

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR



CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E TESTES DE TRANSFERÊNCIA DE
PRIMERS MICROSSATÉLITES (SSR) EM ESPÉCIES DE *Caesalpinia* QUE
OCORREM NA BAHIA

POLLIANA SILVA RODRIGUES

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2008

POLLIANA SILVA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E TESTES DE TRANSFERÊNCIA DE
PRIMERS MICROSSATÉLITES (SSR) EM ESPÉCIES DE *Caesalpinia* QUE
OCORREM NA BAHIA**

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

Área de concentração: Genética
e Biologia Molecular.

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2008**

POLLIANA SILVA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E TESTES DE TRANSFERÊNCIA DE
PRIMERS MICROSSATÉLITES (SSR) EM ESPÉCIES DE *Caesalpinia* QUE
OCORREM NA BAHIA**

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

Área de concentração: Genética
e Biologia Molecular.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2008

Prof. Dr.^a Margarete Magalhães de Souza
UESC

Prof. Dr.^a Eliane Mariza Dortas Maffei
UESB

Prof. Dr.^a Janay Almeida dos Santos-Serejo
Embrapa

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
UESC – Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus por me permitir realizar mais um projeto em minha vida e a minha família que sempre me deu suporte para seguir em busca de meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À minha família: minha mãe Luciene, meu pai Joselito, minha irmã Priscilla, meu noivo Alexandre e Max, pelo carinho, apoio, confiança, atenção, amor, dados a todo tempo.

À Prof.^a Dr.^a Eliane Marize Dortas Maffei, pelo seu auxílio sempre presente durante a graduação despertando minhas habilidades e pelo incentivo de prosseguir até o mestrado fazendo-me acreditar sempre em minha capacidade.

Ao Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa, pela oportunidade de entrar no mestrado dando-me a carta de aceite; por me preparar para o desafio que me aguardava nos dois anos de mestrado; por fornecer subsídios e confiança durante o desenvolvimento da tese, pela motivação e pelo reconhecimento do meu trabalho; pela competência e simplicidade que servirão como espelho para a pessoa e profissional que quero me tornar.

À Prof.^a Dr.^a Margarete Magalhães de Souza, pelos ensinamentos preciosos que levarei sempre comigo, além da cooperação no desenvolvimento do projeto servindo-me de inspiração pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio, pelas lições importantes nos momentos certos, mostrando as qualidades e capacidades que existem em cada um de nós. Obrigada pelo exemplo de pessoa que trouxe para minha vida.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Costa e à prof.^a Dr.^a Fernanda Amato Gaiotto, que disponibilizaram reagentes para execução do trabalho além de auxiliar no andamento da pesquisa e na análise dos dados.

À Priscilla, Lídia, Tereza, Graziella, Giane, amigas que estiveram comigo em todos os momentos, especialmente os mais difíceis, dando-me forças para prosseguir.

À Vanderly, Graziella, Olívia, Cíntia, Américo, Bruna e Mariana, e ao Fabrício e Zé Lima, colegas de laboratório, e estes dois últimos também de campo, que contribuíram de forma imensurável para que essa etapa fosse finalizada com sucesso.

Àqueles que precisam ser lembrados com carinho, pela ajuda que deram a mim conduzindo-me ao que sou hoje; a vocês Luci Silva Catarino e Joselito Rodrigues Silva, meus sinceros agradecimentos.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro por meio do projeto PADCT.

Aos colegas do programa que contribuíram com suas experiências, com momentos de descontrações e de incentivo.

ÍNDICE

EXTRATO	IX
ABSTRACT.....	XI
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. Delimitação do grupo <i>Caesalpinia</i> dentro de <i>Caesalpinioideae</i>	3
2. Importância da conservação genética no contexto das espécies e dos ecossistemas	5
3. Cromossomos e sua importância para evolução	9
3.1. Estudos cromossômicos em <i>Caesalpinia</i>	11
4. Aplicação dos microssatélites em conservação da biodiversidade.....	13
CAPÍTULO 1: ESTUDOS CARIOMORFOLÓGICOS EM ESPÉCIES DE <i>CAESALPINIA</i> (<i>CAESALPINIOIDEAE</i>: <i>LEGUMINOSAE</i>).....	17
Resumo	17
Abstact.....	18
1. Introdução.....	19
2. Materiais e métodos.....	21
3. Resultados.....	23
4. Discussão	32
5. Conclusões e perspectivas	35
6. Agradecimentos.....	35
7. Referência bibliográfica	36

CAPÍTULO 2: TESTES DE TRANSFERÊNCIA DE <i>PRIMERS</i> SSR DE <i>CAESALPINIA ECHINATA</i> PARA OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO.....	38
Resumo	38
Abstract.....	39
1. Introdução.....	39
2. Material e métodos	40
3. Resultados.....	42
4. Discussão	44
5. Conclusões e perspectivas	46
6. Agradecimentos	46
7. Referência bibliográfica	46
CONCLUSÕES GERAIS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES.....	49

EXTRATO

RODRIGUES, Polliana Silva, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2008. **Caracterização Molecular e Citogenética de Espécies de *Caesalpinia* que ocorrem na Bahia.** Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientador: Marco Antônio Costa. Colaboradora: Fernanda Amato Gaiotto.

A Mata Atlântica e a Caatinga, apesar de altamente devastadas, são representativas do patrimônio genético brasileiro de biodiversidade. Dentre os grupos de plantas que ocupam esses habitats são encontradas as espécies de *Caesalpinia* (Caesalpinioideae: Leguminosae), das quais seis estão ameaçadas de extinção. Mesmo assim, há relativamente poucos estudos sobre a estrutura genética e composição cariotípica dessas espécies. Desta forma, objetivou-se caracterizar espécies de *Caesalpinia* que ocorrem na Bahia com base em dados citogenéticos e moleculares. A análise citotaxonômica tem trazido uma grande contribuição ao estudo da evolução devido os cromossomos constituírem o próprio material genético, e alterações desses parâmetros são significativas para a evolução das espécies. No presente trabalho, as espécies *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. pulcherrima*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. microphylla* e *C. calycina* foram analisadas citogeneticamente, visando explicitar as características cariotípicas e subsidiar estudos evolutivos do grupo. Para isso, as sementes foram coletadas, germinadas, submetidas a 8-hidroxiquinolina, fixadas em Carnoy e estocadas em freezer a -20°C até sua utilização. Para o preparo dos cromossomos utilizou-se o protocolo de digestão enzimática e a coloração convencional com Giemsa. As lâminas foram analisadas, fotografadas e os resultados mostraram que todas as espécies apresentaram o mesmo número cromossômico com $2n=24$, porém com morfologias distintas. Os cromossomos

metafásicos de cinco células de cada espécie foram utilizados para determinar o comprimento médio dos cromossomos (X), o índice de assimetria (TF%) e o comprimento do lote haplóide (CHL) e o desvio padrão foi calculado. Com base nesses dados, os ideogramas dessas cinco espécies foram construídos, possibilitando observar que *C. pluviosa* var. *peltophoroides* é a mais primitiva e *C. ferrea* var. *leiostachya* a mais derivada entre as cinco espécies estudadas. Pelo bandejamento C, demonstrou-se prevalência de heterocromatina nas regiões proximais e terminais, corroborando os estudos feitos dentro da família. Outra estratégia que permite conhecer melhor as espécies e monitorar sua conservação é o emprego de marcadores moleculares. Dentre esses, os microssatélites são amplamente utilizados em estudos de espécies relacionadas, o que requer a prévia transferência entre espécies. Assim, no presente trabalho, os 11 *primers* SSR desenvolvidos para *C. echinata* foram testados em *C. pulcherrima*, *C. microphylla*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. pyramidalis*, *C. bracteosa*, *C. calycina*, *C. laxiflora*. As amostras foliares foram coletadas e armazenadas em sílica gel e utilizadas para a extração do DNA para os testes de transferência. Duas temperaturas foram testadas (50°C e 53°C) e cada *primer* amplificou em pelo menos uma espécie. A 50°C, *C. microphylla* apresentou maior eficiência de transferência, não amplificando apenas os *primers* CE02 e CE11. E, à temperatura de 53°C, a espécie com maior sucesso na amplificação foi *C. laxiflora* para a qual foram transferidos sete dos 11 *primers* testados. Como esperado, o sucesso da taxa de amplificação decaiu com a divergência genética.

Palavras-chave: cariótipo, marcador microssatélite, transferibilidade, genética da conservação, evolução.

ABSTRACT

RODRIGUES, Polliana Silva, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2008. **Cytogenetic and molecular characterization of *Caesalpinia*** (Caesalpinioideae: Leguminosae) **species that occur in Bahia**. Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientador: Marco Antônio Costa. Colaboradora: Fernanda Amato Gaiotto.

Atlantic Forest and Caatinga are representative of the Brazilian genetic patrimony and biodiversity. Nowadays its biomes are highly degraded. Among *Caesalpinia* species found in these areas six are considered in risk of extinction. Moreover, there is a lack of studies about genetic structure and cariotype of this species. Cytotaxonomic analysis has been widely used in evolutionary studies. Chromosomes constitute the original genetic material and alterations of these parameters are significant for evolution of the species. This work aimed to characterize *Caesalpinia* species that occur in the Bahia inferred from cytogenetic and molecular data. We analyzed by cytogenetic techniques *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. pulcherrima*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. microphylla* and *C. calycina* evaluating cariotype characteristics and subsidizing evolutionary studies for this group. Hereon, seeds were collected, germinated, submitted in 8-hydroxiquinolein, fixed in Carnoy and stored in freezer -20 °C until required. Enzymatic digestion protocol and conventional coloration were used for treating of the chromosomes. The plates were analyzed, photographed and the results showed same chromosome number ($2n=24$) with distinct morphologies for all analyzed species. Metaphasic chromosomes were used to determine the average length (X), index of asymmetry (TF%) and the length of the haploid lot (CHL). The

ideograms of these five species were constructed. *C. microphylla* is most ancestral and *C. pluviosa* var. *peltophoroides* is more derived among those five species. By C-banding were demonstrated the presence of heterochromatin in the proximal and terminal regions of the chromosomes, corroborating with previous Leguminosae studies. Another helpful tool for study and conservation of species are the molecular markers. The microsatellites are widely used in studies of related species, requiring previously the transference among species. Thus, the 11 primers SSR developed for *C. echinata* were tested in *C. pulcherrima*, *C. microphylla*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. pyramidalis*, *C. bracteosa*, *C. calycina*, *C. laxiflora*. Leaf samples were collected and stored in silica gel. Total DNA was extracted for the transference tests. Two temperatures were tested (50 °C and 53 °C) and each primer amplified in at least one species. To 50 °C, *C. microphylla* presented the best efficiency of transference (only primers CE02 and CE11 were not able to amplify). However, the better temperature of transference in *C. laxiflora* was 53 °C (only four primers were not able to amplify). The reduction of the primers transference due to genetic divergence was expected.

Key words: cariotype, C-banding, microsatellite marker, transferability, genetics conservation, evolution.

INTRODUÇÃO

A família Leguminosae é a terceira maior família de angiospermas (LEWIS et al., 2005) e tem sofrido com a fragmentação dos ecossistemas em que ocorre. Dentre os táxons pertencentes aos legumes encontramos as *Caesalpinia*, grupo com especiação relativamente recente e considerado um complexo de espécies com inúmeras características crípticas (LEWIS et al., 2000), exibindo assim um alto grau de plasticidade fenotípica. Por causa da grande fragmentação que os biomas vêm sofrendo muitas espécies estão em processo de extinção, o que não é diferente com o grupo *Caesalpinia* que possui seis espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2007).

Por causa dessa perda crescente de relictos, vêm-se intensificando os estudos genéticos em populações com amostragens adequadas. Esse acúmulo de dados vem apontando algumas direções importantes para se tomar como referência para as ações de minimização dos impactos ambientais nos ecossistemas (KAGEYAMA et al., 1998).

A prática conservacionista de populações exige o conhecimento dos níveis de diversidade genética mantida dentro das populações. Assim, uma das maneiras mais eficazes de se obter dados genéticos de populações naturais é através de marcadores moleculares, principalmente os de alto conteúdo de informação. Dentre os marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites, (SSR) são os mais eficientes para gerarem dados que permitam formular estratégias de conservação (OLIVEIRA et al., 2006).

Entretanto, a etapa de caracterização das seqüências é a mais difícil, o que têm levado vários pesquisadores a utilizarem *primers* para estudos entre espécies relacionadas (CORRÊA, 1999). Por isso, a possibilidade de

transferência entre espécies geneticamente relacionadas do mesmo gênero aumenta o número de dados que podem ser obtidos a partir desse marcador (RAFALSKI et al, 1996; CHASE et al, 1996, DAYANANDAN et al, 1997). Essa característica dos microssatélites é conhecida como transferibilidade, condicionada por homologia de seqüências de DNA entre espécies relacionadas, o que é um fator muito importante para facilitar o uso de SSR, pois reduz os custos de desenvolvimento dessa ferramenta (OLIVEIRA et al., 2006).

Outra área que tem sido de grande importância é a citogenética, uma vez que os cromossomos não são estruturas rigidamente estáveis e que constituem o próprio material genético (GUERRA, 1988). Dessa forma a diversidade genética é fundamental para a evolução e é usualmente um reflexo de variações no núcleo, cromossomo e DNA (LIU et al., 2006). Por isso, a matéria prima da biodiversidade molecular é a mesma envolvida na evolução das espécies: a variabilidade gênica (GUERRA, 1988).

Contudo, há pouco conhecimento sobre a estrutura e evolução cariotípica em *Caesalpinia* e a maioria das espécies não têm seu cariótipo conhecido. Um dos poucos estudos feitos na área foi realizado na Argentina (CANGIANO; BERNARDELLO, 2005), revelando que as espécies *C. gilliesii*, *C. mimosifolia* e *C. paraguariensis* possuem $2n=24$. Contudo, estudos similares com *Caesalpinia* brasileiras inexistem ou são restritos a informar o número cromossômico.

No presente trabalho, os cariótipos de cinco espécies de *Caesalpinia* foram descritos com base em coloração densa e bandamento C, e 11 *primers* microssatélites desenvolvidos para *C. echinata* foram testados na amplificação de DNA de sete espécies desse gênero. Os dados citogenéticos poderão auxiliar em análise filogenética e outros estudos evolutivos de *Caesalpinia*. A disponibilidade de *primers* microssatélites irá permitir a realização de estudos acerca da estrutura de populações de *Caesalpinia*, consistindo em uma ferramenta útil aos trabalhos de genética da conservação.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Delimitação do grupo *Caesalpinia* dentro de Caesalpinioideae

A subfamília Caesalpinioideae é extremamente diversa em morfologia e anatomia das folhas, madeira, frutos, flores e pólen. Algumas dessas características podem ser informativas filogeneticamente, definindo uma gama de clados próximos à base da família. Essa subfamília é representada por 170 gêneros, sendo ainda considerada basal para Mimosoideae com 60 gêneros e Papilonoideae com 440 (HERENDEEN, 2000).

Pouco se conhece acerca da biologia reprodutiva e polinização da maioria das espécies de Caesalpinioideae (LEWIS et al., 2000). E, tentado diminuir essa deficiência, estudos nesta área foram realizados por Banks & Klitgaard (2000). Por falta destes e de outros estudos dentro de Caesalpinioideae ela é a menos compreendida taxonomicamente, filogeneticamente e evolutivamente.

