partir de estudos de *U. chacoensis* Hunz. foi possível observar uma grande quantidade de heterocromatina e isolar uma família de satDNA por digestão de DNA genômico com enzimas de restrição (Urdampilleta *et al.* 2009). As seqüências de DNA satélite são ricas em bases AT e os monômeros têm aproximadamente 725 pb. Este DNA satélite (denominado *Uch725*) constitui blocos de heterocromatina que ocupam regiões cromossômicas terminais. O principal objetivo deste estudo é avaliar a distribuição da família *Uch725* em espécies dos gêneros *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea* e a possibilidade de utilizar estas seqüências em estudos filogenéticos da tribo Paullinieae.

Materiais e Métodos

Foram analisadas espécies da tribo Paullinieae, representantes dos gêneros *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea* (Tabela 1). Os materiais testemunhas das amostras utilizadas foram depositados nos herbários CTES (Instituto de Botânica del Nordeste, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina) e UEC (Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas).

Extração e quantificação do DNA genômico

A extração do DNA foi conduzida conforme a metodologia descrita por Hoisington *et al.* (1994) com algumas modificações, utilizando tecido foliar fresco ou seco em silicagel. Esta metodologia envolve a extração do DNA a partir de material moído em cadinho de porcelana utilizando nitrogênio líquido para facilitar a quebra do tecido vegetal. O material vegetal moído foi colocado em tampão CTAB, que contém 100 mM de Tris, 700 mM de NaCl, 50 mM de EDTA, 1 % de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) e 140 mM de BME (B-mercaptoetanol), a 65°C durante 1h. O protocolo é seguido de duas extrações com clorofil (clorofórmio/álcool isoamílico, 24:1) resgatando sempre a fase aquosa. A precipitação do DNA foi realizada com isopropanol 100%. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante, e o pellet de DNA foi lavado em etanol 70° e re-suspendido em solução TE, colocando 1 µm de RNase 10 mg/ml.

Digestão e hibridização em membrana de nylon

Para a hibridização em membrana (*Southern Blotting*), o protocolo utilizado teve como base os métodos descritos por Sambrook *et al.* (1989). O DNA genômico de *C. corindum*, *C. grandiflorum*, *C. halicacabum* var *halicacabum*, *C. integerrimum*, *C. oliverae*, *C. procumbens*, *C. pterocarpum*, *P. elegans*, *U. chacoensis*, *U. glabra* e *U. ulmacea* foi digerido com a enzima *HindIII*, overnight a 37°C. Os fragmentos de DNA digerido foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e transferidos por capilaridade numa membrana de nylon (Biodyne B Membrane, KPL). A hibridização da membrana com o plasmídeo recombinante *pUch6* (Urdampilleta *et al.* 2009), marcado com biotina por *nick traslation* (Bionick, Invitrogen), ocorreu a 42°C overnight, sendo a sonda detectada com streptavidina conjugada com fosfatase

alcalina (Biotin Chromogenic Detection Kit, Fermentas). Todos os protocolos utilizados na hibridização em membrana foram desenvolvidos segundo as recomendações do fabricante do kit de detecção (Fermentas).

Amplificação de DNA satélite por PCR e sequenciamento

Com base na sequência de DNA satélite *Uch725*, descrita para *U. chacoensis* (Urdampilleta *et al.* 2009), foram desenhados *primers* específicos para a amplificação deste DNA satélite em outras espécies de *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*. Os pares de *primers* construídos (Tabela 2) foram testados para a amplificação do DNA satélite, utilizando condições tradicionais para a otimização da PCR. Os produtos de PCR foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Green (Invitrogen) e purificados utilizando sistema de purificação de produtos de PCR (Wizard SV Gel & PCR CleanUp Systems, Promega).

Obtenção de sondas marcadas e hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A sonda *pUch6* (Urdampilleta *et al.* 2009) marcada com biotina (Bionick, Invitrogen) foi utilizada para detectar sinais de FISH nas espécies *C. grandiflorum*, *P. elegans*, *U. glabra* e *U. ulmacea*. Também, os produtos de PCR com os pares de *primers* *pUc6-1/pUc6-2* e *Uch725-100* em *C. grandiflorum*, *P. elegans*, *U. glabra* e *U. ulmacea* foram purificados e marcados pela incorporação de biotina (Bionick, Invitrogen) ou digoxigenina (DIG nick translation kit, Roche) para utilização em FISH na própria espécie.

Os protocolos FISH foram desenvolvidos segundo a metodologia descrita por Schwarzscher & Heslop-Harrison (2000). As lâminas com cromossomos metafásicos foram obtidas por esmagamento de raízes pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 2mM por 4-5 h a 15°C, digeridas em solução de celulase 4% e pectinase 40% a 37°C durante 2 h e montadas em ácido acético 45%. As sondas foram detectadas com avidina-FITC (Sigma) ou Anti-DIG-Rhodamina (Roche). As lâminas foram montadas com *antifade* VectaShield (Vector Laboratories) e as fotografias foram feitas utilizando microscópio BX51 (Olympus), equipado com sistema de captura digital de imagem Evolution MT CCD e software Image ProPlus v6 (Media Cybernetics, Inc.).

Resultados

A partir de técnicas de FISH e *Southern Blotting* a sonda *pUch6* demonstrou ser um marcador específico para *U. chacoensis*. Não foram observados sinais de FISH nas espécies *C. grandiflorum*, *P. elegans* e *U. ulmacea*, e nas 12 espécies de *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea* utilizadas no *Southern Blotting* com a sonda *pUch6*, a única que evidenciou sinais de hibridização foi *U. chacoensis* (Fig. 1).

Os primers *pUc6-1* e *pUc6-2*, desenhados para amplificar 512 pb do DNA genômico de *U. chacoensis* (Fig. 2), também amplificaram fragmentos de tamanho similar no DNA genômico de *P. elegans* e *U. ulmacea*. Fragmentos menores (aprox. 200 pb) foram obtidos em *U. glabra* utilizando estes primers, mas não foi possível amplificar em *C. grandiflorum* (Fig. 3A). Os produtos de amplificação marcados com biotina foram localizados por hibridização *in situ* fluorescente em regiões cromossômicas terminais nas preparações de *P. elegans*, *U.*

glabra e *U. ulmacea* (Fig. 3B-3D). Estes sinais de hibridização podem ser associados com regiões cromossômicas ricas em heterocromatina.

Mediante o uso de *primers* inversos *Uch725-100*, *Uch725-165* e *Uch725-410* foi possível amplificar a unidade de repetição completa em várias espécies de *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea* (Fig. 2 e 4). O par de *primers* *Uch725-325* não amplificou fragmentos de DNA satélite nas espécies de Paullinieae estudadas. Estes *primers* permitem frequentemente a amplificação de fragmentos de aproximadamente 180, 360, 540 ou 720 pb; a combinação de tamanho destes produtos de PCR depende do par de *primers* utilizado e das espécies analisadas. A amplificação com os *primers* *Uch725-100* produziu principalmente bandas de 720 pb em *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*; unicamente em *U. glabra* foi amplificado majoritariamente fragmentos de 180 pb (Fig. 4A). Em *C. heringeri*, *C. urvilleoides*, *C. bahianum* e *U. andersonii* observou-se uma amplificação reduzida. Com o *primer* *Uch725-165* é destacada a amplificação de fragmentos de 360 pb em praticamente todas as espécies estudadas (Fig. 4B). Em *U. ulmacea* 340 amplificou com maior intensidade os fragmentos de 180 pb em *C. urvilleoides*, *C. bahianum*, *C. cristobalii* e *U. andersonii* a amplificação foi reduzida. A amplificação com o par de *primers* *Uch725-410* foi relativamente homogênea em *Cardiospermum*, amplificando principalmente fragmentos de 720 pb, mas em *Paullinia* e *Urvillea* os resultados foram variáveis (Fig. 4C). Em *P. elegans* e *Paullinia* sp. esse mesmo par de *primers* amplificou os fragmentos de 720 pb, mas não em *P. rhomboidea* e *P. thalictrifolia*. Em *U. glabra* foram amplificados principalmente fragmentos de 360 pb, e os diferentes citótipos de *U. ulmacea* apresentam diferentes padrões de amplificação.

Os resultados de FISH com as sondas obtidas a partir dos produtos de PCR dos *primers* *Uch725-100* e *Uch725-410* permitiram identificar blocos de DNA satélite da família *Uch725*

nas regiões terminais de vários cromossomos em *C. grandiflorum*, *P. elegans* e *U. glabra* (Fig. 5).

