

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**



**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE TRÊS ESPÉCIES DO**  
**GÊNERO *Dalbergia*, OCORRENTES NO ESTADO DA BAHIA**

**PATRÍCIA NAYARA CALDAS SILVA ROCHA**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Agosto de 2004**

**PATRÍCIA NAYARA CALDAS SILVA ROCHA**

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO  
*Dalbergia*, OCORRENTES NO ESTADO DA BAHIA**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para obtenção  
do título de Mestre em Genética e Biologia  
Molecular.**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Agosto de 2004**

PATRÍCIA NAYARA CALDAS SILVA ROCHA

CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO *Dalbergia*,  
OCORRENTES NO ESTADO DA BAHIA

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em  
Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 30 de agosto de 2004

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa  
UESC

Dr<sup>a</sup>. Janay Almeida dos Santos-Serejo  
EMBRAPA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Rosa Bertão  
(UESC – Orientador)

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais e meu marido que foram companheiros indispensáveis para a concretização desse sonho, agora realizado.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual de Santa Cruz, à CAPES e à FINEP, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Rosa Bertão, minha querida orientadora, que sempre esteve presente e tanto contribuiu para a minha formação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Valéria Fernandes Diederich Lima dos Santos, por ter me apresentado ao mundo científico, e desempenhar um papel indispensável na minha formação enquanto pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Costa, pela co-orientação e inúmeras sugestões.

Ao Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa, pela disponibilidade e colaboração, sempre que solicitada.

Aos Professores do Curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelos ensinamentos transmitidos, pela atenção e pelo apoio prestados.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margarete Magalhães Souza, pela colaboração na análise morfométrica inicial dos cromossomos.

Aos colegas de turma, Adriana Matos Benjamin Leal, Alfredo Dantas Neto, Bianca Mendes Maciel, Cristiane Ferreira Lopes de Araújo, Geruza de Oliveira Ceita, Jeiza Botelho Leal, Joci Neuby Alves Macêdo, Lívia Araújo Lessa Sertório de Souza e Ronaldo Carvalho Santos, pelo companheirismo no decorrer do Curso.

A Andréa Fontes Argolo e Geysa Angélica Andrade da Rocha, pela paciência e prontidão em solucionar, sempre da melhor forma possível, nossos questionamentos e solicitações.

A Brasilino Raimundo dos Santos, pela grande colaboração na coleta do material botânico.

Ao Prof. M.S. Luiz Alberto Matos da Silva, pela identificação taxonômica das espécies estudadas.

À colega Rita de Cássia Vital Santos, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Marcadores Moleculares, pela ajuda em vários momentos da pesquisa. Em especial, a Alayne Magalhães Trindade Domingues pela colaboração na confecção das fotos.

Ao amigo Elton Silva Oliveira, pela excelente reprodução dos ideogramas.

A todos os funcionários da Universidade Estadual de Santa Cruz, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

<b>EXTRATO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xi</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2. 1. Caracterização geral do gênero <i>Dalbergia</i> .....	3
2. 2. Taxonomia do gênero <i>Dalbergia</i> .....	7
2. 3. Estudos citogenéticos.....	9
2. 4. Estudos genéticos e citogenéticos em <i>Dalbergia</i> .....	11
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
4. 1. Material.....	15
4.2. Métodos.....	20
4. 2. 1. Pré-tratamento e germinação de sementes .....	20
4. 2. 2. Coleta, pré-tratamentos e fixação das raízes .....	20
4. 2. 3. Método de Feulgen.....	20
4. 2. 4. Bandamento-C .....	21
4. 2. 5. Coloração com nitrato de prata .....	22
4. 2. 6. Obtenção das fotomicrografias.....	23
4. 2. 7. Análise morfológica dos cromossomos e elaboração dos cariótipos .....	24
4. 2. 8. Análise da variabilidade cariotípica .....	25
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
5. 1. Aspectos gerais dos cariótipos.....	26
5. 2. Variabilidade cariotípica intra e interespecífica .....	33

5. 3. Avaliação da variabilidade dos cariótipos .....	35
5. 4. Aplicação de bandamento cromossômico .....	38
5. 4. 1. Bandamento-C .....	38
5. 4. 2. Coloração com nitrato de prata .....	41
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>43</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>44</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>



## EXTRATO

SILVA-ROCHA, Patrícia Nayara Caldas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, agosto de 2004. **Caracterização Cromossômica de Três Espécies do Gênero *Dalbergia*, Ocorrentes no Estado da Bahia.** Orientadora: Mônica Rosa Bertão. Co-orientador: Marco Antônio Costa. Colaborador: Ronan Xavier Corrêa.

O gênero *Dalbergia* L. f. pertence à família Fabaceae. No Brasil observa-se a ocorrência de 40 espécies de *Dalbergia*, das quais 10 são encontradas na Bahia. Representantes deste gênero são distribuídos por toda costa do Estado, conhecidos pelo elevado valor econômico da madeira e, devido a este fato, são amplamente utilizados comercialmente. A existência de poucos representantes do gênero torna pertinente o desenvolvimento de pesquisas que conduzam à caracterização da diversidade genética existente neste material. Os dados obtidos nesta pesquisa poderão fornecer informações para a elaboração de estratégias que permitam a preservação e o uso racional destas espécies.

Entre as ferramentas disponíveis para a caracterização genética de uma determinada espécie, encontram-se os estudos citogenéticos. As técnicas convencionais de coloração citológica permitem a cariotipagem das espécies, utilizando parâmetros como número e tamanho dos cromossomos e a posição do centrômero.

Nesse contexto, objetivou-se caracterizar os complementos cromossômicos de três espécies de *Dalbergia* que ocorrem no Estado da Bahia, sendo estas *D. nigra*, *D. miscolobium* e *D. ecastaphyllum*. Tais dados foram utilizados para elaborar o cariótipo das espécies, determinar o grau de similaridade cariotípica entre as espécies e contribuir ou fornecer dados para subsidiar estudos sobre o padrão de evolução cromossômica no gênero *Dalbergia*.

A análise morfométrica, os ideogramas e os cariótipos representativos das espécies *D. miscolobium*, *D. nigra* e *D. ecastaphyllum* apresentam-se descritos pela primeira vez no presente trabalho. As análises revelaram que o número cromossômico das três espécies é  $2n = 20$ . O gênero apresenta um cariótipo padrão, mas apesar das similaridades encontradas, existem variações que permitem caracterizar cada espécie individualmente.

A espécie *D. miscolobium* contém um cariótipo com 10 pares cromossômicos, onde nove pares de cromossomos têm centrômero mediano e submediano, (RB ~ 1,13 – 1,51) e um par significativamente distinto, com centrômero submediano, o par cromossômico nº 4 (RB 2,38), que é quem também carrega o satélite.

O cariótipo de *D. nigra* apresentou 10 pares de cromossomos com centrômero mediano e submediano, (RB ~ 1,17 – 1,38). Das 10 metáfases analisadas, observou-se variação com relação ao número de satélites, onde na maioria das células só foi evidenciado um par cromossômico satelitado (Cromossomo nº 5) e em apenas duas metáfases foi detectada a presença de dois pares cromossômicos satelitados (Cromossomos nº 1 e nº 5).

*D. ecastaphyllum* apresentou um cariótipo consistindo de nove pares de cromossomos com centrômero mediano e submediano (RB ~ 1,18 – 1,52) e um par satelitado acrocêntrico, caracteristicamente distinto (Cromossomo nº 6). Neste último, não foi observada a presença de constrição primária.

A técnica de bandamento-C mostrou-se aplicável para as espécies de *Dalbergia*. O padrão observado indica a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões centroméricas de todos os cromossomos dos complementos das três espécies, sendo algumas mais evidentes para determinados pares cromossômicos.

O método de Fernandez-Gomez (1969) apresentou resultados positivos para as espécies em análise, revelando que as mesmas têm similaridade no número de nucléolos por célula. Foi possível observar a marcação de 1 e 2 nucléolos, variáveis em tamanho nos núcleos interfásicos e correspondentes a 1-2 sítios ribossômicos ativos.

Palavras-chave: cariótipo, *Dalbergia miscolobium*, *D. nigra*, *D. ecastaphyllum* e bandamento cromossômico.

## ABSTRACT

SILVA-ROCHA, Patrícia Nayara Caldas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, august, 2004. **Chromosomal characterization of three species of the genus *Dalbergia*, occurring in the State of Bahia.** Advisor: Mônica Rosa Bertão. Advisor Committee Members: Marco Antônio Costa and Ronan Xavier Corrêa.

The genus *Dalbergia* L.f. is placed within Fabaceae family and contains 40 species occurring in Brasil, ten of which occur in the State Bahia, where they can be commonly found across the coast. Due to the good quality of the lumber, these trees have reached an expressive commercial value. Although having relevant economical and ecological importance, genetic diversity of the genus *Dalbergia* has been poorly studied. Once available the information will be a valuable guide to the preservation strategies and rational management.

Traditionally used chromosomal staining techniques and chromosome morphometry can provide useful information to characterize the genetic diversity and others evolutionary aspects within a group.

The aim of the present study was characterize and analyse comparatively the karyotypes of three species of *Dalbergia* L. f. occurring in the state of Bahia; *i.e.* *D. nigra*, *D. miscolobium* e *D. ecastaphyllum*, in order to give support to more detailed chromosomal evolutionary studies.

Karyotype morphometry, and ideograms for the three species are presented for the first time. The three species analysed presented  $2n=20$  chromosomes. Although the genus showed a standard karyotype, some variations were observed which enabled to distinguish each species individually. Karyotype variation were observed in the chromosome sizes and in the number and positions of the satellites.

*D. miscolobium* karyotype presented nine similar chromosome pairs with median or submedian centromere (RB ~ 1,13 – 1,51) and one distinct satellited pair with submedian (RB 2,38).

*D. nigra* presented ten chromosome pairs with median or submedian centromere (RB ~ 1,17 – 1,38). This species showed variation on the number of chromosomes with satellite (one or two satellited pairs).

*D. ecastaphyllum* presented nine chromosome pairs with median or submedian centromere (RB ~ 1,18 – 1,52) and one distinct satellited pair.

C-banding technique indicated presence of heterochromatin in the centromeric region in the three species studied and Silver staining revealed a similar number of NORs.

Key-words: karyotype, *Dalbergia miscolobium*, *D. nigra*, *D. ecastaphyllum* e Chromosome banding

## Lista de Tabelas

1. Identificação dos locais de ocorrência de espécies de *Dalbergia*, segundo levantamento no Herbário do CEPEC/CEPLAC, Ilhéus, BA ..... 16
2. Espécies de *Dalbergia* analisadas, seções, nome científico e comum, acessos, procedência e principais características morfológicas ..... 18
3. Valores de comprimento absoluto (CA - micrômetros), relação de braços (RB), comprimento relativo (CR - %) e comprimento do lote haplóide (CLH - micrômetros) das espécies de *Dalbergia* analisadas ..... 29
4. Análise de variância para os valores de comprimento de lote haplóide e resultados do Teste de Tukey para as espécies de *Dalbergia* analisadas ..... 37
5. Análise de variância para os valores de comprimento absoluto do par cromossômico maior, nº 1, e resultados do Teste de Tukey para as espécies de *Dalbergia* analisadas ..... 37
6. Análise de variância para os valores de comprimento absoluto do par cromossômico menor, nº 10, e resultados do Teste de Tukey para as espécies de *Dalbergia* analisadas ..... 38

## Lista de Figuras

1. Esboço do mapa da Bahia, ilustrando a procedência das sementes das três espécies investigadas. .... 19
2. Aspecto geral dos cromossomos metafásicos a partir de preparações mitóticas: a) *D. miscolobium* ( $2n = 20$ ); b) *D. nigra* ( $2n = 20$ ); e, c) *D. ecastaphyllum* ( $2n = 20$ ). Setas indicam cromossomos satelitados. .... 30
3. Cariótipos comparativos das três espécies: a) *D. miscolobium* ( $2n = 20$ ); b) *D. nigra* ( $2n = 20$ ); e, c) *D. ecastaphyllum* ( $2n = 20$ ). .... 31
4. Ideogramas das espécies: a) *D. miscolobium*; b) *D. nigra*; e, c) *D. ecastaphyllum*. . 32
5. Metáfases mitóticas coradas com a metodologia de Bandamento-C: a) *D. miscolobium*; b) *D. nigra*; e, c) *D. ecastaphyllum*. .... 40
6. Núcleos interfásicos, evidenciando um a dois nucléolos por espécie: a) *D. miscolobium*; b) *D. nigra*; e, c) *D. ecastaphyllum*. .... 42

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Dalbergia* pertence à família Fabaceae, sub-família Papilionoideae, sendo considerado o segundo maior da tribo Dalbergieae Bronn ex. D.C. Possui um número incerto de espécies que se acredita ser em torno de 100. No Brasil observa-se a ocorrência de 40 espécies de *Dalbergia* L. f, cinco com elevado valor econômico, sendo que destas quatro ocorrem na Bahia.

As espécies do gênero distribuem-se por praticamente toda costa do Estado da Bahia que possui uma vegetação bastante diversificada, com áreas representativas dos mais importantes ecossistemas brasileiros. É possível encontrar as espécies de *Dalbergia* nos mais variados tipos de vegetação, como: cerrado, restinga, mata atlântica, manguezal, caatinga, floresta mesofítica e campo rupestre.

A existência de poucos representantes do gênero *Dalbergia* na região de Mata Atlântica, localizada no Estado da Bahia, torna pertinente o desenvolvimento de pesquisas que conduzam à caracterização da diversidade genética existente neste material e, conseqüentemente, à elaboração de estratégias que permitam sua preservação e seu uso racional.

Caracteres citológicos tais como número e morfologia de cromossomos, apresentam grande potencial para a elucidação de estudos filogenéticos e taxonômicos. Como o número cromossômico geralmente se apresenta constante na mesma espécie pode ser usado como caráter taxonômico. O número de cromossomos pode ser uniforme dentro de gêneros ou mesmo tribos, ou variar de grupo para grupo.

A posição, o número e o tamanho de constrições secundárias e satélites cromossômicos têm sido avaliados em muitos grupos de plantas por se mostrarem úteis na caracterização e distinção de espécies.

Dentro deste contexto, o presente trabalho objetivou a caracterização do complemento cromossômico de três espécies de *Dalbergia* L. f., que ocorrem no Estado da Bahia, sendo estas *D. nigra*, *D. miscolobium* e *D. ecastaphyllum*. Tais dados foram utilizados para elaborar os cariótipos, determinar o grau de similaridade cariotípica entre as espécies e gerar dados para subsidiar estudos sobre o padrão de evolução cromossômica no gênero *Dalbergia*.