Trata-se de um grupo pantropical que ocorre em diversos tipos de habitats, com grande variabilidade de estruturas reprodutivas e vegetativas. A maioria dos gêneros encontra-se no sul e norte da África e América e no oeste da Ásia, com grande ocorrência no Brasil, para onde foram citadas cerca de 790 espécies (BARROSO et al., 1984).

Estudos biosistemáticos confirmam a idéia de que a subfamília Caesalpinioideae é um grupo não-natural, compreendendo tribos parafiléticas (TUCKER, 1996; DOYLE et al., 1997; BIONDO et al., 2005), dentre elas encontra-se Caesalpiniae que compreende clados parafiléticos estando sujeitas a modificações futuras (LEWIS et al., 2005). Para este grupo, os estudos

filogenéticos estão descobrindo que o parentesco não está de acordo com classificação de Polhill (1994) que é amplamente utilizada (HASTON et al., 2005).

Do ponto de vista sistemático, o grupo vem sendo amplamente analisado com uma série de resultados moleculares. Contudo, muitas áreas correlatas à sistemática ainda são incipientes, como exemplo as abordagens citogenéticas. *Caesalpinioideae* possui grande variabilidade intergenérica, inter e intra-específica dos números cromossômicos, porém o número básico estabelecido para *Caesalpiniae* é de $x=12$. Esta é pouco estudada citogeneticamente, sendo que muitas espécies têm seus números cromossômicos incorretos ou mesmo desconhecidos, devido ao pequeno número de trabalhos publicados (BIONDO et al., 2005).

Muitas espécies de *Caesalpinia* exibem um alto grau de plasticidade fenotípica, especialmente na folhagem. Isso tem resultado na múltipla nomenclatura dessas espécies, com cada variante tendo concedido uma condição específica, favorecendo o aumento dos problemas de nomenclatura (LEWIS, 1998). O grupo *Caesalpinia* contém 176 espécies e, de face com o número de espécies e a complicada nomenclatura associada a muitas delas, foi levado a revelar nas pesquisas os conjuntos de características que podem indicar a natureza biológica do grupo (LEWIS, 1998). Estes estudos mostraram que ele não é um grupo natural compreendendo assim tribos parafiléticas (BIONDO et al., 2005).

Uma vez que o grupo *Caesalpinia* apresenta-se como um complexo de espécies com inúmeras características crípticas (LEWIS et al., 2000), vários trabalhos morfológicos e moleculares têm sido desenvolvidos, possibilitando, assim, que as espécies sejam corretamente redistribuídas dentro das subfamílias e dos grupos (HASTON et al., 2005).

Em 1753 o gênero *Caesalpinia* foi assim denominado formalmente por Linnaeus em honra a Andrea Cesalpino (LIMA et al., 2002). Este tem uma história taxonômica complexa e, sua nomenclatura associada às dificuldades em trabalhos anteriores, tem sido relacionada com os limites gerais (LEWIS, 1998).

2. Importância da conservação genética no contexto das espécies e dos ecossistemas

A maioria das espécies do gênero *Caesalpinia* cresce em áreas do semi-árido e são usualmente limitadas a arbustos espinhosos (incluindo várias formas da vegetação da caatinga Brasileira) ou a campos rasos de florestas decíduas podendo também crescer em solo arenoso e calcário. Algumas são conhecidas principalmente em locais de alta degradação onde as sementes são liberadas por frutos deiscentes explosivos resultando em uma rápida colonização desses habitats. Muitas espécies de *Caesalpinia* têm preferência por habitats costeiros e a maioria não cresce em altitudes acima de 1.100 metros. Um poucas espécies do grupo ocupam ainda habitats úmidos, sendo que alguns dos variantes de *C. pluviosa* e os três variantes de *C. echinata* (pau-brasil) ocorrem na floresta costal úmida do leste do Brasil (LEWIS, 1998).

O Estado da Bahia tem uma grande diversidade ambiental e, conseqüentemente, abriga uma grande biodiversidade vegetal, incluindo as espécies nativas – forrageiras, frutíferas, medicinais, ornamentais, madeireiras, dentre outras. Ele representa uma área de 567.293 km², compreendendo três biomas expressivos (Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado), sendo que cada uma dessas áreas tem um processo de exploração estabelecido, constituído por uma biodiversidade vegetal bem definida. Parte da diversidade que ainda sobrevive, principalmente a nativa, está conservada em Reservas Biológicas (TABARELLI et al., 2005).

A principal conseqüência da devastação é a perda da diversidade genética, pois se o tamanho da população for diminuindo conseqüentemente, a variação genética das espécies será reduzida (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). No início do século XX, a proteção da biodiversidade foi tida como crucial e contínua, com a conservação genética sendo de importância primária para evitar a extinção da maioria das espécies ameaçadas, ao lado dos aspectos ecológicos, políticos e econômicos para a proteção da biodiversidade (OLIVEIRA et al., 2006).

A onda massiva de industrialização, desenvolvimento econômico e degradação ambiental que se iniciou no Brasil em 1950, resultaram em um levante de preocupações e ações sobre as já graves questões ambientais,

particularmente com referência a mecanismos eficientes de proteção a biodiversidade (TABARELLI et al., 2005). Caso não ocorram grandes reduções nas taxas de desmatamento, o futuro desenha um mundo muito mais pobre em biodiversidade e conseqüentemente em opções de alimentos, medicamentos, e outros.

Uma vez que a diversidade biológica tem sofrido com a constante fragmentação, a perda da variabilidade genética é a principal conseqüência da devastação (YOUNG et al., 1996). Desta forma a biologia da conservação visa entender os efeitos da atividade humana e de desenvolver abordagens práticas para prevenir a extinção de espécies (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). A fragmentação do habitat reduz o tamanho das populações e aumenta o isolamento entre os remanescentes (YOUNG et al., 1996).

O pau-brasil foi intensamente explorado, gerando populações reduzidas a pequenos fragmentos de Mata Atlântica, ocasionando perda da diversidade genética e é hoje uma espécie ameaçada de extinção (VARTY, 2007). Por este motivo a biologia da conservação busca entender os efeitos da atividade humana e assim desenvolver abordagens práticas para prevenir a extinção de espécies (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A partir da última década, os estudos genéticos em populações de espécies arbóreas de florestas tropicais vêm-se intensificando com amostragens adequadas tanto de populações como dentro das mesmas, além do uso de tecnologias genéticas adequadas para quantificar essa diversidade. Esse acúmulo de dados vem apontando algumas direções importantes para se tomar como referência para as ações de minimização dos impactos ambientais nesses ecossistemas. Estudos genético-ecológicos em espécies representativas, tanto em florestas não perturbadas como em matas secundárias, vem mostrando o efeito das ações antrópicas em suas populações, auxiliando na definição dos parâmetros genéticos mais adequados para orientar e monitorar as ações nesses ecossistemas (KAGEYAMA et al. 1998).

A Mata Atlântica brasileira representa uma grande riqueza de patrimônio genético e paisagístico, demonstrada por índices impressionantes: 55% das espécies arbóreas e 40% para espécies não-arbóreas são endêmicas. Ela formava originalmente, uma faixa de mata contínua desde o estado do Rio

Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, hoje resta aproximadamente 7,25% da sua cobertura original (MMA, 2000; CÂMARA, 2005). Quando íntegra ocupava cerca de 15% do atual território brasileiro, ao longo da costa, constituindo um dos mais ricos biomas brasileiros. Todavia, através de cinco séculos, em épocas e intensidades distintas foi, submetida a diversos processos de antropização (AGAREZ et al, 2001).

Esta é tida como uma das 25 prioridades mundiais para a conservação da diversidade biológica do planeta, pois calcula-se que a Mata Atlântica brasileira abrigue 20.000 espécies de plantas vasculares, 620 aves, 261 mamíferos, 200 répteis e 280 anfíbios (MYERS et al., 2000). De acordo com Silva e Tabarelli (2000), aproximadamente 49% da flora de plantas lenhosas nordestina podem se extinguir no nível regional. A floresta já perdeu mais de 93% de sua área (MYERS et al., 2000) e menos de 100.000 km² de vegetação remanesce (TABARELLI et al., 2005).

A vasta maioria dos animais e plantas ameaçados de extinção no Brasil estão nesse bioma e, das sete espécies brasileiras consideradas extintas em tempos recentes, todas se encontravam distribuídas na Mata Atlântica. Embora o número e a escala das iniciativas de conservação tenham crescido consideravelmente durante as últimas décadas, elas ainda são insuficientes para garantir a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica (TABARELLI et al., 2005).

A Caatinga é a vegetação que cobre a maior parte do Semi-Árido Brasileiro. Ela ocupa 11 % do território nacional, abrangendo os estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e Minas Gerais. Na cobertura vegetal das áreas da região nordeste, a caatinga representa cerca de 800.000 km², o que corresponde a 70% da região (SILVA et al., 2004).

Apesar de ser a única grande região natural brasileira cujos limites estão inteiramente restritos ao território nacional, pouca atenção tem sido dada à conservação da variada e marcante paisagem da Caatinga, e a contribuição da sua biota à biodiversidade extremamente alta no Brasil tem sido subestimada (SILVA et al., 2004). Este bioma era tido como pobre em espécies e endemismo. Entretanto, estudos recentes têm desafiado esse ponto de vista e demonstrado a importância dele para a conservação da biodiversidade

brasileira (LEAL et al., 2003).

Em trabalhos quantitativos e qualitativos sobre a flora e a Vegetação da Caatinga, foram registradas cerca de 932 espécies arbóreas e arbustivas, sendo 380 endêmicas. Entretanto, 41% da região nunca foi investigada e 80% permanece subamostrada (TABARELLI et al., 2005), o que sugere um aumento significativo no número real de espécies.

A primeira estimativa feita sobre a degradação dos ecossistemas colocou a Caatinga como o terceiro mais degradado do Brasil, atrás da Mata atlântica e do Cerrado. A segunda, entretanto, eleva a Caatinga para o segundo ecossistema mais degradado do Brasil passando a frente do Cerrado. Contudo, é possível que mesmo esses valores ainda estejam subestimados devido à dificuldade de dimensionar a extensão da perda dos ecossistemas naturais. Apesar de perturbadoras, essas estimativas fornecem diretrizes para a seleção e o planejamento de unidades de conservação e mesmo assim a Caatinga tem o menor número e a menor extensão protegida dentre todos os biomas brasileiros (LEAL et al., 2005).

A Caatinga compreende 1 milhão de km² e poucos têm sido os trabalhos referentes à coleta, utilização, caracterização, estudos filogenéticos e genéticos, aproveitamento de derivados e pré-melhoramento das espécies endêmicas ou de ocorrência espontânea da região que ocupa (SANTOS et al., 2005). É tida como uma formação vegetal altamente ameaçada, pois além dessa carência em estudos, está também envolvida pela idéia de baixa produtividade (ALBUQUERCQUE; ANDRADE, 2001). Por seu potencial forrageiro, medicinal, madeireiro e faunístico muitas de suas populações naturais de espécies vegetais estão ameaçadas de extinção. Dentre as subfamílias mais freqüentes neste bioma encontram-se as Caesalpiniaceas.

A fragmentação provoca a diminuição do número de indivíduos de uma população, favorecendo a perda de variação genética. A população remanescente passa a ter o tamanho menor que o mínimo adequado para o mesmo possa ter sua normal continuidade e evolução. Nessa população pequena pode ocorrer, em curto prazo, deriva genética tendo assim as freqüências de seus genes afastadas daquelas encontrados na população original, inclusive chegando a perder alelos. Em longo prazo, ainda pode haver um aumento da endogamia decorrente da maior probabilidade de

autofecundação e acasalamento entre indivíduos aparentados (KAGEYAMA et al., 1998).

Várias ações quanto ao aspecto genético podem ser consideradas prioritárias em relação aos fragmentos florestais, visando garantir a sustentabilidade das populações das espécies neles existentes, assim como aumentar a eficiência dos mesmos quanto ao seu papel de conservação de populações de espécies indicadoras. Essas ações se referem tanto à priorização dos fragmentos mais aptos para esse fim, através do monitoramento do tamanho efetivo em espécies referências, como também medidas de melhoria da eficiência do papel de conservação dos fragmentos (KAGEYAMA et al., 1998).

O manejo correto dos fragmentos na paisagem, bem como de seus contornos, além de medidas preservacionistas externas como corredores ecológicos para ampliação do fluxo gênico, implantação de zonas de abafamento e de uso restrito serão vitais para a manutenção das condições ecológicas atuais nas gerações futuras (ZAU, 1998). Dessa forma, em cada nível de diversidade biológica, os biólogos da conservação pretendem estudar os mecanismos que alteram e, ou, mantêm a variação em todos os campos, principalmente os mecanismos que influenciam a variabilidade genética das espécies e afetam sua distribuição (PRIMAK; RODRIGUES, 2001).

3. Cromossomos e sua importância para evolução

A citogenética desenvolveu-se principalmente a partir do início do século passado e seu progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia. Com o renascimento das leis de Mendel, surgiu a teoria da herança cromossômica que relaciona os cromossomos com as leis mendelianas de herança sendo um marco para o estudo dos cromossomos, na qual a citologia e a genética passaram a sobrepôr seus conhecimentos numa área denominada citogenética (SOARES-SCOTT et al., 2005). Esses estudos cromossômicos têm sido utilizados na determinação das relações filogenéticas e evolutivas entre grupos de plantas (RAVEN, 1975).

O estudo da evolução pretende compreender o mecanismo de transformação e diversificação dos seres vivos. Para isso é fundamental que os

seres vivos sejam reunidos, de acordo com seu grau de parentesco, em número menor de grupos e táxons. O estabelecimento desses táxons foi feito inicialmente com base na similaridade e, com o desenvolvimento de novas abordagens que fazem uso de técnicas citogenéticas, bioquímicas, dentre outras, as árvores filogenéticas vêm sendo reexaminadas e algumas vezes reformuladas em função desses dados (GUERRA, 1988).

A análise cromossômica sempre foi um dos campos mais interessantes da Citologia e da Genética, tanto quando relacionada a estudos taxonômicos e evolutivos, quanto a estudos estruturais, no melhoramento genético, na caracterização de germoplasma ou na análise clínica. Apesar da revolução provocada pela Genética Molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar todo o genoma de um eucariota na forma de blocos individualizados de material genético, passíveis de serem mensurados, diferenciados em subunidades e manipulados de diversas maneiras (GUERRA; SOUZA, 2002).

Uma vez que os cromossomos não são estruturas rigidamente estáveis, e em praticamente todas as espécies se encontram variações cromossômicas que desempenham um papel importante na evolução das espécies, estas podem ocorrer entre diferentes células do indivíduo, entre indivíduos da mesma população ou entre populações diferentes da mesma espécie. Essas variações podem ocorrer a nível numérico, alterando o número normal de cromossomos, ou estrutural, que altera a morfologia cromossômica padrão (GUERRA, 1988).

Informações sobre cromossomos são relevantes em estudos sistemáticos e evolutivos, abrangendo, desde a simples contagem, até detalhes da citogenética molecular que são a fronteira da pesquisa atual (STACE, 2000). O número cromossômico é a característica mais amplamente utilizada em citogenética (GUERRA, 2000) e, juntamente com outras características citológicas, auxilia no entendimento de variações genéticas envolvidas na evolução do grupo, como também na delimitação taxonômica da espécie (PEDROSA et al.,1999).