Discussão

O DNA satélite é um tipo de DNA repetitivo comum no genoma de plantas (Kubis *et al.* 1998). A unidade de repetição (“o monômero”) é repetida em tandem milhares de vezes, frequentemente formando parte de blocos de heterocromatina (Charlesworth *et al.* 1994), assim como foi observado em algumas espécies de Paullinieae, como *C. grandiflorum*, *P. elegans* e *U. glabra*. Este tipo de DNA altamente repetitivo pode apresentar alta taxa de evolução por deriva gênica. Por ser um DNA não-codificante teria uma maior capacidade de acumular mutações. Mas, existe um conjunto de mecanismos de variação não-Mendeliana que caracteriza o processo denominado “*DNA turnover*”, que levaria a uma rápida amplificação e dispersão do DNA satélite, e a consequente homogeneização no genoma (Bostock 1986; Dover & Tautz 1986; Dover 2002). As diferenças quantitativas no DNA satélite não poderiam ser consideradas em estudos filogenéticos (Hemleben *et al.* 2007), mas a análise de sequências permitiu apoio à sistemática em algumas taxa (De la Herrán *et al.* 2001; Fann *et al.* 2001; Garrido-Ramos *et al.* 1999; Pons & Gillespie 2004; Svtashev *et al.* 1994).

A origem do DNA satélite deveria implicar a existência de um “pré-DNA satélite” que se tornou um componente importante do genoma mediante processos de amplificação e homogeneização (Hemleben *et al.* 2007). Em algumas espécies, a origem das sequências de DNA satélite foi especulada, sendo frequentemente envolvidas sequências de retrotransposons (Cheng & Murata 2003; Langdon *et al.* 2000; Tek *et al.* 2005) e DNA ribossomal (Lim *et al.* 2004; Macas *et al.* 2003). A família do DNA satélite *Uch725* não apresentou homologia com

outras sequências disponíveis nas bases de dados EMBL/GenBank, e desconhecemos a origem desta família de DNA satélite *Uch725*.

Os resultados de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e hibridização em membrana (*Southern blotting*) indicam que *pUch6* seria um marcador específico para o genoma de *U. chacoensis*, já que não foram observados sinais de hibridização em várias espécies de estudadas de Paullinieae. Além da comparação entre espécies, o DNA satélite pode ser útil na identificação de espécies próximas, sendo frequentemente utilizado na identificação de parentais em hibridização (Kamm *et al.* 1995; Pehu *et al.* 1990; Schmidt *et al.* 1990).

A amplificação por PCR utilizando *primers* específicos evidencia a presença de *Uch725* em espécies dos gêneros *Paullinia* e *Urvillea*. Os *primers pUc6-1* e *pUc6-2* amplificam fragmentos de aproximadamente 512 pb, evidenciando a existência de sequências satélites da família *Uch725* em *P. elegans* e *U. ulmacea*. A amplificação de fragmentos menores em *U. glabra* indicaria a presença de rearranjos na estrutura do monômero do DNA satélite nesta espécie. O uso da PCR inversa com os *primers Uch725-100*, *Uch725-165* e *Uch725-410* não só permitiu detectar a ocorrência do DNA satélite da família *Uch725* em diferentes espécies de *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*, assim como também permitiu amplificar o monômero completo do DNA satélite da família *Uch725* nas espécies estudadas. Uma ampla distribuição de sequências da família *Uch725* na tribo poderia apoiar o conceito de sequências “pré-DNA satélite” (Hemleben *et al.* 2007), que eventualmente sofre processos de amplificação e homogeneização dentro do genoma. Esses resultados condizem também com a natureza monofilética do grupo de estudo, o “clado *Paullinia*” (Acevedo-Rodríguez 1993b).

A combinação de fragmentos amplificados de 180, 360, 540 ou 720 pb observada com os *primers Uch725-100*, *Uch725-165* e *Uch725-410* confirmaria a estrutura em tetrâmero de *Uch725* descrita nos monômeros de DNA satélites analisados em *U. chacoensis* (Urdampilleta

et al. 2009). A homologia das subunidades dos monômeros permitiria a amplificação dos fragmentos de 180, 360, 540 pb. Os resultados da PCR inversa sugerem que as subunidades de 180 pb de *U. glabra* apresentaram a maior homologia já que com os *primers Uch725-100, Uch725-165* amplificou preferencialmente fragmentos de 180 pb. Em *U. ulmacea* existe diferença no padrão de amplificação com *Uch725-410* (Fig. 4C), indicando variação no DNA satélites entre os citótipos poliplóides analisados desta espécie. Nossos resultados indicam que sequências da família *Uch725* ou afins ocorrem nos genomas de diversas espécies de Paullinieae, apresentando uma relativa diversidade qualitativa e quantitativa nas sequências de DNA satélite.

Embora tenham sido poucas as espécies estudadas por FISH com sondas de DNA satélite, a localização na região cromossômica terminal parece ser uma característica frequente da família *Uch725* nas espécies de Paullinieae. Em virtude da dinâmica do DNA satélite, poderíamos sugerir a existência de uma pressão seletiva que mantém as sequências da família *Uch725* nas regiões cromossômicas terminais. Estas sequências podem ser incluídas na categoria das sequências associadas ao telômero (Telomere-associated sequences, TAS) (Sharma & Raina 2005). As TASs ocorrem com frequência no genoma e se apresentam em grupos diversos de plantas; recentemente foi sugerido que apresentam uma função na estabilização da extremidade cromossômica, funcionando como uma zona tampão entre o telômero e as regiões cromossômicas internas (Sýkorová *et al.* 2001). Outras funções foram atribuídas ao DNA satélite, sendo uma das mais importantes o reconhecimento dos cromossomos homólogos durante a prófase meiótica (Hemleben *et al.* 2007; Irick 1994).

Como conclusão, foi possível construir *primers* para detectar *Uch725* em espécies de Paullinieae. As técnicas de hibridização permitiram definir a *pUch6* como um marcador específico do genoma de *U. chacoensis*, mas as sequências de DNA satélite da família

Uch725 ocorrem em outras espécies de tribo dos gêneros *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*. A família *Uch725* conservou a localização cromossômica possivelmente relacionada à sua função dentro do genoma, mas demonstrou a existência de variabilidade quali- e quantitativa. Esta variação qualitativa faz com que estas sequências sejam consideradas ferramentas taxonômicas úteis, permitindo combinar marcadores moleculares e cromossômicos em estudos filogenéticos na tribo Paullinieae. A possibilidade de analisar as sequências do DNA satélite de outras espécies permitirá observar diferenças interespecíficas de grande utilidade em estudos filogenéticos da tribo, assim como reforçar a definição de gêneros como *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea* em relação suas espécies morfológicamente intermediárias.

Tabela 1. Espécies estudadas da tribo Paullinieae com os respectivos dados de coleta (localidade e material-testemunha).

Espécie	Localidade
<i>Cardiospermum</i> L.	
<i>C. corindum</i> L.	Brasil, BA, Barra, Urdampilleta <i>et al.</i> 328 (UEC).
<i>C. grandiflorum</i> Sw.	Brasil, SP, Mogi-Guaçu, Fz. Campininha, Firetti <i>et al.</i> s/n (UEC)
<i>C. heringeri</i> Ferrucci	Brasil, ES, Urdampilleta <i>et al.</i> 369 (UEC)
<i>C. integerrimum</i> Radlk.	Brasil, BA, Ubaitaba, Urdampilleta <i>et al.</i> 312 (UEC)
<i>C. cristobalii</i> Ferrucci & Urdampilleta, sp. nov. inéd.	Brasil, MG, Botumirim, Urdampilleta <i>et al.</i> 421 (UEC).
<i>C. halicacabum</i> L. var. <i>halicacabum</i>	Bolívia, Santa Cruz, Chiquitos, Ferrucci <i>et al.</i> 2525 (CTES)
<i>C. oliveirae</i> Ferrucci	Brasil, BA, Itaguaçu da Bahia, Urdampilleta <i>et al.</i> 337 (UEC).
<i>C. procumbens</i> Radlk.	Brasil, MS, Sidrolândia, Urdampilleta <i>et al.</i> 322 (UEC).
<i>C. pterocarpum</i> Radlk.	Brasil, MS, Sidrolândia, Urdampilleta <i>et al.</i> 321 (UEC).
<i>C. urvilleoides</i> (Radlk.) Ferrucci	Brasil, MG, Itaobim, Urdampilleta <i>et al.</i> 425 (UEC).
<i>C. anomalum</i> Cambess.	Brasil, BA, Ibotirama, Urdampilleta <i>et al.</i> 330 (UEC).
<i>C. bahianum</i> Ferrucci & Urdampilleta, sp. nov. inéd.	Brasil, BA, Rio de Contas, Urdampilleta <i>et al.</i> 389 (UEC).
<i>Paullinia</i> L.	
<i>P. elegans</i> Cambess.	Brasil, SP, Campinas, Guará, Obando <i>et al.</i> 289 (UEC)
<i>P. rhomboidea</i> Radlk.	Brasil, PR, Londrina, Urdampilleta <i>et al.</i> 233 (FUEL)
<i>P. thalictrifolia</i> Juss.	Brasil, ES, Santa Teresa, Urdampilleta <i>et al.</i> 372 (UEC)
<i>Paullinia</i> sp.	Brasil, SP, Ubatuba, Urdampilleta <i>et al.</i> 432 (UEC)
<i>Urvillea</i> Kunth	
<i>U. andersonii</i> Ferrucci	Brasil, BA, Brumado, Urdampilleta <i>et al.</i> 345 (UEC)
<i>U. chacoensis</i> Hunz.	Bolívia, Dpto. Chuquisaca, Prov. Calvo, Ferrucci <i>et al.</i> 1763 (CTES)
<i>U. glabra</i> Cambess.	Brasil, RJ, Parati, Urdampilleta <i>et al.</i> 293 (UEC)
<i>U. ulmacea</i> Kunth	Brasil, BA, Morro do Chapéu, Urdampilleta <i>et al.</i> 340 (UEC)
<i>U. ulmacea</i> Kunth	Brasil, PR, Jaguariaiva, Obando <i>et al.</i> 309 (UEC)
<i>U. ulmacea</i> Kunth	Brasil, PR, Londrina, Paiquerê, Urdampilleta <i>et al.</i> 257 (FUEL)