Os dados obtidos nesta pesquisa poderão oferecer informações para a elaboração de estratégias para preservação e uso racional destas espécies, bem como subsidiar programas de melhoramento que visem a obtenção de materiais com caracteres de interesse.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2. 1. Caracterização geral do gênero *Dalbergia*

O gênero *Dalbergia* é considerado o segundo maior da tribo Dalbergieae Bronn ex. D.C. e pertence à família Fabaceae, sub-família Papilionoideae. Muitas de suas espécies são amplamente conhecidas no Brasil com a denominação vulgar de Jacarandá, nome proveniente da língua Tupi, como corruptela de **ya-aca-r-anta** (Carvalho, 1990), que significa árvore que possui madeira dura.

Espécies de *Dalbergia* são importantes árvores tropicais de madeira de lei, que apresentam modo de dispersão de sementes principalmente pelo vento (Rout et al., 2003). Evidências indicam que o sistema de reprodução mais provável entre as espécies do gênero seja a alogamia. Almeida (2001) relata que a dispersão das sementes ocorre por gravidade.

O gênero possui espécies com algumas características comuns e outras divergentes, com relação à morfologia floral, organização da folha, tamanho e organização do fruto, entre outras. Além de ser amplamente utilizado comercialmente, o gênero possui ainda espécies com utilidade medicinal, como o jacarandá-da-Bahia, que tem sido utilizado para tratamento de ferimentos e diarreia.

As valiosas madeiras dos jacarandás são conhecidas desde o Brasil colonial e a importância econômica dessas plantas é citada na literatura já no início daquele período (Carvalho, 1990).

No território brasileiro são conhecidas cinco espécies com elevado valor econômico, sendo que destas quatro ocorrem na Bahia. Neste Estado o gênero é representado por um total de 10 espécies, entre elas *D. nigra* (jacarandá-da-Bahia), *D. decipulares* (Sebastião-

de-arruda), *D. miscolobium* (jacarandá-do-cerrado) e *D. cearencis* (jacarandá-violeta), conhecidas pelo valor de sua madeira. As seis que não apresentam importância econômica conhecida até o momento são *D. acuta*, *D. foliolosa* (jacarandá-rosa), *D. glaucescens*, *D. catingicola*, *D. frutescens* (jacarandá-branco) e *D. ecastaphyllum* (marmeleiro-da-praia).

Entre as espécies de *Dalbergia*, o Jacarandá-da-Bahia (*D. nigra*) é a que possui madeira com maior valor econômico. A espécie pode ainda ser referida com os nomes comuns, caviúna, Brazilian rosewood, jacarandá-caviúna, jacarandá-preto, jacarandá-roxo e palisandre. Carvalho (1990) cita que a árvore descrita como Jacarandá no clássico Tratado Descritivo do Brasil, escrito por Souza, em 1587 e reimpresso pelo Boletim Geográfico em 1964, é possuidora de uma madeira de cor escura, de fragrância acentuada e bastante dura e que apesar de seu peso e densidade, é facilmente trabalhada e resiste ao apodrecimento mesmo nas quentes e úmidas condições tropicais.

A madeira do Jacarandá-da-Bahia é amplamente utilizada, não só pelo desenho decorativo de seu laminado, bem como pela multiplicidade de sua aplicação, tais como: na confecção de móveis torneadas de luxo, no preparo de acabamentos internos em construção civil, em molduras de portas e rodapés, em caixas de rádios e televisões, em peças entalhadas, em cabos de talheres e no artesanato em geral (Almeida, 2001).

Esta espécie, (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allem. ex Benth.), é uma leguminosa arbórea de grande porte, endêmica do litoral sul da Bahia, sendo um componente típico da Mata Atlântica. Constitui-se uma planta decídua, de caráter pioneiro, característica da floresta pluvial da encosta atlântica, sendo encontrada nas encostas bem drenadas, tanto no interior da mata primária densa, como em formações secundárias (Lorenzi, 1992).

Na Bahia, *D. nigra* é encontrada em maior frequência em uma faixa de terreno bem drenado, de relevo ondulado e montanhoso, desde o Rio Itanhém, ao sul, até o Rio Jequiriçá, ao norte; ao leste a espécie raramente atinge o litoral e, ao oeste, alcança as escarpas do Planalto Sul Baiano, principalmente na região de vale dos rios Cachoeira, de Contas e das Almas. Em Minas Gerais, a espécie está associada à floresta semidecídua ao longo dos vales de rios, onde cresce com um porte de menor tamanho, diferindo dos indivíduos normalmente altos e vigorosos da Mata Atlântica. *D. nigra*, pode ainda ser

encontrada nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e norte de São Paulo (Almeida, 2001).

A destruição acelerada das florestas tropicais e o intenso processo de exploração extrativista que ocorre na região sul da Bahia, tem inserido inúmeras espécies de interesse econômico e conservacionista no grupo de espécies ameaçadas de extinção, entre as quais destaca-se o jacarandá-da-Bahia (Sperândio & Fonseca, 1986; Carvalho, 1992; Silva & Mendonça, 1998). Poucos indivíduos dessa espécie são encontrados, ainda que de forma isolada, nos maciços e nos fragmentos de floresta que restam, devido ao intenso desmatamento indiscriminado da Mata Atlântica no sul da Bahia (Almeida, 2001).

O jacarandá-da-Bahia vem sendo objeto de estudos para caracterização da variabilidade genética de acessos das coleções preservadas *in situ* e *ex situ*, através do uso de marcadores moleculares, desenvolvidos nos Laboratórios de Genética Molecular (Ferreira et al., 1998; Almeida et al., 1998; Neto et al., 1998); e de Citogenética e Marcadores Moleculares da Universidade Estadual de Santa Cruz, onde foram realizados estudos acerca da caracterização citogenética da espécie (Silva e Bertão, 2001).

*D. miscolobium* Benth. é outra espécie do gênero *Dalbergia*, pertencente à seção *Dalbergia*, encontrada com os nomes comuns de jacarandá-do-cerrado, cabiúna, cabiúna-do-campo, caviúna, canzileiro, uraúna, pau-preto, jacarandá-caviúna e pau-preto. Em literaturas antigas é freqüentemente referida como *D. violaceae* (Vogel) Malme (Gibbs and Sasaki, 1998). É uma planta característica da vegetação de Cerrado e ocorre do Estado do Piauí ao Estado do Paraná. A espécie *D. miscolobium* é encontrada sob a forma de arbustos ou pequenas árvores de campos limpos que podem alcançar 12 m de altura, quando as condições de solo e disponibilidade de água permitem a formação de um tipo de floresta seca, chamada cerradão (Carvalho, 1997).

*D. miscolobium* é facilmente distinguida de todas as outras espécies brasileiras especialmente por sua estrutura de tronco retorcido e a aparência verde azulada de suas folhas. A cor púrpura escuro do vexilo contrasta com o verde pálido do cálix. É relacionada com *D. spruceana*, mas difere na forma do cálix, na cor mais escura das pétalas e na distribuição geográfica (Carvalho, 1989). As folhas são alternas e compostas por cinco a 10 pares de folíolos rígidos, ovalados, de cor verde-azulada, com até três cm de comprimento. As inflorescências são ramificadas (tipo panícula tirsóide) e estão no

ápice dos ramos ou axila das folhas, contendo até 60 flores. As flores têm cerca de dois mm de comprimento e cor roxo-escuro. Os frutos são escuros, secos (tipo legume samaróide), alongados até oito cm de comprimento, foliáceos, contendo uma ou duas sementes castanhas, achatadas e com a forma de um rim. Segundo Oliveira & Paula (2001) *D. miscolobium* é uma espécie hermafrodita e auto-incompatível cujas flores são polinizadas por abelhas grandes, apresentando também dispersão dos frutos alados pelo vento.

A madeira do Jacarandá do cerrado é de boa qualidade, assim como o jacarandá-da-Bahia, porém pouco utilizada devido à estrutura tortuosa de seu tronco. Também conhecida por sua importância econômica, sua madeira é usada em construções de casas e cercas, fabricação de instrumentos e carvão. Os frutos secos são usados para compor arranjos artesanais de flores secas. Possui grande potencial para a ornamentação devido à presença de algumas características, como a folhagem verde-azulada. A casca libera um corante utilizado no tingimento de algodão empregado em tecelagem (Almeida, 1998).

*D. ecastaphyllum* (L.) Taub, mais comumente conhecida como bugi, marmelo ou marmeleiro-da-praia, ocorre como arbusto semi-prostrado e se distribui ao longo da costa das Américas, do sul da Flórida ao sul do Brasil. Bastante associada a estuários de rios, margens de riachos ou manguezais, mas também pode ser encontrada à beira-mar. Seus frutos são capazes de flutuar, provavelmente expandindo sua ocorrência nas ilhas do oeste da Índia. Apesar de sua fragilidade, suas sementes podem ser dispersas pelas correntes oceânicas, explicando sua presença ao longo da costa do oeste da África. Em um número menor de vezes, a espécie cresce em vegetação de restinga, em solo arenoso, como arbusto ou pequenas árvores (Carvalho, 1989).

As espécies da seção *Ecastaphyllum* têm uma tendência a serem taxonomicamente confusas devido às similaridades morfológicas que resultam da recente evolução dos hábitos similares. Porém, *D. ecastaphyllum* é distinguida das outras espécies da seção por suas folhas unifolioladas, com superfície superior e inferior de coloração distinta; suas longas estípulas lanceoladas e sua distribuição geográfica. Cresce ao longo da costa e é a única espécie do gênero *Dalbergia* com tolerância a condições de forte salinidade (Carvalho, 1989).

## 2. 2. Taxonomia do gênero *Dalbergia*

O gênero *Dalbergia* foi proposto pelo filho de Linnaeus em 1781, em memória de Carl Gustav Dahlberg, um soldado sueco no Suriname e coletor para Linnaeus. O gênero foi descrito para acomodar duas espécies: *D. lanceolaria*, originária de Ceilão e *D. monetaria*, originária do Suriname (Carvalho, 1989).

Este gênero surgiu na África, de onde dispersou, tanto para o leste, como para o oeste. As diferentes condições climáticas e ecossistemas da Ásia e América do Sul influenciaram nos diferentes modos de evolução do gênero (Almeida, 2001).

Existem cerca de 100 espécies no gênero *Dalbergia* e, no Brasil, observa-se a ocorrência de 40 espécies. Na Bahia o gênero é representado por um total de 10 espécies, entre elas *D. nigra* (jacarandá-da-Bahia), *D. decipulares* (Sebastião-de-arruda), *D. miscolobium* (jacarandá-do-cerrado), *D. cearensis*, *D. acuta*, *D. foliolosa* (jacarandá-rosa), *D. glaucescens*, *D. catingicola*, *D. frutescens* (jacarandá-branco) e *D. ecastaphyllum* (marmeleiro-da-praia).

O gênero *Dalbergia* é dividido em cinco seções, que podem ser definidas através das características da inflorescência e do fruto. Essas características são utilizadas por serem as que melhor evidenciam as relações taxonômicas dentro do gênero (Carvalho, 1997).

Das cinco seções, três estão representadas na Bahia. A seção *Dalbergia* é caracterizada por sua inflorescência do tipo panícula, fruto oblongo, nervura reticulada e engloba cinco das espécies ocorrentes na Bahia: *D. nigra*, *D. miscolobium*, *D. foliolosa*, *D. glaucescens* e *D. acuta*.

A seção *Triptolemea* tem inflorescência cimosa, seu fruto é oblongo ou oblongo elíptico, a nervura reticulada e engloba quatro das espécies de ocorrência na Bahia: *D. frutescens*, *D. decipularis*, *D. catingicola*, *D. cearensis*. Já a seção *Ecastaphyllum*, tem apenas um representante na Bahia: *D. ecastaphyllum*, cuja inflorescência é do tipo panícula fasciculada, fruto orbicular e a nervura vai de rugosa a reticulada. As duas seções restantes são *Selenolobium*, que possui representantes nos Estados do Amazonas, Roraima e Amapá; e *Pseudecastaphyllum*, de ocorrência no Pará e Amazonas (Carvalho, 1997).

Muitos estudos sobre sistemática e evolução tem revelado a forte tendência do uso de análises de seqüências de genes para a reconstrução de árvores filogenéticas. Em plantas com flores, genes de cloroplastos têm sido muito utilizados para este propósito (Doyle e Luckow, 2003).

Análises moleculares de leguminosas revelam o grupo Papilionoideae como monofilético e sugere que ele divergiu de outras leguminosas a cerca de 40 a 50 milhões de anos atrás. Quatro dos maiores grupos de papilionóides, que contém importantes espécies domesticadas e ou espécies modelo, são bem suportados por pesquisas de dados moleculares, mas relações entre alguns deles não são muito nítidas. O clado aeschynomenóide/dalbergióide é um grupo diverso que inclui o amendoim e outros gêneros herbáceos, mas também plantas lenhosas como o jacarandá-da-Bahia (Doyle e Luckow, 2003).

A tribo Dalbergiatae, com exceção de *Andira*, *Hymenolobium*, *Vatairea* e *Vataireopsis*, pertence a um grupo monofilético pantropical de leguminosas da subfamília Papilionoidea, designado dalbergióides. Esse grupo ainda inclui todos os gêneros previamente referidos para as tribos Aeschynomene e Adesmieae e a subtribo Bryinae da Desmodiatae. Esse grupo foi detectado a partir de análises filogenéticas de seqüências de DNA do cloroplasto *trnK* (incluindo *matK*) e introns *trnL*, e do RNA ribossomal 5,8 S. Todos os Dalbergióides são membros de um a três subclados, o *Adesmia*, *Dalbergia* e *Pterocarpus*. O clado dalbergióide e seus três subclados são críticos, no sentido de que eles são geneticamente distintos, mas pobremente distinguidos por dados não-moleculares. Caracteres taxonômicos tradicionalmente importantes como hábitos arbóreos, estames livres, e vagens leguminosas, não fornecem suporte para os clados, melhores identificados por análises moleculares (Lavin-Matt et al., 2001).

### 2. 3. Estudos citogenéticos

Entre as ferramentas disponíveis para a caracterização genética de uma determinada espécie encontram-se os estudos citogenéticos, os quais são de suma importância na descrição da variabilidade genética e no entendimento da dinâmica cromossômica envolvendo uma determinada espécie, gênero, família ou ordem a qual ela pertença. Além de permitirem a elucidação da estrutura e organização do genoma vegetal e de mecanismos evolutivos, tais estudos viabilizam a elaboração de estratégias que podem ser utilizadas em programas de melhoramento visando à transferência de genes de interesse (Heslop-Harrison, 1991, 1996).

As análises do complemento cromossômico nos diversos grupos de seres vivos podem fornecer informações básicas para a caracterização citológica, permitindo a identificação de espécies (Bertão, 1993).

Em plantas, os parâmetros utilizados para identificar os cromossomos têm sido o comprimento dos cromossomos, o comprimento do braço longo e do braço curto, bem como a relação de braços (Ferreira, 1998).