Os cromossomos de plantas têm sido tradicionalmente um material produtivo para quase todas as espécies das pesquisas citogenéticas. Contudo, em pelo menos duas décadas, com o desenvolvimento das técnicas de citogenética molecular, principalmente FISH e os numerosos variantes,

revelando detalhes inesperados do comportamento cromossômico e evolução (GUERRA, 2005).

Dessa forma a diversidade genética é fundamental para a evolução e é usualmente um reflexo de variações no núcleo, cromossomo e DNA (LIU et al., 2006). Essas alterações podem ser identificadas pela análise cariotípica fornecendo informações acerca do número, tamanho, padrão de bandeamento e da posição do centrômero que freqüentemente contribuem para o entendimento da evolução das plantas (SHAN et al., 2003), a relação entre espécies, o processo que tem conduzido a diversificação evolucionária e o curso que a evolução tem seguido (PEDROSA et al., 2000; VILATERSANA et al., 2000).

As variações quanto ao número, a posição e ao tamanho de constrições secundárias e de satélites são freqüentemente observadas em vegetais, sendo úteis como marcadores, sugerindo que os mesmos podem ser incorporados ou suprimidos ao longo do processo evolutivo (SOARES-SCOTT et al., 2005).

A análise citotaxonômica tem trazido uma grande contribuição ao estudo da evolução, principalmente pelo fato de que os cromossomos constituem o próprio material genético e, portanto, alterações desses parâmetros são quase sempre significativas para o processo evolutivo das espécies. Além disso, o cariótipo é praticamente insensível às variações ambientais ou fisiológicas. Dessa forma, a análise comparativa de dados citogenéticos em espécies aparentadas, permitem distinguir as características que são exclusivas de cada espécie e aquelas que são comuns a todas ou a maioria delas (GUERRA, 1988).

O conhecimento mais exato e preciso da origem e relação entre as espécies indicará os procedimentos adequados à manipulação genética dentro de um programa de melhoramento genético. Portanto, o conhecimento adquirido nas áreas da biologia celular e molecular vem contribuindo para o entendimento de como os genes estão organizados nos genomas (SOARES-SCOTT et al., 2005).

3.1. Estudos cromossômicos em *Caesalpinia*

O gênero *Caesalpinia* é pouco conhecido quando se trata de dados

citogenéticos, dados esses que podem auxiliar nos estudos dos padrões e processo evolutivo que é tão complexo dentro desse gênero. Apesar de o grupo conter aproximadamente 150 espécies, apenas 19 destas possuem seu número cromossômico conhecido (GOLDBLATT, 1981; LEWIS, 1998; JENA et al., 2004; CANGIANO, BERNARDELLO, 2005).

Os primeiros estudos cromossômicos em *Caesalpinia* revelam $n=12$ e $2n=24$, sendo esses números considerados comuns neste grupo (GOLDBLATT, 1981). Entretanto, em *C. ferrea* foram encontrados números cromossômicos de $2n=24$ e $2n=48$ e em *C. bracteosa*, de $2n=48$. Esses números cromossômicos distintos demonstram a existência de poliploidia dentro do grupo. Outras exceções foram encontradas para *C. pulcherrima*, *C. japonica*, *C. cucullatum* e *C. kanaviense*, as quais foram inicialmente descritas como tendo $2n=22$. Essa diferença no padrão numérico foi atribuída a erro de contagem dos cromossomos tanto em *C. pulcherrima* quanto em *C. japonica*, porém não vê razão para duvidar do número haplóide $n=11$ *C. cucullatum* e *C. kanaviense* (LEWIS, 1998).

Outras espécies com $2n=24$ foram descritas, confirmando-se esse número como padrão em *Caesalpinia*: i) *C. melanadenia*, *C. nelsonii*, *C. exostemma*, *C. hughesii* foram confirmados com o número haplóide de $n=12$ (GOLDBLATT, 1981); ii) *C. exostemma* e *C. cacalaco*, confirmados como $2n=24$, e *C. bonduc*, *C. velutina*, *C. vesicaria*, *C. gilliessi*, *C. yucatanensis* e *C. decapetada* descritas como $2n=24$ e $n=12$ (LEWIS, 1998); iii) *C. gilliessi* é confirmada como $2n=24$, e *C. paraguariensis* e *C. mimosifolia* descritas como $2n=24$ e $n=12$ (CANGIANO e BERNARDELLO, 2005); iiiii) *C. crista* descrita com $2n=24$ (JENA et al., 2004).

Apesar de ser pequeno o número de espécies de *Caesalpinia* com o número cromossômico estabelecido é ainda mais escasso os estudos que abrangem outras características cariotípicas como a morfologia e tamanho cromossômicos. Estes foram estabelecidas para apenas 10 das espécies estudadas citogeneticamente (KUMARI; BIR, 1989; CANGIANO, BERNARDELLO, 2005). Para as espécies que foram realizadas os estudos de morfologia se pode observar que todas possuíam cromossomos de tamanho pequeno com valores de aproximadamente 2,00 μm . Uma vez com estas medidas cromossômicas, os cariótipos apresentaram-se relativamente

simétricos com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (LEVAN, 1964; CHOUDHARY, CHOUDHARY, 1988; KUMARI, BIR, 1989; CANGIANO, BERNARDELLO, 2005).

4. Aplicação dos microssatélites em conservação da biodiversidade

Em cada nível de diversidade biológica, os biólogos da conservação pretendem estudar os mecanismos que alteram e, ou, mantêm essa variação, principalmente os mecanismos que influenciam a variabilidade genética das espécies e afetam sua distribuição (PRIMAK; RODRIGUES, 2001). A matéria prima da biodiversidade molecular é a mesma envolvida na evolução das espécies: a variabilidade gênica. É essa variabilidade que nos permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes. Técnicas inovadoras de biologia molecular estão permitindo que genes valiosos e únicos encontrados em uma espécie sejam transferidos para outra. Estudos em nível genético são de suma importância principalmente para espécies sob forte pressão antrópica e, ou, com alto potencial econômico e ecológico, no sentido de salvaguardar variabilidade genética (POVOA et al., 2004).

A diversidade genética de uma espécie é freqüentemente influenciada por efeitos de deriva genética, endogamia, fluxo gênico e pelo comportamento reprodutivo dos indivíduos dentro das populações. Os indivíduos, normalmente, são diferentes entre si, e essa variação deve-se à presença de diferentes genes gerados pelas mutações que acabam formando alelos distintos. Estes permitem quantificar a variabilidade genética entre os indivíduos (AVISE, 2004).

Os marcadores genéticos possuem um mecanismo de herança mendeliana e a propriedade de se comportarem como dominantes, como é o caso dos *random amplified polymorphic DNA*, ou codominantes, como são os microssatélites. Estes últimos apresentam a vantagem de distinção entre os genótipos heterozigotos e homozigotos. Essa possibilidade de estimar a freqüência alélica constitui a informação necessária para estimativa de diversos parâmetros genéticos populacionais (OUBORG et al., 1999). Portanto, esses marcadores são úteis para entender sobre aqueles mecanismos que alteram a diversidade.

A análise das variações na seqüência de DNA é muito importante em estudos genéticos tornando os marcadores moleculares uma ferramenta útil para análise da variação genética, tendo auxiliado muito a análise genética em plantas. A caracterização da variação genética em populações naturais e entre linhagens cultivadas é crucial para efetiva conservação e exploração de recursos genéticos para programas de melhoramento (VARSHNEY et al., 2005).

Diferentes experimentos no início dos anos 80 demonstraram que os genomas eucariotos são dotados de diferentes classes de seqüências. Uma delas, as seqüências simples repetidas (SSR- *Simple Sequence Repeats*) também denominadas de microssatélites, consiste em pequenas seqüências com 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem. Estes têm sido observados em vários organismos, sendo largamente distribuídos no genoma das plantas. Por serem marcadores co-dominantes e multialélicos possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998). Os microssatélites (SSR), marcadores baseados na reação da polimerase em cadeia (PCR), têm sido uma das ferramentas moleculares mais utilizadas em estudos populacionais (OUBORG et al., 1999). O polimorfismo pode ser detectado por *primers* específicos flanqueadores das repetições de microssatélites sendo assim, os mais eficientes para gerarem dados que permitam auxiliar na formulação de estratégias de conservação (OLIVEIRA et al., 2005).

A aplicação das técnicas moleculares a estudos sobre conservação genética tem tornado possível o exame da genética de espécies em risco de extinção e a análise genética tem sido amplamente utilizada em pesquisa de conservação. O conhecimento da distribuição da variabilidade genética intra- e interpopulações naturais é essencial para adotar estratégias de conservação de germoplasma *ex situ* e *in situ*. Parte deste conhecimento pode ser obtido com base em marcadores microssatélites, os quais são extremamente úteis para estimar os parâmetros genéticos das populações e analisar a paternidade e o fluxo gênico (OLIVEIRA et al., 2005). Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em análises de parâmetros populacionais e reprodutivos possibilitando detectar a variação genética, estimar o fluxo gênico, analisar o sistema reprodutivo, dentre outros fins (OUBORG et al., 1990; O'HANLON et

al., 2000, AVISE, 2004). O maior problema da variabilidade genética encontra-se no fato de que se o tamanho da população for diminuindo conseqüentemente a variação genética das espécies será reduzida (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

As técnicas moleculares possuem um papel fundamental para monitorar a conservação das espécies, visto que permitem quantificar a variabilidade genética. Sabe-se que a variabilidade genética possui um papel fundamental para a manutenção da espécie, visto que a seleção natural é realizada com base nas diferenças existentes entre indivíduos de uma população, de maneira a permitir, principalmente, o sucesso reprodutivo daqueles mais adaptados ao meio ambiente em que se encontram. Quanto maior a variabilidade existente na população, maiores suas chances de perpetuação. Dessa forma, ao explicitar o status de variabilidade com base nos marcadores moleculares, torna-se possível inferir sobre o estado de conservação da espécie e indicar alternativas para seu monitoramento (MELO, 2005).

Os dados genéticos não contribuem apenas para a conservação da diversidade genética de uma única espécie, e sim para a conservação de outras espécies e comunidades ecológicas, visto que todas estão interagindo continuamente dentro dos ecossistemas (FRANKHAM, 1999; MELO, 2005). A perda de uma espécie, uma população ou até uma comunidade biológica inteira abala o equilíbrio ecológico do ecossistema como um todo (WILSON, 1997).

Estudos de quantificação da variabilidade genética e de sua distribuição em pau-brasil vêm demonstrando que o pau-brasil ainda se encontra com sua conservação ameaçada. Com base em microssatélites nucleares, demonstrou-se que estes foram altamente polimórficos, mas quase todos os locus não apresentam a freqüência genotípica esperada sendo a heterozigotidade observada mais baixa do que a esperada, entretanto em três locus mostraram um excesso de indivíduos heterozigotos e nos testes de desequilíbrio de ligação os resultados foram considerados significantes (MELO, 2007). Com base em microssatélites cloroplastídicos, demonstrou-se uma estruturação com a maior variação genética encontrada entre diferentes regiões e entre populações dentro de uma mesma região (Lira et al., 2003). Dados semelhantes para essa espécie haviam sido obtidos com marcadores RAPD

revelando uma quantidade significativa de variação entre populações no estado do Rio de Janeiro (CARDOSO, et al. 1998). Esses dados possibilitaram atribuir mecanismos de isolamento reprodutivos por alterações ambientais que ocorreram no período das glaciações como parte das causas de grande diversidade interpopulacional em pau-brasil (MELO, 2005; CARDOSO et al., 1998).

CAPÍTULO 1: Estudos cariomorfológicos em espécies de *Caesalpinia* (Caesalpinioideae: Leguminosae)

Rodrigues, PS; Souza, MM; Juchum, FS; Costa, MA; Corrêa, RX.

Resumo

As abordagens moleculares em *Caesalpinia* demonstram taxonomia complexa (LEWIS, 1998) e áreas correlatas à sistemática que auxiliam na filogenia e evolução, como a citogenética, ainda são incipientes (GUERRA, 1988). O gênero *Caesalpinia* possui 176 espécies, onde 18 possuem os números cromossômicos relatados (FEDOROV, 1969; GOLDBLATT, 1981; CANGIANO, BERNARDELLO, 2005) e nove delas têm estudos cariomorfológicos (KUMARI; BIR, 1989; CANGIANO, BERNARDELLO, 2005). Desta forma, objetivou-se caracterizar espécies de *Caesalpinia* que ocorrem na Bahia com base em dados citogenéticos. As raízes seminais primárias foram tratadas com celulase 2% e pectinase 20% por 1 hora em câmara úmida a 37°C e posteriormente maceradas. A lâmina foi coberta com uma lamínula e o tecido meristemático foi espalhado e esmagado de forma manual (GUERRA, SOUZA, 2002). Após a coloração convencional com Giemsa as metáfases foram fotografadas e utilizadas para as medições cromossômicas. Observou-se que *C. calycina*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. microphylla*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides* e *C. pulcherrima* apresentaram o mesmo número cromossômico $2n=24$, o qual é comum dentro desse gênero. O comprimento médio dos cromossomos (X) variou de 2,05 μm em *C. microphylla* a 3,32 μm em *C. calycina*, o comprimento do lote haplóide (CLH) variou de 24,63 μm em *C. microphylla* a 39,86 μm em *C. calycina*, o cálculo da razão entre braços (RB) mostrou fórmulas kariótípicas diferentes entre as cinco espécies (LEVAN, 1964). Pelo índice de assimetria

(TF%), *C. ferrea* var. *leiostachya* (TF=39,45%) é mais derivada e *C. pluviosa* var. *peltophoroides* (TF=34,94%) é mais ancestral dentre as cinco espécies estudadas. Os tamanhos cromossômicos das cinco espécies diferiram significativamente ($P < 0,01$). Satélites foram encontrados em *C. calycina* no braço curto dos cromossomos 1 e 6, em *C. microphylla* no braço curto dos cromossomos 1 e 2, em *C. ferrea* var. *leiostachya* no braço longo dos cromossomos 2 e 5, em *C. pulcherrima* no braço longo dos cromossomos 4 e 5 e em *C. pluviosa* var. *peltophoroides* no braço longo dos cromossomos 2 e 6 e no braço curto do cromossomo 3. O maior satélite foi encontrado em *C. calycina* com 0,95 μm e o menor em *C. ferrea* var. *leiostachya* com 0,15 μm . A técnica de banda-C foi aplicada em *C. calycina*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides* e *C. pulcherrima* mostrando as regiões de heterocromatina nos cromossomos que apresentaram presença de bandas terminais e proximais. *C. microphylla* mostra-se a mais simétrica com cromossomos similares morfológicamente e com fórmula cariotípica 12M. Análises citogenéticas mais amplas das espécies de *Caesalpinia* contribuirão para uma visão evolutiva sobre esse grupo, uma vez que este é pouco conhecido citogeneticamente.

Palavras-chave: evolução cromossômica, dados cariomorfológicos, cariótipo, banda-C.