Tabela 2. *Primers* utilizados na análise do DNA satélite em Paullinieae obtidos da sequência original do *Uch725* de *Urvillea chacoensis*.

Nome	Sequência (5' – 3')	T _m °C
pUch6-1	TATTTATTTTCAAGCTTTTCTCCT	50
pUch6-2	ATATTAGTGTTTCCTGATTTCTGC	50
Uch725-100D	AATTTTCGGAAACCCTAATTGCACA	56
Uch725-100R	ATGCTTTGCTTGTAGTGAATTGCG	56
Uch725-165D	CCAAACAATTTTATTTATTTTAT	42
Uch725-165R	GATTTATTTTAAGAACTTTAAATA	42
Uch725-325D	AATATTTGAAGTTCTTAAAACAAA	45
Uch725-325R	TTTGTTTTAAGAACTTCAAATATT	45
Uch725-410D	ACTGAAATATCCATTCAATTATTT	47
Uch725-410R	AGTTTTAATTACTAGGGTTTCTTA	47

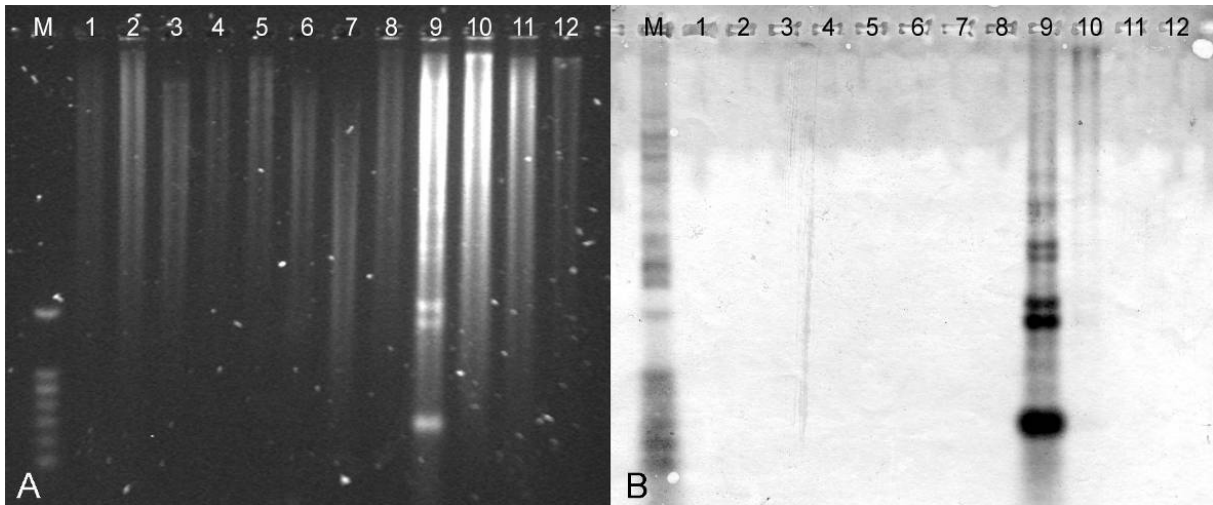


Figura 1. Hibridização em membrana utilizando DNA genômico de diferentes espécies de Paullinieae. A, DNA genômico digerido com *Hind*III; B, Hibridização em membrana com sonda pUch6 biotinizada. Amostras: 1, *C. corindum*; 2, *C. grandiflorum*; 3, *C. halicacabum* var *halicacabum*; 4, *C. integerrimum*; 5, *C. oliverae*; 6, *C. procumbens*; 7, *C. pterocarpum*; 8, *P. elegans*; 9, *U. chacoensis*; 10, *U. glabra*; 11, *U. ulmacea* 309; 12, *U. ulmacea* 257.

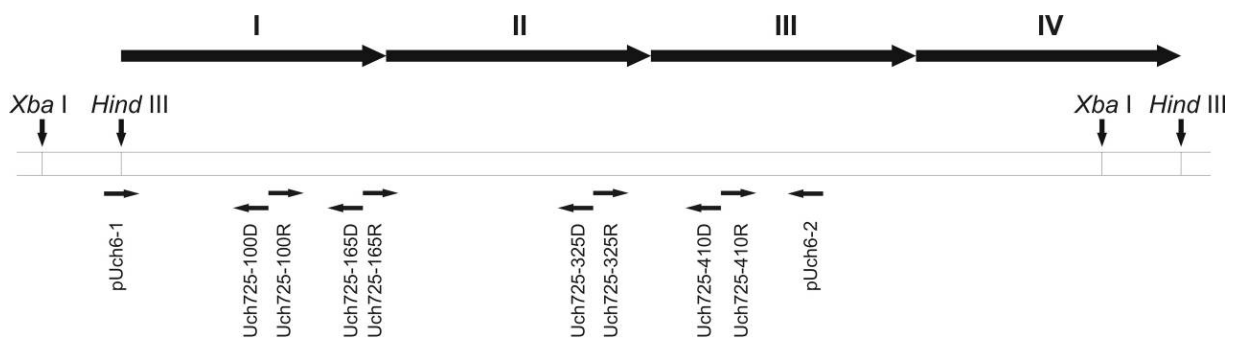


Figura 2. Esquema de localização de *primers* utilizados para amplificação do DNA satélite em Paullinieae, sobre a sequência da sonda pUch-6. Os sítios *Xba*I e *Hind*III indicam os sítios de restrição, e I-IV, representam as subrepetições do DNA satélite *Uch725*.

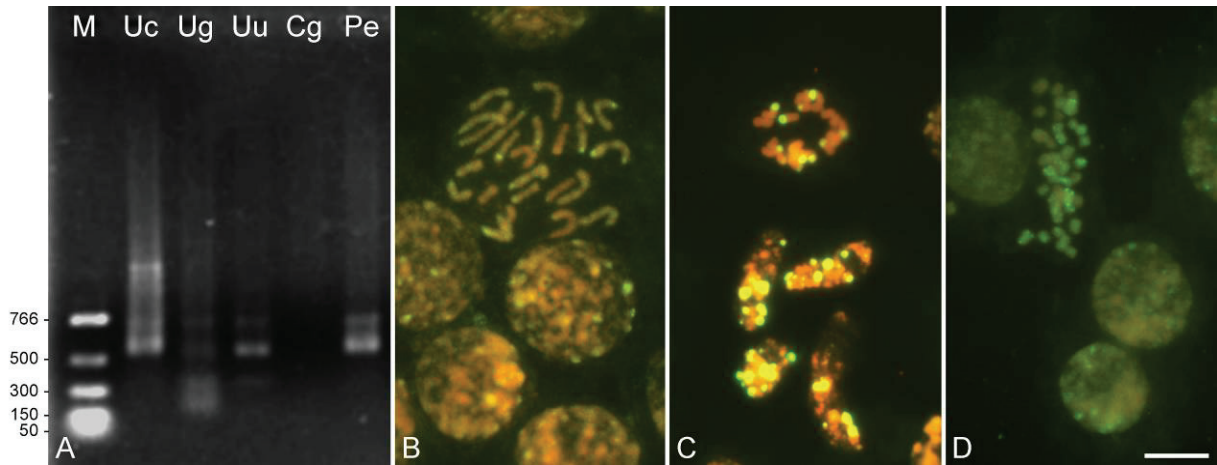


Figura 3. A, PCR utilizando primers *pUc6-1* e *pUc6-2* com DNA genômico de *U. chacoensis* (Uc), *U. glabra* (Ug), e *U. ulmacea* (Uu), *C. grandiflorum* (Cg) e *P. elegans* (Pe). Hibridização *in situ* fluorescente em *P. elegans* (B), *U. glabra* (C) e *U. ulmacea* (D), utilizando como sonda os produtos de amplificação de cada uma das espécies marcados com biotina. Barra = 5 μ m.

