

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
– IMUNOLOGIA & DIP/GENÉTICA & BIOTECNOLOGIA

ANA LUIZA FRANCO

**“CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA COMPARADA NO
GÊNERO *Stylosanthes* (FABACEAE)”**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juiz de Fora

2017

ANA LUIZA FRANCO

**“CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA COMPARADA NO
GÊNERO *Stylosanthes* (FABACEAE)”**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Lyderson Facio Viccini
Co-orientador: Saulo Marçal de Sousa

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Franco, Ana Luiza.

Caracterização cromossômica comparada no gênero *Stylosanthes* (Fabaceae) / Ana Luiza Franco. -- 2017.
90 f. : il.

Orientador: Lyderson Facio Viccini

Coorientador: Saulo Marçal de Sousa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. Citogenética. 2. Fabaceae. 3. Plantas forrageiras. 4. *Stylosanthes*. I. Viccini, Lyderson Facio, orient. II. Sousa, Saulo Marçal de, coorient. III. Título.

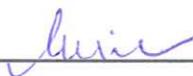
ANA LUIZA FRANCO

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA COMPARADA NO GÊNERO
Stylosanthes (FABACEAE)**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 16 / 02 / 2017 :

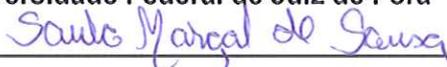
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Orientador

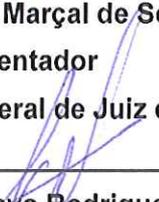
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Saulo Marçal de Sousa

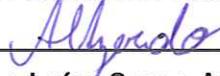
Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza

Universidade Federal de Pernambuco



Prof.^a Dr.^a Ana Luísa Sousa Azevedo

Embrapa

Aos meus amados pais Marise e Washington.

À minha querida irmã Amanda.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Minha imensa gratidão,

A Deus, por ser minha fortaleza e iluminar meu caminho durante toda a vida. À Nossa Senhora Aparecida, pelas bênçãos e proteção.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biotecnologia, pela oportunidade de realizar o curso para a obtenção do título de mestre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro nos projetos e congressos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação pelos exemplos e conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Doutor Lyderson Facio Viccini, pela orientação e confiança a mim depositada. Por seu profissionalismo e cordialidade, contribuindo com grandes conhecimentos e valores essenciais durante toda minha formação acadêmica.

Ao Professor Doutor Saulo Marçal de Sousa, pela coorientação e pelos importantes ensinamentos a mim transmitidos. Por ser um exemplo de profissional competente, além de me auxiliar sempre de maneira inspiradora.

Ao Doutor Marcelo Ayres pela parceria e por gentilmente conceder as sementes de *Stylosanthes* para a realização deste trabalho, mostrando-se sempre disposto à colaborações.

Ao Professor Doutor Luiz Gustavo Rodrigues de Souza pela parceria e cooperação no desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor José Marcello Salabert Campos, sempre gentil e disposto a auxiliar no que fosse necessário.

Aos Professores Doutores Marcelo de Oliveira Santos e Carlos Maranduba, pelas boas conversas relacionadas à pesquisa científica.

Aos Doutores Elyabe Monteiro de Matos, Cristiane Zorzatto e Humberto Henrique, pela amizade e conselhos, além do suporte nas análises de citometria de fluxo.

Aos colaboradores Professores Doutores Paulo Henrique Peixoto e Wagner Otoni por sempre cederem gentilmente fitohormônios e outros materiais necessários quando solicitados.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia da UFJF, pelo agradável convívio diário.

Em especial, agradeço às amigas Aryane Reis, Shaiany Lopes, Camila Neves, Sirlei Julião e Juliana Mainenti, que além de serem excelentes pesquisadoras e de me auxiliarem sempre que necessário, tornaram-se pessoas especiais, com as quais pretendo continuar uma longa amizade, sempre regada a café e risadas.

Às amigas Victória Campos e Flávia Rangel, por todo amor e companheirismo que construímos. Pelo apoio incondicional nos momentos de ansiedade, angústias, conquistas e comemorações.

Ao Silvioney, sempre disposto a ajudar na confecção de reagentes e às colegas Danielle Amaral e Rafaela Zanette, pela ótima convivência e boas conversas.

A todos os alunos de Iniciação Científica pela colaboração na execução dos experimentos e troca de saberes. Particularmente a Matheus Aguiar, Laís Stheling, Sebastião Tavares, Amanda Lima, Elisa Cabral, Paula Mazza, Renan Augusto e Geovana.

À querida amiga Margareth, por toda força e momentos de reflexão.

Aos meus tios, tias e primos, pelos momentos compartilhados de união, felicidade e amor. Sou muito sortuda por fazer parte de uma família tão grande e unida. Este é certamente o meu maior tesouro!

À minha querida irmã Amanda, pelo imenso carinho, amizade e cumplicidade, que foram essenciais nesta caminhada.

À minha mãe Marise, por ser meu exemplo de força, coragem e sabedoria e ao meu pai Washington pelo suporte e motivação. Agradeço por serem os principais responsáveis pela minha formação e pelo amor incondicional a mim oferecido durante toda minha vida.

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

*“Muitas vezes o fator determinante da vitória
não são as escolhas, mas sim as renúncias.”*

Clarice Lispector

RESUMO

O gênero *Stylosanthes* (Fabaceae) possui aproximadamente 50 espécies e algumas apresentam grande importância econômica. Algumas espécies são amplamente utilizadas como forrageiras, em recuperação de áreas degradadas e adubação verde graças a sua alta adaptabilidade aos solos de baixa fertilidade e capacidade de fixar nitrogênio. O gênero está distribuído em áreas tropicais e subtropicais e o Brasil é considerado o maior centro de diversidade, com grande variação intra e interespecífica. Estudos de melhoramento genético relacionados ao gênero têm aumentado, porém a taxonomia permanece controversa. A ocorrência de poliploidia, híbridos e sinônimas reforçam a importância de adicionar novas informações sobre o gênero. Dados citogenéticos sobre o gênero são escassos mesmo constituindo uma importante ferramenta para contribuir com informações relevantes sobre o genoma. Neste trabalho, descreveu-se pela primeira vez, aspectos cariotípicos e quantidade de DNA em espécies diploides (*S. grandifolia*, *S. gracilis*, *S. hippocampoides*, *S. acuminata* e quatro variedades de *S. guianensis*) por meio de técnicas de citogenética molecular (bandeamento CMA/DAPI e hibridização fluorescente *in situ*- FISH) e citometria de fluxo. A germinação de sementes foi induzida em câmara de germinação variando-se a temperatura (18° a 40°C) e adicionando-se hormônio de crescimento (CEPA 0,1mM). Meristemas radiculares foram utilizados para a preparação das lâminas e os cromossomos foram corados com fluorocromos CMA/DAPI para análise de padrões de bandas. Os sítios de DNA ribossômicos 5S e 45S foram mapeados por hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Para estimar a quantidade de DNA, *Pisum sativum* foi utilizado como padrão de referência nas análises de citometria de fluxo. A morfometria cromossômica realizada evidenciou, de uma maneira geral, a presença de um cariótipo simétrico, com poucas variações entre as espécies. A localização de regiões ricas em CG foi similar (duas bandas em posição terminal) em *S. gracilis*, *S. hippocampoides* e em três das variedades de *S. guianensis* (1480, 1463 e 4171). Entretanto, uma variedade de *S. guianensis* (C.V mineirão) além de *S. grandifolia* e *S. acuminata* exibiram quatro marcas CMA positivas. Com relação ao DNAr 5S e 45S, dois sítios foram observados na maioria das espécies, com exceção de *S. acuminata*, que apresentou quatro marcas 45S. Algumas variações também foram observadas entre as variedades de *S. guianensis*. A variedade 4171 apresentou metáfases com três ou quatro sítios de DNAr 45S. O valor médio do conteúdo de DNA estimado foi de aproximadamente 2,50 pg em todas as espécies. Tomados em conjunto, os dados constituem uma importante contribuição para o estudo da história evolutiva do grupo, revelando a estabilidade do genoma quando avaliado do ponto de vista cromossômico e de quantidade de DNA. O estudo contribui ainda para programas de melhoramento genético de espécies com importância econômica.

Palavras-chave: Citogenética. Fabaceae. Plantas forrageiras. *Stylosanthes*.

ABSTRACT

Stylosanthes (Leguminosae) comprises about 50 species being some of them with great economic importance. Some species are widely used as forages and, to recover degraded areas and as a green fertilizer due to its adaptability to low fertility soils and nitrogen fixing capacity. The genus is distributed in tropical and subtropical areas. Brazil is considered the larger diversity center, with great inter and intraspecific variation. Breeding studies have been increased although the taxonomic situation of the group remains controversial. The occurrence of polyploidy, hybrids and many additional synonyms reinforce the importance to add new information about the genus. Cytogenetics data about the genus are scarce, even considering as an important tool to give relevant information about the genome. Here we describe, for the first time, karyotypic aspects and the DNA content of diploid species (*S. grandifolia*, *S. gracilis*, *S. hippocampoides*, *S. acuminata* and four varieties of *S. guianensis*) by using molecular cytogenetic techniques (CMA/DAPI banding and *in situ* hybridization) and flow cytometry. Seeds germination was induced by temperature variation (18° to 40°C) and growth hormones (CEPA 0.1mM) in a germination chamber. Meristematic roots were used to slides preparation. Chromosomes were stained with CMA/DAPI for banding patterns analysis and ribosomal 5S, 45S rDNA sites were mapped by *in situ* hybridization. To estimate the DNA content, *Pisum sativum* were used as a reference standard in flow cytometry analysis. The chromosomal morphometry showed a symmetrical karyotype with few variations between species. The localization of the CG rich regions was similar (two bands at terminal position) in *S. gracilis*, *S. hippocampoides*, and in three of the *S. guianensis* varieties (1480, 1463 and 4171). However, one variety of *S. guianensis* (C.V mineirão), *S. grandifolia* and *S. acuminata* exhibited four CMA+ marks. Regarding 5S and 45S rDNA, two sites were observed in most species, excepting for *S. acuminata*, with four 45S marks. Some variations were also observed among *S. guianensis* accessions. In 4171, metaphases with three or four 45S rDNA sites were observed. DNA content estimation was about 2.50pg in all species. Nevertheless, for *S. grandifolia*, cells with two DNA C-values were observed suggesting a variation in the DNA content. Taking together, the data constitutes an important contribution in the study of evolutionary history of the group, revealing the genome stability when chromosome and DNA content information were considered. The study also contribute for breeding programs of species with economic importance.

Keywords: Fabaceae. Forage plants. Plant cytogenetics. *Stylosanthes*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagens ilustrativas de espécies do gênero <i>Stylosanthes</i> . As letras a e b ilustram a espécie <i>S. guianensis</i> ; as letras c e d ilustram a espécie <i>S. gracilis</i> . Fonte: Environmental and Conservation Programs Neotropical Live Plant Photos Site	39
Figura 2	a) Sementes de <i>Stylosanthes</i> em placa de Petri b) Mudras de <i>Stylosanthes</i> c) Mudras de <i>Stylosanthes</i> em processo de aclimação.....	41
Figura 3	Gel de agarose 1% com marcador de 100 a 1000pb e sondas marcadas de DNAr 5S e 45S, com tamanho ideal de 200 a 500pb.....	43
Figura 4	Bandeamento DAPI/CMA em espécies de <i>Stylosanthes</i> . a) metáfase de <i>S. hippocampoides</i> corada com DAPI b) metáfase com duas marcas CMA ⁺ c) metáfase de <i>S. acuminata</i> corada com DAPI d) metáfase com duas marcas CMA ⁺ e) metáfase de <i>S. gracilis</i> corada com DAPI f) metáfase com duas marcas CMA ⁺ g) metáfase de <i>S. grandifolia</i> corada com DAPI h) metáfase com quatro marcas CMA ⁺ . Barra 10 µm.....	53
Figura 5	Bandeamento DAPI/CMA em espécies de <i>Stylosanthes</i> . a) metáfase de <i>S. guianensis</i> acesso 1480 corada com DAPI b) metáfase com duas marcas CMA ⁺ c) metáfase de <i>S. guianensis</i> acesso 1463 corada com DAPI d) metáfase com duas marcas CMA ⁺ e) metáfase de <i>S. guianensis</i> 4171 corada com DAPI f) metáfase com duas marcas CMA ⁺ g) metáfase de <i>S. guianensis</i> C.V mineirão corada com DAPI h) metáfase com quatro marcas CMA ⁺ . Barra 10 µm	54
Figura 6	Localização da sondas de DNAr 5S e 45S em espécies de <i>Stylosanthes</i> por hibridização in situ fluorescente. a) Metáfase de <i>S. hippocampoides</i> com dois sítios de DNAr 5S marcados b) Metáfase de <i>S. hippocampoides</i> com dois sítios de DNAr 45S marcados c) Metáfase de <i>S. acuminata</i> com dois sítios de DNAr 5S marcados d) Metáfase de <i>S. acuminata</i> com quatro sítios de DNAr 45S marcados e) Metáfase de <i>S. grandifolia</i> com dois sítios de DNAr 5S marcados f) Metáfase de <i>S. grandifolia</i> com dois sítios de DNAr 45S marcados g) Metáfase de <i>S. gracilis</i> com dois sítios de DNAr 5S marcados h) Metáfase de <i>S. gracilis</i> com dois sítios de DNAr 5S marcados. Barra 10 µm.....	56

Figura 7	<p>Idiogramas representativos da FISH em espécies de <i>Stylosanthes</i>. Os cromossomos estão dispostos em ordem decrescente de braço curto. a) <i>S. hippocampoides</i> b) <i>S. acuminata</i> c) <i>S. grandifolia</i> d) <i>S. gracilis</i>. Barra 1,5 μm.....</p>	57
Figura 8	<p>Localização das sondas de DNAr 5S e 4Ss em acessos de <i>S. guianensis</i> por hibridização in situ fluorescente a) Metáfase de 1463 com dois sítios de DNAr 5S marcados b) Metáfase de 1463 com dois sítios de DNAr 45S marcados c) Metáfase de 1480 com dois sítios de DNAr 5S marcados d) Metáfase de 1480 com dois sítios de DNAr 45S marcados e) Metáfase de 4171 com dois sítios de DNAr 5S marcados f) Metáfase de 4171 com dois sítios de DNAr 45S marcados g) Metáfase de C.V mineirão com dois sítios de DNAr 5S marcados h) Metáfase de C.V mineirão com dois sítios de DNAr 45S marcados. Barra 10 μm.....</p>	58
Figura 9	<p>Localização da sonda de DNAr 45S na variedade 4171 de <i>S. guianensis</i> a) Metáfase com um satélite identificado com sítio de DNAr 45S b) Metáfase com dois satélites identificados com sítio de DNAr 45S. Barra 10 μm.....</p>	59
Figura 10	<p>Idiogramas representativos da FISH em diferentes variedades de <i>S. guianensis</i>. Os cromossomos estão dispostos em ordem decrescente de braço curto. a) 1463 b) 1480 c) 4171 d) C.V mineirão. Barra 1,5 μm.....</p>	60
Figura 11	<p>Histogramas representativos da estimativa da quantidade de DNA estimada por citometria de fluxo de espécies de <i>Stylosanthes</i>, sendo a ervilha (<i>Pisum sativum</i>) utilizada como padrão de referência. a) <i>S. gracilis</i> com 2,50 pg de DNA, CV de 4,48% b) <i>S. hippocampoides</i> com 2,53 pg de DNA, CV de 3,85% c) <i>S. grandifolia</i> com 2,50 pg de DNA, CV de 4,21% d) <i>S. acuminata</i> com 2,19 pg de DNA C.V de 4,19%.....</p>	62
Figura 12	<p>Histogramas representativos da estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo de acessos de <i>S. guianensis</i>, sendo a ervilha (<i>Pisum sativum</i>) utilizada como padrão de referência a) C.V mineirão com 2,80 pg de DNA, CV 3,06% b) 4171 com 3,11 pg de DNA, CV 4,11% c) 1463 com 2,77 pg de DNA, CV 4,66% d) 1480 com 3,13 pg de DNA, CV 3,48%.....</p>	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Reagentes e concentrações do mix de hibridização do primeiro dia da FISH.....	44
Tabela 2	Morfometria cromossômica de <i>S. guianensis</i> cultivar C.V mineirão	48
Tabela 3	Morfometria cromossômica de <i>S. guianensis</i> 4171.....	48
Tabela 4	Morfometria cromossômica de <i>S. guianensis</i> 1463.....	49
Tabela 5	Morfometria cromossômica de <i>S. guianensis</i> 1480.....	49
Tabela 6	Morfometria cromossômica de <i>S. hippocampoides</i>	50
Tabela 7	Morfometria cromossômica de <i>S. gracilis</i>	50
Tabela 8	Morfometria cromossômica de <i>S. acuminata</i>	51
Tabela 9	Morfometria cromossômica de <i>S. grandifolia</i>	51
Tabela 10	Dados citogenéticos de espécies de <i>Stylosanthes</i>	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	Adenina e Timina
ANOVA	Análise de Variância
CG	Citosina e Guanina
CMA ₃	Cromomicina A ₃
CV	Coeficiente de Variação
ddH ₂ O	Água Destilada e Deionizada
DA	Distamicina
DAPI	4`6-diamin-2-phenylindole
DNA	“Deoxyribonucleic Acid” - Ácido Desoxirribonucléico
DNAr	DNA Ribossomal
Dr.	Doutor
FISH	“Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization”- Hibridização Fluorescente <i>In Situ</i>
G ₀ /G ₁	Valor 2C de DNA
G ₂	Valor 4C de DNA
h	Hora
IP	Iodeto de Propídeo
mL	Mililitros
N	Número Haploide de Cromossomos
PG.	Picogramas
SSC	NaCl 3M/Citrato Trissódico.2H ₂ O 0,3M
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
WPB	Tampão 0.2 M Tris.HCl, 4 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 2 mM EDTA Na 2 H ₂ O, 86 mMNaCl, 10 mM de sódio bissulfato, 1% [m/v] PVP-10, 1% [v/v] Triton X-100, pH 7.5.
X	Número cromossômico básico
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
2C	Quantidade de DNA no núcleo somático
8-HQ	8-Hidroxiquinoleína
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	O GÊNERO <i>STYLOSANTHES</i>	15
1.1.1	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	15
1.1.2	CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA E BIOLOGIA DA SEMENTE	18
1.1.3	SISTEMÁTICA.....	22
1.2	TÉCNICAS CITOGENÉTICAS.....	26
1.2.1	BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO COM CORANTES FLUORESCENTES	26
1.2.2	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE - FISH	28
2	OBJETIVOS	38
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	39
3.2	GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CULTIVO	40
3.3	ANÁLISE CITOGENÉTICA	41
3.3.1	PREPARAÇÃO MITÓTICA.....	41
3.3.2	MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA.....	42
3.3.3	BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO.....	42
3.3.4	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH)	43
3.3.5	ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	45
4	RESULTADOS	47
4.1	MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA.....	47
4.2	LOCALIZAÇÃO DE BANDAS CMA/DAPI	52
4.3	HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i>	55
4.4	CITOMETRIA DE FLUXO	61
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÕES	75
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 O GÊNERO *STYLOSANTHES*

