

**Maria Angélica Oliveira Marinho**

**CITOTAXONOMIA DE ESPÉCIES DA TRIBO  
VERNONIEAE CASS. (ASTERACEAE BERCHT. & J.  
PRESL) OCORRENTES EM PERNAMBUCO**

**Recife, PE**

**2014**

**Maria Angélica Oliveira Marinho**

**CITOTAXONOMIA DE ESPÉCIES DA TRIBO  
VERNONIEAE CASS. (ASTERACEAE BERCHT. & J.  
PRESL) OCORRENTES EM PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Botânica.

**ORIENTADOR:**

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho –

**CO-ORIENTADORAS:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Betânia Melo de Oliveira

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Rita Cabral Sales de Melo

**Recife, PE**

**2014**

Ficha catalográfica

M338c Marinho, Maria Angélica Oliveira  
Citotaxonomia de Espécies da tribo Vernonieae Cass.  
(Asteraceae Bercht. & J. Presl) ocorrentes em Pernambuco /  
Maria Angélica Oliveira Marinho. – Recife, 2014.  
98 f. : il.

Orientador: Reginaldo de Carvalho.  
Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia,  
Recife, 2014.  
Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Citotaxonomia 2. Bandeamento 3. DNAr 45S 4. Índice  
de assimetria I. Carvalho, Reginaldo de, orientador II. Título

CDD 581

**Citotaxonomia de Espécies da tribo Vernonieae Cass. (Asteraceae Bercht. & J. Presl) ocorrentes em Pernambuco**

**Maria Angélica Oliveira Marinho**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica. Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora :

**Orientador:**

---

**Dr. Reginaldo de Carvalho, UFRPE**

**Banca Examinadora:**

---

**Dra. Margareth Ferreira de Sales, UFRPE**

---

**Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza, UFPE**

---

**Dr. Leonardo Pessoa Félix, UFPB**

---

**Dr. Maria Teresa Aureliano Buril Vital, UFRPE**

**Data da aprovação: 24/02/2014**

*Dedico este trabalho em especial à  
pessoa que fez a diferença na minha  
vida: meu papai, José Batista  
Marinho, In memoriam.*

*Ensinou-me a amar, perdoar, lutar  
e vencer; sempre me apoiou e não  
me deixou desistir.*

*Amor eterno!*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à **Deus** por sempre abrir portas em minha vida e me fazer encherá-las, assim como me orientar e proteger.

Aos meus pais **Maria do Socorro Oliveira e José Batista Marinho** pela dedicação à minha educação, incentivo, carinho e afeto.

À minhas irmãs, **Ana Raquel, Amanda e Rebeca**, pela amizade e acreditarem no meu potencial.

À **Rafael Neves M. Oliveira**, pela paciência e credibilidade, acima de tudo amizade e companheirismo.

Amo todos vocês!!!

Enfim...

Muitas foram às pessoas que colaboraram, direta ou indiretamente, com a realização deste trabalho, a todas quero expressar aqui minha gratidão:

À **Universidade Federal Rural de Pernambuco** e ao **Programa de Pós- Graduação em Botânica** pela oportunidade de realizar este projeto.

Aos **amigos e colegas de laboratório Genialdo, M<sup>a</sup> Luiza, Vanessa, Viviane, Polyana, Tássia, Silmar e Lamonier**, pela amizade, ajuda nas coletas e tratamento dos materiais, entre outros.

Aos **amigos e colegas do Mestrado, Lourenço, Leonardo, Patricia, Laís, Nathalia, André**, pela amizade.

À **Lidiane** pela ajuda e coleguismo.

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Betânia Melo de Oliveira**, co-orientadora, pela credibilidade, constante incentivo, apoio, amizade e orientação na realização deste projeto.

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Rita Cabral Sales de Melo**, co-orientadora, pelo material biológico e orientação.

Aos **Professores do Curso de Pós-Graduação em Botânica**, pela dedicação e formação.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Zickel**, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela dedicação ao Curso de Pós-Graduação.

À **kênia** pela eficiência e ajudas na secretaria da Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Ao **Profº. Dr. Reginaldo Carvalho**, pela orientação, oportunidade e ensinamentos.

Ao **CNPq** pela bolsa sem a qual eu não conseguiria prosseguir nos estudos.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

***Muito obrigada!***

"A vontade de Deus nunca irá levá-lo aonde a  
Graça de Deus não irá protegê-lo."



## RESUMO

---

A família Asteraceae Bercht. & J. Presl possui 1.500 gêneros e cerca de 30.000 espécies, distribuídas por todo o mundo. Embora cosmopolitas, ocorrem predominantemente em ambientes não florestais, apresentando como características principais inflorescências em capítulos, flores de ovário ínfero e estames com anteras conatas. No Brasil, a família Asteraceae representa aproximadamente 300 gêneros e 2.000 espécies. A tribo Vernonieae tem grande importância econômica, medicinal e ecológica. Contudo, sua taxonomia é bastante complexa com problemas de delimitação de espécies. A análise cariotípica, através da citotaxonomia, auxilia na compreensão dos eventos citoevolutivos envolvidos nas modificações do genoma. Os parâmetros utilizados neste tipo de estudo representam ferramentas importantes para a taxonomia. Estudos citotaxonomicos necessitam, além de dados como número e morfologia cromossômica, de informações advindas de técnicas citogenéticas de coloração diferencial como o padrão de distribuição e quantidade de heterocromatina constitutiva, a diferenciação citoquímica da heterocromatina por fluorocromos, a identificação de regiões repetitivas ou de sequências únicas por hibridização *in situ*, entre outros. Para a caracterização do cariótipo foi analisado o CTHC, IC, BC, BL, R, CMC, A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> de onze espécies da tribo Vernonieae, além de um estudo da localização e distribuição da heterocromatina constitutiva e sítios de DNAr 45S no cariótipo de seis espécies desta tribo. Apesar da variação no número cromossômico de  $2n = 18$  a  $2n = 60$ , os dados morfométricos evidenciaram para todas as espécies cariótipos simétricos com predominância de cromossomos metacêntricos. O tamanho cromossômico variou de 1,0 a 4,09  $\mu\text{m}$  e o comprimento cromossômico total variou de 58,31  $\mu\text{m}$  em *Pithecoseris pacourinoides* a 192,70  $\mu\text{m}$  em *Blanchetia heterotrichia*. Embora esses dados mostraram alta similaridade entre os cariótipos estudados, com relação à morfologia cromossômica para os diversos gêneros estudados, foi detectado polimorfismos de número e tamanho cromossômico entre as espécies. Observou-se uma grande diversidade no padrão de bandas entre as espécies analisadas com números de bandas CMA<sup>+</sup> variando de quatro a dezesseis, enquanto que apenas duas espécies apresentaram bandas DAPI<sup>+</sup> posição terminal dos braços cromossômicos. Os sítios de DNAr 45S variou de dois a seis. As diferenças no tamanho e quantidades de bandas heterocromáticas e sítios de DNAr 45S reveladas podem estar relacionadas a pequenas alterações estruturais envolvidas nos processos de evolução dos cariótipos da tribo Vernonieae.

**PALAVRAS-CHAVE:** Citotaxonomia, Bandejamento, DNAr 45S, Índice de assimetria.

## ABSTRACT

---

The Asteraceae family Bercht. & J. Presl has 1,500 genera and about 30,000 species distributed throughout the world. Although cosmopolitan, occurring predominantly in non-forest environments, presenting the main characteristics inflorescences into chapters, inferior ovaries, flowers and stamens with connate anthers. In Brazil, the Asteraceae family represents approximately 300 genera and 2,000 species. The Vernoniae tribe has great economic, medical and ecological importance. However, their taxonomy is very complex problems of delimitation of species. The karyotype analysis by cytotaxonomy, cytogenetics assists in understanding the events involved in the modifications of the genome. The parameters used in this type of study represent important tools for taxonomy. Cytotaxonomic studies require, in addition to data such as number and chromosome morphology, the information derived from cytogenetic techniques such as differential staining pattern of distribution and amount of constitutive heterochromatin, cytochemical differentiation of heterochromatin by fluorochromes, the identification of repetitive regions or unique sequences by *in situ* hybridization, among others. To characterize the karyotype was analyzed CTHC, IC, BC, BL, R, CMC, A1 and A2 of eleven species of Vernoniae tribe (Asteraceae), and a study of the location and distribution of constitutive heterochromatin and 45S rDNA sites in karyotypes of six species of these species. Despite the variation in chromosome number of  $2n = 18$  to  $2n = 60$ , the morphometric data showed karyotypes for all species with symmetrical predominance of metacentric chromosomes. The chromosome size ranged from 1.0 to 4.09  $\mu\text{m}$ . The total chromosome length ranged from 58.31  $\mu\text{m}$  in *Pithecoseris pacourinoides* to 192.70  $\mu\text{m}$  in *Blanchetia heterotrichia*. Although these data showed high similarity between the karyotypes studied with respect to chromosome morphology for several genera was detected polymorphisms of chromosome number and size between species. There was a great diversity in banding patterns between the two species with numbers of CMA positive bands ranging from four to sixteen, while only two species showed DAPI positive bands in the terminal position of the chromosome arms. The 45S rDNA sites varied from two to six. The differences in the size and amounts of heterochromatic bands and 45S rDNA sites revealed may be related to small structural changes involved in the processes of evolution of karyotypes of Vernoniae tribe.

**KEYWORDS:** Cytotaxonomy, banding, 45S rDNA, asymmetry index.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1** - Cromossomos mitóticos de espécies da tribo Vernonieae: **A-** *Vernonia scorpioides*; **B-** *Blanchetia heterotrichia*; **C-** *V. brasiliana*; **D-** *V. chalybaea*; **E-** *Elephantopus hirtiflorus*; **F-** *Pithecoseris pacourinoides*; **G-** *Centratherum punctatum*; **H-** *V. cinerea*; **I-** *E. mollis*. Barra corresponde a 10µm..... 40
- Figura 2** - Cromossomos mitóticos de espécies da tribo Vernonieae: **A-** *Rolandra fruticosa*; **B-** *Vernonia brasiliana*; **C-** *V. condensata*. Barra corresponde a 10µm..... 41
- Figura 3** - Idiogramas de espécies de Vernonieae. **A-** *Centratherum punctatum*; **B-** *Elephantopus mollis*; **C-** *E. hirtiflorus*; **D-** *Pithecoseris pacourinoides*; **E-** *Rolandra fruticosa*; **F-** *Blanchetia heterotrichia*; **G-** *Vernonia brasiliana*; **H-** *V. cinerea*; **I-** *V. condensata*; **J-** *V. chalybaea*; **K-** *V. scorpioides*. Barra corresponde a 10µm..... 42
- Figura 4** - Diagrama de dispersão das assimetrias cariotípicas de Zarco (1986) para as espécies de Vernonieae estudadas. Linhas tracejadas se referem aos grupos com assimetria cariotípica próximas..... 43
- Figura 5** - Relação entre o número cromossômico, o CTHC e os possíveis níveis de ploidia em espécies da tribo Vernonieae..... 44

### Capítulo 2

- Figura I** - Coloração diferencial CMA/DAPI (A, C e E) e FISH com DNAr 45S (B, D e F) de cromossomos mitóticos de espécies da tribo Vernonieae: **A-B-** *Vernonia brasiliana*.; **C-D-** *Centratherum punctatum*; **E-F-** *Rolandra fruticosa*. Barra corresponde a 10µm..... 59
- Figura II** - Coloração diferencial CMA/DAPI (A, C, E e F) e FISH com DNAr 45S (B, D e G) de cromossomos mitóticos de espécies da tribo

	Vernonieae: <b>A-B</b> – <i>Vernonia cinerea</i> ; <b>C-D</b> - <i>V. condensata</i> .; <b>E-G</b> – <i>V. scorpioides</i> . Barra corresponde a 10µm.....	60
<b>Figura III-</b>	Idiogramas de coloração diferencial CMA/DAPI e FISH DNAr 45S de espécies de Vernonieae: <b>A-</b> <i>Centratherum punctatum</i> ; <b>B-</b> <i>Vernonia brasiliiana</i> ; <b>C-</b> <i>V. cinerea</i> ; <b>D-</b> <i>V. condensata</i> ; <b>E-</b> <i>Rolandra</i> <i>fruticosa</i> ; <b>F-</b> <i>V scorpioides</i> .....	61

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Tabela 1 -</b>	Números básicos propostos ( $x$ ); Números cromossômicos ( $2n$ ); Comprimento total haploide de cromatina (CTHC); Média do comprimento Cromossômico (CMC), cromossomo maior e menor (b-B). Média da razão entre braço longo e curto (R) e do Índice centromérico (IC). FCM = Fórmula Cariotípica Média (M = Metacêntrico). Índices de assimetria de Huziwara (1962), TF%, e de Zarco (1986), A <sub>1</sub> e A <sub>2</sub> ; TC= tipo de condensação (P = Proximal), TN= tipo de núcleo (SR = Semi-reticulado), e NV= nível de ploidia de onze espécies de Vernoniaeae.....	38
<b>Tabela 2</b>	Número cromossômico prévio das espécies estudadas.....	39

### Capítulo 2

<b>Tabela I -</b>	Números básicos propostos ( $x$ ); Números cromossômicos diploides ( $2n$ ); Número de bandas CMA/DAPI; Número de sítios DNAr 45S e Nível de ploidia sugerido de espécies de Vernoniaeae .....	58
-------------------	--	----

## SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Família Asteraceae Bercht. & J. Presl .....	03
2.2. Tribo Vernonieae Cass.....	04
2.3. Citotaxonomia .....	06
2.3.1. Coloração convencional.....	06
2.3.2. Índices de assimetria e Morfometria cariotípica.....	07
2.3.3. Coloração diferencial CMA e DAPI.....	07
2.3.4 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente – FISH.....	08
2.4. Citogenética da tribo Vernonieae.....	08
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
<b>CAPÍTULO 1 - Índices de assimetria e morfometria em espécies da tribo Vernonieae Cass. (Asteraceae Bercht. &amp; J. Presl).....</b>	<b>19</b>
RESUMO.....	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	24
DISCUSSÃO.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
APÊNDICE I - Tabela e Figuras.....	35
<b>CAPÍTULO 2 - Localização da heterocromatina por meio da coloração CMA/DAPI e dos sítios de DNAr 45S em espécies da tribo Vernonieae Cass. (Asteraceae Bercht. &amp; J. Presl).....</b>	<b>42</b>
RESUMO.....	44
INTRODUÇÃO.....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
RESULTADOS.....	47
DISCUSSÃO.....	48

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
APÊNDICE II - Tabela e Figuras.....	55
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>59</b>
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
<b>ANEXOS.....</b>	<b>62</b>
1. NORMAS DA REVISTA THE BOTANICAL JOURNAL OF THE LINNEAN SOCIETY .....	63
2. NORMAS DA REVISTA AMERICAN JOURNAL OF BOTANY .....	73

## 1. INTRODUÇÃO

---

---

Os representantes da família Asteraceae Bercht. & J. Presl ocorrem em todo o mundo e em quase todos os tipos de ambiente, podendo ser encontrados nos mais diversos habitats, preferencialmente em ambientes campestres e em condições climáticas variadas, desde regiões tropicais e subtropicais até temperadas (CANCELLI *et al.*, 2010). No Brasil, a família está bem representada, com aproximadamente 300 gêneros e 2.000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005), sendo a família mais numerosa de todas as Eudicotiledoneae, representando cerca de 10% da flora mundial (BREMER, 1994).

A família Asteraceae é composta de ervas perenes e anuais, subarbustos, arbustos, lianas e árvores (MONDIN, 2006). Possui folhas simples, alternas, opostas ou verticiladas, inteiras, dentadas ou lobadas a cortadas de forma variada (CRONQUIST, 1968). Para Bremer (1994) esta família apresenta 17 tribos e três subfamílias, já Panero e Funk (2002) citam dez subfamílias e 35 tribos. Entretanto, Pruski e Sancho (2004) reconheceram apenas 19 tribos distribuídas em cinco subfamílias. Na presente pesquisa adotou-se a classificação de Bremer (1994). A tribo Vernonieae Cass. é diferenciada das outras tribos de Asteraceae pelo seu capítulo homógomo, com flores hermafroditas, corolas tubulosas e ramos do estilete longos e agudos (BREMER, 1994). Esta tribo apresenta muitas divergências quanto à delimitação dos seus gêneros.

A citotaxonomia trata-se do uso de dados citogenéticos na taxonomia (GUERRA, 1990), e sua utilização pode auxiliar na caracterização das espécies. Os principais parâmetros utilizados nesta ciência são o número e a morfologia cromossômica, além do comportamento cromossômico na meiose que integrados com a taxonomia clássica buscam entender e resolver problemas de sistemática e mecanismos de evolução cromossômica (GUERRA, 1988, 1990; STEBBINS, 1971).

A caracterização cariotípica de espécies vegetais representa uma alternativa para ampliar as informações utilizadas em estudos citotaxonômicos, uma vez que, representa um dos instrumentos mais importantes para a compreensão das relações de parentesco, além de possibilitar, em algumas situações, o esclarecimento dos possíveis mecanismos cromossômicos envolvidos na evolução, tanto dentro de pequenos táxons quanto em níveis superiores (STEBBINS, 1971).

Estudos citotaxonômicos abrangem, além de dados de número e morfologia cromossômica, de informações sobre o conteúdo de DNA, bem como a distribuição e



quantidade de heterocromatina constitutiva avaliada por meio de diferentes técnicas de bandeamento, diferenciação citoquímica da heterocromatina por fluorocromos, identificação do DNA satélite por hibridização *in situ*, entre outros (GREILHUBER, 1984). Estes métodos evidenciam uma diferenciação longitudinal dos cromossomos, e por isto possibilitam uma identificação mais precisa dos mesmos, permitindo a análise das relações existentes entre os diferentes grupos de plantas (VOSA, 1985).

O presente estudo visou caracterizar o cariótipo de representantes da tribo Vernonieae ocorrentes em Pernambuco, identificando alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais por meio da citogenética clássica e citogenética molecular, com DNAr 45S e 5S. Com isso, pretendeu-se também ampliar o conhecimento citogenético da flora brasileira do ponto de vista citotaxonômico para Asteraceae, fornecendo subsídios para futuros estudos taxonômicos na família.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 Família Asteraceae Bercht. & J. Presl

A família Asteraceae Bercht. & J. Presl apresenta aproximadamente 1.500 gêneros e 23.000-32.000 espécies, representando 8-10% das Angiospermae distribuídas mundialmente (PRUSKI; SANCHO, 2004). Embora cosmopolitas, ocorrem predominantemente em ambientes não-florestais, apresentando como características principais inflorescências em capítulos, envoltos por brácteas e flores epíginas e estames com anteras conatas (BREMER, 1994). Por apresentar gêneros com grande número de espécies (Ex.: *Aster* L., *Senecio* L., *Eupatorium* L. e *Vernonia* Schreb.) a filogenia e circunscrição das subfamílias, tribos e gêneros, têm gerado muitos posicionamentos taxonômicos diferentes (BREMER, 1994; PANERO; FUNK, 2002; CABRERA, 1944; KEELEY, 1978; JONES, 1979a; KEELEY; ROBINSON, 2009).

Para Bremer (1994), a família compreende três subfamílias e 17 tribos, que diferem na morfologia, química, citologia e sequências de DNA. Panero e Funk (2002) propuseram 10 subfamílias e 35 tribos, com base em estudos de filogenia molecular. Entretanto, para Prusk e Sancho (2004) a família apresenta 19 tribos e cinco subfamílias. No Brasil, as tribos mais diversas são: Astereae Cass., Eupatorieae Cass., Barnadesieae D. Don, Gnaphalineae Cass. ex Lecoq & Juillet, Heliantheae Cass., Libeae, Mutisieae Cass., Plucheeae Benth. A. Anderb. e Vernonieae Cass. (MATZENBACHER, 2003).

Dentre as 20 tribos reconhecidas de Asteraceae, a tribo Vernonieae apresenta maior problema de delimitação taxonômica (FUNK *et al.*, 2005). Relações entre esse táxon são mal compreendidas, em grande parte devido à natureza altamente variável, já que ocorrem em grande diversidade de habitats, e apresentam sobreposição da maioria dos caracteres morfológicos (KEELEY *et al.*, 2007).

A tribo Vernonieae está bem representada no Brasil com vários gêneros endêmicos, bem como numerosas espécies da subtribo Vernoniinae (ROBISON, 1988), esta com cerca de 40 gêneros e 450 espécies (BAKER, 1873). Esta tribo foi estabelecida por Cassini (1819) e é conhecida como “a tribo do mal”, devido ao grande número de espécies e hábitos diversificados, em combinação com a sua distribuição cosmopolita, além das semelhanças na morfologia das espécies, mesmo entre aqueles encontrados em diferentes continentes e o número muito pequeno de características morfológicas que podem ser utilizados de forma confiável para a taxonomia (KEELEY *et al.*, 2007).

## 2.2 Tribo Vernonieae Cass.

A tribo Vernonieae possui distribuição pantropical, apresentando muitas vezes espécies com um endemismo pronunciado para uma dada localidade (JONES, 1977). São encontradas em locais tropicais, subtropicais e temperadas de todo o mundo, com exceção da Europa, parte da Ásia ao norte do Himalaia e Antártida (KEELEY *et al.*, 2007). Para a tribo existe também uma ampla gama de formas de crescimento e tipos de habitat com espécies tipicamente encontrados em solos, tais como serpentina, calcário, bauxite, dolomite, vulcânico e outros ricos em metais (KEELEY *et al.*, 2007).

Segundo Dematteis e Almeida (2010), o táxon é amplamente distribuído no Brasil, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Argentina, mas é basicamente concentrado no sudeste do Brasil. Sales-de-Melo *et al.* (2010) fizeram um levantamento da ocorrência desta tribo no estado de Pernambuco, registrando 32 espécies distribuídas em 13 gêneros.

Do ponto de vista taxonômico, Vernonieae foi considerada um dos mais complexos grupo de Asteraceae (ROBINSON 2007; KEELEY *et al.*, 2007). Bentham (1873) classificou os gêneros da tribo Vernonieae com base, principalmente, na variação do papus e em algumas características da inflorescência, citando o gênero *I* como o mais representativo. Jones (1977) apresentou em sua revisão cerca de 70 gêneros e 1.456 espécies para essa tribo baseado na morfologia de pólen, número cromossômico e presença de terpenoides.

Vernonieae é uma das tribos mais bem sucedidas de Asteraceae, além de compreender mais de um terço de todas as espécies desta família juntamente com as tribos Liabeae e Cichorieae, e é subdividida em 21 subtribos e aproximadamente 130 gêneros, com 1500-1700 espécies (KEELEY *et al.*, 2007).

Há mais de 50 gêneros monotípicos e cerca de 35 gêneros, com menos de três espécies cada, uma situação extremamente incomum (KEELEY *et al.*, 2007). Para Pernambuco foram registrados oito gêneros monoespecíficos, *Albertinia* Spreng, *Argyrovernonia* MacLeish, *Blanchetia* DC., *Centratherum* Cass, *Paralychnophora* MacLeish, *Pithecoseris* Mart. Ex DC., *Rolandra* Rottb. e *Telmatophila* Mart (Salles-de-Melo *et al.*, 2010).

A tribo Vernonieae apresenta ervas perenes ou raramente anual, arbustos e árvores pequenas, raramente com o látex; folhas geralmente alternas, raramente opostas, às vezes em roseta basal, sésseis ou pecioladas; inflorescência cimosa ou com ramos

cidosos, muitas vezes escorpioides ou seriados, flores geralmente bissexuais e férteis; brácteas involucrais, geralmente imbricados, brácteas internas persistentes ou decíduas; corolas avermelhadas, arroxeadas ou brancas, raramente amareladas; base da antera geralmente calcarada, com ou sem apêndices estéreis; apêndice apical não constricto na base, com ou sem glândulas; base de estilete imerso no nectário, com ou sem alargamento basal ou anel basal diferenciado (ROBINSON, 1999). Características como tipos de pólen, apêndices das anteras, número e forma dos cristais na parede do aquênio e análise do cariótipo podem ser usadas na delimitação das subtribos (ROBINSON, 1999).

Estudos moleculares revelaram que Vernoniae é a única tribo da família Asteraceae de origem paleotropical (Madagascar / África) e cuja tribo irmã, a Liabeae, teve origem no Novo Mundo (norte dos Andes, América do Sul) e encontrada em todo o Novo Mundo com grandes irradiações de gêneros e espécies do sul da Argentina para o leste dos Estados Unidos e Antilhas (KEELEY *et al.*, 2007).

