

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

AMÁLIA IBIAPINO MOURA

DIVERSIDADE CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Cuscuta* L.  
(CONVOLVULACEAE)

Recife

2018

AMÁLIA IBIAPINO MOURA

DIVERSIDADE CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Cuscuta* L.  
(CONVOLVULACEAE)

Dissertação apresentada por Amália Ibiapino Moura ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Pernambuco como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Sistemática e evolução  
Orientador: Prof. Marcelo dos Santos Guerra Filho

Recife  
2018

Catálogo na fonte  
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Moura, Amália Ibiapino

Diversidade cariotípica em espécies do gênero *Cuscuta* L.  
(Convolvulaceae) / Amália Ibiapino Moura - 2019.

74 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcelo Guerra  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Vegetal. Recife, 2019.

Inclui referências

1. Convolvulaceae 2. Poliploidia 3. DNA I. Guerra, Marcelo (orient.) II.  
Título

583.94

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-033

AMÁLIA IBIAPINO MOURA

DIVERSIDADE CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Cuscuta* L.  
(CONVOLVULACEAE)

Dissertação apresentada por Amália Ibiapino Moura ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Pernambuco como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em: 28/02/2018

Comissão examinadora

---

Prof. Marcelo Guerra (Orientador) – UFPE

---

Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal (Avaliador externo) – UFPE

---

Dr. Luiz Gustavo Souza Rodrigues (Avaliador interno) – UFPE

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela sorte que eu sempre tive em tudo que escolhi ao longo da vida. Aos meus pais, Ronilda e Laurentino, meus irmãos: Lélia e Laurentino Júnior e a minha sobrinha Giovana que mesmo convivendo com meus medos e “siricuticos” nunca duvidaram e me apoiaram em todos os sentidos para que eu pudesse estar aqui hoje.

Agradeço também ao professor Marcelo que, mesmo sem me conhecer, me acolheu como orientanda e contribuiu bastante para o meu engrandecimento não só profissional, mas também pessoal. Eu sei que dou trabalho, mas depois das coisas que passamos ao longo desses dois anos de convivência você se uma pessoa na qual prezo muito a amizade. Obrigada também a Sandra por ter me ajudado quando cheguei no laboratório e não sabia nem o que era FISH (Não é porque essa menina é do Piauí, que você deixou de ensina-la).

A minha amiga e eterna professora Maria Carolina por ter sido uma das pessoas que mais me incentivou quando escolhi fazer mestrado e vir embora para Recife. Aos amigos que deixei no Piauí (Ana Patrícia e Luan Leonardo), obrigada por entenderem ate minha ausência em muitos momentos. Aos amigos que fiz aqui “interlab” e “extralab”, em especial aos “Lazarentos”: Lucas (enjoado), Yhanndra (fofinha), Brenna (oi lindaaaa) e Amanda (Diva), por sempre cuidarem de mim. Aos “Tiagos”: Esposito (Coração) por ser um amigo atencioso e prestativo (mesmo dizendo que prefere quando eu fico trabalhando em casa), e Ribeiro (Ribaby) que mesmo tendo convivido a pouco tempo é uma pessoa que admiro muito (é concentrado ele! Muito cheio do foco).

Um agradecimento especial a Mariana Báez (Mari, Cristina, Alejandra), se eu encontrei uma família em Recife, foi essa mulher! Obrigada por ser essa pessoa de bom coração que sempre cuida de tudo e de todos e sempre enxerga o lado bom das coisas. Te desejo toda sorte em tudo que você for fazer na vida (agora a gente pode sair para dançar?). Agradeço a Andrea, Mariela, Pablo, Emílio, Iara, Gustavo, Fernanda, Duda, Paulo, Ana, Eline, Deborah, Joana, Tia Edna e todo mundo que me esqueci de citar. Muito obrigada por se fazerem presentes nessa minha jornada.

Por fim, agradeço ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal e a CAPES.

## RESUMO

O gênero *Cuscuta* L. (Convolvulaceae) apresenta cerca de 200 espécies holoparasitas de distribuição cosmopolita. Suas espécies apresentam cariótipos muito diversificados, com variação no número cromossômico ( $2n = 8$  a  $2n = 60$ ), tamanho cromossômico, simetria cariotípica e quantidade de DNA nuclear. Também apresentam espécies que possuem cromossomos holocêntricos e monocêntricos. Neste trabalho, foi feita uma análise do número cromossômico e distribuição da heterocromatina em 18 espécies. Foi também analisada a distribuição dos sítios de DNAr 5S e 35S por FISH em sete dessas espécies e quantificado o DNA nuclear 13 delas. Os novos dados obtidos confirmaram a extensa variação em tamanho cromossômico e quantidade de DNA entre espécies e revelaram um predomínio de cariótipos simétricos e cromossomos pequenos. A variação na quantidade de sítios de DNAr 5S e 35S e de bandas heterocromáticas foi muito limitada, exceto em *C. monogyna* Vahl e *C. indecora* Choisy. Nessas duas espécies foi feita uma análise mais detalhada dos sítios de DNAr e bandas CMA/DAPI. Os dados sugerem que a simetria cariotípica não teria evoluído de forma aleatória e que, da mesma maneira que o tamanho do genoma, pode estar sob o controle de forças seletivas. Além disso, foi investigada a origem híbrida de *C. veatchii* Brandegees. Para isso foi feita uma análise cuidadosa dos cromossomos mitóticos, dos núcleos interfásicos e do padrão de bandas heterocromáticas e sítios de DNAr dessas espécies e de seus prováveis ancestrais, *C. denticulata* Engelm. e *C. nevadensis* I.M. Johnst. E também hibridização genômica *in situ*. Os resultados mostraram que *C. veatchii* é um aloploiploide derivado dessas espécies. No geral, os resultados indicaram que a diversidade cariotípica em *Cuscuta* é de fato bem extensa. Embora a amostra investigada tenha sido praticamente restrita ao subgênero *Grammica*, os dados indicam que esse é um dos gêneros mais promissores para entender diferentes aspectos da evolução cariotípica em plantas.

Palavras-chave: CMA/DAPI. *Cuscuta*. DNAr. GISH. Poliploidia. quantidade de DNA. simetria cariotípica

## ABSTRACT

The genus *Cuscuta* L. (Convolvulaceae) presents about 200 holoparasite species of cosmopolitan distribution. Their species have very diverse karyotypes, with variation in chromosome number ( $2n = 8$  to  $2n = 60$ ), chromosome size, karyotypic symmetry and amount of nuclear DNA. Also present species that have holocentric and monocentric chromosomes. In this work, an analysis of the chromosome number and distribution of heterochromatin in 18 species was made. The distribution of the 5S and 35S rDNA sites by FISH in seven of these species was also analyzed and the nuclear DNA quantified 13 of them. The new data confirmed the extensive variation in chromosome size and amount of DNA between species and revealed a predominance of symmetric karyotypes and small chromosomes. The variation in the amount of 5S and 35S rDNA sites and heterochromatic bands was very limited except for *C. monogyna* Vahl and *C. indecora* Choisy. In these two species a more detailed analysis of rDNA sites and CMA/DAPI bands was made. The data suggest that karyotypic symmetry would not have evolved randomly and that, like genome size, may be under the control of selective forces. In addition, the hybrid origin of *C. veatchii* Brandegees was investigated. For this, a careful analysis was made of the mitotic chromosomes, the interphase nuclei and the pattern of heterochromatic bands and rDNA sites of these species and their probable ancestors, *C. denticulata* Engelm. and *C. nevadensis* I.M. Johnst. And also genomic hybridization in situ. The results showed that *C. veatchii* is an aloploid derived from these species. Overall, the results indicated that the karyotype diversity in *Cuscuta* is indeed very extensive. Although the sample investigated was practically restricted to the subgenus *Grammica*, data indicate that this is one of the most promising genres to understand different aspects of karyotype evolution in plants.

Keywords: CMA/DAPI. *Cuscuta*. DNA amount. rDNA. GISH. karyotype symmetry.

Polyploidy

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>10</b>
2.1 PARÂMETROS UTILIZADOS NA CITOTAXÔNOMIA .....	10
2.1.1 Bandeamento CMA/DAPI .....	10
2.1.2 Localização dos sítios de DNAr 5S e 35S por FISH.....	12
2.1.3 Hibridização genômica <i>in situ</i> (GISH).....	13
2.1.4 Quantificação de DNA .....	14
2.2 ALOPOLIPLOIDIA E HIBRIDIZAÇÃO INTERESPECÍFICA.....	16
2.3O GÊNERO <i>Cuscuta</i> .....	17
2.3.1 Número e morfologia cromossômica .....	18
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 INTENSA PROLIFERAÇÃO DE SÍTIOS DE DNAR E BANDAS HETEROCROMÁTICAS E SUA RELAÇÃO COM A QUANTIDADE DE DNA E A SIMETRIA CARIOTÍPICA EM DUAS ESPÉCIES DE <i>Cuscuta</i> (CONVOLVULACEAE).....	19
3.2 CITOGENÉTICA, ORIGEM E EVOLUÇÃO DE <i>Cuscuta veatchii</i> Brandegee (CONVOLVULACEAE).....	40
3.3 VARIABILIDADE CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DE <i>Cuscuta</i> L. (CONVOLVULACEAE)	58
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A citogenética aliada a sistemática vegetal facilita a compreensão das relações evolutivas entre os táxons (GUERRA, 2000). Análises citogenéticas podem ser feitas utilizando-se vários parâmetros como número, tamanho e morfologia cromossômica, além de padrão de distribuição de heterocromatina. O desenvolvimento de novas técnicas de coloração e análises citomoleculares permitiu estabelecer um grau maior de diferenciação dos cariótipos, o que faz dessas técnicas indispensáveis para os estudos de evolução cromossômica e citotaxonomia (COSTA; FORNI-MARTINS; VANZELA, 2006; GUERRA, 2000). O bandeamento cromossômico com fluorocromos é uma técnica bastante comum em citogenética vegetal. É utilizada não só para corar os cromossomos e determinadas regiões em particular, como também para determinar características estruturais e citoquímicas (SHE; LIU; SONG, 2006). Dentre os fluorocromos mais utilizados, se destacam a cromomicina A3 (CMA) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Esses fluorocromos apresentam uma afinidade preferencial por regiões do DNA ricas nos nucleotídeos GC e AT, respectivamente (CABRAL; FELIX; GUERRA, 2006).

Outra técnica bastante utilizada é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que permite detectar a presença ou ausência de sequências de DNA de interesse e sua localização exata no genoma (GUERRA, 2000). O DNAr 5S e o DNAr 35S, são sequências frequentemente utilizadas na FISH, pois são encontradas no genoma formando unidades de repetição em *tandem* altamente conservadas o que faz com que sejam idéias para análises comparativas (HAMPERL et al., 2013). Uma variação da técnica de FISH utiliza DNA genômico total marcado como sonda. Esta técnica se chama hibridização genômica *in situ* (GISH) e é bastante útil para o estudo de espécies de origem híbrida, pois permite identificar o genoma de cada um dos parentais em um aloploide (YOUNIS et al., 2015).

Com surgimento dos programas de sequenciamento de DNA na década de 90, aumentou o interesse de estudos sobre o tamanho e evolução do genoma. Esses estudos forneceram os primeiros conhecimentos sobre as diferenças em nível de DNA das espécies, como resultado da mudança do tamanho do genoma (BENNETT, 2005). O tamanho do genoma é analisado mais frequentemente por citometria de fluxo, uma técnica rápida e confiável, além de, não requerer reagentes caros. Baseia-se no uso de fluorocromos específicos de DNA para corar núcleos. O citômetro registra a intensidades relativas de fluorescência e a interpretação dos resultados requer uma referência padrão, que é uma espécie com o tamanho do genoma já estabelecido (DOLEŽEL; GREILHUBER; SUDA, 2007; JOHNSTON et al., 1999).

Representado por ca. de 200 espécies holoparasitas, o gênero *Cuscuta* L. (Convolvulaceae) está dividido em quatro subgêneros: *Grammica*, *Pachystigma*, *Cuscuta* e *Monogyna*. Possui uma distribuição cosmopolita, com grande parte das espécies ocorrendo exclusivamente nas Américas (ca. 150, subgênero *Grammica*) (YUNCKER, 1932; COSTEA; TARDIF, 2006; GARCIA et al., 2014). Apresentam flores pequenas e poucas características morfológicas diferenciais, tornando-se um desafio para a classificação ao nível de espécies (MCNEAL et al., 2007). Com folhas reduzidas a escamas e aparentemente sem função as espécies de *Cuscuta* possuem hábito herbáceo, com haste filiforme. Expressam pouca ou nenhuma clorofila e se prendem aos seus hospedeiros através de haustórios (YUNCKER, 1932). *Cuscuta* se destaca pela grande variação cariotípica, com cariótipos que variam de  $2n = 8$  a  $2n = 60$  e números cromossômicos básicos  $x = 7$  e  $x = 15$  (FOGELBERG, 1938; GARCÍA; CASTROVIEJO, 2003; PAZY; PLITMANN, 1987, 1995). Apresenta grande diversidade de tamanho cromossômico (0,4  $\mu\text{m}$  a 19  $\mu\text{m}$ ), possuem cariótipos que variam de simétricos a bimodais e quantidade de DNA nuclear variados ( $2C = 1,58$  pg a  $2C = 65,54$  pg) (MCNEAL et al., 2007; PAZY; PLITMANN, 1995). As espécies do subgênero *Cuscuta* apresentam cromossomos holocêntricos, enquanto os cromossomos dos demais subgêneros são monocêntricos (GARCÍA; CASTROVIEJO, 2003). O subgênero *Grammica* apresenta inúmeros casos de poliploidia além de incongruências filogenéticas que podem ser indicativos da origem híbrida de algumas espécies (GARCIA et al., 2014a; STEFANOVIĆ; COSTEA, 2008). Atualmente, dos estudos citogenéticos envolvendo o gênero *Cuscuta* apenas *C. approximata* possui dados de distribuição de sítios 5S e 45S e bandas CMA e DAPI (GUERRA; GARCÍA, 2004).

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 PARÂMETROS UTILIZADOS NA CITOTAXÔNOMIA

O uso de dados citogenéticos nos estudos de sistemática vegetal é uma importante estratégia para se compreender as relações evolutivas entre os táxons (GUERRA, 2000). Análises citogenéticas podem ser feitas utilizando-se vários parâmetros como número, tamanho e morfologia cromossômica. O desenvolvimento de novas técnicas de coloração e análises citomoleculares permitiu estabelecer um grau maior de diferenciação dos cariótipos, o que faz dessas técnicas indispensáveis para os estudos de evolução cromossômica e citotaxonomia (COSTA; FORNI-MARTINS; VANZELA, 2006; GUERRA, 2000).

O número de cromossomos presentes em uma célula somática de uma planta é bastante variado. Em angiospermas, este número pode variar bastante, como por exemplo  $2n = 4$ , em *Haplopappus gracilis* (Asteraceae) e  $2n = 250$  em *Kalanchoe* (Crassulaceae) (JUDD et al., 2009). O número e o tamanho cromossômico, além da posição do centrômero são características que constituem um cariótipo, estas características podem ser úteis para a caracterização de um táxon. Quanto à posição do centrômero os cromossomos podem ser classificados em metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos e telocêntricos dependendo da distância que se encontra o centrômero ao longo do cromossomo (GUERRA, 1988; JUDD et al., 2009).

O centrômero, também conhecido como constrição primária, é uma região cromossômica parcialmente descondensada onde há a formação do cinetócoro durante a divisão celular. Esse complexo é mediador da ligação dos microtúbulos, que fazem a divisão das cromátides irmãs. Em algumas espécies, é possível perceber a formação do cinetócoro ao longo de toda extensão do cromossomo, diferente do que se observa em cromossomos monocêntricos, onde essa formação ocorre apenas em uma região. Esses cromossomos são denominados holocêntricos ou holocinéticos (GUERRA, 1988). Alguns gêneros vegetais possuem espécies com cromossomos holocêntricos, como é o caso *Drosera* L. (Droseraceae) (SHEIKH; KONDO; HOSHI, 1995), *Rhyncospora* Vahl (MARQUES et al., 2015) e *Cuscuta* L. (PAZY; PLITMANN, 1987).

#### 2.1.1 Bandeamento CMA/DAPI

Apesar da grande variedade de tamanho, número cromossômico e quantidade de DNA das espécies vegetais, características estruturais dos cromossomos como centrômeros, telômeros e compactação da cromatina são bem conservadas (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011). O DNA nuclear das plantas é constituído por sequências

codificadoras de cópia única e por várias classes de sequências repetitivas. Estas constituem grande parte dos genomas e podem estar organizadas em *tandem* (microsatélite, minissatélite e DNA satélites) ou dispersas no genoma (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011).

As sequências repetitivas em *tandem* do genoma estão associadas com a formação de regiões heterocromáticas e estão localizadas nos centrômeros, telômeros e em blocos heterocromáticos intersticiais e pericentroméricos (GREWAL; JIA, 2007). Esta heterocromatina pode ser classificada em facultativa e constitutiva. Esta última é a mais estudada e pode ser corada de maneira específica por meio de técnicas como o bandejamento C (SUMNER, 2008), que consiste em mergulhar as lâminas com metáfases em uma solução de hidróxido de bário e em seguida expor essas lâminas a uma solução salina à temperatura elevada. Os cromossomos são fragmentados e parte do suas cromátides é perdida, permanecendo preservado apenas as regiões heterocromáticas, que são coradas com Giemsa (GUERRA, 1988).

Jellen e Ladizinsky (2000) utilizaram o bandejamento C em *Avena insularis* Ladizinsky e observaram que os cromossomos dessa espécie poderiam ser separados em dois grupos, um com cromossomos predominantemente heterocromáticos e outro predominantemente eucromático. Esses resultados também foram observados em espécies próximas a *A. insularis*, como *A. magna* H.C. Murphy & Terrell. utilizaram o bandejamento C para caracterizar, pela primeira vez, oito espécies do gênero *Serapias* L. (Orchidaceae). O trabalho mostrou uma distribuição homogênea de heterocromatina entre essas espécies, indicando baixa variação interespecífica e o possível surgimento recente do gênero (D'EMERICO; PIGNONE; SCRUGLI, 2000).

O surgimento de novas técnicas de bandejamento cromossômico permitiu visualizar melhor a distribuição da heterocromatina, facilitando a diferenciação cariotípica entre as espécies (MOSCONE et al., 1995). O bandejamento cromossômico com fluorocromos é uma técnica bastante comum em citogenética vegetal. É utilizada não só para corar os cromossomos e determinadas regiões em particular, como também para determinar características estruturais e citoquímicas (SHE; LIU; SONG, 2006).

Uma das técnicas mais utilizadas é a coloração com os fluorocromos cromomicina A3 (CMA) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Esses fluorocromos apresentam uma afinidade preferencial por regiões do DNA ricas nos nucleotídeos GC e AT, respectivamente. Comumente as bandas CMA<sup>+</sup> se localizam com o DNAr 5S e 35S (CABRAL; FELIX; GUERRA, 2006; SHE; LIU; SONG, 2006) ou com outras sequências satélites (BARROS E

SILVA; DOS SANTOS SOARES FILHO; GUERRA, 2013). Diferente do bandeamento C, nesta técnica não há perda de DNA e as lâminas podem ser descoradas e submetidas a novas colorações. Van-Lume et al. (2017) utilizaram bandeamento CMA/DAPI na investigação padrões de variação filogenética, ambiental e geográfica nas em espécies de *Caesalpinia* L. ocorrentes no nordeste do Brasil, na tentativa de explicar a diversidade cariotípica que ocorre no gênero. Os padrões de distribuição de heterocromatina foram congruentes com a distribuição geográfica dessas espécies, geralmente sendo observados cariótipos similares em espécies de um mesmo centro de diversidade.

### **2.1.2 Localização dos sítios de DNAr 5S e 35S por FISH**

Existem dois tipos de DNA ribossomal: DNAr 5S e 35S. O sítio de DNAr 35S está associado à formação do nucléolo (SHAW; BROWN, 2012) e, em todos os eucariotos, esses genes são encontrados formando unidades de repetição em *tandem* altamente conservadas o que faz com que sejam ideais para análises comparativas (HAMPERL et al., 2013). Cada unidade de repetição é formada por três regiões codificadoras: 18S, 5.8S e 25S. Estas regiões codificadoras são separadas entre si por espaçadores internos: ITS1 (entre o 18S e o 5.8S) e ITS2 (entre o 5.8S e o 25S) e cada unidade de repetição se separa por espaçadores intergênicos (IGS) (HAMPERL et al., 2013; KOVARIK et al., 2008). Quanto ao DNAr 5S, cada unidade é composta por uma região codificadora de 120 pb. Essas unidades são separadas por um espaçador não transcrito (NTS) de 100 a 700 pb (DOUET; TOURMENTE, 2007)

Os sítios de DNAr 5S e 35S podem ser detectados nos cromossomos por meio da hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Esta técnica permite detectar a presença ou ausência de sequências de DNA de interesse e sua localização exata no genoma por meio do pareamento de segmentos de DNA ou RNA. Para visualização desses segmentos é necessário que eles estejam marcados com moléculas de fácil detecção. O DNA fita dupla pode ser desnaturado em fitas simples e renaturado para o estado inicial. Se, durante a renaturação, houver sondas disponíveis, essas sondas podem hibridizar *in situ*, ou seja, no local exato onde aquela sequência é encontrada naturalmente (GUERRA, 2004; YOUNIS et al., 2015). As sequências de DNAr 5S e 35S tem a vantagem de serem repetidas centenas de vezes e estarem em *tandem* em um ou mais blocos, o que facilita sua detecção (PEDROSA et al., 2002). A FISH é uma ótima ferramenta para estudar número e distribuição de sítios de DNAr nos cromossomos a fim de observar as relações evolutivas entre as espécies (YOUNIS et al., 2015).

O número de unidades de DNAr 5S nos genomas de espécies vegetais pode variar 2000 a 75000 número de cópias (SASTRI et al., 1992). O DNAr 5S frequentemente é encontrado em sítios cromossômicos distintos do DNAr 35S. Essa localização independente pode estar relacionada ao fato do DNAr 5S ser transcrito pela RNA polimerase III no nucleoplasma, enquanto que o DNAr 35S é transcrito pela RNA polimerase I nos nucléolos (GARCIA; KOVAŘÍK, 2013). Entretanto, é registrada em diversos gêneros vegetais a ocorrência de espécies que possuem sítios de DNAr 5S e 35S no mesmo cromossomo, como *Nemesia* Vent. (DATSON; MURRAY, 2006), *Rhynchospora* Vahl (SOUSA et al., 2011) e *Citrus* L. e vários outros representantes da subfamília Aurantioideae (Rutaceae) (BARROS E SILVA; DOS SANTOS SOARES FILHO; GUERRA, 2013).