Abstract

Molecular studies in *Caesalpinia* have characterized a complex taxonomic history (LEWIS, 1998). The lack of additional cytogenetic information about *Caesalpinia* species perhaps is a problem to systematic of this group (GUERRA, 1988). *Caesalpinia* includes 16 genera and about 176 species, but just 18 have chromosome number reported and nine show cariomorphologic studies. This work aimed to characterize *Caesalpinia* species that occur in the Bahia inferred from cytogenetic and molecular data. Root tips were treated with cellulase 2% and pectinase 20% for 60 minutes in humid chamber (37°C) and squashed. Semi-permanent slides followed the conditions described by Guerra

and Souza (2002). Metaphases stained in Giemsa were photographed and used to chromosomal measurements. *C. calycina*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. microphylla*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides* and *C. pulcherrima* showed the same chromosome number $2n=24$, knowledge for genera. Average chromosome length (X) ranged from 2,05 μm in *C. microphylla* to 3,32 μm in *C. calycina*. Length of the haploid lot (CLH) ranged 24,63 μm in *C. microphylla* to 39,86 μm in *C. calycina*. The reason among arms (RB) showed different cariotypes formulas among the five species. By asymmetry index (TF%) *C. ferrea* var. *leiostachya* (TF=39,45%) is more derived and *C. pluviosa* var. *peltophoroides* (TF=34,94%) is more ancestral among the five studied species. Chromosome sizes among all analyzed species differed significantly ($P < 0,01$). Satellites were found in short arm in *C. calycina* in chromosomes 1 and 6 and in *C. microphylla* in chromosomes 1 and 2. Additionally, satellites were found in long arm of *C. ferrea* var. *leiostachya* in chromosomes 2 and 5 and in *C. pulcherrima* in chromosomes 4 and 5. *C. pluviosa* var. *peltophoroides* showed satellites in long arm of the chromosomes 2 and 6 and in short arm of the chromosome 3. The larger satellite was found in *C. calycina* with 0,95 μm and the smaller in *C. ferrea* var. *leiostachya* with 0,15 μm . C-banding technique showed heterochromatine areas in chromosomes of *C. calycina*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides* and *C. pulcherrima* corroborating with another Legume studies. *C. microphylla* showed the most symmetrical morphology with similar chromosomes and cariotypic formula 12M. Cytogenetic analyses about *Caesalpinia* species will assist evolutionary studies of the group.

Key words: chromosome evolution, cariomorphologic data, cariotype, C-banding.

1. Introdução

A subfamília Caesalpinioideae é pouco estudada citogeneticamente, mas sabe-se que esta possui grande variação intergenérica, inter e intra-específica dos números cromossômicos. Muitas de suas espécies têm seus números cromossômicos incorretos ou mesmo desconhecidos, devido ao pequeno número de trabalhos publicados (BIONDO et al., 2005).

Caesalpinia vem sendo amplamente analisado com uma série de abordagens moleculares demonstrando que o grupo possui uma história taxonômica complexa (LEWIS, 1998). Contudo, muitas áreas correlatas à sistemática ainda são incipientes, como exemplo as abordagens citogenéticas (BIONDO et al., 2005), estudos estes que têm sido utilizados na determinação das relações filogenéticas e evolutivas entre grupos de plantas (GUERRA, 1988).

O gênero *Caesalpinia* contém 176 espécies, entretanto foram relatados os números cromossômicos para apenas 18 espécies (FEDOROV, 1969; GOLDBLATT, 1981; CANGIANO, BERNARDELLO, 2005) e apenas 9 destas possuem estudos com dados cariomorfológicos (KUMARI; BIR, 1989; CANGIANO, BERNARDELLO, 2005). Dessa forma, a maioria das espécies não tem seu cariótipo, números cromossômicos e dados sobre a sua morfologia conhecidos, mas se sabe que para as espécies de *Caesalpinia* são considerados $n=12$ e $2n=24$ como os números cromossômicos comuns dentro do grupo, muito embora tenha sido detectado poliploidia em *C. ferrea* var. *leiostachya* ($2n=24$ e 48) e *C. bracteosa* ($2n=48$) (LEWIS, 1998).

As análises cromossômicas como o número e tamanho cromossômico, padrão de bandeamento e posição do centrômero, freqüentemente contribuem para o entendimento da evolução das plantas (SHAN et al., 2003), a relação entre espécies, o que tem levado à diversificação evolucionária e qual o curso que a evolução tem seguido (PEDROSA et al., 2000; VILATERSANA et al., 2000).

Desta forma o presente trabalho fornece evidências para os estudos da evolução cromossômica dentro do gênero *Caesalpinia* com base em estudos de citogenética clássica e técnicas de bandeamento. Esses novos dados poderão auxiliar em algumas questões evolutivas não-solucionadas por estudos genéticos, bioquímicos, morfológicos e sistemáticos. Além de serem úteis no manejo e conservação das espécies, uma vez que o gênero *Caesalpinia* possui seis espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2007). Além disso, foi verificada hibridação e poliploidia dentro de *Caesalpinia* e a citogenética será útil para detectar as espécies que tem passado esses processos evolutivos.

Neste trabalho, objetivou-se caracterizar o número e a morfologia dos

cromossomos de cinco espécies de *Caesalpinia* que ocorrem na Bahia, com base em coloração convencional e bandamento-C.

2. Materiais e métodos

2.1. Coleta dos frutos

Os frutos foram coletados entre Janeiro e Abril de 2007 (época de floração de *Caesalpinia*), nos biomas Mata Atlântica e Caatinga, nas localidades de Itapetinga (*C. pluviosa* var. *peltophoroides*), Itabuna (*C. ferrea* var. *leiostachya*), Ilhéus (*C. pulcherrima*), Xique-Xique (*C. microphylla*) e Brumado (*C. calycina*).

2.2. Germinação das sementes, coleta e fixação das raízes

As sementes obtidas dos frutos foram tratadas com o fungicida Captan Fersol por 24 horas e então colocadas para germinar em placa de petri com papel filtro umedecido com água destilada (câmara úmida a 24°C), sendo diariamente monitorada. Uma vez germinadas as raízes que alcançavam entre 1 e 2 cm de comprimento foram coletadas e expostas ao anti-mitótico 8-hidroxiquinoleína (8-HQ a 0,002 M) nos períodos de 2 a 24 horas de exposição (1 hora a 24°C e as demais horas a 4°C). As raízes foram secadas rapidamente em papel filtro para tirar o excesso do 8-HQ, fixadas em Carnoy I (3 etanol: 1 ácido acético) por 3 horas a 24 °C e então estocadas no freezer (-20°C) até o momento de sua utilização.

2.3. Preparo das lâminas

As raízes armazenadas no freezer (-20°C) foram lavadas em água destilada duas vezes (5 minutos cada), secadas ligeiramente em papel filtro, colocadas nas lâminas, submetidas à solução enzimática contendo 2% de celulase e 20% de pectinase por 1 hora em câmara úmida a 37°C. Posteriormente, o excesso da solução enzimática da lâmina foi retirado e adicionado uma gota de ácido acético (45%) sobre as raízes deixando agir por 5 minutos. As raízes então foram totalmente fragmentadas em minúsculos pedaços com auxílio de agulhas de seringas, a lâmina foi coberta com uma lamínula e o tecido meristemático espalhado. Uma vez que a lâmina possuía

bom espalhamento meristemático foi feito o esmagamento manual firme e cuidadoso do conjunto lâmina-lamínula com auxílio de papel filtro dobrado para que não houvesse deslizamento da lamínula sobre a lâmina (GUERRA, SOUZA, 2002). Para retirada da lamínula a lâmina foi exposta ao nitrogênio líquido por 5 minutos e então, com auxílio de um estilete, a lamínula é retirada rapidamente e descartada. Posteriormente as lâminas preparadas eram estocadas no freezer à -20°C até a aplicação da técnica desejada.

2.4. Coloração convencional e obtenção das fotos

Para visualização morfológica e contagem dos cromossomos as lâminas foram secadas a temperatura ambiente (24°C), coradas com solução Giemsa (2%) por 10 minutos, lavadas e deixadas para secar a temperatura ambiente (24°C). Uma vez secas as lâminas foram monitoradas e fotografadas, assim como a foto da lâmina micrométrica, em microscópio óptico acoplado a uma câmera digital de 7.1 mega pixels, ambos da Olympus. Posteriormente foram selecionadas aquelas com morfologia cromossômica de qualidade, com bom espalhamento dos cromossomos e com o conjunto cromossômico completo.

2.5. Montagem dos cariogramas e ideogramas.

Das fotografias selecionadas a de melhor qualidade, segundo os padrões de escolha das metáfases, foi utilizada para a montagem dos cariogramas. Para a identificação dos homólogos foi utilizado o software AdobePhotoshop® utilizando-se da ferramenta de medição para estabelecer o comprimento total, comprimento do braço curto e comprimento do braço longo dos cromossomos. A partir destas medições, o cálculo da razão (braço longo/braço curto) foi feito para o correto estabelecimento dos pares cromossômicos, assim como a fórmula cariotípica (LEVAN, A et al., 1964).

Uma vez que os cromossomos de plantas são relativamente pequenos, ideogramas tornam a visualização mais clara. Para que este fosse feito e com resultados confiáveis, cinco metáfases de cada espécie foram medidas estabelecendo a média entre os 12 pares das mesmas, diminuindo a interferência de artefatos técnicos nos resultados. Além disso, através destas medições, foi possível calcular o comprimento relativo dos cromossomos ($CR = \text{Comprimento total do cromossomo} / \text{comprimento do lote haplóide} \times 100$), o

comprimento do lote haplóide (CLH = Comprimento total de todos os cromossomos/2), o comprimento médio dos cromossomos (X = somatório do comprimento total dos cromossomos/número de cromossomos da espécie) e o índice de assimetria (TF%= somatório dos comprimentos dos braços curtos/comprimento do lote haplóide x 100).

2.6. Banda-C

O protocolo utilizado foi o proposto por Guerra e Souza (2002), com adaptações no tempo de desnaturação, para *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. ferrea* var. *leiostachya* e *C. calycina* de 1 hora e 40 minutos, e o tempo de coloração, para *C. ferrea* var. *leiostachya* e *C. pluviosa* var. *peltophoroides* de 45 minutos. Após o preparo das lâminas com esta técnica as mesmas foram montadas com resinas Neomount e fotografadas em microscópio óptico acoplado a câmera de 7.1 mega pixels, ambos da Olympus. Para a banda-C não foi montado o cariógrama, nem foram feitas as medições dos cromossomos.

2.7. Análise dos resultados

As medidas de comprimento dos cromossomos foram analisadas estatisticamente com auxílio do programa GENES (CRUZ, 2001).

3. Resultados

O número somático de cromossomos observado para essas espécies foi de $2n=24$ (Figura 1). O melhor espalhamento dos cromossomos e a melhor visibilidade da morfologia foram obtidos no pré-tratamento com 8-HQ por 6 horas. Em pelo menos 20 lâminas por espécie foram observadas cerca de 10 metáfases por lâmina, para as cinco espécies analisadas: *C. calycina*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. microphylla*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. pulcherrima*.

Com as médias das cinco metáfases representativas de cada uma das espécies, foram desenhados os respectivos ideogramas (Figura 1). Verificou-se que a espécie com o cariótipo mais simétrico foi *C. microphylla* e aquela com cariótipo mais assimétrico foi *C. calycina*.

Os satélites diferiram entre essas espécies quanto ao número, tamanho e localização (Figura 2). Em *C. calycina* eles foram encontrados no braço curto dos pares cromossômicos 1 e 6, em *C. microphylla* no braço curto dos pares cromossômicos 1 e 2, em *C. ferrea* var. *leiostachya* no braço longo dos pares cromossômicos 2 e 5, em *C. pulcherrima* no braço longo dos pares cromossômicos 4 e 5 e em *C. pluviosa* var. *peltophoroides* no braço longo dos pares cromossômicos 2 e 6 e no braço curto do cromossomo 3. O maior satélite foi encontrado em *C. calycina* com 0,95 μm e o menor em *C. ferrea* var. *leiostachya* com 0,15 μm .

As cinco espécies estudadas apresentaram-se cromossomicamente distintas pela análise morfométrica (Tabela 1). O comprimento médio dos cromossomos (X) variou de 2,052 μm em *C. microphylla* a 3,321 μm em *C. calycina*, que o comprimento do lote haplóide (CLH) variou de 24,634 μm em *C. microphylla* a 39,863 μm em *C. calycina*, e que o cálculo da razão entre braços (RB) mostrou fórmulas kariótípicas diferentes entre as espécies. Obteve-se para *C. calycina* 8M+3SM+1ST, para *C. ferrea* var. *leiostachya* 8M+4SM, para *C. microphylla* 12M, para *C. pluviosa* var. *peltophoroides* 4M+8SM e para *C. pulcherrima* 6M+6SM. Pelo índice de assimetria (TF%), *C. ferrea* var. *leiostachya* (TF=39,45%) é mais derivada e *C. pluviosa* var. *peltophoroides* (TF=34,94%) é mais ancestral dentre as cinco espécies estudadas. Além disso, foi estabelecido o comprimento relativo (CR) dos cromossomos de cada espécie em que se pode destacar que *C. calycina* é a espécie na qual o par 1 difere consideravelmente de tamanho em relação ao par 12 (13,633 μm à 4,543 μm) enquanto que em *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. microphylla*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides* e *C. pulcherrima* tiveram um menor grau de variação de acordo com o comprimento relativo apresentando CR de 11 μm a 12 μm para o 1º par e aproximadamente 6 μm para o 12º par.