A análise de cromossomos é feita com base em características morfológicas, melhor observadas em cromossomos metafásicos. Muitos pré-tratamentos para a obtenção de cromossomos metafásicos e, ou prometáfásicos têm sido descritos em plantas, como a aplicação de combinações de inibidores de síntese de proteínas e do fuso mitótico, como cicloheximida e hidroxiquinolina (Bertão e Aguiar-Perecin, 2002).

Várias técnicas citogenéticas para análise de cromossomos foram desenvolvidas e continuam sendo aperfeiçoadas. Até a década de 70, as técnicas convencionais de coloração permitiam apenas a cariotipagem das espécies com base em parâmetros morfométricos como número e tamanho dos cromossomos, e na posição do centrômero (Guerra, 1983).

As técnicas de bandamento cromossômico, que permitem a coloração diferencial de regiões específicas nos cromossomos, surgiram no início da década de 70, simultaneamente com experimentos moleculares *in situ*, que permitem o mapeamento de seqüências repetitivas de DNA (Pardue e Gall, 1970). Segundo Friebe et al. (1996), o desenvolvimento das técnicas de bandamento cromossômico representou um dos

maiores avanços na citogenética vegetal, em virtude da sua potencialidade em demonstrar uma diferenciação estrutural ao longo dos cromossomos somáticos.

As técnicas de bandamento cromossômico evidenciam bandas que representam um tipo de organização do genoma de eucariotos e refletem a diferenciação longitudinal existente nos cromossomos. Essas técnicas são aplicadas principalmente em cromossomos metafásicos (Ferreira, 1998).

O bandamento-C revela padrões de heterocromatina constitutiva nas espécies. Essa técnica, em cromossomos de plantas, foi introduzida por Vosa e Marchi (1972 a, b) e tem fornecido informações valiosas sobre a quantidade, localização e origem da heterocromatina, bem como sua importância no processo de evolução cariotípica (Bertão, 1993).

As alterações cromossômicas podem ser avaliadas através da aplicação das técnicas de bandamento cromossômico. Em estudos de evolução, o bandamento tem sido eficiente em evidenciar as transformações que ocorrem em grupos de espécies próximas com cariótipos semelhantes.

As técnicas de bandamento-C utilizam o Giemsa, que cora mais fortemente as seqüências de DNA repetitivo depois de tratamento que envolve basicamente uma etapa de desnaturação dos cromossomos e outra seguinte de renaturação. Para a desnaturação dos cromossomos é freqüente o uso de hidróxido de bário, porém a formamida também é usada como agente desnaturante (Fernandez et al., 2002).

O bandamento-C em espécies de *Serapias*, um gênero da família Orchidaceae, que possui cromossomos de tamanho pequeno, revelou diferentes quantidades de heterocromatina, com bandas em vários pares cromossômicos, localizadas no centômero, alguns pares com bandas teloméricas no braço curto dos cromossomos ou braços curtos heterocromáticos. Foram observadas bandas heterocromáticas ocupando a extensão total dos cromossomos, com eucromatina limitada às extremidades. Essa distribuição tem sido observada em poucos casos, como *Cicer* e *Melipona* e sugere que as espécies de *Serapias* formam um raro grupo homogêneo (D'emerico et al. 2000).

Regiões específicas do cromossomo que formam o nucléolo, localizado no núcleo interfásico, são denominadas de regiões organizadoras do nucléolo, e se constituem de múltiplas cópias de seqüências de DNA ou genes responsáveis pela



formação de RNA ribossômico. As RONS podem ser diferenciadas através de coloração com Giemsa ou impregnação com prata.

A técnica de coloração com nitrato de prata permite a identificação das regiões organizadoras do nucléolo nas constrições secundárias dos cromossomos satelitados de plantas e animais. Em eucariotos, os genes ribossômicos se localizam em poucos sítios cromossômicos e são organizados em seqüências repetidas em tandem no DNA (Verma, 1995; Friebe et al., 1996).

A localização da RON é uma importante ferramenta para certos estudos, como aqueles sobre evolução e citotaxonomia, e aqueles sobre expressão gênica e diagnóstico de tumores patogênicos (Kavalco; Pazza, 2004).

Diferentes espécies podem apresentar variações na posição, número e tamanho das constrições secundárias e satélites cromossômicos. Essas constrições correspondem à região organizadora do nucléolo e podem ser evidenciadas através dos métodos de impregnação por prata. Esses marcadores cromossômicos podem ser perdidos ou incorporados ao longo do processo evolutivo, ou ainda sofrer acréscimos ou decréscimos e sua atividade referente à RON pode ser variável (Stebbins, 1950; Murray, 1975).

#### **2. 4. Estudos genéticos e citogenéticos em *Dalbergia***

Estudos recentes utilizaram marcadores RAPD para avaliar a diversidade genética de acessos de *D. nigra* localizados no banco de germoplasma da Estação Ecológica do Pau-Brasil, em Porto Seguro – BA. Foram avaliados 163 acessos, onde 133 foram escolhidos ao acaso e 30 escolhidos de acordo com o porte da planta. Os resultados revelaram que a variabilidade encontrada entre os indivíduos da coleção *ex situ* de jacarandá-da-Bahia da ESPAB é ampla e está distribuída entre os acessos da coleção. Acredita-se que as sementes que originaram o arboreto foram coletadas de plantas adultas, a cerca de 30 anos, numa época em que a Mata Atlântica ainda se destacava bastante, o que torna o banco genético da ESPAB uma preciosa ferramenta para programas de recuperação e conservação do jacarandá-da-Bahia (Almeida, 2001).

Tradicionalmente, a identificação de espécies tem sido feita com base em características morfológicas como morfologia floral, cor da flor, e características

agronômicas de plantas. Porém dados genéticos têm se mostrado bastante úteis na identificação e classificação de espécies.

O uso de marcadores para a análise de diversidade genética tem facilitado a manutenção, o manejo e o uso da coleção *ex situ* de jacarandá-da-Bahia da Estação Pau-Brasil através do perfil da variabilidade genética nela existente. A seleção de matrizes com alta variabilidade pode ser usada para produção de sementes, com o objetivo de enriquecer as populações existentes de Mata Atlântica. Como a semente de jacarandá não apresenta grande dormência, a reintrodução desta espécie pode ser feita por semeadura direta e, dessa forma, o sistema radicular das plantas se desenvolve melhor (Almeida, 2001).

Rout et al. (2003) desenvolveu estudos para identificar e relacionar geneticamente cinco espécies de *Dalbergia*, bem como avaliar a diversidade genética entre populações de *Dalbergia sisso*, *D. latifolia*, *D. paniculata*, *D. assamica* e *D. spinosa*, através do uso de marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNAs). Primers foram selecionados para identificação e estabelecimento de um sistema que estimou as relações genéticas e avaliou a variabilidade genética entre os indivíduos em uma população de espécies de *Dalbergia*. Um total de 120 fragmentos distintos de DNA variando de 0,3 a 4,0 kb foram amplificados utilizando nove primers RAPD.

A similaridade genética foi avaliada com base na presença e ausência de bandas, as quais revelaram uma grande variabilidade entre as espécies. A análise de agrupamento indicou que as cinco espécies formam dois grandes grupos. O primeiro agrupamento foi formado por *D. spinosa*, *D. latifolia* e *D. sisso*. O segundo foi representado por *D. paniculata* e *D. assamica*, onde foi observada a similaridade máxima de 60 %. *D. latifolia* e *D. sisso* apresentaram 50 % de similaridade. *D. spinosa* compartilhou mais de 40 % de similaridade com *D. latifolia* e *D. sisso*. Todas as espécies compartilharam mais que 20% de similaridade. A distância genética mais próxima existiu entre as populações de diferentes espécies de *Dalbergia*. Os marcadores RAPD evidenciaram potencial para conservação de clones identificados e caracterização de parentesco genético entre as espécies (Rout et al., 2003).

As Leguminosas apresentam uma grande variação entre as espécies, podendo ser encontradas desde grandes árvores e arbustos até ervas e trepadeiras. Esta grande

diversidade torna este grupo favorável aos estudos do processo evolutivo e comparativo entre certas características celulares fundamentais, como o número de cromossomos, com a distribuição geográfica das espécies e com as relações taxonômicas entre as Leguminosas.

Num trabalho desenvolvido por Bandel (1972), procurou-se estudar a evolução das leguminosas com base na variação numérica dos cromossomos neste grupo de plantas. No estudo foi feita a contagem inédita do número cromossômico de três espécies de *Dalbergia*, *D. cearense*, *D. nigra* e *D. violaceae*, sendo que posteriormente esta última passou a ser designada como *D. miscolobium*. Todas apresentaram o número cromossômico  $2n = 20$ , corroborando com a literatura existente para o gênero. Outras espécies de *Dalbergia* (Bandel, 1972) não apresentaram variação no número cromossômico, são elas: *D. assamica*, *D. cochichinensis*, *D. cultrata*, *D. ecastaphyllum*, *D. lanceolaria*, *D. latifolia*, *D. melanoxyton*, *D. paniculata*, *D. sissoo*, *D. spinosa* e *D. stipulaceae*.

Porém, apenas o complemento cromossômico de jacarandá-da-Bahia (*D. nigra*) foi anteriormente estudado quanto à caracterização cariotípica (Silva; Bertão, 2001), o que justifica e intensifica a necessidade da caracterização citogenética de outras espécies do grupo.

Silva e Bertão (2001) apresentaram a análise citogenética preliminar do jacarandá-da-Bahia, a qual permitiu a confirmação do número cromossômico diplóide para esta espécie como sendo  $2n = 20$ , conforme relatado inicialmente por Bandel (1972). Apesar das limitações quanto ao reduzido tamanho dos cromossomos desta espécie, foi possível a elaboração de um cariótipo contendo 10 pares de cromossomos apresentando centrômeros medianos, submedianos e subterminais, sendo um dos pares satelitado.

Estudos realizados com o gênero *Lathyrus* L., que pertence à família Leguminosae, onde todas as espécies tem  $2n = 14$  cromossomos, mostram que apesar de não haver variação no número de cromossomos podem ocorrer variações no comprimento dos cromossomos, posição dos centrômeros e no número, comprimento e localização de constrições secundárias (Battistin et al., 1999). Este gênero apresenta cariótipos similares, porém existe variação simétrica no comprimento dos cromossomos nas diferentes espécies, sugerindo que quantidades iguais de DNA tem sido perdidas ou adquiridas por

todos os cromossomos. Os estudos sugerem que a evolução das espécies de *Lathyrus* estudadas foi acompanhada por um decréscimo no comprimento dos cromossomos. (Klant; Schifino-Wittmann, 2000).

Características cariomorfológicas de algumas espécies do gênero *Serapias* têm sido reveladas através da metodologia de Feulgen. Os estudos revelaram cromossomos com morfologia complexa e kariótipos moderadamente assimétricos com uma predominância de cromossomos submetacêntricos (D'emerico et al., 2000).

Em *Manihot*, todas as espécies analisadas citologicamente até o presente momento apresentam  $2n = 36$ , com cromossomos pequenos e muitos similares. Um número variado de técnicas citogenéticas tem sido utilizadas para detectar alterações estruturais e numéricas, reconstruir a história evolutiva do grupo ou para fornecer informações para a construção de mapas genéticos (Carvalho; Guerra, 2002). Em gêneros com cromossomos pequenos e número estável, como *Citrus* e *Phaseolus*, tem sido possível identificar diferenças citogenéticas entre as espécies. (Jennings, 1963; Magoon et al., 1969; Umanah; Hartmann, 1973; Carvalho; Guerra, 2002).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4. 1. Material

Em uma etapa inicial foram realizados levantamentos bibliográficos dos locais que pudessem indicar a ocorrência de espécies do gênero *Dalbergia* no Estado da Bahia. Para tanto, foram realizadas visitas ao Herbário do Centro de Pesquisas do Cacau, localizado na Sede da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPEC/CEPLAC), Ilhéus, BA, buscando-se a identificação dos locais de ocorrência dos materiais citados (tabela 1).

Foram coletadas sementes de três espécies do gênero *Dalbergia* L. f., de ocorrência na Bahia, dentre as quais *D. nigra*, *D. miscolobium* e *D. ecastaphyllum*.

As coletas foram realizadas em sete municípios do Estado da Bahia, entre eles: de Caetité, Piatã, Seabra, Lençóis, Morro do Chapéu, Jacobina e Ilhéus. Nos quatro primeiros municípios citados, foram coletados material botânico de *D. miscolobium*, em Morro do Chapéu e Jacobina foram coletados material de *D. nigra*, e em Ilhéus de *D. nigra* e *D. ecastaphyllum*.

Amostras de sementes foram coletas e dispostas em sacos plásticos, devidamente etiquetados com nome da espécie e localização. Foram também coletadas amostras de folhas e flores, quando possível, para posterior identificação taxonômica e sistemática dos materiais.

A identificação taxonômica e sistemática dos materiais foi realizada pelo Prof. Luiz Alberto Mattos Silva, mestre em Botânica e Curador do Herbário da UESC, Ilhéus, BA.

Na tabela 2 são apresentados os materiais utilizados no presente estudo, considerando nome científico e comum, procedência e principais características. A figura 1 ilustra a localização das coletas em municípios do Estado da Bahia.

Tabela 1. Identificação dos locais de ocorrência de espécies de *Dalbergia*, segundo levantamento no Herbário do CEPEC/CEPLAC, Ilhéus, BA.