Entre as angiospermas o número de espécies que possuem cariótipos com apenas um par de sítios de DNAr 5S e 35S é bem maior que aquelas que apresentam cariótipos com dois pares de sítios. Os cariótipos com mais de dois pares são mais raros. (ROA; GUERRA, 2015). Mais frequentemente os sítios de DNAr 5S e 35S ocorrem no braço cromossômico curto. O DNAr 5S ocupa regiões proximais, intersticiais e terminais com uma frequência um pouco maior nas regiões proximais, enquanto que o DNAr 35S tende a ocupar regiões terminais, inclusive nos braços curtos de cromossomos acrocêntricos, onde ocupam todo o braço (ROA; GUERRA, 2012, 2015). A frequência de sítios de DNAr 5S e 35S ocorrentes no mesmo cromossomo é maior em cariótipos com múltiplos sítios e a maioria ocorre no mesmo braço, sendo o DNAr 35S mais distal (GARCIA et al., 2017; ROA; GUERRA, 2015). Em cromossomos holocêntricos, o número de sítios de DNAr 5S e 35S foram similares aos encontrados em cromossomos monocêntricos e, tanto o DNAr 5S quanto o DNAr 35S, em sua maioria, ocuparam regiões terminais (ROA; GUERRA, 2012, 2015). De 665 cariótipos com múltiplos sítios de DNAr 5S e/ou 35S analisados por Roa e Guerra (2015), incluindo cariótipos com cromossomos holocêntricos, 52,8% tinham pelo menos um par de sítios de DNAr 5S e 35S no mesmo cromossomo, nos quais 33,7% eram adjacentes.

### **2.1.3 Hibridização genômica *in situ* (GISH)**

Desde o surgimento da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) das sequências de DNA, várias modificações foram feitas, uma delas utiliza o DNA genômico total marcado como sonda. Esta técnica se chama hibridização genômica *in situ* (GISH) e é bastante útil para o estudo de espécies de origem híbrida (YOUNIS et al., 2015). Dentre as principais aplicações da GISH podemos citar: identificação dos genomas parentais em espécies híbridas, estudos do comportamento cromossômico durante a meiose em híbridos

interespecíficos e estudos de organização cromossômica estrutural (RAMZAN; YOUNIS; LIM, 2017).

Kitajima et al. (2007) utilizaram GISH para identificação cromossômica de tangerina (*Citrus unshiu* Marcow). Para isso usaram sondas feitas com DNA genômico de *C. reticulata* Blanco e *C. maxima* (Burm.) Merr.. O tamanho, a intensidade e a coloração dos sinais de GISH auxiliaram na categorização dos cromossomos em 12 grupos, identificando ainda seis pares de cromossomos homólogos e seis cromossomos heterozigotos dentro do cariótipo de *C. unshiu*. O trabalho também mostrou uma estreita relação evolutiva entre *C. unshiu* e *C. reticulata* e o envolvimento de *C. maxima* na origem desta espécie. LIU; GU, (2011) utilizaram GISH para avaliar a origem alopoliploide de *Camellia reticulata* Lindl. Esta espécie possui indivíduos diploides, tetraploides e hexaploides com  $2n = 30$ ,  $2n = 60$  e  $2n = 90$ , respectivamente. A GISH identificou que a origem do alotetraploide se deu pelo cruzamento do diploide de *C. reticulata* com o diploide *C. pitardii* Cohen Stuart, enquanto que o alohexaploide se originou do cruzamento entre este alotetraploide com *C. saluenensis* Stapf ex Bean.

A GISH também pode ser utilizada para avaliar a constituição nuclear em híbridos somáticos. A hibridização somática consiste na fusão dos protoplasmas de células somáticas de espécies diferentes. Esta técnica permite a combinação de genomas de espécies incompatíveis com a finalidade de transferir traços nucleares e citoplasmáticos de uma espécie para outra. Hibridização somática pode ser utilizada na área do melhoramento de plantas economicamente importantes como espécies do gênero *Citrus* (GUO; DENG, 2001). Yamashita et al. (2002) utilizaram GISH para o estudo da constituição nuclear de híbridos somáticos produzidos entre *Allium cepa* L. e *A. sativum* L. Neste trabalho foram produzidos dois híbridos, com 40 e 41 cromossomos. Através da GISH foi possível identificar no híbrido com 40 cromossomos 17 cromossomos de *A. sativum*, 20 cromossomos de *A. cepa* e três cromossomos com fragmentos de ambos os parentais. O híbrido com 41 cromossomos apresentou o mesmo padrão, porém com 21 cromossomos de *A. cepa*.

#### 2.1.4 Quantificação de DNA

O surgimento dos programas de sequenciamento de DNA na década de 90 fez com que se aumentasse o interesse de estudos sobre o tamanho e evolução do genoma. Esses estudos forneceram os primeiros conhecimentos sobre as diferenças em nível de DNA das espécies, como resultando da mudança do tamanho do genoma (BENNETT, 2005). O termo “valor C” ou 1C é utilizado para indicar a quantidade de DNA em um núcleo haploide não

replicado. O valor C pode ser expresso tanto em picogramas (pg,  $1 \times 10^{-12}$ g) como em pares de base (1 pg = 978 Mpb) (BENNETT, 2005; DOLEŽEL, 2005).

Com o aperfeiçoamento das técnicas de quantificação do DNA nuclear foi possível ter acesso ao tamanho do genoma de pelo menos 15000 eucariotos. O primeiro banco de dados de valor C em plantas foi lançado em 2001 e na sua quinta e atual atualização o banco contém dados de 8510 espécies, a maioria angiospermas (GARCIA et al., 2014b). As espécies vegetais se destacam dentro dos eucariotos por apresentarem uma variação de 2.342 vezes entre o menor genoma,  $1C = 0.06$  pg em *Genlisea margaretae* Hutch., e o maior genoma,  $1C = 152.23$  pg em *Paris japônica* (Franch. & Sav.) Franch. (GREILHUBER et al., 2006; PELLICER; FAY; LEITCH, 2010). Esta variabilidade pode ser bem maior tendo em vista que apenas 5% do total estimado de espécies de plantas tiveram seu DNA quantificado (GARCIA et al., 2014b).

Atualmente, o banco de dados *Plant DNA C-value Database* (<http://data.kew.org/cvalues>, (BENNETT; LEITCH, 2012), está representado, em sua maioria, por espécies de angiospermas. Essa grande variabilidade no tamanho do genoma pode ser consequência da poliploidia e da mudança de sequências de DNA repetitivo, como amplificação e perda de sequências (DODSWORTH; LEITCH; LEITCH, 2015). É natural esperar que um poliploide possua um conteúdo de DNA maior que o encontrado nas espécies que tenham lhe dado origem. Porém há registros que mostram a perda de DNA após eventos de poliploidização. Uma das causas do aumento ou diminuição do tamanho do genoma em poliploides é a ativação de retrotransposons ocorrida depois de eventos de poliploidia. Embora a ativação de retrotransposons possa levar inicialmente ao aumento na quantidade de DNA, a recombinação entre as repetições terminais podem levar a perda de DNA ao longo do tempo (LEITCH; BENNETT, 2004).

O tamanho do genoma é analisado mais frequentemente por citometria de fluxo. Esta técnica se baseia no uso de fluorocromos específicos de DNA e na análise da intensidade relativa de fluorescência dos núcleos corados. Um citômetro de fluxo consiste basicamente em: uma fonte de luz, uma câmara de fluxo, fotodetectores e processadores para converter sinais de luz em impulsos elétricos analógicos, conversores e um sistema informático para a análise e armazenamento de dados (DOLEŽEL, 1991). A citometria de fluxo é rápida e confiável, além disso, não requer reagentes caros. A preparação das amostras consiste em cortes feitos em tecido foliar em um tampão que serve para o isolamento dos núcleos, filtragem e coloração com fluorocromo específico de DNA. O citômetro registra a intensidades relativas de fluorescência e a interpretação dos resultados requer uma referência

padrão, que é uma espécie com o valor-C já estabelecido (DOLEŽEL; GREILHUBER; SUDA, 2007; JOHNSTON et al., 1999).

## 2.2 ALOPOLIPLOIDIA E HIBRIDIZAÇÃO INTERESPECÍFICA

A presença de três ou mais conjuntos cromossômicos em uma célula somática é chamada de poliploidia (JUDD et al., 2009). A poliploidia é um importante fenômeno para o processo de evolução das plantas. Provavelmente, 47 a 70% das angiospermas sejam de origem poliploide (RAMSEY; SCHEMSKE, 2002; SOLTIS; SOLTIS, 1995). Existem dois tipos de poliploidia: autopoliploidia, quando ocorre a duplicação do conjunto cromossômico de uma espécie, e a alopoliploidia, quando envolve hibridização interespecífica (BEAULIEU; JEAN; BELZILE, 2009). A importância e a frequência de eventos de hibridização vêm sendo estudadas em diversas famílias de angiospermas. Além de contribuir para a variabilidade adaptativa, este fenômeno pode ser fonte de novas espécies poliploides (BARTON, 2001). Os alopoliploides são formados de duas maneiras, podem surgir diretamente da fusão de dois gametas não reduzidos ( $2n$ ) de espécies diferentes ou sofrer duplicação após a fusão de gametas normais ( $n$ ) (CHEN, 2007).

A alopoliploidização pode induzir a mudanças no genoma e na expressão gênica. Essas alterações podem ser atribuídas a mudança epigenética da cromatina, aumento do silenciamento em genes codificantes do RNAr e aumento da ativação de elementos transponíveis que podem ocorrer após o evento de hibridização (CHEN, 2007), como descrito em *Arabidopsis suecica* Norrl., um alopoliploide natural originado do cruzamento entre *A. thaliana* (L.) Heynh. e *A. arenosa* (L.). Lawalrée. Madlung et al. (2004) reproduziram esse cruzamento afim de verificar mudanças genômicas nos híbridos recém sintetizados. Registraram atividade transcricional de vários transposons que não estavam ativos nos parentais.

Em híbridos interespecíficos, o conjunto de DNAr de um dos parentais pode ser transcrito enquanto o outro é silenciado. Esse fenômeno recebe o nome de dominância nucleolar ou silenciamento gênico. Este fenômeno está presente não só em híbridos e se trata de uma manifestação no controle de dosagem dos genes de RNAr no qual os genes em excesso são silenciados (KSIAŻCZYK et al., 2011; TUCKER; VITINS; PIKAARD, 2010). O mecanismo que age no silenciamento seletivo em híbridos ainda é pouco conhecido, mas parece ser o mesmo em todas as espécies, híbridas ou não, atuando por meio de mudanças na metilação do DNA e modificações nas histonas (KSIAŻCZYK et al., 2011; PREUSS; PIKAARD, 2007; TUCKER; VITINS; PIKAARD, 2010). Combinações interdependentes

destes mecanismos foram amplamente estudadas em híbridos do gênero *Arabidopsis* Heynh. (LAWRENCE et al., 2004), onde mudanças coordenadas na metilação da citosina do promotor e modificações histonas específicas determinam os estados de ativação e desativação dos genes RNAr. Um componente-chave dessas mudanças é a HDT1, uma histona desacetilase vegetal que localiza-se no núcleo e é necessária pra a desacetilação da H3K9 e sua subsequente metilação.

Muitas vezes, esses genes ajudam na identificação de híbridos interespecíficos, como é registrado no grupo Quadrifaria do gênero *Paspalum* L. onde foram localizados sítios de DNAr 5S e 35S em espécies diploides e tetraploides. Baseado nesses dados foi possível sugerir o envolvimento do diploide *P. haumanii* Parodi na formação do alotetraploide *P. quadrifarum* Lam. pelo padrão de sítios de DNAr 35S encontrados nessa espécie (VAIO et al., 2005).

### 2.3 O GÊNERO *Cuscuta*

O gênero *Cuscuta* pertence à família Convolvulaceae e é representado por ca. 200 espécies (YUNCKER, 1932) separadas em quatro subgêneros: *Grammica*, *Pachystigma*, *Cuscuta* e *Monogyna* (GARCÍA et al., 2014), o subgênero *Grammica*, com cerca de 150 espécies. O gênero *Cuscuta* tem distribuição quase exclusiva nas Américas, habitam ambientes de clima tropical a temperado, sendo essa preferência possivelmente relacionada ao período de dormência das sementes (COSTEA; TARDIF, 2006; YUNCKER, 1932).

Conhecidas como “fios de ovos”, “videira estranguladora”, e ainda “cadarço de bruxa”, as plantas desse gênero são parasitas, com folhas reduzidas a escamas, em pouca quantidade e aparentemente sem função. Têm hábito herbáceo, com haste filiforme. Expressam pouca ou nenhuma clorofila e se prendem aos seus hospedeiros através de haustórios. (YUNCKER, 1932). Possuem células epidérmicas com paredes maleáveis, que permitem sua organização à superfície do hospedeiro, e secretam uma camada proteica que permite a fixação como um adesivo (VAUGHN, 2002). Apresentam flores pequenas e poucas características morfológicas diferenciais, tornando-se um desafio para a classificação ao nível de espécies (MCNEAL et al., 2007). É o único gênero da família que apresenta parasitismo. por conta disso, chegou a ser considerado um grupo separado da família Convolvulaceae. A partir de 1989 foi considerada a relação de *Cuscuta* com Convolvulaceae. A inserção dentro da família se deu por análises moleculares (STEFANOVIĆ; KRUEGER; OLMSTEAD, 2002).

Citogeneticamente, o gênero se destaca pela grande variação cariotípica, com diversidade de tamanho cromossômico, quantidade de DNA nuclear, presença de cromossomos monocêntricos e holocêntricos (centrômero difuso), além de cariótipos bimodais (dois conjuntos de cromossomos morfologicamente distintos no mesmo genoma). Além disso, dados moleculares revelaram pelo menos cinco casos de hibridização interespecífica no subgênero *Grammica* (STEFANOVIĆ; COSTEA, 2008). Essa diversidade de caracteres torna *Cuscuta* um gênero particularmente interessante para estudos sobre evolução cromossômica (GARCÍA; CASTROVIEJO, 2003; MCNEAL et al., 2007).

### 2.3.1 Número e morfologia cromossômica

As espécies de *Cuscuta* apresentam números cromossômicos que variam de  $2n = 8$  a  $2n = 60$ . No geral as espécies apresentam números cromossômicos múltiplos de sete (*C. planiflora* Tem.  $2n = 28$ ) e múltiplos de 15 (*C. cephalanthi* Engelm  $2n = 60$ ). Por essa razão sugere-se que os números básicos em *Cuscuta* sejam  $x = 7$  e  $x = 15$ . (FOGELBERG, 1938; GARCÍA; CASTROVIEJO, 2003; PAZY; PLITMANN, 1987, 1995). Possui grande variação de tamanho cromossômico, podendo variar de 0,4  $\mu\text{m}$  (*C. campestris* Yuncker) a 19  $\mu\text{m}$  (*C. monogyna* Vahl). Possuem cariótipos simétricos e bimodais, e quantidade de DNA nuclear que variam de  $2C = 1,58$  pg em *C. obtusiflora* Kunth até  $2C = 65,54$  pg em *C. indecora* Choisy (MCNEAL et al., 2007; PAZY; PLITMANN, 1995). As espécies do subgênero *Cuscuta* apresentam cromossomos holocêntricos, enquanto os cromossomos dos demais sugêneros são monocêntricos (GARCÍA; CASTROVIEJO, 2003). Dos estudos citogenéticos envolvendo o gênero *Cuscuta* apenas *C. approximata* Bab. possui dados de distribuição de sítios 5S e 35S e bandas CMA e DAPI (GUERRA; GARCÍA, 2004). Este trabalho mostra bandas DAPI marcaram regiões terminais e as bandas CMA em regiões subterminais. Em 10 dos 28 cromossomos de *C. approximata* as bandas CMA se encontraram estreitamente associadas às bandas DAPI. Essa espécie apresenta três pares de DNAr 5S e um par de DNAr 35S.

Dentro de *Cuscuta*, o subgênero *Grammica* apresenta alguns casos de poliploidia, como por exemplo, em *C. cephalanthi* Engelm., um tetraploide  $2n = 60$ . Além de incongruências filogenéticas que podem ser indicativos da origem híbrida de algumas espécies como: *C. veatchii* Brandegee, *C. desmouliniana* Yunck., *C. liliputiana* Costea & Stefanov., *C. bifurcata* Yunck., *C. sandwichiana* Choisy (GARCIA et al., 2014a; STEFANOVIĆ; COSTEA, 2008).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 INTENSA PROLIFERAÇÃO DE SÍTIOS DE DNAR E BANDAS HETEROCROMÁTICAS E SUA RELAÇÃO COM A QUANTIDADE DE DNA E A SIMETRIA CARIOTÍPICA EM DUAS ESPÉCIES DE *Cuscuta* (CONVOLVULACEAE)

Amália Ibiapino<sup>a</sup>, Jéssica Nascimento<sup>a</sup>, Miguel García<sup>b</sup>, Mihai Costea<sup>c</sup>, Sasa Stefanović<sup>b</sup>,  
Marcelo Guerra<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal – Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Botânica, Recife, PE, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Biologia, Universidade de Toronto-Mississauga, Mississauga, Ontario L5L  
1C6, Canadá

<sup>c</sup>Departamento de Biologia, Universidade de Wilfrid Laurier, Waterloo, Ontario N2L 3C5,  
Canadá

\*Autor para correspondência: Marcelo Guerra

Departamento de Botânica, CCB

Universidade Federal de Pernambuco

50.670-420 Recife, PE

msfguerra@hotmail.com

#### Resumo

O tamanho do genoma varia amplamente entre as angiospermas, mas apesar disso a maioria das espécies apresenta cariótipo simétrico, sugerindo que a manutenção da simetria do cariótipo pode estar sob o controle da seleção. No gênero *Cuscuta*, um grupo de plantas holoparasitas, a maioria das espécies apresenta 30 cromossomos pequenos. Contudo, em dois subgêneros houve um grande aumento do tamanho do genoma com manutenção do número de cromossomos. No presente trabalho foi feita uma análise cariotípica detalhada em duas espécies representantes desses dois grupos, *C. indecora* e *C. monogyna*, visando verificar se a ampliação do genoma seguiu caminhos similares nos dois casos. Ambas as espécies apresentaram cariótipo simétrico, havendo em *C. monogyna* uma maior quantidade de DNA genômico, maior número de blocos heterocromáticos e de sítios de DNAr 5S e 35S

espalhados pelo genoma. Mais importante, os blocos de heterocromatina e de DNAr, não foram equilocais nem apresentaram padrões similares, mas mesmo assim não alteraram a simetria cariotípica. Esses dados levantam a possibilidade de que haja um mecanismo de controle da expansão do genoma de forma a não alterar a simetria cariotípica.

## Introdução

O tamanho do genoma das plantas é extremamente variável, alcançando nas angiospermas uma variação muito maior que em outros organismos. Os limites conhecidos atualmente são cerca de 60 Mb em *Genlisea aurea* A. St.-Hil. (uma pequena planta aquática carnívora da família Lentibulariaceae) e cerca de 150.000 Mb em *Paris japonica* (Franch. & Sav.) Franch. (uma pequena erva invasora de Melanthiaceae), perfazendo uma variação de 2.342 vezes [Garcia et al., 2014]. Mesmo dentro de um único gênero é possível encontrar uma variação impressionante no tamanho do genoma, chegando a até 70 vezes no gênero *Oxalis* L. [Gardner et al., 2012]. Curiosamente, o excesso de DNA observado nos maiores genomas raramente é devido à poliploidia, muito comum nas angiospermas, mas sim à proliferação excessiva de uns poucos tipos de retrotransposons do tipo LTR [Michael, 2014]

Além dos retrotransposons e outras sequências de distribuição dispersa no genoma, o DNA repetitivo em *tandem* também contribui para aumentar o tamanho do genoma. Essas sequências podem ser visualizadas nos cromossomos por FISH. Agrupadas em sítios de tamanhos variáveis, correspondendo geralmente a blocos de heterocromatina [Gaeta et al., 2010; Barros e Silva et al., 2010]. Diferente do DNA repetitivo disperso, o DNA satélite representa uma fração relativamente pequena do tamanho do genoma, geralmente em torno de 10%, podendo chegar a até 50% [Garrido Ramos, 2017]. Igualmente, os blocos de heterocromatina ocupam uma fração pequena da extensão do conjunto cromossômico das espécies e só muito raramente chegam em torno de 50% [Guerra, 2000]. Esses blocos geralmente são detectados por técnicas de coloração cromossômica específicas, principalmente a técnica de bandeamento C e a coloração com fluorocromos com afinidade diferenciada para regiões do DNA ricas em AT ou GC. Nesse último caso, destacam-se os fluorocromos cromomicina A3 (CMA) e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que se ligam preferencialmente a sequências de DNA ricas em GC ou AT, respectivamente (revisado por Guerra, [2000]).

Entre as sequências de DNA repetitivo em *tandem*, as mais extensamente conhecidas são as sequências de DNA ribossomal (DNAr 5S e DNAr 35S ou 45S). As sequências de DNAr frequentemente se encontram reunidas em um só sítio com todas as cópias do DNAr

5S e um outro sítio com todas as cópias de DNAr 35S, embora o número de sítios por genoma haploide possa variar amplamente [Roa and Guerra, 2012, 2015]. O número de cópias de genes ribossomais varia bastante entre espécies, mas parece haver uma tendência a ser maior nos genomas maiores [Prokipovich et al., 2003].

Entre as angiospermas com maior variação no conteúdo de DNA, destaca-se o gênero *Cuscuta* L. (Convolvulaceae), um grupo de ervas hemiparasitas ou holoparasitas, sem folhas, sem raízes e com pouca ou nenhuma clorofila [García et al., 2014]. Em uma amostra de apenas 11 espécies de *Cuscuta*, todas do subgênero *Grammica*, a variação no conteúdo de DNA nuclear foi de 56 vezes, variando o valor 2C entre 1,16 pg e 65,54 pg [McNeal et al., 2007]. O gênero consiste de aproximadamente 200 espécies espalhadas por quase todas as regiões temperadas e tropicais do mundo. Taxonomicamente, é um gênero de difícil delimitação de espécies devido principalmente à extrema redução de caracteres vegetativos e florais [García et al., 2014]. No entanto, apresenta uma das maiores diversidades cariológicas conhecidas e talvez o único gênero de angiospermas com espécies com cromossomos holocêntricos e monocêntricos [Pazy and Plitmann, 1995]. Contudo, muito pouco é conhecido sobre sua variabilidade estrutural cromossômica relacionada à distribuição da heterocromatina ou de sítios de DNAr. Uma exceção é *C. approximata* Bab., uma espécie com cromossomos holocêntricos, grande quantidade de heterocromatina e poucos sítios de DNAr [Guerra and García, 2004].