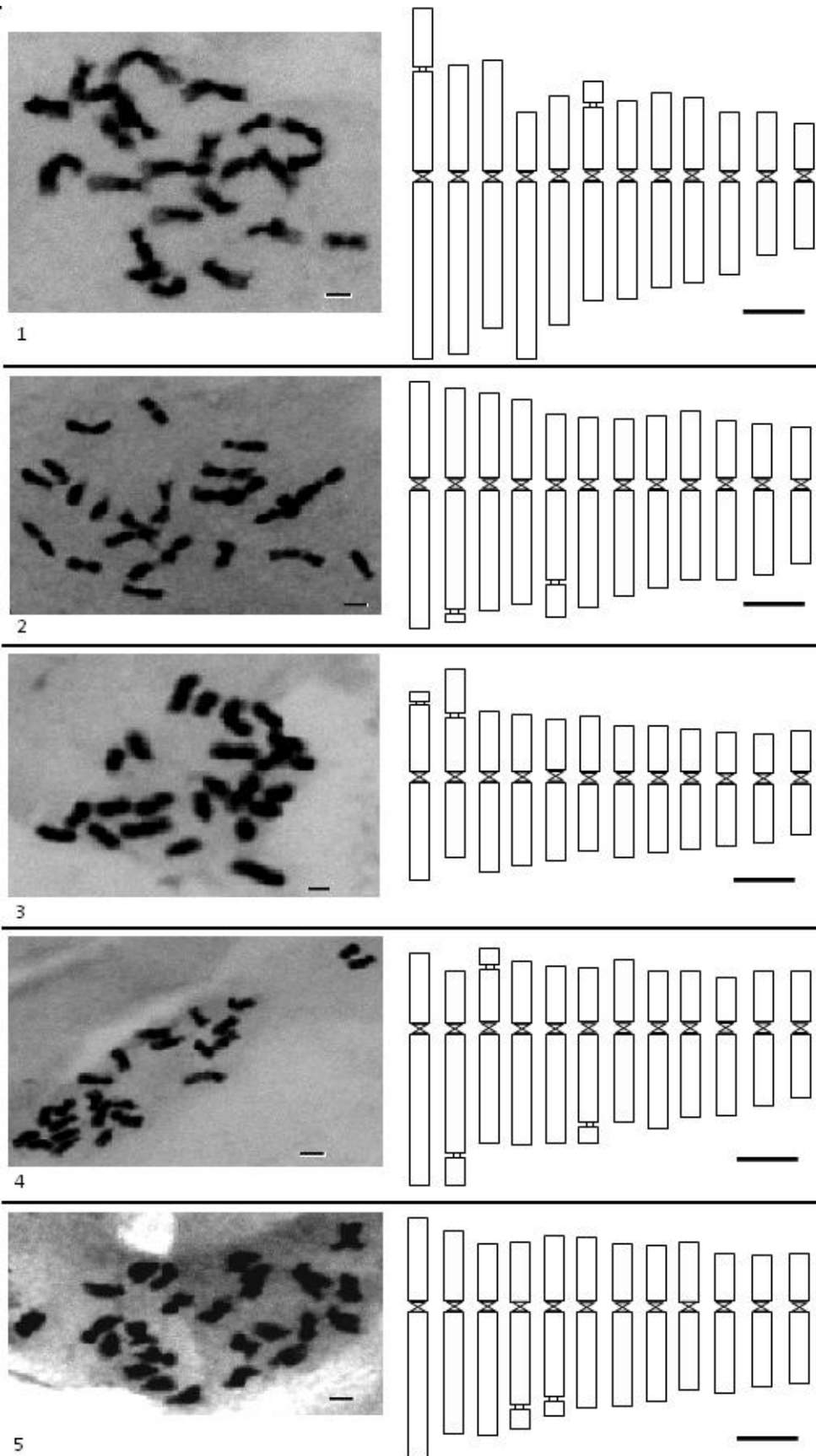


Figura 1. Metáfases mitóticas (barra de 10 µm) e ideogramas (barra de 1 cm = 1 µm) de *C. calycina* (1); *C. ferrea* var. *leiostachya* (2); *C. microphylla* (3); *C. pluviosa* var. *peltophoroides* (4); *C. pulcherrima* (5).

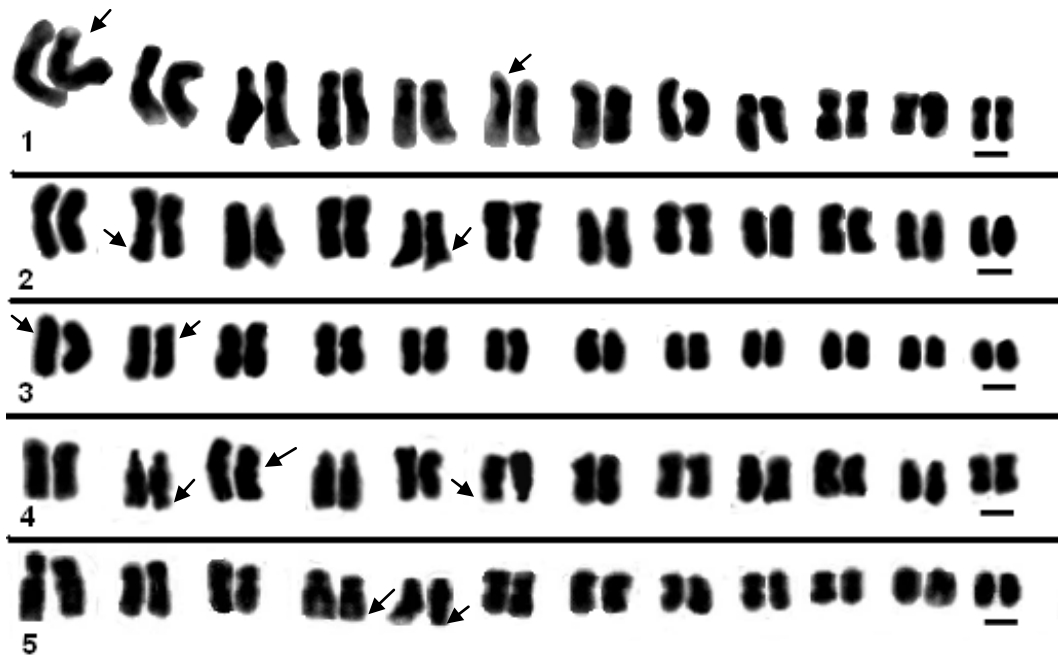


Figura 2. Representação dos kariogramas de *C. calycina* (1); *C. ferrea* var. *leiostachya* (2); *C. pluviosa* var. *peltophoroides* (3); *C. pulcherrima* (4); *C. microphylla* (5). Setas indicam pares satelitados. Barra equivale a 10 µm.

O teste de médias demonstrou a variação cromossômica relacionada ao tamanho dentro das cinco espécies (Tabela 1). De acordo com ele foi verificado que a maior variação morfológica do tamanho dos cromossomos ocorreu em *C. calycina* e que a menor foi em *C. microphylla*. Os pares 8 e 9 não foram estatisticamente diferentes tanto em *C. calycina* quanto em *C. ferrea* var. *leiostachya* de acordo com o Teste de Tukey. A espécie com a maior quantidade de pares cromossômicos que estatisticamente não possuíam diferenças morfológicas de tamanho cromossômico foi *C. pulcherrima* nos pares 5, 6, 7 e 8. *C. pluviosa* var. *peltophoroides* e *C. pulcherrima* foram as únicas espécies que apresentaram pelo menos um par cromossômico que era só não era estatisticamente parecido com o par cromossômico 1.

Os dados obtidos foram avaliados pelo programa GENES que possibilitou estimar a variação do tamanho cromossômico entre as cinco espécies ($F= 6,13 \%$). De acordo com o resultado dos dados estatísticos os comprimentos cromossômicos entre e dentro das espécies diferiram significativamente ($P<0,01$). Para todas essas análises o coeficiente de variação (CV) foi menor que 15%, mostrando que os dados não possuem grande variação e que a amostragem foi adequada para o experimento (Tabela 2, 3, e 4).

Tabela 1: Cálculo do comprimento médio dos cromossomos (CM), do comprimento relativo (CR), da razão de braços (RB), do comprimento do lote haplóide (CLH), do comprimento médio dos cromossomos (X), do índice de assimetria (TF) e estabelecimento da fórmula cariotípica para as cinco espécies de *Caesalpinia* com seus respectivos desvios padrão. Médias com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

Pares de cromossomos	Espécies de <i>Caesalpinia</i>								
	<i>C. calycina</i>			<i>C. ferrea</i> var. <i>leiostachya</i>			<i>C. microphylla</i>		
	CM (µm)	CR (%)	RB (µm)	CM (µm)	CR (%)	RB (µm)	CM (µm)	CR (%)	RB (µm)
1	5,435±0,633 a	13,633	1,791	3,828±0,384 a	11,082	1,452	2,837±0,366 a	11,518	1,446
2	4,498±0,281 ab	11,284	1,635	3,547±0,264 ab	10,268	1,344	2,797±0,384 ab	11,353	1,408
3	4,178±0,414 bc	10,480	1,333	3,348±0,252 abc	9,691	1,627	2,434±0,226 abc	9,881	1,482
4	3,813±0,249 bcd	9,565	3,078	3,200±0,209 abcd	9,264	1,427	2,270±0,278 abcd	9,214	1,479
5	3,516±0,306 cde	8,819	1,977	3,052±0,287 bcd	8,835	1,426	2,097±0,315 bcde	8,511	1,557
6	3,256±0,419 def	8,167	1,935	2,925±0,281 bcde	8,467	2,169	1,988±0,246 bcde	8,068	1,231
7	3,004±0,154 ef	7,536	1,691	2,730±0,267 cdef	7,903	2,005	1,917±0,239 cde	7,780	1,626
8	2,940±0,996 efg	7,376	1,393	2,616±0,208 defg	7,574	1,743	1,844±0,243 cde	7,484	1,510
9	2,802±0,147 efg	7,029	1,426	2,584±0,192 defg	7,480	1,304	1,742±0,254 de	7,073	1,569
10	2,460±0,294 fgh	6,170	1,590	2,386±0,227 efg	6,907	1,620	1,658±0,159 de	6,730	1,503
11	2,152±0,155 gh	5,397	1,241	2,271±0,216 fg	6,575	1,755	1,573±0,208 e	6,383	1,519
12	1,811±0,159 h	4,543	1,470	2,055±0,198 g	5,949	1,468	1,478±0,160 e	5,999	1,262
CLH (µm)	39,863			34,541			24,634		
X (µm)	3,321			2,878			2,052		
TF%	36,003			39,450			39,178		
Fórmula cariotípica	8M+3SM+1ST			8M+4SM			12M		

Continua...

Tabela 1: Continuação ...

Pares de cromossomos	Espécies de <i>Caesalpinia</i>					
	<i>C. pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i>			<i>C. pulcherrima</i>		
	CM (μm)	CR (%)	RB (μm)	CM (μm)	CR (%)	RB (μm)
1	3,599 \pm 0,469 a	11,646	2,178	3,736 \pm 0,508 a	12,022	1,916
2	3,262 \pm 0,357 ab	10,556	2,338	3,151 \pm 0,348 ab	10,139	1,871
3	2,936 \pm 0,310 abc	9,500	2,148	2,962 \pm 0,208 abc	9,532	2,306
4	2,834 \pm 0,231 bcd	9,169	1,819	2,807 \pm 0,281 bcd	9,033	1,624
5	2,736 \pm 0,261 bcde	8,854	1,992	2,675 \pm 0,315 bcde	8,609	1,356
6	2,583 \pm 0,330 bcdef	8,358	1,679	2,613 \pm 0,291 bcde	8,410	1,578
7	2,451 \pm 0,293 cdef	7,929	1,406	2,480 \pm 0,265 bcde	7,982	1,780
8	2,362 \pm 0,307 cdef	7,644	1,892	2,357 \pm 0,293 bcde	7,584	1,661
9	2,190 \pm 0,179 def	7,087	1,754	2,259 \pm 0,305 cde	7,268	1,441
10	2,063 \pm 0,205 ef	6,674	1,823	2,109 \pm 0,350 de	6,788	1,846
11	2,014 \pm 0,213 ef	6,516	1,426	1,992 \pm 0,325 de	6,412	1,905
12	1,873 \pm 0,194 f	6,006	1,264	1,932 \pm 0,316 e	6,217	1,540
CLH (μm)	30,904			31,078		
X (μm)	2,575			2,589		
TF%	34,943			37,442		
Fórmula cariotípica	4M+8SM			6M+6SM		

Tabela 2. Resumo da ANOVA para a característica comprimento dos cromossomos entre *C. calycina*, *C. microphylla* (CM), *C. ferrea* var. *leiostachya* (CFL), *C. pluviosa* var. *peltophoroides* (CPP) e *C. pulcherrima* (CP) ($2n = 24$). Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Fontes de Variação	GL	QM
Táxons	4	2,5915
Erro	55	0,4223
CV (%)	24,21	

Tabela 3. Resumo da ANOVA para a característica comprimento cromossômico em *C. calycina* (CC), *C. microphylla* (CM), *C. ferrea* var. *leiostachya* (CFL), *C. pluviosa* var. *peltophoroides* (CPP) e *C. pulcherrima* (CP) ($2n = 24$). Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Fontes de Variação	GL	QM				
		CC	CM	CFL	CPP	CP
Táxons	11	4,8874	1,4410	0,9091	1,3743	1,3720
Erro	48	0,0980	0,0647	0,0702	0,0845	0,1055
CV (%)		9,53	8,84	13,01	11,28	12,54

A técnica de banda C foi aplicada em *C. calycina*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides* e *C. pulcherrima*, mostrando as regiões de heterocromatina no conjunto cromossômico. As bandas terminais foram mais freqüentes nas espécies do que as bandas proximais. Não foram visualizadas bandas intersticiais em nenhuma das espécies. *C. pluviosa* var. *peltophoroides* e *C. pulcherrima* obtiveram blocos pequenos de heterocromatina o contrário do observado em *C. ferrea* var. *leiostachya* e *C. calycina* que apresentaram grandes blocos de heterocromatina. Não foi obtida banda-C para *C. microphylla* (Figura 3).

Tabela 4. Resumo da ANOVA para a característica comprimento dos pares cromossômico dentro de *C. calycina* (CC), *C. microphylla* (CM), *C. ferrea* var. *leiostachya* (CFL), *C. pluviosa* var. *peltophoroides* (CPP) e *C. pulcherrima* (CP) ($2n = 24$). Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

FV	GL	QM											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CC	4	0,0984	0,2076	0,3758	0,1509	0,1738	0,1806	0,4615	0,0143	0,1192	0,1668	0,1769	0,0510
Erro	5	0,0017	0,0203	0,0041	0,0017	0,0024	0,0011	0,0030	0,0015	0,0013	0,0031	0,0623	0,0030
CV(%)		0,76	3,21	1,52	1,10	1,47	1,02	1,74	1,35	1,37	2,28	12,06	3,06
CFL	4	0,2957	0,1424	0,1293	0,0873	0,1591	0,1587	0,1316	0,0873	0,0740	0,1032	0,0940	0,0812
Erro	5	0,0010	0,0019	0,0011	0,0015	0,0022	0,0001	0,0009	0,0014	0,0010	0,0027	0,0003	0,0008
CV(%)		0,84	1,22	0,99	1,24	1,55	0,45	1,09	1,44	1,22	2,17	0,81	1,36
CM	4	0,2676	0,2964	0,0961	0,1083	0,1945	0,1183	0,1011	0,1084	0,1204	0,0510	0,0869	0,0517
Erro	5	0,0014	0,0014	0,0006	0,0013	0,0002	0,0016	0,0009	0,0012	0,0008	0,0011	0,0020	0,0002
CV(%)		1,36	1,40	0,99	1,56	0,70	2,05	1,59	1,86	1,68	2,00	2,90	1,13
CPP	4	0,4401	0,2562	0,1930	0,1074	0,1343	0,1703	0,1452	0,1589	0,0468	0,0283	0,0550	0,0129
Erro	5	0,0014	0,0023	0,0006	0,0017	0,0016	0,0003	0,0009	0,0012	0,0015	0,0018	0,0011	0,0008
CV(%)		1,05	1,47	0,86	1,46	1,48	0,68	1,27	1,46	1,78	2,09	1,68	1,62
CP	4	0,5177	0,2421	0,0873	0,1531	0,2004	0,1719	0,1403	0,1759	0,1934	0,2463	0,2622	0,2116
Erro	5	0,0023	0,0023	0,0019	0,0016	0,0016	0,0027	0,0004	0,0008	0,0011	0,0021	0,0010	0,0006
CV(%)		1,30	1,52	1,47	1,44	1,50	1,99	0,80	1,19	1,47	2,18	1,61	1,31

Tabela 6. Resumo da ANOVA para as características comprimento cromossômico entre *Caesalpinia calycina*, *C. microphylla*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides* e *C. pulcherrima* ($2n = 24$). Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