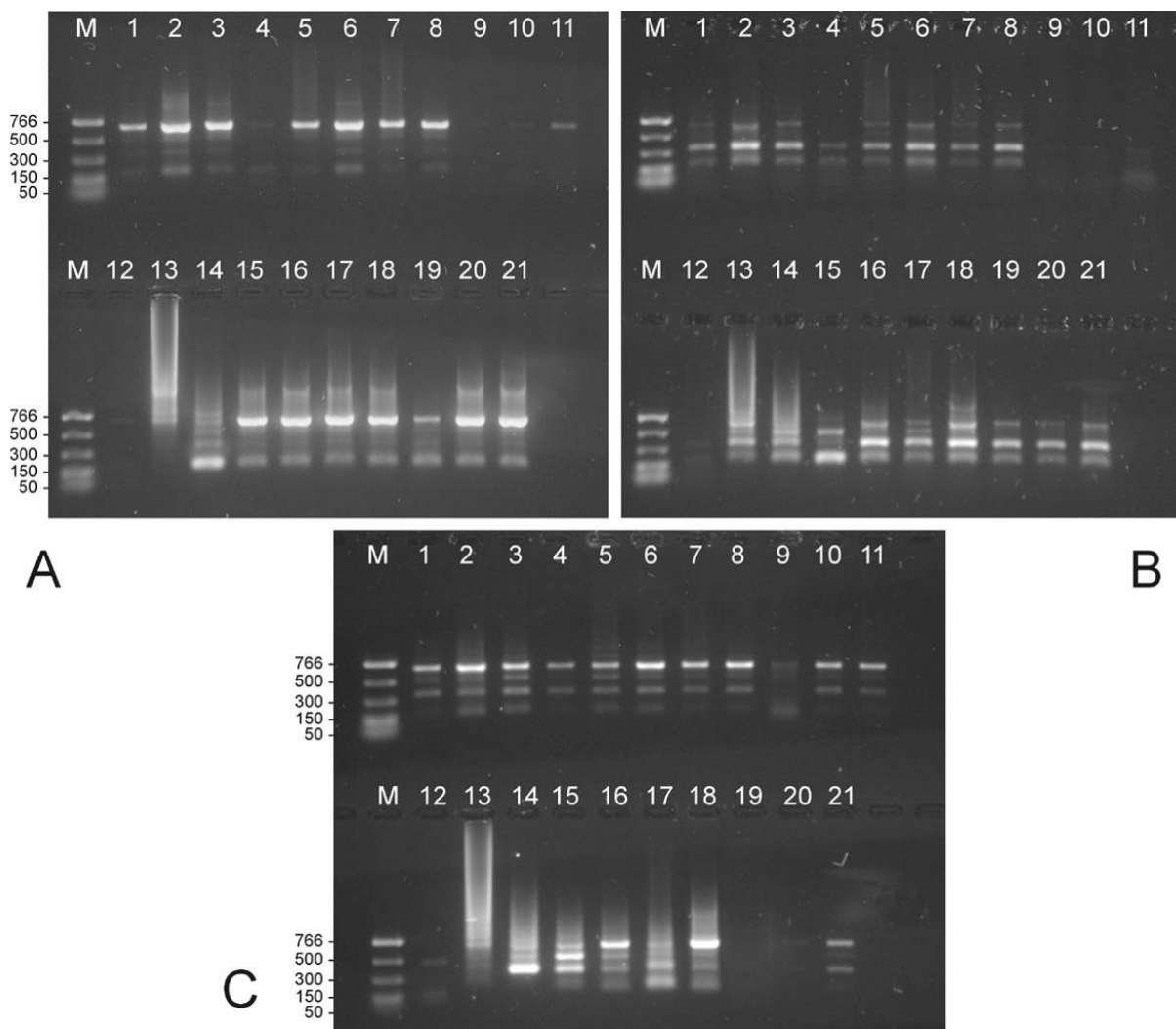


Figura 4. Amplificação de DNA satélite da família *Uch725* em espécies de *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea* por PCR inversa. PCR com primers *Uch725-100* (A), *Uch725-165* (B) e *Uch725-410* (C) desenhados de *pUch6*. Amostras: 1, *C. anomalum*; 2, *C. grandiflorum*; 3, *C. halicacabum* var. *halicacabum*; 4, *C. heringeri*; 5, *C. integerrimum*; 6, *C. oliveirae*; 7, *C. procumbens*; 8, *C. pterocarpum*; 9, *C. urvilleoides*; 10, *C. bahianum*; 11, *C. cristobalii*; 12, *U. andersonii*; 13, *U. chacoensis*; 14, *U. glabra*; 15, *U. ulmacea* 340; 16, *U. ulmacea* 309; 17, *U. ulmacea* 257; 18, *P. elegans*; 19, *P. rhomboidea*; 20, *P. thalictrifolia*; 21, *Paullinia* sp.