Espécie	Determinador e/ou coletor	Data	Localização	Observações
<i>D. nigra</i>	Pinheiro	22/07/1971	Bahia, Rodovia Lagoa Encantada. Plantação de Capim.	Árvore de 10 m de altura. 35 cm de diâmetro. Fruto verde.
	André M. de Carvalho	02/04/1986	Bahia, Município de Gandú. Cerca de 10 Km a Sul de gandú, pela rodovia BR 101.	Vegetação de Mata Higrófila Sul Baiana. Árvore com 9 m de altura e 20 cm de diâmetro. Tronco ramificado por rebrotação. Frutos imaturos verdes.
	L. P. de Queiroz	13/12/1992	Bahia, Município de Cachoeira. Fazenda Favela. Mata estacional. 12° 32' S/ 39° 00' W.	Árvore de 5 m de altura, com folíolos cartáceos. Arbustos imaturos verdes.
<i>D. miscolobium</i>	L. P. de Queiroz	1993	Bahia, Município de Seabra. Cerca de 8 Km ao norte de Seabra, na estrada para Lagoa da Boa Vista. Cerca de 12° 20' 58" S/ 41° 45' 54" W. Alt.: 960 m.s.m. Cerrado	Árvore de 4 m de altura, pouco ramificado, com tronco suberoso, sulcado. Folíolos amarronzados.
	L. P. de Queiroz	18/05/1989	Bahia, Município de Lençóis. Estrada que liga Lençóis à BR 242, numa extensão de 12 Km. Coletas ao longo da estrada. Vegetação de Mata de Cipó.	Árvore de 6 m de altura, com 20 cm de diâmetro. Frutos imaturos, cor verde.
	André M. de Carvalho	05/04/1986	Bahia, Município de Palmeiras. 8 Km a oeste do Pai Inácio, pela BR 242, em direção a Seabra. Cerrado.	Nomes vulgares: Jacarandá do Cerrado, jacarandazinho do campo. Árvore com 6 m de altura. Tronco tortuoso e casca suberosa. Folhas glaucas, frutos imaturos verdes.
	André M. de Carvalho	11/06/1992	Bahia, Município de Barreiras. Estrada para o aeroporto de Barreiras. Coletas entre 5 a 15 Km a partir do centro do município. Cerrado.	Arbusto com 3 m de altura. Folhas levemente discoloradas, acizentadas. Pétalas enegrecidas.
	Queiroz	1993	Bahia, Município de Seabra. Cerca de 2 Km a sudoeste de lagoa da Boa Vista, na encosta da Serra do Bebedor. 12° 17' 03" S/ 41° 48' 57" W. Cerrado.	Árvore com cerca de 4 m com tronco tortuoso, suberoso, fissurado. Folíolos coriáceos. Frutos amarronzados.
	V. C. Souza	08/03/1994	Bahia, Município de Caetitê. 12 a 20 Km da cidade em direção a Brejinho das Ametistas. 1100 a 1200 m.s.m. Entre 14° 06' 10" S/ 42° 30' 31" W e 14° 11' 19" S/ 42° 29' 48" W.	Arbusto com cerca de 1,7 m de altura, cálice verde claro, estandarte.
	Lázara Cordeiro	24/07/1985	São Paulo, Instituto Florestal de Mogi Guaçu – Fazenda Campininha.	Árvores, frutos maduros.
	André M. de Carvalho	05/12/1998	Bahia, Chapada Diamantina, Mucugê, Caminho para Guiné, BR 242, Km 54. 100 m. Área de transição.	Árvore. Folhas com folíolos membranáceos. Frutos imaturos verdes.

Continua ...

Tabela 1. Continuação . . .

<i>D. cearensis</i>	J. C. A. Lima	24/03/1984	Bahia, Município de Caetité. Lat. 14° 05' S/ Long. 42° 13' W.	Árvore com 2,5 m de altura (fanerófitica), fruto pequeno com cápsulas aladas, verdes. Altitude: 560 m; vegetação estepe arbórea (caatinga).
	S. B. da Silva	14/03/1981	Bahia, Tanque Novo. 13° 44' S/ 42° 24' W.	Árvore de pequeno porte, em torno de 5 m de altura. Vegetação contato Savana/ Floresta Estacional.
		23/03/1984	Bahia, Município de Brotas de Macaúbas. Entre Nova Feira e Ouricuri do Ouro. 12° 05' S/ 42° 29' W.	Árvoreta com cerca de 4 a 5 m de altura (fanerófitica). Fuste retilíneo com 9 cm de diâmetro à altura do peito. Frutos monospermiados alados, imaturos, de cor verde; maduros, de cor castanha. Muito freqüente. Altitude de 610 m. Relevo de rampas colúvicas, vegetação de estepe arbórea (caatinga).
<i>D. decipularis</i>	André M. de Carvalho	03/04/1986	Bahia, Município de Jacobina. Cerca de 20 Km na estrada Jacobina/ Capim Grosso. Fazenda Pau d'alho.	Mata de Cipó. Árvore com 10 m de altura, muito freqüente na mata local. Folíolos levemente discolores. Frutos verdes amarelados. Nome vulgar: Sebastião de arruda. Madeira de lei comercializada na região.
<i>D. ecastaphyllum</i>	Queiroz, E. P.	07/2000	Bahia, Litoral norte, Esplanada, Baixio. Margeando o rio na Barra do Una. 11° 47' S/ 37° 56' W.	Arbusto unifoliolado glabro, membranáceo. Flores pequenas, aladas, perfumadas.
		01/06/1966	Bahia, Margem da rodovia Una/ Olivença. Mata Costeira.	Arbusto prostrado de 3 m, beira do mar. Frutos verdes.
	Graziela/ Pinheiro	11/05/1966	Bahia, Município de Itacaré. Beira mar. Zona calcárea.	Arbusto de 1 a 2 m; frutos verdes.
	Velva e Rudd/ T. S. Santos	21/08/1979	Bahia, Município de Ilhéus. Km 3 a 4 da rodovia Pontal/ Buerarema. Mangue.	Arbusto de 3 m de altura, beira mar. Frutos verdes.
	André M. de Carvalho	03/12/1981	Bahia, Município de Una, 10 Km a sudeste de Una, praia a sudeste de Comandatuba. 15° 21' S/ 39° 00' W.	Arbusto semi-prostrado, 1 m de altura. Flores brancas e frutos imaturos verde pálido.
	André M. de Carvalho	05/09/1989	Bahia, Município de Caravelas. Cerca de 2 Km a nordeste da cidade, na estrada para Ponta de Areia. Manguezal.	Arbusto escandente, crescendo na beira do manguezal. Flores com cálice creme, corola alva. Frutos imaturos verdes.
	André M. de Carvalho	09/10/1989	Bahia, Município de Ilhéus. Cerca de 8 Km na estrada Ilhéus/ Olivença. Vegetação de Praia.	Planta subarborescente escandente. Folhas levemente discolores. Flores com corola alva.

Tabela 2. Espécies do gênero *Dalbergia* analisadas, seções, nome científico e comum, acessos, procedências e principais características morfológicas.

Nome Científico	Nome Comum	Acessos	Procedência	Inflorescência	Posição da Inflorescência	Cor da Corola	Nº de sementes	Tamanho do fruto (cm)	
Seção <i>Dalbergia</i>	<i>D. miscolobium</i>	Jacarandá-do-Cerrado	DM01	Caetité	Panícula	Terminal/ Axilar	Púrpura escuro	1 - 2	5,8 x 1,5
			DM02	Estrada Piatã/ Seabra – BA					
			DM03	Seabra – BA					
			DM04	Estrada Seabra/ Lençóis – BA					
			DM05	Estrada Seabra – Lençóis – BA					
	<i>D. nigra</i>	Jacarandá-da-Bahia	DN01	CEPLAC, Ilhéus - BA	Panícula	Axilar	Amarelo Pálido	1 - 2	6,5 x 1,5
			DN02	CEPLAC, Ilhéus – BA					
			DN03	Morro do Chapéu – BA					
			DN04	Jacobina – BA					
Seção <i>Ecastaphyllum</i>	<i>D. ecastaphyllum</i>	Marmeleiro da Praia, Bugi	DE01	Acuípe, Ilhéus – BA	Panícula Fasciculada	Axilar	Branca	1	3 x 2
			DE02	Acuípe, Ilhéus – BA					



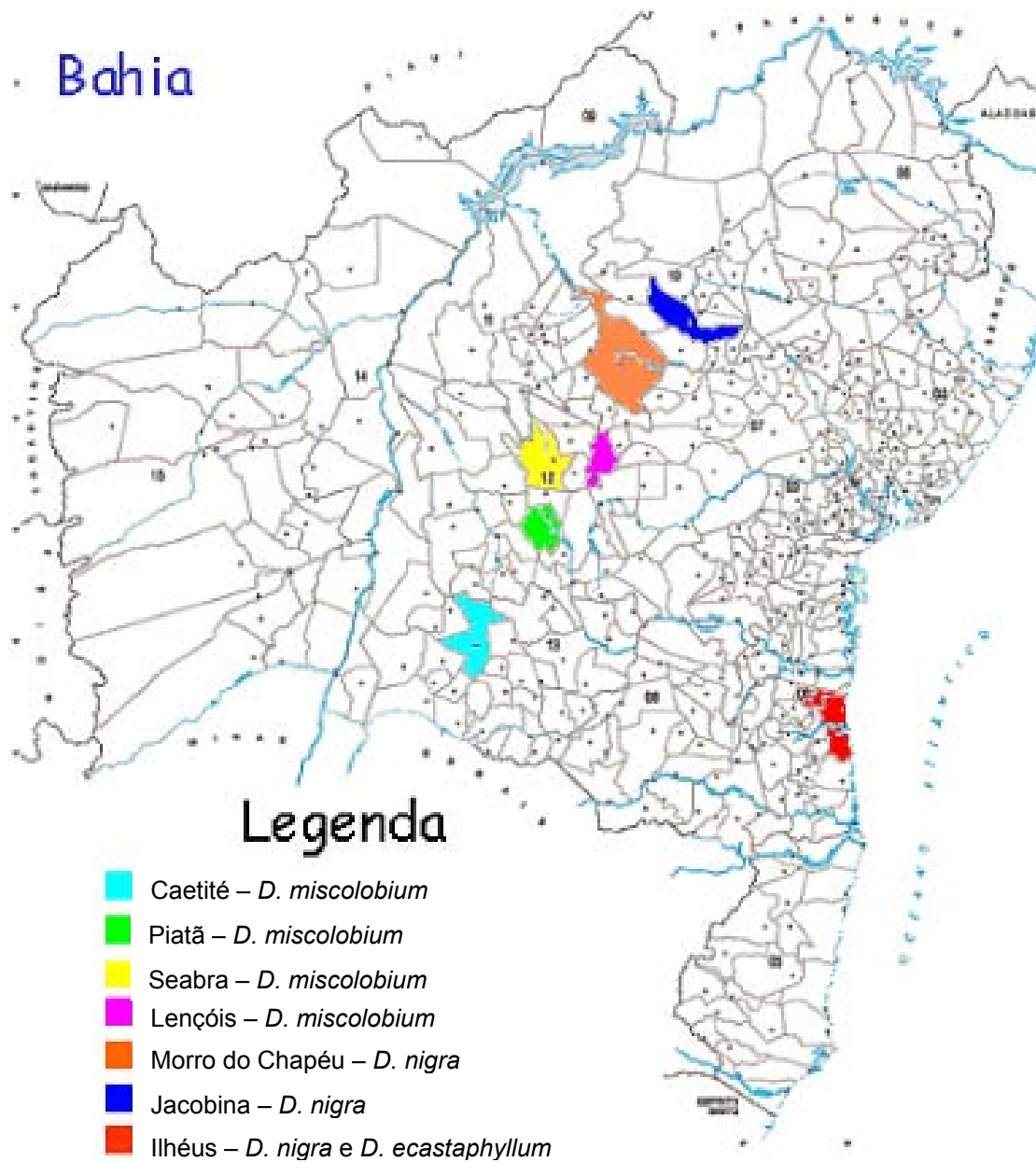


Figura 1. Esboço do mapa da Bahia, ilustrando a procedência das sementes das três espécies investigadas.

## **4.2. Métodos**

### **4. 2. 1. Pré-tratamento e germinação de sementes**

As sementes foram retiradas das vagens, lavadas e colocadas para germinação em placas de Petri, com papel filtro umedecido com água destilada, à temperatura ambiente, no escuro, em baixas condições de umidade.

### **4. 2. 2. Coleta, pré-tratamentos e fixação das raízes**

As raízes foram coletadas ao atingirem aproximadamente 2 cm de comprimento, e submetidas a tratamentos com 8-hidroxiquinolina e Cicloheximida, agentes mitogênicos que bloqueiam a divisão celular. Foi aplicada a 8-hidroxiquinolina na concentração de 0,03 %, conforme identificado anteriormente como eficiente na obtenção de células em metáfase de jacarandá-da-Bahia (Silva; Bertão, 2001), e 8-hidroxiquinolina na concentração de 0,03 % combinado com cicloheximida 12,5 ppm. Este último tratamento foi utilizado para obtenção de um maior número de células em metáfase, uma vez que os dois inibem a produção de proteínas ligadas à formação do fuso mitótico. Esses dois tratamentos foram aplicados durante um período de duas horas e trinta minutos. Ainda foram feitas coletas diretamente no fixador (tratamento controle).

Após os tratamentos com agentes mitogênicos, as raízes foram fixadas em solução Carnoy (3 partes de álcool etílico e 1 parte de ácido acético P.A.), durante um período mínimo de 12 horas, transferidas para etanol a 70 %, e armazenadas a 5 °C, até o momento de aplicação das técnicas de coloração.

### **4. 2. 3. Método de Feulgen**

Utilizado para a visualização das preparações citológicas, o método de Feulgen foi conduzido como descrito anteriormente (Bertão, 1998), com modificações. As raízes previamente tratadas com agentes mitogênicos para acumulação de metáfases foram

retiradas da geladeira, lavadas em água destilada por 5 minutos, submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N, a 60 °C por 8 minutos, lavadas em água destilada por 5 minutos e incubadas em Reativo de Schiff, durante 45 minutos, no escuro.

Após lavagem em água corrente, por 5 minutos, as raízes foram transferidas para ácido acético a 45 % por 1 a 5 minutos, a região meristemática excisada e então submetida à maceração e ao esmagamento em solução de orceína acética a 2 %. As lamínulas foram removidas em ácido acético a 45% ou pelo método seco com nitrogênio líquido e, após secagem ao ar, as lâminas foram montadas em Bálsamo do Canadá.

#### **4. 2. 4. Bandamento-C**

Numa primeira etapa, a metodologia de bandamento-C utilizada seguiu o procedimento descrito por Aguiar-Perecin (1985b), com modificações. As raízes armazenadas no fixador Carnoy foram retiradas da geladeira para atingir temperatura ambiente. Em seguida, elas foram transferidas para ácido acético 45 % por um período de 2 a 5 minutos, no intuito de promover certo amolecimento no tecido. Foi realizada a dissecação da ponta da raiz, que é a região onde está concentrado o tecido meristemático e então maceradas e esmagadas na mesma solução.

As preparações foram observadas ao microscópio de contraste de fase, para verificar a presença de metáfases com boa qualidade, contendo cromossomos nítidos e espalhados. As melhores preparações foram selecionadas para a aplicação da metodologia de bandamento-C. A separação de lâminas e lamínulas foi obtida através da remoção das lamínulas em ácido acético a 45 %, as preparações foram dispostas para secagem e em seguida armazenadas em etanol absoluto a 4 °C, por no mínimo 24 horas. Posteriormente, as preparações foram dispostas para secagem ao ar, e então submetidas a tratamento com solução saturada de hidróxido de bário a 37 °C, por um período de 20 minutos, com duas lavagens subseqüentes com água destilada. As preparações foram transferidas para solução salina 2 x SSC (cloreto de sódio 0,3 M + citrato de sódio 0,03 M), à temperatura ambiente, por 5 minutos e incubadas na mesma solução de 2 x SSC a 60 °C, por 1 hora. Após lavagem em água destilada, realizou-se a

desidratação do material em uma série mistura aquosa com etanol (70 %, 95 % e 100 %) e uma posterior secagem. Para visualização das bandas, as preparações foram coradas em solução de Giemsa a 2 % (pH 6,8), por 10 minutos, lavadas em água destilada, novamente dispostas para secagem e, por fim, montadas em Bálsamo do Canadá.