FV	GL	QM											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Espécies	4	3,6294	2,3249	2,1083	1,6208	1,3606	,08954	0,8103	,08111	0,8197	0,5020	0,3492	0,2341
Erro	20	0,2325	0,1094	0,0853	0,0632	0,0887	0,1020	0,0618	0,0586	0,0489	0,0658	0,0532	0,0457
CV(%)		12,60	9,66	9,21	8,42	10,58	12,10	9,88	9,99	9,55	12,01	11,53	11,68

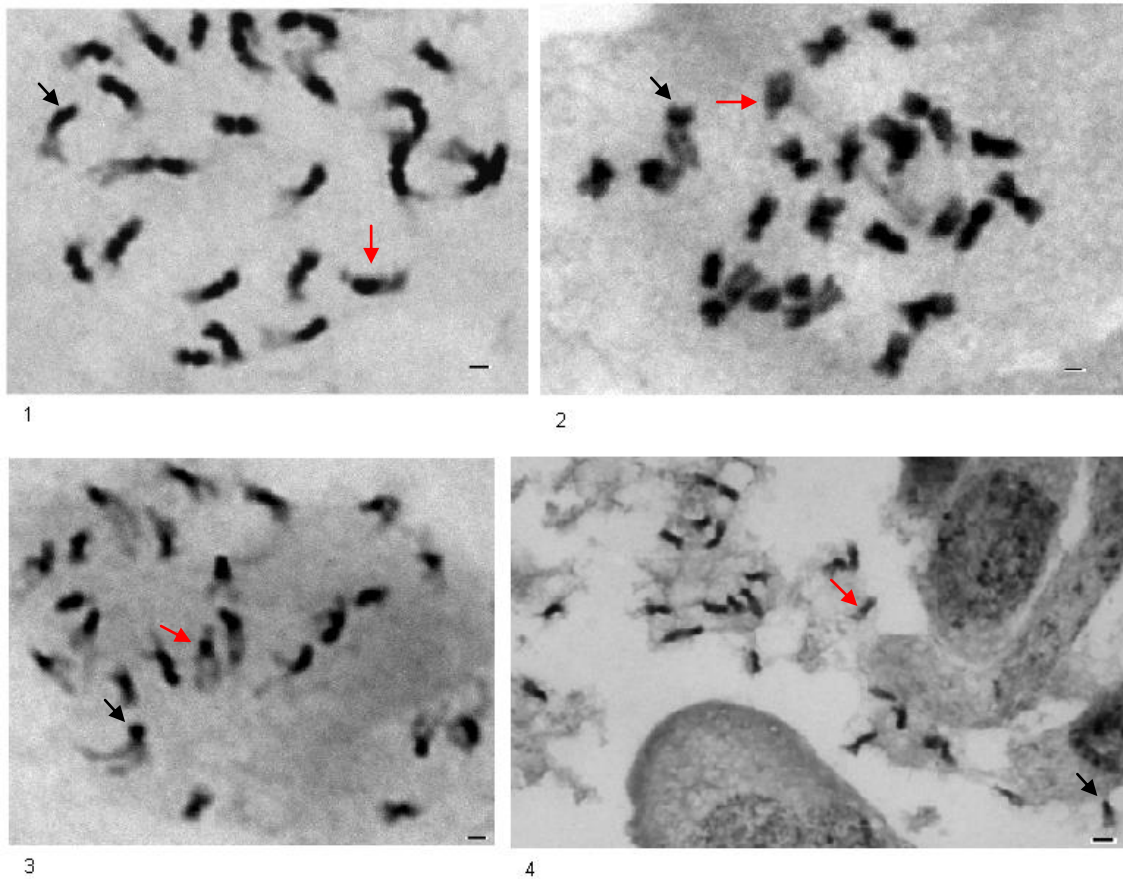


Figura 3: Banda-C em *C. calycina* (1), *C. ferrea* var. *leiostachya* (2), *C. pluviosa* var. *peltophoroides* (3), *C. pulcherrima* (4). Setas pretas indicam banda-C terminais e setas vermelhas Banda-C proximais. Barra equivale a 10 μ m.

4. Discussão

O gênero *Caesalpinia* é caracterizado por problemas filogenéticos principalmente devido à dificuldade na área de sistemática em separar as espécies dentro do gênero, o que leva a constantes rearranjos nos estudos filogenéticos. Apesar disso, dados citogenéticos que auxiliam em estudos de sistemática, são escassos neste gênero. Visando minimizar a carência de dados e subsidiar os estudos de evolução dentro do grupo, cinco espécies de *Caesalpinia* foram caracterizadas citogeneticamente.

Com o pré-tratamento de seis horas em 8-hidroquinoleína foi possível encontrar cerca de 10 metáfases espalhadas por lâminas para as cinco espécies em estudo. *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. microphylla*, *C. pulcherrima* e *C. calycina* apresentaram o mesmo número cromossômico $2n=24$, o que corrobora com dados da literatura para o grupo

Caesalpinia (BIONDO et al., 2005; CIPRIANO, BERNARDELLO, 2005). As metáfases escolhidas para a análise numérica encontravam-se isoladas, possibilitando evitar erros na contagem dos cromossomos.

Entretanto, foram observadas dissimilaridades morfológicas nos cariótipos das espécies em estudo as quais apresentaram diferenças na presença e localização dos satélites, detectáveis pela técnica de citogenética clássica, e na morfologia e tamanho cromossômicos. Os satélites foram observados nas cinco espécies, para *C. calycina*, *C. microphylla*, *C. ferrea* var. *leiostachya* e *C. pulcherrima* dois pares de satélites foram visualizados, entretanto variaram no tamanho, na posição nos braços e nos pares em que se encontravam. Três pares de satélites foram detectados em *C. pluviosa* var. *peltophoroides*. O segundo par cromossômico foi o que, com mais freqüência, exibiu os satélites, o que foi verificado em *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. microphylla* e *C. pluviosa* var. *peltophoroides*. A presença de satélites no par 3 e no par 4 foi verificada apenas em *C. pluviosa* var. *peltophoroides* e *C. pulcherrima*, respectivamente. Essas variações morfológicas são normais, embora a tendência de espécies relacionadas seja a de manter um padrão cariotípico similar. Variações morfológicas podem ser encontradas também em diferentes populações de uma mesma espécie (SOUZA, BENKO-ISEPPON, 2004). Ainda que cromossomos satelitados não sejam comuns em Caesalpinioideae (KUMARI, BIR, 1989; SOUZA, BENKO-ISEPPON, 2004), todas as cinco espécies estudadas apresentaram satélites assim como nos estudos feitos por Cangiano e Bernardello (2005). Contudo, no presente trabalho, não foi possível investigar um maior número de indivíduos por população.

Dentre as espécies aqui estudadas, *C. pulcherrima* e *C. ferrea* var. *leiostachya* tiveram seu número cromossômico confirmados como $2n=24$. As outras três (*C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. calycina* e *C. microphylla*) tiveram seu número cromossômico descrito pela primeira vez como sendo $2n=24$, demonstrando que esse padrão é mais uma vez sustentado como o número diplóide comum em *Caesalpinia*.

Os dados cariomorfológicos foram obtidos pela primeira vez para as cinco espécies abordadas neste trabalho. As medições cromossômicas possibilitaram estabelecer o comprimento médio e índice de assimetria dessas

espécies (Tabela 1). O comprimento médio dos cromossomos variou de 3,33 µm em *C. calycina* a 2,05 µm em *C. microphylla*. Em outras espécies de *Caesalpinia* (*C. gilliesii*, *C. paraguariensis* e *C. mimosifolia*), a média do tamanho cromossômico foi de 1,90 µm (CANGIANO; BERNARDELLO, 2005). Dentro da subfamília Caesalpinioideae o tamanho cromossômico encontrado por Auler (1997) e Biondo et al., (2005) foi de 2 µm ou menos. O comprimento do lote haplóide variou de 39,86 µm em *C. calycina* a 24,63 µm em *C. microphylla* o que corrobora com o encontrado por Cangiano & Bernardello (2005) que obteve o CLH variando de 20.67 µm a 24.74 µm. O índice de assimetria variou de 39,45 % em *C. ferrea* var. *leiostachya* a 34,94 % em *C. pluviosa* var. *peltophoroides* o que permite inferir que *C. ferrea* var. *leiostachya* é a mais ancestral e *C. pluviosa* var. *peltophoroides* a mais derivada das cinco espécies estudadas quanto à morfologia cromossômica. Entretanto o TF % não variou consideravelmente entre as outras três espécies, sendo 37,44 % em *C. pulcherrima*, 39,17 % em *C. microphylla* e 36,00 % em *C. calycina*. Isso permite inferir que a pressão evolutiva que essas espécies vêm sofrendo ocorre quase que na mesma intensidade.

As diferenças intra-específicas e inter-específicas quanto ao tamanho cromossômico foram significativas ($P < 0,01$).

As fórmulas cariotípicas estabelecidas neste trabalho para *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. microphylla*, *C. pulcherrima*, *C. ferrea* var. *leiostachya* e *C. calycina*, demonstraram prevalência de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Essa mesma tendência foi observada em Caesalpinioideae por Stebbins (1971), por Souza & Benko-Iseppon (2004), por Kumari & Bir (1989), e por Auler (1997). Embora seja rara a presença de cromossomos subteloicêntricos na subfamília (KUMARI, BIR, 1989), um par foi observado em *C. calycina*. De acordo com Stebbins (1971), a assimetria cariotípica está envolvida e relacionada com a especiação, sendo os simétricos mais primitivos. Entretanto, apesar de *C. microphylla* possuir doze pares de cromossomos metacêntricos, possuindo o cariótipo mais simétrico, foi a que mostrou o segundo maior índice de assimetria entre as espécies estudadas.

A técnica de banda-C possibilitou evidenciar que as regiões proximais e teloméricas foram os locais preferenciais da heterocromatina em *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. pulcherrima* e *C. calycina*, não

sendo encontradas bandas intersticiais. Esse está corroborando as análises de Guerra (2000), as quais indicam que espécies com cromossomos pequenos geralmente não apresentam heterocromatina intersticial. As espécies *C. pluviosa* var. *peltophoroides* e *C. pulcherrima* foram as que exibiram pequenos blocos de heterocromatina, ao passo que *C. ferrea* var. *leiostachya* e *C. calycina* apresentaram grandes blocos de heterocromatina. Entretanto, nas quatro espécies estudadas, há pelo menos um par de cromossomos quase que totalmente heterocromático. Não foi obtida banda-C para *C. microphylla*. Este é o primeiro estudo dentro do grupo na qual a técnica de banda-C foi aplicada.

Estudos futuros por meio de outras técnicas citogenéticas com essas e outras espécies de *Caesalpinia*, tais como banda-NOR, DAPI/CMA e FISH, são necessários para melhor inferir sobre a evolução cariotípica dentro do grupo. Além disso, poderão explicitar pequenas diferenças entre as espécies, quanto a morfologia de seus cromossomos, tais como regiões organizadores nucleolares, as quais não foram detectadas na presente análise.

5. Conclusões e perspectivas

As cinco espécies estudadas apresentam o número cromossômico considerado típico de *Caesalpinia* ($2n=24$) e possuem fórmulas cariotípicas distintas.

O cariótipo mais simétrico e com todos 12 pares de cromossomos metacêntricos de *C. microphylla*, características considerada primitivas, apresentou o segundo maior índice de assimetria, uma característica considerada derivada.

Sugere-se emprego de técnicas de citogenética molecular e a análise de um maior número de espécies para melhor compreender a evolução cariotípica de *Caesalpinia*.

6. Agradecimentos

Ao José Lima da Paixão, pela colaboração na coleta e identificação botânica do material; à Patrícia Nayara Caldas, Vanderly Andrade Souza, Graziela Feitosa e Olívia Maria Duarte, pelos auxílios nas técnicas

citogenéticas; à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de Mestrado a P.S.R.; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro concedido ao projeto PADCT.

7. Referência bibliográfica

AULER, N. M. Estudo citogenético e anatomia de madeira de *Apuleia leiocarpa*. Santa Maria: UFSM, 1997.

BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 4, p. 797-808, 2005.

CIPRIANO, M. A.; BERNARDELLO, G. Karyotype analysis in Argentinean species of Caesalpinia (Leguminosae). **Caryologia**, v. 58, n. 3, p. 262-268, 2005.

CRUZ, C. D. Programa Genes (Versão Windows), Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. Imprensa universitária UFV, Viçosa, Brasil.

CUCO, S. M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M. L. C.; AGUIAR-PERCIN, M. L. R. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botânica Brasílica**, v. 17, n. 3, p. 363-370, 2003.

GUERRA, M. S. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara S. A., 1988, 142 p.

GUERA, M. Patterns of distribution heterochromatin in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC-Editora, 2002, 131 p.

KUMARI, S.; BIR, S. S. Karyomorphological evolution in Caesalpinaceae. **Journal of Cytology and Genetics**, v. 24, p. 149-163, 1989.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

LIU, H.; YAN, G.; SHAN, F.; SEDGLEY, R. Karyotypes in *Leucadendron* (Proteaceae): evidence of the primitiveness of the genus. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 151, p. 387-394, 2006.

PEDROSA, A.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 361-367, 2000.

SHAN, F.; YAN, G.; PLUMMER, J. A. Karyotype evolution in the genus *Boronia* (Rutaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 142, p. 309-320, 2003.

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

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: Addison-Wisley Publishing Company, 1971. 216 p.

SUMNER, A. T. **Chromosomes Organization and Function**. London: Blackwell Science, 2003, 203 p.

VILATERSANA, R.; SUSANNA, A.; GARCIA-JACAS, N.; GARNATJE, T. Karyology, generic delineation and dysploidy in the genera *Carduncellus*, *Carthamus* and *Phonus* (Asteraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 134, p. 425-438, 2000.

CAPÍTULO 2: Testes de transferência de *primers* SSR de *Caesalpinia echinata* para outras espécies do gênero

Polliana da Silva Rodrigues, Fabrício do Sacramento Juchum, Fernanda Amato Gaiotto, Ronan Xavier Corrêa

Resumo

A aplicação das técnicas moleculares para a conservação genética tem tornado possível o exame da genética de espécies em risco de extinção e sua análise tem sido amplamente utilizada em pesquisa de conservação. Dentre os marcadores mais utilizados com esta finalidade estão os microssatélites (SSR) que possuem alto conteúdo de informação. Porém, possuem alto custo e dificuldade de desenvolvimento. Com base nisso, a conservação dos sítios microssatélites entre espécies ou mesmo entre gêneros torna possível a transferência desses marcadores entre espécies relacionadas. A transferência de *primers* SSR reduz os custos da técnica, fator que tem limitado seu uso. Assim, buscou-se testar a transferência de 11 *primers* SSR desenvolvidos para *Caesalpinia echinata* em oito espécies de *Caesalpinia*. Amostras de DNA de *C. microphylla*, *C. echinata* (controle), *C. laxiflora*, *C. calycina*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. pulcherrima*, *C. bracteosa* e *C. pyramidalis* foram amplificadas por PCR para a obtenção de fragmentos microssatélites de tamanhos esperados conhecidos para *C. echinata*. Destes, o *primer* CE09 amplificou padrão compatível com regiões microssatélites em seis das oito espécies estudadas e os demais 10 *primers* requerem novos testes com modificações de temperatura para confirmação das ampliações. O *primer* CE09 e os demais que apresentarem padrões de amplificação típicos de SSR devem ser utilizados futuramente em populações representativas de cada

espécie para determinação dos parâmetros populacionais.