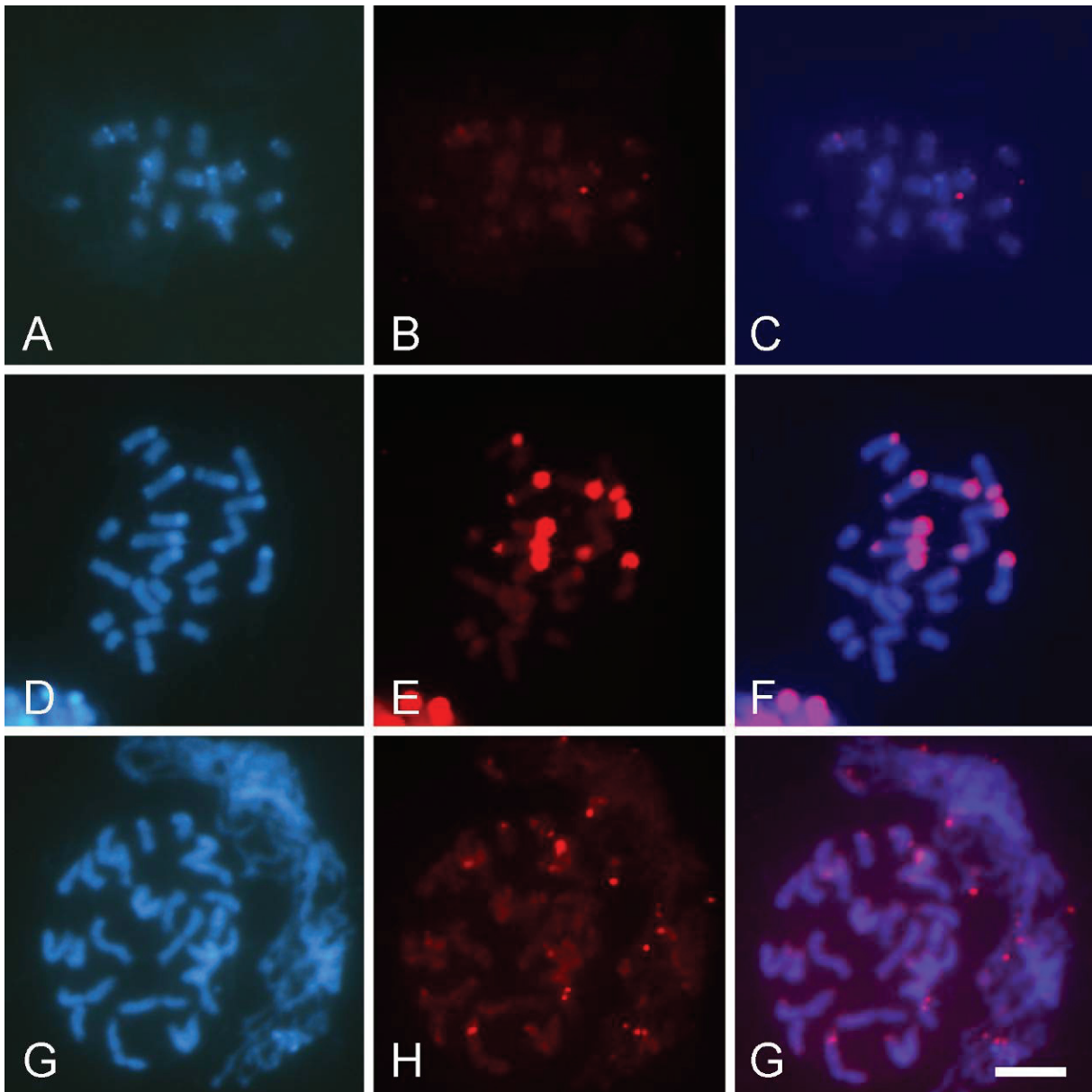


Figura 5. Localização de produtos da PCR (*primers* Uch725-100) marcados com DIG (Vermelho) pela técnica de FISH utilizando em *C. grandiflorum* (A-C), *U. glabra* (D-F) e *P. elegans* (G-I). A, D e G, coloração com DAPI; B, E e H, FISH com DNA satélite. C, F e I, recomposição da imagem em RGB. Barra = 5 μ m.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Foram estudadas 44 espécies sul-americanas de *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania*, *Thinouia* e *Urvillea*. Deste estudo resultaram 29 novas contagens cromossômicas, 15 descrições cariotípicas. Em aproximadamente 20 espécies foram descritos os padrões bandamentos cromossômicos e distribuição de DNAr. E o isolamento de sequências de DNA satélite permitiu adicionar novos marcadores para serem utilizados nas comparações cariotípicas do grupo.
- ✓ Os cariótipos das espécies de *Thinouia* apresentaram grande homogeneidade, demonstrando que o gênero é um grupo citogeneticamente bem definido. Entretanto, as semelhanças no número e tamanho cromossômico com espécies das tribos Cupanieae, Paullinieae e Thouineae não permitiram concluir sobre sua inclusão em uma delas.
- ✓ O número básico $x = 12$ é o mais frequente em Paullinieae e encontra-se presente nos gêneros *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Paullinia*, *Serjania* e *Urvillea*. Em *Houssayanthus*, *Paullinia* e *Serjania* o $x = 12$ é um caráter conservado. Particularmente em *Houssayanthus* e *Serjania*, $2n = 24$ é observado em todas as espécies analisadas.
- ✓ A redução no número cromossômico é uma sinapomorfia que diferencia a tribo Paullinieae das demais tribos da família Sapindaceae. Em Sapindaceae, os números básicos que apresentam maior frequência são $x = 14$, 15 e 16 , mas em Paullinieae, o $x = 14$ está presente unicamente em *Thinouia* e *Lophostigma*.

-
- ✓ O processo de redução cromossômica foi mais acentuado nos gêneros *Cardiospermum* ($x = 7, 9, 10, 11$ e 12) e *Urvillea* ($x = 11$ e 12). A classificação infragenérica de *Urvillea* em duas seções é reforçada pela presença de números básicos diferentes. Esta variação no número básico permitiu também a caracterização de algumas seções em *Cardiospermum*, como por exemplo, a seção *Carphospermum* ($x = 9$).

 - ✓ A redução do número cromossômico em *Cardiospermum* pode ser confirmada com as observações em *C. heringeri* ($2n = 24$) e *C. integerrimum* ($2n = 14$). Nesta dupla de espécies afins o processo de disploidia poderia estar relacionado com a re-localização dos genes de DNA ribossomais.

 - ✓ O conhecimento sobre a importância da poliploidia como um processo evolutivo foi ampliado nos três gêneros do “clado *Paullinia*”, *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*, além de sua distribuição fitogeográfica principalmente nas espécies da Mata Atlântica.

 - ✓ A maior diversidade cariotípica da tribo Paullinieae foi observada em *Cardiospermum*, sendo provavelmente refletida nas diversas adaptações no hábito, distribuição fitogeográfica e variações morfológicas. O tipo de núcleo em intérfase e o comportamento dos cromossomos na prófase definem dois grupos principais, parcialmente associados com a classificação infragenérica proposta para *Cardiospermum*.

- ✓ A localização e número dos loci de DNAr 18-5,8-26S e 5S em Paullinieae é variável e foram marcadores específicos para alguns táxons. A não-sintenia destes genes foi a característica mais freqüente; a sintenia destes genes é um caráter que diferencia unicamente a seção *Carphospemum* em *Cardiospermum*.

- ✓ Não existe uma relação linear entre o aumento de número de loci de DNA ribossomal e o aumento de nível de ploidia, como seria esperado em autopoliplóides recentes. Essa situação que indica possíveis eventos de hibridação e reorganização genômica nos complexos poliplóides.

- ✓ Em *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea* é frequente a ocorrência de segmentos heterocromáticos nas regiões cromossômicas terminais, demonstrando padrões variados de bandas (blocos ricos em AT, GC ou neutros) após da utilização de diferentes técnicas de bandamento cromossômico.

- ✓ A família do DNA satélite rico em AT, componente de blocos de heterocromatina terminal em *U. chacoensis*, é distribuída em várias espécies de *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea*.

- ✓ As variações quali- e quantitativas do DNA satélite seriam responsáveis pelas variações nos padrões de bandas observados. A variação qualitativa faz destas sequências ferramentas taxonômicas úteis, combinando marcadores moleculares e cromossômicos em estudos filogenéticos na tribo Paullinieae.

- ✓ A análise das sequências do DNA satélite em diversas espécies da tribo Paullinieae permitirá observar diferenças interespecíficas de grande utilidade em estudos filogenéticos da tribo. Estes novos marcadores poderiam reforçar a definição de gêneros como *Cardiospermum*, *Paullinia* e *Urvillea* em relação com as espécies morfológicamente intermediárias assim como resolver outros aspectos da sistemática da tribo Paullinieae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo-Rodríguez P, 1993a. A Revision of *Lophostigma* (Sapindaceae). *Syst Bot*, 18: 379-388.
- , 1993b. Systematics of *Serjania* (Sapindaceae). Part I: A revision of *Serjania Sect. Platycoccus*. *Mem New York Bot Gard*, 67: 1-93.
- Anamthewat-Jonsson K & Heslop-Harrison JS, 1993. Isolation and characterization of genome-specific DNA sequences in Triticeae species. *Molecular and General Genetics MGG*, 240: 151-158.
- APG II, 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc*, 141: 399-436.
- Barkley FA, 1956. Sapindaceae of southern South America. *Lilloa*, 28: 111-179.
- Bennett MD, 1998. Plant genome values: How much do we know? *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 2011-2016.
- Beridze T, 1976. DNA nuclear satellites of the genus *Brassica*. *Mol Biol (Mosk)*, 10: 538-542.
- Bostock CJ, 1986. Mechanisms of DNA Sequence Amplification and their Evolutionary Consequences. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 312: 261-273.
- Brown GR & Carlson JE, 1997. Molecular cytogenetics of the genes encoding 18s-5.8s-26s rRNA and 5s rRNA in two species of spruce (*Picea*). *Theoret Appl Genetics*, 95: 1-9.
- Buntjer JB & Lenstra JA, 1998. Self-amplification of satellite DNA in vitro. *Genome*, 41: 429-434.
- Cai QING, Zhang DAMI, Liu ZL & Wang XR, 2006. Chromosomal Localization of 5S and 18S rDNA in Five Species of Subgenus *Strobus* and their Implications for Genome Evolution of *Pinus*. *Ann Bot*, 97: 715-722.
- Charlesworth B, Sniegowski P & Stephan W, 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220.
- Cheng ZJ & Murata M, 2003. A Centromeric Tandem Repeat Family Originating From a Part of Ty3/gypsy-Retroelement in Wheat and Its Relatives. *Genetics*, 164: 665-672.
- Coen E, Strachan T & Dover G, 1982. Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. *J Mol Biol*, 158: 17-35.
- Cronquist A, 1981. An integrated system of classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York.

- , 1988. The evolution and classification of flowering plants. New York: New York Botanic Gardens.
- Dahlgren G, 1989. An updated angiosperm classification. *Bot J Linn Soc*, 100: 197-203.
- Dalgaard V, 1986. Chromosome numbers in flowering plants from Madeira. *Willdenowia*, 16: 221-224.
- Datson P & Murray B, 2006. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Res*, 14: 845-857.
- De la Herrán R, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M & Garrido-Ramos MA, 2001. The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) based on two satellite DNA families. *Heredity*, 87: 691-697.
- De Melo NF & Guerra M, 2003. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora L.* species with distinct base chromosome numbers. *Ann Bot*, 92: 309-316.
- Deumling B, 1981. Sequence arrangement of a highly methylated satellite DNA of a plant, *Scilla*: A tandemly repeated inverted repeat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 338-342.
- Diers L, 1961. Der Anteil an Polyploidien in den Vegetationsgürteln der Westkordillere Perus. *Z Bot*, 49: 437-488.
- Dover GA & Tautz D, 1986. Conservation and Divergence in Multigene Families: Alternatives to Selection and Drift. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 312: 275-289.
- Dover G, 2002. Molecular drive. *Trends Genet*, 18: 587-589.
- Eckardt NA, 2001. A sense of self: the role of DNA sequence elimination in allopolyploidization. *Plant Cell*, 13: 1699-1704.
- Eichhorn, A & Franquet, R, 1936. Numération chromosomique et évolution nucléaire chez le *Koelreuteria paniculata*. 1609-1611.
- Fann J-Y, Kovarik A, Hemleben V, Tsirekidze N & Beridze T, 2001. Molecular and structural evolution of *Citrus* satellite DNA. *Theoret Appl Genetics*, 103: 1068-1073.
- Feldman M, Liu B, Segal G, Abbo S, Levy AA & Vega JM, 1997. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics*, 147: 1381-1387.
- Fernández Casas J & Fernández Piqueras J, 1981. Estudio cariológico de algunas plantas bolivianas. *An Jard Bot Madr*, 38: 149-152.
- Ferrucci MS, 1981. Recuentos cromosómicos en Sapindáceas. *Bonplandia*, 5: 73-81.
- , 1985. Recuentos cromosómicos en *Allophylus* y *Serjania* (Sapindaceae). *Bol Soc Argent Bot*, 24: 200-202.