Por causa da grande dificuldade de obter boas preparações, que pudessem evidenciar bandas distintas e de boa qualidade, optou-se-se optar por uma nova metodologia de bandamento-C, que foi descrita por Fernandez et al. (2002). Esse novo protocolo utiliza a formamida como agente desnaturante, o que nos proporcionou a obtenção de preparações com melhor definição da morfologia cromossômica e nitidez de bandas, livre das precipitações causadas pela ação do hidróxido de bário. As preparações foram obtidas pelo método de maceração e esmagamento descrito acima.

Para o Bandamento-C, colocou-se 20  $\mu$ L de formamida a 50 % (solução aquosa) sobre a lâmina e cobriu-se com lamínula. Num primeiro momento as preparações foram incubadas em formamida por 2 minutos, à temperatura de 70 °C e, em seguida, mantidas na mesma solução por um período de 60 minutos a 37 °C. As preparações foram lavadas em solução salina 2 X SSC (cloreto de sódio 0,3 M + citrato de sódio 0,03 M) por 60 minutos à temperatura ambiente. Por fim, as preparações foram coradas em solução de Giemsa a 5 % (pH 6,8), por 20 minutos, lavadas em água destilada, dispostas para secagem ao ar e então montadas em resina Neo-Mount.

#### **4. 2. 5. Coloração com nitrato de prata**

A técnica de Howell & Black (1980) foi utilizada na tentativa de se estabelecer a localização de sítios de rDNA nos cromossomos metafásicos das espécies em análise. Raízes pré-tratadas e mantidas em solução Carnoy foram esmagadas em ácido acético a 45 % e a qualidade das preparações citológicas monitorada em microscópio de contraste de fase. Lâminas e lamínulas foram separadas em ácido acético a 45 % e dispostas para secar à temperatura ambiente. Para coloração, foram adicionadas às preparações 2 gotas de solução de gelatina a 2 % e 4 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50%. As preparações foram então incubadas em câmara úmida a 70

°C, e o tempo de coloração monitorado através de observações ao microscópio óptico. Após separação de lâminas e lamínulas com água destilada, seguida de secagem ao ar, as preparações citológicas foram montadas em Bálsamo do Canadá.

Ainda foi aplicada uma nova e rápida metodologia de coloração com nitrato de prata para a visualização das RONS em cromossomos metafásicos. Os procedimentos seguiram a técnica descrita por Kavalco & Pazza (2004). Foram colocados 2 gotas de solução aquosa de gelatina a 1 % com 0,25 % de ácido fórmico e 4 gotas de nitrato de prata a 25 % sobre a lâmina e cobertos com lamínula. As preparações foram incubadas por 5 segundos em microondas de alta potência. Em seguida as lamínulas foram removidas e procedeu-se a lavagem das preparações em água destilada. Com o objetivo de visualizar melhor os cromossomos, as preparações foram contracoradas com solução de Giemsa a 5 %, por 30 segundos. Após lavagem, as preparações foram dispostas para secagem ao ar e posterior montagem em Neo-Mount.

Para a análise de nucléolos em núcleos interfásicos, o procedimento adotado foi aquele descrito por Fernandez-Gomes et al. (1969). As raízes foram fixadas diretamente em solução contendo 1 parte de formol a 10 % e 1 parte de hidroquinona a 1 % por 2 horas, à temperatura ambiente, seguindo-se de lavagem em água destilada, por 3 vezes. Após transferência para solução aquosa de nitrato de prata a 2 %, as preparações foram incubadas no escuro, a 37 °C, por 15 horas. Foram realizadas novas lavagens em água destilada, e as raízes foram novamente submetidas à mistura fixadora por 2 horas, à temperatura ambiente. A maceração e o esmagamento das raízes foram feitos em ácido acético a 45 % para obtenção das preparações citológicas. Após visualização em microscópio óptico, as melhores preparações foram selecionadas, dispostas em ácido acético a 45 %, para remoção da lamínula, seguindo-se de secagem e montagem das mesmas em Bálsamo do Canadá.

#### **4. 2. 6. Obtenção das fotomicrografias**

Foi realizada a análise das preparações mitóticas coradas pelo método de Feulgen, visando a confirmação do número cromossômico das espécies e identificação de cromossomos individuais. Para a obtenção das medidas cromossômicas foram

utilizadas metáfases mitóticas intactas, que apresentaram cromossomos morfológicamente nítidos e adequadamente espalhados.

Um mínimo de sete e máximo de 10 células mitóticas, de cada espécie, foram selecionadas e fotomicrografadas em fotomicroscópio Olympus, com objetiva de imersão 100, utilizando-se o filme Kodak Technical Pan. Para a obtenção das ampliações fotográficas foi empregado papel KODABROME PRINT RC F3.

#### **4. 2. 7. Análise morfométrica dos cromossomos e elaboração dos cariótipos**

As micrografias foram ampliadas e utilizadas para a medição dos cromossomos das espécies. Desse modo, foi feita a identificação de cada par cromossômico e organização dos mesmos em ordem decrescente de tamanho.

As medidas cromossômicas foram realizadas com auxílio de compasso de ponta seca e papel milimetrado (limite de 0,5 mm) em ampliações fotográficas de 8.500 vezes, determinando-se os valores de comprimento cromossômico em milímetros (comprimento do braço maior e do braço menor). Com base nestes dados foram determinados os seguintes parâmetros: comprimento absoluto (CA, em micrômetros), comprimento relativo (CR, em %), relação de braços (RB) e comprimento do lote haplóide (CLH, em micrômetros).

Os valores de comprimento relativo e relação de braços foram estimados de acordo com a metodologia descrita por Aguiar-Perecin & Vosa (1985), conforme apresentado a seguir.

$$RB = \frac{\text{braço maior}}{\text{braço menor}}$$

A média de relação de braços dos dois elementos de cada par de homólogos foi determinada para cada célula analisada. O comprimento relativo foi estimado em termos de percentagem em relação ao comprimento total do lote haplóide, e, a média de cada par de homólogos foi estimada para cada célula analisada.

$$CR = \frac{\text{comprimento absoluto do par}}{\text{comprimento total do lote haplóide}} \times 100$$

A partir desses dados foram determinados os cariótipos das espécies analisadas, onde os cromossomos foram pareados conforme seus valores de comprimento absoluto e relações de braços, sendo então organizados em ordem decrescente de tamanho.

#### **4. 2. 8. Análise da variabilidade cariotípica**

A despeito das similaridades encontradas entre as espécies, procedeu-se a avaliação comparativa de parâmetros que pudessem indicar possíveis variações nos padrões cariotípicos. Para tanto, os dados morfométricos foram comparados estatisticamente segundo delineamento inteiramente casualizado, sendo os valores médios comparados através do Teste de Tukey, utilizando-se o Programa SAS-PGLM.

Os parâmetros estabelecidos foram: o comprimento absoluto dos cromossomos maior e menor, o comprimento do lote haplóide e a relação entre os cromossomos maior e menor.

A análise dos valores de comprimento absoluto dos pares maior e menor foi desenvolvida com o intuito de se verificar o grau de conservação entre esses cromossomos.

Para a avaliação comparativa dos comprimentos de lote haplóide foram considerados os valores de comprimento do lote haplóide de cada um dos materiais para verificar variações no complemento cromossômico e relacioná-las a prováveis variações no conteúdo de DNA.

A relação (R) entre os pares número um e número 10 foi utilizada para verificar a variabilidade da posição do centrômero nos diferentes cariótipos, com base na seguinte expressão:

$$R = \frac{\text{comprimento absoluto do cromossomo maior}}{\text{comprimento absoluto do cromossomo menor}}$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5. 1. Aspectos gerais dos cariótipos

A identificação de todos os pares cromossômicos e a elaboração de cariótipos das espécies foi realizada a partir dos dados de comprimento absoluto, relação de braços e comprimento relativo dos cromossomos (Tabela 3).

A observação de metáfases mitóticas evidenciou um número cromossômico básico  $2n = 20$  cromossomos para todas as espécies analisadas, corroborando com os dados reportados na literatura para o gênero *Dalbergia* (Bandel, 1972).

As Figuras de 2 a 4, correspondem às metáfases mitóticas, cariótipos e ideogramas, elaborados para cada material. A análise das mesmas revelou que, apesar da similaridade observada no aspecto geral dos complementos cromossômicos das espécies analisadas, existem diferenças significativas que permitem sua distinção.

A análise morfométrica, os ideogramas e os cariótipos representativos das espécies *D. miscolobium*, *D. nigra* e *D. ecastaphyllum* apresentam-se descritos pela primeira vez no presente trabalho, uma vez que nenhuma informação sobre a caracterização cromossômica destas espécies foi encontrada na literatura relacionada. Desta forma, os resultados aqui obtidos mostraram-se essencialmente importantes para caracterizar a posição desta espécie no gênero, suas relações de parentesco com outras espécies e sua participação no processo evolutivo.

A falta de informações sobre a caracterização cromossômica de espécies do gênero, não proporcionou uma avaliação comparativa desse padrão cariotípico com as outras espécies. Os resultados permitiram descrever os cariótipos das espécies de *Dalbergia* distintamente.



### **a) *Dalbergia miscolobium***

Para a análise morfométrica dos cromossomos desta espécie, foram avaliadas oito metáfases mitóticas, de dois diferentes acessos desta planta, que mostraram um cariótipo padrão ( $2n = 20$ ) consistindo de nove pares de cromossomos com centrômero mediano e submediano, dentre eles, cromossomo nº 1 (RB 1,15), cromossomo nº 2 (RB 1,22), cromossomo nº 3 (RB 1,16), cromossomo nº 5 (RB 1,13), cromossomo nº 6 (RB 1,51), cromossomo nº 7 (RB 1,37), cromossomo nº 8 (RB 1,27), cromossomo nº 9 (RB 1,37), cromossomo nº 10 (RB 1,30) e um par significativamente distinto, com centrômero submediano, o par cromossômico nº 4 (RB 2,38), conforme Tabela 3 e Figura 3a.

Observou-se a ocorrência de apenas um par satelitado para esta espécie. A análise de metáfases mitóticas neste material revelou o posicionamento do satélite no par cromossômico nº 4, segundo a classificação deste par quanto ao tamanho cromossômico absoluto e comprimento relativo. A porção de DNA correspondente ao satélite foi considerada grande, a despeito do observado na literatura para outras espécies de plantas (Bertão 1993, Ferreira, 1998, Carvalho & Guerra, 2002). Não foi possível determinar a distância entre a região terminal do braço curto e o satélite, não sendo possível se estabelecer um padrão entre as metáfases analisadas.

O comprimento absoluto dos cromossomos desta espécie variou de 4,13 a 2,16 micrômetros para os pares cromossômicos maior e menor, enquanto o comprimento relativo ficou entre 13,76 e 7,13 % (Tabela 3). Não foram observadas variações entre os exemplares avaliados.

### **b) *Dalbergia nigra***

O cariótipo desta espécie ( $2n = 20$ ) apresentou 10 pares de cromossomos com centrômero mediano e submediano, dentre eles, cromossomos nº 1 (RB 1,17), cromossomo nº 2 (RB 1,25), cromossomo nº 3 (RB 1,23), cromossomo nº 4 (RB 1,22), cromossomo nº 5 (RB 1,38), cromossomo nº 6 (RB 1,36), cromossomo nº 7 (RB 1,20),

cromossomo nº 8 (RB 1,1,28), cromossomo nº 9 (RB 1,30), cromossomo nº 10 (RB 1,30), conforme Tabela 3 e Figura 3b.

Para esta espécie, foram avaliadas 10 metáfases de três acessos distintos. Observou-se variação com relação ao número de satélites, onde na maioria das células só foi evidenciado um par cromossômico satelitado e em apenas duas metáfases foi detectada a presença de dois pares cromossômicos satelitados. As análises revelaram o posicionamento do satélite no par cromossômico nº 5 e naquelas metáfases em que ocorreram a presença de dois satélites, este segundo estaria posicionado no par cromossômico nº 1. A distância entre a região terminal do braço curto e o satélite não foi determinada, não sendo possível estabelecer se houve um padrão entre as metáfases analisadas (Figura 2b e 3b).

O tamanho absoluto dos cromossomos desta espécie variou entre 3,10 e 1,75 micrômetros para os pares cromossômicos maior e menor, respectivamente. O comprimento relativo variou de 12,88 a 7,28 % (Tabela 3).

### **c) *Dalbergia ecastaphyllum***

Os dois acessos desta espécie apresentaram cariótipos similares, consistindo de nove pares de cromossomos com centrômero mediano e submediano, dentre eles, cromossomo nº 1 (RB 1,22), cromossomo nº 2 (RB 1,49), cromossomo nº 3 (RB 1,37), cromossomo nº 4 (RB 1,29), cromossomo nº 5 (RB 1,43), cromossomo nº 7 (RB 1,25), cromossomo nº 8 (RB 1,52), cromossomo nº 9 (RB 1,33), cromossomo nº 10 (RB 1,18) e um par satelitado acrocêntrico, caracteristicamente distinto.

Nesta espécie o satélite está posicionado no par cromossômico nº 6, não sendo observada a presença de constrição primária (Figuras 2c e 3c). Não houve variação no tamanho do satélite, sendo este considerado grande.