Palavras-chave: Microssatélite, Caesalpinioideae, Genética populacional, conservação.

Abstract

Molecular techniques have been applying for conservation genetic evaluating species in risk of extinction. Microsatellite markers (SSR) are widely used in conservation researches, mainly those with high content of information. However, its markers are very expensive and of hard development. Additionally, conserved sites between species or genera begin possible transfer its markers to related species. The transference of SSR primers reduces the cost of the technique. Thus, we test the transfer of 11 primers SSR developed to *C. echinata* in eight species of *Caesalpinia*. DNA samples of *C. microphylla*, *C. echinata* (control), *C. laxiflora*, *C. calycina*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. pulcherrima*, *C. bracteosa* and *C. pyramidalis* were amplified by PCR. Microsatellites primers produced fragments with expected sizes to *C. echinata*. The primer CE09 amplified six of the eight analyzed species. Furthermore, another 10 primers require new amplifications tests. CE09 and others selected primers should be useful in future studies producing population parameters of the analyzed species.

Key words: Microsatellite, Caesalpinioideae, Population Genetics, Conservation.

1. Introdução

Diversas técnicas de Biologia Molecular estão disponíveis para a detecção de variabilidade genética em nível de seqüência ou de polimorfismos de comprimento de fragmentos de DNA. O desenvolvimento tecnológico na área de marcadores moleculares tem sido fascinante e extremamente rápido, sendo a análise das variações no DNA muito importante em estudos genéticos, tornando os marcadores moleculares uma ferramenta útil para análise da

variação genética. Além disso, é crucial para efetiva conservação e exploração de recursos genéticos vegetais para programas de melhoramento (VARSHNEY et al., 2005). Dentre os marcadores codominantes, os microssatélites (SSR) são considerados os mais adequados para estudos populacionais.

A conservação de sítios microssatélites conservados entre espécies ou mesmo entre gêneros torna possível a transferência de marcadores entre espécies relacionadas, usando-se *primers* heterólogos. Essa característica dos microssatélites é conhecida como transferibilidade, condicionada por homologia de seqüências de DNA entre espécies relacionadas. Tal prática é muito importante para facilitar o uso de SSR, pois reduz os custos de desenvolvimento dessa ferramenta (OLIVEIRA et al., 2006). Essa transferência pode ocorrer entre espécies do mesmo gênero (ISAGI; SUHANDONO, 1997; CIPRIANI et al., 1999) ou mesmo entre diferentes gêneros de uma mesma família (WHITE; POWELL, 1997; ROA et al., 2000; ZUCCHI et al., 2002).

Os marcadores SSR estão disponíveis para poucas espécies arbóreas e, dentre as cerca de 170 espécies de *Caesalpinia*, apenas *C. echinata* dispõe de marcadores SSR disponíveis (MELO et al., 2007). Desta forma, 11 *primers* de *C. echinata* foram testados na amplificação de sete espécies de *Caesalpinia*, visando disponibilizar essa ferramenta para os estudos de diversidade aplicada à conservação.

2. Material e métodos

2.1. Material foliar

As coletas de amostras foliares de *C. microphylla*, *C. echinata*, *C. laxiflora*, *C. calycina*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. pulcherrima*, *C. bracteosa* e *C. pyramidalis* foram feitas na Bahia, em áreas de Mata atlântica e Caatinga, nas cidades de Xique-Xique, Potiraguá, Itapetinga, Livramento de Brumado, Ilhéus, Itabuna e Almadina (Figura 1).

O material foliar de dois exemplares de cada espécie foi coletado e armazenado em sílica gel até o momento da extração do DNA. Além destas, foram coletadas amostras para obtenção de Vouchers utilizados na identificação do material biológico que se encontram no Herbário da UESC (Tabela 1).



Figura 1. Cidades nas quais as coleta das amostras foliares foram obtidas (Fonte: Google Earth)

Tabela 1. Localidades das coletas das amostras foliares nas regiões de Caatinga e Mata Atlântica

Espécies	Município	Datas
<i>C. bracteosa</i>	Livramento de Brumado	04-04-07
<i>C. calycina</i>	Livramento de Brumado	04-04-07
<i>C. ferrea</i> var. <i>leiostachya</i>	Ilhéus	21-02-07
<i>C. laxiflora</i>	Livramento de Brumado	04-04-07
<i>C. microphylla</i>	Xique-Xique	05-04-07
<i>C. pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i>	Potiraguá	19-08-06
	Almadina	18-02-07
<i>C. pulcherrima</i>	Itabuna	15-05-07
<i>C. pyramidalis</i>	Livramento de Brumado	04-04-07

2.2. Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído do material foliar pelo método CTAB de Doyle e Doyle (1990) modificado, juntamente com o protocolo de Jobes et al. (1995).

2.3. Análises Moleculares

As amostras de DNA extraídas de folhas foram submetidas a reações de PCR contendo os 11 pares de *primers* padronizados para a amplificação de regiões de microssatélites em *C. echinata* (MELLO et al., 2007). A mistura para a realização da reação da polimerase em cadeia (PCR) contendo 13 µl foi composta por 7,5 ng de DNA genômico por passo, dNTPs a 250 µM, MgCl₂ a 0,75 µM, tampão para PCR 1X (Tris-HCl a 10 mM, KCl a 50 mM, MgCl₂ a 2,25 mM, pH 8.3), BSA a 2,5 µg/µl, cada “*primer*” a 0,2 µM, e 1U de *Taq* DNA polimerase. Amostra de DNA de *C. echinata* (7,5 ng) foi utilizada como controle nas reações PCR dos 11 *primers*.

As amplificações foram realizadas em termociclador programado para: um passo inicial a 96 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 50 °C e 53 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e terminando com um passo a 72 °C por 7 minutos. A análise prévia dos testes de amplificação foi visualizada pela eletroforese em gel de agarose a 3%.

3. Resultados

A qualidade do DNA extraído variou entre *C. microphylla*, *C. echinata*, *C. laxiflora*, *C. calycina*, *C. ferrea* var. *leiostachya*, *C. pluviosa* var. *peltophoroides*, *C. pulcherrima*, *C. bracteosa* e *C. pyramidalis* e o produto da extração foi quantificado e visualizado em gel de agarose 3% (Figura 2A).

Para certificar se as amostras de DNA aparentemente degradado (amostras 4 e 8 e 12 e 16, Figura 2A) eram amplificáveis, foi feito um PCR utilizando o *primer trnL*, sabidamente funcional em *C. echinata*, com as amostras 6, 9, 14 e 18, comprovando-se amplificação satisfatória (Figura 2B).

Os testes de amplificação com os *primers* de *C. echinata* com as temperaturas de 50 °C e 53 °C obtiveram taxas satisfatórias de transferência, com 62 %, dentro do grupo *Caesalpinia*. Os *primers* CE 09, CE 07 e CE 18 obtiveram maior sucesso nos testes de transferências amplificando para todas as sete espécies utilizadas. Os resultados mostram que *C. microphylla* foi a espécie que obteve maior taxa de transferência não amplificando apenas para os *primers* CE 02 e CE 11. À temperatura de 53°C a taxa de amplificação foi

menor, porém a espécie com maior sucesso na amplificação foi *C. laxiflora* que obteve transferência em sete dos onze *primers* testados. (Tabela 2).

O *primer* CE 09 foi o que melhor apresentou bandas típicas de microssatélites, obtendo melhor padrão de bandas esperadas a temperatura de 50 °C. O *primer* CE 24 demonstrou poucas bandas típicas de microssatélites nas duas temperaturas testadas, 50 °C e 53 °C. (Figura 3).

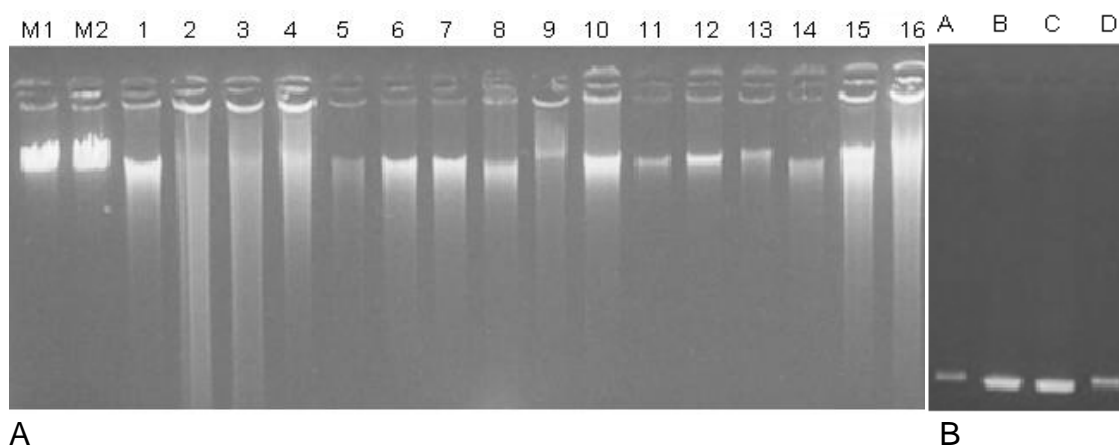


Figura 2: Amostras de DNA total de oito espécies de *Caesalpinia*. A) M1 e M2, marcadores moleculares de 100 e 200 Kb, respectivamente; 1 e 2, *C. echinata*; 3 e 4, *C. pluviosa* var. *peltophoroides*; 5 e 6, *C. pyramidalis*; 7 e 8, *C. bracteosa*; 9 e 10, *C. calycina*; 11 e 12 *C. pulcherrima*; 13 e 14, *C. laxiflora*; 15 e 16, *C. microphylla*. B) Produto da amplificação com o *primer* *trnL* a partir de amostras de DNA de *C. pluviosa* var. *peltophoroides* (A), *C. bracteosa* (B), *C. pulcherrima* (C) e *C. microphylla* (D).

Tabela 2. Avaliação dos padrões de amplificação do DNA de oito espécies de *Caesalpinia* com 11 *primers* SSR desenvolvidos para *C. echinata* a temperatura de 50 °C (primeiro sinal) e 53 °C (segundo sinal): (+) = amplificou banda típica e do tamanho esperado para o microssatélite; (-) = não amplificou banda típica de microssatélite.

Espécies	Primers SSR										
	CE 02	CE 07	CE 09	CE 11	CE 14	CE 18	CE 19	CE 23	CE 24	CE 25	CE 26
<i>C. echinata</i>	--	+-	++	+-	+-	+-	--	--	+-	--	--
<i>C. calycina</i>	+-	+-	+-	--	--	+-	+-	--	--	+-	--
<i>C. laxiflora</i>	--	+-	++	--	+-	++	--	++	+-	++	+-
<i>C. pulcherrima</i>	+-	+-	++	--	--	+-	--	--	--	+-	--
<i>C. microphylla</i>	--	+-	++	--	++	+-	++	++	++	+-	++
<i>C. bracteosa</i>	--	+-	+-	--	+-	+-	--	--	--	+-	--
<i>C. pyramidalis</i>	--	+-	++	--	--	+-	--	++	+-	--	--
<i>C. pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i>	+-	+-	+-	+-	--	+	--	--	+-	+-	--

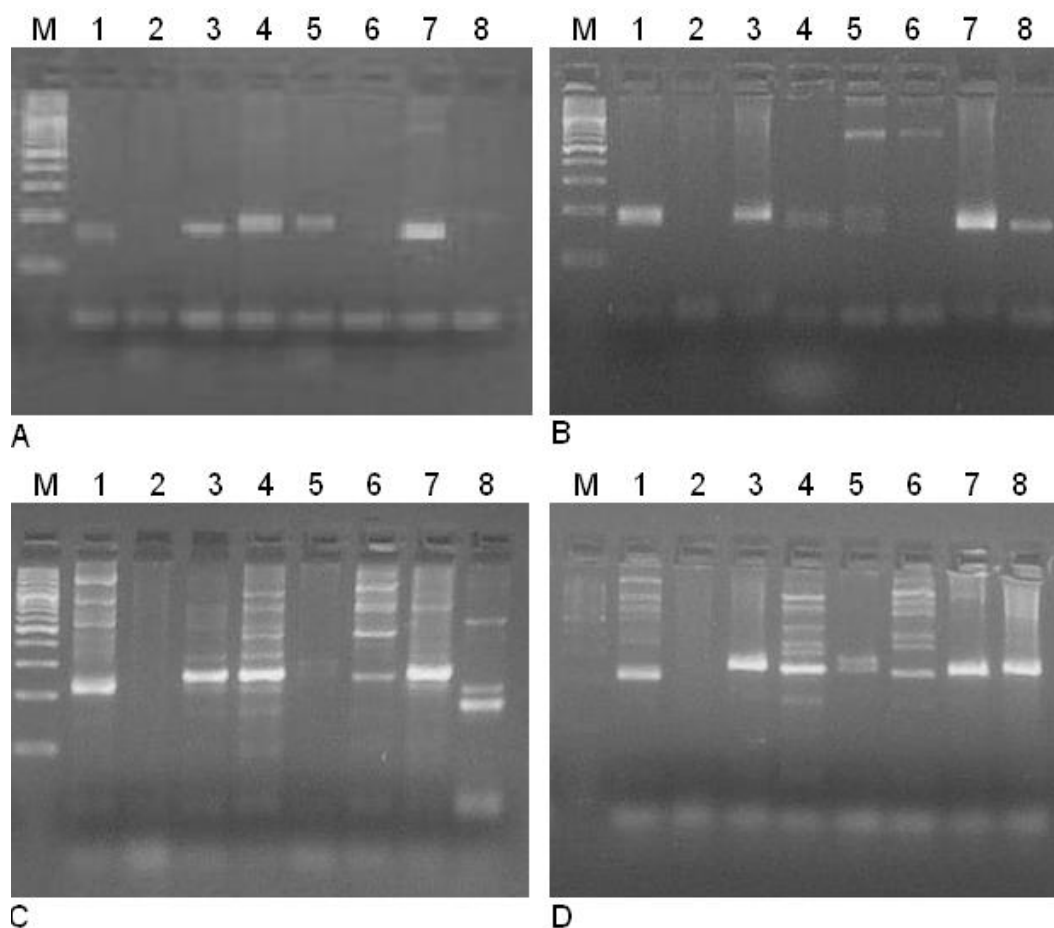


Figura 3. Padrão eletroforético dos produtos de amplificação com dois *primers* SSR de *Caesalpinia echinata* (CE09: A e B; e CE24: C e D) em: *C. echinata* (1); *C. calycina* (2); *C. laxiflora* (3); *C. pulcherrima* (4); *C. microphylla* (5); *C. bracteosa* (6); *C. pyramidalis* (7); e *C. pluviosa* var. *peltophoroides* (8). Temperatura de anelamento de *primers*: 50 °C (A e C) e 53 °C (B e D).

4. Discussão

Os marcadores microssatélite são amplamente utilizados na obtenção de dados para estudos de conservação, entretanto a etapa de desenvolvimento é laboriosa e de alto custo. Por isso a técnica de transferências de *primers* SSR entre espécies relacionadas é amplamente utilizada visando minimizar a limitação de seu uso como feito no presente trabalho.