Filogeneticamente, o gênero *Cuscuta* é colocado dentro de Convolvulaceae [Stefanović and Olmstead, 2004], uma família caracterizada por pequeno tamanho do genoma ( $2C \leq 4,5$  pg) (Kew Plant DNA C-values Database, <http://data.kew.org./cvalues/>), cariótipos predominantemente simétricos e número cromossômico  $2n = 30$ , na maioria dos gêneros e espécies (ver, por exemplo, Yen et al. [1992]; Pitez et al. [2008]).

Taxonomicamente, o gênero *Cuscuta* se encontra dividido em quatro subgêneros: *Monogynella*, representado por aproximadamente nove espécies do Velho Mundo; *Grammica*, com cerca de 150 espécies, principalmente das Américas; *Cuscuta*, com aproximadamente 25 espécies do Velho Mundo e *Pachystigma*, um pequeno grupo de espécies endêmicas da África do Sul [García et al., 2014]. Cada subgênero parece ter seguido uma tendência cariotípica diferente (revisado por Pazy and Plitmann [1995] e García and Castroviejo [2003]). *Monogynella* é caracterizada por cromossomos excepcionalmente grandes; *Cuscuta* é o único subgênero com cromossomos holocinéticos; *Grammica* tem a maior variação no conteúdo de DNA ( $2C = 0,96 - 66,54$  pg) [McNeal et al., 2007; Kubesová et al., 2010]; e *Pachystigma*

ainda não possui registro cromossômico, embora ao menos duas espécies analisadas recentemente apresentem cariótipos bimodais (M. García, dados não publicados).

Um grande aumento no tamanho do cromossomo/genoma ocorreu aparentemente apenas duas vezes durante a evolução do gênero *Cuscuta*: em espécies do subgênero *Monogynella* [Kaul and Bahn, 1977; Pazy and Plitmann, 1995] e em *C. indecora* Choisy do subgênero *Grammica* [McNeal et al., 2007]. Neste trabalho, analisamos o tamanho do genoma e o cariótipo de *C. monogyna* Vahl, a espécie mais estudada de *Monogynella*, e *C. indecora*, procurando entender duas questões importantes sobre a evolução cromossômica: 1) o aumento do tamanho do genoma pode estar relacionado à amplificação de sequências de repetição em *tandem* detectáveis ao nível citológico, como bandas heterocromáticas e sítios de DNAr; 2) Teria o aumento do genoma alterado a simetria do cariótipo dessas duas espécies de maneira aleatória ou haveria alguma pressão de seleção favorecendo a manutenção da morfologia cromossômica simétrica?

### **Materiais e métodos**

Sementes de *C. monogyna* e *C. indecora* foram coletadas no campo, germinadas em placas de Petri e cultivadas na estufa da Universidade de Toronto-Mississauga (Canadá) e no Jardim Experimental do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, parasitando principalmente indivíduos de *Plectanthus scutellarioides* (L.) R. Br. (cólus). Os dados relativos a essas coletas estão indicados na Tabela 1.

### **Preparação de lâminas e coloração cromossômica**

Para análises mitóticas, as gemas apicais dos ramos dessas plantas foram pré-tratadas em colchicina 0,2% durante 24 horas a 10 °C, fixadas em uma solução 3:1 de etanol-ácido acético e posteriormente armazenadas a -20 ° C. Para análises meióticas, os brotos de flores jovens foram diretamente fixados e armazenados a -20 ° C. O material fixado foi lavado em água destilada, hidrolisado em HCl 5 N durante 20 minutos e, posteriormente, corado com 1% de hematoxilina férrica [Guerra, 2000]. Para a coloração com CMA/DAPI e FISH, o material foi lavado em água destilada, digerido em uma solução de celulase (Onozuka) a 2% e pectinase (Sigma) a 20% a 37 °C durante 60 minutos, esmagado em uma gota de 45% de ácido acético e a lamínula removida em nitrogênio líquido.

Para a coloração com CMA/DAPI, as lâminas foram envelhecidas durante três dias e coradas por 60 minutos com CMA (0,2 mg/ml) e 30 min com DAPI (1 µg/ml) (ver Guerra e García [2004]). As lâminas foram então mantidas no escuro por três dias antes da análise sob

um microscópio Leica DMLB de epifluorescência. As imagens foram capturadas com uma câmera de vídeo Cohu CCD usando o software Leica QFISH e foram otimizadas para melhor contraste e brilho usando o Adobe Photoshop CS3 versão 10.0.

Todas as hibridizações *in situ* foram feitas segundo o protocolo de Pedrosa et al. [2002]. Para a localização dos sítios de DNAr, um clone de 500 pb do DNAr 5S (D2) de *Lotus japonicus* [Pedrosa et al., 2002], e um outro de 6,5 kb do DNAr 35S (R2) de *Arabidopsis thaliana* [Wanzenbock et al., 1997], foram utilizados como sondas. As sondas foram marcadas por *nick translation* (DNase I Thermo Scientific e DNA polymerase I 1UT $\mu$ l Invitrogen) com Cy3-dUTP (Amersham) e digoxigenina 11-dUTP (Roche), respectivamente. A mistura de hibridização, composta por 60% (v/v) de formamida, 5% (p/v), dextran sulfato, 2x SSC, e 5ng/ $\mu$ l de sonda foi desnaturada a 75°C por 10 minutos. A preparação citológica foi desnaturada por 5 minutos e hibridizada por 18-20 horas a 37°C em câmara úmida. A sonda de DNAr 35S foi detectada com anticorpo primário anti-digoxigenina produzido em ovelha, conjugado com FITC (Roche) e o sinal amplificado com o anticorpo secundário contra anti-digoxigenina de ovelha produzida em coelho conjugada com FITC (Dako). As lâminas foram montadas em Vectashild (Vector) contendo DAPI (2  $\mu$ g/ml). As imagens foram capturadas conforme descrito anteriormente.

Como *C. monogyna* apresentou um número excepcionalmente elevado de sítios de DNAr, analisamos o número de nucléolos em ambas as espécies, utilizando a técnica de impregnação com nitrato de prata, para verificar se houve um incremento real no número de sítios de DNAr 35S ativos. Para a impregnação de nitrato de prata, as lâminas foram preparadas com maceração enzimática como descrito anteriormente. Uma gota de 50% de nitrato de prata diluído em água destilada foi adicionada a cada lâmina, coberta com uma lamínula e mantida a 60°C em banho-maria durante 1-2 horas (ligeiramente modificada a partir de [Hizume et al., 1980]. Quando os nucléolos foram claramente diferenciados, as lâminas foram lavadas, secas ao ar e montadas em glicerol.

### **Medição do tamanho cromossômico e citometria de fluxo**

A estimativa do tamanho do cromossomo foi baseada em medidas de cinco metáfases de *C. monogyna* e cinco de *C. indecora*, usando o software Adobe Photoshop CS3 versão 10.0. Para a citometria de fluxo, preparou-se uma suspensão de núcleos a partir de pontas de talos utilizando tampão WPB [Loureiro et al., 2007]. Os núcleos interfásicos foram corados com iodeto de propídio e a quantidade de DNA nuclear foi estimada usando um citômetro de Fluxo CyFlow SL (Partec, Görlitz, Alemanha). Como controle interno foram utilizadas folhas

jovens de *Vicia faba* ssp. *faba* 'Inovec' ( $2C = 26,9$  pg /  $2C$  DNA, [Doležel et al., 2005]. O valor final de  $2C$  foi baseado em três medidas diferentes para cada amostra utilizando a equação "média do pico da amostra/ média do pico do padrão  $\times 2C$  conteúdo de DNA de controle interno (pg)" e o software FloMax (Partec) para processamento de dados.

## Resultados

### Número, tamanho e morfologia cromossômico e quantidade de DNA

As análises com coloração convencional mostraram que ambas as espécies apresentaram alta similaridade cariotípica, com  $2n = 30$ , cromossomos grandes e cariótipos simétricos (Fig. 1a e c). Na meiose, eles apresentaram 15 bivalentes com pareamento regular (Fig. 1d e 3d). *Cuscuta monogyna* apresentou 13 pares de cromossomos metacêntricos, variando em tamanho de 13,49 para 19,85  $\mu\text{m}$  e dois pares de acrocêntricos, 12,15  $\mu\text{m}$  de comprimento em média. *Cuscuta indecora* teve 14 pares metacêntricos, variando em tamanho de 11,65 a 18,69  $\mu\text{m}$  e um par acrocêntrico com cerca de 10,41  $\mu\text{m}$  de comprimento. O comprimento do cariótipo haploide foi maior em *C. monogyna* (239,47  $\mu\text{m}$ ) do que em *C. indecora* (215,9  $\mu\text{m}$ ). As constrições secundárias não foram visíveis nos cromossomos de *C. monogyna*, enquanto que em *C. indecora* apenas um par de constrições secundárias proximais foi observado (Fig. 2a' e 3a'). O número de nucléolos variou de um a seis em *C. monogyna*, mas a maioria dos núcleos apresentou dois nucléolos grandes e alguns pequenos (Fig. 1f). Em *C. indecora*, a maioria dos núcleos exibiu um ou dois nucléolos e em apenas poucas células apareceram três ou quatro nucléolos (Fig. 1e). O número de núcleos analisados foi 3052 em *C. monogyna* e 1225 em *C. indecora* e o número médio de nucléolos por núcleo foi de 2,23 e 1,3 respectivamente.

O tamanho do genoma também foi maior em *C. monogyna* que em *C. indecora*. Embora tenha havido uma grande diferença entre os valores obtidos para as duas amostras de *C. indecora* ( $2C = 45,14 \pm 0,96$  pg e  $2C = 50,03 \pm 0,05$  pg) os desvios padrões e os coeficientes de variação foram pequenos (CV = 2,66 e 3,43, respectivamente). Essas amostras de *C. indecora* foram obtidas de plantas enviadas da Universidade Toronto-Mississauga (Canadá) e medidas em Recife seis a 10 dias após a coleta. Por outro lado, não houve diferenças significativas entre as quatro amostras de *C. monogyna* ( $2C = 66,08 \pm 0,09$  pg;  $68,15 \pm 0,01$ ;  $68,59 \pm 0,27$ ;  $67,51 \pm 0,74$ ) provenientes de material fresco crescendo no jardim experimental do Departamento de Botânica, no primeiro caso, e plantas enviadas da Universidade Toronto-Mississauga, nas demais.

### **Bandas CMA/DAPI e sítios de DNAr**

Os cromossomos de *C. monogyna* corados com CMA/DAPI revelaram um grande número de bandas CMA<sup>+</sup> e DAPI<sup>+</sup>, resultando em um padrão de bandas “listrado” em alguns braços cromossômicos (Fig. 2a e a’ e 3a e a’). No entanto, a maioria das bandas foi fracamente contrastada, especialmente as bandas CMA<sup>+</sup>. A grande maioria das bandas estavam localizadas em posições intersticiais e mais concentradas em um dos braços cromossômicos, geralmente o menor deles. Um número menor de bandas e sítios de DNAr foi encontrado nas regiões terminais e proximais dos cromossomos, além de umas poucas bandas centroméricas. Este número surpreendente de bandas foi mais claramente observado nos núcleos zigotênicos ou paquitênicos, onde os pequenos blocos heterocromáticos foram mais evidentes (Fig. 2b’’ e 3c), permitindo contar completamente cerca de 160 bandas heterocromáticas. Além disso, algumas bandas CMA<sup>+</sup> ou DAPI<sup>+</sup> foram às vezes observadas como bandas negativas para DAPI ou CMA, respectivamente (Fig. 2d).

A hibridização *in situ* com sondas de DNAr 5S e 35S em *C. monogyna* revelou cerca de 32 sítios de 5S e 30 sítios de DNAr 35S (Fig. 2c’). O número exato de sítios foi difícil de identificar, porque alguns deles estavam muito proximamente posicionados e outros foram fracamente marcados. A maioria dos sítios de DNAr 35S e alguns sítios de 5S foram colocalizados com bandas CMA<sup>+</sup>, mas nenhum sítio foi claramente colocalizado com alguma banda DAPI<sup>+</sup> ou com outro sítio de DNAr diferente. Todas as bandas CMA<sup>+</sup> centroméricas, algumas bandas intersticiais e pelo menos um par de bandas CMA<sup>+</sup> terminais não foram associadas a sítios de DNAr, indicando a ocorrência de pelo menos dois tipos diferentes de heterocromatina CMA<sup>+</sup>.

Todos os cromossomos tiveram pelo menos um sítio de DNAr ou uma banda heterocromática e a combinação dessas duas marcas cromossômicas permitiu a identificação de todos os pares cromossômicos. A figura 2d ilustra bem a caracterização dos dois pares cromossômicos portadores dos maiores sítios de DNAr 35S. O maior sítio de DNAr 35S foi colocalizado com uma banda fortemente negativa com DAPI, mas não foi diferencialmente corado com CMA (parte superior da Fig. 2d). Esse sítio foi posicionado intersticialmente no braço curto de um par de cromossomos metacêntricos apresentando uma banda DAPI<sup>+</sup> puntiforme no centrômero. Além disso, entre esse sítio de DNAr 35S e o centrômero havia ainda um segundo sítio de DNAr 35S e um sítio duplo de DNAr 5S, enquanto no braço longo não foi observado nenhum sítio ou banda. O segundo maior sítio de DNAr 35S foi posicionado na região terminal do braço curto de um par acrocêntrico adjacente a um sítio de

DNAr 5S. No braço longo desse acrocêntrico foram observados dois sítios de DNAr 5S separados por uma banda DAPI<sup>+</sup> (Fig. 2d inferior).

Em *C. indecora*, o número de bandas CMA<sup>+</sup> e DAPI<sup>+</sup> foi menor que em *C. monogyna*, mas quase todas as bandas foram também fracamente contrastadas, pequenas e intersticiais. Apenas um par de cromossomos metacêntricos apresentou uma grande banda terminal DAPI<sup>+</sup> e um outro par apresentou uma banda DAPI<sup>+</sup> pequena e bem brilhante na região proximal (Fig. 3a-a'), no braço oposto à maior banda CMA<sup>+</sup> proximal. Foram observadas 10 outras bandas DAPI<sup>+</sup> proximais ou pericentroméricas pequenas e cerca de 12 bandas CMA<sup>+</sup>, todas colocalizadas com sítios de DNAr, exceto um par de bandas CMA<sup>+</sup> proximais (Fig. 3a' e d). Entretanto, após a FISH o número de bandas heterocromáticas observada foi bem maior que na coloração direta CMA/DAPI (Fig. 3a''). Contudo, nesse caso, a especificidade do DAPI por regiões ricas em AT foi perdida, provavelmente pelo processo de desnaturação e renaturação do DNA durante a FISH, sendo esse resultado semelhante às bandas C observadas com Giemsa [Barros e Silva and Guerra, 2010].

Em *C. indecora*, foram localizados cinco pares de sítios de DNAr 5S, todos intersticiais ou subterminais, exceto o maior deles, localizado na região terminal do braço longo do par acrocêntrico (Fig. 3b). Além disso, em algumas células foram observados mais um ou dois pares de sítios pequenos e fracos. Em relação aos sítios de DNAr 35S, foram observados dois pares proximais em cromossomos metacêntricos, sendo que apenas o maior deles foi colocalizado com uma banda CMA<sup>+</sup> (Fig. 3b' e b''). Além desses, foi encontrado mais um par de sítios proximais, bem pequenos e visíveis apenas em algumas células (Fig. 3d'). A figura 3d' mostra um paquíteno com 15 bivalentes, onde se vê bem os 5 pares de sítios de DNAr 5S e os 3 sítios de DNAr 35S. A figura 3d mostra também que algumas bandas CMA co-localizaram com sítios de DNAr 35S e outras que não.

## Discussão

### Tamanho do genoma e simetria cariotípica

O tamanho do genoma encontrado para as duas espécies de *Cuscuta* analisadas ficou entre os mais altos conhecidos para eudicotiledôneas, sendo o genoma de *C. monogyna* (2C = 67,58 pg) menor apenas que os genomas de algumas espécies de Viscaceae e Loranthaceae (LEITCH; LEITCH, 2013). O tamanho do genoma de *C. indecora* estimado aqui (2C = 45,50 e 50,03 pg) foi bem menor que o registro anterior para essa espécie (2C = 65,54 pg; McNeal et al. [2007]). Essa diferença na quantidade de DNA é muito alta para ser atribuída a variação

intraespecífica, uma vez que na natureza a variação é usualmente menor que 10% [Greilhuber, 2005]. A ocorrência de citótipos com diferentes números cromossômicos também parece pouco provável, uma vez que a contagem de três das nossas amostras e de três outras registradas na literatura apresentaram sempre  $2n = 30$ . Uma outra fonte comum de erro é a identificação botânica, mas nesse caso ambas as amostras foram identificadas por especialistas no gênero. É possível que essa variação seja devida a erro na quantificação do DNA ou a limitações do próprio material, como por exemplo, a presença em maior ou menor quantidade de componentes citoplasmáticos inibidores da coloração [Greilhuber, 2005]. As nossas medições não puderam ser repetidas e foram feitas depois de vários dias de coleta do material, o que pode ter contribuído para essas discrepâncias. Entretanto, o estado de conservação do material foi suficiente para analisar os cromossomos após pré-tratamento, sugerindo que estava bem conservado. Em *C. gronovii* Willdenow, McNeal et al. [2007] obtiveram diferentes valores  $2C$  para cada uma das cinco amostras analisadas, variando de 4,37 a 13,81 pg. Segundo esses autores, essa variação poderia ser devida ao fato de que as gemas apicais de *Cuscuta* tem um crescimento muito rápido, levando a que núcleos interfásicos em diferentes fases de S tenham sido incluídos em cada medição, ou ainda devido a endopoliploidia, comum em tecidos em intensa atividade metabólica.

O fato de que as demais espécies analisadas do subgênero *Grammica* apresentaram quantidade de DNA e tamanho cromossômico muito menor que *C. indecora* [McNeal et al., 2007; Ibiapino, 2018] sugere que a mudança de tamanho do genoma tenha ocorrido em *C. indecora* ou dentro do clado *Indecora*, um grupo de espécies muito pequeno [Costea et al., 2015]. Ao contrário do subgênero *Indecora*, no subgênero *Monogynella* a quantidade de DNA nuclear de *C. monogyna* e das duas outras espécies conhecidas, *C. exaltata* Engelmann ( $2C = 41,86$  pg) e *C. lupuliformis* Krockner ( $2C = 44,93$  pg) [McNeal et al., 2007], foi sempre alto. Igualmente *C. reflexa* Roxb., a única outra espécie do subgênero com dados cariotípicos conhecidos ( $2n = 32$ ), tem cromossomos bem grandes (10,42 a 23,06  $\mu\text{m}$ ; [Kaul and Bhan, 1974]). Isso sugere que cromossomos grandes seja uma característica comum às espécies de *Monogynella* e que esse aumento tenha ocorrido antes da diversificação desse subgênero. Como as demais Convolvulaceae parecem possuir cromossomos pequenos [Pitrez et al., 2008], a expansão do genoma em *Monogynella* deve ter ocorrido após a separação do gênero *Cuscuta* de seu grupo irmão. Portanto, em *Cuscuta*, como em diversos outros grupos onde ocorrem espécies com grandes genomas, a expansão do genoma parece ter se dado de forma súbita, seguindo um modelo pontuado ao invés de gradual [Leitch et al., 2007; Pellicer et al., 2014]. Essas expansões abruptas são geralmente devidas à intensa proliferação de um ou

poucos tipos de retroelementos [Piegu et al., 2006; Bennetzen and Wang, 2014] embora outros tipos de sequências também possam contribuir para o aumento do valor C [Gaeta et al., 2010; Li et al., 2017].

### **Heterocromatina e sítios de DNAr**

Os cromossomos de *C. monogyna* chamam a atenção pelo grande número de blocos de heterocromatina e de sítios de DNAr. Em *C. indecora*, a quantidade de bandas e de sítios de DNAr 5S foi maior que os padrões típicos para angiospermas [Guerra, 2000; Roa and Guerra, 2015]. Nessas duas espécies, as bandas heterocromáticas foram de cinco tipos diferentes: 1) Bandas DAPI<sup>+</sup> maiores e mais brilhantes, geralmente proximais; 2) Bandas DAPI<sup>+</sup> pequenas e fracas, geralmente intersticiais; 3) Bandas CMA<sup>+</sup> colocalizadas com sítios de DNAr 5S; 4) Bandas CMA<sup>+</sup> colocalizadas com sítios de DNAr 35S e 5) Bandas CMA<sup>+</sup> não relacionadas aos sítios de DNAr. A colocalização de bandas CMA<sup>+</sup> com sítios de DNAr 35S tem sido observada em praticamente todas as espécies analisadas [Guerra, 2000] enquanto a colocalização com sítios de DNAr 5S está restrita a um número menor de espécies (ver por exemplo, Cabral et al., [2006]). A diferença na afinidade dos sítios de DNAr 5S pelo CMA provavelmente se deve a variações no conteúdo de GC desses sítios. A unidade de repetição do DNAr 5S contém uma sequência codificante conservada, geralmente com 120 pb, e uma sequência espaçadora, ou NTS (Non Transcribed Spacer), de tamanho muito variável e conteúdo de GC baixo. Entretanto em algumas espécies o conteúdo de GC do NTS pode ser maior que 50% [Waminal et al., 2014], o que poderia explicar essa variação na associação com bandas CMA<sup>+</sup>.

Apesar do grande número de bandas heterocromáticas, principalmente em *C. monogyna*, as bandas CMA<sup>+</sup> e DAPI<sup>+</sup> nas duas espécies foram quase sempre pequenas e pouco contrastadas, ao contrário de *C. approximata*, que apresentou bandas DAPI<sup>+</sup> grandes ocupando cerca de 30 a mais de 50% da extensão de cada cromossomo, além de umas poucas bandas CMA<sup>+</sup> [Guerra and García, 2004]. Bandas heterocromáticas pequenas e bandas pouco ou não perceptíveis com CMA ou DAPI provavelmente indicam sítios com um número baixo de sequências repetitivas e com pouca diferenciação na proporção de AT/GC (revisado por Barros e Silva and Guerra [2010]). Análises recentes do “satelitoma” de algumas espécies revelaram a existência de um grande número de sequências satélites diferentes, muitas delas formadas por pequenos arranjos espalhados pelos genomas [Ruiz-Ruano et al., 2016; Palacios-Gimenez et al., 2017], que poderiam gerar os padrões encontrados nestas duas espécies.