A tribo Vernoniae é de grande importância econômica, medicinal e ecológica. Muitas de suas espécies são utilizadas para tratar doenças de pele, para livrar o corpo de parasitas e vermes, dores de estômago, dor menstrual e do parto e como um analgésico geral, tendo sido isolada uma variedade de compostos farmacologicamente ativos, alguns de espécies brasileiras e africanas, testados para uso contra parasitas tropicais e câncer (KEELEY *et al.*, 2012). Além disso, a folha de algumas espécies é utilizada como fonte de vitamina C e sais minerais na África e agricultores utilizam-na para alimentar os animais domésticos (KEELEY *et al.*, 2012).

Folhas de espécies do gênero *Vernonia* são utilizadas para tratar gripe, resfriados, tosses, bronquite, contusões, hemorroidas e infecções do útero pela medicina popular no Brasil (CORRÊA *et al.*, 2004). A ação medicinal de *V. cinerea* (L.) Less. foi comprovada cientificamente. Esta espécie apresenta propriedades analgésicas, anti-inflamatória, antipirética e ação citotóxica (IWALEWA *et al.*, 2003). Algumas sementes de representantes da tribo são utilizadas na fabricação de óleos de alta qualidade. No Brasil algumas espécies são usadas para produzir grandes quantidades de xaropes de frutose, utilizados em bebidas; enquanto outras fornecem resinas para revestimentos de tinta e papel (KEELEY *et al.*, 2012).

Vernoniae é de extrema importância ecológica, sendo encontrada em solos antigos, como no Cerrado e Caatinga do Brasil e da escarpa oriental da África. Embora sejam cosmopolitas, ocorrem principalmente em ambientes não florestais (BREMER,

1994). Numerosas espécies em todo o mundo co-evoluíram com insetos endêmicos. Há uma série de formiga-mutualísticas em espécies africanas (KEELEY *et al.*, 2012). No Brasil, os tetrafídeos são a família de endófagos mais importantes das Vernonieae, sendo encontrados em capítulos dessa tribo (BREMER, 1994).

### **2.3. Citotaxonomia**

A análise citotaxonomica contribui de forma significativa no estudo da evolução, já que os cromossomos constituem o próprio material genético (GUERRA, 1988). Através das técnicas convencionais variações entre os cariótipos podem ser definidas. As técnicas de bandeamento C, coloração com corantes fluorescentes CMA/DAPI, e a localização de sequências de DNAr 5S e 45S podem auxiliar na diferenciação de espécies.

A análise cromossômica é a única maneira de observar o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, fáceis de serem medidos e diferenciados em subunidades, além de manipulados de diferentes formas (BRAMMER *et al.*, 2007).

#### **2.3.1. Coloração convencional**

A técnica com uso do corante Giemsa, tipo de coloração convencional, marca os cromossomos uniformemente, permitindo a obtenção de vários dados cromossômicos como o número cromossômico de cada espécie, as medidas dos cromossomos (comprimento total da cromatina, comprimento dos braços curtos e longos) que permitem determinar os índices de assimetria, o índice centromérico e a razão entre os braços cromossômicos, sendo possível também a visualização de regiões satélites associada ao cromossomo (podendo estar ausente) e da região centromérica.

O índice centromérico ou a razão entre os braços cromossômicos pode ser usado para estabelecer a fórmula cariotípica dos cromossomos, classificada nas categorias: metacêntrico, submetacêntrico, telocêntrico e acrocêntrico (GUERRA, 1988). Segundo Guerra *et al.*, (1997), estes dados e o padrão de condensação e de coloração, podem fornecer informações valiosas para comparar espécies ou identificar variações inter e intraespecíficas. Muitos trabalhos utilizaram a coloração convencional para determinar os números cromossômicos de espécies da tribo Vernonieae (ver por exemplo: DEMATTEIS 1996, 1998, 2002; DEMATTEIS; FERNÁNDEZ 1998, 2000;

DEMATTEIS *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007; ÂNGULO; DEMATTEIS 2009a e b, 2011).

### **2.3.2. Índices de assimetria e Morfometria cariotípica**

A morfologia cromossômica é um parâmetro usado para comparar cromossomos de uma mesma indivíduo e entre espécies diferentes. A medida dos braços cromossômicos permite obter valores como índice centromérico e a razão entre os braços longo e o curto de cada cromossomo. Estes dados também permitem obter assimetria cariotípica que é utilizada em muitos trabalhos para medir a assimetria inter e intracromossômica (PASZKO, 2006). A assimetria cariotípica pode ser intracromossômica, relacionada com a posição do centrômero no cromossomo e predominância de cromossomos com centrômeros terminais e subterminais num cariótipo, e intercromossômica, neste caso relacionado com o tamanho cromossômico altamente heterogêneo (LEVITSKY, 1931; STEBBINS, 1971).

Os índices de assimetria cariotípica, além de ser uma boa expressão da morfologia geral dos cariótipos de plantas, podem evidenciar alterações na morfologia dos cromossomos e têm sido frequentemente relacionado à evolução em plantas superiores (PASZKO, 2006). Na literatura existem diferentes métodos, utilizados para famílias diferentes, para avaliar a assimetria cariotípica, sendo os principais métodos: TF% de Huziwara (1962); o AsK% de Arano (1963); a classificação de Stebbins (1971), que é muito utilizada; o Rec e o Syi de Greilhuber e Speta (1976); o A1 (índice de assimetria intracromossômica) e o A2 (índice de assimetria intercromossômica) de Zarco (1986); e o "A" de Watanabe *et al.* (1999).

### **2.3.3. Coloração diferencial CMA e DAPI**

A coloração convencional é, muitas vezes, insuficiente para a diferenciação cromossômica intraespecífica e interespecífica, principalmente nas espécies que apresentam número e morfologia cromossômica semelhante. Por isso, são usadas técnicas de coloração diferencial como bandeamento C, coloração com fluorocromos CMA/DAPI e hibridização *in situ* para uma caracterização mais detalhada de cada cromossomo.

As técnicas diferenciais permitem corar bandas, caracterizando melhor alguns cromossomos, podendo ser utilizadas para identificar cromossomos homólogos ou auxiliar na análise da evolução cromossômica comparada (GUERRA; SOUZA, 2002).

Os fluorocromos são corantes que apresentam propriedades fluorescentes base-específicos. Os mais utilizados atualmente são o 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que se liga às regiões cromossômicas ricas em bases nitrogenadas adenina e timina (AT), e a Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>), que se liga as regiões heterocromáticas ricas em bases nitrogenadas guanina e citosina (GC).

Mansanares (2004) e Oliveira (2008) publicaram dados sobre as caracterizações citogenéticas da tribo Vernonieae através da técnica de coloração com o uso de fluorocromos CMA<sub>3</sub>/DAPI.

### **2.3.4 Hibridização *in situ* fluorescente – FISH**

A hibridização *in situ* permite estabelecer novos tipos de marcadores cromossômicos para a análise cariotípica comparada, localizar diversos genes e sequências repetitivas ao longo dos cromossomos, construir mapas físicos para diferentes espécies de plantas, entre outros (GUERRA, 2004).

Esta técnica foi descrita pela primeira vez por Gall e Pardue (1969) e consiste basicamente no pareamento de determinado segmento de ácido nucléico com uma sequência de nucleotídeos complementar situada dentro da célula. Para este fim, usavam inicialmente moléculas radioativas, mas recentemente tem sido utilizado com muito mais frequência corantes fluorescentes para detectar os nucleotídeos marcados da sonda, sendo chamada, portanto, de hibridização *in situ* fluorescente (Fluorescence *in situ* hybridization - FISH).

Os fluorocromos mais utilizados na coloração da sonda são os Cy3, FITC (fluorescein isothiocyanate), vermelho-Texas e rodamina. Para corar o DNA cromossômico total, usa-se mais comumente o DAPI ou o iodeto de propídeo. Sequências únicas ou repetitivas (organizadas em tandem) ou o DNA genômico total de um organismo podem ser usadas como sonda. Entretanto, as mais utilizadas são as de sequências repetitivas (DNAr 45S e 5S), devido ao fato de serem mais facilmente detectadas e proporcionarem sinais mais evidentes. Uma característica importante dos DNAr 5S e 45S (abrangendo as regiões 18S, 5,8S e 28S) é que a sequência de nucleotídeos desses genes é muito conservada evolutivamente, o que significa que elas são muito similares em todos os eucariotas (GUERRA, 2004).

## **2.4. Citogenética da tribo Vernonieae**

Muitos trabalhos contribuem para o estudo citogenético em Asteraceae, relatando número de cromossomos, nível de ploidia, comportamento meiótico, morfometria e morfologia cariotípica, índice de assimetria, análise de bandas, entre outros (COLEMAN, 1968; HUNZIKER *et al.*, 1990; TURNER *et al.*, 1979; ROBINSON *et al.*, 1981; SUNDBERGE *et al.*, 1986; HUNZIKER *et al.*, 1989; STROTHER; PANERO, 2001; JONES 1979a e b;. DEMATTEIS 1996, 1998, 2002; DEMATTEIS; FERNÁNDEZ 1998, 2000; DEMATTEIS *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007; ÂNGULO; DEMATTEIS 2009a e b, 2011).

Em relação a grande diversidade e quantidade de espécies da tribo Vernonieae, estudos cromossômicos envolvendo técnicas de citogenética, tanto clássica quanto molecular, são poucos para esta tribo. Os estudos citogenéticos para este taxon são principalmente referentes às subtribos Lychnophorinae e Vernoniinae, especificamente para o gênero *Vernonia*, com inexistência de informações para a grande maioria das demais subtribos. Existem poucos trabalhos no Brasil e apenas um único estudo citotaxonômico relevante desta tribo para o estado de Pernambuco, (SALES-DE-MELO *et al.*, 2010). Apesar da escassa informação citológica, os cromossomos têm se mostrado úteis na citotaxonomia do gênero *Lessingianthus* Harold & Robinson (DEMATTEIS, 2002).

Segundo Solbrig (1977), o número cromossômico básico é  $n = 9$ , sugerindo que este seja o número básico para a família. Para a tribo Vernonieae há uma grande diversidade de números básicos, especialmente na subtribo Vernoniinae com  $n = 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17$  e  $19$  (ÂNGULO; DEMATTEIS, 2011); em Leiboldiinae  $n = 19$ ; para Piptocarphinae  $n = 17$ ; em Centratherinae  $n = 16$ ; em Lychnophorinae  $n = 15, 17, 18$ ; Elephantopodinae  $n = 11, 13$ ; em Rolandrinae  $n = 8$ ; já para Chrestinae, Sipelisiinae e Trichospirinae o número cromossômico básico é desconhecido (ROBINSON, 1999). Segundo Jones (1979b), muitos autores acreditam que a tribo Vernonieae do Velho Mundo é baseada em  $x = 9$ , que pode ter se originado  $x = 10$  por aneuploidia ascendente.

Estudos anteriores para Vernonieae têm mostrado a ocorrência de poliploidia para a tribo como em *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H.Rob. com tetraploidia (RUAS *et al.*, 1991) e hexaploidia (HUNZIKER *et al.*, 1990); e no gênero *Lessingianthus* com o maior número de taxa poliploide, que na maioria dos casos, ocorre tetraploides e octaploides (DEMATTEIS *et al.*, 2007), além de apresentar os mais altos níveis de ploidia dentro de Vernonieae, com o caso mais extremo de uma espécie decaploide



com  $2n = 160$  (DEMATTEIS; FERNÁNDEZ, 2000). Poliploidia e aneuploidia foram responsáveis no surgimento de um número maior de cromossomos, sendo importante para evolução de Vernonieae no Novo Mundo (JONES, 1979b).

Foram realizadas contagem cromossômica para espécies da subtribo Lychnophorinae. Jones (1982) encontrou para *Paralychnophora reflexo-auriculata* (= *Eremanthus reflexo-auriculatus*; *L. reflexoauriculata*)  $2n = 36$ , enquanto que Sales-de-melo *et al.* (2010) e Mansanares *et al.* (2002) encontraram  $2n = 38$ . Mansanares *et al.* (2002) e Mansanares (2004) evidenciaram, dentre as trinta e três espécies, variação de números cromossômicos para o gênero *Lychnophora*:  $2n = 34$ ,  $2n = 36$  e  $2n = 38$ . Mansanares (2004) determinou números cromossômicos e a elaboração de cariótipos de algumas espécies das seções *Lychnophoriopsis* e *Sphaeranthus* do gênero *Lychnophora* de regiões do estado de Minas Gerais e da Bahia e apenas Sales-de-Melo *et al.* (2010) determinaram números cromossômicos para espécies da subtribo Lychnophorinae em Pernambuco.

Estudos com técnicas de bandeamento e hibridização *in situ* (FISH) são escassos para a tribo Vernonieae. Mansanares (2004) obteve resultados com a técnica de FISH com DNAr 45S para espécies da subtribo Lychnophorinae, encontrando oito sítios para *Lychnophora hatschbachii*, *L. montesclarensis*, *L. pinaster* e *L. syncephala*; 10 sítios em *L. pseudovillosissima*; 16 sítios para *L. syncephala* (célula polissomática), *L. cryptomerioides*, *L. diamantinana*, *L. ericoides*, *L. itacambirensis*, *L. staavioides*; seis sítios em *L. grazielae*; quatro sítios para *L. rosmarinifolia*; e dois sítios para *L. santosii*. Oliveira (2008) realizou estudos com técnicas de bandeamentos CMA/DA/DAPI e AgNOR e FISH em espécies do gênero *Vernonia* de regiões dos estados de São Paulo e de Minas Gerais e observou pequenas diferenças cariotípicas entre as espécies estudadas.

### 3. REFERÊNCIAS

---

- ÂNGULO, M. B.; DEMATTEIS M. Caryological analysis of South American species of *Vernonia* (Vernonieae, Asteraceae). **Plant Biosystems**. 2009a. 143 (1):20–24.
- ÂNGULO, M. B.; DEMATTEIS M. Karyotype analysis in eight species of *Vernonia* (Vernonieae, Asteraceae) from South America. **Caryologia**. 2009b. 62 (2):81–88.
- ÂNGULO, M. B.; DEMATTEIS, M. Cytotaxonomy of some species of the South American genus. **Plant Syst Evol**. 2012. 298:277–285.
- ARANO, H. Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan. IX. The karyotype analysis and phylogenetic considerations on *Pertya* and *Ainsliaea*. **Botanical Magazine** (Tokyo). 1963. 76: 32–39.
- ARIVOLI, S.; TENNYSON, S.; MARTIN, J. J. Larvicidal efficacy of *Vernonia cinerea* (L.) (Asteraceae) leaf extracts against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Journal of Biopesticides**. 2011; 4 (1): 37-42.
- BAKER, J. G. Compositae I. Vernonieae. In: Martius, c.f. e Eichler, a.g. (eds.). **Flora brasiliensis**. Lipsiae, Monachii. 1873. 6(2):1-180.
- BARROS, R. F. M. **A tribo Vernonieae Cass. (Asteraceae) em Áreas de Conservação de Cerrado do Estado do Piauí**. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, 2002.
- BENTHAM, G. Notes of the classification history, and geographical distribution of the Compositae. *Jour. Linn. Soc. Bot.*, 1873. 13: 355-577.
- BEVELLE, C.A.; HANDY, G.A.; SEGAL, R.A.; CORDELL, G.; FARNSWORTH, N. R. Isocentratherin, a cytotoxic germacrolide from *Centratherum punctatum* (Compositae). **Phytochemistry**. 1981. 20 (7): 1605 –1607.
- BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. Citogenética vegetal: da era clássica à molecular. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 9p. html. 2007 (Embrapa Trigo. Documentos Online, 85). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do85.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm)>. Acessado em 20 de março de 2012.
- BREMER, K. Asteraceae: Cladistics e Classification. Portland, **Timber Press**. 1994.
- BUSKÜHL, H. **Avaliação in vitro do mecanismo de ação citotóxico da mistura e substâncias isoladas da *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers.**, Dissertação (Mestrado). Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí. 2007.

- CABRERA, A. L. Vernonicas Argentinas (Compositae). **Darwiniana**. 1944. 6(3):265–379.
- CABRERA, A. L.; KLEIN, R. M. Compostas: 3. Tribo: Vernoniae. **Flora Ilustrada Catarinense**. 1980. p 354-355.
- CANCELLI, R. R. *et al.* Catálogo palinológico de táxons da família Asteraceae Martinov, no Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia. **Série Botânica**, Porto Alegre, 2010. 65(2): 201-280.
- CARVALHO, D. F. **Estudo do potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. (Asteraceae)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2012.
- CASSINI, J. Physiological Chil. **Natural History Art**. 1819. 88: 203.
- CHIAPPETA, A.; MELLO, J. F. Higher plants with biological activity Plants of Pernambuco II. **III Revista do Instituto de Antibióticos**. 1984. 111: 99-111.
- COLEMAN, J. R. Chromosome numbers in some Brazilian Compositae. **Rhodora**. 1968. 70: 228–240.
- CORRÊA, R. M.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; ALVES, T. L. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes tipos de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**. 2004. 28(2): 339-344.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: William C. Steere. 1968. 395p.
- D'ALBUQUERQUE, I. L.; DE LIMA, O. G.; NAVARRO, M. C. P. Antibiotic substances from higher plants. XIX. Occurrence of anti-microbial substances in the leaves of *Vernonia scabra*. **Rev Inst Antibiot**. Univ. Recife. 1961. 3:93-95.
- DEMATTEIS, M. Estudios cromosomicos en especies Argentinas de *Vernonia* (Asteraceae). **Bonplandia**. 1996. 9(1-2): 103-110.
- DEMATTEIS, M. Chromosome studies of some *Vernonia* species (Asteraceae). **Gen. Mol. Biol**. 1998. 21: 381-385.
- DEMATTEIS, M. Cytotaxonomic analysis of South American species of *Vernonia* (Vernoniae: Asteraceae). **Bot. Jour. Linn. Soc**. 2002. 139:401-408.
- DEMATTEIS, M., ALMEIDA, G. *Lessingianthus* In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB027189>> Acessado em: 12 de Julho de 2012.

- DEMATTEIS, M.; FERNÁNDEZ, A. Karyotypes of Seven South American Species of *Vernonia* (Vernonieae, Asteraceae). **Cytologia**. 1998. 63:323-328.
- DEMATTEIS, M.; FERNÁNDEZ, A. *Chromosome studies on nine South American species of Vernonia (Vernonieae, Asteraceae)*. **Caryologia**. 2000. 53(1): 55-61.
- DEMATTEIS, M.; MOLERO, J.; ANGULO, M. B.; ROVIRA, A. Chromosome studies on some Asteraceae from South America. **Bot J Linn Soc**. 2007. 153:221–230.
- DREUX, E. C. **Avaliação do efeito antiinflamatório do extrato hidroalcoólico de *Vernonia scorpioides* (Lam.) Persoons em inflamação aguda**. Dissertação (Mestrado), Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo, 2005.
- FUNK, V. A.; BAYER, R. J.; KEELEY, S.; CHAN, R.; WATSON, L.; GEMEINHOLZER, B.; SCHILLING, E.; PANERO, J. L.; BALDWIN, B. G.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; JANSEN, R. K. Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biol. Skr**. 2005. 55: 343–374.
- GREILHUBER, J. Chromosomal evidence in taxonomy. In: Heywood, V.H.; Moore, D.M. Current Concept in plant taxonomy. London, **Academic Press**. 1984. p: 157-180.
- GREILHUBER, J.; SPETA, F. C-banded karyotype in the *Scilla bohenackeri* Group, *S. persica* and *Puschkinia* (Liliaceae). **Plant System. Evol**. 1976. 126: 149-188.
- GUERRA, M. A. Situação da citotaxonomia de Angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. 1990. 4:75-86.
- GUERRA, M. Introdução a citogenética geral. Rio de Janeiro: **Ed. Guanabara**, 1988. 142p.
- GUERRA, M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco -I. **Revista Brasileira de Genética**. 1986. 9: 21-40.
- GUERRA, M.; Sousa, M. J. Como observar cromossomos – Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: **FUNPEC**. 2002. 191p.
- GUERRA, M. Uso do Giemsa na Citogenética Vegetal: comparação entre bandeamento simples e o bandeamento. **Ciência e cultura**. 1983. 35: 190-193.
- GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A. E. B.; CORNELIO, M. T. M.; SANTOS, K.; SOARES, W. D. Chromosome number and secondary constriction variation in 51

- accessions of a citrus germplasm bank. **Revista Brasileira de Genética**. 1997. 20(3): 489-496.
- GUERRA, M. FISH-Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**. 2004. 184p.
- HUZIWARA Y. Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosomes of Aster. **American Journal of Botany**. 1962. 49: 116–119.
- HUNZIKER, J. H.; ESCOBAR, A.; XIFREDA, C. C.; GAMERRO, J. C. Estudios cariológicos en Compositae. VI. **Darwiniana** 1990. 30:115–121
- HUNZIKER, J. H.; WULFF, A. F.; XIFREDA, C. C.; ESCOBAR, A. Estudios cariológicos en Compositae. V. **Darwiniana**. 1989. 29:25– 39.
- IWALEWA, E. O.; IWALEWA, O. J.; ADEBOYE, J. O. Analgesic antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* Less. leaf. **Journal of Ethnopharmacology**. 2003. 86: 229.
- JONES, S. B. Chromosome numbers of Vernonieae (Compositae). Bull. **Torrey Bot. Club**. 1979a. 106(2): 79-84.
- JONES, S. B. *IOPB* Chromosome numbers reports *LXIV*. **Taxon**. 1982. 31: 126-127.
- JONES, S. B. Synopsis and pollen morphology of Vernonia (Compositae: Vernonieae) in the New World. **Rhodora**. 1979b. 81:425–447.
- JONES, S. B. Vernonieae - systematic review: In: HEYWOOD, V.H., HARBONE, J. B.; TURNER, B.L. (eds.). *The biology and Chemistry of the Compositae*. London, **Academic Press**. 1977. 1:503-521.
- KEELEY, S. C. A revision of the West Indian Vernonias (Compositae). **J Arnold Arbor**. 1978. 59:360–413.
- KEELEY, S. C. **Vernonieae- The Evil Tribe**. Disponível em: <http://sterlingkeeley.wordpress.com/vernonieae/#> Acessado em 20 de março de 2012.
- KEELEY, S.; FORSMAN, Z. H.; CHAN, R. A. Phylogeny of the “evil tribe” Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: Support from separate and combined congruent datasets (trnL1, ndhF, ITS). **Mol Phylogen Evol**. 2007. 44:89–103.
- KEELEY, S. C.; ROBINSON, H. Vernonieae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RJ (eds) Systematics, evolution and biogeography of Compositae. **International Association for Plant Taxonomy**. Vienna. 2009. P. 439–469.

- KIRKMAN, L. K. Taxonomia revision f *Centratherum* and *Phyllocephalum* (Compositae: Vernonieae). **Rhodora**. Cambridge. 1981.83:1-24.
- LEVITSKY, G. A. The karyotype in systematics. Bulletin of Applied Botany, **Genetics and Plant Breeding**. 1931. 27: 220–240.
- LI PAN, D. D. L.; RISWAN, S.; L. B.S. KARDONO, ; CHAI, H.; BLANCO, E. J. C.; FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D.; SWANSON, S. M.; KINGHORN, A. D. Bioactivity-guided isolation of cytotoxic sesquiterpenes of *Rolandra fruticosa*. **Phytochemistry**. 2010.
- LORENZI, H. **Ervas Daninhas do Brasil**. São Paulo: Ed.: do autor. 1982. 108p.
- MAIA, G. L. A. **Estudo fitoquímico da espécie *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Reis (Fabaceae)**. Dissertação (Mestrado). - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2008. 151p.
- MANSANARES, M. E. **Estudo citotaxonômico de espécies do gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophorinae) em Minas Gerais**. Tese (Dotourado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2004.
- MANSANARES, M. E.; FORNI-MARTINS, E. R.; SEMIR, J. Chromosome numbers in the genus *Lychnophora* Mart. (Lychnophorinae:Vernonieae: Asteraceae). **Caryologia**. 2002. 55(4): 367-374.
- MATZENBACHER, I. N. Diversidade florística dos campos sul-brasileiros. In: Congresso Nacional de Botânica, 54, **Boletim de Resumos**, Recife, SBB. 2003. p.124-127.
- MONDIN, C. A. Riqueza genérica e dados biogeográficos das asteráceas brasileiras. Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética. 1ed. **Conferências Plenárias e Simpósios do 57º Congresso Nacional de Botânica**. Porto Alegre: Pallotti. 2006.
- MORAES, M. D. **A família Astearaceae na planície litorânea de Picinguaba**, Dissertação (Mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, 1997.
- NAKAJIMA, J. N. **A família Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 2000. 467p.
- NOGUCHI, N.; NIKI, E. Forum: Therapeutic Applications of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Human Disease. **Free Radical Biology and Medicine**. 2000. 28:1538–1546.