O tamanho absoluto dos cromossomos variou de 3,64 a 2,13 micrômetros para o maior e o menor par, enquanto o comprimento relativo foi entre 13,51 e 7,89 % (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de comprimento absoluto (CA. - micrômetros), relação de braços (RB), comprimento relativo (CR - %) e comprimento do lote haplóide (CLH - micrômetros) das espécies de *Dalbergia* analisadas

ESPÉCIES	CROMOSSOMOS																						
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		CLH		
	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	$\mu\text{m} \pm \text{s}$	
<i>D. miscolobium</i>	CA	4,13	0,64	3,84	0,62	3,30	0,55	3,20	0,63	3,01	0,52	2,89	0,50	2,72	0,46	2,52	0,47	2,36	0,49	2,16	0,47	30,11	5,04
	RB	1,15	0,07	1,22	0,10	1,16	0,12	2,38	0,81	1,13	0,14	1,51	0,28	1,37	0,29	1,27	0,15	1,37	0,19	1,34	0,34		
	CR	13,76	1,05	12,77	0,65	10,99	0,65	10,59	0,62	9,98	0,46	9,59	0,39	9,04	0,43	8,34	0,40	7,81	0,74	7,13	0,54		
<i>D. nigra</i>	CA	3,10	0,34	2,91	0,31	2,69	0,25	2,47	0,28	2,44	0,22	2,36	0,28	2,28	0,22	2,12	0,20	1,97	0,18	1,75	0,12	24,08	1,98
	RB	1,17	0,19	1,25	0,14	1,23	0,10	1,22	0,11	1,38	0,27	1,36	0,20	1,20	0,19	1,28	0,19	1,30	0,19	1,30	0,17		
	CR	12,88	0,93	12,07	0,87	11,16	0,26	10,24	0,53	10,16	0,74	9,79	0,44	9,45	0,40	8,80	0,28	8,17	0,50	7,28	0,61		
<i>D. ecastaphyllum</i>	CA	3,64	0,47	3,45	0,62	3,00	0,48	2,74	0,39	2,69	0,41	2,52	0,37	2,52	0,33	2,51	0,38	2,27	0,41	2,13	0,44	27,11	4,29
	RB	1,22	0,17	1,49	0,23	1,37	0,17	1,29	0,27	1,43	0,21	-		1,25	0,16	1,52	0,34	1,33	0,10	1,18	0,44		
	CR	13,51	0,85	12,69	0,64	11,07	0,83	10,15	0,64	9,96	0,77	9,13	0,46	9,28	0,37	9,33	0,61	8,36	0,52	7,89	0,56		

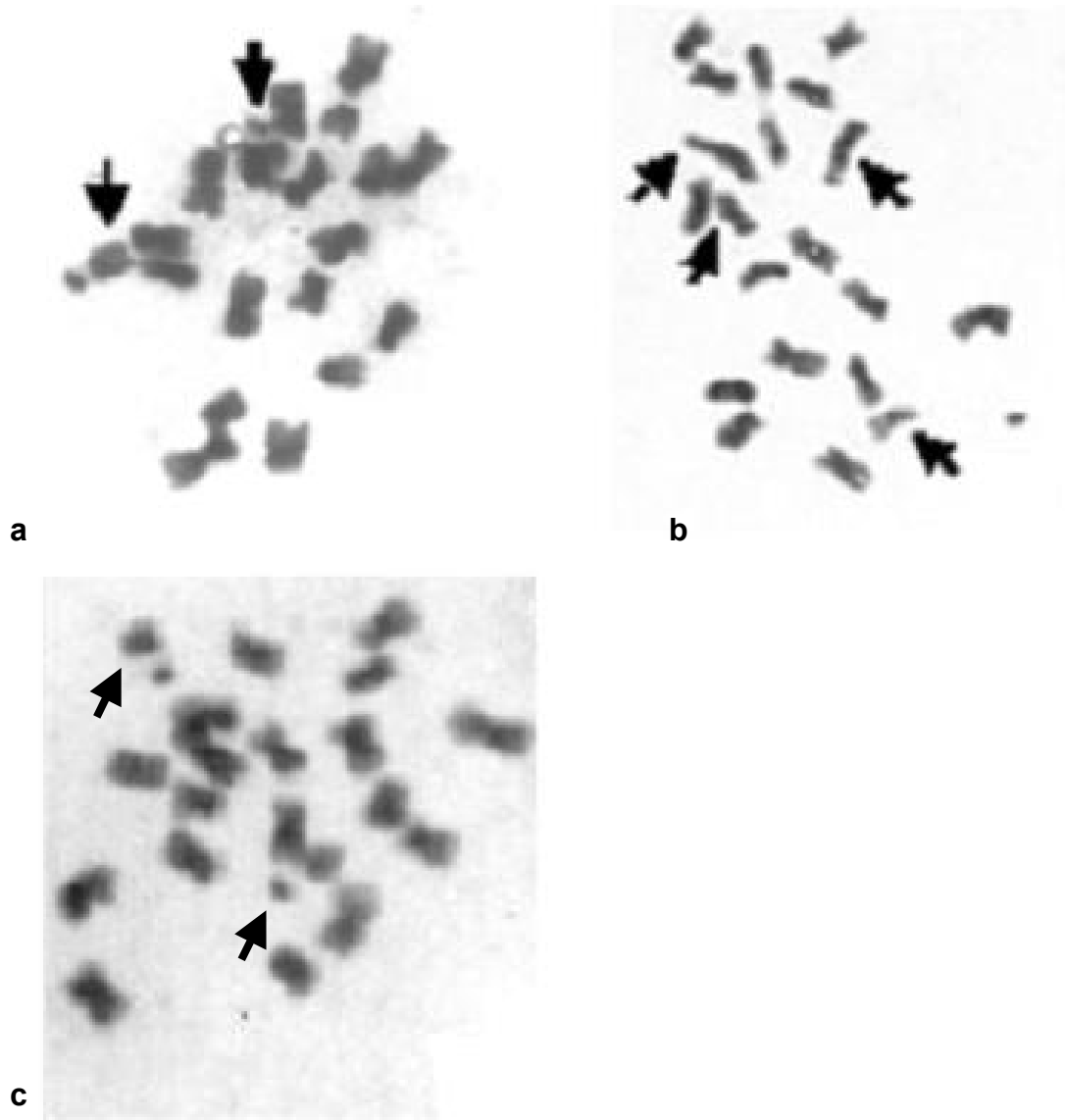


Figura 2: Aspecto geral dos cromossomos metafásicos a partir de preparações mitóticas: a) *D. miscolobium* ( $2n = 20$ ); b) *D. nigra* ( $2n = 20$ ); e, c) *D. ecastaphyllum* ( $2n = 20$ ). Setas indicam cromossomos satelitados.

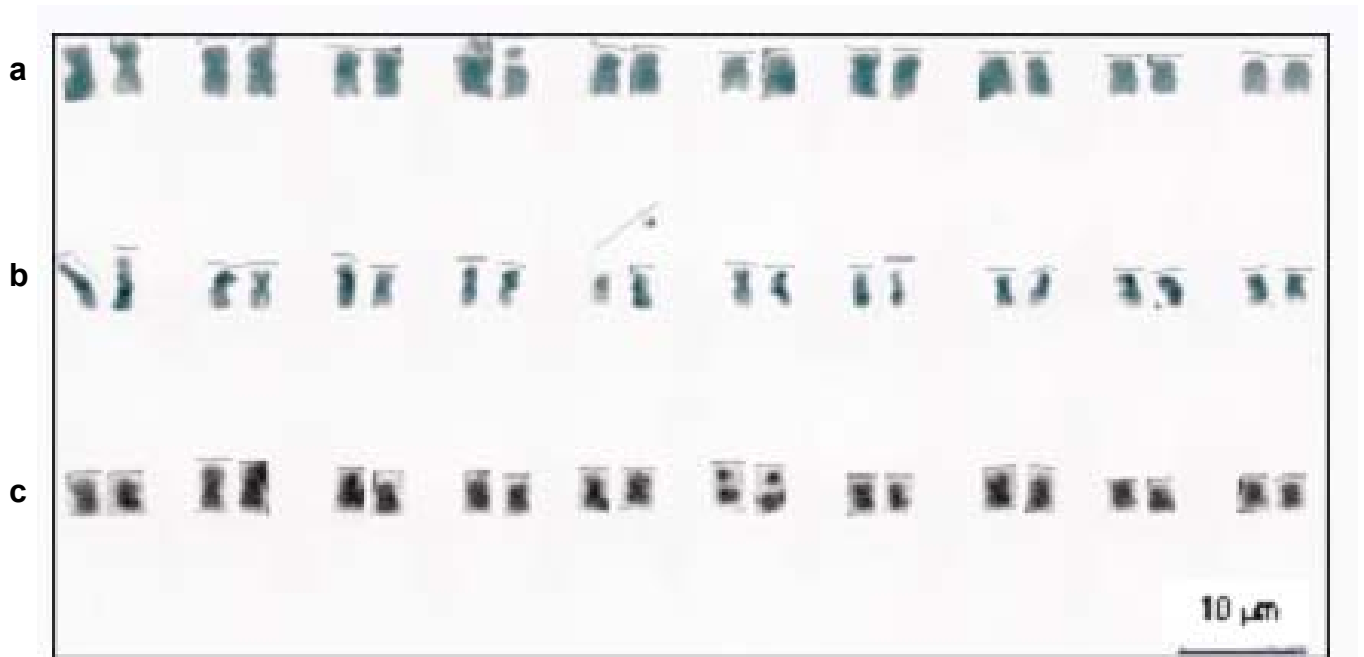


Figura 3: Cariótipos comparativos das três espécies, a) *D. miscolobium* ( $2n = 20$ ), b) *D. nigra* ( $2n = 20$ ) e c) *D. ecastaphyllum* ( $2n = 20$ ).

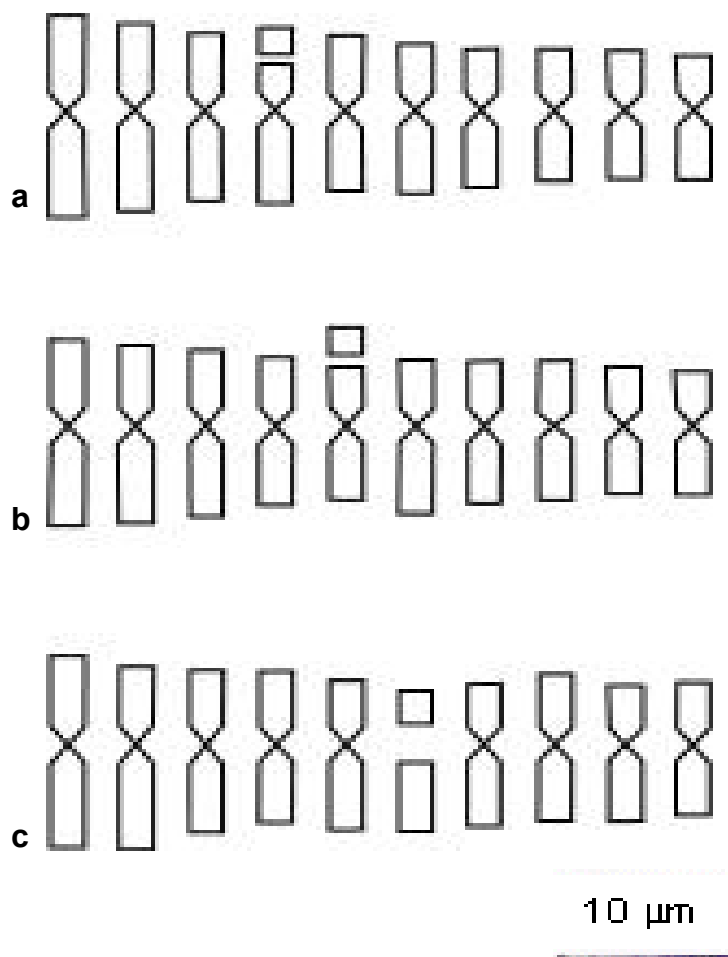


Figura 4. Ideogramas das espécies: a) *D. miscolobium*; b) *D. nigra*; e, c) *D. ecastaphyllum*.

## 5. 2. Variabilidade cariotípica intra e interespecífica

Com base na morfologia cromossômica, analisada através dos parâmetros comprimento absoluto, comprimento relativo e relação de braços, foi possível identificar e caracterizar os cromossomos das três espécies de *Dalbergia* avaliadas neste trabalho.

A avaliação comparativa entre os cariótipos destes materiais permitiu constatar a ocorrência de um padrão cariotípico dentro de cada espécie. Não foram observadas maiores variações intraespecíficas. Para a espécie *D. nigra*, as análises foram procedidas em 10 metáfases de três acessos desta espécie. Foram evidenciados dois pares de cromossomos satelitados, sendo estes o par cromossômico nº 1 e o par cromossômico nº 5, no entanto, esta observação só foi possível em duas das 10 metáfases avaliadas, sendo estas células de um único exemplar; nas outras só ocorreu satélite no cromossomo cinco. Esse fato leva a sugerir que existe variação intraespecífica para esta espécie no que diz respeito a número de satélites, porém torna-se necessária uma investigação mais detalhada, com um número maior de células metafásicas e de acessos deste material.

Para *D. miscolobium* e *D. ecastaphyllum* não foram observadas variações intraespecíficas, e todas as células analisadas revelaram o mesmo padrão cromossômico.

Apesar das similaridades observadas, ocorreram diferenças significativas entre as espécies quanto a: tamanho absoluto; posição do centrômero; número, tamanho e, principalmente, pela variação na posição do satélite (Figuras 3 e 4).

O comprimento do lote haplóide mostrou-se razoavelmente variável, revelando a espécie *D. miscolobium* como a de maior complemento cromossômico, seguida por *D. ecastaphyllum* e a *D. nigra*. *D. miscolobium* diferiu significativamente de *D. nigra* com relação ao comprimento do lote haplóide, já *D. ecastaphyllum* possui comprimento do lote haplóide, com valor intermediário entre as duas primeiras (Tabela 3).

Os cariótipos mais divergentes evidenciados entre as espécies de *Dalbergia* analisadas no presente estudo, no que diz respeito ao comprimento dos cromossomos, foram os correspondentes às espécies *D. miscolobium* e *D. nigra*. O comprimento

cromossômico absoluto dos pares n° 1, 2 e 3 divergiu significativamente entre as espécies *D. miscolobium* e *D. nigra*. *D. ecastaphyllum* apresentou cromossomos com valores intermediários entre essas duas, com relação aos três primeiros pares cromossômicos (Tabela 3).

Os dados de comprimento absoluto para os pares cromossômicos n° 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 não revelaram diferenças significativas entre as espécies.

Com relação ao parâmetro relação de braços houve correspondência entre os pares cromossômicos das diferentes espécies, sendo o par cromossômico n° 1 bem característico, com centrômero mediano (RB ~ 1,14 – 1,22) e os pares cromossômicos n° 2, 7, 8 e 9 com centrômero submediano (RB ~ 1,20 – 1,52).

O par cromossômico n° 3 apresenta variabilidade entre as espécies no que diz respeito a relação de braços. As espécies *D. ecastaphyllum* e *D. nigra* apresentam relações de braço 1,36 e 1,23 respectivamente para este par cromossômico, estando o centrômero posicionado submedianamente. *D. miscolobium* difere das duas primeiras espécies citadas quanto ao par cromossômico n° 3, onde o centrômero ocupa uma posição mediana (RB 1,16).

O cromossômico n° 4 também mostrou divergência entre as espécies *D. ecastaphyllum* (RB – 1,29) e *D. nigra* (RB – 1,22) em comparação com a relação de braço de *D. miscolobium* (RB – 2,38). Apesar das três espécies apresentarem pares cromossômicos com centrômeros na região submediana, existe uma diferença significativa nos valores de relação de braço das duas primeiras em relação a *D. miscolobium*. Nesta última, o par cromossômico n° 4 também se mostra diferente das outras pela ocorrência do satélite.

*D. miscolobium* difere de *D. ecastaphyllum* e *D. nigra* com relação ao posicionamento do centrômero para o par cromossômico n° 5. *D. miscolobium* apresentou um centrômero mediano (RB – 1,13), enquanto *D. ecastaphyllum* (RB – 1,42) e *D. nigra* (RB – 1,38) apresentaram centrômeros submedianos. É no par cromossômico n° 5 que está ligado o satélite de *D. nigra*, porém a mesma não diferiu significativamente de *D. ecastaphyllum* com relação ao posicionamento do centrômero.