O número excepcionalmente alto de sítios de DNAr 5S e 35S em *C. monogyna* dificilmente pode ser explicado como consequência de uma maior necessidade de atividade de síntese de DNAr. Nessa espécie, o número médio de nucléolos foi apenas um pouco maior que em *C. indecora*, mas os nucléolos desta última foram geralmente maiores, indicando que a atividade de síntese nucleolar não acompanhou o aumento no número de sítios de DNAr. Algumas espécies apresentam dezenas de sítios de DNAr 5S e 35S espalhados por todos os cromossomos (ver por exemplo, Martínez et al. [2010]), mas não se sabe se todos são ativos. Embora espécies com número alto de sítios de DNAr 35 possam ter todos os sítios ativos [Brasileiro-Vidal et al., 2003; Souza et al., 2016], é possível que alguns desses, como também alguns de DNAr 5S, sejam inativos, contenham apenas versões truncadas desses genes ou sejam sequências de DNA satélite formadas a partir do DNA espaçador do DNAr 5S ou 35S [Almeida et al., 2012; Bueno et al., 2016].

### **Simetria cariotípica: acaso ou necessidade?**

Apesar de provavelmente terem expandido seus genomas independentemente, a morfologia dos cromossomos de *C. monogyna* e *C. indecora* resultou em cariótipos muito semelhantes. Igualmente em *C. reflexa* Roxb. (*Monogynella*), o cariótipo está formado por cromossomos grandes, meta a acrocêntricos [Kaul and Bhan, 1974], seguindo a nomenclatura usada para as demais espécies [Guerra, 1988]. Isso sugere que os dois eventos de expansão do genoma tenham ocorrido de forma equitativa em todos os braços cromossômicos, exceto nos braços curtos dos acrocêntricos, conservando a simetria do cariótipo. Levin [2002], argumenta que se os cariótipos ancestrais de dois grupos não tiverem sido muito assimétricos e tiver ocorrido um aumento equitativo da quantidade de DNA em todos os braços cromossômicos, haverá necessariamente a um aumento da simetria cariotípica. Embora cariótipos assimétricos sejam encontrados em algumas espécies dos subgêneros *Grammica*, *Cuscuta* e *Pachystigma*, a grande maioria das espécies do gênero têm cariótipos com cromossomos pequenos e predominantemente metacêntricos a acrocêntricos [García and Castroviejo, 2003; Ibiapino, 2018, García et al., não publicado], sugerindo que a evolução da simetria nessas espécies tenha seguido o caminho esperado, segundo a sugestão de Levin [2002].

Contudo, um estudo extenso na família Liliaceae revelou que o aumento da quantidade de DNA pode ter efeitos variáveis na simetria de diferentes gêneros e tribos e que o incremento de DNA não foi equitativo para todos os cromossomos, sendo maior nos braços maiores [Peruzzi et al., 2008]. De fato, um aumento equitativo do tamanho do genoma é mais provável ocorrer quando promovido por retroelementos, capazes de gerar milhares de novas

cópias e se reintegrar aleatoriamente no genoma [Piegu et al., 2006]. Igualmente, o surgimento de blocos de DNA satélite espalhados equilocalmente em todos os cromossomos, geralmente em regiões proximais ou terminais dos cromossomos [Ribeiro et al., 2017; Garrido-Ramos, 2017], poderia ter um efeito semelhante na simetria do cariótipo. Contudo, a ocorrência de grandes blocos de heterocromatina em um ou poucos cromossomos pode levar a um aumento na assimetria cariotípica, como em *Eleutherine* [Feitoza and Guerra, 2011] e *Muscari* [de la Herrán et al., 2001].

No caso de *C. monogyna*, os sítios de DNAr e bandas heterocromáticas foram principalmente intersticiais, não apresentaram um padrão comum a todos os cromossomos e foram mais frequentes nos braços curtos que nos longos. Mesmo assim, o cariótipo se manteve simétrico. Em *C. indecora*, as sequências que formam os sítios de DNAr e as bandas heterocromáticas tiveram padrões bem distintos: as bandas CMA não associadas ao DNAr foram principalmente proximais e intersticiais, os sítios de DNAr 5S foram subterminais e intersticiais, enquanto os sítios de DNAr 35S foram sempre proximais. Embora completamente não relacionadas, essas bandas não alteraram o tamanho dos braços cromossômicos. Mesmo a maior banda do cariótipo de *C. indecora*, uma banda DAPI<sup>+</sup> na região terminal de um braço cromossômico, não modificou a morfologia de metacêntrico nesse cromossomo. Esses dados sugerem que a expansão dessas diferentes sequências pode ser ponderada por forças seletivas, da mesma maneira que o tamanho total do genoma pode ter valor seletivo [Bilinski et al., 2017], e levantam a possibilidade de que haja um mecanismo de controle da proporção de DNA nos braços cromossômicos, de forma a não alterar significativamente a simetria cariotípica. Em outras palavras, o aumento do valor C nas angiospermas pode ser passivo, livre de forças seletivas, como proposto por Leitch et al. [2007], mas a distribuição de diversas sequências repetitivas capazes de rápida expansão nos braços cromossômicos pode ter limites de tolerância.

## Referências

Garcia S, Leitch IJ, Anadon-Rosell A, Canela MÁ, Gálvez F, Garnatje T, et al.: Recent updates and developments to plant genome size databases. *Nucleic Acids Res* 42:D1159–D1166 (2014).

Gardner AG, Vaio M, Guerra M, Emswiler E: Diversification of the American bulb-bearing *Oxalis* (Oxalidaceae): dispersal to North America and modification of the tristylous breeding system. *Am J Bot* 99:152–164 (2012).

Michael TP: Plant genome size variation: bloating and purging DNA. *Brief Funct Genomics* 13:308–317 (2014).

Barros e Silva AE, dos Santos Soares Filho W, Guerra M: Linked 5S and 45S rDNA Sites Are Highly Conserved through the Subfamily Aurantioideae (Rutaceae). *Cytogenet Genome Res* 140:62–69 (2013).

Garrido-Ramos MA: Satellite DNA: an evolving topic. *Genes* 8:230 (2017).

Guerra M: Chromosome number variation and evolution in monocots. *Monocots Syst Evol CSIRO Melb* 127–136 (2000).

Roa F, Guerra M: Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. *BMC Evol Biol* 12:225 (2012).

Roa F, Guerra M: Non-Random Distribution of 5S rDNA Sites and Its Association with 45S rDNA in Plant Chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 146:243–249 (2015).

Prokopowich CD, Gregory TR, Crease TJ: The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome* 46:48–50 (2003).

Garcia MA, Costea M, Kuzmina M, Stefanovi S: Phylogeny, character evolution, and biogeography of *Cuscuta* (dodders; Convolvulaceae) inferred from coding plastid and nuclear sequences. *Am J Bot* 101:670–690 (2014).

McNeal JR, Arumugunathan K, Kuehl JV, Boore JL, de Pamphilis CW: Systematics and plastid genome evolution of the cryptically photosynthetic parasitic plant genus *Cuscuta* (Convolvulaceae). *BMC Biol* 5:55 (2007).

Pazy B, Plitmann U: Chromosome divergence in the genus *Cuscuta* and its systematic implications. *Caryologia* 48:173–180 (1995).

Guerra M, García MA: Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). *Genome* 47:134–140 (2004).

García MÁ, Castroviejo S: Estudios citotaxonómicos en las especies Ibéricas del género *Cuscuta* (Convolvulaceae). *An Jardín Botánico Madr* (2003)

Kubešová M, Moravcova L, Suda J, Jarošík V, Pyšek P: Naturalized plants have smaller genomes than their non-invading relatives: a flow cytometric analysis of the Czech alien flora. *Preslia* 82:81–96 (2010).

Stefanović S, Olmstead RG: Testing the Phylogenetic Position of a Parasitic Plant (*Cuscuta*, Convolvulaceae, Asteridae): Bayesian Inference and the Parametric Bootstrap on Data Drawn from Three Genomes. *Syst Biol* 53:384–399 (2004).

Yen DE, Gaffey PM, Coates DJ: Chromosome numbers of Australian species of *Ipomoea* L. (Convolvulaceae). *Austrobaileya* 749 - 755 (1992).

Pitrez SR, de Andrade LA, Alves LIF, Felix LP: Karyology of some Convolvulaceae species occurring in NE Brazil inselbergs. *Plant Syst Evol* 276:235–241 (2008).

MLH K: Cytology of *Cuscuta reflexa* Roxb. *Cytologia* (Tokyo) 39:493–498 (1974).

Guerra M: Hematoxylin: a simple, multiple-use dye for chromosome analysis. *Genet Mol Biol* 22:77–80 (1999).

Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A: Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661–1672 (2002).

Wanzenbock E-M, Schofer C, Schweizer D, Bachmair A: Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 11:1007–1016 (1997).

Hizume M, Sato S, Tanaka A: A highly reproducible method of nucleolus organizing regions staining in plants. *Stain Technol* 55:87–90 (1980).

Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C: Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Ann Bot* 98:679–689 (2006).

Barros e Silva AE, Guerra M: The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotech Histochem* 85:115–125 (2010).

Leitch IJ, Leitch AR: Genome size diversity and evolution in land plants; in : *Plant Genome Diversity Volume 2*. Springer 307–322 (2013).

Greilhuber J: Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Ann Bot* 95:91–98 (2005).

Costea M, García MA, Stefanović S: A Phylogenetically based infrageneric classification of the parasitic plant genus *Cuscuta* (Dodders, Convolvulaceae). *Syst Bot* 40:269–285 (2015).

Leitch IJ, Beaulieu JM, Cheung K, Hanson L, Lysak MA, Fay MF: Punctuated genome size evolution in Liliaceae. *J Evol Biol* 20:2296–2308 (2007).

Pellicer J, Kelly LJ, Leitch IJ, Zomlefer WB, Fay MF: A universe of dwarfs and giants: genome size and chromosome evolution in the monocot family Melanthiaceae. *New Phytol* 201:1484–1497 (2014).

Piegu B, Guyot R, Picault N, Roulin A, Saniyal A, Kim H, et al.: Doubling genome size without polyploidization: dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. *Genome Res* 16:1262–1269 (2006).

Bennetzen JL, Wang H: The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. *Annu Rev Plant Biol* 65:505–530 (2014).

Gaeta ML, Yuyama PM, Sartori D, Fungaro MHP, Vanzela ALL: Occurrence and chromosome distribution of retroelements and NUPT sequences in *Copaifera langsdorffii* Desf.(Caesalpinioideae). *Chromosome Res* 18:515–524 (2010).

Li S-F, Su T, Cheng G-Q, Wang B-X, Li X, Deng C-L, et al.: Chromosome evolution in connection with repetitive sequences and epigenetics in plants. *Genes* 8:290 (2017).

Cabral JS, Felix LP, Guerra M: Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genet Mol Biol* 29:659–664 (2006).

Waminal NE, Ryu KB, Park BR, Kim HH: Phylogeny of Cucurbitaceae species in Korea based on 5S rDNA non-transcribed spacer. *Genes Genomics* 36:57–64 (2014).

Palacios-Gimenez OM, Dias GB, Lima LG, Ramos É, Martins C, Cabral-de-Mello DC: High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*. *Sci Rep* 7:6422 (2017).

Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM: High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci Rep* 6: 28333 (2016).

Martínez J, Vargas P, Luceño M, Cuadrado Á: Evolution of *Iris* subgenus *Xiphium* based on chromosome numbers, FISH of nrDNA (5S, 45S) and trnL–trnF sequence analysis. *Plant Syst Evol* 289:223–235 (2010).

Brasileiro-Vidal AC, Cuadrado A, Brammer SP, Zanatta ACA, Prestes AM, Moraes-Fernandes MIB, et al.: Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poaceae) using in situ hybridization with different DNA sequences. *Genet Mol Biol* 26:505–510 (2003).

Souza G, Crosa O, Speranza P, Guerra M: Phylogenetic relations in tribe Leucocoryneae (Amaryllidaceae, Allioideae) and the validation of *Zoellnerallium* based on DNA sequences and cytomolecular data. *Bot J Linn Soc* 182:811–824 (2016).

Almeida C, Fonsêca A, dos Santos KGB, Mosiolek M, Pedrosa-Harand A: Contrasting evolution of a satellite DNA and its ancestral IGS rDNA in *Phaseolus* (Fabaceae). *Genome* 55:683–689 (2012).

Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Martí DA, Mariguela TC, Cabral-de-Mello DC: The 5S rDNA in two *Abracris* grasshoppers (Ommatolampidinae: Acrididae): molecular and chromosomal organization. *Mol Genet Genomics* 291:1607–1613 (2016).

Guerra M dos S: Introdução à citogenética geral. Guanabara Koogan (1988).

Levin DA: The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press (2002).

Peruzzi L, Leitch IJ, Caparelli KF: Chromosome diversity and evolution in Liliaceae. *Ann Bot* 103:459–475 (2008).

Ribeiro T, Dos Santos KG, Richard MM, Sévignac M, Thareau V, Geffroy V, et al.: Evolutionary dynamics of satellite DNA repeats from *Phaseolus* beans. *Protoplasma* 254:791–801 (2017).

Feitoza L, Guerra M: Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. *Genetica* 139:305–314 (2011).

de la Herrán R, Robles F, Cuñado N, Santos JL, Ruiz Rejón M, Garrido-Ramos MA, et al.: A heterochromatic satellite DNA is highly amplified in a single chromosome of *Muscari* (Hyacinthaceae). *Chromosoma* 110:197–202 (2001).

Bilinski P, Albert PS, Berg JJ, Birchler J, Grote M, Lorant A, et al.: Parallel altitudinal clines reveal adaptive evolution of genome size in *Zea mays*. *BiorXiv* 134528 (2017).

Tab 1: Procedência dos acessos de *C. monogyna* e *C. indecora* analisadas, seguido de número cromossômico e quantidade de DNA (2C)|Desvio Padrão (DP)

Espécie	Número de Procedência herbário	de	Procedência	2n	2C ±DP
<i>C. monogyna</i> Vahl	UTM-1348		Israel: Kursi; dat: 2012	30	67,58 ± 0,27
<i>C. indecora</i> Choisy			México, (cedido pela SAGARPA - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), localidade desconhecida, 2013	30	45,58± 0,9
	Stefanović 16-74, TRTE	SS-	USA: New Mexico; Chaves Co., Roswell, corner E McCune and S Main St (Hwy 285); dat: 16 Aug 2016	30	
	Stefanović 16-53, TRTE	SS-	USA: New Mexico; Socorro Co., on Pueblitos Rd., 1/3 mi E of Escondida Bridge Park (1/2 mi E of Hwy 408); dat: 9 Aug 2016	30	
	Stefanović 15-77 b, TRTE	SS-	Procedência desconhecida		50,03± 0,5

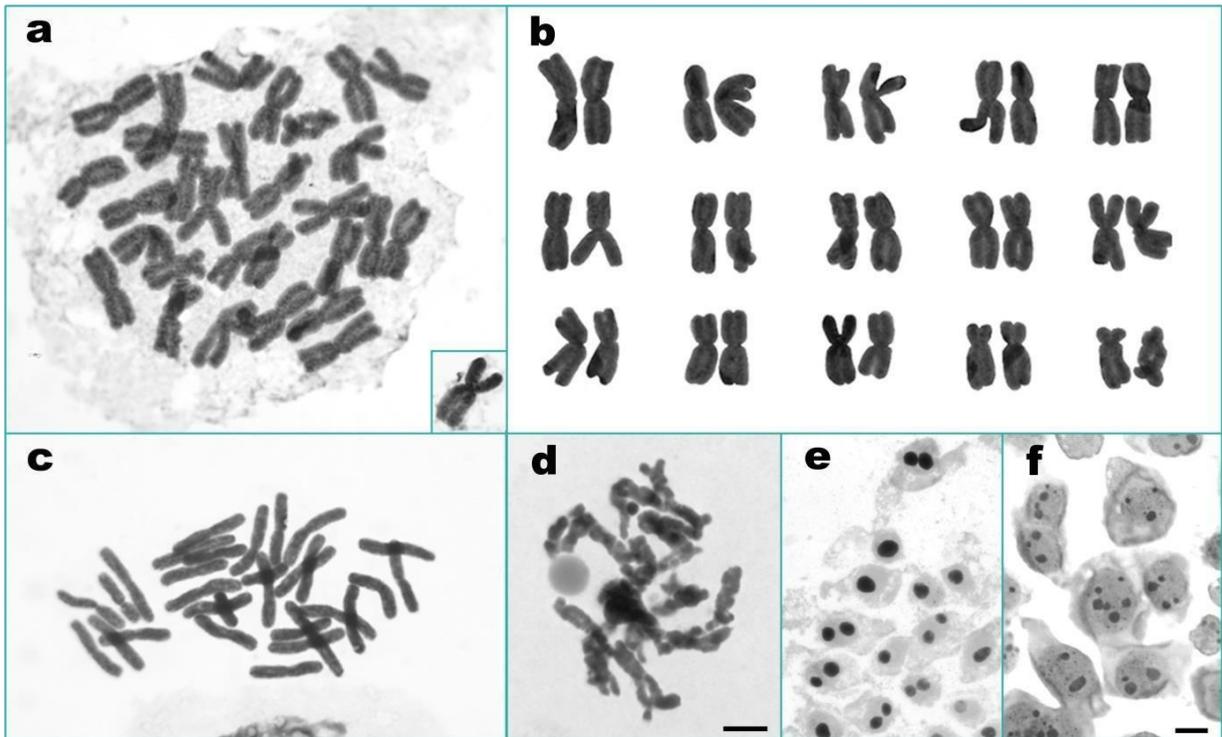


Fig. 1: Cromossomos de *Cuscuta monogyna* (a, f) e *C. indecora* (c-e) coradas com hematoxilina. Cariograma de *C. monogyna* (b) mostrando 13 pares de cromossomos metacêntricos e dois pares acrocêntricos. Paquíteno de *C. indecora* (d). Núcleos interfásicos impregnados com nitrato de prata. *Cuscuta indecora* (e) e *C. monogyna* (f). Barras em d (válida para a, c e d) e em f (válida para e e f) correspondem a 10  $\mu\text{m}$ .

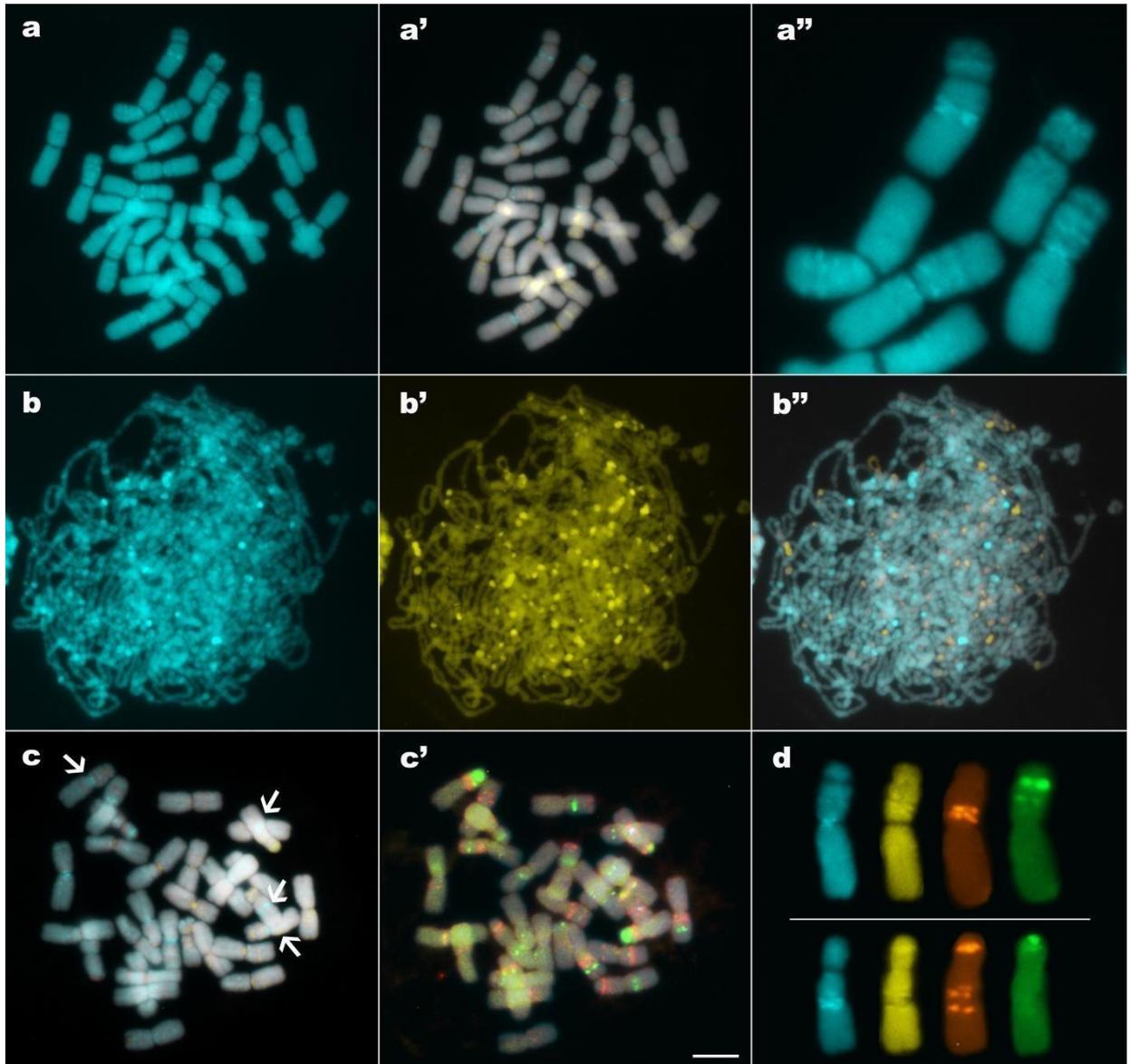


Fig. 2: Metáfases (**a**, **a'**, **c** e **c'**) e zigóteno (**b**, **b'** e **b''**) de *C. monogyna* corados com DAPI (**a** e **b**), CMA (**b'**), CMA e DAPI sobrepostos (**a'**, **b''** e **c**) e coloração sequencial CMA/DAPI-FISH (**c**, **c'**) com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 35S (verde). Os cromossomos com os maiores sítios de DNAr 35S estão indicados com setas em **c**. Em **d**, esses mesmos cromossomos de uma outra célula são mostrados, destacando as diferentes colorações. Barra em **c'** corresponde a 10  $\mu$ m.