1.1.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O gênero *Stylosanthes* pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae e consiste em aproximadamente 50 espécies distribuídas ao longo das regiões tropicais e subtropicais do continente americano. (COSTA e FERREIRA, 1984; MANNETJE, 1984; KUMAR e SANE, 2003; COSTA, 2006). Em virtude de sua importância econômica, também é encontrado em cultivo em outras regiões como a Austrália, África e Ásia (STACE e EDYE, 1984).

As espécies do gênero vêm sendo utilizadas em muitos países na recuperação de áreas degradadas, na adubação verde e na alimentação animal em virtude da sua adaptação a solos de baixa fertilidade, do seu potente sistema radicular, da tolerância à seca e da capacidade de fixar nitrogênio, graças à simbiose com bactérias do gênero *Rizhobium* (NASCIMENTO, 1986). A fixação biológica de nitrogênio atmosférico é um dos mais importantes processos que ocorrem no solo relacionados à manutenção de vida na Terra e os principais sistemas fixadores de nitrogênio na agricultura são formados por leguminosas, como ervilhas, feijões, soja, grão-de-bico e leguminosas forrageiras, como o amendoim e estilosantes (SHELTOM, FRANZEL e PETERS, 2005). Tais espécies do gênero *Stylosanthes* podem ser utilizadas na formação de pastagens de alto valor nutricional por meio de consórcio com outras espécies, como gramíneas, e em plantios exclusivos como banco de proteínas. Este tipo de pastagem diminui os custos com adubação nitrogenada e melhora a qualidade da dieta animal no período seco do ano, além de contribuir para a reabilitação de áreas degradadas (ANDRADE e KARIA, 2000).

A capacidade das espécies de *Stylosanthes* de fixar nitrogênio através das bactérias do gênero *Rhizobium* desperta grande interesse não apenas pela importância do processo para o solo e para o ecossistema como um todo, mas também pela notável relação ecológica de simbiose entre tais bactérias e as plantas do gênero. Chaves et al. (2016) isolaram, caracterizaram e avaliaram a eficiência simbiótica das bactérias em *Stylosanthes* localizados em áreas de savana Amazônica na região de Roraima, Brasil. Os resultados indicaram que uma grande diversidade

de α - Proteobacteria e β - proteobacteria são capazes de nodular *Stylosanthes spp.*, possuindo um grande potencial.

Leguminosas forrageiras podem ser usadas como alternativa na melhoria de pastagens cultivadas em diversas regiões, contribuindo nos sistemas de produção agrícola com inúmeras vantagens: manter e elevar o nível de fertilidade do solo com a adição de nitrogênio ao sistema; auxiliar o controle de pragas e moléstias; controlar a erosão do solo; auxiliar na tolerância a sombreamento e na manutenção de áreas de descanso (MARASCHIN, 1997). Conseqüentemente, em sistemas menos intensivos, a utilização de leguminosas forrageiras tem refletido de forma definitiva o aumento da produtividade, tanto em pastagens nativas como cultivadas. Incrementos na produtividade animal são observados quando os animais são submetidos ao pastejo em área de pastagens com consorciação entre leguminosas e gramíneas tropicais. Tal fato está relacionado, dentre outros fatores, com o aporte extra de nitrogênio e, conseqüentemente, pelo aumento do valor nutritivo da dieta dos animais por ocasião do uso da leguminosa no sistema, sendo, portanto, uma alternativa promissora para sistemas de produção orgânica na pecuária de corte e leite (PEREIRA, 2001).

Outro aspecto relevante é que *Stylosanthes* são leguminosas de pastagens localizadas predominantemente em áreas tropicais e subtropicais, onde a baixa disponibilidade de fósforo (P) é uma grande restrição para o crescimento de muitas plantas. O fósforo é um macronutriente essencial para o desenvolvimento de plantas, sendo o fosfato inorgânico (Pi) a principal forma de P adquirida diretamente do solo (MARSCHNER, 1995). No entanto, Pi é facilmente fixado por partículas do solo e microorganismos, transformando-se assim, em formas não disponíveis para serem usadas diretamente pelas plantas, limitando a produção em solos naturais e agrícolas. Nota-se contudo que a sobrevivência de *Stylosanthes* em solos pobres em P ocorre porque espécies do gênero são capazes de absorvê-lo de maneira mais eficiente comparado a outras espécies. Tal fato tem despertado interesse por estudos de mecanismos bioquímicos sobre o gênero, que ainda são amplamente desconhecidos (LIU et al., 2016).

Stylosanthes é o gênero com maior número de cultivares dentre as leguminosas tropicais usadas como pastagens, principalmente em áreas de solos ácidos e de baixa fertilidade natural, como as áreas tropicais áridas e semiáridas, sendo a Austrália o primeiro país a reconhecer o valor do gênero nesta aplicação

(EDYE, 1997; GUODAO et al. 1997). Oito cultivares foram lançados comercialmente no mercado brasileiro, onde *S. guianensis*, *S. capitata* e *S. macrocephala* são as principais espécies com potencial de uso. A Embrapa Gado de Corte lançou em 2000 no mercado, a cultivar Campo Grande, registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, como sendo um material composto por *Stylosanthes macrocephala* e *S. capitata*, (EMBRAPA GADO DE CORTE, 2007). Sementes das duas espécies foram selecionadas previamente para produtividade de matéria seca, produtividade de sementes e resistência a antracnose. Elas foram então cultivadas em áreas separadas, onde se permitiu o cruzamento natural entre as plantas, havendo a formação de duas populações com características agronômicas desejáveis, originando assim a cultivar Campo Grande, que é formada por 20% de *S. macrocephala* e 80% de *S. capitata*. A estratégia de se utilizar conjuntamente várias linhagens teve como objetivo evitar a pressão de seleção do patógeno da antracnose sobre um genótipo único e, dessa forma, dificultar a quebra de resistência a doença. Apesar da cultivar ser composta por linhagens geneticamente distintas, estas linhagens possuem algumas características fenotípicas uniformes, como a altura das plantas, época de florescimento e produção de sementes, o que favorece a produção. Essa cultivar tem sido utilizada por produtores e agricultores com sucesso em várias partes do Brasil (ANDRADE, ASSIS e SALES, 2010).

Dentre outras espécies com grande potencial no aumento de produtividade das pastagens tropicais, se destacam cultivares de *S. guianensis* var. *guianensis*, *S. guianensis* var. *pauciflora* e *S. guianensis* var. *canescens*; *S. humilis*, *S. scabra*, *S. hamata*, *S. capitata*, *S. macrocephala* e *S. viscosa* (COSTA e SCHULTZE-KRAFT 1993; SCHULTZE-KRAFT, COSTA e FLORES 1984; COSTA, 2006).

O papel de ervas cultivadas em projetos de recuperação de áreas degradadas tem mostrado grande importância para a sobrevivência das plântulas, crescimento e desenvolvimento da comunidade vegetal. A interação entre plantas é responsável pela presença ou ausência de espécies particulares, como propagação de plantas exóticas invasoras em uma comunidade, e é crucial para a restauração do ecossistema (PADILLA e PUGNAIRE, 2006). Starr et al. (2013) avaliaram a influência da utilização de espécies de *Stylosanthes* perenes sobre a colonização de plantas em uma região reabilitada situada na região do Cerrado no Brasil. A suposição era de que *Stylosanthes* spp. provavelmente iria bloquear o desenvolvimento de diferentes espécies, mas a sua presença na verdade permitiu que a área fosse colonizada por

1,6 vezes mais espécies de plantas do que a área de controle. Inicialmente neste estudo, *S. capitata*, *S. macrocephala* e *S. guianensis* foram semeadas na área exposta e no final da primeira estação de crescimento, a área foi exclusivamente coberta por estas ervas. Porém, nos cinco anos seguintes, 26 espécies de plantas foram estabelecidas na área, e os únicos remanescentes das espécies de *Stylosanthes guianensis* (S.) foram responsáveis por apenas 9% da comunidade. Em última análise, a área coberta com *Stylosanthes spp.* evoluiu para uma comunidade vegetal que foi mais diversificada e menos dominada por espécies exóticas do que a área controle.

Ainda dentro do gênero, algumas espécies são utilizadas há muitos anos como plantas medicinais. *Stylosanthes erecta*, por exemplo, é frequentemente usada na medicina popular em alguns países asiáticos e do noroeste africano para combater a esquistossomose (BAH et al., 2006). O chá de folhas ou da parte aérea moída de *S. erecta* misturada com raízes de *Calotropis procera* ou com frutos de *Tamarindus indica* é bastante utilizado para combater a forma urinária dessa moléstia em várias regiões. Já foram relatados popularmente, efeitos analgésicos e anti-inflamatórios de *S. fruticosa*, porém esses efeitos não foram confirmados por Malairajan et al. (2006).

Devido à importância econômica no setor agrônomico e em programas de melhoramento, os estudos relacionados às espécies do gênero vêm aumentando. O uso de marcadores moleculares no estudo de cruzamentos, genotipagem, relações alélicas, indução de poliploidia e citogenética são algumas das linhas de pesquisa que vem contribuindo para ampliar o conhecimento e melhor utilizaros recursos vegetais em *Stylosanthes* (VIEIRA, AGUIAR PERENCIN e MARTINS, 1993; SANTOS-GARCIA et al., 2011; CHANDRA, PATHAK e BHATT, 2006; WU et al., 2015).

1.1.2 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA E BIOLOGIA DA SEMENTE

O Brasil é considerado o maior centro de diversidade de *Stylosanthes*, compreendendo 45% de todas as espécies dentro do gênero, principalmente no Brasil Central, onde se observa o maior endemismo e maior variação fenotípica inter e intraespecífica (STACE e CAMERON, 1984; COSTA, 2006). O segundo centro de diversidade encontra-se na região formada pelo México e Caribe, na América Central (STACE e CAMERON, 1984).

As plantas do gênero apresentam um porte que varia de herbáceo a subarbustivo, podendo ser ereto, semiprostrado ou prostrado. De uma maneira geral,

caracterizam-se por apresentarem grande variabilidade, tanto intra como interespecífica, sendo plantas perenes, com exceção de *S. humilis* que caracteriza-se como anual de hábito prostrado, ascendente e ereto (COSTA, 2006). As folhas são trifolioladas e a inflorescência é pedunculada, terminal ou axilar, simples, do tipo espiga. As flores são sésseis, papilionadas e protegidas por brácteas, possuindo cores que variam entre branco, amarelo e laranja. O número de bractéolas que protegem a flor, por sua vez, foi um importante caráter morfológico utilizado na divisão do gênero em diferentes seções. O fruto é uma vagem do tipo lomento, com um ou dois artículos férteis e um apêndice terminal persistente no ápice, o qual varia de tamanho conforme a espécie, sendo bem visível em *S. humilis*, *S. leiocarpa*, *S. bracteata* e *S. linearfolia*, mas pouco visível em *S. guianensis*. As sementes geralmente variam de ovoide a elipsoide, de cores amarelas, pretas, marrons ou avinhadas (FERREIRA e COSTA, 1979; COSTA, 2006).

Os sistemas reprodutivos são a chave para a adaptação de populações naturais ou cultivadas e, em *Stylosanthes*, são de grande interesse para os que trabalham com a biologia e o desenvolvimento do gênero. Todas as espécies fazem predominantemente, a autopolinização. A apomixia não é comum em *Stylosanthes*, particularmente porque este padrão é extremamente raro em leguminosas (ARROYO, 1981). Porém, alguns estudos têm relatado a presença de certa taxa de polinização cruzada em algumas espécies. Santos-Garcia et al (2011) utilizaram marcadores microsatélites e observaram uma taxa de autogamia de 31% em *S. capitata* e 26% em *S. guianensis*. Stace (1984) também relatou a ocorrência de reprodução mista nas mesmas espécies e ressalta que é comum a existência de certa taxa de polinização cruzada como um importante componente para a manutenção das populações na natureza. Dentre os fatores ambientais que influenciam na taxa de cruzamento destacam-se a intensidade, a homogeneidade e a sobreposição de florescimento entre indivíduos, além da atuação de animais polinizadores. Consequentemente, o modo de dispersão do pólen e sementes determina como os genes são transferidos e recombinados, afetando a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações (GOODWILLIE et al., 2005).

As sementes, que sempre se apresentam com algum grau de dormência, possuem ampla variabilidade para este caráter, que, entre e dentro das espécies de *Stylosanthes*, é controlado por fatores genéticos e ambientais (REIS e MARTINS, 1986). Dentro do gênero existem duas formas de dormência: dormência endógena ou

embrionária, em que a embebição das sementes para a germinação ocorre quando a temperatura ótima se estabiliza; e dormência exógena ou dureza da semente, uma característica que nas leguminosas é atribuída à impregnação por suberina (substância impermeável à água) nas células paliçádicas da camada exterior do tegumento, especialmente daquelas camadas subcuticulares. Essa dormência tegumentar causa um bloqueio físico que não permite a embebição da semente nem a oxigenação do embrião, que por isso permanece latente (McKEON e MOTT, 1984; BURKART, 1952; TEDESCO et al., 2001).

Fatores genéticos que controlam a germinação de sementes estão sendo cada vez mais estudados em várias espécies. Potokina et al. (2002) identificaram mais de 1440 genes associados à germinação em sementes de *Hordeum vulgare* L (aveia), que estão envolvidos com degradação de reservas, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de lipídeos, metabolismo de nitrogênio e etc. Já outros grupos de genes estão associados à dormência em plantas. Quando a semente está dormente, tais genes podem ter a expressão aumentada ou diminuída. Finch-Savage et al. (2007) apresentaram resultados que mostram uma clara evidência que o balanço entre os hormônios ABA (ácido abscísico) e GAs (giberelinas) em sementes de *Arabidopsis thaliana* determinam pontos importantes na germinação. Os autores constataram que os genes envolvidos com a síntese de GA, como o GA3ox1, tem a expressão aumentada com a superação da dormência e germinação, enquanto que os genes envolvidos com a síntese de ABA têm a expressão diminuída, como NCED4, NCED6 e NCED9. Apesar do relato de dormência, não há trabalhos desta natureza com espécies do gênero *Stylosanthes*.