- OLIVEIRA, V. M.; FORNI-MARTINS, E. R.; SEMIR, J. Cytotaxonomic studies in six species of *Vernonia* (Asteraceae: Vernonieae). **Caryologia**. 2007. 60:37–47.
- OLIVEIRA, V. M. **Caracterização cariotípica de espécies de *Vernonia* Schreb. (Asteraceae: Vernonieae) com técnicas de diferencial longitudinal de cromossomos (bandamentos e hibridação de DNA *in situ*)**. Tese (Doutorado). Instituto de biologia. Campinas, SP. 2008.
- PANERO, J. L.; FUNK, V. A. T. A phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). **Proceedings of the Biological society of Washington** 2002. 115: 909-922.
- PASZKO, B. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. **Plant Systematics and Evolution**. 2006. 258:39–48.
- PEDROSA, A.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; SCHWEIZER, D.; BACHMAIR, A. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*, **Genetics**. 2002. 161:1661–1672.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CUELLAR, T.; BARBOSA, R. L. Aplicação de técnicas de citogenética na caracterização dos cromossomos da espécie *Coffea arabica* L. I **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. 2000. p.444-446.
- POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. Corumbá/MS: EMBRAPA, 1994.
- PRUSKI, J. F.; SANCHO, G. A. **Asteraceae or Compositae**. p. 33-38. In: N. Smith, S.A. Mori, A. Henderson, D.W. 2004.
- RAUH, L. K. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lam) Persons Em modelos de inflamação cutânea em camundongos**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008.
- RIBEIRO, P. G. F. E DINIZ, R. C. **Plantas aromáticas e medicinais – cultivo e utilização**. Londrina: IAPAR, 2008.
- RIZVI S. M. D.; BISWAS, D.; ARIF, J. M.; ZEESHAN, M. In-vitro antibacterial and antioxidant potential of leaf and flower extracts of *Vernonia cinerea* and their phytochemical constituents. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. 2011; 9 (2):164-169.
- ROBINSON, H.; BOHLMANN, F.; KING, R. M. Chemosystematic notes on the Asteraceae III. Natural subdivisions of the Vernonieae. **Phytologia**. 1980. 46:421–436.

- ROBINSON, H.; POWELL, A. M.; KING, R. M.; WEEDIN, J. F. Chromosome numbers in Compositae, XII: Heliantheae. **Smithsonian Contributions to Botany**. 1981. 52: 1–28.
- ROBINSON, H. Tribe Vernoniaeae. In: KADEREIT, J; JEFFREY, C. (eds) The families and genera of vascular plants. Asterales. **Springer**, Berlin. 2007. 8:165–192.
- ROBINSON, H. Generic and Subtribal Classification of American Vernoniaeae. **Smithsonian Contributions to Botany**. 1999. 89: 1-116.
- ROBINSON, H. Studies of the *Lepidaploa* complex (Vernoniaeae: Asteraceae), IV: the new genus, *Lessigenianthus*. **Proc. Biol. Soc. Wash.**, 1988101: 929-951.
- RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; VIEIRA, A. O. S.; MATZENBACHER, N. I.; MARTINS, N. S. Cytogenetics of genus *Vernonia* Schreber (Compositae). **Cytologia**. 1991. 56:239–247.
- SALES-DE-MELO, M. R. C. **Levantamento taxonômico e citogenético da tribo Vernoniaeae Cass. (Asteraceae) no estado de Pernambuco, Brasil**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2005.
- SALLES-DE-MELO, M. R.; LUCENA, R. M.; SEMIR, J. O.; CARVALHO, R.; PEREIRA, C. A.; BENKO-ISEPPON, A. M. Karyological features and cytotaxonomy of the tribe Vernoniaeae (Asteraceae). **Springer**. 2010. 285(3-4):189-199.
- SCHWEIZER, D.; AMBROS, P. F. Chromosome banding. In: **Methods in molecular biology: Chromosome analysis protocols**. 1994. 29:97-113.
- SMITHSONIAN TROPICAL RESEARCH INSTITUTE HERBARIUM, Smithsonian Tropical Research Institute's Herbarium (SCZ) 2013. Disponível em: <<http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/species/1748/?fam=Asteraceae&page=12>> Acessado em: 25 de julho de 2013.
- SOLBRIG, O. T. Chromosomal cytology and evolution in the family Compositae. In: Heywood, V.H.; Harborne, J.B. e Turner, B.L. (eds.). The Biology and Chemistry of the Compositae I. London. **Academic Press**. 1977. 1:267-281.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Plantarum**. Nova Odessa. 2005.
- STEBBINS, G. L. Chromosomal evolution in higher plants. **Addison-Wesley. Publishing Company**, California, 1971. 216 p.



- STROTHER, J. L.; PANERO, J. L. Chromosome studies: Mexican Compositae. **American Journal of Botany**. 2001. 88: 499–502.
- SUNDBERG, S.; COWAN, C. P.; TURNER, B. L. Chromosome counts of Latin American Compositae. **American Journal of Botany**. 1986. 73: 33–38.
- TURNER, B. L.; BACON, J.; URBATSH, L.; SIMPSON, B. Chromosome numbers in South American Compositae. **American Journal of Botany**. 1979. 66: 173–178.
- VILELLA, T., ANDRADE, B. S. B.; MELLO, U.; NORD, N.; SILVA, F. A. C.; REIS, S. L. A. Plantas medicinais e tóxicas. **III Simpósio sobre recursos naturais e Sócio-econômicos do Pantanal**. Os desafios do novo milênio. Carumbá-MS. 2000.
- VOSA, C. G. Plant chromosome banding and cytotaxonomy. Tópicos de citogenética e evolução de plantas. In: AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; MARTINS, P. S.; BANDEL, G. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**. 1985. p.17-25.
- WATANABE, K.; YAHARA, T.; DENDA, T.; KOSUGE, K. Chromosomal evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. **Journal of Plant Research**. 1999. 112: 145–161.
- YUSUF, M.; CHOWDHURY, J. U.; WAHAB, M. A.; BEGUM, J. Medicinal plants of Bangladesh. **BCSIR**, Dhaka. 1994. 17–266.
- ZARCO, C. A new method for estimating karyotype asymmetry. **Taxon** 1986. 35: 526–530.
- ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC. 2000.

# **CAPÍTULO 1**

## **Índices de assimetria e morfometria em espécies da tribo Vernonieae Cass. (Asteraceae Bercht. & J. Presl)**

**Autores:** Maria Angélica Oliveira MARINHO, Maria Rita Cabral SALES-MELO, Maria Betânia Melo de OLIVEIRA e Reginaldo de CARVALHO.

Capítulo 1- Índices de assimetria e morfometria em espécies da tribo Vernonieae Cass.  
(Asteraceae Bercht. & J. Presl)

---

---

Maria Angélica Oliveira MARINHO <sup>(1)</sup>, Maria Rita Cabral SALES-DE-MELO <sup>(2)</sup>,  
Maria Betânia Melo de OLIVEIRA <sup>(3)</sup> e Reginaldo de CARVALHO <sup>(1)</sup>

(1) Universidade Federal Rural de Pernambuco; Departamento de Biologia, Genética; Programa de Pós-graduação em Botânica; Laboratório de Citogenética Vegetal, Recife, Pernambuco, Brasil.

(2) Universidade Federal Rural de Pernambuco; Departamento de Biologia, Botânica; Recife, Pernambuco, Brasil.

(3) Universidade Federal de Pernambuco; Departamento de Bioquímica, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail para correspondência: reginaldo.ufrpe@gmail.com

Revista a ser enviada: *Botanical Journal of the Linnean Society* - Online ISSN: 1095-8339

RESUMO- A tribo Vernoniae pertence à família Asteraceae, apresentando 1.100 espécies distribuídas em 129 gêneros. Neste estudo foram analisadas de forma comparada 11 espécies pertencentes à essa tribo ocorrentes no estado de Pernambuco a fim de determinar o número cromossômico, polimorfismos cariotípicos e a relação entre os valores de assimetria cariotípica. Para caracterizar as espécies citogeneticamente e entender eventos citogenéticos foi analisado o Comprimento Total Haploide da cromatina (CTHC), Índice Centromérico (IC), tamanho dos Braços Curtos (BC) e Longos (BL), Razão entre os braços curtos e longos (R), comprimento médio cromossômico (CMC) e índices de assimetria intra ( $A_1$ ) e intercromossômica ( $A_2$ ). De acordo com os dados morfométricos todas as espécies apresentaram cariótipos simétricos com predominância de cromossomos metacêntricos. Observou-se variação no número cromossômico de  $2n=18$  a  $2n=60$  e tamanho cromossômico (1,0 a  $4,09\mu\text{m}$ ). O comprimento cromossômico total variou de  $58,31\mu\text{m}$  em *Pithecoseris pacourinoides* a  $192,70\mu\text{m}$  em *Blanchetia heterotrichia*. A média do comprimento cromossômico foi maior para *B. heterotrichia* e menor para *Pithecoseris pacourinoides* quando correlacionado com o CTHC. Esses dados revelaram alta similaridade entre os cariótipos estudados, ao menos em relação à morfologia cromossômica, mesmo em espécies pertencentes a diferentes gêneros. Entretanto foi detectado variabilidade de número e tamanho cromossômico entre as espécies. Aspectos sobre a relação de proximidade genética interespecífica e intergenérica em relação aos índices de assimetria intra e intercromossômica são discutidos.

**Palavras-chave:** Citotaxonomia - Morfometria - Índice centromérico - Variação interespecífica.

## INTRODUÇÃO

Vernonieae Cass. é uma das tribos pertencente a família Asteraceae, possuindo 1.100 espécies e 129 gêneros distribuídos em seis subtribos (Keeley *et al.*, 2007; Keeley & Robson, 2009). Uma particularidade desta tribo é a presença de capítulo homógomo, com flores hermafroditas, corolas tubulosas e ramos do estilete longos e agudos (Bremer, 1994). Espécies de Vernonieae podem ser encontradas como ervas anuais ou perenes, subarbustos, arbustos, lianas e árvores, raramente de grande porte. As folhas são normalmente alternas, com venação pinada (Bremer, 1994). Distribuem-se nas regiões pantropicais (Hind, 1993), das quais aproximadamente 55 gêneros e 435 espécies ocorrem no Brasil (Nakajima *et al.*, 2000). Dentre os gêneros brasileiros, destacam-se três endêmicos da região Nordeste: *Blanchetia* DC., *Pithecoseris* Mart. ex DC. e *Telmatophila* Mart. ex Baker (Barroso, 1986).

Do ponto de vista taxonômico, Vernonieae apresenta problemas de delimitação, sendo considerado um dos grupos mais complexos da família Asteraceae. Este fato se deve ao grande número de hábitos diferentes das espécies, em combinação com a sua distribuição mundial, além das semelhanças morfológicas encontradas mesmo entre espécies de diferentes continentes, sendo este parâmetro pouco confiável para distingui-las (Keeley *et al.*, 2007).

Um dos métodos utilizados no entendimento do modo de especiação em diferentes grupos de plantas é a investigação citogenética (Zohary, 1984), que em algumas espécies de Vernonieae, juntamente com dados bioquímicos e da variação morfológica vem resolvendo algumas questões taxonômicas (Vega & Massimiliano, 2012).

Uma das formas para explorar os dados citogenéticos é através do estudo morfométrico e da simetria cariotípica. Esta última é caracterizada pela predominância de cromossomos com morfologia semelhante, sendo os fatores que ocasionam a assimetria cariotípica e a posição do centrômero e o acúmulo de diferenças no tamanho relativo entre os cromossomos do complemento (Zuo & Yuan, 2011).

A tribo Vernonieae é relativamente bem estudada em termos citológicos. Existem estudos morfocariológicos relatados para muitas espécies da tribo (Jones, 1979; Dematteis, 1996, 2002; Dematteis & Fernandez, 2000; Oliveira *et al.*, 2007). No Brasil, a maior parte das análises cariológicas está voltada para as espécies da região sul, sudeste e centro-oeste e para o estado da Bahia, merecendo destaque os trabalhos de Mansanares *et al.* (2002, 2007). Para o estado de Pernambuco observa-se apenas o

estudo de Salles-de-Melo *et al.* (2010). O principal objetivo deste estudo foi contribuir para caracterização morfométrica dos cariótipos de onze espécies da tribo Vernonieae pertencentes a cinco subtribos ocorrentes no Estado de Pernambuco, além de detectar polimorfismos, determinar o número cromossômico e entender os eventos citogenéticos envolvidos na evolução cromossômica das espécies.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todo material vegetal investigado foi proveniente do estado de Pernambuco, tendo sido estudadas onze espécies da tribo Vernonieae pertencente a cinco subtribos: Centraterinae H. Rob., R. M. King & Bohlmann, *Centratherum punctatum* Cass.; Elephantopodinae Less, *Elephantopus mollis* Kunth e *E. hirtiflorus* DC.; Lychnophorinae Benth, *Pithecoseris pacourinoides* Mart. ex DC.; Vernoniinae Less., *Blanchetia heterotrichia* DC., *V. cinerea* (L.) Less., e *V. Chalybaea* Mart. Ex DC., *V. condensata* Baker, *V. brasiliiana* (L.) Druce e *V. scorpioides* (Lam.) Pers.; e Rolandrinae Less, *Rolandra fruticosa* Rottb. Foram coletados e herborizados ramos florais e vegetativos, seguindo as técnicas usuais. Materiais de todas as espécies foram depositados no Herbário PEUFR, Departamento de Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco (Tabela 1).

A análise citogenética convencional com Giemsa seguiu a técnica descrita por Benko-Iseppon e Morawetz (2000). Pontas de raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8HQ) 2 mM durante 12-24 h e fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1). As medições e análise da morfologia cromossômica foram realizadas com base nessa técnica.

Para análise foram utilizadas cinco metáfases de cada espécie com padrão semelhante de condensação. Para as medições cromossômicas foi utilizada como padrão a média da medida dos pares cromossômicos e dos braços, incluindo a posição centromérica. A obtenção das medidas foi feita através do programa MicroMeasure versão 3.3.

Para caracterização do cariótipo foram analisadas a morfometria e a assimetria cariotípica. Na morfometria foram medidos o comprimento total haploide de cromatina (CTHC), calculado mediante somatória do cariótipo haploide cromossômico; a média do índice centromérico (IC), do tamanho dos braços, curto (b) e longo (B), e da razão entre os braços curto e longo (R) de cada par cromossômico, fornecido pelo próprio programa; além do comprimento médio cromossômico (CMC). Para assimetria

cariotípica foi avaliado o índice de assimetria de Huziwarra (1962), TF%, e de Zarco (1986),  $A_1$  e  $A_2$ .

Os idiogramas foram desenhados usando o programa Power Point da Microsoft baseados nas médias das medidas dos braços cromossômicos. A nomenclatura adotada para a morfologia cromossômica foi a de Levan (1964), sendo M para metacêntricos (IC=50.0-40.1), SM para submetacêntricos (IC = 40.0-25.1), A para acrocêntricos (IC = 25.1-0.01) e T para telocêntricos (IC = 0.00). O diagrama de dispersão foi elaborado com base nos dados dos índices inter e intercromossômico de Zarco (1986) no programa Microsoft Excel, os grupos próximos foram detectados por análise dos componentes principais pelo programa MVSP e confrontados com análise de variância pelo programa BioEstat 5.0.

## RESULTADOS

Os parâmetros morfométricos e índices de assimetria para as onze espécies estudadas estão organizados na Tabela 1. Os números cromossômicos variaram de  $2n = 18$  a  $2n = 60$  (Figuras 1 e 2), enquanto que o tamanho variou de 1,00  $\mu\text{m}$  a 4,09  $\mu\text{m}$ . As espécies *Blanchetia heterotrichia* e *Pithecoseris pacourinoides* apresentaram o maior (192,70  $\mu\text{m}$ ) e o menor (58,31  $\mu\text{m}$ ) tamanho cromossômico, respectivamente. Porém não foi observada correlação com o número cromossômico e comprimento total haploide de cromatina para espécie *P. pacourinoides*. A média do comprimento cromossômico foi maior para *B. heterotrichia* e menor para *P. pacourinoides*, correlacionando este dado com o CTHC. Os idiogramas apresentados (Figura 3) revelam que a maioria dos cariótipos foram simétricos, com as espécies possuindo cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, com predominância de metacêntricos (Figura 1, 2 e 3).

A maioria das espécies apresentou condensação cromossômica do tipo proximal, exceto em *Vernonia scorpioides* e *V. brasiliana* que apresentaram condensação simultânea do braço curto e da região proximal. Já em *Rolandra fruticosa* a condensação mostrou-se dessincronizada. Com relação à distribuição e proporção da heterocromatina verificou-se que todas as espécies apresentaram núcleos interfásicos do tipo semi-reticulado. Dentre as espécies estudadas sugere-se que quatro sejam poliploides e as demais diploides com números básicos  $x = 9, 10, 13$  e  $15$  (Tabela 1). Na figura 5 observa-se uma relação entre o número cromossômico, o CTHC e as possíveis ploidias em espécies da tribo Vernonieae.

O diagrama de dispersão entre os índices de assimetria intra e intercromossômica mostraram grupos com proximidade entre espécies pertencentes a subtribos diferentes. Foram formados cinco grupos no diagrama, as linhas tracejadas em verde indicam as espécies com assimetria cariotípica intra e interespecífica próximos (Figura 4). As demais espécies estão livres, pois representam individualmente suas subtribos. Entre as espécies estudadas verificou-se que *V. brasiliiana* e *V. condensata*, ambas pertencentes à mesma subtribo Vernoniinae, são as que possuem cariótipo mais assimétrico quando comparadas as demais (Figuras 2 e 3). Um resumo das principais características cariotípicas das espécies em estudo está descrito abaixo.

### **Subtribo Centratherinae**

O número cromossômico para *Centratherum punctatum* foi  $2n = 32$ , o CTHC foi de 28,29  $\mu\text{m}$  e o CMC de 1,77  $\mu\text{m}$ . Esta espécie possui cariótipo simétrico representado, em média, por cromossomos do tipo metacêntrico (M). O índice centromérico foi de 0,45 e a razão entre os braços 0,97. O tamanho dos 16 pares cromossômicos do complemento variou de 1,36  $\mu\text{m}$  a 2,24  $\mu\text{m}$ . Com relação aos índices de assimetria, o TF% foi de 44,97 %; o índice de assimetria intra ( $A_1$ ) e intercromossômica ( $A_2$ ) foi de 0,13 cada (Tabela 1 e Figura 3).

### **Subtribo Elephantopodinae**

A análise cariotípica de *Elephantopus mollis* evidenciou o número cromossômico  $2n = 22$ . Os índices de assimetria TF%,  $A_1$  e  $A_2$ , foram 45,37 %; 0,17 e 0,12, respectivamente. O comprimento médio cromossômico (CMC) foi de 2,51  $\mu\text{m}$ , comprimento total haploide da cromatina (CTHC) foi 27,59  $\mu\text{m}$ , e a razão entre os braços (R) foi de 1,24. *E. hirtiflorus* apresentou número diploide  $2n = 28$ , CTHC igual a 25,87  $\mu\text{m}$ , CMC de 1,85  $\mu\text{m}$  e um valor R de 1,15. O índice de assimetria para esta espécie foi TF% igual a 46,50 %,  $A_1$  de 0,13 e  $A_2$  de 0,11 (Tabela 1). O índice centromérico (IC) foi semelhante para *E. mollis* e *E. hirtiflorus* de 0,45 e 0,47; o tamanho do maior e menor cromossomo variou de 2,04 a 3,08  $\mu\text{m}$  e de 1,53 a 2,13  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Tabela 1, Figuras 1 e 3).

### **Subtribo Lychnophorinae**

*Pithecoseris pacourinoides* apresentou  $2n=24$ , tamanho médio cromossomo variando de 1,15 a 1,72  $\mu\text{m}$ . O comprimento total haploide da cromatina foi de 16,43  $\mu\text{m}$ ,



o comprimento médio cromossômico 1,37  $\mu\text{m}$  e assimetria cariotípica TF% de 44,69. O índice de assimetria intracromossômica  $A_1$  foi 0,19 e o índice de assimetria intercromossômica  $A_2$  foi 0,12 (Tabela 1).

### **Subtribo Vernoniinae**

Nesta subtribo foram analisadas sete espécies: *Blanchetia heterotrichia*, com  $2n = 46$ ; *Vernonia brasiliiana*,  $2n = 34$ ; *V. cinerea*,  $2n = 18$ ; e *V. chalybaea*,  $2n = 32$ ; *V. condensata*  $2n = 40$  e *V. scorpioides*  $2n = 60$ . A análise dos cariótipos e idiograma revelam algumas diferenças entre as espécies dessa subtribo. A principal diferença corresponde ao tamanho cromossômico e CTHC (Tabela 1). Todas as espécies apresentaram em média cromossomos metacêntricos, sendo encontrados também cromossomos submetacêntricos (Tabela 1, Figura 1, 2 e 3). Apesar das diferenças morfológicas, semelhanças cromossômicas relacionadas à simetria cariotípica também foram detectadas entre espécies como no valor TF% para *V. Chalybaea* e *V. condensata* (Tabela 1).

### **Subtribo Rolandrinae**

A única espécie estudada para este taxa foi *Rolandra fruticosa* que apresentou número cromossômico diploide  $2n = 52$ , com variação do tamanho cromossômico de 1,22 a 2,37  $\mu\text{m}$ . Os valores nos índices de assimetrias foram de 45,78 % para o TF%, de 0,15 para o  $A_1$  e de 0,15 para o  $A_2$  (Tabela 1 e Figura 2).

## **DISCUSSÃO**

A caracterização citogenética para a tribo Vernoniaceae revelou uma elevada heterogeneidade no número cromossômico das espécies investigadas,  $2n = 18$  a  $2n = 60$ , demonstrando ser esta característica um bom parâmetro para estudos citogenéticos da tribo. O número cromossômico de *Centratherum punctatum*, *Elephantopus mollis*, *E. hirtiflorus*, *Pithecoseris pacourinoides*, *Blanchetia heterotrichia*, *Vernonia brasiliiana*, *V. cinerea* e *V. chalybaea* coincidiram com dados relatados na bibliografia, enquanto que em *V. condensata*, *V. scorpioides* e *Rolandra fruticosa* os valores foram diferentes (Tabela 2)

A variação encontrada para os números cromossômicos em relação à literatura pode ser decorrente de contagens errôneas, já que as espécies apresentam cariótipos com cromossomos pequenos ou ainda tratar-se de espécies crípticas ou citótipos.

Contudo, deve-se considerar também o local de coleta dos espécimes estudados nos trabalhos anteriores. As Vernonieae do Velho Mundo mostram-se menos diversificada em relação aos números cromossômicos que as espécies do Novo Mundo (Jones, 1979). Os números cromossômicos podem ser utilizados para diferenciação interespecífica, sendo um demonstrativo da heterogeneidade cromossômica existente nesta tribo.

O número básico para a tribo Vernonieae Cass. é  $x = 9$  ou  $10$  para as espécies paleotropicais e  $x = 16$  ou  $17$  para as neotropicais (Jones, 1977). Entretanto Bernardello (1986) e Dematteis e Fernandez (2000) sugerem  $x = 9, 10, 14, 15, 16, 17$  e  $19$  para as espécies do Novo Mundo. O número básico para as subtribos foi relatado por Robson (1999), Elephantopodinae, com  $x = 11$  ou  $13$ ; Centratherinae  $x = 16$ ; Lychnophorinae  $x = 15, 17$  e  $18$ ; e Vernoniinae  $x = 17$ . Acredita-se que nas espécies *Blanchetia heterotrichia*, *Vernonia condensata*, *V. scorpioides* e *Rolandra fruticosa* tenham ocorrido o evento da poliploidia. A divergência no número cromossômico das demais espécies, como em *Pithecoseris pacourinoides*, pode ter ocorrido devido à influência de disploidia, já que este evento citogenético mostra-se expressivo para evolução da família Asteraceae (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2003).