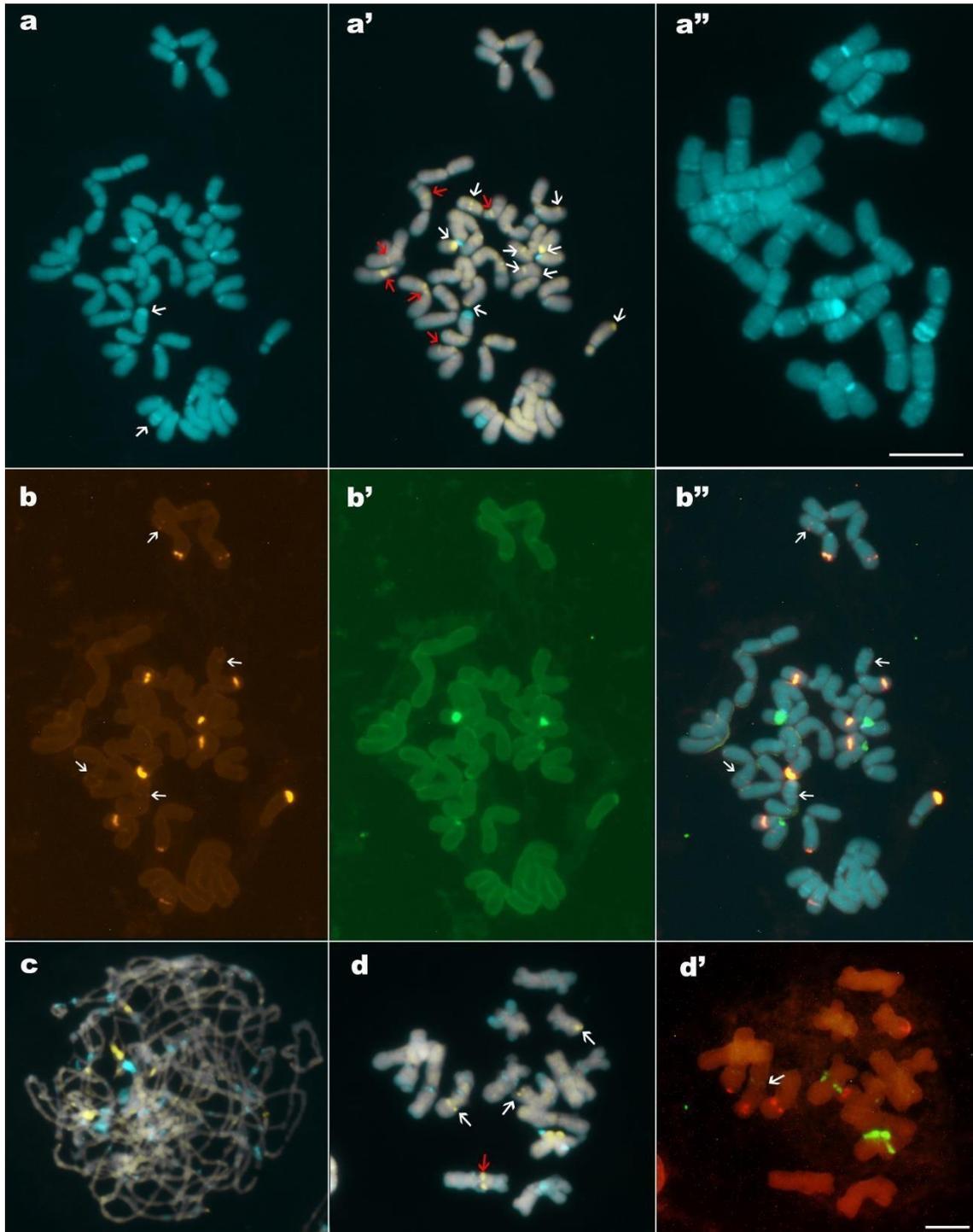


Fig. 3: Metáfases (**a**, **a'**, **a''**), zigóteno (**c**) e diplóteno (**d** e **d'**) de *C. indecora* corados com DAPI (**a**, **a'**), CMA e DAPI sobrepostos (**a'**, **c** e **d**) e FISH com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 35S (verde) (**b**, **b'**, **b''** e **d'**). Setas vermelhas em **a'** e **d** indicam bandas CMA<sup>+</sup> que não colocalizaram com as sondas de DNAr. Setas brancas indicam bandas DAPI<sup>+</sup> mais intensas (**a**), bandas CMA<sup>+</sup> que colocalizaram com sítios de DNAr (**a'**, **d**), sítios de DNAr 5S e 35S fracamente marcados (**b''** e **d'**, respectivamente). Barras em **c** e **d'** correspondem a 10  $\mu$ m. Barra em **d'** válida para todas as figuras exceto **c**.

### 3.2 CITOGENÉTICA, ORIGEM E EVOLUÇÃO DE *Cuscuta veatchii* Brandege (CONVOLVULACEAE)

Amália Ibiapino<sup>1</sup>, Miguel García<sup>2</sup>, Mihai Costea<sup>3</sup>, Sasa Stefanović<sup>2</sup>, Marcelo Guerra<sup>1\*</sup>

1 - Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal – Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Recife, PE, Brasil

2 – Departamento de Biologia, Universidade de Toronto-Mississauga, Mississauga, Ontario L5L 1C6, Canadá

3 – Departamento de Biologia, Universidade de Wilfrid Laurier, Waterloo, Ontario N2L 3C5, Canadá

\*Autor para correspondência: Marcelo Guerra

Departamento de Botânica, CCB

Universidade Federal de Pernambuco

50.670-420 Recife, PE

msfguerra@hotmail.com

#### **Resumo**

Eventos de hibridização interespecífica são comuns na evolução das angiospermas, principalmente na formação de aloploidos. No gênero *Cuscuta* (Convolvulaceae), um grupo de plantas de difícil delimitação de espécies tem sido encontrado alguns indícios de hibridização interespecífica. Dados moleculares sugerem que *C. veatchii* seria um híbrido entre *C. denticulata* e *C. nevadensis*. Para testar essa hipótese foi feita uma análise citogenética com coloração CMA/DAPI e hibridização *in situ* fluorescente utilizando sondas genômicas (GISH) e sondas de DNAr 5S e 35S. A análise revelou que os cromossomos de *C. denticulata* eram menores e possuíam a região centromérica bem definida, enquanto *C. nevadensis* possuía cromossomos maiores e com a região centromérica mais larga e fortemente corada, além de umas poucas bandas CMA<sup>+</sup> nas duas espécies. Em *C. veatchii* ( $2n = 60$ ) foi possível distinguir cerca de 30 cromossomos semelhantes aos de *C. denticulata* e outros 30 semelhantes aos de *C. nevadensis*. A análise com sondas genômicas de *C. denticulata* e *C. nevadensis* confirmou a presença desses dois genomas em *C. veatchii*. Curiosamente, a análise dos sítios de DNAr em diferentes populações dessas espécies revelou que o número de sítios em *C. veatchii* [6 (5S) + 4 (35S)] difere do esperado para um híbrido

entre *C. denticulata* [2 (5S) + 2 (35S)] e *C. nevadensis* [6 (5S) + 10 (35S)]. Esses dados indicam que: 1, *C. veatchii* é um aloploiploide; 2, os dois ancestrais diploides já divergiam na estrutura de seus cromossomos antes de ocorrer a hibridização interespecífica; 3, após a formação do aloploiploide os sítios de DNAr parecem ter sido redistribuídos e reduzidos em número. Como os dados filogenéticos sugerem uma divergência recente, é possível que a evolução cariotípica nessas espécies tenha ocorrido numa taxa relativamente alta.

## Introdução

Eventos de hibridização interespecífica são comuns na evolução das angiospermas, sendo a maioria deles acompanhada de poliploidização. Se os híbridos diploides se mantiverem férteis poderão gerar por introgressão gênica uma ampla diversidade de fenótipos, com eventual formação de novas espécies. Se, no entanto, esse evento for acompanhado de poliploidia terá menor chance de introgressão, mas poderá gerar subitamente uma nova espécie (Abbott *et al.*, 2013). A natureza poliploide dos híbridos pode ser identificada numa análise citogenética, mas o reconhecimento de uma espécie ou um indivíduo como híbrido pode ser mais complexa, uma vez que nem sempre os híbridos apresentam fenótipo intermediário entre os ancestrais (SOLTIS; SOLTIS, 2009). Uma análise filogenética utilizando sequências de DNA plastidial e nuclear pode permitir reconhecer híbridos interespecíficos independentemente do fenótipo (Sang and Zhong, 2000). Nesses casos, uma incongruência entre dados filogenéticos de origem plastidial e nuclear pode ser um indicativo de evolução reticulada no grupo, embora outras possíveis causas dessas distorções (contaminação de DNA, variabilidade intraespecífica inexplorada, transferência horizontal, etc) precisem ser avaliadas (Stefanović and Costea, 2008). Como a poliploidia frequentemente acompanha a hibridização interespecífica, uma análise citogenética é fundamental para entender a natureza do híbrido e identificar a presença de marcadores citológicos dos diploides que comprovem sua relação com o híbrido (veja por exemplo, Vaio *et al.* 2005; Lee *et al.*, 2011).

Um bom exemplo disso ocorre no gênero *Cuscuta* L. (Convolvulaceae), que apresenta baixa diversidade fenotípica entre espécies, assim os únicos híbridos reconhecidos foram indicados por análises filogenéticas (Stefanović and Costea, 2008). *Cuscuta* é um gênero composto por cerca de 200 espécies de plantas parasitas herbáceas, com pouca ou nenhuma clorofila e com hastes filiformes que se prendem ao hospedeiro através de haustórios (Stefanović *et al.*, 2007). O gênero encontra-se dividido em quatro subgêneros, sendo que a maioria das espécies (ca. 150) pertence ao subgênero *Grammica* (Lour.) Yunck, de

distribuição predominantemente neotropical (Garcia *et al.*, 2014). Uma análise filogenética indicou ao menos cinco casos de possíveis híbridos nesse subgênero (Stefanović and Costea, 2008; Garcia *et al.*, 2014). Um desses prováveis híbridos se encontra na seção *Denticulata*, constituída por apenas três espécies: *C. denticulata* Engelm., *C. nevadensis* I.M. Johnst. e *C. veatchii* Brandege. Estas três espécies ocorrem nos desertos do sul dos Estados Unidos e México e compartilham características do desenvolvimento embrionário únicas no gênero, destacando-se uma estrutura globosa na extremidade radicular que acumula água e nutrientes necessários para a fase autotrófica inicial de seu desenvolvimento em ambiente seco (Stefanović and Costea, 2008). *Cuscuta nevadensis* tem distribuição parcialmente simpátrica com *C. veatchii* e era considerada sinonímia da mesma, só recentemente as três espécies foram separadas com base em caracteres morfológicos da semente e embrião (Costea *et al.*, 2005). Análises de DNA nuclear (ITS) indicam *C. veatchii* como espécie irmã de *C. denticulata*, enquanto na análise de DNA plastidial (*trnL-F*), *C. veatchii* aparece como irmã de *C. nevadensis* (Stefanović and Costea, 2008).

A maioria das espécies do subgênero *Grammica* apresenta  $2n = 30$  ou, menos frequentemente,  $2n = 60$ , o que sugere que híbridos aloploides podem ter contribuído para a formação de algumas espécies. A caracterização cariotípica de híbridos interespecíficos pode ser feita por meiose ou por mitose. Nesse último caso, são levados em consideração principalmente o número, o tamanho e a morfologia dos cromossomos, além de características estruturais de fácil detecção, como padrão de distribuição de heterocromatina e de sítios de DNA ribossomal, detectados por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (Almeida *et al.*, 2007; de Moraes *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2012). No caso de aloploides, é particularmente recomendada a hibridização genômica *in situ* (GISH), que permite reconhecer os subgenomas que formaram o híbrido utilizando sondas de DNA genômico proveniente de cada um dos prováveis ancestrais (CHESTER *et al.*, 2010).

Neste trabalho foi feita uma caracterização cariotípica de *C. veatchii* e de seus supostos parentais (*C. denticulata* e *C. nevadensis*) utilizando a coloração com os fluorocromos 4 -6- diamidino-2-fenilindol (DAPI) e cromomicina A3 (CMA). Com isso, foi possível analisar o número, tamanho e morfologia dos cromossomos e identificar bandas heterocromáticas de cada espécie. Foi também analisada a distribuição de sítios de DNAr 5S e 35S por FISH e foram comparados os cromossomos de *C. veatchii* com os das outras duas espécies por GISH. Os resultados revelaram que *C. veatchii* é um aloploide, muito provavelmente formado por um evento de hibridização entre os diploides *C. denticulata* e *C. nevadensis*, seguido de poliploidia.

## **Materiais e Métodos**

Sementes de *C. denticulata*, *C. nevadensis* e *C. veatchii* foram obtidas a partir de coletas realizadas em diversas regiões da Califórnia, EUA, e norte do México. A Fig. 1 mostra a distribuição conhecida dessas espécies e os locais de coleta da presente amostra. O material para análise citogenética foi proveniente de sementes germinadas em placas de Petri. Apenas uma amostra de *C. denticulata* (Stefanović SS-13-46 TRTE) foi possível cultivar em casa de vegetação, utilizando como hospedeiros indivíduos de cóleus (*Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd). Os dados de herbário e procedência de cada acesso analisado estão apresentados na Tabela 1.

## **Preparação de lâminas**

A preparação de lâminas foi feita utilizando meristemas apicais de plântulas recém-germinadas ou da amostra de *C. denticulata* cultivada. O material foi pré-tratado com 8-hidroxiquinoleína por 24h a 10°C, fixado em etanol: ácido acético 3:1 (v/v) por um período de 5 a 24 horas em temperatura ambiente e depois estocados à 20°C no próprio fixador. Posteriormente, o material foi lavado em água destilada, digerido em uma solução enzimática contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma) e esmagadas em ácido acético 45%. Por último, a lamínula foi retirada após resfriamento com nitrogênio líquido.

## **Bandeamento CMA/DAPI**

A coloração CMA/DAPI foi feita conforme descrito por Cabral *et al.* (2006) com modificações. As lâminas foram envelhecidas à temperatura ambiente por três dias, depois coradas com 10µl de CMA 0,2 mg/µl por 60 minutos e em seguida corada com 10µl de DAPI 1µg/ml por 30 minutos. As lâminas foram montadas com tampão glicerol-McIlvaine pH 7,0 (1:1) e novamente envelhecidas por três dias à temperatura ambiente. As imagens foram capturadas com câmera COHU CCD acoplada em microscópio de fluorescência Leica DMLB equipado com software QFISH da Leica.

## **Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)**

Todas as hibridizações *in situ* foram feitas segundo o protocolo de Pedrosa *et al.* (2002). Para a localização dos sítios de DNAr, um clone de 500 pb do DNAr 5S (D2) de *Lotus japonicus* (Pedrosa *et al.*, 2002), e um outro de 6,5 kb do DNAr 35S (R2) de *Arabidopsis thaliana* (Wanzenbock *et al.*, 1997), foram utilizados como sondas. As sondas

foram marcadas por *nick translation* (DNase I Thermo Scientific e DNA polymerase I 1U/μl Invitrogen) com Cy3-dUTP (Amersham) e digoxigenina 11-dUTP (Roche), respectivamente. A mistura de hibridização, composta por 60% (v/v) de formamida, 5% (p/v), dextran sulfato, 2x SSC, e 5ng/μl de sonda foi desnaturada a 75°C por 10 minutos. A preparação citológica foi desnaturada por 5 minutos e hibridizada por 18-20 horas a 37°C em câmara úmida. A sonda de DNAr 35S foi detectada com anticorpo primário anti-digoxigenina produzido em ovelha, conjugado com FITC (Roche) e o sinal amplificado com o anticorpo secundário contra anti-digoxigenina de ovelha produzida em coelho conjugada com FITC (Dako). As lâminas foram montadas em Vectashild (Vector) contendo DAPI (2μg/ml). As imagens foram capturadas conforme descrito anteriormente.

### **Hibridização genômica *in situ* (GISH)**

Para a hibridização genômica *in situ*, a extração de DNA genômico de *C. denticulata* e *C. nevadensis* foi feita segundo o protocolo de (DOYLE; DOYLE, 1987). As sondas foram marcadas por *nick translation*, conforme descrito anteriormente, com Cy3-dUTP (Amersham) (*C. denticulata*) e digoxigenina 11-dUTP (Roche) (*C. nevadensis*). O DNA genômico foi fragmentado utilizando a DNase I (Thermo Scientific) a temperatura de 15°C por 1h em pedaços de cerca de 300 pb, verificados por eletroforese em gel de agarose. Após a fragmentação, a reação foi interrompida utilizando 1 μl de EDTA 0,5 M. As hibridizações foram feitas sem DNA bloqueador (DNA não marcado de uma das espécies) ou com bloqueio em concentração 10 vezes maior que o DNA marcado.

### **Resultados**

Todos os acessos de *C. denticulata* e *C. nevadensis* apresentaram número cromossômico  $2n = 30$ , mas algumas características estruturais foram bem distintas. Nos cromossomos de *C. denticulata* a região do centrômero foi sempre fracamente corada com DAPI (Fig. 1a), permitindo observar que todos os cromossomos eram metacêntricos. Além disso, ao menos 18 cromossomos mostraram pequenas bandas CMA<sup>+</sup> proximais ou centroméricas e dois blocos proximais maiores correspondentes ao único par de satélites (Fig. 1a'-a''). Em *C. nevadensis* os cromossomos foram maiores e mais densamente corados, tanto com DAPI quanto com CMA, dificultando a observação dos centrômeros (Fig. 1b-b'). Além disso, foram observadas algumas bandas DAPI<sup>+</sup> grandes, porém pouco contrastadas, na região proximal ou intersticial de alguns cromossomos e algumas bandas CMA<sup>+</sup> pouco contrastadas proximais. O maior par cromossômico apresentou uma banda CMA<sup>+</sup> mais brilhante (Fig.

1b’’), frequentemente formando uma constrição secundária. As duas espécies diferiram também pela estrutura do núcleo interfásico: *C. nevadensis* apresentou núcleos com cromocêntricos grandes e bem definidos e a cromatina difusa pouco corada, enquanto *C. denticulata* apresentou núcleos com cromatina mais uniformemente distribuída e apenas poucos e pequenos cromocêntricos (Fig. 1a-b).

Em *C. veatchii*, todos os acessos apresentaram  $2n = 60$ , destacando-se dois conjuntos de cromossomos morfologicamente distintos: um grupo de cerca de 30 cromossomos menores, menos corados e com constrição primária bem definida, semelhantes aos encontrados em *C. denticulata*, e outro grupo de cerca de 30 cromossomos maiores e mais corados semelhantes aos encontrados em *C. nevadensis* (Fig 1 d-d’). Bandas CMA<sup>+</sup> proximais foram observadas em vários cromossomos pequenos e uma banda proximal no maior par cromossômico, algumas vezes encontrada distendida (Fig 1d). Os núcleos interfásicos de *C. veatchii* apresentaram cromatina difusa mais densa que em *C. nevadensis*, porém com alguns cromocêntricos grandes semelhantes aos desta última espécie (Fig. 1c).

Em relação aos sítios de DNAr, *C. denticulata* apresentou somente um par de DNAr 5S e um par de DNAr 35S em todos os acessos analisados. Esses sítios ocorreram adjacentes no mesmo braço, sendo o 35S posicionado mais proximalmente, geralmente distendido e colocalizado com uma banda CMA<sup>+</sup>, enquanto que o 5S foi mais terminal (Fig. 2a). Em *C. nevadensis*, todos os acessos apresentaram três pares de sítios de DNAr 5S e cinco pares de sítios de DNAr 35S, destacando-se dois pares cromossômicos com sítios de DNAr de 5S e 35S adjacentes, sendo o 35S mais proximal (Fig. 2b’). O maior par de sítios de DNAr 35S teve localização proximal, apareceu frequentemente distendido e foi colocalizado com a maior banda CMA<sup>+</sup> no maior par cromossômico (Fig. 2b-b’).

Em todos os acessos de *C. veatchii* foram observados três pares de sítios de DNAr 5S, um deles bem fracamente marcado, e dois pares de sítios de DNAr 35S proximais. O par de DNAr 5S mais fracamente marcado foi o único adjacente a um sítio de DNAr 35S, também fracamente marcado e localizado em um par cromossômico pequeno e com o centrômero bem definido, típico de *C. denticulata* (Fig. 2c’). O maior par cromossômico de *C. veatchii* pareceu corresponder ao maior par cromossômico de *C. nevadensis*, porque além do tamanho semelhante apresentou também o maior sítio de DNAr 35S, em posição proximal e frequentemente distendido (Fig. 2c’-d).

A GISH utilizando sonda genômica sem DNA bloqueador não foi suficiente para marcar diferencialmente os subgenomas. Entretanto, acrescentado à sonda com o DNA marcado de uma espécie um excesso de 10x mais DNA não marcado da outra espécie foi

suficiente para distinguir os dois subgenomas. Dessa maneira, a sonda genômica de *C. denticulata* marcou 30 cromossomos semelhantes aos de *C. denticulata*, principalmente nas regiões pericentroméricas, enquanto a sonda genômica de *C. nevadensis* marcou de maneira mais dispersas outros 30 cromossomos, incluindo todos os cromossomos maiores e mais bem corados de *C. veatchii* (Fig. 2e'-e'').

## Discussão

O presente trabalho confirma a contagem de  $2n = 30$  para *C. denticulata* (Raven *et al.*, 1965) e revela que *C. nevadensis* e *C. veatchii* possuem  $2n = 30$  e  $2n = 60$ , respectivamente. O número cromossômico  $2n = 30$  é o mais frequente no gênero *Cuscuta* (Pazy and Plitmann, 1995; García and Castroviejo, 2003) e certamente representa a condição diploide. Tetraploides com  $2n = 60$  são mais raros, mas são também conhecidos, principalmente no subgênero *Grammica*, como em *C. cephalanthi* Engelm. e *C. gronovii* Willd. ex Roem. & Schult. (Fogelberg, 1938; McNeal *et al.*, 2007).