O par cromossômico n° 6 apresentou-se com centrômero submediano nas espécies *D. miscolobium* (RB – 1,51) e *D. nigra* (RB – 1,36), com exceção da espécie



*D. ecastaphyllum*, onde este par além de ser acrocêntrico é também o portador do satélite.

No par cromossômico n° 10, diferenças foram observadas entre as espécies *D. miscolobium* (RB – 1,34) e *D. nigra* (RB – 1,30) que evidenciaram centrômero submediano, em comparação com *D. ecastaphyllum* (RB – 1,18), onde o centrômero ocupou uma posição mediana.

As espécies mostraram-se divergentes com relação à posição do satélite. Para *D. miscolobium* o satélite pode ser observado no par cromossômico n° 4 (Figuras 3 e 4), enquanto que para *D. nigra* no par cromossômico n° 5 e *D. ecastaphyllum* no par cromossômico n° 6. Porém entre as espécies *D. nigra* e *D. ecastaphyllum* não ocorreu variabilidade significativa com relação ao comprimento cromossômico dos mesmos. Já a espécie *D. miscolobium* apresentou o cromossomo satelitado com tamanho absoluto relativamente maior (Tabela 3).

### **5. 3. Avaliação da variabilidade dos cariótipos**

Para avaliar os níveis de variabilidade e simetria entre os cariótipos dos materiais foram avaliados o tamanho dos complementos cromossômicos (Tabelas 3 e 4), os comprimentos absolutos dos pares cromossômicos maior (Tabela 5) e menor (Tabela 6) e os valores dados pela relação cromossomos maior/cromossomos menor (R).

A avaliação dos resultados da análise de variância e do teste de Tukey para o comprimento do lote haplóide (Tabela 4) sugeriu divergências entre as espécies, com relação ao conteúdo do DNA nuclear. As variações dentro de um gênero podem ocorrer através de eventos como deleções ou adições de seqüências de DNA.

*D. miscolobium* apresentou os maiores valores de comprimento do lote haplóide, sendo considerado distinto de *D. nigra*, que apresentou os menores valores de complemento cromossômico. *D. ecastaphyllum* apresentou valores intermediários, não sendo significativamente distintos de *D. miscolobium*, nem de *D. ecastaphyllum* (Tabela 4). Apesar das diferenças de comprimento absoluto, o comprimento relativo não evidenciou diferenças significativas entre as espécies. Essa uniformidade no comprimento relativo pode refletir alterações proporcionais ao tamanho de cada cromossomo.

Para a análise de comprimento absoluto do par cromossômico maior (Tabela 5), o teste de Tukey evidenciou diferenças entre as espécies. *D. miscolobium* apresentou o maior valor para este parâmetro, ficando mais distante de *D. nigra*, que revelou o menor valor para o cromossomo um. Porém todas as espécies mostraram ser correspondentes com base na análise de relação de braço, onde os cromossomos apresentaram centrômeros na região mediana.

Os resultados do teste de Tukey para o par cromossômico menor revelaram uma correspondência maior, apesar de *D. miscolobium* continuar apresentando valores mais elevados, seguida de *D. ecastaphyllum* e *D. nigra*, respectivamente. Ainda foi feita a avaliação da relação entre os pares cromossômicos maior e menor. Constatou-se que não houve grande variação entre as espécies. *D. miscolobium* apresentou a maior relação entre os pares cromossômicos maior e menor (1,94), mantendo a tendência com relação aos maiores valores de comprimento cromossômico. Porém observou-se que *D. nigra* apresentou relação entre os pares cromossômicos maior e menor (1,78) maior que *D. ecastaphyllum* (1,74). Esta observação, apesar de não ser estatisticamente significativa pode refletir um cariótipo mais simétrico quanto ao tamanho dos pares cromossômicos para *D. ecastaphyllum*.

Tabela 4. Análise de variância para os valores de comprimento de lote haplóide e resultados do teste de TuKey para as espécies de *Dalbergia* analisadas

FV	GL	QM	F
TRATAMENTOS	11	21,5911106	1,13
RESÍDUOS	13	19,0866960	
Xm = 26,85880 ± 4,368832			
CV = 16,26593 %			
ESPÉCIES	MÉDIAS	5%	
<i>D. miscolobium</i>	30,108	a	
<i>D. ecastaphyllum</i>	27,110	ab	
<i>D. nigra</i>	24,084	b	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

Tabela 5. Análise de variância para os valores de comprimento absoluto do par cromossômico maior, nº 1, e resultados do teste de TuKey para as espécies de *Dalbergia* analisadas

FV	GL	QM	F
TRATAMENTOS	11	0,62977756	2,69
RESÍDUOS	13	0,23451930	
Xm = 3,582800 ± 0,484272			
CV = 13,51658 %			
ESPÉCIES	MÉDIAS	5%	
<i>D. miscolobium</i>	4,1300	a	
<i>D. ecastaphyllum</i>	3,6443	ab	
<i>D. nigra</i>	3,1020	b	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

Tabela 6. Análise de variância para os valores de comprimento absoluto do par cromossômico menor, nº 10, e resultados do teste de TuKey para as espécies de *Dalbergia* analisadas

FV	GL	QM	F
TRATAMENTOS	11	0,18609316	1,23
RESÍDUOS	11	0,15164597	
Xm = 1,978261 ± 0,389417			
CV = 19,68484 %			
ESPÉCIES	MÉDIAS	5%	
<i>D. miscolobium</i>	2,1986	a	
<i>D. ecastaphyllum</i>	2,1083	a	
<i>D. nigra</i>	1,7460	a	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

#### 5. 4. Aplicação de bandamento cromossômico

##### 5. 4. 1. Bandamento-C

Objetivando a possível detecção de diferenciação ao longo do complemento cromossômico das espécies de *Dalbergia* em análise neste estudo, foram empregadas técnicas de bandamento cromossômico. Como na literatura não foram encontrados trabalhos referentes à aplicação da metodologia de bandamento C para o gênero, foram realizados vários ensaios experimentais visando o estabelecimento de uma técnica que melhor se adequasse. Numa primeira etapa, a metodologia de bandamento-C utilizada seguiu o procedimento descrito por Aguiar-Perecin (1985b), com modificações. Essa técnica foi escolhida por ter sido descrita para milho, que é um organismo modelo para plantas. Porém, na análise das preparações obtidas a partir das três espécies de *Dalbergia* em estudo, não foram evidenciados cromossomos com

bandas heterocromáticas distintas, provavelmente devido à excessiva desnaturação dos cromossomos e a grande precipitação deixada pelo hidróxido de Bário.

Como os cromossomos das espécies aqui estudadas são de tamanho reduzido e de difícil manuseio, o que refletiu na grande dificuldade de obter boas preparações que pudessem evidenciar bandas distintas e de boa qualidade, optou-se optar por uma nova metodologia de bandamento-C. Para tanto, foi aplicada a metodologia descrita por Fernandez et al. (2002). Esse novo protocolo utilizou formamida como agente desnaturante, o que nos proporcionou a obtenção de preparações com boa qualidade, livre das precipitações causadas pela ação do hidróxido de bário.

Foi possível detectar a ocorrência de bandas-C centroméricas nas três espécies de *Dalbergia* analisadas (Figura 5). O padrão observado indica a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões centroméricas de todos os cromossomos dos complementos das três espécies, sendo algumas mais evidentes para determinados pares cromossômicos.

Em virtude da dificuldade de se obter metáfases com ótimo grau de condensação, não foi possível proceder a identificação de cada par cromossômico nas células em que foram aplicadas as técnicas de bandamento-C. Porém, como observado na Figura 5, foi evidenciada a ocorrência de bandas-C na região centromérica de todos os cromossomos.

Como citado anteriormente, não foi encontrada literatura relacionada ao gênero *Dalbergia* sobre estudos de bandamento cromossômico, o que torna difícil maiores comparações. Outros grupos de plantas têm sido utilizados em estudos de bandamento-C. D'emerico et al. (2000), analisaram espécies de *Serapias* quanto à presença de bandas-C. Neste caso, a metodologia de bandamento-C empregada revelou diferentes quantidades de heterocromatina, com bandas em vários pares cromossômicos, localizadas no centrômero, assim como em *Dalbergia*. Em *Serapias*, alguns pares revelaram bandas teloméricas no braço curto dos cromossomos ou braços curtos heterocromáticos. Acredita-se que em *Dalbergia* podem ocorrer bandas teloméricas, porém é necessário a avaliação em um número maior de células para constatar a presença destas regiões heterocromáticas nas três espécies estudadas.

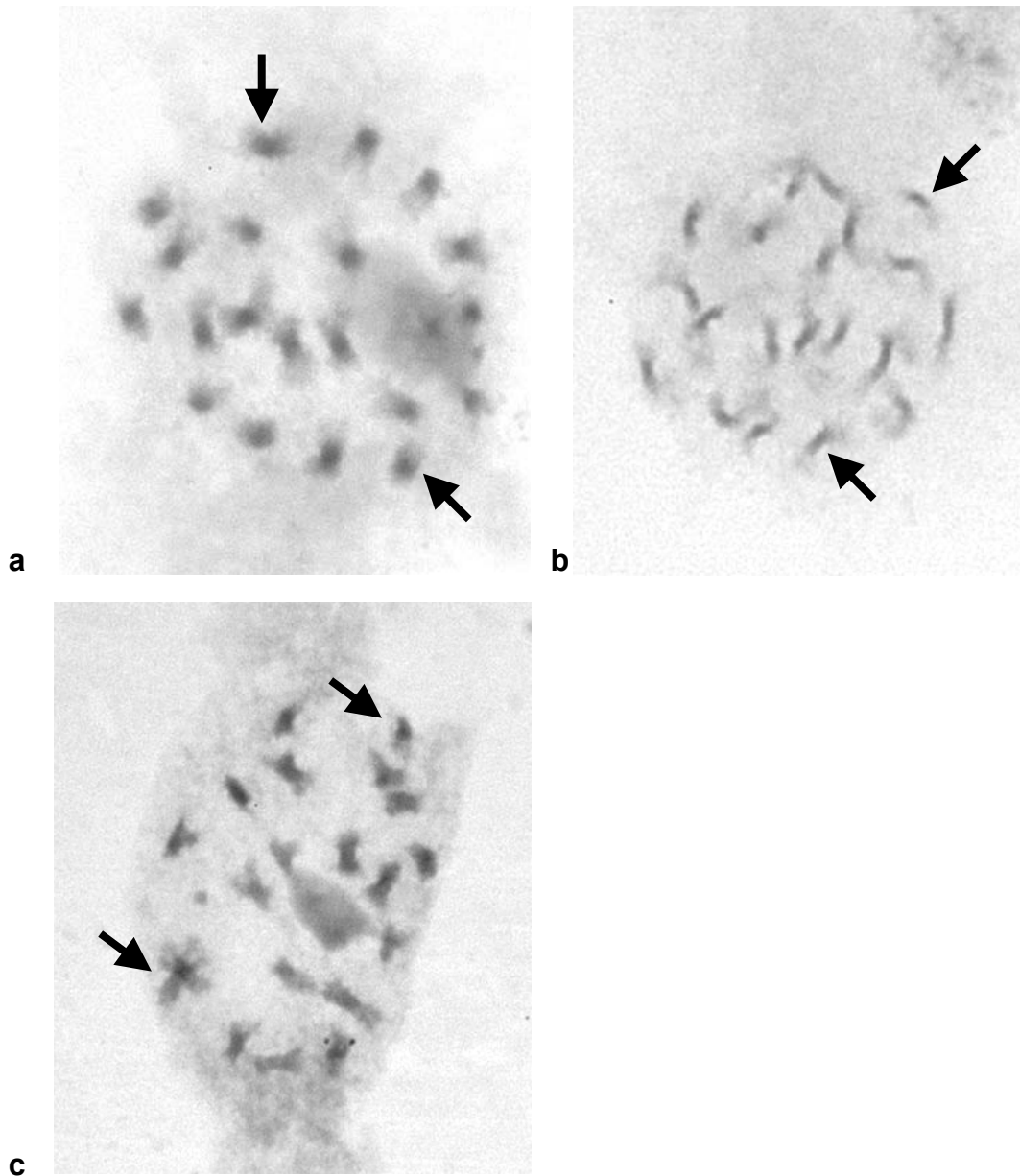


Figura 5: Prometáfases mitóticas coradas com a metodologia de Bandamento-C: a) *D. miscolobium*; b) *D. nigra*; e, c) *D. ecastaphyllum*.

#### **5. 4. 2. Coloração com nitrato de prata**

O método de Howell & Black (1980) utilizado para detectar as regiões organizadoras de nucléolos (RONs), particularmente em cromossomos mitóticos, não apresentou resultados satisfatórios, pois foram observadas apenas marcações inespecíficas em vários cromossomos profásicos e prometafásicos.

Com o objetivo de aprimorar a técnica para melhor evidenciar os sítios de rDNA nos cromossomos metafásicos das três espécies em estudo, ainda foi aplicada uma nova e rápida metodologia de coloração com nitrato de prata para a visualização das RONs. O procedimento seguiu, em linhas gerais a técnica descrita por Kavalco & Pazza (2004). A observação das preparações citológicas não evidenciou a ocorrência de cromossomos metafásicos marcados. Constatou-se que a qualidade das preparações não foi ideal para a observação de cromossomos metafásicos distintos, revelando a necessidade de um melhor refinamento no preparo das lâminas.

Estudos recentes mostraram a eficácia da utilização de microondas para a detecção de Ag-RONs em preparações cromossômicas mitóticas, revelando bandas com qualidade similar àquelas obtidas através do método convencional descrito por Howel & Black (1980). Essa nova técnica de coloração com prata reduziu drasticamente o tempo necessário de detecção das RONs, podendo ser evidenciado em aproximadamente cinco segundos. O método convencional de impregnação com prata deve ser monitorado em câmara úmida até a obtenção da coloração adequada. Em temperatura de 60 °C o tempo de coloração pode variar entre três e cinco minutos, com a temperatura elevada a preparação pode secar a ponto de prejudicar a qualidade da mesma. Além do curto tempo de exposição, esse método permite o preparo de várias lâminas ao mesmo tempo, uma vez que a irradiação de microondas se distribui homoganeamente entre elas e reduz a precipitação causada pela prata. (Kavalco e Pazza, 2004).

O método de Fernandez-Gomez (1969) utilizado para detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) em núcleos interfásicos apresentou resultados positivos para as espécies em análise. Conforme demonstrado na figura 6, foi possível observar a marcação de 1 e 2 nucléolos, variáveis em tamanho nos núcleos interfásicos e correspondentes a 1-2 sítios ribossômicos ativos.