- , 1989. Cromosomas en *Cardiospermum* y *Diplokeleba* (Sapindaceae), significado taxonómico y evolutivo. *Bonplandia*, 6: 151-164.
- , 1991. Sapindaceae. In Spichiger R & Ramella L (eds), Flora del Paraguay 1-144. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève - Missouri Botanical Garden, Ginebra.
- , 1997a. El número cromosómico de *Urvillea laevis* (Sapindaceae). *Bonplandia*, 9: 305-306.
- , 1997b. *Urvillea peruviana* (Sapindaceae) nueva especie andina. *Bonplandia*, 9: 237-240.
- , 2000a. Cytotaxonomy of Sapindaceae with special reference to the tribe Paullinieae. *Genet Mol Biol*, 23: 941-946.
- Ferrucci, MS, 2000b. Revisión de los géneros *Cardiospermum* y *Urvillea* para el neotrópico (*Sapindaceae*). Tesis doctoral. FCEFYN-Universidad Nacional Córdoba. 1-215.
- , 2006. A new species of *Urvillea* (Sapindaceae) from northwestern Venezuela. *Brittonia*, 58: 83-87.
- Ferrucci MS & Acevedo-Rodríguez P, 2005. Three new species of *Serjania* (Sapindaceae) from South America. *Syst Bot*, 30: 153-162.
- Ferrucci MS & Anzótegui LM, 1993. El polen de *Paullinieae* (Sapindaceae). *Bonplandia*, 6: 211-243.
- Ferrucci MS & Solís Neffa VG, 1997. Citotaxonomía de *Sapindaceae* sudamericanas. *Bol Soc Argent Bot*, 33: 77-83.
- Ferrucci, M. S. and J. D. Urdampilleta. *Cardiospermum bahianum* y *C. cristobalii* (Sapindaceae), dos nuevas especies del Nordeste de Brasil. 2009.
- Flavell RB, 1986. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 312: 227-242.
- Freitas DV, Carvalho CR, Nascimento Filho FJ & Astolfi-Filho S, 2007. Karyotype with 210 chromosomes in guarana (*Paullinia cupana* 'Sorbilis'). *J Plant Res*, 120: 399-404.
- Gadek PA, Fernando ES, Quinn CJ, Hoot SB, Terrazas T, Sheahan MC & Chase MW, 1996. Sapindales: Molecular delimitation and infraordinal groups. *Am J Bot*, 83: 802-811.
- Gall JG & Pardue ML, 1969. Formation and detection RNA-DNA hybrid molecules in cytologic al preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 63: 378-383.
- Ganal M & Hemleben V, 1986. Comparison of the ribosomal RNA genes in four closely related Cucurbitaceae. *Pl Syst Evol*, 154: 63-77.

- Garcia S, Canela MA, Garnatje T, McArthur ED, Pellicer J, Sanderson SC & Vallès J, 2008. Evolutionary and ecological implications of genome size in the North American endemic sagebrushes and allies (*Artemisia*, Asteraceae). *Biol J Linn Soc*, 94: 631-649.
- Garcia S, Garnatje T, Hidalgo O, McArthur ED, Siljak-Yakovlev S & Vallès J, 2007. Extensive ribosomal DNA (18S-5.8S-26S and 5S) colocalization in the North American endemic sagebrushes (subgenus *Tridentatae*, *Artemisia*, Asteraceae) revealed by FISH. *Pl Syst Evol*, 267: 79-92.
- Garcia S, Lim K, Chester M, Garnatje T, Pellicer J, Vallès J, Leitch A & Kovarik A, 2009. Linkage of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* (family Asteraceae): first evidence from angiosperms. *Chromosoma*, 118: 85-97.
- Garrido-Ramos MA, de la Herrón R, Jamilena M, Lozano R, Ruiz Rejón C & Ruiz Rejón M, 1999. Evolution of Centromeric Satellite DNA and Its Use in Phylogenetic Studies of the Sparidae Family (Pisces, Perciformes). *Mol Phylogenet Evol*, 12: 200-204.
- Gerlach WL & Bedbrook JR, 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res*, 7: 1869-1885.
- Graham A, 1985. Studies in Neotropical Paleobotany. IV. The Eocene Communities of Panama. *Ann Mo Bot Gard*, 72: 504-534.
- , 1991. Studies in Neotropical Paleobotany. IX. The Pliocene Communities of Panama-Angiosperms (Dicots). *Ann Mo Bot Gard*, 78: 201-223.
- Gregory TR, 2001. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cellsize, and the C-value enigma. *Biological Reviews*, 76: 65-101.
- Greilhuber J & Ehrendorfer F, 1988. Karyological approaches to plant taxonomy. *Plant & Animal Sciences*, 1: 297.
- Grimm GW, Renner SS, Stamatakis A & Hemleben V, 2006. A Nuclear Ribosomal DNA Phylogeny of *Acer* Inferred with Maximum Likelihood, Splits Graphs, and Motif Analysis of 606 Sequences. *Evol Bioinformatics Online*, 7-22.
- Guarim Neto G, Rodrigues Santana S & Valdete Bezerra JS, 2000. Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu. *Acta Bot Bras*, 14: 327-334.
- Guerra M, 1983. O uso do Giemsa na citogenética vegetal: comparação entre coloração convencional e o bandeamento. *Ciência e Cultura*, 35: 190-193.
- , 1986. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. I. *Rev Bras Genet*, 9: 21-40.
- , 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet Mol Biol*, 23: 1029-1041.

- Guervin C, 1961. Contribution à l'étude cyto-taxinomique des Sapindacées et caryologique des Mélianthacées et des Didiéracées. 23: 49-87. *Rev Cytol Biol Vég*, 23: 49-87.
- , 1964. Étude caryo-taxonomique et répartition géographique de quelques Sapindacées. *Bull Mus Nat Hist Natur*, 36: 858-868.
- Harrington MG, Edwards KJ, Johnson SA, Chase MW & Gadek PA, 2005. Phylogenetic inference in Sapindaceae sensu lato using plastid matK and rbcL DNA sequences. *Syst Bot*, 30: 366-382.
- Heitz E, 1928. Das Heterochromatin der Moose. I. *Jahrb Wiss Botanik*, 69: 762-818.
- Hemleben V, Kovarik A, Torres-Ruiz RA, Volkov RA & Beridze T, 2007. Plant highly repeated satellite DNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. *Syst Biodiversity*, 5: 277-289.
- Hemmer W & Morawetz W, 1990. Karyological differentiation in *Sapindaceae* with special reference to *Serjania* and *Cardiospermum*. *Bot Acta*, 103: 372-383.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Anamthawat-Jonsson K, Leitch AR, Shi M & Leitch IJ, 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique*, 3: 106-109.
- Ho ISH & Leung FC, 2002. Isolation and characterization of repetitive DNA sequences from *Panax ginseng*. *Molecular Genetics and Genomics*, 266: 951-961.
- Hoisington D, Khairallah M & Gonzáles-de-León D, 1994. Laboratory Protocols: Applied Molecular Genetics Laboratory. CIMMYT, México.
- Hunziker AT, 1978. Notas críticas sobre Sapindáceas Argentinas. III. *Houssayanthus*, genus novum Sapindacearum. *Kurtziana*, 11: 7-24.
- Huziwara Y, 1962. Karyotype Analysis in Some Genera of Compositae. VIII. Further Studies on the Chromosomes of Aster. *Am J Bot*, 49: 116-119.
- Ingle J, Pearson G & Sing RM, 1973. Species distribution and properties of nuclear satellite DNA in higher plants. *Nature*, 242: 193-197.
- Irick H, 1994. A new function for heterochromatin. *Chromosoma*, 103: 1-3.
- Jiang J & Gill BS, 1994. New 18S-26S ribosomal RNA gene loci: Chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. *Chromosoma*, 103: 179-185.
- John HA, Birnstiel ML & Jones KW, 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223: 582-587.
- Johnston TJ, Murray DS & Williams JC, 1979. Germination and emergence of balloonvine (*Cardiospermum halicacabum*) compared with soybean seeds. *Weed Sci*, 27: 73-76.