Em *Vernonia cinerea* o número cromossômico foi  $2n = 18$ , o que está de acordo com o número básico  $x = 9$ . Estudos citológicos (Part I. Cytological studies in Asteraceae, 2013) nesta espécie evidenciou um poliploide para a espécie com  $2n = 36$ . *V. condensata*  $2n = 40$  foi considerada, neste trabalho, tetraploide, com  $x = 10$ , concordando com o número básico sugerido para o gênero *Vernonia*. O número de bandas CMA<sup>+</sup> encontrado condiz com uma situação de poliploidia (dados não mostrados). Enquanto que em *V. scorpioides* com  $2n = 60$  há uma dúvida com relação ao seu número básico, podendo ser um tetraploide com  $x = 15$  ou hexaploide com  $x = 10$ . Sales-de-Melo *et al.* (2010) sugeriram que para este grupo o nível de ploidia máximo seria tetraploidia. Oliveira (2008) encontrou para outras espécies da subseção *Scorpioideae* Benth variação cromossômica com  $2n = 32$  para *Vernonia rubriramea* e  $2n = 60$  para *V. platensis*.

Dados da literatura correlacionam o aumento de bandas cromossômicas heterocromáticas ricas em AT ou GC com os diversos níveis de poliploidia, mas nem sempre essas correlações são possíveis para todas as espécies de plantas (Ovalle, 2007; Moraes & Guerra, 2010). Neste trabalho, os níveis de ploidia foram discutidos com base nos números básicos relatados na literatura para a tribo Vernonieae. Uma relação entre o número cromossômico, o comprimento total haploide da cromatina (CTHC) e as

possíveis ploidias em espécies da tribo Vernonieae, relata apenas que o CTHC não é um bom parâmetro para discussão sobre poliploidização em Vernonieae.

Entretanto, o valor do-CTHC revelou diferenças entre as espécies investigadas. Observou-se uma variação de 16,43  $\mu\text{m}$  em *Pithecoseris pacourinoides* a 66,46 $\mu\text{m}$  em *Blanchetia heterotrichia*. A variação entre as espécies também está relacionada ao tamanho cromossômico, é o caso de *Centratherum punctatum* e *Vernonia chalybaea*, que apesar de apresentar números cromossômicos iguais possuíam tamanhos cromossômicos divergentes 28,29  $\mu\text{m}$  para primeira e 38,48  $\mu\text{m}$  para a segunda espécie. O CTHC de *V. chalybaea* no presente estudo foi semelhante ao relatado por Dematteis & Fernandez (2000) com espécies das Bahia, com CTCH igual a 38,48 $\mu\text{m}$ . Por outro lado, o comprimento médio cromossômico (CMC) diferiu desses autores o qual foi registrado no presente trabalho 2,40 $\mu\text{m}$  e tamanho do menor e maior cromossomo de 1,69 e 3,25  $\mu\text{m}$ . Esta variabilidade pode ser decorrente de diferenças populacionais, mostrando especiação no cariótipo das espécies ocorrentes na Bahia, apresentando cromossomos menores.

Oliveira (2008) relatou para *Vernonia scorpioides* variação no tamanho cromossômico igual 0,73-1,6  $\mu\text{m}$ , enquanto que no presente trabalho foi evidenciado 1-2,19  $\mu\text{m}$ . Apesar dos cromossomos dos representantes da tribo Vernonieae Cass. normalmente serem pequenos a espécie *Blanchetia heterotrichia* apresentou cromossomos com tamanhos médios variando de 1,45 - 4,09  $\mu\text{m}$ . Na literatura há poucas informações a respeito da análise morfológica e da assimetria cariotípica para as espécies em estudo, demonstrando a relevância deste trabalho para estudos citotaxonômicos do grupo.

A abundância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos é comum para a tribo Vernonieae como pode ser constatado em trabalhos anteriores (Dematteis, 1996, 1998; Dematteis & Fernandez, 1998, 2000; Oliveira *et al.*, 2007). A predominância deste tipo de cromossomo caracteriza um cariótipo simétrico, logo o aumento da assimetria intracromossômica ocorre, principalmente, devido à mudança na posição do centrômero da região submediana ou mediana para terminal ou subterminal, intracromossômica (Stebbins, 1971). A simetria cariotípica também é caracterizada pela semelhança no tamanho dos cromossomos, pois a assimetria pode ocorrer através da acumulação de diferenças no tamanho relativo entre os cromossomos do complemento, intercromossômica.

Segundo Zue & Yuan (2011), os índices de assimetria de Stebbins (1971), categorias de 1-4; o TF% de Huziwarra (1962); o AsK% de Arano (1963); o  $A_1$  de Zarco (1986); e o  $CV_{CI}$  Paszko (2006) são propostos apenas para avaliar a assimetria intracromossômica enquanto que o  $A_2$  é usado para mensurar a assimetria intercromossômica. Para Zarco (1986) relacionar o  $A_1$  e  $A_2$  em um gráfico de dispersão bidimensional é a melhor maneira de representar a assimetria cariotípica entre espécies e táxons.

Ruas *et al.* (1991) consideraram a assimetria cariotípica no gênero *Vernonia* Schreb. moderada. Entretanto, com base nos índices de assimetria intra e intercromossômica, deste estudo, todas as espécies são simétricas (Tabela 1 e Figura 3), se consideradas individualmente. Estudos da assimetria cariotípica em grupos de plantas proporcionam um entendimento da evolução cariotípica (Felix *et al.*, 2007). Segundo Sharma (1990), baseando-se na comparação entre cariótipos ancestrais relativamente conhecidos, determinados através da taxonomia clássica, cariótipos simétricos são considerados mais primitivos do que os assimétricos; assim como cromossomos com braços mais longos em relação aos de braços mais curtos; já centrômeros medianos com os cromossomos com braços de comprimentos desiguais são mais recentes que os com braços cromossômicos de igual comprimento. Sendo assim, as espécies de *Vernoniae* estudadas apresentam características cariológicas primitivas. No entanto, para conclusões mais precisas é necessário estudos de bandas heterocromáticas utilizando técnicas de diferenciação longitudinal cromossômica.

Zarco (1986) utilizou índices de assimetria,  $A_1$  e  $A_2$ , para estudar realações cariotípicas entre 22 espécies da tribo Aveneae (Gramineae), e Huziwarra (1962) usou o TF% para os cariótipos de espécies do gênero *Aster* (Asteraceae). O índice de assimetria intra ( $A_1$ ) e intercromossômica ( $A_2$ ) mostram poucas diferenças entre as subtribos estudadas, talvez pelo fato das espécies estarem intimamente relacionadas. *Vernonia cinerea* e *Blanchetia heterotrichia* apresentaram os maiores valores de  $A_1$  e  $A_2$  (0,22 e 0,22, respectivamente), enquanto que *V. brasiliiana* menor  $A_1$  (0,11) e os menores valores para  $A_2$  foram descritos para *V. cinerea* (0,11) e *Elephantopus mollis* (0,11). Percebe-se que há uma contradição com relação a estes índices em *V. cinerea*, isto ocorre porque as duas variações são distintas, enquanto que o  $A_1$  está relacionado à posição do centrômero no cromossomo, e o  $A_2$  se baseia na diferença entre o menor e maior cromossomo do cariótipo.

Segundo o diagrama de dispersão apresentado aqui, *E. hirtiflorus* foi a espécie mais simétrica. Quanto ao TF% não foi evidenciado variação expressiva entre o grupo estudado, o maior valor foi para *Vernonia brasiliiana* (47,13) e o menor para *V. cinerea* (43,90), concordando com os dados de A<sub>1</sub>. Neste estudo as espécies *Centratherum punctatum* e *V. chalybaea* foram as que mais apresentaram similaridades do ponto de vista citológico com número cromossômico igual ( $2n = 32$ ) e pouca variação nos demais dados.

Pode-se perceber que a dispersão nos índices de Zarco (1986) das espécies nas subtribos é grande. As linhas tracejadas em verde agrupam espécies que apresentaram índice de assimetria próximos. Na subtribo Vernoniinae as espécies foram distribuídas em quatro grupos, três entre espécies desta tribo e uma relacionada com espécies de outras subtribos. *Blanchetia* é um gênero monotípico endêmico do Nordeste brasileiro (Barroso *et al.*, 1991). *B. heterotrichia* se agrupou próximo do gênero *Vernonia*, podendo ela futuramente ser transferida para este gênero, o que sugere estudos, tanto citogenéticos quanto morfológicos.

Os índices de assimetria TF%, A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, particularmente, exibiram uma variação pequena. De qualquer forma, existe pouca variação da assimetria no cariótipo das espécies estudadas. Dematteis (1996, 1998, 2002); Dematteis & Fernandez (1998, 2000) sugerem que a diversificação do gênero *Vernonia* foi acompanhada por pequenas alterações na constituição cariotípica das espécies por apresentar assimetria pouco variável.

As diferenças encontradas em alguns dos parâmetros cariotípicos investigados (número e condensação cromossômica) é um indicativo da diferenciação intraespecífica presente no gênero *Vernonia*. Fenômenos como a disploidização e aloploidização podem ter ocorridos no percurso evolutivo do grupo, podendo ser encontrados cromossomos com níveis de ploidias. Apesar de ser pouca diferença na assimetria cariotípica, isto implica uma evolução mais minuciosa da espécie com relação ao cariótipo, sendo necessários trabalhos envolvendo bandeamento cromossômico e Hibridização *in situ* (FISH).

Entretanto, outras características cariotípicas se mantiveram estáveis e homogêneas, como o tipo de núcleo e presença de cromossomos pequenos. Segundo Guerra (1985), dentro de um mesmo gênero, normalmente, a estrutura nuclear é mantida constante, havendo variações interespecíficas quando se trata de gêneros com número de espécies alto com grandes variações na morfologia e distribuição geográfica dispersa.

Os dados aqui apresentados podem ser vantajosos na caracterização e distinção de espécies cuja morfologia floral e vegetativa é muito semelhante (Oliveira *et al.*, 2012). Uma questão a ser estudada é se a dificuldade na diferenciação taxonômica através da morfologia esta relacionada com a grande simetria cariotípica no grupo. Acosta *et al.* (2005) relataram que a assimetria cariotípica dos gêneros *Solanum* e *Lycianthes* foi um método concordante com a classificação sistemática baseada em caracteres morfológicos.

## REFERÊNCIAS

- Acosta MC, Bernardello G, Guerra M & Moscone EA. 2005. Karyotype analysis in several South American species of *Solanum* and *Lycianthes rantonnei* (Solanaceae) *Táxon* 54: 713-723.
- Arano H. 1963. Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan. IX. The karyotype analysis and phylogenic consideration of *Pertya* and *Ainsliaea*. *Bot Mag Tokyo* 76:32–39.
- Barroso GM. 1986. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa, MG: UFV.
- Barroso GM. 1991. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa, MG: UFV, V. 3, 323p.
- Benko-Iseppon AM & Morawetz W. 2000. Cytological comparison of Calyceraceae and Dipsacaceae with special reference to their taxonomic relationships. *Cytologia* 65:123–128.
- Bernardello LM. 1986. Números cromosômicos en Asteraceae de Córdoba. *Darwiniana* 27:169–178.
- Bremer K. 1994. *Asteraceae: Cladistics and classification*. Timber Press, Portland.
- Carr GD; King RM; Powell AM & Robinson H. 1999. Chromosome numbers in Compositae. XVIII. *American Journal of Botany*. 86(7): 1003–1013.
- Chuang TI Chao YC; Hu WWL & Kwan SC. 1963. Chromosome numbers of the vascular plants of Taiwan. I. *Taiwaniana* 1:51–66.
- Dematteis M. 1996. *Estudios cromosomicos en especies argentinas de Vernonia (Asteraceae)*. *Bonplandia*, 9: 103-110.
- Dematteis M. 1998. Chromosome studies of some *Vernonia* species (Asteraceae). *Genet Mol Biol*. 21:381–385.
- Dematteis M. 2002. Cytotaxonomic analysis of South American species of *Vernonia* (Vernonieae: Asteraceae). *Bot J Linn Soc*. 139:401–408.

- Dematteis M & Fernandez A. 1998. *Karyotypes of seven South American species of Vernonia (Asteraceae)*. *Cytologia*, 63:323-328.
- Dematteis M & Fernandez A. 2000. Chromosome studies on nine American species of *Vernonia* (Vernonieae, Asteraceae). *Caryologia* 53:55–61.
- Felix WJP; Almeida A; Melo NF & Felix LP. 2007. Citogenética de duas espécies de *Zephyranthes* Herb. (Amaryllidaceae – Hipeastreae) cultivadas. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 294-296.
- Guerra M. 1985. Coloquio sobre citogenética e evolução de plantas, 1, 1984, Piracicaba. Anais. Ribeirao Preto: *Sociedade Brasileira de Genética*, 240p.
- Guerra M. 1988. *Introdução à Citogenética Geral*. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro-RJ. 142p.
- Hind DJN. 1993. Notes on the Compositae of Bahia, Brazil: I. *Kew Bulletin* 48:245-277.
- Huynh K. 1965. *Contribution a l'étude caryologique et embryologique des Phanerogames du Perou*. Collection: *Denkschriften der Schweizerischen Akademie der Naturwissenschaften*.
- Huziwara Y. 1962. Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosomes of Asteraceae. *American Journal of Botany* 49: 116–119.
- Jones SB. 1977. Vernonieae-Systematic Review. In V.H. Heywood, J.B. Harborne, and B.L. Turner, editors, *The Biology and Chemistry of the Compositae*, 1:503-52. London and New York: Academic Press.
- Jones SB. 1979. Chromosomes of Vernonieae (Compositae). *Bull Torrey Bot Club* 106:79–84.
- Keeley S Forsman ZH & Chan RA. 2007. phylogeny of the “evil tribe” Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: Support from separate and combined congruent datasets (trnL1, ndhF, ITS). *Mol Phylogen Evol.* 44:89–103.
- Keeley SC & Robinson H. 2009. Vernonieae. In: Funk, V. A.; Susana, A.; Stuessy, T. F.; eBayer, R. J. (eds.), *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. Vienna, Austria: *International Association for Plant Taxonomy (IAPT)*, pp. 439-469.
- Kirkman LK. 1981. Taxonomic revision of *Centratherum* and *Phyllocephalum* (Compositae: Vernonieae). *Rhodora* 83:1–24.

- Levan A; Fredga K & Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Institute of genetics, Lund, Sweden, and Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, N.Y., U.S.A.
- Mansanares ME; Forni-Martins ER & Semir J. 2002. Chromosome numbers in the genus *Lychnophora* Mart. (Lychnophorinae, Vernoniae, Asteraceae). *Caryologia* 55:367–374.
- Mansanares ME; Forni-Martins ER & Semir J. 2007. Cytotaxonomy of *Lychnophoriopsis* Sch. Bip. and *Paralychnophora* MacLeish species (Asteraceae: Vernoniae: Lychnophorinae). *Bot J Linn Soc.* 154:109–114.
- Moore DM. 1982. Flora Europaeae check-list and chromosome index. Cambridge, Cambridge University Press.
- Moraes AP & Guerra M. 2010. Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). *Plant Syst Evol.* 287:113–118. DOI 10.1007/s00606-010-0302-5.
- Morton JK. 1993. Chromosome numbers and polyploidy in the flora of Cameroon Mountain. *Opera Bot.* 121:159–172.
- Nakajima, J. N. 2000. *A família Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil*. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 467p.
- Oliveira, V. M. de; Forni-Martins, E. R. e Semir, J. 2007. Cytotaxonomy of species of *Vernonia*, section *Lepidaploa*, Group *Axilliflorae* (Asteraceae, Vernoniae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 154, 99–108.
- Oliveira, VM. 2008. *Caracterização cariotípica de espécies de Vernonia Schreb. (Asteraceae: Vernoniae) com técnicas de diferencial longitudinal de cromossomos (bandeamentos e hibridação de DNA in situ)*. Tese (Doutorado). Instituto de biologia. Campinas, SP.
- Oliveira VM; Semir J & Forni-Martins ER. 2012. Chromosome Numbers and Karyotypes of Species of *Vernonia* sect. *Lepidaploa* (Asteraceae: Vernoniae). *Folia Geobot.* 47:93–103.
- Ovalle FR. 2007. *Citotaxonomia molecular do gênero Callisia Loefl (Commelinaceae)*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco.
- Part I. Cytological studies in Asteraceae. (Julho, 2013) Disponível em: [http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/6506/7/07\\_part%201.pdf](http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/6506/7/07_part%201.pdf)

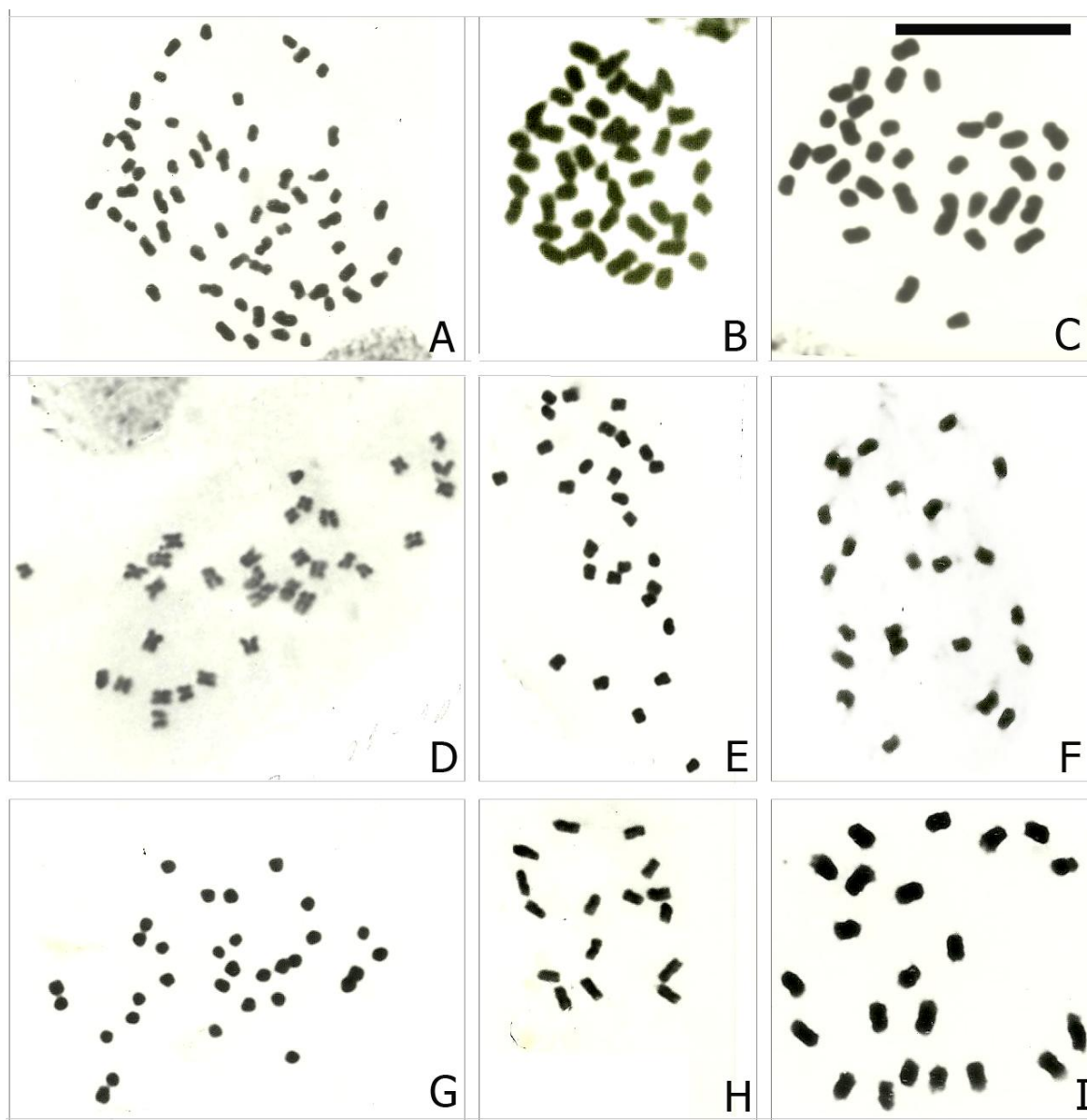


- Paszko B. 2006. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Pl Syst Evol.* 258:39–48.
- Ruas PM; Ruas CF; Vieira OS; Matzenbacher NI & Martins NS. 1991. Cytogenetics of genus *Vernonia* Schreber (Compositae). *Cytologia.* 56:239–247.
- Salles-de-Melo MRC; Lucena RM; Semir J; Carvalho R; Pereira RCA & Benko-Iseppon AM. 2010. Karyological features and cytotaxonomy of the tribe Vernonieae (Asteraceae). *Plant Syst Evol.* 285:189–199.
- Sharma A. 1990. Taxonomy as related to genetic diversity in plants. *J. Ind. Bot. Soc.* 69: 1-3.
- Stebbins GL. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants.* Edward Arnold (Publishers) Ltd, London.
- Sundberg S; Cowan CP & Turner BL. 1986. Chromosome counts of Latin American Compositae. *American Journal of Botany.* 73 (1): 33–38.
- Vega D. & Massimiliano AJ. 2012. Chromosome studies of some species of *Vernonanthura* and *Vernonia* (Asteraceae, Vernonieae). *Caryologia: International Journal of Cytology. Cytosystematics and Cytogenetics.* 65:271-275.
- Weiss-Schneeweiss H; Stuessy TF; Siljak-Yakovlev S; Baeza CM & Parker J. Karyotype evolution in South American of *Hypochoeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Pl. Syst. Evol.* 241: 171-184. 2003.
- Zarco C. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526–530. 1986.
- Zohary D. 1984. Modes of evolution in plants under domestication. In Grant WF. ed. *Plant Biosystematics*, Academic Press, Canada, p. 579-596.
- Zuo L. & Yuan Q. 2011. The difference between the heterogeneity of the centromeric index and intrachromosomal asymmetry. *Plant Syst Evol.* 297:141–145.