Nas cultivares brasileiras de *Stylosanthes*, sempre é necessário que as sementes passem por algum tipo de processo de escarificação. Alguns métodos são recomendados para a superação total da "dureza" das sementes, como tratamentos químicos, escarificação mecânica e tratamento térmico com o uso de temperaturas elevadas (ALENCAR et al., 2009). A eficiência do tratamento é variável de acordo com a espécie. Espécies tropicais respondem melhor a métodos onde é utilizada a exposição ao calor, visto que tratamentos de superação de dormência devem simular as condições ambientais pelas quais passam as sementes no seu "habitat" natural (GARCIA E BASEGGIO, 1999). Araujo et al. (1996) mostraram que as sementes de *S. guianensis* expostas ao calor seco de 95°C por 12 horas tiveram superação do problema de sementes duras e, apesar de ter provocado acréscimo no número de

sementes mortas, ocorreu significativa melhoria na germinação das mesmas. Alencar et al. (2007) também verificaram aumento no índice de velocidade de germinação em sementes de *S. guianensis* quando tratadas a 50°C por 5 horas. Battistin (1981) por sua vez, avaliou a germinação de sete espécies e três variedades do gênero *Stylosanthes* em regimes de temperatura constante. Todas as espécies e variedades apresentaram alta porcentagem de sementes dormentes, refletindo baixa variabilidade dentro de cada temperatura. Entretanto, Alencar et al. (2009) observou comportamento diferencial e altamente variável entre as espécies no que se refere à taxa de velocidade de germinação das sementes nas diferentes temperaturas. Portanto, pode-se notar que ainda há divergência entre autores com relação ao efeito de cada tratamento sobre as sementes nas espécies do gênero, bem como a resposta diferenciada de cada uma delas, o que pode estar relacionado a diversos fatores.

Além dos tratamentos térmicos, muitos outros métodos para quebrar a dormência de maneira eficaz foram testados, como o uso de substâncias variadas e de reguladores de crescimento (VIEIRA e BARROS, 1994). De acordo com Ribeiro et al. (2011), soluções contendo os íons Al^{3+} e Fe^{3+} auxiliaram na quebra da dormência de sementes de *S. humilis*. O mecanismo de ação do íon Fe^{3+} agiu na indução da produção de etileno, acelerando o processo de germinação. Por outro lado, a ação do Al^{3+} foi provavelmente uma consequência de uma condição estressante promovida pela sua alta concentração, o que desencadeou a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e influenciou a germinação precoce.

A fim de quebrar a dormência em sementes de *Stylosanthes humilis*, Chaves (2011) utilizou diferentes métodos como o uso de reguladores de crescimento, imersão em água, escarificação ácida e escarificação mecânica após a imersão nos reguladores. Cada método variou quanto a porcentagem de sementes germinadas, o que indica que cada tipo de semente responde de forma diferenciada aos estímulos.

Alguns estudos mostraram que o uso de soluções de baixo pH podem quebrar a dormência em algumas espécies como a aveia selvagem (*Avena fatua*) (ADKINS, SIMPSON e NAYLOR, 1985), o arroz vermelho (*Oryza sativa*) e algumas braquiárias (COHN et al., 1987). Tal fato ocorre pois o meio ácido pode agir como um fator estressante, aumentando a síntese de etileno e promovendo a germinação de sementes. Pelacani et al. (2005) utilizaram reguladores de crescimento e testaram algumas soluções de baixo pH como tampões McIlvaine (ácido cítrico $Na_2H_2PO_4$) e KOH em sementes dormentes de *S. humilis*. Altos índices de germinação foram

observados nas sementes em soluções de pH 2 e 3. De acordo com os autores, algumas considerações devem ser feitas frente aos resultados apresentados, visto que, o solo no qual as espécies do gênero *Stylosanthes* se desenvolvem naturalmente ou são cultivadas como forrageiras, são geralmente ácidos (pH 4.0- 5.5) como os solos de savana (parte do Cerrado Brasileiro) (CARVALHO et al., 1988). Ao assumir que o pH da solução do solo é tamponado contra mudanças drásticas a curto e médio prazo, e que na alta gama de variação de pH nos solos a germinação seria relativamente alta, uma proporção de milhões de sementes que são lançadas ao solo germinaria e, assim, a dormência passaria despercebida pelos que cultivam em outros tipos de solo, o que geralmente não é mencionado na literatura (PELACANI et al., 2005; CAMERON, 1967a; McIVOR, 1976).

A variação de resultados encontrados ao longo dos trabalhos ocorre graças aos diferentes efeitos que cada tratamento de escarificação causa nas sementes e às diferenças anatômicas de cada espécie. De acordo com Chavez (2011), as sementes de *Stylosanthes* possuem o tegumento completamente liso, sem nenhuma rachadura, independentemente de estarem dormentes ou não. Os únicos orifícios observados na semente são o hilo e a micrópila, que estão localizados lado a lado e não permitem a entrada de água e nutrientes para o início da germinação.

É válido ressaltar que a dormência das sementes é uma das mais importantes estratégias utilizadas na superação das condições ambientais adversas e, também, na colonização de novos habitats não apropriados ao crescimento durante todo o ano (ALENCAR et al., 2009).

1.1.3 SISTEMÁTICA

No que se refere à sistemática, o gênero *Stylosanthes* foi inicialmente estabelecido, em 1788, por O. Swartz, com duas espécies: *S. procumbens* (= *S. hamata* (L.) Taub.) e *S. viscosa* Sw; e, em 1938, Vogel reconheceu quinze espécies divididas em duas seções: *Stylosanthes* (= *Eusylosanthes* Vog.) e *Styposanthes*. A primeira seção agrupou as espécies em que a flor não é sustentada por um eixo rudimentar e possui uma bractéola interna. Na segunda seção, estão as espécies em que as flores apresentam um eixo rudimentar e uma ou duas bractéolas internas (FERREIRA e COSTA 1979; COSTA, 2006). A diferenciação das espécies dentro do gênero foi baseada em várias características morfológicas tais como: formato dos folíolos, das inflorescências, tipo de venação, formato das bractéas, presença ou

ausência de xilopódio e de pilosidade nas vagens, entre outras. Ao longo do tempo, o número de espécies reconhecidas foi aumentando. Mohlenbrock (1960) revisando o gênero, ampliou para 30 o número de espécies reconhecidas. Atualmente, aproximadamente 50 espécies fazem parte do grupo (COSTA, 2006), porém a sua taxonomia ainda é bastante controversa e a tipificação do gênero e de suas seções têm sido objetos de discussão ao longo da história. Discordâncias sobre a classificação das espécies ainda são bastante pronunciadas (KARIA, 2008).

Com o progresso das pesquisas relacionadas ao genoma de plantas, os caracteres morfológicos para a divisão das duas seções acima mencionadas foram substituídos pela divisão baseada nos diferentes níveis de ploidia presentes no gênero (STACE e CAMERON, 1984, KARIA, 2008). *Stylosanthes* seção *Styposanthes* estaria representada por espécies poliploides e diploides como: *S. bracteata*, *S. capitata*, *S. hamata*, *S. fruticosa*, *S. erecta* e *S. scabra*; e *Stylosanthes* seção *Stylosanthes* representada por sua vez apenas por espécies diploides como: *S. acuminata*, *S. gracilis*, *S. grandifolia*, *S. guianensis*, *S. hippocampoides*, *S. humilis*, *S. linearifolia*, *S. longiseta*, *S. maracajuensis*, *S. montevidensis*, *S. nunoii* e *S. viscosa*. Entretanto, a cada novo estudo a situação taxonômica das espécies do gênero sofre mudanças e alguns autores desconsideram a divisão das duas seções, construindo novas relações filogenéticas entre as espécies (Vander Stappen, 2003; KARIA, 2008).

Em *Stylosanthes*, os poucos estudos referentes à citogenética do gênero relatam a existência de espécies diploides, tetraploides e hexaploides. O número cromossômico básico dentro do gênero é $n=10$. Existem, portanto, espécies diploides ($2n=20$), como *S. guianensis*, *S. hippocampoides*, *S. humilis* e *S. gracilis*; espécies alotetraploides ($2n=40$), como *S. capitata*, *S. fruticosa* e *S. scabra*; além de um representante alohexaploide ($2n=60$), *S. erecta* (STACE e CAMERON, 1984). Dados de biologia molecular e dados isoenzimáticos sugerem que *S. macrocephala* deu origem à *S. capitata*. Outros estudos apontam *S. macrocephala* ou *S. bracteata* como possíveis doadoras maternas e *S. pilosa* como doador paterno do genoma de *S. capitata*. (MAASS e SAWKINS, 2004; STACE, 1984; VANDER STAPPEN et al., 1999).

Burt (1984) enfatizou a relevante variabilidade genética e a grande variabilidade fenotípica existentes na espécie *S. hamata*. Com relação ao número cromossômico, *S. hamata* foi considerada diploide ($2n=20$) por Cameron (1967b) e tetraploide ($2n=40$) por Brolmann (1979), porém Stace e Cameron (1987) realizaram

estudos relacionados a aloenzimas e, comparando as duas variantes, constataram que se tratavam de espécies diferentes. Já Vanni e Fernandez (2011), relataram a existência de citótipos diploides e tetraploides em uma mesma amostra de sementes comerciais de *S. seabrana* cv. *Única*, considerando o nível de ploidia insuficiente como critério para distinção de espécies.

A identificação de eventos poliploides na filogenia de angiospermas proporciona a oportunidade de avaliar a correspondência entre eventos de duplicação do genoma e grandes diversificações. Utilizando tal abordagem, a poliploidia certamente parece ter sido uma das principais forças motrizes por trás da diversificação das angiospermas (SOLTIS e SOLTIS, 2009). A especiação e diversificação em *Stylosanthes* é recente e, assim como em outras leguminosas, se dá por hibridação interespecífica ou intraespecífica, seguida de evolução com desenvolvimento de mecanismos de incompatibilidade genética (SOLTIS e SOLTIS, 2009; COSTA, 2006). Com isso, as espécies poliploides do gênero teriam sido originadas por hibridação interespecífica e subsequente poliploidização entre taxa das diferentes seções (STACE e CAMERON, 1984; SOLTIS e SOLTIS, 1995, 2009; COSTA, 2006).

Comparativamente a outros gêneros, estudos filogenéticos sugerem que os gêneros *Arachis* e *Chapmannia*, *Pachecoa* e *Arthrocarpum* estão mais próximos de *Stylosanthes*, constituindo a subtribo *Stylosanthinae* juntamente com os gêneros *Fissicalyx* e *Fiebrigiella* (LAVIN et al. 2001). Nos últimos anos, observou-se maior resolução filogenética dentro das ramificações dos clados de Papilionoideae (CARDOSO et al., 2013, 2014, 2015). Contudo, para se obter uma estimativa robusta da filogenia das leguminosas é necessária reanalisar os taxa, especialmente no caso dos gêneros não resolvidos ou filogeneticamente enigmáticos (LPWG, 2013). Uma revisão da sistemática de leguminosas realizada pelo Grupo de Trabalho sobre Filogenia de Leguminosas (LPWG, 2013) revelou que 51 gêneros de Papilionoideae ainda permanecem sem lugar ou sem hipótese filogenética molecular. Embora seja possível utilizar a morfologia para tentar posicionar a maioria desses gêneros em algum ramo principal da árvore de Papilionoideae, dados moleculares podem revelar inesperadas posições filogenéticas (CARDOSO et al., 2015).

O principal debate na classificação taxonômica do gênero remete-se à *S. guianensis*, que é uma espécie polimórfica reconhecida por distintas variedades e ampla variação morfológica, que formam o denominado “complexo guianensis” ou

“aliança guianensis”. Além da morfologia do fruto, Ferreira e Costa (1979) levaram em conta para identificação deste complexo, o hábito de crescimento, número de feixes vasculares e tipo de venação do folíolos (VIEIRA, AGUIAR-PERENCIN e MARTINS, 1993). Costa (2006) em uma relevante revisão e caracterização botânica do gênero, divide *S. guianensis* em quatro variedades: *S. guianensis* var. *guianensis* (que inclui var. *vulgaris*), *S. guianensis* var. *pauciflora*, *S. guianensis* var. *canescens* e *S. guianensis* var. *microcephala*. Estudos de RAPD (“Random amplified polymorphic DNA”) mostraram a diferenciação genética do grupo de espécies relacionadas com *S. guianensis*: *S. gracilis*, *S. grandifolia*, *S. acuminata* e *S. hipocampoides*. Tais estudos de diferenciação podem auxiliar na sistemática de espécies polimórficas, como é o caso de *S. guianensis*. (KAZAN et al., 1993; COSTA, 2006). Costa (2006) especula ainda, que a origem ds dificuldades e grandes desordens para os pesquisadores do gênero *Stylosanthes* é a inclusão de um grande número de espécies, variedades e formas como *S. guianensis* enquanto elas são perfeitamente identificáveis como espécies independentes, embora possam estar ligadas por ancestral comum, o qual ainda não foi identificado.

Diante disso, o conhecimento intrínseco sobre as espécies do gênero é cada vez mais necessário. Neste contexto, as técnicas moleculares e de citogenética têm sido uma importante ferramenta de estudo para caracterização dos mais variados táxons (SILVA et al. 2009). Huang et al. (2014) utilizaram a técnica de SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*), uma nova tecnologia de marcadores moleculares desenvolvida a partir da reação de polimerase em cadeia, para identificar a presença de híbridos verdadeiros e de auto-híbridos em acessos de *S. guianensis*. Por meio da presença ou ausência de bandas parentais específicas, a técnica é capaz de fornecer a pureza dos híbridos, o que contribui para a construção de mapas genéticos. Ding et al. (2015) também aprofundaram os estudos em *S. guianensis* desenvolvendo marcadores EST-SSR através do seu transcriptoma, além de analisar a diversidade genética entre diferentes acessos da espécie. Entre outras técnicas moleculares utilizadas no gênero destacam-se: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), eletroforese de isoenzimas e polimorfismo de cpDNA (LIU e MUSIAL, 1995; VIEIRA et al., 1997; VANDER STAPPEN et al., 1998; COSTA, 2006; ROBINSON et al., 1980). Vander Stappen (2003) utilizou sequências de regiões de espaçadores transcritos internos e externos (ETS e ITS) para estudar as relações filogenéticas no

gênero, concluindo que a análise comparada de tais regiões foi relevante, ampliando o conhecimento relacionado às relações evolutivas para 12 espécies de *Stylosanthes*. Do ponto de vista citotaxonômico, Vieira et al. (1993) realizaram um dos poucos estudos que abordam análises cromossômicas no gênero.

Nota-se, portanto, um número cada vez maior de estudos moleculares que podem auxiliar na compreensão das relações filogenéticas e ampliar o conhecimento sobre o gênero, visto que a utilização de novos marcadores podem caracterizar as espécies sob diferentes aspectos e contribuir para a inferência sobre as relações de parentesco (VIEIRA, et al., 1993; LIU e MUSIAL, 2001; COSTA, 2004; KARIA, 2008; CHANDRA et al. 2011; SANTOS GARCIA et al., 2012; HUANG et al., 2014; DING et al., 2015).

É importante destacar que a compreensão da história evolutiva e taxonômica de um gênero é de enorme relevância, pois a caracterização do grupo como um todo pode influenciar em pesquisas futuras sobre biologia reprodutiva, biogeografia e melhoramento. Porém, estudos cromossômicos em *Stylosanthes* ainda são pouco explorados, mesmo sendo um importante instrumento para a compreensão das relações de parentesco, que traz ricas informações acerca do genoma (GUERRA, 2008). Diante disso, o presente estudo tem grande potencial para obter informações significativas do ponto de vista citogenético para espécies do gênero.