A análise com os fluorocromos CMA e DAPI revelou a ocorrência de diversas bandas CMA<sup>+</sup> proximais em *C. denticulata*, sendo apenas uma delas co-localizada com sítios de DNAr. Em *C. nevadensis* ocorreram poucas bandas CMA<sup>+</sup> mas todas pareceram associadas a sítios de DNAr. Por outro lado, em *C. nevadensis* foram observadas bandas DAPI<sup>+</sup> pouco contrastadas aparentemente sem correspondência em *C. denticulata*. Isso sugere que em *C. nevadensis* houve uma expansão de sequências de DNA ricas em AT (bandas DAPI<sup>+</sup>) enquanto em *C. denticulata* houve expansão de sequências ricas em GC (bandas CMA<sup>+</sup>). A substituição de bandas DAPI<sup>+</sup> por CMA<sup>+</sup>, ou vice-versa, é relativamente rara mas tem sido reportada para alguns outros gêneros, como por exemplo em *Aristolochia* Juss. (Berjano *et al.*, 2009). Mudança na composição de bases da heterocromatina entre espécies próximas mais provavelmente se deve a substituição da sequência satélite principal por uma outra com uma taxa de AT/GC diferente, como prevista pela hipótese das bibliotecas de sequências satélites ("library hypothesis" - Fry and Salser, 1977). Segundo essa hipótese, espécies próximas compartilham diferentes sequências satélites espalhadas pelo genoma, podendo estas ser amplificadas ou parcialmente eliminadas em diferentes momentos da evolução de um grupo. A região pericentromérica é particularmente rica em sequências satélites de diferentes tamanhos e composição de AT/GC (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016), o que permitiria uma eventual substituição de uma sequência dominante rica em AT por uma sequência rica em GC, ou vice-versa. Em *Cuscuta*, a única espécie analisada com CMA/DAPI é *C. approximata*, que apresenta bandas DAPI<sup>+</sup> na região terminal de todos os seus cromossomos e na região

mediana de alguns deles (Guerra and García, 2004). Dados não publicados sobre diversas outras espécies de *Cuscuta* revelam que as bandas DAPI<sup>+</sup> são as mais comumente encontradas no gênero (Ibiapino, 2018), sugerindo que a presença de bandas CMA<sup>+</sup> não associadas ao DNAr 35S em *C. denticulata* seja uma condição derivada.

Uma consequência da expansão de sequências repetitivas em *C. nevadensis* é a formação de grandes cromocêntricos na intérfase. Esse tipo de núcleo, conhecido como arreticulado, é bem diferente daquele observado em *C. denticulata*, com cromatina menos heterogênea e cromocêntricos menores (núcleos semi-reticulados) (Delay, 1947). Essa diferença na estruturados dos núcleos interfásicos está relacionada principalmente à distribuição da histona H4 acetilada na leucina 5 (H4K5acet) ao longo do cromossomo e a uma maior densidade de sequências repetitivas nas regiões proximais (Feitoza *et al.*, 2017). Por outro lado, os núcleos interfásicos de *C. veatchii*, com alguns cromocêntricos grandes e cromatina difusa um pouco mais densa, representa uma condição intermediária entre os tipos nucleares dos dois ancestrais diploides.

Diferentemente desses padrões de cromatina, o número de sítios de DNAr 5S e 35S em *C. veatchii* não apresenta aditividade de caracteres, uma vez que foram encontrados seis sítios de DNAr 5S e apenas quatro de 35S, ao invés de oito sítios de DNAr 5S e 12 de 35S esperados num modelo aditivo. O número de sítios de DNAr dos parentais é perfeitamente conservado em aloploiploides induzidos, mas nos aloploiploides naturais esse número frequentemente se encontra alterado (geralmente reduzido), principalmente os sítios de DNAr 5S (Lee *et al.*, 2011; Volkov *et al.*, 2017). Em *Nicotiana*, foi observado que híbridos sintéticos e híbridos naturais com menos de 200.000 anos não alteraram o número de sítios de DNAr 5S e 35S, enquanto naqueles com cerca de 1,5 milhões de anos houve forte redução e tendência a retornar ao número de sítios dos diploides ancestrais (Kovarik *et al.*, 2008). Portanto, a forte redução do número de sítios de DNAr em *C. veatchii* pode ser um indicativo de que este híbrido não seja de origem muito recente. É interessante observar que em *C. veatchii* a conservação dos sítios ancestrais de DNAr 35S foi restrita ao único par originário de *C. denticulata* e ao maior sítio de DNAr 35S de *C. nevadensis*. Este último pareceu ser o único sítio ativo em *C. veatchii*, mas a possibilidade de que o sítio menor tenha uma atividade mais limitada ou tecido-específica não pode ser excluída (Tucker *et al.* 2010; Chandrasekhara *et al.*, 2016).

Uma análise das sequências ITS de *C. veatchii* e de *C. nevadensis* havia revelado que elas são muito similares (Stefanović and Costea, 2008), sugerindo que teria havido uma homogeneização em favor das sequências de *C. nevadensis*. De fato, coletas posteriores

extensivas não revelaram nenhuma sequência de ITS típica de *C. denticulata* em *C. veatchii*, sugerindo completa homogeneização de sequências na direção de *C. nevadensis* (Stefanovic *et al.*, dados não publicados). Curiosamente, o processo de homogeneização de sequências de ITS modificou a composição das sequências de DNAr 35S do sítio proveniente de *C. denticulata* sem aparentemente alterar seu tamanho e sua posição junto ao sítio mais fraco de DNAr 5S. Aparentemente, o processo de homogeneização de sequências repetitivas é mais eficiente nos sítios ativos, que apresentam a cromatina mais descondensada e mais exposta aos mecanismos de recombinação responsáveis pela homogeneização (Kobayashi, 2006). Como o sítio de DNAr 35S de *C. denticulata* e o sítio do maior par cromossômico de *C. nevadensis* eram sempre ativos e descondensados, é possível que isso tenha favorecido a homogeneização desses dois sítios, enquanto os sítios menos ativos teriam sido progressivamente eliminados (Kobayashi, 2006; Chandrasekhara *et al.*, 2016).

Os sítios de rDNA 35S são geralmente encontrados na região terminal dos cromossomos e só mais raramente na região proximal (Roa and Guerra, 2012). Uma explicação para a preferência pela posição terminal é que essa região permite a ocorrência de recombinação não homóloga sem afetar a sintenia dos demais genes dos cromossomos, facilitando assim a homogeneização interlocos (Hanson *et al.* 1996). Contudo, em *C. veatchii* a posição dos sítios foi proximal e a homogeneização aparentemente foi completa, sugerindo que o mecanismo de homogeneização de sequências em *tandem* independe da posição dessas sequências no cromossomo.

A indicação citológica mais evidente de que *C. veatchii* seja um aloploiploide derivado de um cruzamento entre *C. denticulata* e *C. nevadensis* foi dada pela GISH, que revelou que metade dos cromossomos dessa espécie tem maior afinidade pelo DNA genômico de *C. denticulata* e a outra metade tem maior afinidade pelo genoma de *C. nevadensis*. O fato de que não foi possível diferenciar os dois subgenomas sem a adição de DNA bloqueador, sugere ter havido uma dispersão significativa das sequências repetitivas de cada subgenoma reduzindo a diferença entre eles, um processo que parece diretamente relacionado ao tempo de formação do aloploiploide (Kovarik *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011).

Assim, tanto as diferenças nas bandas CMA/DAPI quanto na estrutura dos núcleos interfásicos, no tamanho dos cromossomos e no número de sítios de DNAr 5S e 35 sugerem que antes de haver ocorrido a formação do aloploiploide *C. veatchii* as duas espécies diploides já haviam divergido consideravelmente em sua estrutura cromossômica. Por outro lado, após a formação de *C. veatchii*, deve ter decorrido um tempo suficientemente longo para reduzir o

número de sítios de DNAr 5S e 35S, homogeneizar as sequências de ITS, e reduzir as diferenças na fração repetitiva dispersa de cada subgenoma.

## Referências

**Abbott R, Albach D, Ansell S, et al. 2013.** Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology* **26**: 229–246.

**Berjano R, Roa F, Talavera S, Guerra M. 2009.** Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. *Plant Systematics and Evolution* **280**: 219–227.

**Cabral JS, Felix LP, Guerra M. 2006.** Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology* **29**: 659–664.

**Chandrasekhara C, Mohannath G, Blevins T, Pontvianne F, Pikaard CS. 2016.** Chromosome-specific NOR inactivation explains selective rRNA gene silencing and dosage control in *Arabidopsis*. *Genes & Development*.

**Chester M, Leitch AR, Soltis PS, Soltis DE. 2010.** Review of the Application of Modern Cytogenetic Methods (FISH/GISH) to the Study of Reticulation (Polyploidy/Hybridisation). *Genes* **1**: 166–192.

**Costea M, Nesom GL, Tardif FJ. 2005.** Taxonomic status of *Cuscuta nevadensis* and *C. veatchii* (Convolvulaceae) in North America. *Brittonia* **57**: 264–272.

**De Souza Almeida CC, De Lemos Carvalho PC, Guerra M. 2007.** Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **155**: 541–547.

**Delay C. 1947.** Recherches sur la structure des noyaux quiescents chez les Phanérogames. *Rev. Cytol. et Cytophysiol. Veg.* **9**: 169–222.

- Doyle J, Doyle JL. 1987.** Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem Bull* **19**: 11–15.
- Feitoza L, Costa L, Guerra M. 2017.** Condensation patterns of prophase/prometaphase chromosome are correlated with H4K5 histone acetylation and genomic DNA contents in plants. *PLOS ONE* **12**: e0183341.
- Fogelberg SO. 1938.** The Cytology of *Cuscuta*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **65**: 631.
- Fry K, Salsler W. 1977.** Nucleotide sequences of HS- $\alpha$  satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell* **12**: 1069–1084.
- García MÁ, Castroviejo S. 2003.** Estudios citotaxonómicos en las especies Ibéricas del género *Cuscuta* (Convolvulaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **60**.
- Garcia MA, Costea M, Kuzmina M, Stefanovi S. 2014.** Phylogeny, character evolution, and biogeography of *Cuscuta* (dodders; Convolvulaceae) inferred from coding plastid and nuclear sequences. *American Journal of Botany* **101**: 670–690.
- Guerra M, García MA. 2004.** Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). *Genome* **47**: 134–140.
- Hanson RE, Islam-Faridi MN, Percival EA, et al. 1996.** Distribution of 5S and 18S–28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* **105**: 55–61.
- Kobayashi T. 2006.** Strategies to maintain the stability of the ribosomal RNA gene repeats. *Genes & genetic systems* **81**: 155–161.

- Kovarik A, Dadejova M, Lim YK, et al. 2008.** Evolution of rDNA in *Nicotiana* Allopolyploids: A Potential Link between rDNA Homogenization and Epigenetics. *Annals of Botany* **101**: 815–823.
- Lee Y-I, Chang F-C, Chung M-C. 2011.** Chromosome pairing affinities in interspecific hybrids reflect phylogenetic distances among lady's slipper orchids (*Paphiopedilum*). *Annals of Botany* **108**: 113–121.
- McNeal JR, Arumugunathan K, Kuehl JV, Boore JL, dePamphilis CW. 2007.** Systematics and plastid genome evolution of the cryptically photosynthetic parasitic plant genus *Cuscuta* (Convolvulaceae). *BMC Biology* **5**: 55.
- de Moraes AP, dos Santos Soares Filho W, Guerra M. 2007.** Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Research* **15**: 115–121.
- Pazy B, Plitmann U. 1995.** Chromosome divergence in the genus *Cuscuta* and its systematic implications. *Caryologia* **48**: 173–180.
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A. 2002.** Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Genetics* **161**: 1661–1672.
- Raven PH, Kyhos DW, Hill AJ. 1965.** Chromosome numbers of spermatophytes, mostly Californian. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany* **6**: 105–113.
- Roa F, Guerra M. 2012.** Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. *BMC evolutionary biology* **12**: 225.
- Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. 2016.** High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Scientific Reports* **6**.
- Sang T, Zhong Y. 2000.** Testing hybridization hypotheses based on incongruent gene trees. *Systematic Biology* **49**: 422–434.

**Soltis PS, Soltis DE. 2009.** The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 561–588.

**Souza LGR, Crosa O, Speranza P, Guerra M. 2012.** Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of Botany* **109**: 987–999.

**Stefanović S, Costea M. 2008.** Reticulate evolution in the parasitic genus *Cuscuta* (Convolvulaceae): over and over again. *Botany* **86**: 791–808.

**Stefanović S, Kuzmina M, Costea M. 2007.** Delimitation of major lineages within *Cuscuta* subgenus *Grammica* (Convolvulaceae) using plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* **94**: 568–589.

**Tucker S, Vitins A, Pikaard CS. 2010.** Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Current Opinion in Cell Biology* **22**: 351–356.

**Vaio M, Speranza P, Valls JF, Guerra M, Mazzella C. 2005.** Localization of the 5S and 45S rDNA Sites and cpDNA Sequence Analysis in Species of the Quadrifaria Group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany* **96**: 191–200.

**Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk NV, Hosiawa-Baranska M, Maluszynska J, Hemleben V. 2017.** Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biology* **17**.

**Wanzenböck E-M, Schofer C, Schweizer D, Bachmair A. 1997.** Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **11**: 1007–1016.

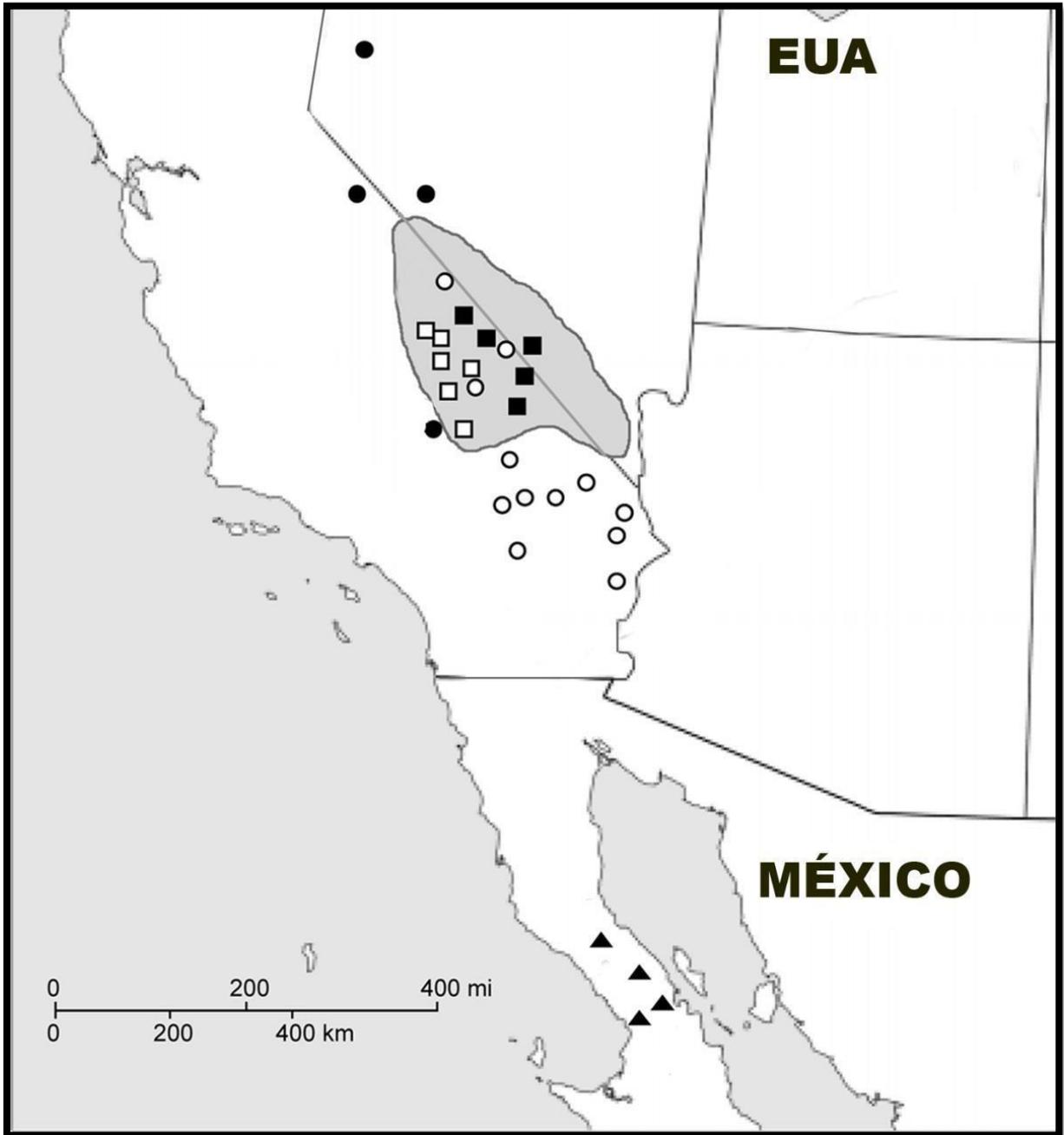
**Tabela 1** Espécies analisadas com respectivos número de herbário, procedência, número cromossômico (2n) e número de sítios de DNAr 5S, 35S e 5S-35S (sítios adjacentes)

Espécie e número de herbário	Procedência	2n	5S + 35S (total)	5S - 35S adjacentes
<i>C. denticulata</i> Engelm.				
Stefanović SS-13-46 TRTE	USA, California; Inyo Co., Death Valley NP, Hwy 267, 16 mi SE of Scotty's Castle; dat: 28 Jun 2013	30	2 + 2	2
Stefanović SS-16-24 TRTE	USA, Arizona; La Paz Co., Hwy 72, mile post 40, 2 mi N of aquaduct, 33°47'54"N 113°49'53"W; dat: 05 Abr 2016	30	2 + 2	2
Stefanović SS-14-81 TRTE	Procedência desconhecida	30	2 + 2	2
<i>C. nevadensis</i> I.M. Johnst.				
Stefanović SS-13-26 TRTE	USA, California; Inyo Co., Hwy 127, 45 mi N of Baker, 35° 50.5199' N 97° 14.8188' W; dat 23 Jun 2013	30	6 + 10	4
Stefanović SS-13-29 TRTE	USA, California; Inyo Co., Hwy 190, 6 mi W of Death Valley Jct, 36°20'25.0"N 116°35'49.5"W; 23 Jun 2013	30	6 + 10	4

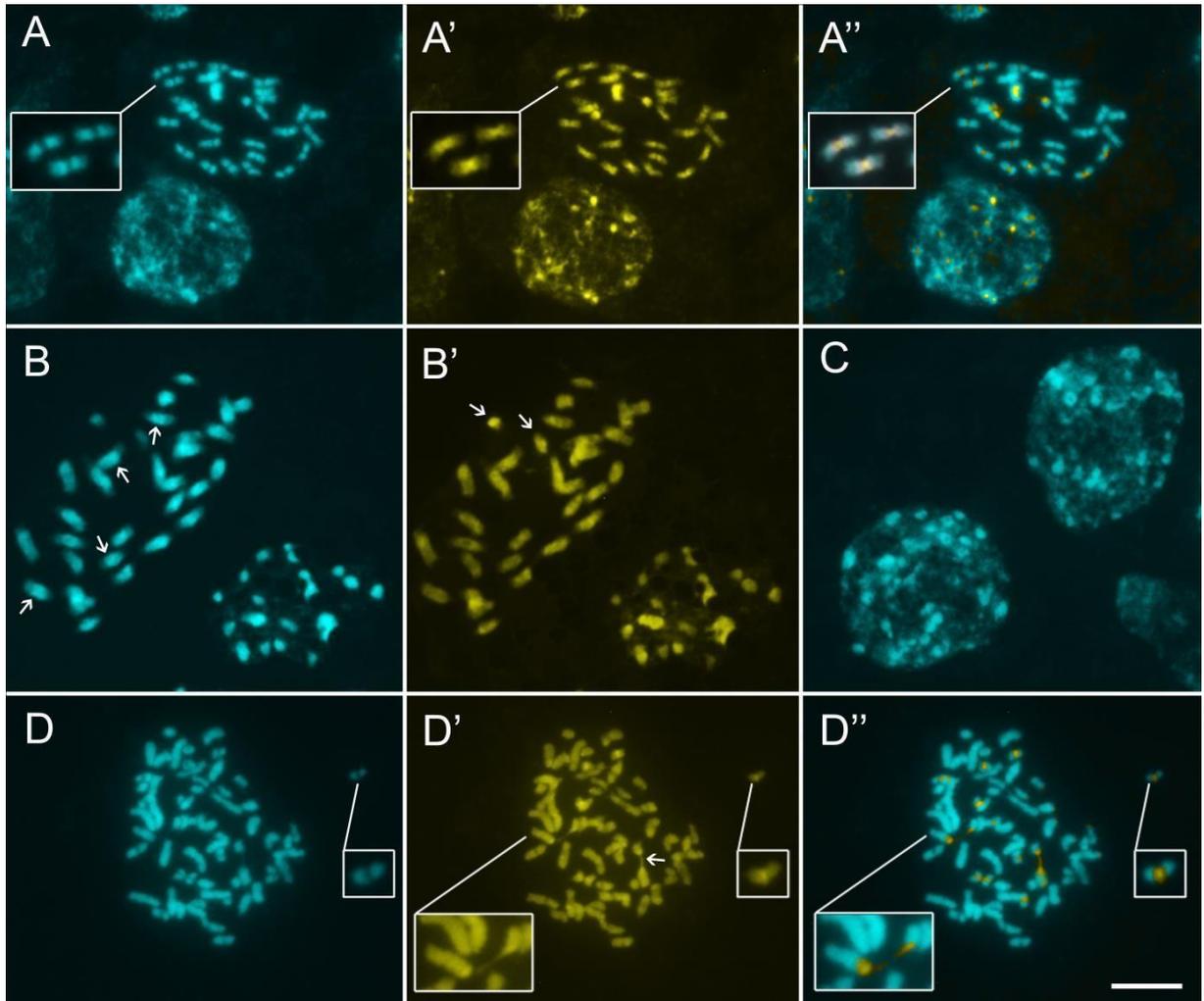
---

	USA, California; Inyo Co., Hwy	30	6 + 10	4
Stefanović SS-13-35 TRTE	190, 3.5 mi N of Olancha, 36°19'06.8"N 117°57'54"W; 24 Jun 2013			
	USA, California; Inyo Co.,	30	6 + 10	4
Stefanović SS-23-36 TRTE	Saline Valley Rd., 5 mi SE of intersection w/ Hwy 168, 37°09'06.9"N 118°09'43.5"W 25 Jun 2013			
 <i>C. veatchii</i> Brandegee				
	Próximo a Baja de los Angelos,	60	6 + 4	2
Bajia, Costea s.n. WLU	28° 58' 47.1"N, 113° 43' 13.0 W; 298 m, 30 Abr 2014			
	Cataviña Norte; 29° 45' 32.7 N,	60	6 + 4	2
Cataviña Norte, Costea s.n. WLU	114° 45' 17.5"W, 589 m, 30 Abr 2014			
	Norte de Punta Prieta, 28° 57'	60	6 + 4	2
Punta Prieta, Costea s.n. WLU	25.4" N, 114° 09' 40.2 W, 240 m, 30 Abr 2014			