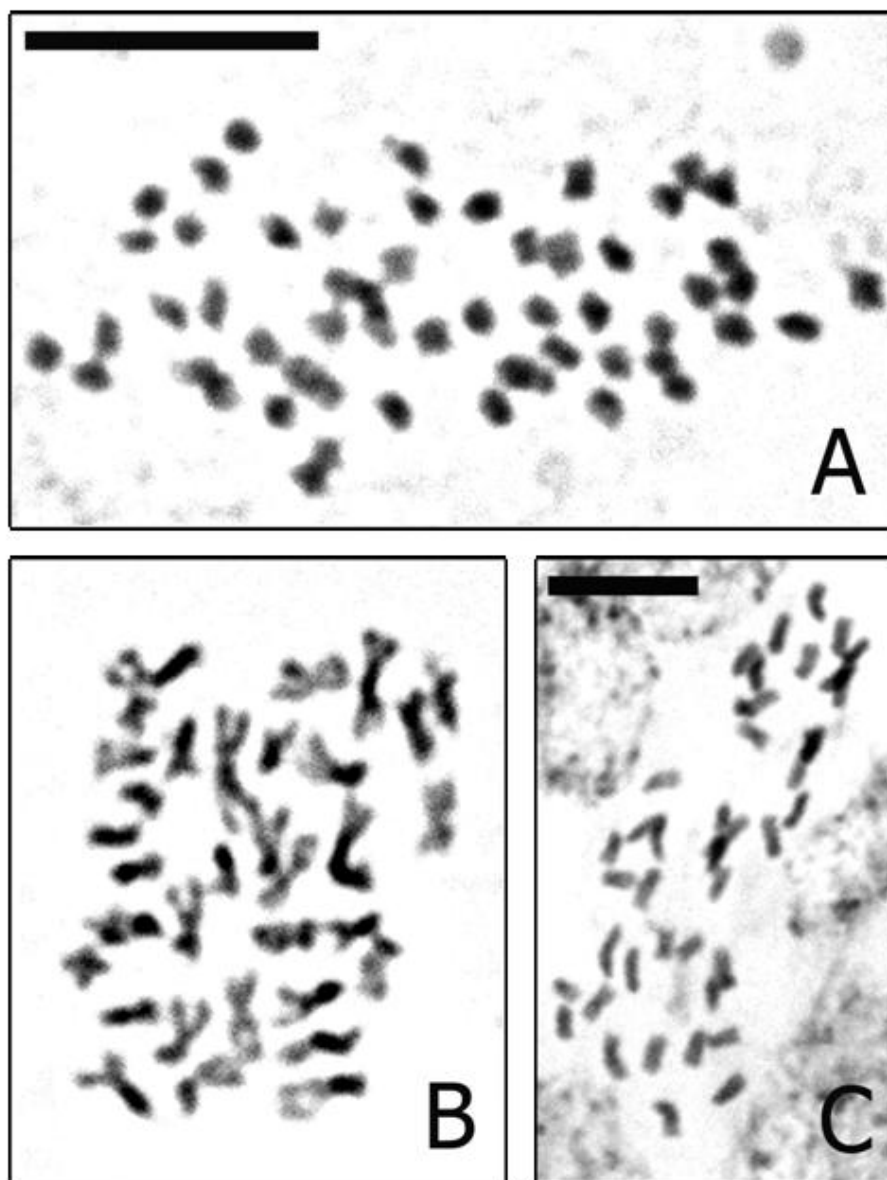


**Tabela 2.** Número cromossômico prévio das espécies estudadas.

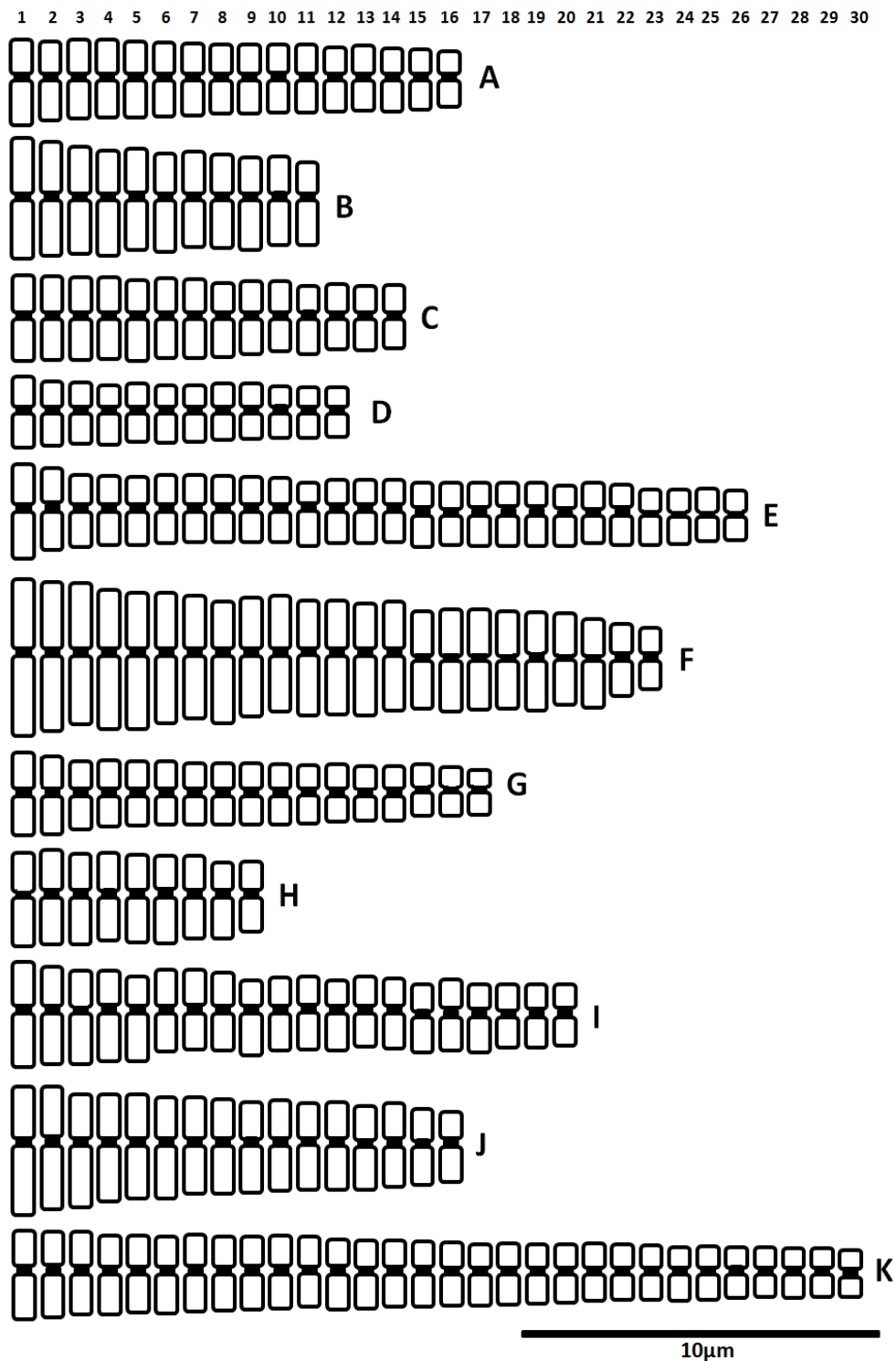
<b>Espécie</b>	<b>2n</b>	<b>Autores prévios</b>
<i>Centratherum punctatum</i> Cass	32	Kirkman (1981) e Carr <i>et al.</i> -(1999)
<i>Elephantopus mollis</i> Kunth	22	Chuang <i>et al.</i> (1963), Jones (1979), Morton (1993), Carr <i>et al.</i> (1999) e Sales-de-Melo <i>et al.</i> (2010)
<i>E. hirtiflorus</i> DC.	28	Sales-de-Melo <i>et al.</i> (2010)
<i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart. ex DC.	24	Sales-de-Melo <i>et al.</i> (2010)
<i>Blanchetia heterotrichia</i> DC.	46	Sales-de-Melo <i>et al.</i> (2010)
<i>Vernonia brasiliana</i> (L.) Druce	34	Sales-de-Melo <i>et al.</i> (2010)
<i>V. cinerea</i> (L.) Less	18	Dematteis (2002)
<i>V. chalybaea</i> Mart. Ex DC.	32	Dematteis (2002)
<i>V. condensata</i> Baker	30 32 34 40 56	Huynh (1965) Oliveira (2008) Moore (1982) Sales-de-Melo <i>et al.</i> (2010) Sundberg <i>et al.</i> (1986)
<i>V. scorpioides</i> (Lam.) Pers.	56 58	Oliveira (2008) Sales-de-Melo <i>et al.</i> (2010)
<i>Rolandra fruticosa</i> (L.) Kuntze	50	Sales-de-Melo <i>et al.</i> (2010)



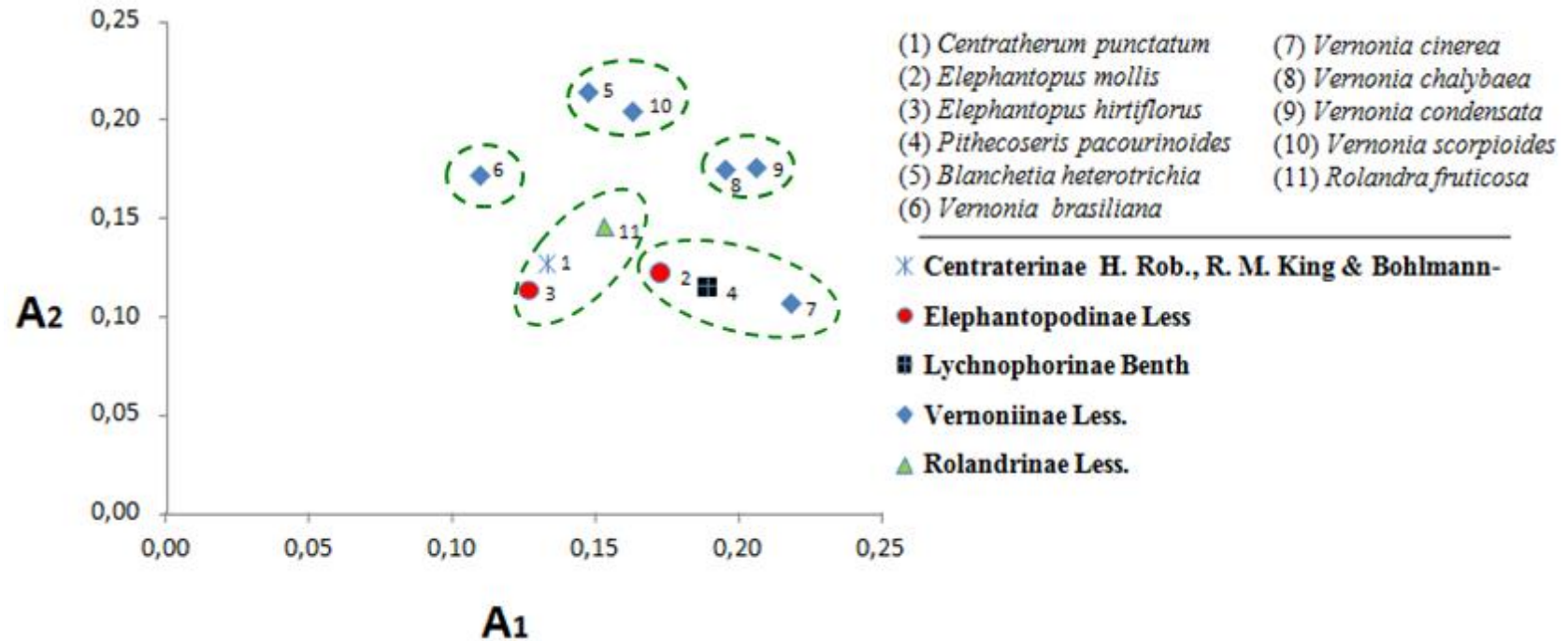
**Figura 1** - Cromossomos mitóticos de espécies da tribo Vernonieae: **A-** *Vernonia scorpioides*; **B-** *Blanchetia heterotrichia*; **C-** *V. brasiliiana*; **D-** *V. chalybaea*; **E-** *Elephantopus hirtiflorus*; **F-** *Pithecoseris pacourinoides*; **G-** *Centratherum punctatum*; **H-** *V. cinerea*; **I-** *E. mollis*. Barra corresponde a 10 $\mu$ m.



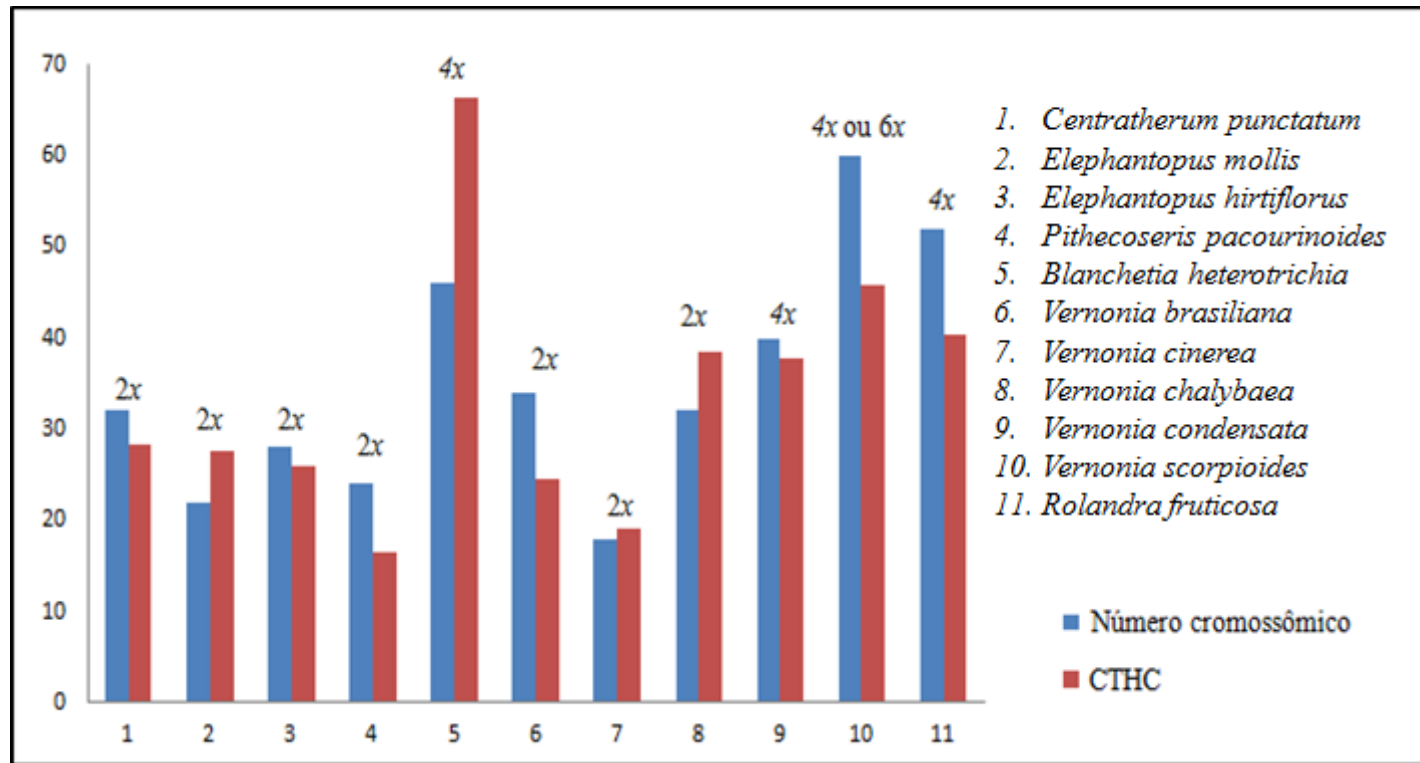
**Figura 2** –Cromossomos mitóticos de espécies da tribo Vernonieae: **A-** *Rolandra fruticosa*; **B-** *Vernonia brasiliana*; **C-** *V. condensata*. Barra corresponde a 10µm.



**Figura 3-** Idiogramas de espécies de Vernoniae. **A-** *Centratherum punctatum*; **B-** *Elephantopus mollis*; **C-** *E. hirtiflorus*; **D-** *Pithecoseris pacourinoides*; **E-** *Rolandra fruticosa*; **F-** *Blanchetia heterotrichia*; **G-** *Vernonia brasiliiana*; **H-** *V. cinerea*; **I-** *V. condensata*; **J-** *V. chalybaea*; **K-** *V. scorpioides*. Barra corresponde a 10 $\mu$ m.



**Figura 4-** Diagrama de dispersão das assimetrias cariotípicas de Zarco (1986) para as espécies de Vernoniae estudadas. Linhas tracejadas se referem aos grupos com assimetria cariotípica próximas.



**Figura 5**– Relação entre o número cromossômico, o CTHC e os possíveis níveis de ploidia em espécies da tribo Vernonieae.



## **CAPÍTULO 2**

**Localização da heterocromatina por meio da coloração CMA/DAPI e dos sítios de DNAr 45S em espécies da tribo Vernoniae Cass. (Asteraceae Bercht. & J. Presl)**

**Autores:** Maria Angélica Oliveira MARINHO, Maria Rita Cabral SALES-DE-MELO, Maria Betânia Melo de OLIVEIRA e Reginaldo de CARVALHO.

Capítulo 2- Localização da heterocromatina por meio da coloração CMA/DAPI e dos sítios de DNAr 45S em espécies da tribo Vernonieae Cass. (Asteraceae Bercht. & J. Presl)

---

---

Maria Angélica Oliveira MARINHO <sup>(1)</sup>, Maria Rita Cabral SALES-DE-MELO <sup>(2)</sup>, Maria Betânia Melo de OLIVEIRA <sup>(3)</sup> e Reginaldo de CARVALHO <sup>(2)</sup>

(1) Programa de Pós-graduação em Botânica – PPGB/UFRPE, Recife-PE, Brasil.

(2) Departamento de Biologia, área de Botânica –UFRPE, Recife-PE, Brasil.

(3) Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife-PE, Brasil.

E-mail: reginaldo.ufrpe@gmail.com (Reginaldo de CARVALHO)

Revista a ser enviada: *American Journal of Botany* y - Online ISSN: 1188-603X

RESUMO- Este trabalho teve por objetivo localizar a distribuição da heterocromatina pelo uso dos fluorocromos CMA e DAPI e do DNAr 45S em seis espécies da tribo Vernonieae (Asteraceae) distribuídas em três subtribos. com intuito de identificar polimorfismos cariotípicos e compreender eventos citogenéticos envolvidos no processo de evolução cromossômicas dessas espécies. As espécies apresentaram variação no padrão de bandas heterocromáticas principalmente em relação as bandas CMA+, cujo número variou de 4 a 16 bandas. Por outro lado, apenas uma espécie apresentou bandas DAPI positivas, *Vernonia scorpioides*, localizadas na posição terminal da maioria dos cromossômicos. As diferenças no tamanho e quantidades de bandas heterocromáticas reveladas podem estar relacionadas a pequenas alterações estruturais envolvidas nos processos de evolução cariotípica da tribo Vernonieae.

**Palavras-chave:** bandeamento - CMA/DAPI - Variação interespecífica

## INTRODUÇÃO

A tribo Vernoniae (Asteraceae) compreende cerca de 70 gêneros e 1.456 espécies distribuídas mundialmente (Jones, 1977). No Brasil são encontradas aproximadamente 31% das espécies (Baker, 1873, Nakajima et al., 2012). O grupo é reconhecido morfológicamente pela presença de estiletes estreitos com ramos longos, agudos, filiformes, pilosos dorsalmente, encontrando-se flores hermafroditas abaixo da bifurcação dos ramos, além de corolas tubulosas e ramos do estilete longos e agudos (Grokoviski, 2007), muitas de suas flores apresentam coloração roxa.

Apesar de muitas espécies serem consideradas invasoras (ex.: *Vernonia cinerea* e *Rolandra fructuosa*), a tribo apresenta espécies importantes do ponto de vista medicinal, como *Rolandra fruticosa*, usadas no tratamento de câncer das células do cólon (Li Pam et al, 2010); *Vernonia scorpioides*, usada como anti-inflamatório (Rauh, 2008); *V. cinerea*, usada como planta medicinal e como larvicida (Arivoli, 2011). Além disto, existem espécies usadas para ornamentação (Ex.: *V. brasiliiana*, também chamada no interior de Pernambuco como árvore de natal seca); e muitas delas fazem parte do nicho ecológico de espécies de tetrafídeos (Bremer, 1994).

Embora declarada monofilética e bem estabelecida, existem controvérsias sobre a taxonomia de Vernoniae no que tange os limites genéricos, existindo dúvidas quanto ao número de gêneros e de suas respectivas espécies (Bremer, 1994; Keeley et al., 2007). Esta problemática é justificada pela natureza altamente variante, diversidade de habitats e sobreposição de caracteres morfológicos no grupo (Keeley et al., 2007). Porém, a tribo exibe gêneros monotípicos, é o caso de *Blanchetia* DC. e *Rolandra* Rottb (Robinson et al., 1980), este último endêmico do Brasil (Dematteis, 2013).

Em vegetais os fluorocromos mais utilizados são o CMA (Cromomicina A3), que tem preferência por DNA rico em bases G-C, e o DAPI (4',6 - diamidino -2- fenilindol), para regiões ricas em A-T. Blocos de heterocromatina podem ser caracterizados usando estes dois fluorocromos (Guerra, 2000). Estudos do cariótipo usando características morfométricas, assimetria cariotípica, FISH (fluorescente *in situ* hibridização) e esta dupla coloração com fluorocromos (CMA/DAPI) revelaram importantes características cariotípicas para a tribo Vernoniae, complementando estudos na família Asteraceae. Cerbah et al. (1995) estudaram espécies de *Hypochoeris* L. (tribo Lactuceae), utilizando bandeamento cromossômico com fluorocromo CMA<sub>3</sub>, enquanto que Cerbah (1998) pode ter iniciado a técnica de FISH no grupo. Entretanto, poucos são os trabalhos para a família com bandeamento e FISH.

Diversas áreas importantes atuam para auxiliar problemas taxonômicos, como a citogenética, a química e a morfologia (Robinson, 1999) que juntas podem fornecer um

embasamento mais preciso com relação à taxonomia e evolução deste grupo. Apesar dos grandes avanços na filogenia molecular, dados cromossômicos podem fornecer informações úteis para a determinação das relações e posição taxonômica das espécies da família Asteraceae. Autores como Gatt *et al.* (1998, 1999), estudaram poliploidia na tribo Heliantheae por meio da localização de sequências repetidas de DNA. Do mesmo modo, Vanzela *et al.* (2002), pesquisaram sítios de DNAr 45S e bandas CMA<sub>3</sub> nesta tribo, inferiram que rearranjos contendo segmentos pequenos de heterocromatina e de DNAr contribuíram evolutivamente nas espécies da família.

Além de ser uma ferramenta útil na sistemática e evolução das plantas, a citogenética pode auxiliar os estudos clássicos de taxonomia morfológica. Portanto, este estudo objetiva identificar as diferenças cromossômicas entre espécies da tribo Vernonieae que ocorrem no estado de Pernambuco, por meio da localização das regiões heterocromáticas contribuindo para a caracterização citotaxonômica e para o entendimento dos eventos evolutivos destas espécies.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal foi proveniente dos municípios de Recife e Buíque do estado de Pernambuco, tendo sido estudadas seis espécies da tribo Vernonieae pertencente a três subtribos: Centraterinae H. Rob., R. M. King & Bohlmann, *Centratherum punctatum* Cass.; Vernoniinae Less., *Vernonia cinerea* (L.) Less., *V. condensata* Baker, *V. brasiliana* Pers. e *V. scorpioides* (Lam.) Pers.; e Rolandrinae Less., *Rolandra fruticosa* Rottb. Foram coletados e herborizados ramos florais e vegetativos, seguindo as técnicas usuais. Materiais de todas as espécies foram depositados no Herbário PEUFR, Departamento de Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco (Tabela 1).

Para análises citogenéticas, raízes foram coletadas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8HQ) na concentração de 0,002M, por 4 horas à temperatura ambiente. Logo após, o material foi colocado em solução Carnoy (álcool etílico e ácido acético glacial, 3:1), por 24 horas em temperatura ambiente, e armazenadas a -20 °C em freezer.

Foi realizada coloração diferencial com fluorocromos CMA e DAPI utilizando o protocolo de Schweizer e Ambros (1994). As raízes foram digeridas por até 2 horas em uma solução de celulase (2%) e pectinase (20%) a 37°C e esmagadas em ácido acético a 45%. As lâminas foram envelhecidas por três dias à temperatura ambiente e, posteriormente, coradas por 60 minutos com CMA a 0,5 mg/mL, e contracoradas com DAPI 2 µg/ml por 30 minutos e montadas em tampão McIlvaine-glicerol (1:1).

Para a confecção das lâminas utilizou-se o procedimento como descrito acima. As sondas D2, de *Lotus japonicus* (Pedrosa et al. 2002), e R2, de *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck et al. 1997), foram utilizadas para localizar os sítios de DNAr 5S e 45S, respectivamente, nos cromossomos das espécies. Para a marcação das sondas, o DNA foi isolado através da técnica de mini-prep utilizando o Kit da Invisorb seguindo as recomendações do fabricante. As sondas foram marcadas com Cy3-dUTP (Amersham), através de Nick Translation com o kit Nick Translation Mix (Roche). A FISH seguiu o protocolo de Pedrosa-Harand et al. (2006) com modificações. As lâminas selecionadas foram pré-tratadas com RNase e pepsina, fixadas em formaldeído e desidratadas em série alcoólica. A mistura de hibridização contendo 50% de formamida, 10% de sulfato de dextran, 2 x SSC, 1µl de sonda (~2-5ng/µl). O volume foi completado para 10µl com água de injeção. O processo de desnaturação desnaturada ocorreu previamente com a sonda por 5 min a 75°C e com as lâminas por 10 min cada a 75°C. Após a adição da solução da sonda sobre as lâminas, este conjunto foi desnaturado novamente na mesma condição de tempo e temperatura. Posteriormente o conjunto lâmina/lamínula foi colocado em câmara úmida a 37°C overnight. Após as lavagens pós-hibridização, os cromossomos foram contra corados com DAPI em meio Vectashield 2 µg/ml (Vector).

As imagens de fluorescência foram analisadas e capturadas em microscópio de epifluorescência Leica DM 2500 equipado com câmera digital DFC 345FX, o software CW 4000 foi utilizado para o processamento das imagens. As pranchas foram editadas no software Adobe photoshop CS3. Os idiogramas foram desenhados usando o programa Power Point da Microsoft, optou-se pelo arranjo dos cromossomos pela forma e não pelo tamanho, e pela localização das bandas e sítios.