1.2 TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

1.2.1 BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO COM CORANTES FLUORESCENTES

Os resultados obtidos com o uso de bandeamentos cromossômicos têm permitido um melhor entendimento sobre a constituição do genoma de plantas, pois essas técnicas permitem uma comparação entre os padrões das bandas e suas composições nos diferentes cromossomos. Caracterizações citogenéticas de plantas mediante bandeamento cromossômico com o uso de fluorocromos vêm sendo utilizadas por vários autores e contribuindo com novas perspectivas para o cariótipo vegetal como um todo (SCHWEIZER, 1976; CARVALHO e GUERRA, 2002; SOUSA, REIS e VICCINI, 2013; NATH et al., 2014; REIS et al., 2014; BOLSHEVA et al., 2015).

A técnica que utiliza corantes fluorescentes para bandeamento baseia-se nos padrões diferenciais característicos de bandas nos cromossomos o que proporciona uma análise mais refinada dos conjuntos cromossômicos. Os

fluorocromos mais utilizados atualmente são o 4-6- diamidino-2-phenilindol (DAPI) e a cromomicina A3 (CMA₃). Segundo Schweizer (1976), preparações cromossômicas com os fluorocromos DAPI e CMA₃ produzem padrões de bandas de acordo com a afinidade de bases do DNA. O corante fluorescente CMA₃ é um fluorocromo que se liga as regiões heterocromáticas ricas em bases nitrogenadas guanina e citosina (GC). Já o DAPI é um fluorocromo que se liga às regiões cromossômicas ricas em bases nitrogenadas adenina e timina (AT). Estes fluorocromos podem ser associados a antibióticos para incrementar o contraste do bandejamento. O fluorocromo CMA₃ pode ser usado associado ao antibiótico distamicina (CMA₃-DA) o qual age como um contra corante que se liga às bases AT, permitindo um maior contraste nas regiões ricas em GC. Da mesma forma, o DAPI quando associado ao antibiótico actinomicina (AMD) faz com que este funcione também como um contracorante, neste caso ligando-se às bases GC promovendo maior contraste das regiões ricas em AT.

Carvalho e Guerra (2002) observaram que as espécies de *Manihot* e cultivares de *Manihot esculenta* apresentam grande similaridade no complemento cromossômico. Todas as espécies apresentaram cariótipo simétrico com $2n = 36$ cromossomos. Com técnicas convencionais de coloração os autores definiram poucas variações entre os cariótipos; porém com as técnicas de banda-C, banda-NOR, bandamento com corantes fluorescentes CMA e DAPI, e a localização de sequências de rDNA 5S e 18S-5.5S-26S, diferenciaram efetivamente as espécies.

Para o gênero *Crinum* (Amaryllidaceae), Ahmed et al. (2004), determinaram o número cromossômico e o padrão de bandas CMA₃ e DAPI para três subespécies do gênero (*C. amoenum*, *C. asiaticum* e *C. latifolium*). A partir destes dados os autores foram capazes de determinar que *C. latifolium* era um alotriploide segmentado.

Nath et al. (2014) utilizaram o bandejamento cromossômico com corantes DAPI e CMA para avaliar relações evolutivas em espécies do gênero *Drimia* (Asparagaceae) que são endêmicas da África, Índia e regiões do Mediterrâneo, possuindo uma longa história de uso medicinal como tônico para o coração, principalmente devido à presença de glicosídeos esteróides cardioativos. O gênero é taxonomicamente e citogeneticamente complexo pois há uma grande variação morfológica e cariotípica, o que resulta em confusão taxonômica. Foram então estudadas cinco espécies (*D. indica*, *D. wightii*, *D. razii*, *D. coromandeliana* e *D. polyantha*). Por meio da análise dos padrões de bandas CMA associados e técnicas de citometria de fluxo, os autores verificaram que as diferenças entre os cariótipos

refletiram divergência evolutiva no gênero mesmo a nível intra-específico como exemplificado por diferentes populações de *D. indica* e *D. wightii*. No entanto, através de mudanças estruturais, principalmente constituídas por regiões organizadoras de nucléolo e diferenças no conteúdo de heterocromatina, foi possível estabelecer algumas homologias cromossômicas entre as espécies, facilitando a compreensão da taxonomia dentro de *Drimia*.

Dentro do grupo das leguminosas, Fonseca e Pedrosa-Harand (2013) associaram o bandeamento à técnicas de hibridização *in situ* e caracterizaram o genoma de espécies do gênero *Phaseolus*, evidenciando uma estabilidade cariotípica geral, onde apenas poucas inversões raras representaram as principais alterações do cariótipo durante a evolução do gênero. O número de estudos relacionados ao padrão de bandas utilizando fluorescência dentro da família Fabaceae estão aumentando e resultados cada vez mais promissores vem sendo obtidos por vários autores (BORTOLETTI et al., 2011; CASTIGLIONE et al., 2012; SOUSA, REIS e VICCINI, 2013). Bortoletti et al. (2012) encontraram divergências quanto à quantidade e composição de heterocromatina em duas espécies do gênero *Vigna*, que também possuem importância econômica graças ao seu alto teor de proteína, permitindo a identificação de cromossomos individuais em *V. unguolata* e *V. radiata*.

Exceto pelo estudo realizado por Lira (2015), que fez a análise com dupla coloração CMA₃/DAPI em acessos da espécie diploide *S. seabrana* e em *S. scabra*, que é tetraploide, a maioria dos trabalhos feitos no gênero *Stylosanthes* estão limitados à contagem do número cromossômico e análise do cariótipo, sem o emprego de técnicas mais detalhadas (VIEIRA, AGUIAR-PERENCIN e MARTINS, 1993).

1.2.2 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE - FISH

O conhecimento dos padrões de herança, bem como a localização dos genes nos cromossomos, tem permitido ao melhoramento genético, expressivo avanço na incorporação de importantes características agrônômicas entre as melhores plantas, resultando no desenvolvimento das cultivares disponíveis aos agricultores. Ressalta-se que a criação destas cultivares é feita através de cruzamentos direcionados, podendo ser mais rápida e eficiente, por meio da ação conjunta entre melhoristas e citogeneticistas que visam analisar o modo como as características hereditárias são transferidas nas diferentes gerações, bem como a

detecção da ocorrência de anormalidades cromossômicas (BRAMMER, 2010; BRASILEIRO-VIDAL e GUERRA, 2002).

Com o advento das técnicas em Biologia Molecular, o estudo dos cromossomos tem acumulado refinamentos, sobretudo, aqueles relacionados com a localização de genes ou de sequências de DNA repetitivo. Esses estudos são possíveis com a Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH). Além dessa, a hibridação de genomas inteiros, através de GISH (Hibridização Genômica *in situ*), tem fornecido interessantes dados sobre o estudo de híbridos e espécies proximamente relacionadas. Tais técnicas são amplamente utilizadas para localizar diferentes sequências de DNA em cromossomos mitóticos ou meióticos, em núcleos interfásicos e em fibras de cromatina estendidas (BRASILEIRO VIDAL e GUERRA, 2002). A abordagem do método proporciona a interação entre conhecimento da biologia celular, citogenética clássica e genética molecular.

Os segmentos de DNA ou RNA marcados funcionam como sondas para localizar as sequências de DNA nos cromossomos que sejam complementares a ela e reconhecem especificamente em um único par cromossômico, regiões específicas, tais como centrômeros e telômeros ou até mesmo um sítio específico denominado DNA-alvo. A detecção de sequências *in situ* tem gerado avanços importantes na citogenética de plantas, destacando-se a construção de mapas físicos, a investigação detalhada da estrutura cromossômica, o acompanhamento da quantidade de cromatina introduzida em cruzamentos interespecíficos e a análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas (LEITCH et al., 1994).

As sondas mais comumente utilizadas são aquelas de sequências repetitivas por serem mais facilmente detectadas e por isso proporcionarem sinais mais evidentes. Dentre as sondas de sequências repetitivas, uma das mais aplicadas são as sequências de rDNA 45S e 5S, pois foram muito bem conservadas durante a evolução. A sonda de rDNA conhecida como pTa71, clonada no plasmídeo pUC19, possui 9,0 Kb e corresponde à sequência de DNA ribossômico de *Triticum aestivum*, que abrange as regiões 28S, 5.8S e 26S (GERLACK e BEDBROOK, 1979). A sonda de rDNA 5S conhecida como pScT7 possui 300-500 pb, foi clonada no plasmídeo pUC8 e corresponde à sequência de DNA ribossômico 5S isolada de *Secalle cereale*, e, (LAWRENCE e APPELS, 1986). Tais sítios de DNAr 18S-28S e 5S são marcas cromossômicas úteis capazes de fornecer evidências valiosas sobre organização do genoma e evolução.

A partir do emprego da citogenética molecular, pode-se detectar sequências específicas de DNA de genomas diferentes, o que tem possibilitado importantes avanços, cujas pesquisas estão focadas na investigação detalhada da estrutura cromossômica. Esta área da citogenética também é promissora para a caracterização de germoplasma, bem como para a detecção de segmentos cromossômicos associados a genes de resistência a estresses bióticos e abióticos, foco de programa de melhoramento. Portanto, é possível explorar os recursos citogenéticos, através do uso de ferramentas biotecnológicas, como a citogenética clássica e molecular, associadas à genética e ao melhoramento (BRAMMER, ZANOTTO e CARVEZAN, 2007).

Reis et al. (2014) utilizaram a técnica de FISH para estudar processos evolutivos no complexo poliploide *Lippia alba* (Verbenaceae). A espécie, que possui importância medicinal, detém ampla plasticidade fenotípica e genômica, além de diferenças no nível de ploidia entre os indivíduos ($2n= 30, 38, 45, 60$ e 90) e constituições químicas diferenciadas. O número de sinais de DNAr 5S variou proporcionalmente de acordo com o número de cromossomos, diferentemente do DNAr 45S, que não apresentou tal proporcionalidade. Além disso, altas taxas de irregularidade meiótica também foram encontradas, o que fortalece a hipótese de que o complexo *Lippia alba* tenha passado por um aumento do genoma, provavelmente por autopoliploidia.

Gan et al. (2013) obtiveram novas implicações filogenéticas através da FISH aplicada ao gênero *Gossypium*, pertencente à família Malvaceae, conhecido por abrigar espécies de algodão. Através do mapeamento do genoma de indivíduos diploides e tetraploides, foi possível traçar relações entre as espécies além de identificar eventos evolutivos como expansão, diminuição e transposição de DNAr ocorrendo no gênero.

Com o objetivo de identificar recombinações e estudar a dinâmica do número cromossômico e da posição dos loci de DNA ribossomal em gerações F2 e F4 derivadas do híbrido F1 de *Festuca pratensis* Huds. ($2n=4x=48$) x *Lolium perene* ($2n=4x=28$), pertencentes à família Poaceae, Książczyk et al (2014) mapearam o genoma das espécies através de hibridização fluorescente *in situ*, utilizando FISH e GISH. Os resultados revelaram que as plantas das três gerações compartilharam vários loci de DNAr com mudanças estruturais, provavelmente como resultado de rearranjos intra e inter- cromossomais. Observaram ainda, uma variação assimétrica

no número de braços recombinantes com e sem loci de DNAr entre os genomas parentais. O genoma de *Lolium* foi mais afetado por rearranjos nos braços cromossômicos com os loci de DNAr, enquanto *Festuca* foi mais afetada nos braços sem os loci.

Vallès et al (2015) realizaram a caracterização citogenética de espécies de *Juniperus* (Cupressaceae) do Mediterrâneo. Além da técnica de coloração com Cromomicina A3, foi realizado o FISH para detectar regiões de genes 45s de rRNA em cinco espécies do gênero, quatro diploides (*J. communis*, *J. oxycedrus*, *J. phoenicea* e *J. sabina*) e somente uma exclusivamente tetraploide (*J. thurifera*). Os resultados mostraram um padrão bastante homogêneo, com um par de cromossomos com bandas CMA positivas nas constrições secundárias colocalizadas com os sinais de DNAr 45S. Neste trabalho, as espécies diploides mostraram resultados semelhantes a espécies da Ásia investigadas anteriormente pela FISH. Contudo, as espécies tetraploides apresentaram resultados diferentes: nas espécies asiáticas, o número de sinais e a localização eram exatamente o dobro em tetraploides comparados aos diploides, enquanto neste trabalho, os tetraploides mostraram o mesmo número de sinais (não o dobro) que os diploides. Este fato contribuiu para o conhecimento sobre a evolução de *J. thurifera*, pois pode-se deduzir que depois do evento de poliploidização e estabelecimento do genoma duplicado, ocorreram rearranjos cromossômicos implicando em perda das regiões ricas em GC e dos loci de DNAr, evidenciando a ocorrência de paleopoliploidia.

A caracterização citogenética com as técnicas de bandeamento-C, bandeamento com fluorocromos CMA e DAPI e hibridização *in situ* para rDNA foi também realizada por Bolsheva et al. (2015) em espécies do gênero *Linum*. A grande variação no número cromossômico encontrada nestas espécies ($2n= 16, 18, 20, 26, 28, 30, 32, 36, 42, 72, 84$) indica que alterações cromossômicas podem ter desempenhado um importante papel na especiação deste táxon. Para contribuir com um melhor entendimento da diversidade genética e relações entre espécies do gênero, estudos comparativos de cariótipos e genomas de espécies dentro da seção *Syllinum* Griseb ($2n= 26, 28$) foram realizados. Cromossomos de 10 espécies da seção *Syllinum* foram investigados por bandeamento C/DAPI, coloração com CMA e Ag-NOR, FISH com sondas de DNAr e de repetições teloméricas, além do uso de análise de RAPD. Foi observado que o padrão cromossômico de bandeamento C/DAPI das espécies com 28 cromossomos foram altamente similares e duas espécies

diferiram das outras no local dos sítios de DNAr, além da presença de cromossomo B em todas elas. Cromossomos de *Linum nodiflorum* ($2n= 26$) e as espécies de $2n= 28$ foram similares nos padrões de bandas DAPI/ C e na localização dos sítios de DNAr, mas foram diferentes no tamanho dos cromossomos e no número. Os autores concluíram que espécies da seção *Syllinum* provavelmente foram originadas de um ancestral tetraploide comum e as espécies com 28 cromossomos foram intimamente relacionadas, mas *L. nodiflorum* divergiu de forma significativa a partir do restante das espécies, provavelmente devido a rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a evolução.

Espécies de interesse econômico de várias partes do planeta estão tendo seus genomas mapeados com a técnica de hibridização *in situ* e marcação da heterocromatina, como as espécies do gênero *Larix* (Pinaceae), um dos gêneros mais difundidos e importantes economicamente entre as coníferas do mundo, sendo dominantes em florestas boreais do Hemisfério Norte, como as da Sibéria. Tendo alta adaptabilidade, estas espécies e seus complexos híbridos naturais formam grandes extensões de florestas abertas monodominantes em altas latitudes. Goryachkina et al. (2012) estudaram as primeiras caracterizações e relações evolutivas entre as espécies do gênero através dos sinais da marcação de regiões de DNAr 5S e 45S.

Dentro de Leguminosae, Chalup et al. (2015) analisaram o cariótipo de espécies do gênero *Lathyrus*, seção *Notolathyrus*, por mapeamento citogenético de bandas heterocromáticas e DNAr 5S e 45S. As bandas cromossômicas apresentaram variação interespecífica na quantidade e distribuição de heterocromatina, e em conjunto com a distribuição dos loci de rDNA, permitiu a caracterização de todas as espécies estudadas. Evolutivamente, os dados cromossômicos revelaram que as espécies sul-americanas de *Notolathyrus* são um grupo homogêneo apoiando a monofilia da seção. No entanto, a correlação observada entre a quantidade de heterocromatina e algumas variáveis geográficas e bioclimáticas sugeriram que a variação na fração heterocromática possa ter um importante valor adaptativo para as espécies do gênero.

Outros gêneros dentro da família estão sendo submetidos à técnica de FISH e, com isso, aspectos genômicos diferenciados são cada vez mais caracterizados citogeneticamente em leguminosas (DARMENCY, 2005; ALMEIDA e PEDROSA-HARAND, 2010; BORTOLETI et al., 2012; PUCCIARELLO et al., 2013; BAZIZ et al., 2014; SHE et al., 2015).