As espécies *C. calycina*, *C. pyramidalis*, *C. microphylla* e *C. laxiflora*, coletadas em área de Caatinga, tiveram que sofrer adaptações no protocolo. Apesar disso, o DNA obtido continuava degradado e temendo não ser suficiente para a amplificação, um teste preliminar com *primers trnL* foi realizado mostrando que a amplificação com *primers* era possível. Isso

demonstra que além do teste de qualidade visualizado em gel de agarose a 3%, deve-se proceder ao teste de amplificação do DNA obtido.

Os testes preliminares visando observar se há transferibilidade dos *primers* SSR desenvolvidos para *C. echinata* em outras espécies do gênero confirmam que há grande potencial para sua utilização no grupo de espécies avaliado. Entre cinco e nove dos 11 *primers* testados apresentaram evidência de amplificação típica de microssatélite nas diferentes espécies. Estes resultados serão úteis em estudos futuros na análise de diversidade dentro e entre espécies e populações.

Os primeiros ensaios de transferência com os *primers* SSR de *C. echinata* foram submetidos para todas as sete espécies estudadas nas temperaturas de 53 °C e 50 °C e a amplificação de algumas espécies puderam ser observadas. Outros trabalhos com este intuito foram desenvolvidos dentro do mesmo gênero como o de *Cicer raticulatum* (SETHY et al., 2006), o de *Prunus percica* L. (CIPRIANI et al., 1999), *Olean europeae* L. (RALLO et al., 2003), *Oriza sativa* (BRONDANI et al., 2003). Para estes, houve uma taxa de transferência de 97%, 59%, 86% e 37% respectivamente, o que corrobora com o nível de transferência observada com os *primers* de *C. echinata* no presente estudo que foi 62%. Acredita-se que o nível de transferência pode ser melhorado com mudanças na temperatura de amplificação para os *primers* que não tiveram boa transferibilidade dentro do gênero.

A taxa de amplificação entre espécies relacionadas varia de acordo com nível de relação sistemática como demonstrado por Isagi e Suhandono (1997) em diferentes espécies de *Quercus* onde a taxa de transferência variou de 22% a 94% dependendo assim do nível de proximidade entre elas. Entretanto, Pieratoni et al. (2004) obteve altas taxas de transferência entre espécies de gêneros diferentes. Dessa forma, fica claro que o sucesso da taxa de amplificação depende do nível de divergência genética. Em plantas, os locos conservados de microssatélites têm sido observados principalmente entre cultivares, subespécies e espécies relacionadas (MÉTAIS et al., 2002), fornecendo informações relevantes para identificar unidades de conservação.

5. Conclusões e perspectivas

O *primer* CE09 produziu padrão de amplificação típico de SSR para seis espécies de *Caesalpinia* e, juntamente com os demais que forem identificados em novos testes de transferência, deverá ser utilizado para genotipar pelo menos 20 diferentes acessos por espécie para proceder com as estimativas dos parâmetros de caracterização de cada *primer*.

Os produtos das amplificações dos testes de transferência deverão ser analisados em eletroforese em gel de poliacrilamida e corados com prata para resolução adequada dos alelos produzidos.

6. Agradecimentos

Ao José Lima da Paixão e Fabrício Juchum, pela colaboração na coleta e identificação botânica do material; à Mariana Araújo Barreto e ao Fabrício Sacramento Juchum, pelos auxílios nas técnicas moleculares; à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de Mestrado a P.S.R.; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro concedido ao projeto PADCT.

7. Referência bibliográfica

BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; BORBA, T. C. O.; BRONDANI, R. P. V. Trasferability of microsatellite and sequence tagged site markers in *Oryza* species. **Hereditas**, v.138, p. 187-192, 2003.

CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W. G.; MARRAZZO, M. T.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. AC/ GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical Application Genetic**, v. 99, p. 65-72, 1999.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

ISAGI, Y.; SUHANDONO, S. PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 897-899, 1997.

JOBES, D. V.; HURLEY, D. L.; THIEN, L. B. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides and RNA. **Taxon**, v. 44, p. 349-386, 1995.

MELO, S. C. O.; GAIOTTO, F. A.; CUPERTINO, F. B.; CORRÊA, R. X.; REIS, A. M. M.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R. P. V. Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. **Conservation Genetic**, v. 8, p. 1269-1271, 2007.

MÉTAIS, I.; HAMON, B.; JALOUZOT, R.; PELTIER, D. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. **Theoretical Application Genetic**, v. 104, p.1346-1352, 2002.

OLIVEIRA E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVCKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular biology**, n. 39, v. 2, p. 294-307, 2006.

PIERATONI, L.; CHO, K. H.; SHIN, I, S.; CHIODINI, R.; TARTARINI, S.; DONDINI, L.; KANG, S. J.; SANSVINI, S. Characterization and transferability of apple SSRs to two European pear F₁ population. **Theoretical Application Genetic**, v. 109, p. 1519-1524, 2004.

RALLO, P.; TENZER, I.; GESSLER, C.; BALDONI, L.; DORADO, G.; MARTÍN, A. Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. **Theoretical Application Genetic**, v. 107, p. 940-946, 2003.

ROA, A. C.; AGUIRRE, P. C.; DUQUE, M. C.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; IGLESIAS, C.; TOHME, J. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 11, p. 1647-1655, 2000.

SETHY, N. K.; CHOUDHARY, S.; SHOKEEN, B.; BHATIA, S. Identification of microsatellite markers from *Cicer reticulatum*: molecular variation and phylogenetic analysis. **Theoretical Application Genetic**, v. 112, p. 347-357, 2006.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and application. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005.

WHITE, G.; POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 851-860, 1997.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* ssp. To *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 512-513, 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

Com as análises citogenéticas feita em cinco espécies de *Caesalpinia* foi possível observar que a espécies mais derivada quanto ao cariótipo foi *C. pluviosa* var. *peltophoroides*. Entretanto, uma análise mais ampla das espécies de *Caesalpinia* contribuirá para uma visão evolutiva sobre esse grupo, uma vez que o mesmo é pouco conhecido citogeneticamente.

O nível de transferência de *primers* de *C. echinata* para as demais espécies *Caesalpinia*, relativamente à temperatura de 50 °C e 53 °C, foram satisfatórios para demonstrar o potencial de transferência entre as espécies desse gênero. Os testes de transferência requererem continuidade no que se refere à temperatura de anelamento, eletroforese em poliacrilamida e determinação dos respectivos parâmetros populacionais, bem como poder de inferência genética associado a cada loco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

ALBUQUERQUE U.P, ANDRADE A. H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2001.

ALEJANDRA, C. M.; BERNARDELLO, G. Karyotype analysis in Argentinean species of *Caesalpinia* (Leguminosae). **Caryologia**, v. 58, n. 3, p. 262-268, 2005.

AGAREZ, F. V.; VINCENS, R. S.; CRUZ, C. M.; NOGUEIRA, C. R.; GARAY, I. Utilização de índice de vegetação na classificação integrada de fragmentos florestais em Mata Atlântica de Tabuleiros no Município de Sooretana, ES. **Anais SBSR**, Foz do Iguaçu: INPE, p. 1499-1507, 2001.

AVISE, J. C. **Molecular Markers: Natural History and Evolution**. New York. Chapman e Hall, 2004, 511 p.

BANKS, H.; KLITGAARD, B. B. Palynological contribution to the systematic of detarioid legumes (Leguminosae: Caesalpinioideae). **In**: Advances in legume systematic, part 9, eds. Herendeen, p. s. and Bruneau, A. Kew: Royal Botanical Gardens. 2000.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASSO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 1984, 377 p.

BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 4, p. 797-808, 2005.

CARDOSO, M. A.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P. C. G.; OLIVEIRA, D. E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**, v. 7, p. 601-608, 1998.

CÂMARA, IG (2005) Breve história da conservação da Mata Atlântica. **In**: Galindo-Leal C, Câmara IG (eds) Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e

perspectivas Fundação SOS Mata Atlântica. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005, p.31-42.

CHASE, M. R.; KESSELI, R.; BAWA, K. S. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, v. 83, p. 51-57, 1996.

CORRÊA, X. C. **Genes de resistência ao feijoeiro**: identificação de marcadores moleculares, organização e identificação de análogos. 1999. 116 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

DAYANANDAN, S.; BAWA, K. S.; KESSELI, R. Conservation of microsatellite among tropical tree (Leguminosae). **American Journal Botanical**, v. 84, p. 1658-1663, 1997.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; BALLENGER, J.A.; DICKSON, E.E.; KAJITA, T.; OHASHI, H. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcl* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. **American Journal of Botany**, v. 84, p. 541-554, 1997.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares**. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995, 220 p.

FRANKHAM, R. Quantitative genetics in conservation biology. **Genetic Research Camb**, v. 326, p. 237-244, 1999.

GOLDBLATT, P. Cytology and the phylogeny of Leguminosae. **In**: Advances in Legume Systematics (R. M. Polhill & P. R. Raven, eds.). Royal Botanical Gardens, Kew, part 2, p. 427-463, 1981.

GUERRA, M. S., **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara S.A, 1988. 142 p.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC-Editora, 2002, 131 p.

GUERRA, M. What is new on plant cytogenetics? **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 444-445, 2005.

HASTON, E. M.; LEWIS, G. P.; HAWKINS, J. A. A phylogenetic reappraisal of the *Peltophorum* group (Caesalpiniae: Leguminosae) based on the chloroplast *TRNL-F*, *RBCL* e *RPS16* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 8, p. 1359-1371, 2005.

HERENDEEN, P. S. Structural evolution in the Caesalpinioideae (Leguminosae). **In**: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. (Eds.) Advances in Legume Systematics. Kew: Royal Botanic Garden, p. 45-64, 2000.

IUCN, 2007. Red List of Threatened species. Available via <http://www.iuncredlist.org>. Cited on February 07 2008.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Editora Universitária, 2003.

LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; LACHER, T. E. JR. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 139-146, 2005.

LEWIS, G. P. **Caesalpinia, a revision of the Poincianella – Erythrostemon group**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1998, p. 233.

LEWIS, G. P.; SIMPSON, B. B.; NEFF, J. L. Progress in understanding the reproductive biology of the Caesalpinioideae (Leguminosae). In: P. S. Herendeen and Breuneau (editors). *Advances in legume systematic*, Royal botanic Gardens, Kew, Richmond, UK, v. 9, p. 65-78, 2000.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Eds). **Legumes of the World**. Kew: Royal Botanical Garden, 2005, 592 p.

LIRA, C. F.; CARDOSO, S. R. S., FERREIRA, P. C. G. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3219-3225, 2003.

LIU, H.; YAN, G.; SHAN, F.; SEDGLEY, R.. Karyotypes in *Leucadendron* (Proteaceae): evidence of the primitiveness of the genus. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 151. p. 387-394, 2006

MELO, S. C. O., CORRÊA, R. X. **Estrutura Genética e Fluxo Gênico em *Caesalpinia ecginata* (Pau-brasil) por meio de Marcadores Microsatélites**. 2005. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2005.

MELO, S. C. O.; GAIOTTO, F. A.; CUPERTINO, F. B.; CORRÊA, R. X.; REIS, A. M. M. R.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R. P. V. Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. **Conservation Genetic**, v. 8, p. 1269-1271, 2007.

MMA – Ministério do Meio Ambiente, dos recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. **Consevation International do Brasil**, Fundação SOS Mata Atlântica e Fundação Biodiversitas, Brasília, 2000.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-873, 2000.

- O'HANLON, P.C, PERKALL, R. and BRIESE, D. T. A review of new PCR-based genetic markers and their utility to weed ecology. **Weed Research**, v. 40, p. 239-254, 2000.
- OLIVEIRA E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVCKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, n. 39, v. 2, p. 294-307, 2006.
- OUBORG, N.J.; PIQUOT, Y.; GROENENDAEL, J. M. V. Populations genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, v. 87, p. 551-568, 1990.
- OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; GROENENDAEL, J. M. V. Populations genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, v. 87, p. 551-568, 1999.
- PEDROSA, A.; GITAÍ, J.; SILVA, A. E. B.; FELIX, L. P.; GUERRA, M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – V. **Acta Botanica Brasílica**, v. 13, p. 49-60, 1999.
- PEDROSA, A.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 361-367, 2000.
- POLHILL, R. M. Classification of the Leguminosae. *In*: Phytochemical Dictionary of the Leguminosae (F. A. Bisby, J. Buckingham & J. B. Harbone, eds.). Chapman & Hall, **London**, v. 1, p. 35-54, 1994.
- POVOA, J.S.R; LACERDA, A. L. M.; CIAMPI, A. Y. Análise genética de uma espécie alvo nativa do semi-árido utilizando-se marcador RAPD. *In*: Congresso Nacional de Genética, 50., 2004, Costão do Santinho: SC. **Resumos...**, Florianópolis: SBG, 2004.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E.. **Biologia da Conservação**. Londrina; E. Rodrigues, 2001, 328p.
- RAFALSKY, J. A.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; VOGEL, J. M.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. *In*: Analysis of Nonmammalian Genomes: a Practical Guide (Birren, B. and Lai, F., eds.). Academic Press, New York, p. 75-133, 1996.
- RAVEN, P. H. The Bases of Angiosperm Phylogeny: Cytology. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 62, n. 3, p. 724-764, 1975.
- SANTOS, M. J.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Ecologia da polinização e fenologia de duas espécies de *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) ocorentes em Caatinga, Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 361-373, 2005.
- SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Citogenética clássica e molecular em *passifloras*. *In*: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). Reunião técnica de pesquisas em

- maracujazeiro, Planaltina Distrito Federal: Embrapa Cerrados, p. 559-586, 2005.
- SHAN, F.; YAN, G.; PLUMMER, J. A. Karyotype evolution in the genus *Boronia* (Rutaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 142. p. 309-320, 2003.
- SILVA, J. C., TABARELLI, M. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic Forest of northeast Brazil. **Nature**, v. 404, p. 72-74, 2000.
- SILVA, J. M. C.; SOUSA, M. C.; CASTELLETTI, C. H. M. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic Forest. **Global Ecology and Biogeography**, v. 13, p. 85-92, 2004.
- STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20st and 21st centuries. **Taxon**, v. 49, p. 451-476, 2000.
- TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, p. 132-138, 2005.
- TUCKER, S. C. Trends in evolution of floral ontogeny in *Cassia sensu stricto*, *Senna*, and *Chamaecrista* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae: Cassineae), a study in convergence. **American Journal of Botany**, v. 83, n. 6, p. 687-711, 1996.
- VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and application. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005.
- VARTY N. (1998) *Caesalpinia echinata*. In: IUCN2006. 2006 IUCN red list of threatened species. Available via <http://www.iucn-redlist.org> of subordinate document. Cited on July 15th 2006.
- VILATERSANA, R.; SUSANNA, A.; GARCIA-JACAS, N.; GARNATJE, T. Karyology, generic delineation and dysploidy in the genera *Carduncellus*, *Carthamus* and *Phonus* (Asteraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 134. p. 425-438, 2000.
- WILSON, E. O. **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997, 657 p.
- YOUNG, A, BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends Ecology Evolution**, v. 11, p. 413-418, 1996.
- ZAÚ, A. S. Fragmentação da Mata Atlântica: aspectos teóricos. **Floresta e Ambiente**, v. 5, n. 1, p. 160-170, 1998.