## RESULTADOS

As seis espécies, distribuídas entre três subtribos, analisadas neste estudo revelaram diferenças no número de cromossomos e um padrão diversificado de bandas CMA que foram classificadas como CMA<sup>+</sup>, CMA<sup>-</sup> e CMA<sup>0</sup> e as bandas DAPI em DAPI<sup>+</sup>, DAPI<sup>-</sup> e DAPI<sup>0</sup> dependendo da intensidade de brilho dos sinais de fluorescência observados. O número de bandas CMA<sup>+</sup> variou de quatro a 16 nas espécies analisadas (Tabela I, Figuras I e II), enquanto que apenas a espécie *V. scorpioides* apresentou bandas DAPI<sup>+</sup>, na maioria dos cromossomos, e todas as bandas foram terminais. Em algumas espécies, as bandas CMA<sup>+</sup> foram observadas nas regiões proximais dos cromossomos, variando no número e na intensidade do sinal. Sinais intercalares foram observados em *Rolandra fruticosa*. Bandas DAPI<sup>-</sup> Também foram observadas (Figuras I e II)

*Centratherum punctatum* Cass (subtribo Centraterinae) apresentou  $2n = 32$ . Foram observadas quatro bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> terminais, duas grandes e duas pequenas na região terminal de dois pares cromossômicos (Figura Ia e II). Foram observados quatro sítios de DNAr 45S, dois maiores e dois menores na posição terminal de dois pares cromossômicos, possivelmente coincidindo com as mesmas regiões das bandas CMA<sup>+</sup>. *Rolandra fruticosa* Rottb (Rolandrinae Less.) apresentou número cromossômico  $2n = 52$ , quatro pequenas bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, todas terminais. Dois sítios terminais de DNAr 45S foram visualizados em um par cromossômico.

Quatro espécies da subtribo Vernoniinae Less foram estudadas revelando polimorfismos cariotípicos entre elas. *Vernonia cinerea* com número cromossômico  $2n = 18$ , mostrou quatro bandas terminais CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> duas maiores e duas menores nos terminais de dois pares cromossômicos (Figura II). Quatro sítios de DNAr 45S também foram observados com as mesmas características, provavelmente correspondentes às bandas CMA<sup>+</sup> (Figuras II), enquanto que *V. condensata* com  $2n = 40$ , revelou dezesseis bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> terminais e trinta e quatro bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> proximais. Seis sinais de DNAr 45S foram observados, sendo quatro maiores e dois menores na região terminal dos cromossomos (Figuras II). *V. brasiliiana* Pers. com,  $2n = 36$ , apresentou quatro bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, duas terminais e duas intersticiais em dois pares cromossomos (Figuras I). Com a FISH foram observados dois sítios terminais heteromórficos em um par cromossômico (Figuras I).

Por outro lado, *V. scorpioides* (Lam.) Pers. apresentou um padrão de bandas diferente do encontrado para as demais espécies. O número cromossômico observado foi  $2n = 60$ , e oito bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, duas bandas maiores e quatro menores, todas distais. É interessante destacar que, das 42 bandas DAPI<sup>+</sup>. Foram observados cromossomos com apenas uma banda DAPI<sup>+</sup> telomérica e outros com bandas DAPI<sup>+</sup> nos dois terminais (Figura II). Apenas dois sítios de DNAr 45S foram observados para essa espécie (Figura I). Os primeiros resultados de hibridização *in situ* para as espécies de *V. brasiliiana*, *V. scorpioides*, *Rolandra fruticosa*, *Centratherum punctatum* e *V. cinerea* foram obtidos no presente estudo.

## DISCUSSÃO

Colorações clássicas em cariótipos desfavoráveis como os apresentados pelas espécies da tribo Vernonia, simétricos e com cromossomos pequenos, torna possível a análise de um número reduzido de parâmetros citogenéticos como o número e a morfologia cromossômica, dificultando a identificação dos pares cromossômicos homólogos e a evolução cariotípica (Ruas *al.*, 1991; Dematteis, 1996, 1998; Dematteis e Fernández, 1998, 2000; Oliveira, 2008). Os números cromossômicos mais frequentes para a tribo Vernoniaceae são  $2n = 32$  e  $34$

(Oliveira, 2008), encontrados para *Centratherum punctatum* (Centraterinae) e *Vernonia brasiliiana* (Vernoniinae), respectivamente. Entretanto para a tribo variam entre  $2n = 18$  a  $2n = 160$  (Oliveira, 2008). A subtribo Centraterinae apresenta apenas dois gêneros e quatro espécies, duas delas pertencentes ao gênero *Centratherum* (Breme, 1994). Os dados de bandeamento apresentados neste trabalho são inéditos para quatro (*Centratherum punctatum*, *Rolandra fruticosa*, *Vernonia brasiliiana* e *Vernonia cinerea*) das seis espécies estudadas.

A observação de quatro a 16 bandas CMA<sup>+</sup> revelou a presença de regiões heterocromáticas mais ricas em pares de base C≡G. *V. condensata*, com  $2n = 40$ , mostrou-se a mais rica em heterocromatina CMA positiva, pois além de apresentar dezesseis bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> terminais, mostrou trinta e quatro bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> proximais, uma quantidade de bandas maior que a relatada para as demais espécies (Tabela I e Figura II e III). Este padrão não foi encontrado em nenhuma outra espécie do gênero e da tribo. Oliveira (2008) encontrou quatro sítios de DNAr 45S que corresponderam aos quatro satélites encontrados para a espécie, entretanto o número cromossômico relatado foi  $2n = 36$ , e apenas duas bandas CMA<sup>+</sup> diferindo do presente estudo. O número de bandas CMA<sup>+</sup> também diferiu do estudo de Salles-de-Melo *et al.* (2010) que encontraram apenas 10 bandas CMA<sup>+</sup>. Essas regiões cromossômicas coradas com cromomicina representam uma porção do DNA reconhecida como heterocromática região esta, passível de modificações em seu conteúdo ao longo do tempo. Segundo Edelman e Lin (1995), a heterocromatina provavelmente representa um importante fator na evolução e especiação dos grupos vegetais. Para Schwarzacher *et al.* (1980), as mudanças na quantidade de heterocromatina são um parâmetro expressivo no entendimento de questões genéticas e estudos de filogenia.

*Vernonia scorpioides*, com  $2n = 60$ , também apresentou um padrão diferente das demais espécies, tanto no número cromossômico quanto no número de bandas CMA/DAPI. Foram observadas oito bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, além de dois blocos grandes e seis muito pequenos, todos distais, e 42 bandas DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>-</sup> terminais. Para esta espécie foram localizadas apenas duas Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) por meio da coloração com CMA e da FISH. Oliveira (2008) relatou apenas seis bandas CMA<sup>+</sup> e nenhuma DAPI<sup>+</sup> e um número cromossômico diploide  $2n = 56$ . A grande presença de heterocromatina rica em pares de bases A=T não foi relatada na literatura para nenhuma outra espécie da tribo.

A discordância no número de bandas CMA entre os dados apresentados e os relatados na literatura para esta espécie pode decorrer de polimorfismos populacionais, presença de citótipos ou raças cromossômicas e até mesmo pela variação no número cromossômico. Outro fator pode ser devido ao tamanho das bandas menores de difícil visualização. No presente estudo, houve casos em que bandas CMA<sup>+</sup> menores só puderam ser visualizadas em células



pró-metafásicas profásicas (Figura II), totalizando oito, enquanto que na metáfase são visualizadas apenas duas. Isso também ocorreu em *Crotalaria*, na qual uma das bandas CMA<sup>+</sup> pode não ter sido visualizada devido ao seu tamanho reduzido (Mondin *et al.*, 2004).

Guerra *et al.* (2000) e Redi *et al.* (2001) relataram que quantificação da heterocromatina no cariótipo pode indicar a relação evolutiva entre espécies. Pouca heterocromatina evidencia uma condição primitiva, enquanto que muita heterocromatina indica uma derivação. Com base nisto, *V. scorpioides* e *V. condensata* são as espécies mais apomórfica por apresentar mais heterocromatina. Neste caso, *V. scorpioides* estaria relacionada com número basal  $x = 17$ , das espécies neotropicais, o que enriquece a ideia de que esta espécie seja um tetraploide e não um hexaploide que sofreu displóidia ou aneuploidia. No entanto, *V. condensata* é uma espécie do velho mundo, cujo número básico cromossômico estaria entre  $x = 9$  e  $x = 10$  (Santosh, e Raghbir, 2013), o que contradiz esta teoria, a não ser pela evolução sofrida pelas espécies neotropicais. Este número básico e a quantidade de bandas CMA<sup>+</sup> remetem que *V. condensata* seja um tetraploide. Contudo, são necessários mais estudos utilizando outros marcadores cromossômicos, em Asteraceae e em outras famílias para que essa hipótese possa ser confirmada. As diferenças no tamanho e quantidades de bandas heterocromáticas observadas podem estar relacionadas a pequenas alterações estruturais evolutivas nos cariótipos das espécies da tribo Vernonieae.

No presente estudo houve coincidência na localização dos sítios de DNAr 45S e bandas CMA dos cariótipos de todas as espécies. Em *Vernonia scorpioides*, *V. brasiliiana*, *V. condensata* e *Rolandra fruticosa* ocorreram mais bandas CMA<sup>+</sup> que sítios DNAr 45S. Os números variaram de dois em *Vernonia scorpioides*, *V. brasiliiana* e *Rolandra fruticosa*; quatro em *Centratherum punctatum* e *V. cinerea*; e seis em *V. condensata*. Em um trabalho anterior foram registrados quatro sítios de DNAr 45S para *V. condensata* e dois sítios para outras sete espécies de *Vernonia* (Oliveira, 2008). Em seu trabalho com espécies da tribo Carduceae (Asteraceae), Garnatje *et al.* (2004) observaram que as bandas CMA<sup>+</sup> e os sítios de DNAr 45S, na maioria das vezes, possuem a mesma localização, sugerindo que sequências ribossômicas repetidas poderiam estar interespaçadas ou compor a heterocromatina. Por outro lado, Berger e Greilhuber 1993 relataram que normalmente em plantas há coincidência na localização das regiões organizadoras de nucléolo e das bandas CMA<sup>+</sup>, sendo esta última afirmação a mais aceita por diversos autores.

Segundo Guerra (2004), o DNAr 45S é uma sequência moderadamente repetitiva, que forma blocos com muitas repetições, em um ou mais pares cromossômicos e correspondem às constrições secundárias. Nas espécies de Vernonieae estudadas, apenas um ou dois cromossomos são observados com constrições secundárias por meio de técnicas como

coloração com Giemsa 2% e cromomicina, enquanto a técnica de FISH com sonda de DNAr 45S revelou um número maior de sinais em *Centratherum punctatum*; *Vernonia cinerea* e *V. condensata*. Isto ocorre devido a especificidade da sonda em localizar e se hibridizar por homologia a qualquer sequência no cromossomo independente de sua funcionalidade ou não, o que classifica a FISH como uma técnica eficiente para a identificação do número total de sítios de DNA alvo no cromossomo (Guerra, 2004).

## REFERÊNCIAS

- ARIVOLI, S.; TENNYSON, S. E MARTIN, J. J. 2011. Larvicidal efficacy of *Vernonia cinerea* (L.) (Asteraceae) leaf extracts against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) *Journal of Biopesticides*, 4 (1): 37 – 42.
- BAKER, J.G. Compositae I. Vernonieae. 1873. In: Martius, c.f. e Eichler, a.g. (eds.). 6(2):1-180. Flora brasiliensis. Lipsiae, Monachii.
- BERGER, R.; GREILHUBER, J. C-bands and chiasma distribution in *Scilla amoena*, *S. ingridae*, and *S. mischtschenkoana* (Hyacinthaceae). 1993.- *Pl. Syst. Evol.* 184: 125-137.
- BREMER, K. 1994. Asteraceae: Cladistics and classification. Timber Press, Portland.
- CERBAH, M., COULAUD, J. E SILJAK-YAKOVLEV, S. 1995. Genome size, fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. *Genome*. 38:689-695.
- CERBAH, M., COULAUD, J. E SILJAK-YAKOVLEV, S. 1998. rDNA organization and evolutionary relationships in the *Hypochoeris* (Asteraceae). *J. Hered.* 89: 312-318.
- DEMATTEIS, M. 1996. Estudos cromosômicos em espécies Argentinas de *Vernonia* (Asteraceae). *Bonplandia* 9(1-2):103-110.
- DEMATTEIS, M. 1998. Chromosome studies of some *Vernonia* species. (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 381-385.
- DEMATTEIS, M.; LOEUILLE, B. 2013. *Rolandra* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16288>)
- DEMATTEIS, M. E FERNÁNDEZ, A. 1998. karyotypes of seven South American species of *Vernonia* (Asteraceae). *Cytologia* 63: 323-328.
- DEMATTEIS, M. E FERNÁNDEZ, A. 2000. Chromosomes studies on nine South American species of *Vernonia* (Vernonieae, Asteraceae). *Caryologia* 53(1):61.
- EDELMAN, J.R. E LIN, Y. J. 1995. Repetitive DNA/heterochromatin: can it be the “driving force” of evolution and speciation? *Cytobios* 83:117-127.

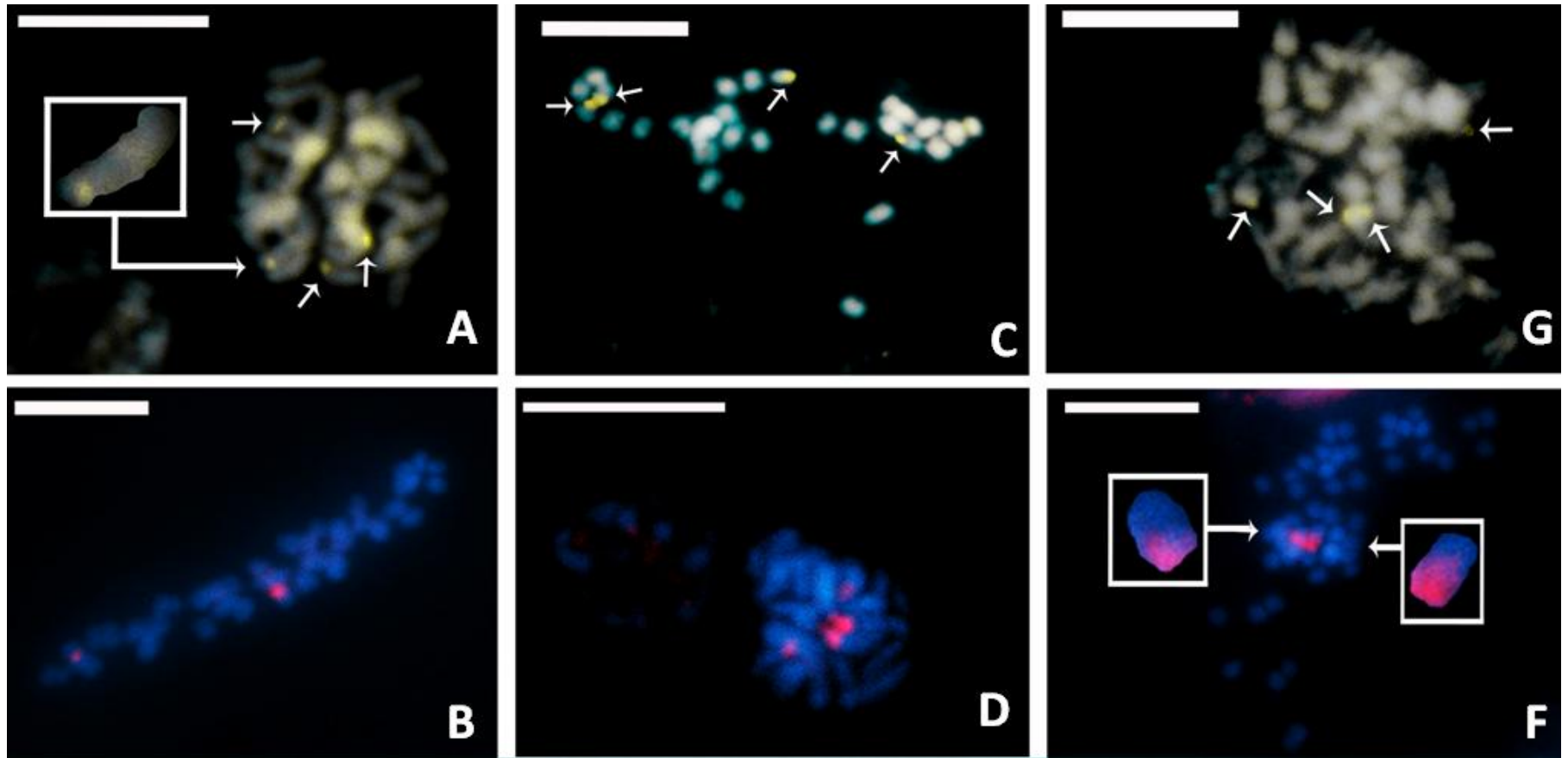
- GARNATJE, T.; VALLÉS, J.; VILATERSANA, R.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; SILJACYAKOVLEV, S. Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). 2004. *Plant Biology* 6:140–146.
- GATT, M.; DING, H.; HAMMETT, K. E MURRAY, B. 1998. Polyploidy and evolution in wild and cultivated *Dahlia* species. *Ann. Bot.*, 81: 647-656.
- GATT, M.; HAMMETT, K. E MURRAY, B. 1999. Confirmation of ancient polyploidy in *Dahlia* (Asteraceae) species using genomic *in situ* hybridization. *Ann. Bot.*, 84: 39-48.
- GUERRA, M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet Mol Biol* 23:1029-1041.
- GUERRA, M. E SOUZA, M. J. 2002. Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto. 131p. ISBN 85-87528-38-6.
- GUERRA, M. 2004. FISH – conceitos e aplicações na citogenética / Organizado por Marcelo Guerra – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 184p. il. ISBN – 85-89265-06-4
- GROKOVISKI, L. 2007. Estudo taxonômico do gênero *PIPTOCARPHA* R. BR. (Asteraceae: Vernonieae) no estado do Paraná, Brasil. dissertação universidade federal do paraná. Curitiba.
- JONES, S. B. 1977. Vernonieae-Systematic Review. In V.H. Heywood, J.B. Harborne, and B.L. Turner, editors, *The Biology and Chemistry of the Compositae*, pages 503-52 1. London and New York: Academic Press.
- KEELEY, S; FORSMAN, Z. H. E CHAN, R. A. 2007. Phylogeny of the “evil tribe” Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: Support from separate and combined congruent datasets (trnL1, ndhF, ITS). *Mol Phylogen Evol* 44:89–103.
- LI PAN, D. D. L.; RISWAN, S.; L. B.S. KARDONO, ; CHAI, H.; BLANCO, E. J. C.; FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D.; SWANSON, S. M.; KINGHORN, A. D. 2010. Bioactivity-guided isolation of cytotoxic sesquiterpenes of *Rolandra fruticosa*. *Phytochemistry*.
- MONDIN M.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. 2007. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. *Genet. Mol. Biol.* 30(1): 65-72.
- OLIVEIRA, V. M. 2008. Caracterização cariotípica de espécies de *Vernonia* Schreb. (Asteraceae: Vernonieae) com técnicas de diferencial longitudinal de cromossomos

- (bandeamentos e hibridação de DNA *in situ*). Tese (Doutorado). Instituto de biologia. Campinas, SP.
- PEDROSA, A.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; SCHWEIZER, D. E BACHMAIR, A. 2002. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661-1672.
- PEDROSA-HARAND, A.; DE ALMEIDA, C.C.S.; MOSIOLEK, M.; BLAIR, M.W.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. 2006. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics*. 112(5):924-933.
- ROBINSON, H.; BOHLMANN, F. E KING, R. M. 1980. Chemosystematic notes on the Asteraceae III. Natural subdivisions of the Vernonieae. *Phytologia*. 46:421-436.
- RAUH, L. K. 2008. Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lam) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- REDI, C. A.; GARAGNA, S.; ZACHARIAS, H.; ZUCCOTTI, M. E CAPANNA, E. 2001. The other chromatin. *Chromosoma* 110: 136-147.
- ROBINSON, H. 1999. Generic and Subtribal Classification of American Vernonieae. *Smithsonian contributions to botany num.* 89:1-116.
- RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; VIEIRA, O.S.; MATZENBACHER, N.I. & MARTINS, N.S. 1991. Cytogenetics of genus *Vernonia* Schreber (Compositae). *Cytologia*, 56: 239-247.
- SALLES-DE-MELO, M. R.; LUCENA, R. M.; SEMIR, J. O.; CARVALHO, R.; PEREIRA, C. A. E BENKO-ISEPPON, A. M. 2010. Karyological features and cytotaxonomy of the tribe Vernonieae (Asteraceae). *Springer*. 285(3-4):189-199.
- SANTOSH, B. E RAGHBIR, C. G. 2013. Male meiosis and chromosome number in Asteraceae family from district Kangra of H.P. (Western Himalayas). *International Journal of Botany and Research* 3(1):43-58.
- SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P. E SCHWEIZER, D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematic and Evolution*. 134(3-4):293-297.
- SCHWEIZER, D. E AMBROS, P.F. 1994. Chromosome banding: stain combinations for specific regions. In: GOSDEN, J. R. (Ed.). *Methods in molecular biology: Chromosome analysis protocols*. 29:97-112. Humana Press. 508p. ISBN 978-0-89603-289-7
- VANZELA, A. L. L.; RUAS, C. F., OLIVEIRA, M.F. E RUAS, P.M. 2002. Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S probe. *Genetica*, 114: 105-111.
- WANZENBÖCK, EM; SCHÖFER, C; SCHWEIZER, D E BACHMAIR, A. 1997. Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and

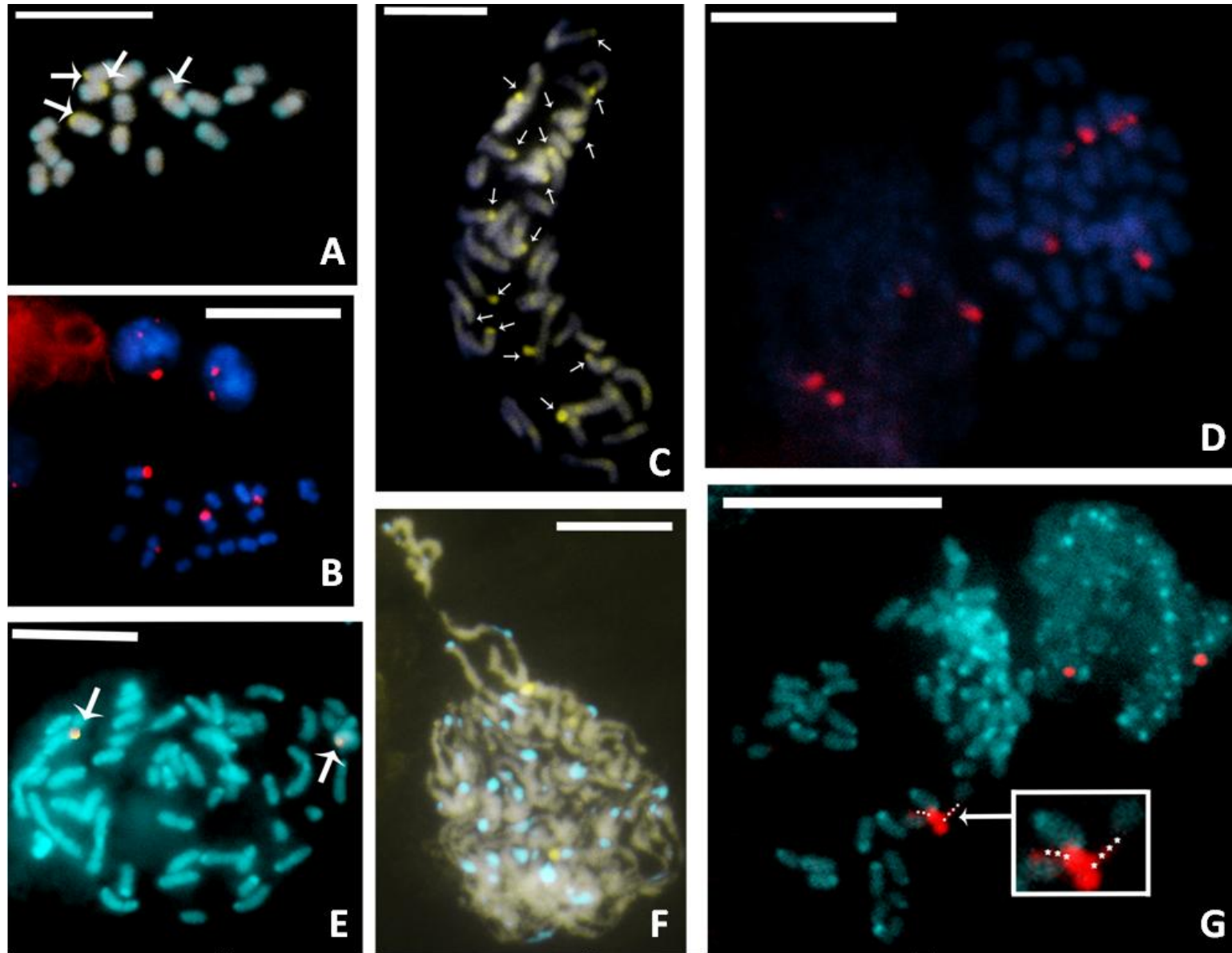
do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 11:1007-1016.