Pode-se notar que, do ponto de vista taxonômico e de relações filogenéticas, o avanço das técnicas de citogenética molecular tem proporcionado a diversos autores análises mais claras e refinadas sobre relações evolutivas por meio das marcações físicas nos cromossomos, que permitem a visualização de variações, anormalidades e pontos em comum dentro e entre os genomas de várias espécies de plantas (ZANELA, 2009; LAVANIA et al., 2010; MORALES, AGUIAR PERECIN e MONDIN, 2011; GAN et al., 2013; NATH et al., 2014; REIS et al., 2014; CHALUP et al., 2015; SILVESTRI, ORTIZ e LAVIA, 2015). Apesar de ser utilizado como marcador cromossômico, há casos de homoplasias do DNAr 45S, onde nem sempre é possível utilizá-lo exclusivamente como parâmetro de comparação, pois sua distribuição nem sempre é aleatória. Em angiospermas, por exemplo, há certa tendência em relação a distribuição de tais sítios ao longo dos cromossomos para a região terminal do braço curto, portanto discussões e hipóteses ainda são discutidas em tais abordagens. (ROA e GUERRA, 2012)

Contudo, o gênero *Stylosanthes* não possui seu genoma mapeado por meio de sondas de DNA ribossomal constituindo assim um dos objetivos do presente trabalho.

1.2.3 ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Além dos estudos citogenéticos, a citometria de fluxo constitui outro método de grande utilidade para auxiliar a caracterização de plantas. Trata-se de uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem em uma suspensão líquida, sendo inicialmente desenvolvida para contagem e análise rápida de células sanguíneas. Posteriormente, a partir da década de 80 a técnica passou a ser adaptada para células vegetais (DOLEZEL, 1997a). Diante disso, inúmeras aplicações foram desenvolvidas e empregadas em plantas, dentre as quais destacam-se: a estimativa da quantidade de DNA; níveis de ploidia; medida do tamanho do genoma; estudos do ciclo celular; estudos de biologia reprodutiva e análises de genotoxicidade (DOLEZEL et al., 2007; GALBRAIT et al., 1983; BIRADAR et al., 1994).

Entre as plantas há uma ampla variação no tamanho do genoma. A quantidade de DNA nuclear, por sua vez, tem significado adaptativo e influencia o fenótipo tanto pela expressão de seu conteúdo quanto pelos seus efeitos físicos.

Assim, o conhecimento da quantidade de DNA nuclear de um grupo de organismos pode ser útil em vários campos, como biologia molecular e celular, ecologia, melhoramento genético, fitogeografia e sistemática (BENNET e LEITCH, 1995).

Esse método tem se mostrado eficiente na pesquisa do genoma de plantas principalmente pela reprodutibilidade, precisão e rapidez, pois requer pequenas quantidades de tecido vegetal, sendo possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucas gramas de tecidos foliares em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (GALBRAITH et al., 1983). A coloração da amostra é feita com corantes específicos para o DNA como o iodeto de propídeo, DAPI e brometo de etídeo, o que permite ao citômetro realizar a leitura das partículas em suspensão e estimar a quantidade de DNA (DOLEZEL et al., 2007). A quantidade de DNA é expressa em picogramas (pg), 10^{-12} g, sendo que 1pg corresponde a 978 Mpb (DOLEZEL et al, 2003).

Apesar da alta praticidade na citometria de fluxo em plantas, há vários obstáculos e dificuldades associadas à preparação das amostras graças à estrutura da célula vegetal. As plantas são compostas de tecidos tridimensionais complexos com células de formatos irregulares e paredes celulares rígidas que estão unidas à matriz extracelular. Problemas adicionais são evidenciados pela composição química das células vegetais, pois produzem uma grande variedade de metabólitos secundários que podem interferir na coloração dos constituintes da própria célula, dificultando assim, a quantificação dos sinais fluorescentes pelo citômetro (DOLEZEL, GREIHUBER e SUDA, 2007). A amostra para a FCM deve estar na forma de suspensão líquida de partículas individuais, e então, para minimizar as adversidades encontradas é necessário que um tampão eficiente seja incluído no preparo.

A solução tampão adequada é aquela que permite o isolamento e manutenção da integridade dos núcleos. Atualmente, têm sido usados vários tampões diferentes no isolamento de núcleos de várias espécies (GALBRAITH et al., 1983). A sua composição é determinada pela necessidade de inibir a atividade das nucleases, de fornecer condições ótimas para a coloração do DNA e de estabilizar a cromatina. Por vezes, são adicionados ao tampão agentes redutores (como o mercaptoetanol) que têm a função de inibir a ação de compostos fenólicos (DOLEZEL, BINAROVA e LUCRETTI, 1989; ENDEMANN et al., 2002; GALBRAITH et al., 2002). É válido ressaltar que não há um único tampão que funcione eficientemente para todas as

espécies ou tipos de tecidos vegetais, cabendo ao pesquisador realizar estudos prévios para comparar a eficiência de diferentes tampões em cada espécie para que as amostras sejam lidas com maior precisão e qualidade.

Como o conteúdo de DNA nuclear das células em G_0/G_1 reflete o nível de ploidia de uma espécie, através da comparação com o pico G_1 de uma planta padrão - com o nível de ploidia conhecido- é possível realizar uma rápida estimativa do nível de ploidia da amostra em estudo. Diante disso a escolha de um padrão de referência, que pode ser interno ou externo, é de grande importância para a qualidade das estimativas (JOHNSTON et al., 1999). As espécies que são mais rotineiramente utilizadas como padrões internos de referência na estimativa do conteúdo de DNA de genomas vegetais em vários centros de pesquisa no mundo são: *Pisum sativum* ($2C=9,09$ pg); *Zea mays* ($2C=5,72$ pg); *Vicia faba* ($2C=26,90$ pg); *Solanum lycopersium* (1,95pg), entre outros (DOLEZEL, 1991).

Sabe-se que variações múltiplas na quantidade de DNA nuclear podem refletir diferentes níveis de ploidia dentro de uma espécie ou de populações (GALBRAITH et al., 2002). Como a citometria de fluxo é bastante rápida e informativa, ela tem sido empregada com êxito na identificação de indivíduos poliploides e mixoploides nos mais diferentes gêneros de plantas, além de contribuir para a validação de procedimentos como os de duplicação cromossômica (CAMPOS, 2007; PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014; GOMES et al., 2014). Do ponto de vista evolutivo, o reconhecimento de poliploides é de grande valia, uma vez que estes podem apresentar alterações na sua composição genética que refletem em incremento da plasticidade fenotípica e/ou amplitude ecológica, pois destacam-se pela habilidade de colonizar ambientes inóspitos, podendo ser pioneiros na ocupação de *habitats* nos quais seus antepassados diploides não obtiveram sucesso (LEVIN, 2002).

Com relação ao melhoramento, a técnica pode ainda auxiliar o melhorista na caracterização de bancos de germoplasma, na identificação das plantas oriundas de cruzamentos interespecíficos, já que a hidridação interespecífica é frequentemente utilizada como uma das estratégias para a transferência de caracteres de interesse de uma espécie para outra. De acordo com os valores intermediários do conteúdo de DNA, a técnica pode detectar híbridos interespecíficos se as espécies parentais apresentarem grande variação da quantidade de DNA nuclear (DOLEZEL, 1997). Tais mensurações são particularmente úteis para determinar hibridismo nos cruzamentos

interespecíficos, bem como em estudos evolutivos para apoiar a identificação de espécies progenitoras em complexos aloploidos. (ARUMUGANATHAN e EARLE, 1991; TUNA et al., 2001; DOLEZEL e BARTOS, 2005; KAUSHAL et al., 2006; SAMOLUK et al., 2015; CHALUP et al., 2014).

Em leguminosas, Samoluk et al (2015) estimaram a quantidade de DNA de espécies do gênero *Arachis*, nas quais os genomas possuem diferentes tipos e organizações. Os valores 2C obtidos variaram de 2.55 a 3.22 pg nos diploides. Entre outros resultados, a comparação dos valores 2C sugeriu que as variações nos conteúdos de DNA eram proporcionalmente distribuídas entre os braços cromossômicos e que a fração heterocromática não foi diretamente envolvida em tais variações. No entanto, a falta de relações significativas com variáveis bioclimáticas no estudo, sugeriu que existem muitos fatores que determinam intrínsecos papéis ecológicos do conteúdo de DNA em diferentes linhagens de seção *Arachis* durante a evolução. Outros autores também vêm utilizando a citometria de fluxo dentro da família pra caracterizar diferentes gêneros (HAVANDA, BRUMMER e DOYLE, 2011; CHALUP et al., 2014).

A técnica favorece também, alguns estudos taxonômicos, como podemos observar no estudo de Naganowska et al (2002), no qual as análises de diferentes espécies de leguminosas do gênero *Lupinus*, resultaram em um agrupamento que sustenta a classificação taxonômica infragenérica geralmente aceita para algumas espécies do grupo, visto que a quantidade de DNA de um clado foi significativamente diferente dos demais.

Dentro do contexto do estudo de plantas forrageiras, a citometria de fluxo tem sido um recurso cada vez mais explorado pelos melhoristas. No Brasil, as espécies de *Brachiaria* mais cultivadas tem sido submetidas à técnica para as mais diversas finalidades. Timbo (2011) obteve genótipos duplicados de *B. ruziziensis* e caracterizou o nível de ploidia obtido, além de indicar um protocolo de citometria mais adequado para a análise de genótipos de *Brachiaria* do programa de melhoramento da Embrapa Gado de Leite.

Stylosanthes é um gênero de importância econômica significativa, sendo objeto de estudo por vários pesquisadores da área de melhoramento. Neste contexto, a citometria de fluxo pode ser útil para monitorar a estabilidade do nível de ploidia, identificar haploides e duplohaploides em culturas de anteras e ovários, verificar novos níveis de ploidia em resultados de cruzamentos, detecção de indivíduos aneuploides,

no estudo da apomixia, identificação do sexo em plantas dioicas, identificação de híbridos, identificação de polissomatia, acompanhamento do desenvolvimento da semente, identificação do produto e fusão de protoplastos. Contudo, atualmente a aplicação mais comum da citometria de fluxo é para análise do nível de ploidia tanto para os programas de melhoramento genético quanto para os de produção de sementes (DOLEZEL, 1997; GALBRAIT et al., 1983; BENNET e LEITCH, 1995).

Considerando a relevância econômica e a escassez de dados envolvendo a caracterização citogenética e citométrica em *Stylosanthes*, justifica-se o presente estudo pela necessidade de ampliar o conhecimento acerca dos aspectos genômicos das espécies a partir de metodologias específicas variadas, o que contribuiria para o entendimento das relações taxonômicas e em futuros estudos relacionados ao melhoramento genético do gênero.

2 OBJETIVOS

Objetivou-se caracterizar citogeneticamente quatro variedades de *S. guianensis* (1463, 1480, 4171 e C.V mineirão) além das espécies *S. hipocampoides*, *S. gracilis*, *S. acuminata* e *S. grandifolia*, que são espécies diploides mais proximamente relacionadas dentro do gênero, empregando técnicas de coloração diferencial nos cromossomos e mapeando regiões específicas por meio da citogenética molecular. Além disso, estimou-se a quantidade de DNA nuclear para tais espécies no gênero. Os objetivos específicos foram:

- a) Caracterizar citogeneticamente os cromossomos por meio de bandeamento DAPI/CMA;
- b) Mapear regiões de DNA ribossomal 5S e 45S por meio da hibridação fluorescente *in situ* (FISH);
- c) Identificar e comparar as possíveis variações genômicas interespecíficas;
- d) Estimar, por citometria de fluxo, o conteúdo de DNA nuclear das diferentes espécies de *Stylosanthes*.

Espera-se que os resultados deste trabalho tenham implicações capazes de contribuir para o entendimento das relações filogenéticas deste grupo que carrega uma história evolutiva e taxonômica controversa, além de permitir que o conhecimento da composição do genoma facilite estudos futuros relacionados a biologia evolutiva, melhoramento genético e diversidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

No presente trabalho foram utilizadas sementes de espécies do gênero *Stylosanthes* (Figura 1) provenientes do banco de germoplasma da empresa Embrapa Cerrados, cedidas pelo pesquisador Dr. Marcelo Ayres. Para as análises citogenéticas foram utilizadas sementes de *S. grandifolia*, *S. acuminata*, *S. gracilis*, *S. hippocampoides* e *S. guianensis*. Foram adicionalmente avaliados quatro variedades de *S. guianensis* (1480, 4171, 1463 e C.V mineirão). O acesso CPAC 4171 pertence ao grupo de acessos elite do programa de melhoramento da Embrapa. Já BRS 1463 e 1480 são linhagens registradas como cultivares. C.V mineirão, por sua vez é um cultivar lançado pela Embrapa em 1995. Há grande similaridade morfológica entre tais espécies e variedades.



Figura 1: Imagens ilustrativas de espécies do gênero *Stylosanthes*. As letras a e b ilustram a espécie *S. guianensis*; as letras c e d ilustram a espécie *S. gracilis*. Fonte: Environmental and Conservation Programs Neotropical Live Plant Photos Site.

3.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CULTIVO

Com o objetivo de quebrar a dormência tegumentar nas sementes de *Stylosanthes*, vários testes foram realizados. Estes testes envolveram diferentes opções de escarificação, que incluíram o uso de ácidos abrasivos sob variados períodos de tempo, imersão em água quente e adição de hormônios variados. Baseado nos resultados, definiu-se o seguinte protocolo: as sementes passaram por processos de escarificação mecânica com a utilização de lixa e imersão em água a 80°C por cinco minutos. Em seguida, foram colocadas para germinar em placas de Petri forradas com papel filtro e banhadas com o hormônio etileno (CEPA 0,1mM) também utilizado para estimular a germinação precoce (Figura 1a). Posteriormente, foram mantidas em câmara de germinação (BOD) com temperatura variando de 18° a 40°C e fotoperíodo de 12h. Das 8:00 h às 10:00h da manhã a temperatura se manteve à 18°C. De 10:00h às 12:00h, 25°C. Já entre 12:00h e 16:00h, a temperatura foi de 40°C, caindo para 25°C a partir das 16:00h e assim permanecendo até às 20:00h. De 20:00h até o dia seguinte, 18°C foram mantidos.

Para o crescimento total das plantas e obtenção de folhas, após o desenvolvimento inicial as plântulas passaram pelo processo de aclimação para adaptação ao solo. O processo de aclimação consistiu na retirada das sementes inicialmente desenvolvidas das placas de Petri e transferência para copos plásticos, contendo terra e Plantmax® como substrato na proporção de 1:1 (Figura 2b e c). Cada copo foi protegido com sacos plásticos para simular mini-estufas propiciando a formação de um microclima favorável ao estabelecimento das plântulas. O material foi mantido em BOD com as mesmas variações de temperatura e fotoperíodo acima mencionados.

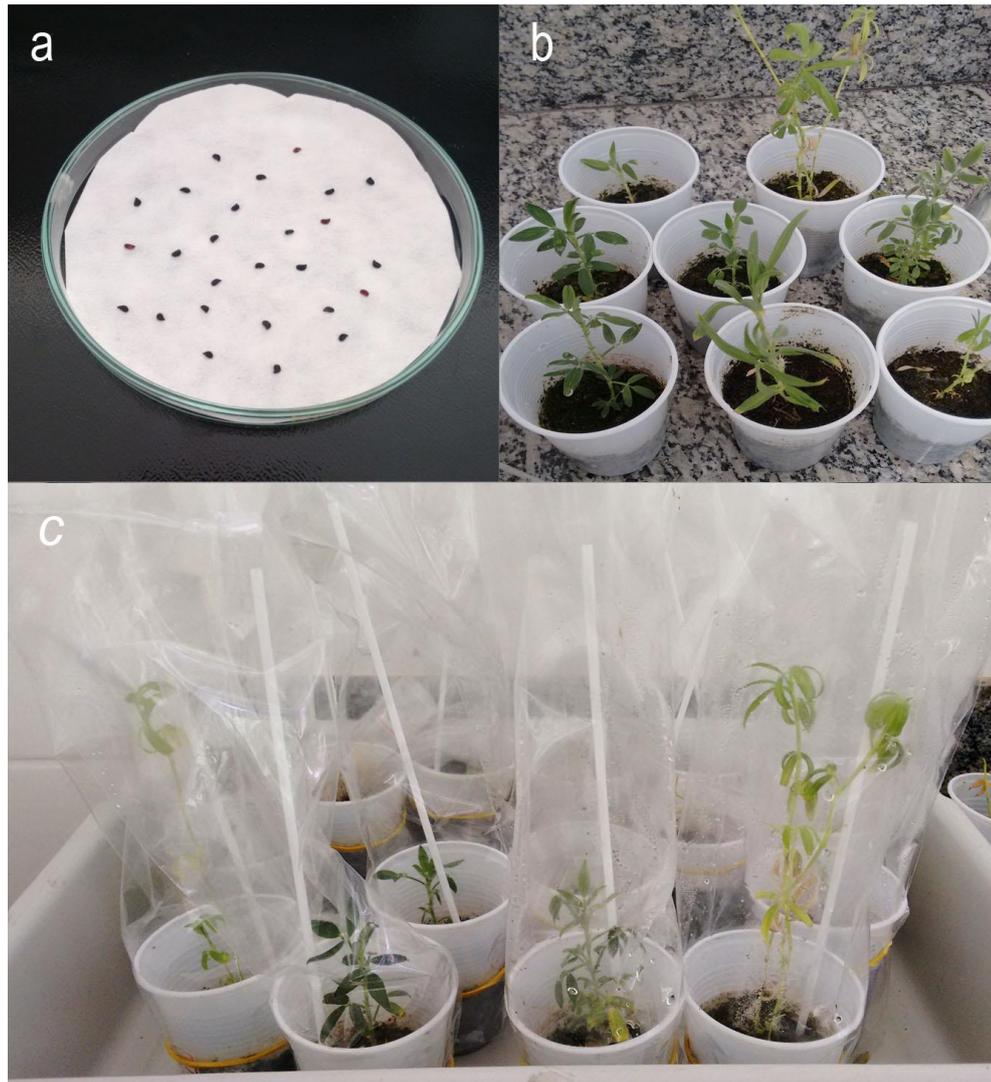


Figura 2: a) Sementes de *Stylosanthes* em placa de Petri; b) Plântulas de *Stylosanthes*; c) Plântulas de *Stylosanthes* em processo de aclimatação.