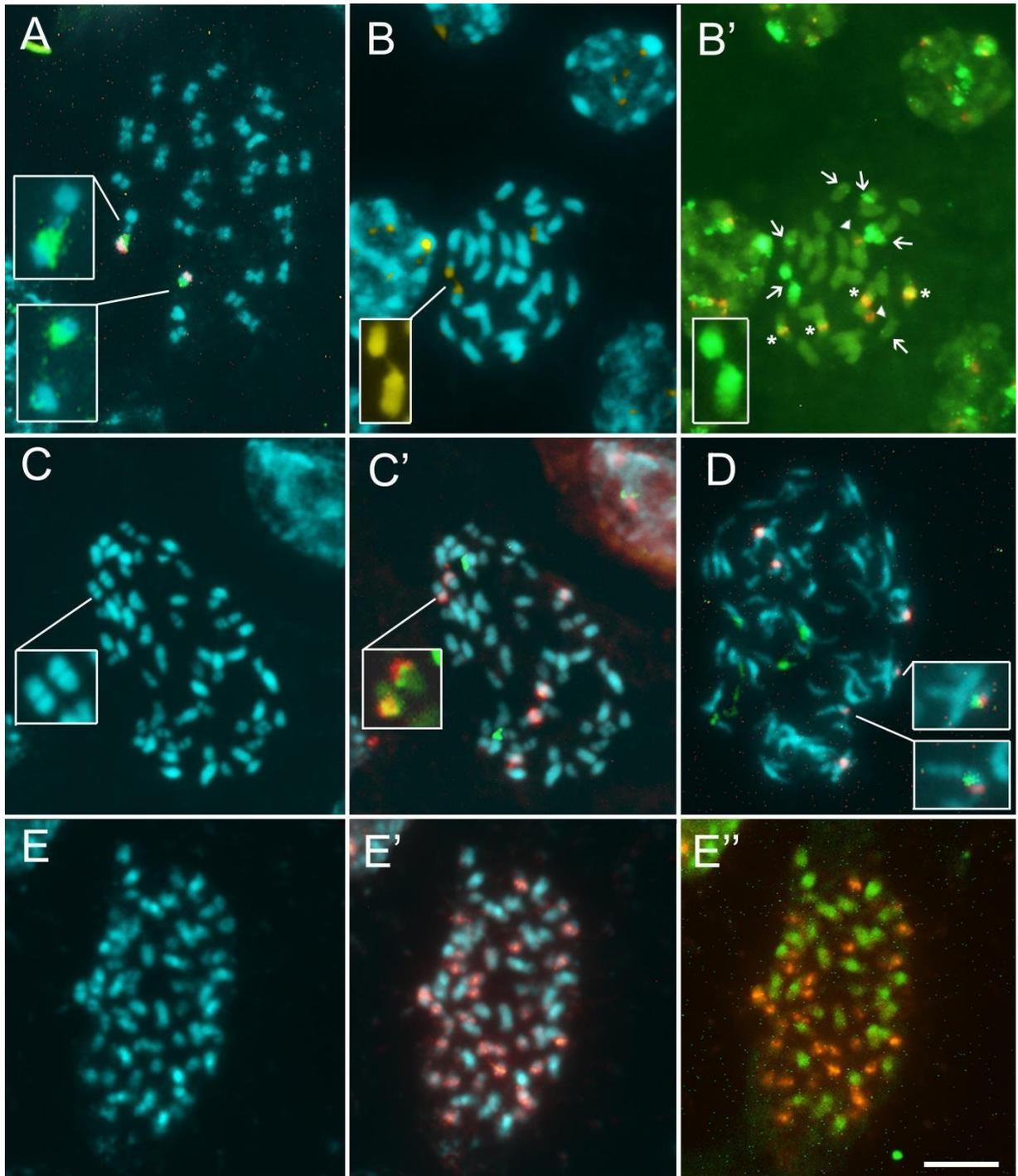
---



**Fig. 1.** Distribuição das espécies de *Cuscuta* seção *Denticulata*. A posição aproximada dos locais de coleta está indicado por círculos para *C. denticulata*, quadrados para *C. nevadensis*, e triângulos para *C. veatchii*. Sombreado indica área de distribuição potencial de *C. denticulata*.



**Fig. 2.** Metáfases e núcleos interfásicos de *C. denticulata* (A, A', A''), *C. nevadensis* (B, B' e C) e *C. veatchii* (D, D' e D'') corados com CMA (amarelo) e DAPI (azul). Setas em B indicando bandas DAPI<sup>+</sup> e em B' e D' indicando RONS. Barra em D' corresponde a 10  $\mu$ m.



**Fig. 3.** Metáfases mostrando localização dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 35S(verde) em *C. denticulata* (A), *C. nevadensis* (B e B'), *C. veachii* (C' e D). Resultado de GISH realizada em *C. veachii* com sondas de DNA genômico de *C. denticulata* (vermelho) e *C. nevadensis* (verde) (E' e E''). Barra em E'' corresponde a 10  $\mu$ m.

### 3.3 VARIABILIDADE CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DE *Cuscuta* L. (CONVOLVULACEAE)

**Amália Ibiapino 1, Miguel García 2, Mihai Costea 3, Leonardo Pessoa Felix 4, Sasa Stefanović 2, \*Marcelo Guerra 1**

*1 Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal - Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Recife, PE, Brasil*

*2 Departamento de Biologia - Universidade de Toronto-Mississauga, Mississauga, Ontário L5L 1C6, Canadá*

*3 Departamento de Biologia - Universidade Wilfrid Laurier, Waterloo, Ontário N2L 3C5, Canadá*

*4 Laboratório de Botânica - Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, Brasil*

\* Autor para correspondência: [msfguerra@hotmail.com](mailto:msfguerra@hotmail.com)

O gênero *Cuscuta* pertence à família Convolvulaceae, representado por ca. 200 espécies (Yuncker, 1932) separadas em quatro subgêneros: *Grammica*, *Pachystigma*, *Cuscuta* e *Monogyna* (Garcia et al., 2014). O subgênero *Grammica*, com cerca de 150 espécies, tem distribuição quase exclusiva nas Américas (Yuncker, 1932). As espécies do gênero *Cuscuta* habitam ambientes de clima tropical a temperado, sendo essa preferência possivelmente relacionada ao período de dormência das sementes (Costea & Tardif, 2006).

As espécies desse gênero são todas holoparasitas, com pouca ou nenhuma clorofila, folhas reduzidas a escamas e aparentemente sem função. Possuem hábito herbáceo, com haste filiforme, e se prendem aos seus hospedeiros através de haustórios (Yuncker, 1921, 1932). Apresentam flores pequenas e poucas características morfológicas diferenciais, tornando-se um desafio para a classificação ao nível de espécies (McNeal et al., 2007). É o único gênero da família que apresenta parasitismo e sua inserção dentro de Convolvulaceae se deveu principalmente à sua morfologia reprodutiva (Yuncker, 1921; Stefanović et al., 2007), tendo sido posteriormente confirmada pela análise de DNA mitocondrial (McNeal et al., 2007).

Citogeneticamente, o gênero *Cuscuta* se destaca pela grande variação cariotípica, com ampla diversidade de tamanho cromossômico e quantidade de DNA nuclear, além de apresentarem cromossomos monocêntricos ou holocinéticos (que apresentam centrômero difuso). Essa diversidade de caracteres torna *Cuscuta* um gênero particularmente interessante

para estudos sobre evolução cromossômica (García & Castroviejo, 2003; McNeal et al., 2007).

Os números cromossômicos conhecidos no gênero variam de  $2n = 8$  a  $2n = 60$ , com números básicos  $x = 8$  e  $x = 15$  (Pazy & Plitmann, 1995; García & Castroviejo, 2003). Algumas espécies são poliploides, mas a maioria é diploide com  $2n = 30$ . As espécies do subgênero *Cuscuta* apresentam cromossomos holocinéticos enquanto os cromossomos dos demais subgêneros são monocêntricos (García & Castroviejo, 2003). Dos estudos citogenéticos sobre o gênero, apenas *C. approximata* Bab. do subgênero *Cuscuta* foi estudada quanto à distribuição de sítios 5S e 45S e bandas CMA e DAPI (Guerra & García, 2004). Os demais trabalhos trataram apenas da morfologia e número cromossômico com coloração convencional.

Neste trabalho, foi feita a análise do número cromossômico e do padrão de distribuição de bandas heterocromáticas com os fluorocromos 4 -6- diamidino-2-fenilindol (DAPI) e cromomicina A3 (CMA) em 13 espécies do gênero, principalmente do subgênero *Grammica*. Dessas espécies, sete também foram analisadas quanto a distribuição de sítios de DNAr 5S e 35S por FISH (hibridização in situ fluorescente) e em 12 espécies foi feita a quantificação do DNA, visando obter mais informações sobre o cariótipo dessas espécies.

A preparação das lâminas foi feita utilizando meristemas apicais de sementes recém-geminadas ou de plantas cultivadas no jardim experimental do Departamento de Botânica da UFPE, utilizando como hospedeiros indivíduos de cóleus (*Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd, Lamiaceae). O material foi pré-tratado com 8-hidroxiquinoleína por 24 h a 10°C, fixado em etanol:ácido acético 3:1 (v/v) e estocado a -20°C no próprio fixador. Posteriormente, o material foi lavado em água destilada, digerido em uma solução de celulase/pectinase, esmagado em ácido acético 45%, e a lamínula foi retirada após resfriamento com nitrogênio líquido. A coloração CMA/DAPI e a FISH foram feitas conforme descrito anteriormente por Guerra & García (2004) para *C. approximata*, modificando-se apenas a concentração do CMA para 0,1 mg/μl.

Para a quantificação do DNA nuclear por citometria de fluxo, preparou-se uma suspensão de núcleos a partir de pontas de talos utilizando tampão WPB (Loureiro et al., 2006). Os núcleos interfásicos foram corados com iodeto de propídio e a quantidade de DNA nuclear foi estimada usando um citômetro de fluxo CyFlow SL (Partec, Görlitz, Alemanha). Como controle interno, foram utilizadas folhas jovens de espécies recomendadas por Dolezel (2005), selecionando-se sempre a espécie controle com valor 2C mais próximo ao da espécie em estudo. O valor final de 2C foi baseado em três medidas diferentes para cada amostra

utilizando a equação "média do pico da amostra/ média do pico do padrão  $\times$  2C conteúdo de DNA de controle interno (pg)" e o software FloMax (Partec) para processamento de dados.

A Tabela 1 apresenta um resumo dos principais resultados e as Figuras 1 a 3 ilustram os principais dados citológicos. No geral, foi confirmado que a maioria das espécies de *Cuscuta* apresenta cromossomos pequenos, com cariótipos simétricos e pouca heterocromatina. A poliploidia foi frequente, predominando tetraploides com  $2n = 60$  e cromossomos bem pequenos. Em *C. vandevenderi* Costea & Stefanovic (Fig. 3c), foi registrado o maior número de cromossomos no gênero ( $2n = 90$ ), sendo o único hexaploide conhecido. Nessa espécie, o cariótipo foi mais assimétrico, com cerca de 30 cromossomos maiores e mais corados com CMA, sugerindo que pode se tratar de um aloploiploide.

A maioria das bandas heterocromáticas foi do tipo CMA<sup>+</sup>, exceto em *C. compacta*, com grande blocos de heterocromatina DAPI<sup>+</sup> (Fig. 1a). Em *C. partita* foi observado que a região proximal de todos os cromossomos não corou nem com CMA nem com DAPI, mas o espaço entre braços cromossômicos foi muito extenso para se tratar apenas do centrômero (Fig. 2b). *Cuscuta epithymum* (L.) L., a única espécie do subgênero *Cuscuta* incluída nesta análise, apresentou os maiores cromossomos da amostra e pequenas bandas CMA em quase todos os terminais cromossômicos e em algumas regiões intersticiais. Além disso, esses cromossomos não apresentaram constrições primárias, como esperado para cromossomos holocinéticos.

O número de sítios de DNAr 5S variou de um par, em *C. howelliana* Rubtzoff, Peter (Fig. 2a'), *C. partita* Choisy (Fig. 2b') e *C. glomerata* Choisy (Fig. 2c'), dois pares em *C. epithymum* (L.) L. (Fig. 2d'), *C. campestris* Yunck. (Fig. 3a') e *C. racemosa* Mart. (Fig. 3b'), e três pares em *C. vandevenderi* (Fig. 3c'). O número de sítios de DNAr 35S encontrado foi um par, em *C. howelliana* (Fig. 2a'), *C. partita* (Fig. 2b'), *C. glomerata* (Fig. 2c') e *C. epithymum* (Fig. 2d'), e dois pares, em *C. campestris* (Fig. 3a), *C. racemosa* (Fig. 3b') e *C. vandevenderi* (Fig. c'). Os sítios de DNAr 35S colocalizaram sempre com as maiores bandas CMA<sup>+</sup> enquanto os sítios de DNAr 5S não tiveram bandas correspondentes na coloração CMA/DAPI, exceto em *C. glomerata* e *C. campestris*. A quantidade de DNA variou de  $2C = 1,35$  pg a  $2C = 10,56$  pg (Tabela 1).

\* Primeira contagem cromossômica para a espécie

## CONVOLVULACEAE

\**Cuscuta*

*americana* L.

$2n = 30$ , Bonito, Pernambuco, Brasil. Marcelo Guerra (CUS 1952) [Fig. 1e]

\**Cuscuta americana* L.

$2n = 30$ , Arcoverde, Pernambuco, Brasil. Leonardo Félix (LPF 16651)

\**Cuscuta americana* L.

Campina Grande, Paraíba, Brasil. Marcelo Guerra (CUS 1921)

*Cuscuta australis* R. Br.

$2n = 30$ , planta cultivada a partir de sementes comerciais adquiridas em Toronto, 2014 (produto comercializado como "Tu-si-zi") [Fig. 1c]

\**Cuscuta bonafortunae* Costea & I. García

$2n = 30$ , Zamora, Michoacán, México. García Ruiz & García (8375 CIMI, WLU) [Fig. 1d]

*Cuscuta campestris* Yunck.

$2n = 60$ , Campina Grande, Paraíba, Brasil. Leonardo Félix (LPF 15889) [Fig. 3a]

*Cuscuta compacta* Juss. ex Choisy

$2n = 30$ , Texas, EUA. Mihai Costea (UTM-1566, TRTE) [Fig. 1<sup>a</sup>]

\**Cuscuta cotijana* Costea & I. García

$2n = 60$ , Los Gallineros, Cotija, Michoacán, México. García-Ruiz (7560 CIMI, WLU) [Fig. 1f]

*Cuscuta epithymum* (L.) L.

$2n = 30$ , Garganta de Navamediana, Macizo Central Ávila, Espanha. M. Luceño (1250 M.S.M) [Fig. 2d]

*Cuscuta glomerata* Choisy

$2n = 30$ , Iowa, EUA. Richard Lutz s.n. (WLU) [Fig. 2c]

\**Cuscuta howelliana* Rubtsoff, Peter,

$2n = 30$ , Napa, Califórnia, EUA. Ruygit s.n., (WLU) [Fig. 2a]

\**Cuscuta partita* Choisy

$2n = 30$ , Areia, Paraíba, Brasil. Marcelo Guerra s/n [Fig. 2b]

\**Cuscuta racemosa* Mart.

$2n = 60$ , Santos, São Paulo, Brasil. Marcelo Guerra (CUS 1919) [Fig. 3b]

\**Cuscuta vandevenderi* Costea & Stefanović

$2n = 90$ , Esperança, Paraíba, Brasil. Marcelo Guerra (CUS 1944) [Fig. 3c]

*Cuscuta* sp.

$2n = 30$ , Buíque, Pernambuco, Brasil. Marcelo Guerra (CUS 1924) [Fig. 1b]

## Referências

**Costea, M., & Tardif, F. J.** 2006. The biology of Canadian weeds. 133. *Cuscuta campestris* Yuncker, *C. gronovii* Willd. ex Schult., *C. umbrosa* Beyr. ex Hook., *C. epithymum* (L.) L. and *C. epilinum* Weihe. *Can. J. Plant Sci.*, 86: 293–316.

**Dolezel, J.** 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.*, 95: 99–110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>

**García, M. Á., & Castroviejo, S.** 2003. Estudios citotaxonómicos en las especies Ibéricas del género *Cuscuta* (Convolvulaceae). *An. Jardín Botánico Madr.*, 60.

**Garcia, M. A., Costea, M., Kuzmina, M., & Stefanovi, S.** 2014. Phylogeny, character evolution, and biogeography of *Cuscuta* (dodders; Convolvulaceae) inferred from coding plastid and nuclear sequences. *Am. J. Bot.*, 101: 670–690. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300449>

**Guerra, M., & García, M. A.** 2004. Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). *Genome*, 47: 134–140. <https://doi.org/10.1139/g03-098>

**Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J., & Santos, C.** 2006. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Ann. Bot.*, 98: 679–689.

**McNeal, J. R., Arumugunathan, K., Kuehl, J. V., Boore, J. L., & dePamphilis, C. W.** 2007. Systematics and plastid genome evolution of the cryptically photosynthetic parasitic plant genus *Cuscuta* (Convolvulaceae). *BMC Biol.*, 5: 55. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-55>

**Pazy, B., & Plitmann, U.** 1995. Chromosome divergence in the genus *Cuscuta* and its systematic implications. *Caryologia*, 48: 173–180. <https://doi.org/10.1080/00087114.1995.10797327>

**Stefanović, S., Kuzmina, M., & Costea, M.** 2007. Delimitation of major lineages within *Cuscuta* subgenus *Grammica* (Convolvulaceae) using plastid and nuclear DNA sequences. *Am. J. Bot.*, 94: 568–589.

**Yuncker, T. G.** 1921. Revision of the North American and West Indian species of *Cuscuta*: With Thirteen Plates (Vol. 6). University of Illinois.

**Yuncker, T. G.** 1932. The Genus *Cuscuta*. *Mem. Torrey Bot. Club*, 18: 109–331.

Tabela 1: Tamanho do genoma (2C), desvio padrão (DP) e procedência das espécies de *Cuscuta* analisadas.

Espécie	2C (pg)/DP	Procedência
<i>Cuscuta americana</i> L.	1,37±0,00 5	Arcoverde, Pernambuco, Brasil. Marcelo Guerra (CUS 2003)
<i>Cuscuta americana</i> L.	1,47±0,03	Campina Grande, Paraíba, Brasil. Marcelo Guerra (CUS 1921)
<i>Cuscuta australis</i> R. Br.	1,43±0,05	Planta cultivada a partir de sementes comerciais (produto comercializado como "Tu-si-zi")
<i>Cuscuta cephalanthi</i> Engelm.	7,53±0,04	Iowa, EUA (UTM-1567, TRTE)
<i>Cuscuta compacta</i> Juss. ex Choisy,	6,63±0,07	Texas, EUA. Mihai Costea (UTM-1566, TRTE)
<i>Cuscuta glomerata</i> Choisy	10,56±0,0 5	Iowa, EUA. Richard Lutz s.n. (WLU)
<i>Cuscuta gronovii</i> Willd. ex Roem. & Schult.	13,81±0,1 5	Southampton, Virgínia, EUA. (Hwy 460)
<i>Cuscuta polygonorum</i> Engelm.	1,35±0,01	Desconhecida
<i>Cuscuta purpurata</i> Phil.	6,05±0,25	Chile (UTM-1433, TRTE)
<i>Cuscuta racemosa</i> Mart.	2,84±0,10	Santos, São Paulo, Brasil. Marcelo Guerra (CUS 1919)
<i>Cuscuta sandwichiana</i> Choisy	3,68±0,19	Hawaii, EUA. (UTM-155, TRTE)
<i>Cuscuta vandevenderi</i> Costea & Stefanović	3,66±0,16	Esperança, Paraíba, Brasil. Marcelo Guerra (CUS 1944)

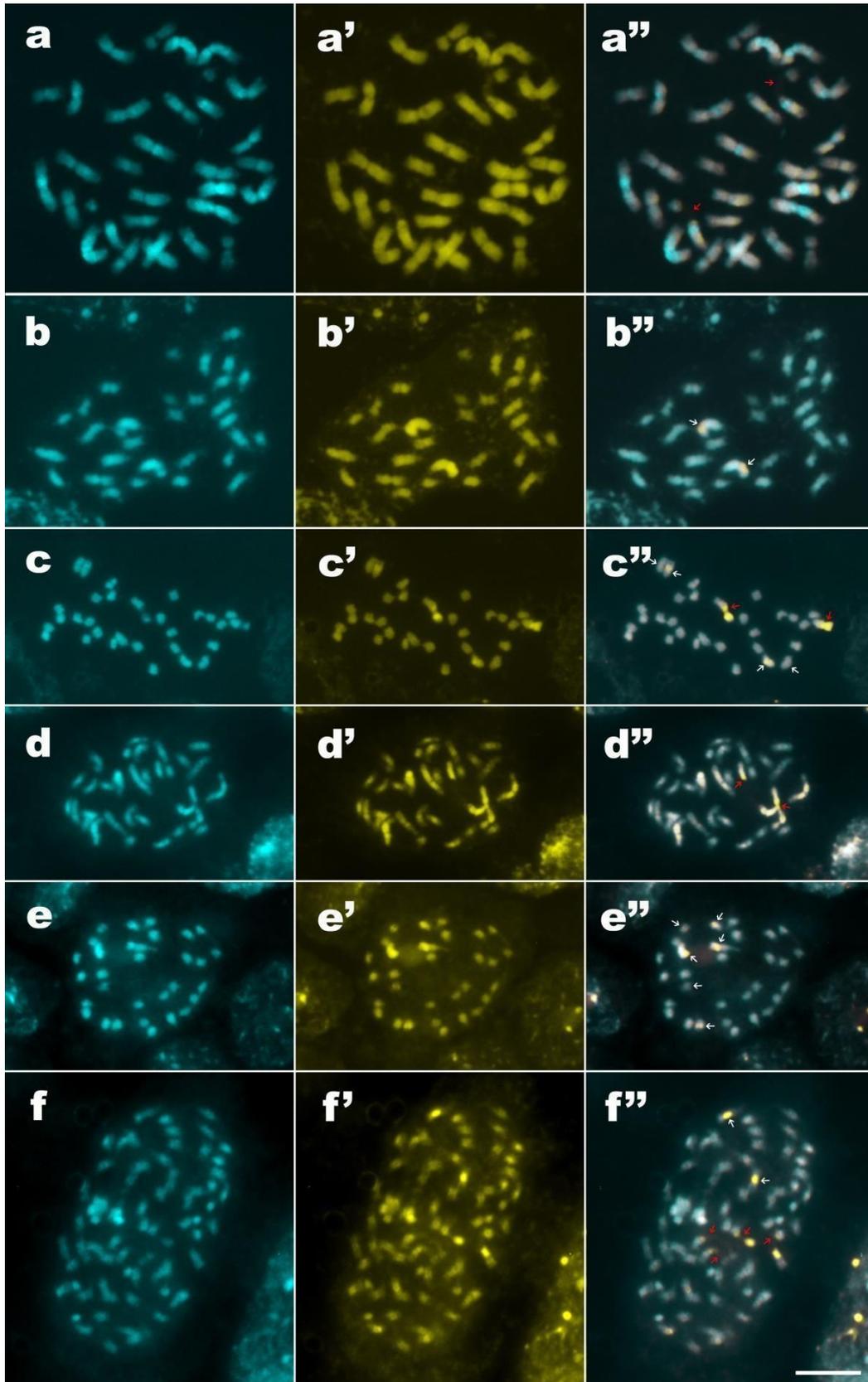


Fig. 1: Metáfases ou prometáfases de *Cuscuta compacta* (a), *Cuscuta* sp. (b), *C. australis* (c), *C. bonafortunae* (d), *C. americana* (e) e *C. cotijana* (f). As células foram coradas com DAPI (primeira coluna), CMA (segunda coluna) e as imagens foram sobrepostas (terceira coluna).