**APÊNDICE II: Tabela e Figuras****Tabela I-** Números básicos propostos ( $x$ ); Números cromossômicos diploides ( $2n$ ); Número de bandas CMA/DAPI; Número de sítios DNAr 45S e Nível de ploidia sugerido de espécies de Vernoniaceae.

SUBTRIBOS	ESPÉCIE	$x$	$2n$	Nº de bandas CMA/DAPI	Nº de sítios DNAr 45S	Nível de ploidia
<b>Centraterinae H. Rob., R. M. King &amp; Bohlmann</b>	<i>Centratherum punctatum</i> Cass	16	32	4 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	4	2x
<b>Rolandrinae Less.</b>	<i>Rolandra fruticosa</i> Rottb	10	52	4 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	2	4x
<b>Vernoniinae Less.</b>	<i>Vernonia cinerea</i> (L.) Less	9	18	4 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	4	2x
	<i>V. condensata</i> Baker	10	40	16 CMA <sup>++</sup> /DAPI <sup>-</sup> (distal) 34 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup> (proximal)	6	4x
	<i>V. brasiliiana</i> (L.) Druce	18	36	4 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	2	2x
	<i>V. scorpioides</i> (Lam.) Pers.	15	60	8 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup> 42 DAPI <sup>+</sup> /CMA <sup>-</sup>	2	4x

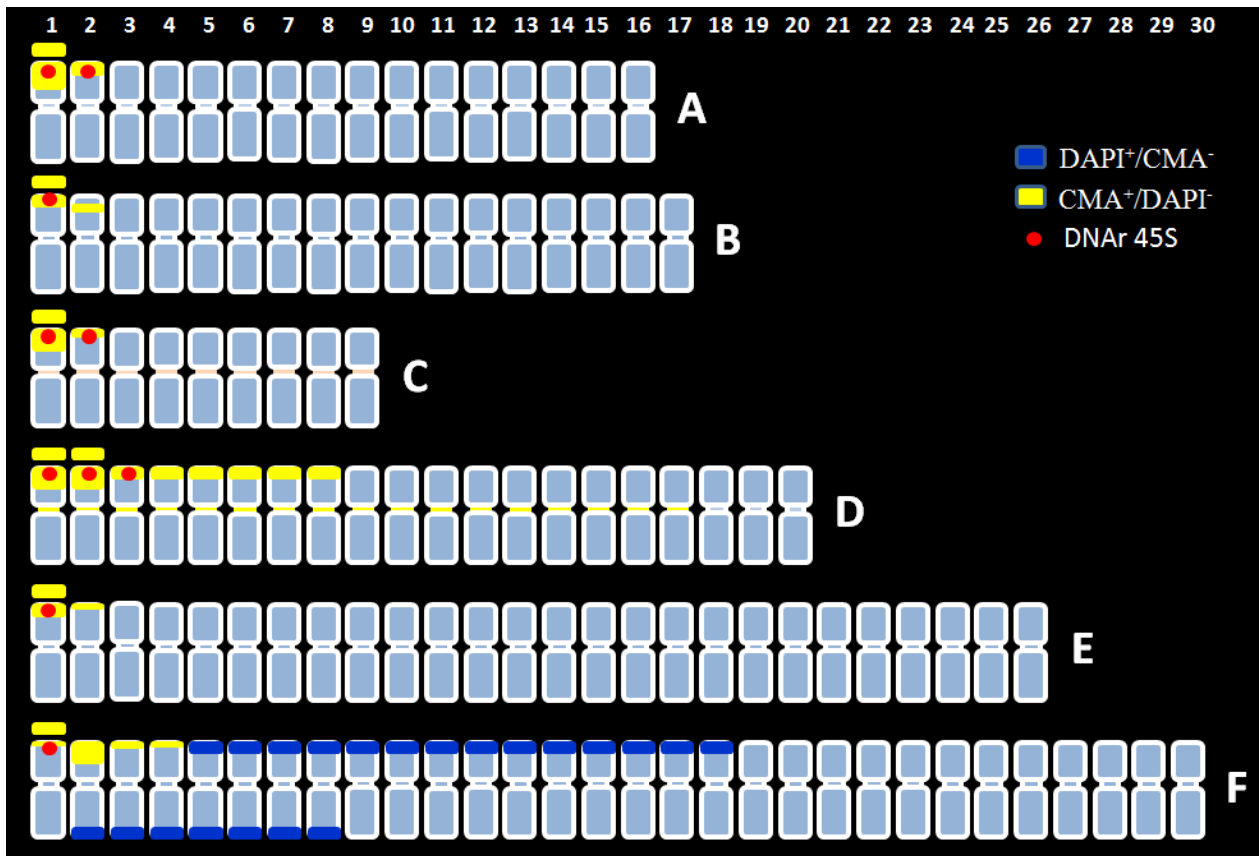


**Figura I** - Coloração diferencial CMA/DAPI (A, C e E) e FISH com DNAr 45S (B, D e F) de cromossomos mitóticos de espécies da tribo Vernoniae: **A-B-** *Vernonia brasiliana*.; **C-D-** *Centratherum punctatum*; **E-F-** *Rolandra fruticosa*. Barra corresponde a 10 $\mu$ m.



**Figura II** - Coloração diferencial CMA/DAPI (A, C, E e F) e FISH com DNRr 45S (B, D e G) de cromossomos mitóticos de espécies da tribo Vernonieae: **A-B** – *Vernonia cinerea*; **C-D**- *V. condensata* .; **E-G**– *V. scorpioides* . Barra corresponde a 10μm.





**Figura III** - Idiogramas de coloração diferencial CMA/DAPI e FISH DNAr 45S de espécies de Vernoniaeae: **A-** *Centratherum punctatum*; **B-** *Vernonia brasiliana*; **C-** *V. cinerea*; **D-** *V. condensata*; **E-** *Rolandra fruticosa*; **F-** *V. scorpioides*.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## Considerações Finais

---

---

1. Este trabalho contribuiu para um melhor conhecimento cariotípico de espécies da tribo Vernonieae, com contagens cromossômicas mais precisas e elaboração de cariótipos mais detalhados através do uso dos fluorocromos CMA e DAPI e FISH.
2. Os números cromossômicos encontrados para as espécies analisadas variaram de  $2n = 18$  a  $2n = 60$ . Mostrando variação interespecífica para o número cromossômico das espécies investigadas.
3. Dentre as espécies estudadas sugere-se que quatro sejam poliploides (*Blanchetia heterotrichi* DC.a, *V. condensata* Baker, *V. scorpioides* (Lam.) Pers. e *Rolandra fruticosa* (L.) Kuntze) e as demais diploides.
4. A maioria das espécies apresentou condensação dos cromossomos do tipo proximal, entretanto em *Vernonia scorpioides* e *V. brasiliana* observou-se condensação uniforme do braço curto e da região proximal.
5. As espécies estudadas exibem um baixo grau de assimetria cariotípica, isto ocorre devido à pequena variação de tamanho cromossômico e a presença de cromossomos metacêntricos. Considerando os índices de assimetria A1 e A2 em conjunto, a espécie *Elephantopus hirtiflorus* é a que possui o cariótipo mais simétrico. Tendo por base o índice TF%, a simetria cariotípica é crescente de *V. brasiliana* (TF%=47,12) é a espécie mais simétrica, enquanto que *V. cinerea* é a mais assimétrica (TF%=43,9).
6. As seis espécies analisadas com a técnica de bandeamento cromossômico com fluorocromos CMA e DAPI, apresentaram diferenças no número de cromossomos e um padrão diversificado de bandas CMA e DAPI. Em algumas espécies, as bandas CMA<sup>+</sup> foram observadas nas regiões proximais dos cromossomos, variando no número e na intensidade do sinal fluorescente.
7. Foram analisadas seis espécies com a técnica de FISH mostrando variação na quantidade de sítios de DNAr 45S (2 a 6), localizados sempre na posição terminal. Em espécies como *Vernonia cinerea* e *V. condensata* os sítios corresponderam à localização de bandeamento com CMA.
8. As diferenças no tamanho e quantidades de bandas heterocromáticas e sítios de DNAr 45S reveladas podem estar relacionadas a pequenas alterações estruturais envolvidas nos processos de evolução dos cariótipos da tribo Vernonieae.

9. Novos marcadores devem ser usados para ampliar a caracterização cariotípica da tribo Vernonieae e contribuir para um melhor entendimento da tribo.
10. As diferenças encontradas em alguns dos parâmetros cariotípicos investigados são um indicativo da diferenciação intraespecífica presente na tribo Vernonieae. Eventos citogenéticos Fenômenos como poliploidia e a disploia podem ter ocorridos no percurso evolutivo do grupo.

# ANEXOS

## **1. NORMAS DA REVISTA: THE *BOTANICAL JOURNAL OF THE LINNEAN SOCIETY* (QUALIS A2)**

### **Instructions for Authors**

The Linnean Society publishes four periodicals: the *Biological*, and *Zoological Journals*, and *The Linnean*, the Society's newsletter and proceedings.

The *Botanical Journal of the Linnean Society* publishes original papers on systematic and evolutionary botany and comparative studies of both living and fossil plants. Review papers are also welcomed which integrate fields such as cytology, morphogenesis, palynology and phytochemistry into a taxonomic framework. will only publish new taxa in exceptional circumstances as part of larger monographic or phylogenetic revisions.

Submissions to the Botanical Journal are now made on-line using ScholarOne Manuscripts. To submit to the Journal go to <http://mc.manuscriptcentral.com/botjls>. If this is the first time you have used the system you will be asked to register by clicking on 'create an account'. Full instructions on making your submission are provided. You should receive an acknowledgement within a few minutes. Thereafter, the system will keep you informed of the process of your submission through refereeing, any revisions that are required, and a final decision.

Manuscripts submitted by other methods will not be considered.

### **Conflict of Interest**

The *Botanical Journal of the Linnean Society* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in a cover letter to the Editor, in the manuscript (under the Acknowledgement section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships. Corresponding authors will be asked to confirm whether or not a conflict of interest exists as part of the submission process.

## Ethical Guidelines

The Journal expects authors to abide by the guidelines of those statutory bodies, or, discipline that are specific to the country of origin, or, execution of the research.

## Copyright Transfer Agreement Form

Authors will be required to sign a Copyright Transfer Agreement Form (CTA) for all papers accepted for publication. Signature of the Copyright Transfer Agreement Form is a condition of publication and papers will not be put into production until a signed form has been received. (Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will retain the right to publish their paper in various media/circumstances (please see the form for further details). A copy of the form may be downloaded [here](#).

## OnlineOpen

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Wiley Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via Wiley Online Library. Each Online Open article will be subject to a one-off fee of US\$3000 to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge.

For the full list of terms and conditions, see [http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms).

Authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: [https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp) (Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY.)

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the Journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

## Author material archive policy

All original hardcopy artwork will be returned to authors after publication. **Please note that, unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all electronic material and**

**remaining hardcopy two months after publication.** If you require the return of any of this material, you must inform the editorial office upon submission.

### **Offprints**

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs.

### **Manuscript preparation**

Authors should aim to communicate ideas and information clearly and concisely, in language suitable for the moderate specialist. Papers in languages other than English are not accepted unless invited. When a paper has joint authorship, one author must accept responsibility for all correspondence; the full postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author who is to check proofs should be provided. Although the Society does not specify the length of manuscripts, it is suggested that authors preparing long texts (20 000 words or more, including references, etc.) should consult the Editor before considering submission. **Please submit your manuscript in an editable format such as .doc or .rtf. If you submit your manuscript in a non-editable format such as PDF, this will slow the progress of your paper as we will have to contact you to request an editable copy.**

Papers should conform to the following general layout:

#### *Title page*

This should include title, authors, institutions and a short running title. The title should be concise but informative, and where appropriate should include mention of family or higher taxon in the form: 'Taxonomy of the oak, *Quercus* (Fagaceae)'. A subtitle may be included, but papers in numbered series are not accepted. Names of new taxa should not be given in titles.

#### *Abstract*

This must be on a separate page. The abstract is of great importance as it may be reproduced elsewhere, and is all that many may see of your work. It should be about 100-200 words long and should summarize the paper in a form that is intelligible in conjunction with the title. It should not include references. The abstract should be followed by up to ten keywords additional to those in the title (alphabetically arranged and separated by hyphens) identifying the subject matter for retrieval systems. Taxonomic authorities should not be included in the Abstract.

#### *Subject matter*

The paper should be divided into sections under short headings. Except in systematic hierarchies, the hierarchy of headings should not exceed three. Do not combine Results and Discussion –



these should be two different sections. Herbarium vouchers provide a permanent record of the plant material studied. Vouchers should be deposited in a recognized herbarium, and numbers/information should be included in the table or list of material used. In the case of population-level studies, one voucher per population will normally be considered adequate. Authors submitting papers to the *Botanical Journal* should consult [www.ipni.org](http://www.ipni.org) or *Authors of Plant Names* edited by R.K. Brummitt and C.E. Powell (Royal Botanic Gardens, Kew, 1992; ISBN 947-643-44-3). Names of genera and species should be printed in italic; suprageneric taxon names should be in roman. Cite the author of genera and lower taxa (subgenus, section, species, etc.) on first mention in the main text. Manuscripts without author names will be returned.

Authors of plant names should follow the abbreviations of Brummitt & Powell, 1992, paying particular attention to the spacing (most do not have spaces following the full stops). These standard abbreviations can be found online at [www.ipni.org](http://www.ipni.org)

Use SI units and the appropriate symbols (mm, not millimetre;  $\mu\text{m}$ , not micron; s, not sec; Myr for million years). Use the negative index ( $\text{m}^{-1}$ ,  $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{h}^{-1}$ ) except in cases such as 'per plant'). Avoid elaborate tables of original or derived data, long lists of species etc.; if such data are absolutely essential, consider including them as appendices or as online-only supporting information. Avoid footnotes and keep cross references by page to an absolute minimum.

Families used follow APG III (2009). See *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121. Note particularly the use of Asteraceae (not Compositae) and Fabaceae (not Leguminosae). Names of suprageneric taxa (subtribe, tribe, subfamily, family, order etc.) are plural nouns and take plural verb forms e.g. "Allioideae are", "Betulaceae comprise" etc.

Use of 'chloroplast' should be avoided when referring to plastid genome studies based on total genomic DNA extractions as other plastid types are involved. Use of 'phylogeny' should be avoided when reporting the results of an analysis (there is only one true phylogeny). Use 'phylogenetic analysis', 'phylogenetic tree' or similar. If abbreviations are used, 'species' should be abbreviated as 'sp.' (singular) or 'spp.' (plural) and 'subspecies' should be abbreviated as 'subsp.' (singular) or 'subspp.' (plural). Higher taxonomic ranks (genus, subgenus, section etc.) should not be abbreviated. *Sensu stricto* and *sensu lato* should be abbreviated as *s.s.* and *s.l.* (in italics), respectively.

### References

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

In the text, give references in the following forms: 'Stork (1988) said', 'Stork (1988: 331)' where it is desired to refer to a specific page, and '(Rapport, 1983)' where giving reference simply as authority for a statement. Note that names of joint authors are connected by '&' in the text. When papers are by three authors, use all names on the first mention and thereafter abbreviate to the first name *et al.* For papers by four or more authors, use *et al.* throughout.

The list of references must include all publications cited in the text and only these. Prior to submission, make certain that all references in the text agree with those in the references section, and that spelling is consistent throughout. In the list of references, titles of periodicals must be given in full, not abbreviated. For books, give the title, place of publication, name of publisher (if after 1930), and indication of edition if not the first. In papers with half-tones, plate or figure citations are required only if they fall outside the pagination of the reference cited. References should conform as exactly as possible to one of these four styles, according to the type of publication cited.

Burr FA, Evert RF. 1982. A cytochemical study of the wound-healing proteins in *Bryopsis hypnoides*. *Cytobios* 6: 199-215.

Gould SJ. 1989. *Wonderful life: the Burgess Shale and the nature of history*. New York: W.W. Norton.

Dow MM, Cheverud JM, Rhoads J, Friedlaender J. 1987b. Statistical comparison of biological and cultural/history variation. In: Friedlaender J, Howells WW, Rhoads J, eds. *Solomon Islands project: health, human biology, and cultural change*. New York: Oxford University Press, 265-281.

Gay HJ. 1990. The ant association and structural rhizome modifications of the far eastern fern genus *Lecanopteris* (Polypodiaceae). Unpublished D. Phil. Thesis, Oxford University.

Other citations such as papers 'in press' may appear on the list but not papers 'submitted', 'in review' or 'in preparation'. These may be cited in the text as 'unpubl. data'. A personal communication may be cited in the text but not in the reference list. Please give the initials and surnames for all authors of personal communications and unpublished data.

In the case of taxonomic reviews, authors are requested to include full references for taxonomic authorities.

Give foreign language references in ordinary English alphabetic form (but copy accents in French, German, Spanish, etc.), if necessary transliterating in accordance with a recognized scheme. For the Cyrillic alphabet use British Standard BS 2979 (1958). If only a published

translation has been consulted, cite the translation, not the original. Add translations not supplied by the author of the reference in square brackets.

### *Tables*

Keep these as simple as possible, with few horizontal and, preferably, no vertical rules. When assembling complex tables and data matrices, bear the dimensions of the printed page (225 x 168 mm) in mind; reducing typesize to accommodate a multiplicity of columns will affect legibility.

### *Illustrations*

These normally include (1) half-tones reproduced from photographs, (2) black and white figures reproduced from drawings and (3) diagrams. Use one consecutive set of Arabic numbers for all illustrations (do not separate 'Plates' and 'Text-figures' - treat all as 'Figures'). Figures should be numbered in the order in which they are cited in the text. Use upper case letters for subdivisions (e.g. Figure 1A-D) of figures; all other lettering should be lower case.

### *Half-tones reproduced from photographs*

Increasingly, authors' original images are captured digitally rather than by conventional film photography. In these cases, please use settings on your equipment for the highest possible image quality (minimum 300dpi).

Desktop technology now allows authors to prepare plates by scanning photographic originals and then labelling them using graphics programs such as Adobe Illustrator. These are acceptable provided:

Resolution is a minimum of 300 dpi at the final required image size. The labelling and any line drawings in a composite figure should be added in vector format. If any labelling or line drawings are embedded in the file then the resolution must be a minimum of 800 dpi. Please note that vector format labelling will give the best results for the online version of your paper.

Electronic files are saved uncompressed as TIFF or EPS files.

In the case that it is not possible to provide electronic versions, please supply photographic prints with labelling applied to a transparent overlay or to a photocopy.

*Grouping and mounting:* when grouping photographs, aim to make the dimensions of the group (including guttering of 2 mm between each picture) as close as possible to the page dimensions of 168 × 225 mm, thereby optimizing use of the available space. Remember that grouping photographs of varied contrast can result in poor reproduction. If supplied as photographic prints, the group should be mounted on thin card. Take care to keep the surface of the prints clean and free of adhesive. Always provide overlays to protect the photographs from damage.

*Lettering and numbering:* If supplied as photographic prints, letters and numbers should be applied in the form of dry-transfer ('Letraset') letters, numbers, arrows and scale bars, but not measurements (values), to transparent overlays in the required positions, rather than to the photographs themselves; this helps to avoid making pressure marks on the delicate surface of the prints, and facilitates relabelling, should this be required. Alternatively, pencilled instructions can be indicated on duplicates or photocopies marked 'FOR LABELLING ONLY'. Self-adhesive labels should be avoided, but if they are used, they should not be attached directly to either photographs or overlays, but to photocopies, to indicate where they are to be positioned. Labelling will be inserted electronically by the typesetter in due course.

*Colour:* Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt for paid full colour (see the Colour Work Agreement Form [here](#))\*, covering the full cost of reproduction, such that colour is used both in the hardcopy and online. In this case, legends may make reference to colour if necessary, such as for a key. If your paper is accepted and you have opted for paid full colour, we will need a completed Colour Work Agreement Form. **Colour illustrations will be published free of charge provided that the colour is deemed essential by the Editor for interpretation of the figure.**

\*Please note that we are no longer able to accept electronic or scanned copies of Colour Work Agreement Forms. Please print out the form and return a signed hard copy to the production editor at the following address: Production Editor - *Botanical Journal of the Linnean Society*, Journals Content Management, Life Sciences, Wiley Blackwell, John Wiley & Sons, 9600 Garsington Road, Oxford, OX4 2DQ, UK

#### *Black and white figures reproduced from drawings*

These should be scanned at a minimum resolution of 800 dpi and supplied in TIFF format. Please note that JPEG, Powerpoint and doc files are not suitable for publication. If it is not possible to provide electronic versions, the figures supplied should be in black ink on white card or paper. Lines must be clean and heavy enough to stand reduction; drawings should be no more than twice page size. The maximum dimensions of published figures are 168 × 225 mm. Scale bars are the most satisfactory way of indicating magnification. Take account of proposed reduction when lettering drawings; if you cannot provide competent lettering, it may be pencilled in on a photocopy.

© [date] The Linnean Society of London, *Botanical Journal of the Linnean Society*

#### *Diagrams*

In most instances the author's electronic versions of diagrams are used and may be re-labelled to conform to journal style. These should be supplied as vector format Encapsulated PostScript (EPS) files. Please note that diagrams or graphs will not reproduce well in the online version of your paper unless they are in vector format due to low maximum screen resolution.

Type legends for Figures in numerical order on a separate sheet. Where a 'key' is required for abbreviations used in more than one Figure, this should be included as a section of the main text.

Authors whose manuscripts contain large phylogenies, and who feel that these cannot be represented well in the standard page format, may opt to pay for fold-out pages as part of their article (see the Fold-Out Agreement Form [here](#)). Please note that fold-out pages will be included only with the Editor's agreement.

**Authors wishing to use illustrations already published must obtain written permission from the copyright holder before submitting the manuscript.** Authors may, in the first instance, submit good xerox or photographic copies of figures rather than the originals.

Detailed instructions on preparing illustrations in electronic form are available [here](#).

Authors may be charged for alterations at proof stage (other than printer's errors) if they are numerous.

#### *Supporting information*

Authors wishing to submit material to be hosted as online supporting information should consult the author guidelines [here](#). Authors should note that the Editor may suggest that figures, tables, and lists not deemed necessary for the understanding of the paper should be published online as supplementary material.

*Please follow these guidelines carefully:*

- Include all parts of the text of the paper in a single .doc or .rtf file. The ideal sequence is: (1) Header (running heads; correspondence; title; authors; addresses; abstract; additional keywords, etc.). (2) Body of article. (3) Acknowledgements. (4) References. (5) Figure Legends. (6) Tables (for each table, the legend should be placed before the body of the table). (7) Appendices.

Include all figure legends, and tables with their legends if available.

#### **Do not embed figures in the text file**

Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph.

Turn the hyphenation option off.

Specify any special characters used to represent non-keyboard characters.

Take care not to use l (ell) for 1 (one), O (capital o) for 0 (zero) or ß (German esszett) for ß (beta).

### **Copyright**

Authors receiving requests for permission to reproduce work published by the Linnean Society should contact Blackwell Publishing for advice.

### **Pre-submission English-language editing**

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

---

## 2. NORMAS DA REVISTA *AMERICAN JOURNAL OF BOTANY* (QUALIS A1)

Instructions for Authors

For *Applications in the Plant Sciences Instructions for Authors*, see [http://www.botany.org/apps/APPS\\_Author\\_Instructions.html](http://www.botany.org/apps/APPS_Author_Instructions.html).