3.3 ANÁLISE CITOGENÉTICA

3.3.1 PREPARAÇÃO MITÓTICA

Com a finalidade de acessar a região meristemática das raízes, sementes de espécies diploides de *Stylosanthes* foram colocadas em placas de Petri forradas com papel filtro úmido e mantidas em câmara de germinação (BOD) em temperatura variando de 18°C a 40°C até o momento do início da germinação. Após a obtenção das raízes, as mesmas foram coletadas com 1cm de comprimento e tratadas com a solução bloqueadora de 8- hidroxiquinoleína (HQ) na concentração de 2mM à 4°C por um período de 8 horas. Posteriormente, as raízes foram lavadas por 15 minutos em água corrente e por 10 minutos em água destilada, sendo em seguida fixadas em

solução de Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético glacial) e armazenadas em refrigerador por, no mínimo, 24 horas.

As raízes tratadas passaram por lavagens em água destilada e, posteriormente, foram digeridas em solução enzimática (2% Cellulase : 20% Pectinase- Sigma) em estufa a 37°C por 5 horas. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação e secagem ao ar (CARVALHO e SARAIVA, 1993), utilizando os meristemas radiculares previamente digeridos.

3.3.2 MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA

A partir de metáfases representativas foram obtidas medidas de comprimento total dos cromossomos (CT= comprimento do braço curto + comprimento do braço longo) e do comprimento de cada braço dos cromossomos.

Os cromossomos foram ordenados pelo tamanho do braço curto (dispostos do maior braço curto para o menor) e os seguintes parâmetros foram usados: comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo (CT = BL + BC); relação entre braços ($r = BL/BC$); índice centromérico (IC= $BC100/CT$); comprimento relativo do cromossomo (CR = $100CT/CLH$).

Os gráficos para os idiogramas foram construídos no programa Excel e editados no Photoshop 7.0.

3.3.3 BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO

Para a visualização de bandas cromossômicas através da coloração com CMA₃ (cromomicina A₃) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol), foi usado o procedimento descrito por Schweizer (1976). Lâminas envelhecidas por três dias foram inicialmente submersas em HCl, 1M por 10 minutos. Sobre as lâminas secas foram aplicados 30µL de CMA₃. O material foi em seguida coberto com lamínulas plásticas e mantido à temperatura ambiente no escuro por uma hora. Após este período, as lâminas foram lavadas com jatos de água destilada e secas ao ar ainda em ambiente com ausência de luz. Adicionou-se então, 30 µl da solução de distamicina, 0,1 mg/ml, as quais foram incubadas durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram novamente lavadas para a posterior aplicação de 30 µl da solução de DAPI, que agiu por mais 30 minutos no escuro. Decorrido este período, realizou-se uma última lavagem e as

lâminas foram montadas em meio antifade (30 µl). Passados pelo menos 3 dias em refrigerador, o material foi analisado em microscópio com filtro específico para o fluorocromo DAPI (comprimento de onda de 360 a 390 nm) e filtro apropriado para CMA (comprimento de onda de 430 a 480 nm).

3.3.4 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

- Preparo das Sondas

Para o processo de hibridização, bactérias *E. coli* competentes foram transformadas por eletroporação com os plasmídeos vetores contendo as regiões do gene ribossomal 5S e 45S de *Triticum aestivum*. As bactérias transformadas foram multiplicadas em meio de cultura LB contendo ampicilina 100mg/ml *overnight* a 37°C em 180 rpm. As regiões de DNA ribossomal foram extraídas com o kit Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (GE Healthcare) e então marcadas com biotina e digoxigenina por meio da reação de nick translation com os kits BioNick e DigNick (Roche) em termociclador por aproximadamente 35 minutos à 15°C.

Em seguida, as amostras de sonda foram analisadas em corrida de eletroforese em gel de agarose 1%. As sondas que apresentaram fragmentos entre 200 e 500 pares de bases foram estocadas para posteriores hibridizações (Figura 3), e aquelas que possuíam fragmentos maiores que 500pb foram novamente submetidas ao tratamento no termociclador para a obtenção de segmentos de 200 a 500 pb, ideais para a hibridização.

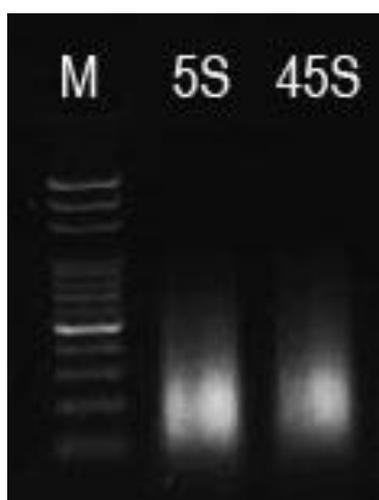


Figura 3: Gel de agarose 1% com marcador de 100 a 1000pb e sondas marcadas de DNAr 5S e 45S, com tamanho ideal de 200 a 500pb.

A seguir serão descritos os detalhes do processo de hibridização in situ fluorescente.

a) Preparação da Mistura de Hibridização

No início do processo preparou-se uma solução de hibridização contendo a sonda de interesse (Tabela 1). A solução contendo a sonda foi centrifugada brevemente e colocada no gelo até a aplicação nas lâminas.

Tabela 1. Reagentes e concentrações do mix de hibridização do primeiro dia da FISH.

Componentes	Concentração
Formamida DEIONIZADA 100%	10 μ L
Dextran sulfato 50%	4 μ L
20 x SSC	2 μ L
Sonda	1 μ L
Água MILIQ	2 μ L

b) Desnaturação dos cromossomos

Foram aplicados 100 μ L de formamida 70% / 2x SSC diretamente nos cromossomos que foram cobertos por lamínulas de parafilme de 22x40mm e mantidos em estufa (80-85°) por 1,5 minuto para desnaturação. Imediatamente as lâminas foram retiradas da estufa e imersas em etanol 70% gelado por 5 minutos e depois em etanol 90% e 100% por mais 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram secas ao ar.

c) Desnaturação da sonda

A solução contendo a sonda foi aquecida a 90°C por 10 minutos. Em seguida, foi imersa no gelo e agitada brevemente antes de ser utilizada.

d) Hibridização

Foram adicionados 19 μ L da solução contendo a sonda desnaturada em cada lâmina e cobriu-se com lamínula de vidro (24x32mm). Para a hibridização, a lâmina foi colocada em uma câmara úmida a 37°C por vinte e quatro horas.

No segundo dia, antes de iniciar os procedimentos realizou-se um pré-aquecimento de um recipiente banho maria contendo 2X SSC a 42°C.

e) Banhos pós hibridização

Após vinte e quatro horas, as lâminas foram removidas da câmara úmida e mergulhadas em um banho com solução de 2x SSC, onde as lamínulas se soltaram naturalmente. Assim, as lâminas foram lavadas uma vez por 5min com 2x SSC; uma vez por 5 min, com 2x SSC a 42°C e uma vez por 5min com 1x PBS.

f) Detecção dos sinais de hibridização através de anticorpos (Digoxigenina e Biotina)

Em um ambiente escuro foram misturados por lâmina 20 µL de 5x TNB Buffer, 80µL de ddH₂O, 1µL de Rhodamina anti-DIG e 1µL de TRITC acoplado a Streptavidina. Aplicou-se 100µL por lâmina da solução contendo o anticorpo, cobrindo-se em seguida com lamínula. As lâminas foram incubadas em uma câmara úmida e escura a 37°C por 1 hora. Em seguida, as mesmas foram lavadas três vezes por 5 min em solução TNT 1x. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS 1x sendo finalmente aplicado o Vectashield/DAPI (aproximadamente 20µL por lâmina).

As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX53. Figuras representativas de cada espécie foram fotografadas e editadas no programa Photoshop 7.0 para pseudocolorizar uma das sondas utilizadas e melhorar o contraste das marcas. Todas as sondas aplicadas (5S e 45S) foram coradas com fluorocromos vermelhos. A coloração da sonda 45S foi alterada pelo programa de edição de imagem por meio de pseudocoloração para a cor verde com o objetivo de obter uma melhor diferenciação na representação entre as localizações das duas sondas.

3.3.5 ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para estimar a quantidade de DNA, tecidos foliares das espécies de *Stylosanthes* foram macerados juntamente ao tecido foliar do padrão interno de referência (*Pisum sativum*) com auxílio de uma lâmina de bisturi em placa de Petri contendo 1mL do tampão WPB gelado a fim de liberar os núcleos em suspensão (DOLEZEL et al., 1989). O tecido macerado foi aspirado através de duas camadas de gaze com auxílio de uma pipeta plástica e posteriormente filtrado em uma malha de 50 µm sendo coletado em um tubo de poliestireno. A coloração dos núcleos foi

realizada pela adição de 50 µL de uma solução de 1 mg/mL de iodeto de propídeo (IP) à suspensão. Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados usando uma escala logarítmica. As amostras foram feitas em triplicata para cada espécie e foi considerado o valor médio entre as análises. A análise foi realizada no citômetro FacsCanto II e os histogramas foram obtidos por meio do programa Flowing software 2.5 (<http://www.uskonaskel.fi/flowingsoftware/>). O conteúdo de DNA em picogramas (pg) foi estimado como mostrado a seguir:

$$2C = \frac{\text{G1 da espécie estudada}}{\text{G1 do padrão}} \times \text{quantidade de DNA do padrão interno}$$

Onde:

2C = quantidade de DNA nuclear da amostra (pg)

G1 da espécie estudada = posição do pico G1 da amostra

G1 do padrão = posição do pico G1 de *Pisum sativum*

Para verificar as diferenças nas médias das quantidades de DNA das variedades de *S. guianensis*, foi realizada análise de variância ANOVA seguida de teste de Scott Knott a 5% de significância por meio do programa computacional Genes (CRUZ, 2013).

4 RESULTADOS

4.1 MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA

As metáfases analisadas apresentaram número cromossômico $2n=20$ para todos os acessos de *S. guianensis*, bem como para *S.hipocampoides*, *S. gracilis*, *S. grandifolia* e *S. acuminata*. Cerca de trinta metáfases foram analisadas em cada espécie e as cinco mais representativas foram escolhidas para serem medidas.

Com relação ao complexo *S. guianensis*, na variedade C.V mineirão, o comprimento médio dos cromossomos variou de 2,12 μm (cromossomo 10) a 3,72 μm (cromossomo 2). Já o comprimento relativo dos mesmos ficou entre 6,63% (cromossomo 10) e 11,64 % (cromossomo 2), valores que se relacionam com o comprimento total do lote haploide. Detalhes dos dados morfométricos podem ser observados na Tabela 2.

Na variedade 4171 o tamanho variou de 1,73 μm a 3,4 μm , nos cromossomos 10 e 1 respectivamente, representando 6,40% e 12,60 % do comprimento total (Tabela 3). Esta variedade apresentou porções cromossômicas extras que seriam prováveis satélites distendidos, cujo número variou entre zero, um e dois entre as metáfases analisadas representando aproximadamente 2% do genoma. Em 1463, foi possível observar que o menor par apresentou 1,40 μm (cromossomo 10) e o maior 3,77 μm (cromossomo 2) (Tabela 4). Já a variedade 1480 mostrou o menor par com 1,62 μm (cromossomo 10 com 5,84% referente ao comprimento relativo) e o maior com 3,25 (11,73% no cromossomo 2) e, apresentou três pares de cromossomos submetacêntricos, sendo todos os outros classificados como metacêntricos (Tabela 5). Idiogramas representativos das variedades de *S. guianensis* podem ser vistos na figura 10, onde os cromossomos foram dispostos em ordem decrescente de braço curto.

Em *S. hipocampoides*, os comprimentos variaram de 1,88 μm (cromossomo 10) a 3,00 μm (cromossomo 1), possuindo três pares de cromossomos submetacêntricos (Tabela 6). Em *S. gracilis* houve variação entre 1,31 μm e 3,04 μm representando 5,36% a 12,42% no comprimento relativo (Tabela 7). *S. acuminata* apresentou cromossomos com tamanhos entre 1,70 μm (cromossomo 10) e 3,15 μm (cromossomo 5), que corresponderam a 5,82 % e 9,58% de comprimento relativo respectivamente. Nesta espécie, ocorreu a presença de uma constrição secundária

no cromossomo 7 (Tabela 8). Já em *S. grandifolia*, o menor par cromossômico apresentou 1,57 μm (cromossomo 10) correspondendo a 7,25% do lote haploide total. O maior par com 2,53 μm apresentou comprimento relativo de 11,69 % (Tabela 9). Idiogramas representativos destas espécies podem ser vistos na figura 7, onde os cromossomos foram dispostos em ordem decrescente de braço curto.

Tabela 2. Morfometria cromossômica de *S. guianensis* cultivar C.V mineirão

Crom	BC (μm)	BL (μm)	CT (μm)	R	IC	CR (%)	Classe
1	1,62	1,80	3,41	1,11	47,40	10,67	M
2	1,49	2,23	3,72	1,49	40,09	11,64	M
3	1,48	2,00	3,48	1,36	42,45	10,86	M
4	1,41	2,08	3,49	1,48	40,29	10,90	M
5	1,30	1,35	2,65	1,04	49,06	8,28	M
6	1,25	2,03	3,28	1,63	38,03	10,25	M
7	1,22	1,60	2,82	1,31	43,34	8,80	M
8	1,16	2,26	3,42	1,94	33,97	10,70	SM
9	1,10	2,51	3,60	2,29	30,40	11,26	SM
10	0,78	1,34	2,12	1,71	36,87	6,63	SM
CLH=			31,99				

Comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo (CT = BL + BC); relação entre braços ($r = \text{BL}/\text{BC}$); índice centromérico (IC= $\text{BC}100/\text{CT}$); comprimento relativo do cromossomo (CR = $100\text{CT}/\text{CLH}$); metacêntrico (M); submetacêntrico (SM).