Setas vermelhas indicam constrições secundárias e setas brancas indicam bandas CMA<sup>+</sup> mais evidentes. Barra em f'' corresponde a 10  $\mu$ m.

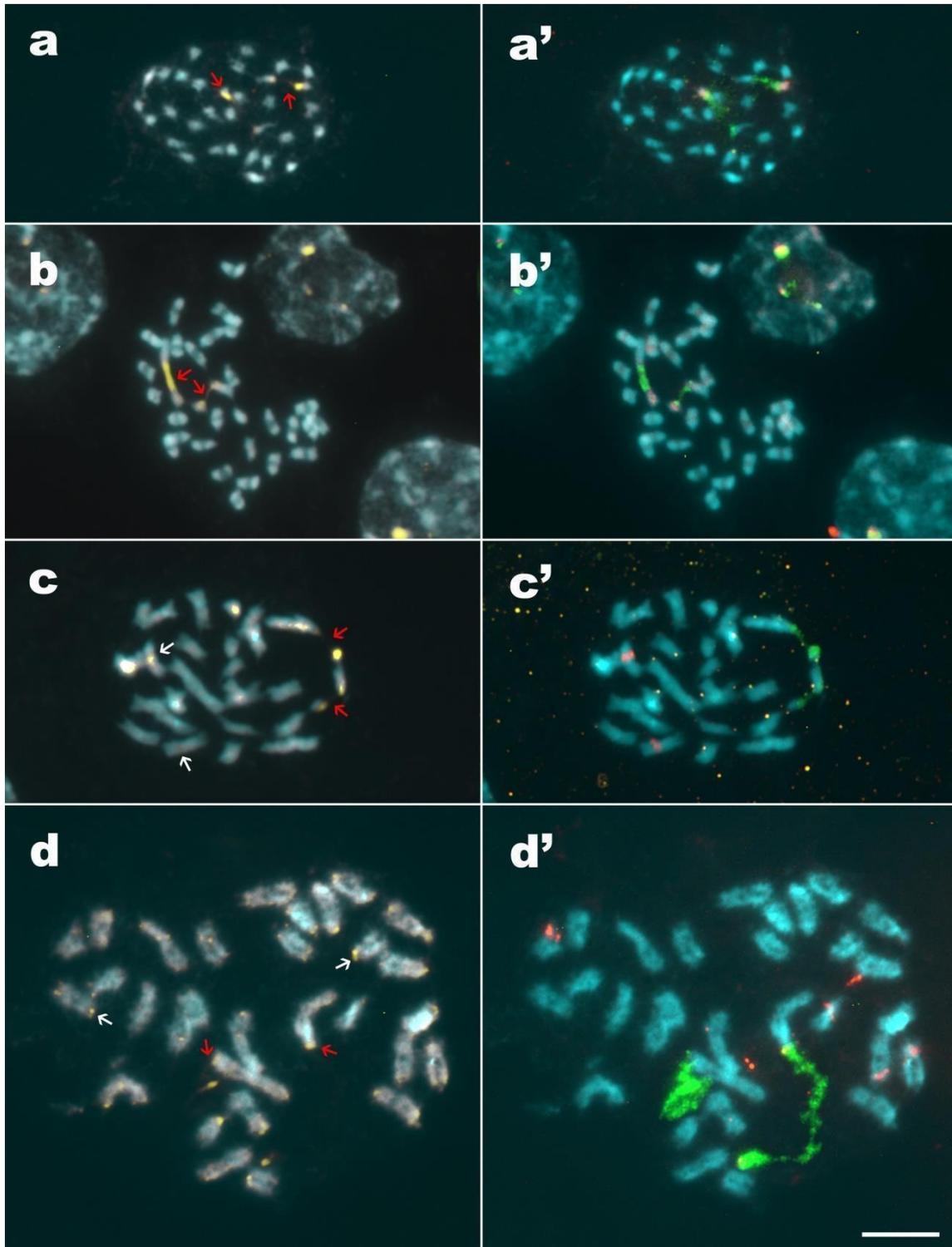


Fig. 2: Metáfases ou prometáfases de *C. howelliana* (a), *C. partita* (b), *C. glomerata* (c) e *C. epithymum* (d). As células foram coradas com CMA/DAPI (primeira coluna) e submetidas a hibridização *in situ* (segunda coluna) com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 35S (verde).

Setas vermelhas indicam constrições secundárias e setas brancas indicam bandas CMA<sup>+</sup> mais evidentes. Barra em **d'** corresponde a 10 $\mu$ m.

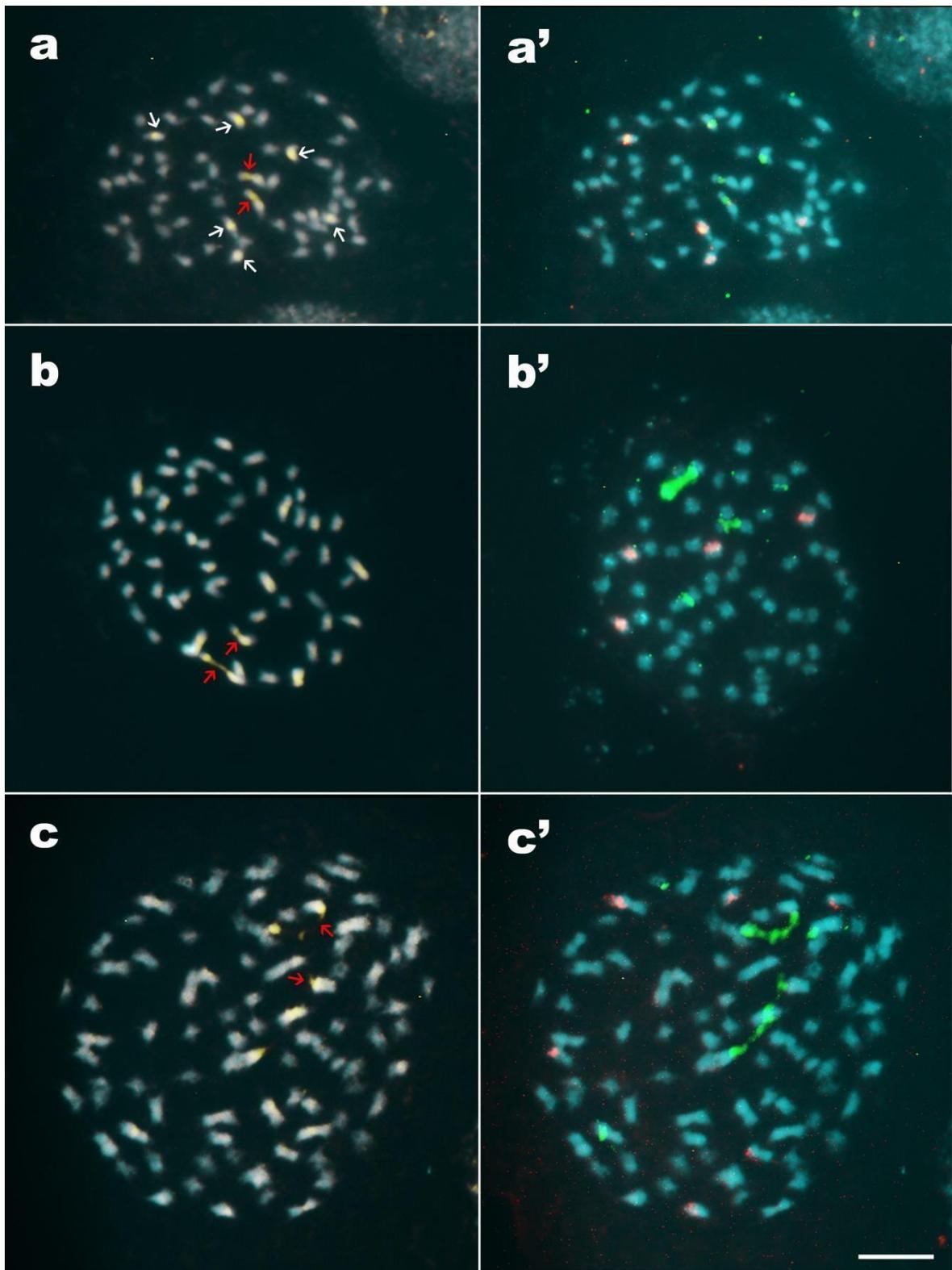


Fig. 3: Metáfases e prometáfases de *C. campestris* (**a**), *C. racemosa* (**b**) e *C. vandevenderi* (**c**). As células foram coradas com CMA/DAPI (primeira coluna) e submetidas à hibridização *in situ* (segunda coluna) com sonda de DNAr 5S (vermelho) e 35S (verde). Setas vermelhas

indicam constrições secundárias e setas brancas indicam bandas CMA<sup>+</sup> mais evidentes. Barra em **c'** corresponde a 10 $\mu$ m.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados encontrados no presente trabalho sugerem que:

- A variação de tamanho cromossômico dentro do gênero *Cuscuta* é mais extensa do que era conhecido.
- Todos os números cromossômicos encontrados neste trabalho foram múltiplos de 15, o que suporta a hipótese de que  $x = 15$  seja o número básico do gênero.
- Não foi registrado das nenhuma variação intraespecífica de número, o que indica que possivelmente as variações registradas na literatura sejam devido as dificuldades de preparação citológica dessas espécies.
- A heterocromatina presente no genoma das espécies de *Cuscuta* pode ter contribuído para o aumento dos braços cromossômicos e da quantidade de DNA.
- *Cuscuta* parece ter sofrido um aumento do tamanho do genoma antes da diversificação desse gênero com as demais espécies da família Convolvulaceae
- O subgênero *Grammica* apresentou um caso de aloploidia confirmado na seção *Denticulata*
- Poliploidia e eventos de hibridização podem ter contribuído para a variação cariotípica encontrado em *Cuscuta*
- Em *Grammica* há predomínio de cariótipos simétricos com cromossomos pequenos, exceto em *C. compacta* e *C. indecora*.

## REFERÊNCIAS

- BARROS E SILVA, A. E.; DOS SANTOS SOARES FILHO, W.; GUERRA, M. Linked 5S and 45S rDNA Sites Are Highly Conserved through the Subfamily Aurantioideae (Rutaceae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 140, n. 1, p. 62–69, 2013.
- BARTON, N. H. The role of hybridization in evolution. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 3, p. 551–568, 2001.
- BEAULIEU, J.; JEAN, M.; BELZILE, F. The allotetraploid *Arabidopsis thaliana*–*Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 281, n. 4, p. 421–435, abr. 2009.
- BENNETT, M. D. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms: Progress, Problems and Prospects. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 45–90, 1 jan. 2005.
- CABRAL, J. S.; FELIX, L. P.; GUERRA, M. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 659–664, 2006.
- CHEN, Z. J. Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, n. 1, p. 377–406, jun. 2007.
- COSTA, J. Y.; FORNI-MARTINS, E. R.; VANZELA, A. L. L. Karyotype characterization of five Brazilian species of *Echinodorus* (Alismataceae) with chromosomal banding and 45S rDNA FISH. **Plant Systematics and Evolution**, v. 257, n. 1–2, p. 119–127, fev. 2006.
- COSTEA, M.; TARDIF, F. J. The biology of Canadian weeds. 133. *Cuscuta campestris* Yuncker, *C. gronovii* Willd. ex Schult., *C. umbrosa* Beyr. ex Hook., *C. epithymum* (L.) L. and *C. epilinum* Weihe. **Canadian journal of plant science**, v. 86, n. 1, p. 293–316, 2006.
- DATSON, P. M.; MURRAY, B. G. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? **Chromosome Research**, v. 14, n. 8, p. 845–857, dez. 2006.
- D'EMERICO, S.; PIGNONE, D.; SCRUGLI, A. Giemsa C-banded karyotypes in *Serapias* L. (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 133, n. 4, p. 485–492, 2000.
- DODSWORTH, S.; LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J. Genome size diversity in angiosperms and its influence on gene space. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 35, p. 73–78, dez. 2015.
- DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, n. 4, p. 143–154, 1 set. 1991.
- DOLEŽEL, J. Plant DNA Flow Cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 99–110, 1 jan. 2005.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2233–2244, set. 2007.

DOUET, J.; TOURMENTE, S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. **Heredity**, v. 99, n. 1, p. 5, 2007.

FOGELBERG, S. O. The Cytology of *Cuscuta*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 65, n. 9, p. 631, dez. 1938.

GARCIA, M. A. et al. Phylogeny, character evolution, and biogeography of *Cuscuta* (dodders; Convolvulaceae) inferred from coding plastid and nuclear sequences. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 4, p. 670–690, 1 abr. 2014a.

GARCÍA, M. Á.; CASTROVIEJO, S. Estudios citotaxonómicos en las especies Ibéricas del género *Cuscuta* (Convolvulaceae). **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 60, n. 1, 2003.

GARCIA, S. et al. Recent updates and developments to plant genome size databases. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D1159–D1166, jan. 2014b.

GARCIA, S. et al. Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database. **The Plant Journal**, v. 89, n. 5, p. 1020–1030, mar. 2017.

GARCIA, S.; KOVAŘÍK, A. Dancing together and separate again: gymnosperms exhibit frequent changes of fundamental 5S and 35S rRNA gene (rDNA) organisation. **Heredity**, v. 111, n. 1, p. 23, 2013.

GREILHUBER, J. et al. Smallest Angiosperm Genomes Found in Lentibulariaceae, with Chromosomes of Bacterial Size. **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 770–777, nov. 2006.

GREWAL, S. I. S.; JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 1, p. 35–46, jan. 2007.

GUERRA, M. Chromosome number variation and evolution in monocots. **Monocots: systematics and evolution**. CSIRO, Melbourne, p. 127–136, 2000.

GUERRA, M. DOS S. **Introdução à citogenética geral**. [s.l.] Guanabara Koogan, 1988.

GUERRA, M.; GARCÍA, M. A. Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). **Genome**, v. 47, n. 1, p. 134–140, jan. 2004.

GUERRA, M. (ORG ). **FISH: conceitos e aplicações na citogenética**. [s.l.] Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

GUO, W. W.; DENG, X. X. Wide somatic hybrids of *Citrus* with its related genera and their potential in genetic improvement. **Euphytica**, v. 118, n. 2, p. 175–183, 2001.

HAMPERL, S. et al. Chromatin states at ribosomal DNA loci. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 3–4, p. 405–417, mar. 2013.

HESLOP-HARRISON, J. S. P.; SCHWARZACHER, T. Organisation of the plant genome in chromosomes: Organisation of the plant genome in chromosomes. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 18–33, abr. 2011.

JELLEN, E. N.; LADIZINSKY, G. Giemsa C-banding in *Avena insularis* Ladizinsky. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, n. 3, p. 227–230, 2000.

JOHNSTON, J. S. et al. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 5, p. 609–613, 1999.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática Vegetal:- Um Enfoque Filogenético**. [s.l.] Artmed Editora, 2009.

KITAJIMA, A. et al. Chromosome identification and karyotyping of Satsuma mandarin by genomic in situ hybridization. **Journal of the American society for Horticultural Science**, v. 132, n. 6, p. 836–841, 2007.

KOVARIK, A. et al. Evolution of rDNA in *Nicotiana* Allopolyploids: A Potential Link between rDNA Homogenization and Epigenetics. **Annals of Botany**, v. 101, n. 6, p. 815–823, 13 mar. 2008.

KSIAŹCZYK, T. et al. Immediate unidirectional epigenetic reprogramming of NORs occurs independently of rDNA rearrangements in synthetic and natural forms of a polyploid species *Brassica napus*. **Chromosoma**, v. 120, n. 6, p. 557–571, dez. 2011.

LAWRENCE, R. J. et al. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. **Molecular cell**, v. 13, n. 4, p. 599–609, 2004.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome downsizing in polyploid plants. **Biological journal of the Linnean Society**, v. 82, n. 4, p. 651–663, 2004.

LIU, L.-Q.; GU, Z.-J. Genomic in situ hybridization identifies genome donors of *Camellia reticulata* (Theaceae). **Plant Science**, v. 180, n. 3, p. 554–559, mar. 2011.

MADLUNG, A. et al. Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids: Genomic changes in *Arabidopsis* polyploids. **The Plant Journal**, v. 41, n. 2, p. 221–230, 14 dez. 2004.

MARQUES, A. et al. Holocentromeres in *Rhynchospora* are associated with genome-wide centromere-specific repeat arrays interspersed among euchromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 44, p. 13633–13638, 2015.

MCNEAL, J. R. et al. Systematics and plastid genome evolution of the cryptically photosynthetic parasitic plant genus *Cuscuta* (Convolvulaceae). **BMC Biology**, v. 5, n. 1, p. 55, 2007.

MOSCONE, E. A. et al. Analysis of Active Nucleolus Organizing Regions in *Capsicum* (Solanaceae) by Silver Staining. **American Journal of Botany**, v. 82, n. 2, p. 276, fev. 1995.

- PAZY, B.; PLITMANN, U. Persisting demibivalents: a unique meiotic behaviour in *Cuscuta babylonica* Choisy. **Genome**, v. 29, n. 1, p. 63–66, 1987.
- PAZY, B.; PLITMANN, U. Chromosome divergence in the genus *Cuscuta* and its systematic implications. **Caryologia**, v. 48, n. 2, p. 173–180, jan. 1995.
- PEDROSA, A. et al. Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus*. **Genetics**, v. 161, n. 4, p. 1661–1672, 1 ago. 2002.
- PELLICER, J.; FAY, M. F.; LEITCH, I. J. The largest eukaryotic genome of them all? **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 164, n. 1, p. 10–15, 2010.
- PREUSS, S.; PIKAARD, C. S. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: Insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1769, n. 5–6, p. 383–392, maio 2007.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Neopolyploidy in Flowering Plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 33, n. 1, p. 589–639, nov. 2002.
- RAMZAN, F.; YOUNIS, A.; LIM, K.-B. Application of Genomic *in situ* Hybridization in Horticultural Science. **International Journal of Genomics**, v. 2017, p. 1–12, 2017.
- ROA, F.; GUERRA, M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. **BMC evolutionary biology**, v. 12, n. 1, p. 225, 2012.
- ROA, F.; GUERRA, M. Non-Random Distribution of 5S rDNA Sites and Its Association with 45S rDNA in Plant Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 3, p. 243–249, 2015.
- SASTRI, D. C. et al. An overview of evolution in plant 5S DNA. **Plant Systematics and Evolution**, v. 183, n. 3–4, p. 169–181, 1992.
- SHAW, P.; BROWN, J. Nucleoli: Composition, Function, and Dynamics. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 158, n. 1, p. 44–51, 1 jan. 2012.
- SHE, C.; LIU, J.; SONG, Y. CPD staining: an effective technique for detection of NORs and other GC-rich chromosomal regions in plants. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 81, n. 1, p. 13–21, jan. 2006.
- SHEIKH, S. A.; KONDO, K.; HOSHI, Y. Study on diffused centromeric nature of *Drosera* chromosomes. **Cytologia**, v. 60, n. 1, p. 43–47, 1995.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. The dynamic nature of polyploid genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 18, p. 8089–8091, 1995.
- SOUSA, A. et al. Distribution of 5S and 45S rDNA sites in plants with holokinetic chromosomes and the “chromosome field” hypothesis. **Micron**, v. 42, n. 6, p. 625–631, ago. 2011.

- STEFANOVIĆ, S.; COSTEA, M. Reticulate evolution in the parasitic genus *Cuscuta* (Convolvulaceae): over and over again this paper is one of a selection of papers published in the Special Issue on Systematics Research. **Botany**, v. 86, n. 8, p. 791–808, ago. 2008.
- STEFANOVIĆ, S.; KRUEGER, L.; OLMSTEAD, R. G. Monophyly of the Convolvulaceae and circumscription of their major lineages based on DNA sequences of multiple chloroplast loci. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 9, p. 1510–1522, 2002.
- SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.
- TUCKER, S.; VITINS, A.; PIKAARD, C. S. Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 3, p. 351–356, jun. 2010.
- VAIO, M. et al. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria Group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). **Annals of Botany**, v. 96, n. 2, p. 191–200, 1 ago. 2005.
- VAN-LUME, B. et al. Heterochromatic and cytomolecular diversification in the *Caesalpinia* group (Leguminosae): Relationships between phylogenetic and cytogeographical data. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 29, p. 51–63, dez. 2017.
- VAUGHN, K. C. Attachment of the parasitic weed dodder to the host. **Protoplasma**, v. 219, n. 3–4, p. 227–237, 2002.
- YAMASHITA, K. et al. Chromosome and cytoplasm analyses of somatic hybrids between onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*A. sativum* L.). **Euphytica**, v. 125, n. 2, p. 163, 2002.
- YOUNIS, A. et al. FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 9, p. 1477–1488, set. 2015.
- YUNCKER, T. G. The Genus *Cuscuta*. **Memoirs of the Torrey Botanical Club**, v. 18, n. 2, p. 109–331, 1932.