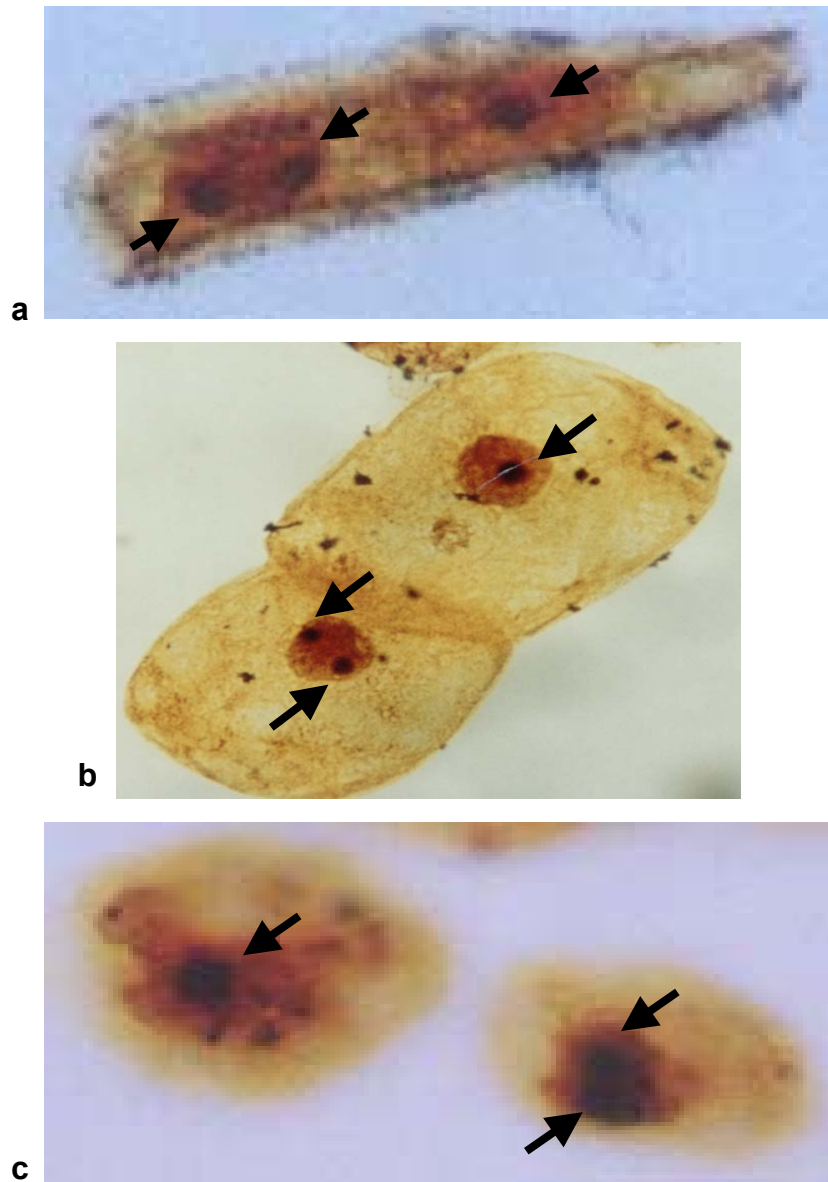


Figura 6. Núcleos interfásicos, evidenciando um a dois nucléolos por espécie: a) *D. miscolobium*; b) *D. nigra*; e, c) *D. ecastaphyllum*.



## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados da análise da morfologia cromossômica nas espécies *Dalbergia miscolobium*, *D. nigra* e *D. ecastaphyllum* foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

1. O gênero apresenta um cariótipo padrão, constituído de 10 pares cromossômicos com centrômeros medianos e submedianos. E, apesar das similaridades encontradas nos cariótipos das espécies em estudo, existem variações que permitem caracterizar cada cromossomo individualmente, bem como cada espécie.

2. Existem variações interespecíficas relacionadas ao tamanho cromossômico, ao número e à posição do satélite. Em alguns casos, também ocorrem variações no posicionamento do centrômero.

3. Variações intraespecíficas foram observadas com relação ao número de satélites na espécie *D. nigra*, ocorrendo dois pares de cromossomos satelitados em duas das 10 metáfases avaliadas e apenas um par cromossômico com satélite nas outras.

4. A técnica de bandamento C evidenciou a ocorrência de bandas-C centroméricas e pericentroméricas nas três espécies de *Dalbergia* analisadas.

5. A comparação entre os resultados obtidos a partir dos métodos de impregnação pela prata permitiu considerar que as três espécies em análise têm um máximo de dois nucléolos por célula nos núcleos interfásicos, correspondentes à existência de dois sítios, contendo genes ribossomais ativos.

## 7. PERSPECTIVAS

1. A técnica de bandamento-C mostra-se aplicável para as espécies de *Dalbergia* entretanto, estudos mais detalhados são necessários para o estabelecimento de padrões de bandas e posterior diferenciação cromossômica intra e interespecífica.

2. Por causa das limitações técnicas, não foi possível estabelecer o posicionamento definitivo dos sítios ativos de genes ribossomais em cromossomos específicos. Modificações nos métodos de coloração com prata e o uso de hibridação in situ deverão ser utilizadas para caracterizar as regiões cromossômicas dos genes ribossomais.

3. A despeito da falta de informações acerca da caracterização cromossômica de espécies de *Dalbergia*, tais estudos mostram ser potencialmente importantes para o estabelecimento de relações entre espécies e contribuição das mesmas na evolução do gênero.

4. Serão investigadas, citogeneticamente, novas espécies de *Dalbergia*, com o objetivo de estabelecer relações entre espécies e ampliar as informações acerca da caracterização cromossômica do gênero.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-PERECIN, M.L.R de; Bandamento-C e tipos de heterocromatina em milho. In: AGUIAR-PERECIN, M.L.R de; MARTINS, P.S.; BANDEL, G.; **Tópicos de citogenética e evolução de plantas**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1985b. p. 51-67.

AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de; VOSA, C.G. C-Banding in maize II. Identification of somatic chromosomes. **Heredity**. v. 54, p. 37-42, 1985.

ALMEIDA, M.P. **Avaliação da diversidade genética de acessos *ex situ* de jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* Vell. Allemão ex Benth.) por meio de marcadores RAPD, como subsídio para sua conservação**. 2001. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Ilhéus, Ba, 2001.

ALMEIDA, M.P.; AHNERT, D.; LEAL, A.M.B.; SCHUSTER, I.; SIQUEIRA, I.G.; ASSUNÇÃO, A.; MAGALHÃES, Y.; SANTOS, C. dos. Metodologia para extração do DNA genômico de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allem. (Jacarandá-da-Bahia). In: V Seminário de Pesquisa da UESC. Qualidade de Pesquisa e Qualidade de Vida, 1998, Ilhéus, **Resumos...** Ilhéus: Editus, 1998. p. 63.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: **EMBRAPA – CPAC**. 1998.

BANDEL, G. **Variação numérica dos cromossomos e evolução nas Leguminosas**. 1972. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

BATTISTIN, A.; BIONDO, E.; COELHO, L.G.M. Chromosomal Characterization of Three Native and one Cultivated Species of *Lathyrus L.* in Southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**; v. 22, n. 4, p. 557-563, 1999.

BERTÃO, M.R.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Maize somatic chromosome preparation: pretreatments and genotypes for obtention of high index of metaphase accumulation. **Caryologia**, v. 55, n. 2, p. 115-119, 2002.

BERTÃO, M.R. **Caracterização Citogenética de Linhagens de Milho (*Zea mays* L.) Através de Bandamento Cromossômico e Hibridação Molecular *in situ***. 1998, Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

BERTÃO, M.R. **Evolução Cariotípica no Gênero *Capsicum* (Solanaceae)**. 1993, Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

CARVALHO, A.M. de. A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. **Brittonia**, v. 49, n. 1, p. 87-109, 1997.

CARVALHO, A.M. de. The genus *Dalbergia* L. f. in Bahia, Brazil. **Herbarium, CEPEC Cocoa Research Center**, CP 7, 6 – 17p., 1992.

CARVALHO, A.M.V. de. Os Jacarandás da Bahia. **Agrotrópica**. v. 2, n. 1, p. 1-10, 1990.

CARVALHO, A.M. de. **Systematics studies of the genus *Dalbergia* L. f. in Brazil**. 1989. Tese (Ph.D.). Reading (UK): University of Reading, 1989.

CARVALHO, R. de; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**. v. 136, p. 159-168, 2002.

D'EMERICO, S.; PIGNONE, D.; SCRUGLI, A. Giemsa C-banded karyotypes in *Serapias* L. (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Society**, v. 133, p. 485-492, 2000.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. A. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, v. 131, p. 900-910, March, 2003.

FERNANDEZ, R.; BARRAGÁN, M.J.L.; BULLEJOS, M; MARCHAL, J. A.; DIAZ DE LA GUARDIA, R.; SÁNCHEZ, A. New C-band protocol by heat denaturation in the presence of formamide. **Hereditas**. v. 137, p. 145-148, 2002.

FERNANDEZ-GOMES, E.; STOCKERT, J. C.; LOPEZ-SAEZ, J. F.; GIMENEZ-MARTIN, G. Staining plant cell nucleoli with AgNO<sub>3</sub>, after formalin-hydroquinone fixation. **Stain Technology**, v. 44, p. 48-49, Geneva, 1969.

FERREIRA, M.A.M.M. **Determinação do Padrão de Regiões Heterocromáticas no Gênero *Capsicum* Através de Métodos de Bandamento**. 1998. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba 1998.

FERREIRA, R.C.S.; ALMEIDA, M.P.; ANHERT, D. Estudo da metodologia para extração de DNA de jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra*). In: IV Seminário Anual de Iniciação Científica da UESC. 1998, Ilhéus, **Resumos...** Ilhéus: Editus, 1998. p. 50.

FRIEBE, B.; ENDO, T.R.; BIKRAM, S.G. Chromosome banding methods. In: Fukui, K.; Nakayama, S. (Ed.). **Plant Chromosomes: laboratory methods**. Boca Raton: CRC Press. p. 123-153, 1996.

GUERRA, M.dos S. O uso de Giemsa na citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandeamento. **Ciência e cultura**, v. 35, n. 2, p.190-192, 1983.

GUERRA, M.dos S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara. 1988, p. 24-35.

GIBBS, P.; SASSAKI, R. Reproductive Biology of *Dalbergia miscolobium* Benth. (Leguminosae – Papilionoideae) in SE Brazil: The effects of Pistillate Sorting on Fruit-set. **Annals of Botany**, v. 81, p. 735-740, 1998.

HESLOP-HARRISON, J.S. The molecular cytogenetics of plant. **Journal Cell Science**, v. 100, p.15-21, 1991.

HESLOP-HARRISON, J.S. Comparative analysis of plant genome architecture. In: Heslop-Harrison, J.S. (Ed.) **Unifying plant genomes 50<sup>th</sup> SEB symposium**. Cambridge:Company of Biologists. p.17-23, 1996.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**. v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JENNINGS, D.L. Variation in pollen and ovule fertility in varieties of cassava and the effect of interspecific crossing on fertility. **Euphytica**. v. 12, p. 69-76, 1963.

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R. A rapid alternative technique for obtaining silver-positive patterns in chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**. v. 27, n. 2, p. 196-198, 2004.

KLANT, A.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Karyotype morphology and evolution in some *Lathyrus* (Fabaceae) species of southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 23, n. 2, p. 463-467, 2000.

LAVIN-MATT; PENNINGTON, R. T; KLITGARD-BENTE, B.; SPRENT, J.I. DE LIMA, H.C.; GASSON, P.E. The dalbergioid legumes (Fabaceae): Delimitation of a pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 3, p. 503-533, March, 2001.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Lorenzi, Harri (Ed.). Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1992. 368p.

MAGOON, M.L., KRISHNAN R.; VIJAYABAI, K. Morphology of pachytene chromossomes and meiosis in *Manihot* esculenta Crantz. **Cytologia**, v. 34, p. 612-618, 1969.

MURRAY, B.G. The cytology of the genus *Brisa*, L. Gramineae. I. Chromossome Numbers, karyotypes and nuclear DNA variation. **Chromossoma**, Berlin, v. 54, p. 141-154, 1976.

NETO, V.M.; AHNERT, D.; LEAL, A.M.B.; ALMEIDA, M.P.; ALMEIDA, D.S. de; COUTINHO, S.C.; CORADIM, V.T.R. Avaliação da diversidade genética *in situ* do jacarandá (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allem. Ex. Benth.), por meio de marcadores moleculares tipo RAPD em reserva de Mata atlântica em Porto Seguro – Ba. In: V Seminário de Pesquisa da UESC. Qualidade de Pesquisa e Qualidade de Vida. 1998, Ilhéus, **Resumos...** Ilhéus: Editus, 1998. p. 64.

OLIVEIRA, P.E.A.M.; PAULA, F.R. Fenologia e biologia reprodutiva de plantas de Mata de Galeria. In: Riberio, J.F.; Fonseca, C.E.L. da; Sousa-Silva, J.C. eds. **Cerrado:**

**caracterização e recuperação de matas de galeria.** Planaltina: Embrapa-Cerrados, pp. 301-332, 2001.

PARDUE, M.L.; GALL, J.C. Chromosomal Localization of Mouse Satellite DNA. **Science**, v.168, n. 3937, p. 1356-1358, 1970.

ROUT, G. R.; BHATACHARYA, D.; NANDA, R.M.; NAYAK, S.; DAS, P. Evaluation of genetic relationships in *Dalbergia* species using **RAPD** markers. **Biodiversity and Conservation**, v. 12, n. 2, p. 197-206, February 2003.

SILVA, L..F. da.; MENDONÇA, J.R. Mata Atlântica do Sudeste da Bahia: Interação Ambiental e Deterioração do Ecossistema. **Especiaria**, Ano I, no. 2, jul/dez, 1998. p.153-176.

SILVA, P.N.C.; BERTÃO, M.R. **Análise Citogenética de Jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allem ex Benth.) Através da Aplicação de Metodologias de Bandamento Cromossômico.** Trabalho de Conclusão de Curso. 2001.

SPERANDIO, J.P.; FONSECA, C.E.L. da. Comportamento do Jacarandá-da-Bahia em plantios experimentais em Manaus, AM. In: Simpósio do Trópico Úmido, 1<sup>o</sup>, Belém, **Anais**. EMBRAPA - CPATU. p. 307-311, 1986.

STEBBINS, G.L. Variation and evolution in plants. New York. **Columbia University Press**. 1950, 643p.

UMANAH, E.E.; HARTMANN, R.W. Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot* species. J. Am. Soc. Hort. Sci., v. 98, p. 272-274, 1973.

VERMA, R.S.; BABU, A. **Human chromosomes: principles and techniques.** New York: McGraw-hill, 1995. 419p.

VOSA. C.G.; MARCHI, P. Quinacrine Fluorescence and Giemsa staining in Plants. **Nature (New Bio)**. v. 237, p. 191-192, 1972.