Tabela 3. Morfometria cromossômica de *S. guianensis* 4171

Crom	BC (μm)	BL (μm)	CT (μm)	R	IC	CR (%)	Classe
1	1,43	1,98	3,40	1,38	41,95	12,60	M
2	1,27	1,84	3,11	1,45	40,85	11,51	M
3	1,22	1,61	2,83	1,32	43,16	10,49	M
4	1,10	1,50	2,60	1,36	42,31	9,63	M
5	1,17	2,07	3,23	1,77	36,13	11,98	SM
6	0,99	1,33	2,31	1,34	42,65	8,57	M
7	0,94	1,38	2,31	1,47	40,50	8,57	M
8	0,84	1,44	2,29	1,71	36,89	8,47	SM
9	0,80	1,63	2,43	2,04	32,87	8,99	SM
10	0,63	1,10	1,73	1,75	36,30	6,40	M
s1	0,54		0,54			2,00	
s2	0,55		0,55			2,04	
CLH=			27,34				

Comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo (CT = BL + BC); relação entre braços ($r = \text{BL}/\text{BC}$); índice centromérico (IC= $\text{BC}100/\text{CT}$); comprimento relativo do cromossomo (CR = $100\text{CT}/\text{CLH}$); metacêntrico (M); submetacêntrico (SM); satélites (s1 e s2)

Tabela 4. Morfometria cromossômica de *S. guianensis* 1463

Crom	BC (μm)	BL (μm)	CT (μm)	R	IC	CR (%)	Classe
1	1,76	1,99	3,75	1,13	46,88	11,73	M
2	1,55	2,21	3,77	1,43	41,22	11,77	M
3	1,38	2,33	3,72	1,69	37,20	11,63	M
4	1,29	2,17	3,46	1,69	37,24	10,80	M
5	1,28	1,46	2,74	1,15	46,61	8,56	M
6	1,24	2,17	3,41	1,75	36,32	10,66	SM
7	1,09	2,07	3,16	1,90	34,54	9,87	SM
8	0,97	2,26	3,23	2,32	30,11	10,10	SM
9	0,90	2,33	3,23	2,58	27,96	10,09	SM
10	0,56	0,83	1,40	1,48	40,27	4,37	M
CLH=	31,86						

Comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo (CT = BL + BC); relação entre braços ($r = \text{BL}/\text{BC}$); índice centromérico (IC= $\text{BC}100/\text{CT}$); comprimento relativo do cromossomo (CR = $100\text{CT}/\text{CLH}$); metacêntrico (M); submetacêntrico (SM).

Tabela 5. Morfometria cromossômica de *S. guianensis* 1480.

Crom	BC (μm)	BL (μm)	CT (μm)	R	IC	CR (%)	Classe
1	1,38	1,87	3,25	1,36	42,32	11,73	M
2	1,25	1,82	3,07	1,46	40,72	11,09	M
3	1,22	1,79	3,01	1,46	40,67	10,86	M
4	1,21	1,70	2,91	1,41	41,43	10,50	M
5	1,11	2,12	3,23	1,90	34,47	11,67	SM
6	1,06	1,43	2,49	1,36	42,42	8,99	M
7	1,00	2,11	3,11	2,11	32,17	11,24	SM
8	0,95	1,60	2,55	1,69	37,19	9,21	M
9	0,81	1,70	2,51	2,10	32,25	9,05	SM
10	0,67	0,95	1,62	1,41	41,50	5,84	M
CLH=	27,75						

Comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo (CT = BL + BC); relação entre braços ($r = \text{BL}/\text{BC}$); índice centromérico (IC= $\text{BC}100/\text{CT}$); comprimento relativo do cromossomo (CR = $100\text{CT}/\text{CLH}$); metacêntrico (M); submetacêntrico (SM).

Tabela 6. Morfometria cromossômica de *S. hippocampoides*

Crom	BC (μm)	BL (μm)	CT (μm)	R	IC	CR (%)	Classe
1	1,33	1,68	3,00	1,27	44,12	11,33	M
2	1,25	1,69	2,94	1,36	42,45	11,10	M
3	1,13	1,79	2,92	1,59	38,63	11,02	M
4	1,11	1,72	2,83	1,56	39,13	10,68	M
5	1,10	1,49	2,59	1,36	42,34	9,76	M
6	1,07	1,50	2,57	1,41	41,53	9,69	M
7	1,02	1,75	2,77	1,71	36,83	10,46	SM
8	0,96	1,81	2,77	1,88	34,73	10,45	SM
9	0,84	1,41	2,25	1,69	37,22	8,49	M
10	0,66	1,22	1,88	1,85	35,04	7,09	SM
CLH=	26,52						

Comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo (CT = BL + BC); relação entre braços ($r = \text{BL}/\text{BC}$); índice centromérico (IC= $\text{BC}100/\text{CT}$); comprimento relativo do cromossomo (CR = $100\text{CT}/\text{CLH}$); metacêntrico (M); submetacêntrico (SM).

Tabela 7. Morfometria cromossômica de *S. gracilis*

Crom	BC (μm)	BL (μm)	CT (μm)	R	IC	CR (%)	Classe
1	1,31	1,73	3,04	1,32	43,16	12,42	M
2	1,13	1,71	2,84	1,52	39,69	11,61	M
3	1,05	1,59	2,64	1,53	39,59	10,81	M
4	1,02	1,58	2,60	1,56	39,08	10,63	M
5	0,99	1,71	2,70	1,73	36,62	11,06	SM
6	0,91	1,56	2,47	1,72	36,79	10,13	SM
7	0,87	1,76	2,63	2,04	32,91	10,76	SM
8	0,83	1,27	2,10	1,53	39,50	8,58	M
9	0,74	1,38	2,12	1,87	34,79	8,67	SM
10	0,58	0,73	1,31	1,26	44,29	5,36	M
CLH=	24,44						

Comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo (CT = BL + BC); relação entre braços ($r = \text{BL}/\text{BC}$); índice centromérico (IC= $\text{BC}100/\text{CT}$); comprimento relativo do cromossomo (CR = $100\text{CT}/\text{CLH}$); metacêntrico (M); submetacêntrico (SM).

Tabela 8. Morfometria cromossômica de *S. acuminata*

Crom	BC (μm)	BL (μm)	CT (μm)	R	IC	CR (%)	Classe
1	1,28	1,52	2,80	1,19	45,76	10,92	M
2	1,24	1,70	2,94	1,37	42,21	11,44	M
3	1,08	1,66	2,74	1,53	39,45	10,66	M
4	1,09	1,87	2,96	1,71	36,89	11,51	SM
5	1,05	2,10	3,15	2,00	33,39	12,25	SM
6	1,00	1,60	2,60	1,60	38,54	10,11	M
7	0,97	1,40	2,37	1,45	40,76	9,22	M
8	0,84	1,71	2,54	2,04	32,94	9,90	SM
9	0,74	1,16	1,90	1,58	38,74	7,39	M
10	0,69	1,01	1,70	1,47	40,56	6,60	M
CLH=			25,67				

Comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo (CT = BL + BC); relação entre braços ($r = \text{BL}/\text{BC}$); índice centromérico (IC= $\text{BC}100/\text{CT}$); comprimento relativo do cromossomo (CR = $100\text{CT}/\text{CLH}$); metacêntrico (M); submetacêntrico (SM); * presença de constrição secundária.

Tabela 9. Morfometria cromossômica de *S. grandifolia*

Crom	BC (μm)	BL (μm)	CT (μm)	R	IC	CR (%)	Classe
1	1,00	1,43	2,43	1,44	41,03	11,21	M
2	0,95	1,18	2,13	1,25	44,48	9,85	M
3	0,85	0,97	1,82	1,14	46,70	8,41	M
4	0,87	1,27	2,14	1,46	40,61	9,91	M
5	0,82	1,14	1,95	1,40	41,74	9,03	M
6	0,85	1,68	2,53	1,98	33,53	11,69	SM
7	0,79	1,38	2,16	1,75	36,42	10,00	SM
8	0,76	1,72	2,47	2,27	30,57	11,42	SM
9	0,74	1,70	2,44	2,28	30,46	11,27	SM
10	0,66	0,91	1,57	1,38	41,95	7,25	M
CLH=			21,63				

Comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo (CT = BL + BC); relação entre braços ($r = \text{BL}/\text{BC}$); índice centromérico (IC= $\text{BC}100/\text{CT}$); comprimento relativo do cromossomo (CR = $100\text{CT}/\text{CLH}$); metacêntrico (M); submetacêntrico (SM).

4.2 LOCALIZAÇÃO DE BANDAS CMA/DAPI

Durante este trabalho, a técnica de bandeamento cromossômico com fluorocromos CMA/DAPI foi aplicada pela primeira vez no genoma de *S.hipocampoides*, *S. gracilis*, *S. grandifolia*, *S. acuminata*, *S. aurea* e em quatro acessos de *S. guianensis* (C.V mineirão, 1480, 1463 e 4171).

Em *S. hipocampoides* e *S. gracilis*, duas marcas CMA⁺ foram identificadas no menor par cromossômico em região terminal do braço curto (Figura 4b,f). Já *S. grandifolia* e *S. acuminata* apresentaram quatro marcas, sendo que duas delas, também se encontraram no menor par cromossômico em região terminal e as outras duas localizaram-se em região proximal em um par de cromossomos maiores (Figura 4d, h).

Com relação aos acessos de *S. guianensis*, foi possível observar duas marcas ricas em CG em 1480, 1463 e 4171 (Figura 5b,d,f) enquanto o acesso C.V mineirão apresentou quatro marcas (Figura 5h). A presença das marcas no menor par cromossômico também esteve presente nesta espécie.

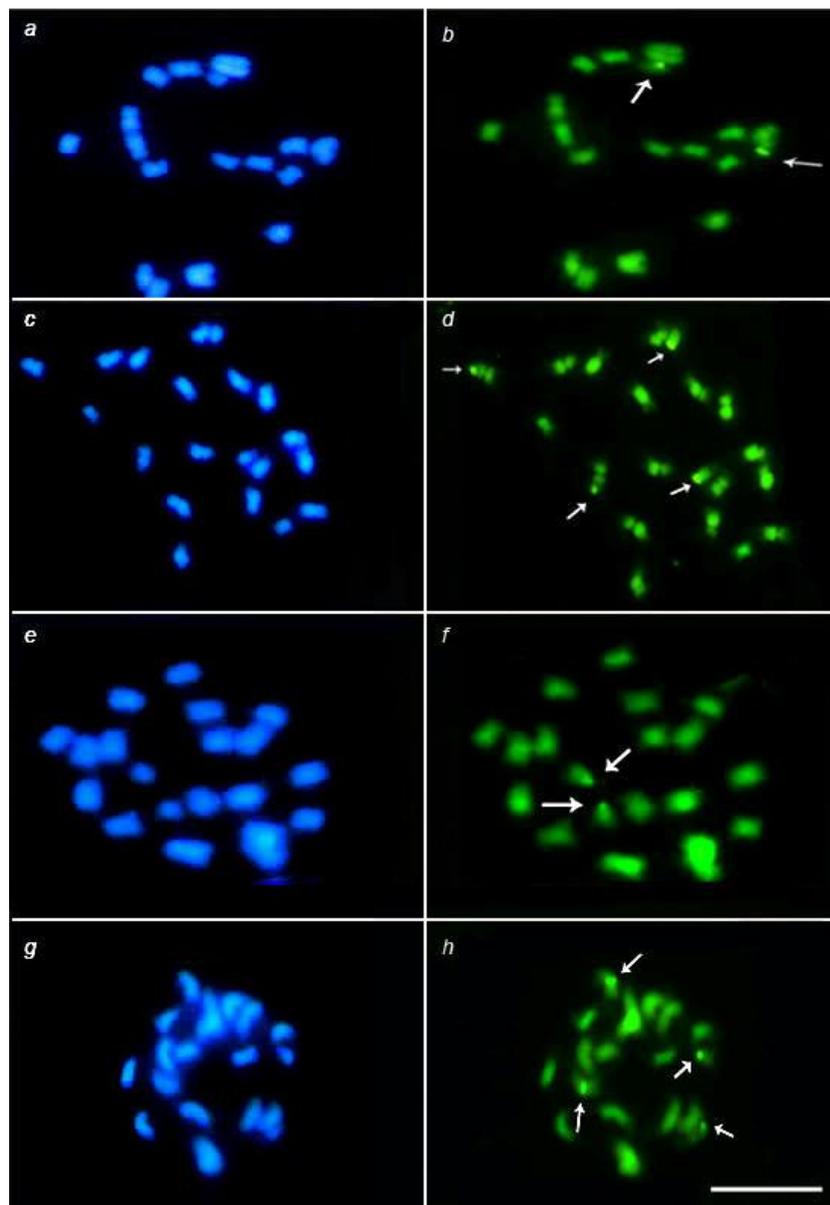


Figura 4: Bandeamento DAPI/CMA em espécies de *Stylosanthes*. a) metáfase de *S. hippocampoides* corada com DAPI b) metáfase com duas marcas CMA⁺ c) metáfase de *S. acuminata* corada com DAPI d) metáfase com duas marcas CMA⁺ e) metáfase de *S. gracilis* corada com DAPI f) metáfase com duas marcas CMA⁺ g) metáfase de *S. grandifolia* corada com DAPI h) metáfase com quatro marcas CMA⁺. Barra 5 μ m.

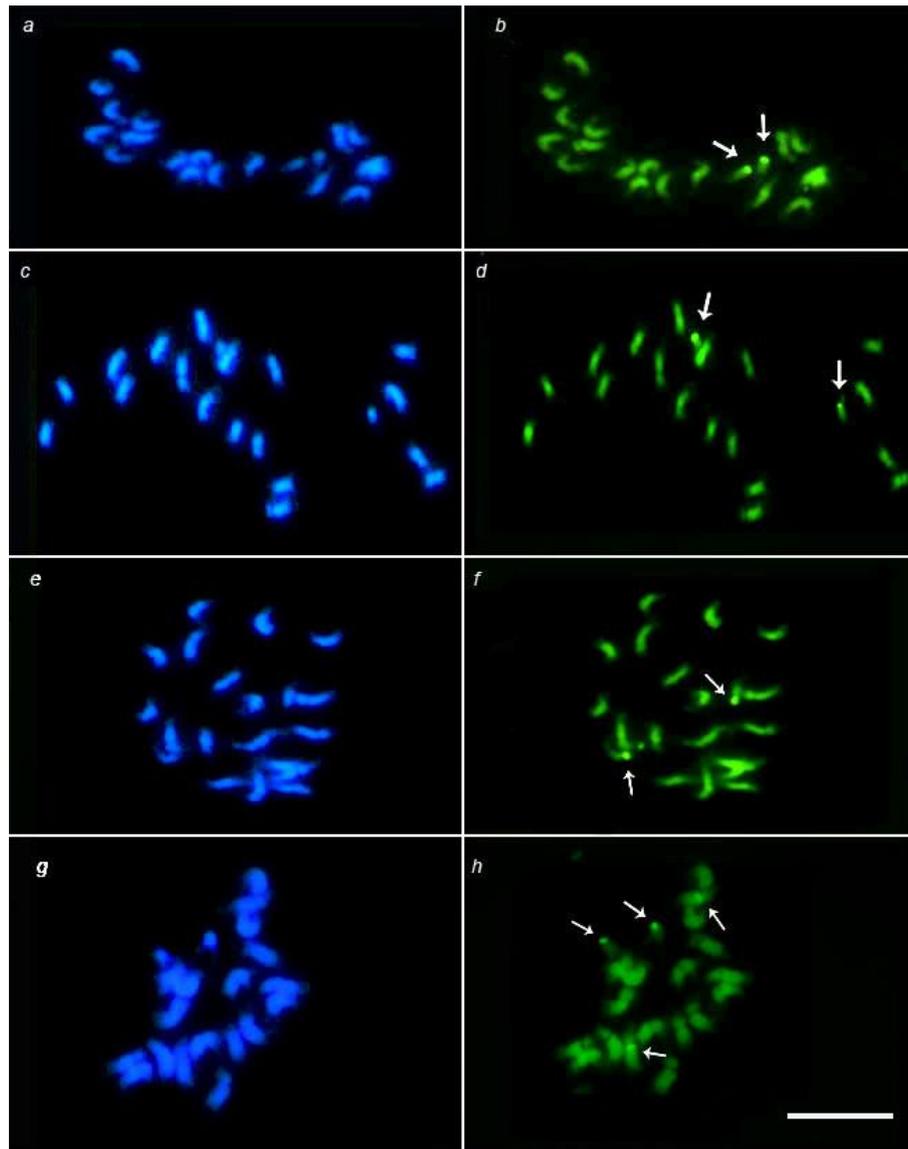


Figura 5: Bandeamento DAPI/CMA em espécies de *Stylosanthes*. a) metáfase de *S. guianensis* acesso 1480 corada com DAPI b) metáfase com duas marcas CMA⁺ c) metáfase de *S. guianensis* acesso 1463 corada com DAPI d) metáfase com duas marcas CMA⁺ e) metáfase de *S. guianensis* 4171 corada com DAPI f) metáfase com duas marcas CMA⁺ g) metáfase de *S. guianensis* C.V mineirão corada com DAPI h) metáfase com quatro marcas CMA⁺. Barra 5 μ m.

4.3 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU*

Com relação a hibridização *in situ*, *S. hippocampoides*, *S. gracilis* e *S. grandifolia*, apresentaram dois sítios de DNAr 5S e dois 45S (Figura 6). Nas três espécies, as marcas 5S se localizaram em região intersticial no cromossomo e as marcas 45S, por sua vez foram encontradas em região terminal do menor par cromossômico. Já a espécie *S. acuminata*, apresentou duas marcas 5S, mas se diferenciou das demais por apresentar quatro sítios de DNAr 45S, nos quais dois deles também foram observados no menor par cromossômico. Idiogramas representativos podem ser vistos na figura 7.