-
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF & Donoghue MJ, 2002. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sinauer Assoc, Sunderland, MA.
- Judd WS, Sanders RW & Donoghue MJ, 1994. Angiosperm family pairs: Preliminary phylogenetic analyses. *Harvard Papers in Botany*, 5: 1-51.
- Kamm A, Galasso I, Schmidt T & Heslop-Harrison JS, 1995. Analysis of a repetitive DNA family from *Arabidopsis arenosa* and relationships between *Arabidopsis* species. *Plant Mol Biol*, 27: 853-862.
- Kapila R, Das S, Srivastava PS & Lakshmikumar M, 1996. A novel species-specific tandem repeat DNA family from *Sinapis arvensis*: Detection of telomere-like sequences. *Genome*, 39: 758-766.
- Kato A, Yakura K & Tanifuji S, 1984. Sequence analysis of *Vicia faba* repeated DNA, the FokI repeat element. *Nucleic Acids Res*, 12: 6415-6426.
- Kralovics R, Fajkus J, Kovarik A & Bezdek M, 1995. DNA curvature of the tobacco GRS repetitive sequence family and its relation to nucleosome positioning. *J Biomol Struct Dyn*, 12: 1103-1119.
- Kubis S, Schmidt T & Heslop-Harrison JS, 1998. Repetitive DNA Elements as a Major Component of Plant Genomes. *Ann Bot*, 82: 45-55.
- Lakshmikumar M & Ranade SA, 1990. Isolation and characterization of a highly repetitive DNA of *Brassica campestris*. *Plant Mol Biol*, 14: 447-448.
- Langdon T, Seago C, Jones RN, Ougham H, Thomas H, Forster JW & Jenkins G, 2000. De Novo Evolution of Satellite DNA on the Rye B Chromosome. *Genetics*, 154: 869-884.
- Langer-Safer PR, Levine M & Ward DC, 1982. Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 4381-4385.
- Leitch IJ & Bennett MD, 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biol J Linn Soc*, 82: 651-663.
- Leung FC, 1999. New application of low-Cot DNA as a DNA fingerprinting probe. *Electrophoresis*, 20: 1762-1767.
- Levan A, Sandberg A & Fredga K, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lim KY, Skalicka K, Koukalova B, Volkov RA, Matyasek R, Hemleben V, Leitch AR & Kovarik A, 2004. Dynamic changes in the distribution of a satellite homologous to intergenic 26-18S spacer in the evolution of *Nicotiana*. *Genetics*, 166: 1935-1946.
- Lombello RA & Forni-Martins ER, 1998. Chromosomal studies and evolution in Sapindaceae. *Caryologia*, 51: 81-93.

- Lorite P, Garcia MF, Carrillo JA & Palomeque T, 2001. A new repetitive DNA sequence family in the olive (*Olea europaea* L.). *Hereditas*, 134: 73-78.
- Macas J, Mészáros T & Nouzová M, 2002. PlantSat: a specialized database for plant satellite repeats. *Bioinformatics*, 18: 28-35.
- Macas J, Navrátilová A & Mészáros T, 2003. Sequence subfamilies of satellite repeats related to rDNA intergenic spacer are differentially amplified on *Vicia sativa* chromosomes. *Chromosoma*, 112: 152-158.
- Macas J, Pozárková D, Navrátilová A, Nouzová M & Neumann P, 2000. Two new families of tandem repeats isolated from genus *Vicia* using genomic self-priming PCR. *Molecular and General Genetics MGG*, 263: 741-751.
- Maglio CAF, Forni-Martins ER & Da Cruz ND, 1984. In Löve A (ed), Chromosome number reports LXXXIV. *Taxon* 33: 536.
- Mangenot S & Mangenot G, 1958. Deuxième liste de nombres chromosomiques nouveaux chez diverses Dicotylédones et Monocotylédones d'Afrique occidentale. *Bull Jard Bot État*, 28: 315-329.
- Mathieu O, Jasencakova Z, Vaillant I, Gendrel AV, Colot V, Schubert I & Tourmente S, 2003. Changes in 5S rDNA Chromatin Organization and Transcription during Heterochromatin Establishment in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 2929-2939.
- Medri EM, Lleras E & Valois ACC, 1980. Comparação anatômica entre folhas diplóides e poliplóides do guarana (*Paullinia cupana* var *sorbilis* (Mart.) Ducke). *Acta Amazonica*, 10: 283-288.
- Morawetz W, 1986. Remarks on karyological differentiation patterns in tropical woody plants. *Pl Syst Evol*, 152: 49-100.
- Muller J & Leenhouts PW, 1976. A general survey of pollen types in Sapindaceae in relation to taxonomy. *The Evolutionary Significance of the Exine*, 407-445.
- Muravenko OV, Amosova AV, Samatadze TE, Semenova OY, Nosova IV, Popov KV, Shostak NG, Zoschuk SA & Zelenin AV, 2004. Chromosome Localization of 5S and 45S Ribosomal DNA in the Genomes of *Linum* L. Species of the Section *Linum* (Syn. *Protolinum* and *Adenolinum*). *Russ J Gen*, 40: 193-196.
- Nagl W & Fusening HP, 1979. Types of chromatin organization in plant nuclei. *Pl Syst Evol*, Suppl. 2: 221-223.
- Nakagawa M, 2006. Ploidy, geographical distribution and morphological differentiation of *Parasenecio auriculata* (Senecioneae; Asteraceae) in Japan. *J Plant Res*, 119: 51-61.
- Neumann P, Nouzová M & Macas J, 2001. Molecular and cytogenetic analysis of repetitive DNA in pea (*Pisum sativum* L.). *Genome*, 44: 716-728.

- Ni LP & Guo SL, 2005. Review on relationship between invasiveness of plants and their DNA C-value. *Acta Ecologica Sinica*, 25: 2372-2381.
- Nogueira CZ, Ruas PM, Ruas CF & Ferrucci MS, 1995. Karyotypic Study of Some Species of *Serjania* and *Urvillea* (Sapindaceae; Tribe Paullinieae). *Am J Bot*, 82: 646-654.
- Pagel M & Johnstone RA, 1992. Variation across Species in the Size of the Nuclear Genome Supports the Junk-DNA Explanation for the C-Value Paradox. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 249: 119-124.
- Paiva J & Leitão MT, 1989. Números cromossômicos para alguns taxa da Africa Tropical- II. *Bol Soc Broteriana, Sér 2*, 62: 117-130.
- Paszko B, 2006. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Pl Syst Evol*, 258: 39-48.
- Pehu E, Thomas M, Poutala T, Karp A & Jones MGK, 1990. Species-specific sequences in the genus *Solanum*: identification, characterization, and application to study somatic hybrids of *S. brevidens* and *S. tuberosum*. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 80: 693-698.
- Pinkel D, Straume T & Gray JW, 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 2934-2938.
- Pons J & Gillespie RG, 2004. Evolution of satellite DNAs in a radiation of endemic Hawaiian spiders: Does concerted evolution of highly repetitive sequences reflect evolutionary history? *J Mol Evol*, 59: 632-641.
- Radlkofer L, 1931-1934. Sapindaceae. In Engler A (ed), *Das Pflanzenreich IV*, 165 (Heft 98a-h) 1-1539. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- , 1978. Ueber *Sapindus* und damit in Zusammenhang stehende Pflanzen. *Sitzungsber Math-Phys Cl Königl Bayer Akad Wiss München*, 8: 221-408.
- Raina SN & Mukai Y, 1999. Detection of a variable number of 18S-5.8S-26S and 5S ribosomal DNA loci by fluorescent in situ hybridization in diploid and tetraploid *Arachis* species. *Genome*, 42: 52-59.
- Ran Y, Hammett KRW & Murray BG, 2001. Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia* (Amaryllidaceae). *Ann Bot*, 87: 823-830.
- Raskina O, Barber JC, Nevo E & Belyayev A, 2008. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res*, 120: 351-357.
- Romero Zarco C, 1986. A New Method for Estimating Karyotype Asymmetry. *Taxon*, 35: 526-530.

- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sanmiguel P & Bennetzen JL, 1998. Evidence that a Recent Increase in Maize Genome Size was Caused by the Massive Amplification of Intergene Retrotransposons. *Ann Bot*, 82: 37-44.
- Sarkar AK, Datta N, Chatterjee U & Hazra D, 1982. In Löve A (ed), IOPB Chromosome number reports LXXVI. *Taxon* 31: 578.
- Schlaepfer DR, Edwards PJ, Semple JC & Billeter R, 2008. Cytogeography of *Solidago gigantea* (Asteraceae) and its invasive ploidy level. *J Biogeogr*, 35: 2119-2127.
- Schmidt T, Jung C & Metzloff M, 1991. Distribution and evolution of two satellite DNAs in the genus *Beta*. *Theor Appl Genet*, 82: 793-799.
- Schmidt T, Junghans H & Metzloff M, 1990. Construction of *Beta procumbens*-specific DNA probes and their application for the screening of *B. vulgaris* x *B. procumbens* (2n = 19) addition lines. *Theoret Appl Genetics*, 79: 177-181.
- Schubert I, 2007. Chromosome evolution. *Curr Opin Plant Biol*, 10: 109-115.
- Schwarzacher T, 2003. DNA, chromosomes, and in situ hybridization. *Genome*, 46: 953-962.
- Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD & Heslop-Harrison JS, 1989. In situ localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot*, 64: 315-324.
- Schwarzacher TP, Ambros S & Schweizer D, 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Pl Syst Evol*, 134: 293-297.
- Schwarzacher TP & Heslop-Harrison P, 2000. *Practical in situ hybridization*. Bios, Oxford.
- Schweizer D, 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324.
- Schweizer D & Loidl J, 1987. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chrom Today*, 9: 61-74.
- Semple JC, 1974. Chromosome numbers of phanerogams. 5. *Ann Mo Bot Gard*, 61: 902-903.
- Sharma S & Raina SN, 2005. Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenet Genome Res*, 109: 15-26.
- Shibata F, Hizume M & Kuroki Y, 2000. Molecular cytogenetic analysis of supernumerary heterochromatic segments in *Rumex acetosa*. *Genome*, 43: 391-397.
- Simmonds NW, 1954. Chromosome behaviour in some tropical plants. *Heredity*, 8: 139-146.
- Simpson DR, 1976. A partial revision of *Paullinia* (Sapindaceae) for Ecuador, Peru, and Bolivia. Part. I. *Fieldiana Botany*, 26: 125-164.

- Siroky J, Lysak M, Dolezel J, Kejnovsky E & Vyskot B, 2001. Heterogeneity of rDNA distribution and genome size in *Silene* spp. *Chromosome Res*, 9: 387-393.
- Solíis Neffa VG & Fernández A, 2001. Cyto geography of the South American *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae, Leiocarpae). *Bot J Linn Soc*, 137: 189-196.
- Solíis Neffa VG & Ferrucci MS, 1997. Cariotipos de especies sudamericanas de *Serjania* (Sapindaceae, Paullinieae). *Bonplandia*, 9: 265-276.
- , 1998. Cariotipos de Sapindaceae sudamericanas. *Bol Soc Argent Bot*, 33: 185-190.
- Soltis DE & Soltis PS, 1995. The dynamic nature of polyploid genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 8089-8091.
- Soltis DE, Soltis PS, Endress PK & Chase MW, 2005. Phylogeny and Evolution of Angiosperms. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Somner, GV, 2001. *Paullinia* L. (Sapindaceae): Morfologia, Taxonomia e Revisão de *Paullinia* sect. *Phygoptilon*. Tese Doutorado. Universidade de São Paulo. 1-274.
- Stace CA, 2000. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon*, 49: 451-477.
- Stebbins GL, 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley Publishing Company, UK..
- Stebbins GL, 1985. Polyploidy, Hybridization, and the Invasion of New Habitats. *Ann Mo Bot Gard*, 72: 824-832.
- Stevens, P. F., 2001. Angiosperm Phylogeny Website, Version 9. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, 23-12-0009.
- Sugiura T, 1931. A list of chromosome numbers in angiospermous plants. *Bot Mag , Tokyo*, 45: 353-355.
- Sun M, Chen H & Leung FC, 1999. Low-Cot DNA sequences for fingerprinting analysis of germplasm diversity and relationships in *Amaranthus*. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 99: 464-472.
- Svitashev S, Bryngelsson T, Vershinin A, Pedersen C, Sall T & Von Bothmer R, 1994. Phylogenetic analysis of the genus *Hordeum* using repetitive DNA sequences. *Theoret Appl Genetics*, 89: 801-810.
- Sýkorová E, Fajkus J, Ito M & Fukui K, 2001. Transition between two forms of heterochromatin at plant subtelomeres. *Chromosome Res*, 9: 309-323.
- Takhtajan A, 1987. *Systema Magnoliophytorum*. Leningrad: Soviet Sciences Press..

- Tek AL, Song J, Macas J & Jiang J, 2005. Sobo, a recently amplified satellite repeat of potato, and its implications for the origin of tandemly repeated sequences. *Genetics*, 170: 1231-1238.
- Thorne RF, 2000. The classification and geography of the flowering plants: Dicotyledons of the class Angiospermae (Subclasses Magnoliidae, Ranunculidae, Caryophyllidae, Dilleniidae, Rosidae, Asteridae, and Lamiidae). *Bot Rev*, 66: 441-647.
- Torrell M, Cerbah M, Siljak-Yakovlev S & Vallès J, 2003. Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescence in situ hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Plant Syst Evol*, 239: 141-153.
- Trifonov E, 1989. The multiple codes of nucleotide sequences. *Bulletin of Mathematical Biology*, 51: 417-432.
- Umadevi I & Daniel M, 1991. Chemosystematics of the Sapindaceae. *Feddes Repertorium*, 102: 607-612.
- Urdampilleta, JD, 2005. Estudo citogenético em Paullinieae (Sapindaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina. 1-79.
- Urdampilleta JD, de Souza AP, Schneider D, Vanzela ALL, Ferrucci MS & Forni-Martins ER, 2009. Molecular and cytogenetic characterization of an AT-rich satellite DNA family in *Urvillea chacoensis* Hunz. (Paullinieae, Sapindaceae). *Genetica*, 136: 171-177.
- Urdampilleta JD, Ferrucci MS & Forni-Martins ER, 2008a. Chromosome studies of some *Thinouia* species (Sapindaceae) and the taxonomic implications. *Ann. Bot. Fennici* 45: 68-73. *Ann Bot Fenn*, 45: 68-73.
- Urdampilleta JD, Ferrucci MS, Torezan JMD & Vanzela ALL, 2006. Karyotype relationships among four South American species of *Urvillea* (Sapindaceae: Paullinieae). *Pl Syst Evol*, 258: 85-95.
- Urdampilleta JD, Ferrucci MS & Vanzela ALL, 2005. Karyotype differentiation between *Koelreuteria bipinnata* and *K. elegans* ssp. *formosana* (Sapindaceae) based on chromosome banding patterns. *Bot J Linn Soc*, 149: 451-455.
- , 2007. Cytogenetic studies of four South American species of *Paullinia* L. (Sapindaceae). *Bot J Linn Soc*, 154: 313-320.
- Urdampilleta JD, Ferrucci MS, Vanzela ALL & Forni-Martins ER, 2008b. Differences and Resemblances in Banding Patterns and Ribosomal DNA Distribution in Four Species of Paullinieae Tribe (Sapindaceae). *Cytologia*, 73: 283-291.
- Van Der Ham RWJM & Tomlik A, 1994. *Serjania* pollen and the origin of the tribe Paullinieae (Sapindaceae). *Rev Palaeobot Palynol*, 83: 43-53.
- Vanzela ALL, Guerra M & Luceño M, 1996. *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes (n= 2). *Cytobios*, 88: 213-228.

-
- Vershinin AV & Heslop-Harrison JS, 1998. Comparative analysis of the nucleosomal structure of rye, wheat and their relatives. *Plant Mol Biol*, 36: 149-161.
- Volkov RA, Komarova NY & Hemleben V, 2007. Ribosomal DNA in plant hybrids: inheritance, rearrangement, expression. *Syst Biodiversity*, 5: 261-276.
- Weckerle CS & Rutishauser R, 2005. Gynoecium, fruit and seed structure of Paullinieae (Sapindaceae). *Bot J Linn Soc*, 147: 159-189.
- Weckerle CS, Stutz MA & Baumann TW, 2003. Purine alkaloids in Paullinia. *Phytochemistry*, 64: 735-742.
- Weiss-Schneeweiss H, Tremetsberger K, Schneeweiss GM, Parker JS & Stuessy TF, 2008. Karyotype diversification and evolution in diploid and polyploid South American Hypochaeris (Asteraceae) inferred from rDNA localization and genetic fingerprint data. *Ann Bot*, 101: 909-918.
- Wendel JF, 2000. Genome evolution in poliploids. *Plant Mol. Biol.* 42: 225-249. *Plant Mol Biol*, 42: 225-249.
- Youn-Kyu P, Kim BD, Kim BS, Armstrong KC & Kim NS, 1999. Karyotyping of the chromosomes and physical mapping of the 5S rRNA and 18S-26S rRNA gene families in five different species in Capsicum. *Genes & Genetic Systems*, 74: 149-157.
- Yunis JJ & Yasmineh WG, 1971. Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. *Science*, 174: 1200-1209.
- Zoldos V, Papes D, Cerbah M, Panaud O, Besendorfer V & Siljak-Yakovlev S, 1999. Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 Quercus species. *Theoret Appl Genetics*, 99: 969-977.