### SCOPE AND AIMS OF THE JOURNAL

The *American Journal of Botany* (*AJB*) publishes peer-reviewed, innovative, significant research of interest to a wide audience of plant scientists in all areas of plant biology, all levels of organization, and all plant groups and allied organisms. *AJB* requires authors to frame their research questions and discuss their results in terms of major questions of plant biology. In general, papers that are too narrowly focused, purely descriptive, natural history, broad surveys, or that contain only preliminary data will not be considered.

### Review Procedure and Policy

Manuscripts are reviewed by scholars with expertise in the research area. Reviewers, Associate Editors, and the Editor-in-Chief evaluate manuscripts for innovations in, significant contributions to, and noteworthy advances in the theoretical or conceptual bases of the subdisciplines of plant biology, and/or novel insights of general relevance to fundamental questions of biology (see [http://www.botany.org/ajb/AJB\\_Reviewer\\_Instructions.pdf](http://www.botany.org/ajb/AJB_Reviewer_Instructions.pdf) for review criteria).

Manuscripts may be returned without review if the English needs significant improvement. Typically, authors have two opportunities to produce an acceptable manuscript: the original submission and one revision in which to address the criticisms and concerns of the reviewers and editors.

Correspondence and notifications regarding manuscripts will be through e-mail, directed through the editorial office ([ajb@botany.org](mailto:ajb@botany.org)). All reviewer comments and author revisions are handled electronically using Editorial Manager (<http://ajb.edmgr.com>). Copyediting queries and page proofs (e-galleys) are also provided electronically.

Final acceptance of a manuscript is contingent upon compliance with Journal requirements. Manuscripts other than Special Invited Papers are generally published in the order of receipt, within subject areas, of the final, accepted version or of the corrected proof. With the Journal's online *AJB* Advance Access feature, articles that have undergone complete peer review and copyediting, as well as full review by the authors, will be posted as soon as possible.

The Journal editors expect authors to follow the ethics guidelines of the Botanical Society of America (BSA) ([www.botany.org/governance/ethics.php](http://www.botany.org/governance/ethics.php)).

- **Copyrighted Material and Plagiarism**—If copyrighted material is reproduced in the manuscript, full attribution must be provided in the text; proof of permission must be sent to the Editorial Office. It is the responsibility of the authors, not the BSA or the editors or reviewers, to ensure that proper attribution is given to data and/or text previously published elsewhere. If suspicion is raised about the originality of the material (unattributed to source), the Editorial Office may check the manuscript for plagiarism. In cases where plagiarism is verified, the manuscript will be returned without further review without the possibility of re-submission. Self-plagiarism (i.e., the use of identical sentences from previously published papers by the same author) is also not acceptable.
- **Conflict of Interest**—Authors are responsible for recognizing and disclosing any duality of interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other personal connections. All funding sources, including the research funder and grant number, must be given in the acknowledgements section.

**Data Origin**—When using unpublished data owned or created by a researcher who is not the author or a co-author, a formal statement from the owner of the data must be sent to the Editorial Office acknowledging the use of the data and granting formal permission.

**Data Access**—*AJB* requires that supporting data be deposited in an appropriate repository to facilitate reader access prior to submission of the manuscript. Genetic information, such as DNA, RNA, or protein sequences, should be submitted to an appropriate data bank, such as GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) or EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>). Alignments used to produce phylogenies must be submitted to TreeBase (<http://www.treebase.org/>), Dryad (<http://datadryad.org/>), or to *AJB* to be published with the paper as supplementary material. The data matrices must be in an editable format (i.e., text files) for reanalysis by any interested readers following publication. Authors are encouraged to archive all sequences generated from next-generation sequencing techniques in a suitable public repository, such as the Sequence Read Archive of NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), the Sequence Read Archive of ENA ([http://www.ebi.ac.uk/ena/about/sra\\_submissions](http://www.ebi.ac.uk/ena/about/sra_submissions)), or Dryad. Ecological data or software information may also be deposited into Dryad or a similar publicly available site. Media files may also be housed on Figshare (<http://figshare.com/>). If necessary, raw data files (e.g., DNA sequences, gel images, chromatograms, data matrices), and/or electropherograms may be requested by the editors during the review process.

**Nomenclature**—*AJB* requires that nomenclature for all extant and extinct species conform to the current International Code of Nomenclature of Algae, Fungi and Plants. Taxonomic authorities are given at first mention in the text (not in the manuscript title). Authors should refer to the International Plant Names Index (<http://www.ipni.org/index.html>) or Tropicos (<http://www.tropicos.org/>) for accepted authority names. Conventions adopted by the scientific community must be used for genetic symbols and nomenclature.



Use conventions adopted by the scientific community for genetic symbols and nomenclature.

**Vouchers**—At the time of submission, supporting genetic and voucher specimen information must be provided, preferably for each population sampled, as appropriate (see Appendices below). Plant vouchers are defined here as mounted herbarium specimens that are permanently housed in an accessible herbarium or museum and that are identified by unique accession numbers; vouchers may be requested for review by future investigators to verify the identity of the material used in the study (especially if taxonomic rearrangements occur in the future). In discussions of morphological character states, access to the data must be provided.

Manuscripts that report data from individual populations must include the GPS coordinates for each of the populations sampled. A waiver of this requirement may be granted for rare, threatened, or endangered species, as explained in the cover letter. Accuracy must be provided to the nearest second, or the fifth decimal place if using decimal degrees. If vouchers or GPS coordinates are unavailable, an explanation must be provided in the cover letter, as well as within the article itself. Exceptions to the voucher requirement will be assessed by the editors.

## General Instructions and Requirements

Before submitting manuscripts, please review all instructions and refer to recent issues of *AJB*.

To take advantage of the free-page-charge policy, at least one author must be a member of the BSA when the manuscript is submitted for review as well as during the year of publication (except for Special Invited Papers). Authors who are not members of the BSA may also submit manuscripts for consideration: a mandatory page charge of \$150 per printed (or equivalent PDF) page is assessed. Page charges must be paid prior to a manuscript going into production, based on the estimated number of printed (or PDF) pages.

*AJB* requires that at least one colleague whose first language is English critically read and edit the manuscript before submission. Manuscripts may be returned without review if the English needs significant improvement.

## Open Access Policy

*AJB* authors have the option to make their accepted paper freely available online immediately upon publication. The fee for Open Access is \$1500 (discounted to \$500 if the author's institution subscribes to the Journal). Contact the Editorial Office at [ajb@botany.org](mailto:ajb@botany.org) for more information.

## Submission

Submit your manuscript via the online submission and review system, Editorial Manager, at <http://ajb.edmgr.com>. First-time users need to register for an account at this URL using their active e-mail addresses. The same Username and Password created on Editorial Manager are

**process**

used to log in as an author or as a reviewer. [If there are any difficulties in the login or submission process, contact the Editorial Office at [ajb@botany.org](mailto:ajb@botany.org) for assistance.]

There is a mandatory charge for more than five changes made on proofs resulting from mistakes made by the author(s). Author(s) who require a figure replacement in the e-galleys stage, unless the error was caused by the *AJB* editorial staff or the compositor, will be charged \$25 for each figure replacement or correction.

Authors are encouraged to submit figures in color when doing so enhances the presentation of the scientific information. Due to the cost of printing color, however, the editor may recommend using black and white if the information is just as clear when presented this way.

## Article Types

In addition to Research Papers, *AJB* publishes the following:

**Special Invited Papers**—These are mostly reviews of limited scope on timely subjects written for a general, albeit well-informed, audience. Special Invited Papers are typically solicited by the Editor-in-Chief, the Special Papers Editor, or an Associate Editor. Discuss ideas for unsolicited Special Papers with the Editor-in-Chief or the Special Papers Editor. Manuscripts are subject to the usual review process. Benefits for Special Invited Papers include rapid publication, no page charges, and free membership in the BSA for one year. In the introduction, succinctly explain why your paper is of interest to the general biological community.

**Brief Communications**—These are short papers (2–5 printed pages) reporting significant new findings that do not warrant standard full-length treatment with the usual main headings, or that provide scholarly commentaries, corrections, criticisms, or alternative interpretations of results presented in published papers. “Opinion” papers that are unsupported by new data or reanalysis of published data are unacceptable. Brief Communications are subject to normal review. Publication will be expedited. Membership requirements and page charges are not waived.

**Invited Commentary**—All invited commentaries are paired with a forthcoming paper, usually on the suggestion of an Associate Editor or the Editor-in-Chief. These 3- to 5-page articles discuss the contributions and significance of the research paper relative to accepted or emerging paradigms in the subject. Membership requirements and page charges are waived.

## Manuscript Preparation

A cover letter, an author agreement form, a manuscript file, and separate files for figures should be uploaded at <http://ajb.edmgr.com>. The manuscript file includes in the following order: Title Page, Footnote Page, Abstract Page, Text, Literature Cited, Tables, Appendices, and Figure Legends.

For manuscript files, MS Word (.doc) format is preferred, but Rich Text Format (.rtf) files are acceptable for review as well.

The Editorial Manager online submission system automatically inserts line numbers to facilitate review comments, so line numbers are not required in the manuscript file.

Double-space and left justify the margin of the entire manuscript, including Literature Cited, Appendices, Figure Legends, and Tables, using continuous pagination.

Leave at least a 2.5-cm margin on all sides. Place a header with last name(s) of author(s) and page number in upper right corner.

Number figures and tables in the order discussed in the text.

### **Cover/Response Letter**

Include a cover letter that describes the questions addressed or hypotheses tested, the major contribution of your paper to your discipline, and how this contribution is of interest to a broad audience. List any papers on related topics by any of the authors that have been published within the past year or that are in review or in press. For a revision, include a letter detailing your response to all the review comments.

### **Author Agreement Form**

Upon initial submission of a manuscript, the corresponding author must fill out an author agreement form and either upload an electronic version at the online submission site or mail or fax a hard copy to the Editorial Office in St. Louis, Missouri (**American Journal of Botany**, P.O. Box 299, St. Louis, MO 63166-0299, USA; 1-314-577-9515). The author agreement form is available online at [http://www.botany.org/ajb/AJB\\_Author\\_Agreement\\_Form\\_2.docx](http://www.botany.org/ajb/AJB_Author_Agreement_Form_2.docx); on the Editorial Manager website at the “Attach Files” screen; and from the Editorial Office.

### **Manuscript Content**

#### **1. Title Page**

Place a running head 2.5 cm (1 in) below the top of the page with the surname of the FIRST author (followed, as appropriate, with the surname of a sole co-author, or with et al. if there are three or more authors) and a short title. The manuscript title for research papers should be specific and informative, conveying the key findings of the research in an active voice. Center boldfaced title written with sentence-style capitalization, followed by superscript 1 (for footnote 1, to appear on footnote page). In most cases, Latin binomials in a title should be followed by the name of the family in parentheses.

Below the title, list authors: each author's first name, middle initial, surname. On the next line, give affiliation and unabbreviated address. If authors have different affiliations and addresses, add a superscript number after each author's name to indicate the footnoted address. Include another footnote superscript number to indicate the author for correspondence.

## 2. Footnote Page

Include the following footnote:

<sup>1</sup>Manuscript received \_\_\_\_\_; revision accepted \_\_\_\_\_.

Place brief acknowledgments, if desired, as a separate paragraph, using the following style: "The author(s) thank(s)...". For brevity, do not use first names. Include grant acknowledgments here.

Other footnotes (e.g., e-mail for correspondence) are permitted: match footnote numbers with those on the title page.

## 3. Abstract Page

*AJB* requires structured abstracts for manuscript submission. The abstract is 250 words or less, written in the following structured format:

- *Premise of the study* (why the work was done, what major questions of plant biology are addressed, and why it is important to the broad *AJB* readership)
- *Methods*
- *Key results*
- *Conclusions* (what major points should the reader take from this article)

Note that the abstract will be used in an RSS feed and thus should capture the interest of the general botanical community as well as the specialists and include the most important contribution of this paper. Avoid references; if essential, cite parenthetically with journal name, volume number, pages, and year.

Provide a list of 3–10 "**Key words**" that will be used for the volume index. Capitalize proper nouns, place in alphabetical order, and separate by semicolons.

## 4. Text

In the first paragraph of the introduction, include the theoretical or conceptual basis for your work in a context accessible to the diverse botanical readership that *AJB* attracts. Include a summary of conclusions and a take-home message for the generally informed reader in the DISCUSSION.

Center main headings and capitalize all letters: MATERIALS AND METHODS, RESULTS, and DISCUSSION.

Indent subheadings at the start of a paragraph; capitalize only the first word and proper nouns and adjectives.

***Second-level headings***—(boldface italic followed by an em dash)

*Third-level headings*—(italic followed by an em dash) Fourth-level headings—(regular text followed by an em dash)

In MATERIALS AND METHODS add name, city, spelled-out state (if in USA), and country of manufacturers/suppliers after brand names.

If statistical analyses are used, include statistical values in the RESULTS either in the text or within tables. Include the statistic value, degrees of freedom, and *p*-value for each result reported (e.g., for a *t*-test report “*t* = 32.41, *df* = 1, *P* = 0.03“ for an ANOVA report “*F*<sub>5, 23</sub> = 26.45, *P* less than 0.001” [note two *df*-values as subscripts with *F*]). Use *P* for significance, and *p* for probability.

Common Latin words (e.g., *in vivo*, *sensu lato*) are not italicized.

Footnotes are not used in the text.

## 5. Literature Cited

Verify all entries against original sources. Double check that all references in the manuscript text are in the Literature Cited and vice-versa and that they agree in spelling and year.

**Literature citations in text**—Cite references in chronological order (oldest first); within a given year, order them alphabetically (e.g., Jones and Gil, 1999, 2006; Ashton et al., 2007; Brown, 2007; Jackson, 2005, 2008).

Single author: Jones (2008) or (Jones, 2008). Two authors: Jones and Gil (2008) or (Jones and Gil, 2008). More than two authors: Jones et al. (2008) or (Jones et al., 2008).

Manuscripts accepted for publication but not yet published: Jones (in press) or (Jones, in press). Include “In press” citations in LITERATURE CITED (shown later).

Unpublished data and manuscripts (e.g., submitted, in prep.) and personal communication: (F. Jones, Institution, unpublished data [or unpublished manuscript or personal observation]). These are not included in LITERATURE CITED.

**References listed in LITERATURE CITED**—List citations in alphabetical order by author. Single-author titles precede multi-authored titles by the same senior author, regardless of date.

List works by the same author(s) chronologically, beginning with earliest date of publication. Spell out all author(s) names. Use “a”, “b” (determined alphabetically) for works with the same author(s) and year citation.

For multi-authored works, list the first seven authors and then “et al.”— unless there are only eight authors and then list all eight.

Type author names in citations in upper and lower case or in large and small caps, *not* in all caps. For formatting examples (note spacing, capitalization, italics, etc.), go to [http://www.botany.org/ajb/ajb\\_Lit\\_Cited\\_Instructions.pdf](http://www.botany.org/ajb/ajb_Lit_Cited_Instructions.pdf).

## **6. Tables – include in manuscript file and place immediately after Literature Cited**

Tables need to be formatted using the Table feature in Word or in a spreadsheet such as Excel.

Number tables with Arabic numerals followed by a period. Capitalize first word of title; all others, except proper nouns, are lowercase; spell out names of genera and abbreviations on first mention; place period at end. Include study organism (species or group) and geographic location in each caption when appropriate. Place explanatory notes and define all abbreviations below the table after the heading “Note:” or “Notes:”. Place footnotes after the Notes.

Every column must have an appropriately placed heading (esp. the first at left—the stub head), with appropriate subheadings. In the body of the table, capitalize the first word of each entry (and proper nouns); do not use vertical lines between columns; indicate footnotes by lowercase superscript letters.

If the use of color in a table is essential, please contact the Editorial Office at [ajb@botany.org](mailto:ajb@botany.org).

## **7. Appendices – include in manuscript file and place immediately after the tables**

If voucher and gene accession information support the study, list these in Appendix 1, which will be published in the print and online versions. Provide an appendix title, and a sentence-style row of headings for the data. For each taxon sampled, include specimen voucher information and/or gene accession numbers, separated by commas. To save space, the taxa can be run together in a paragraph. See a current issue or <http://www.amjbot.org/content/98/6/1049.full> for an example.

Additional appendices may be included. *AJB* encourages online-only publication of extensive appendices, as well as other supplemental materials that support the article but are best presented electronically (see “Online Supplemental Materials” below).

**8. Figure Legends – include in manuscript file and place immediately after the Appendices (or after the tables if there are no appendices)**

Each figure legend must be complete and informative so that reference to the text is not necessary to understand the content of the figure. Abbreviations should be defined unless they are standard convention. Place legends as separate paragraphs following the appendices. For figures with multiple lettered panels, a general title for the figure should be followed by a description of each panel (e.g., Fig. 5. Relationship between... (A) All fruits. (B) Fruits less than 0.5 mm.). When applicable, study organism (species or group) or geographic location, and define scale bar (e.g., Bar = 0.1  $\mu\text{m}$ ). For micrographs, include pertinent information such as magnification and type of section, stain, optics, or special techniques. Any nonlinear adjustment to photographs must be detailed.

Define all symbols and abbreviations either in a key within the figure or in the legend; if defined in an earlier legend, the appropriate figure or table may be cited.

Place figure abbreviations in alphabetical order and format as follows: c, cell; n, nucleus.

**Figures/Illustrations - upload as separate files** (do not include in the manuscript file)

For details and illustrated examples, see [http://www.botany.org/ajb/AJB\\_Digital\\_Art\\_Guidelines.pdf](http://www.botany.org/ajb/AJB_Digital_Art_Guidelines.pdf). A figure checklist is also available at [http://www.botany.org/ajb/AJB\\_Figure\\_Checklist.pdf](http://www.botany.org/ajb/AJB_Figure_Checklist.pdf).

TIFF or EPS formats are preferred for color and black and white photographs, drawings, and graphs.

Prepare figures at the final size desired: 1 column (8.9 cm [3.5 in]), 1.5 column (12.7-15.3 cm [5-6 in]), or 2 columns (18.4 cm [7.25 in]) wide and less than the length of the page (23 cm [9 in]).

Low-resolution files may be initially uploaded/submitted for the review process. Once your manuscript has been tentatively accepted, printer-quality (high-resolution) figures are required. See “Tips for Large Files” below.

### **Figure Manipulations**

Certain types of electronic manipulations of micrographs and other digital images may not be ethically acceptable. Images that will be compared with each other must be acquired and processed under the same conditions. Manipulations such as background subtraction or white-balancing should be explained in the Materials and Methods section. Note that a selected area within an image may not be altered or enhanced; the entire image must be treated the same. Linear adjustments to contrast, brightness, or color must be applied to an entire image or plate equally (or explained). Detail nonlinear adjustments in the legend. Always keep original raw data files for documentation upon request.

### **Resolution for Final Figures**

Line art (black lines and text, including phylogenetic trees): 1000-1200 dpi.

Halftone/grayscale (images with shades of gray, such as black and white photographs): a minimum of 300 dpi.

Color: a minimum of 300 dpi. Use RGB mode (not Indexed Color Mode). [Note: Do not send color files if images are to be printed in black and white.]

Combination art (grayscale image with type): 600-900 dpi.

Grayscale images should have the whitest area of the image set at a 2% highlight value, while the blackest area of the image should be set to a 98% shadow value.

Include the screen and printer font files for any text that has been added to the figure. Use PC or Mac versions of Adobe Postscript fonts. To avoid font problems, convert all type to curves or paths.

### **Format and Style**

Use consistent style, font, and font size (between 6 and 10 pt.) for all figures. Use of standard fonts (Times New Roman, Helvetica) gives better results.

For figures with multiple elements (photos, drawings, or graphs), group elements in a rectangle or square and label the top left corner of each element with a capital letter (e.g., A, B). Keep



elements close together for best use of space. Photographs in a composite plate should each be numbered and separated by a thin line or blank space.

Label axes; include Standard International (SI) Units of measure in parentheses; capitalize only the first letter of the first word (e.g., “Stem growth (%)”). Axis label should be c. 0.2 cm from units on axis, but no more than 0.5 cm; x- and y-axis labels should be equidistant from axes.

Use abbreviations consistently in the text and figures.

For magnified illustrations, provide a scale bar defined in either the figure itself or at the end of the legend.

### **Cover image and caption**

You are invited to submit one or more color photographs (or artificially colorized photomicrographs) to be considered for a cover illustration. The image must be at least 300 ppi and in portrait format slightly larger than 21.6 cm wide × 28 cm high (8.5 x 11 in). Submit the file(s) online with your original submission or revised manuscript. Also include a brief caption that describes the image, scientific name and authority of any organism, photographic technique, image manipulation, and the major result of the research. For micrographs, include pertinent information such as magnification and type of section, stain, optics, or special techniques.

The legend should do more than just describe the image itself: it should "tell a story" by explaining why the image is important to entice the reader to search for the full article. See <http://www.amjbot.org/content/vol95/issue4/cover.shtml> for an example.

### **Tips for Large Files**

Files >5 MB may be slow (or impossible) to upload on most servers. When saving graphics, LZW compression (Save As/Option) may be used to reduce file size. If your image is line-art and all pixels are either black or white, first convert the image to grayscale mode, then convert to bitmap mode at 1200 dpi, then save with LZW compression. If your image is black and white with gray portions, convert the image to grayscale mode, then save with LZW compression. (If you have any confusion about bitmap mode for line-art, your Digital Art Guidelines contain examples of image types with suggested resolutions. Alternatively, the Editorial Office may direct you to upload the files to an FTP site or send them via e-mail through <http://www.YouSendIt.com>.)

### **Online Supplemental Materials**

Authors may wish to augment their manuscripts with online supplemental materials (e.g., large data sets, three-dimensional reconstructions, simulations, real-time movies, color photographs).

Upload these appendices as separate files with the initial manuscript submission. Include a header on each file using this format: Smith et al.—American Journal of Botany 99(#): ###-###. 2012. – Data Supplement S1 – Page 1”. Name online supplements Appendix S1, Appendix S2, etc, in the order in which they appear in the text, regardless of whether they are tables, figures, text, other media, or a combination thereof. In the manuscript, after the mention of an online appendix, include the following: “(see Supplemental Data with the online version of this article)”.

Note that if authors wish to submit long DNA sequence appendices as supplemental material, they should select the "DNA sequences (online-only supplemental)" option on Editorial Manager. This ensures that lengthy appendices are not built into the reviewers' PDF, but are still accessible to the reviewers.

### **Abbreviations, Units, and Symbols**

See a recent Table of Contents page for commonly used abbreviations.

Do not begin a sentence, heading, or title with an abbreviation.

Abbreviate figure as “Fig.” or “Figs.”

Use the following abbreviations with numerals without spelling out at first use: h, min, s, yr, mo, wk, d, cm, mm, DNA, cpDNA, RNA, dNTP. Designate temperature as in 30°C (use the degree sign, not zero or the letter o).

Numbers: write out one through nine unless a measurement, a designator, or in a range (e.g., four petals, 3 mm, 6 yr, 5–11 species, day 2). Use % instead of percent with numerals; 1000 instead of 1,000; 10 000 instead of 10,000; 0.13 instead of .13.

Use Standard International (SI) units throughout the text, figures, and tables. Use the word mass (kg, g, mg) correctly; weight is reported in newtons (N). Use either a solidus for one unit in the denominator (e.g., kg/m<sup>2</sup>) or a negative exponent with multiplier dot (e.g., kg•m<sup>-2</sup>•d<sup>-1</sup>) for two or more units in the denominator. Use L for liter (mL for milliliter).

Include a space before and after all operation signs (e.g., =, +) with equations and definitions; use an en dash (width of two hyphens) for minus sign.

### **Copyright and Color Agreement Forms**

Once your manuscript has been accepted for publication, return signed copyright forms for the article, and any color plates, to the Editorial Office in St. Louis, Missouri. All authors must sign off on the copyright form or contact the Editorial Office to confirm their participation in the work.

**Copyright Assignment** - <http://www.botany.org/ajb/AJBcopyright.pdf>

**Color agreement form** - [http://www.botany.org/ajb/AJBcolor\\_agr.pdf](http://www.botany.org/ajb/AJBcolor_agr.pdf)

If you have reproduced copyrighted material in your manuscript, send proof of permission to the Editorial Office.

If you would like to reproduce copyrighted material previously published in the *American Journal of Botany*, return the completed permission request form available online at <http://www.botany.org/ajb/BSAPermission.pdf>