Nas diferentes variedades de *S. guianensis*, foi possível observar dois sítios de DNAr 5S e dois 45S em C.V mineirão, 1463 e 1480 (Figura 8). Porém, em 4171 o número de marcas 45S variou entre dois, três e quatro nas duas variedades. Basicamente o número mais recorrente foi o de duas marcas encontradas no menor par cromossômico, que continuaram presentes nesta localização mesmo nas metáfases que apresentaram variações. O número adicional de marcas que ocasionalmente foram identificadas, encontravam-se em porções menores extras de cromossomos, prováveis satélites distendidos que são identificados de maneira irregular entre as metáfases encontradas (Figura 9). Idiogramas representativos podem ser vistos na figura 10.

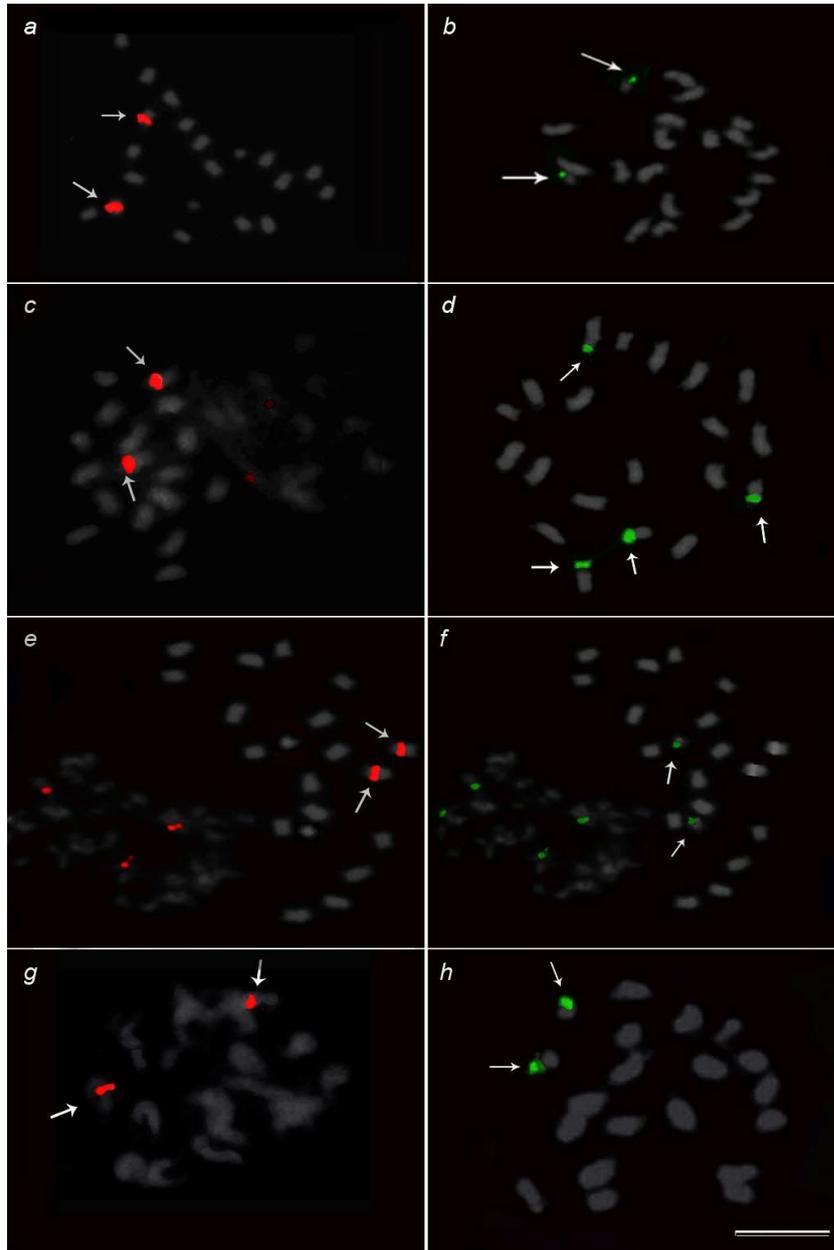


Figura 6: Localização da sondas de DNAr 5S e 45S em espécies de *Stylosanthes* por hibridização *in situ* fluorescente. a) Metáfase de *S. hippocampoides* com dois sítios de DNAr 5S marcados b) Metáfase de *S. hippocampoides* com dois sítios de DNAr 45S c) Metáfase de *S. acuminata* com dois sítios de DNAr 5S marcados d) Metáfase de *S. acuminata* com quatro sítios de DNAr 45S marcados e) Metáfase de *S. grandifolia* com dois sítios de DNAr 5S marcados f) Metáfase de *S. grandifolia* com dois sítios de DNAr 45S marcados g) Metáfase de *S. gracilis* com dois sítios de DNAr 5S marcados h) Metáfase de *S. gracilis* com dois sítios de DNAr 5S marcados. Barra 10 µm.

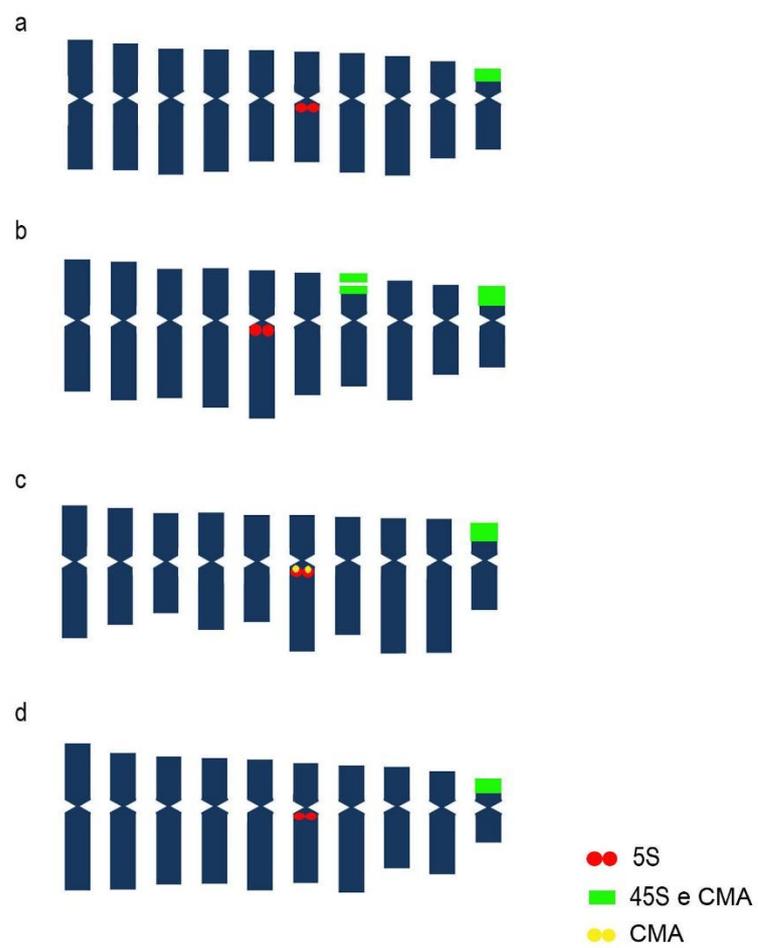


Figura 7: Idiogramas representativos da FISH em espécies de *Stylosanthes*. Os cromossomos estão dispostos em ordem decrescente de braço curto. a) *S. hippocampoides* b) *S. acuminata* c) *S. grandifolia* d) *S. gracilis*. Barra 1,5 μ m.

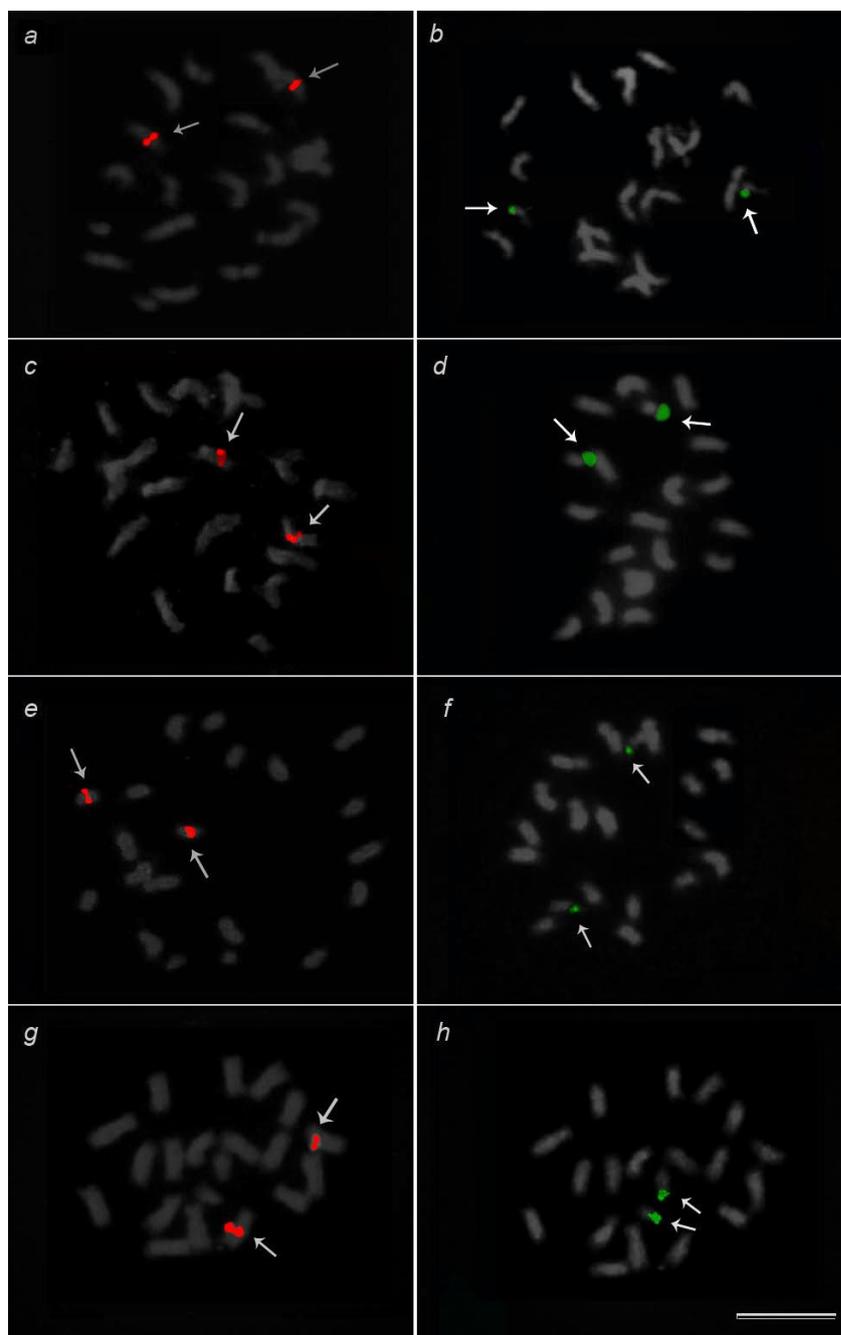


Figura 8: Localização das sondas de DNAr 5S e 45S em acessos de *S. guianensis* por hibridização in situ fluorescente a) Metáfase de 1463 com dois sítios de DNAr 5S marcados b) Metáfase de 1463 com dois sítios de DNAr 45S marcados c) Metáfase de 1480 com dois sítios de DNAr 5S marcados d) Metáfase de 1480 com dois sítios de DNAr 45S marcados e) Metáfase de 4171 com dois sítios de DNAr 5S marcados f) Metáfase de 4171 com dois sítios de DNAr 45S marcados g) Metáfase de C.V mineirão com dois sítios de DNAr 5S marcados h) Metáfase de C.V mineirão com dois sítios de DNAr 45S marcados. Barra 10 μ m.

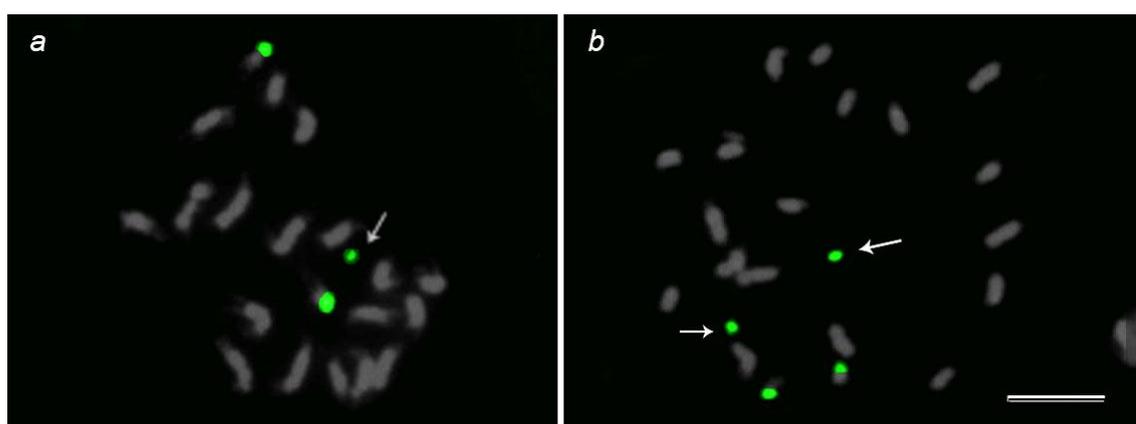


Figura 9: Localização da sonda de DNAr 45S na variedade 4171 de *S. guianensis* a) Metáfase com um satélite identificado com sítio de DNAr 45S b) Metáfase com dois satélites identificados com sítio de DNAr 45S. Barra 10 μm .

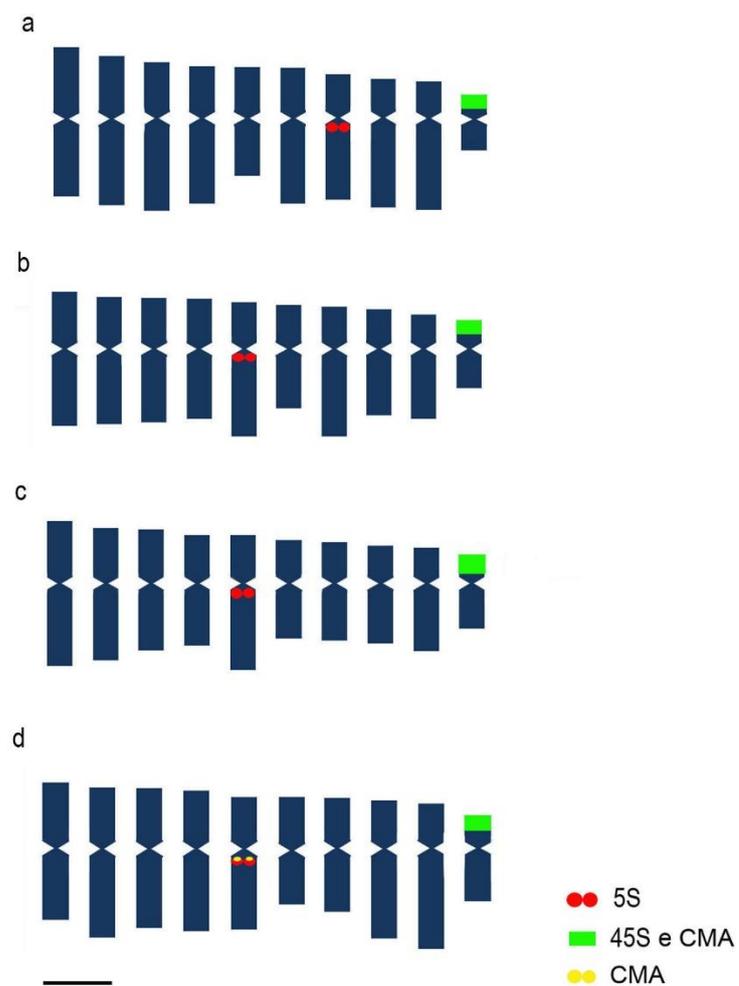


Figura 10: Idiogramas representativos da FISH em diferentes variedades de *S. guianensis*. Os cromossomos estão dispostos em ordem decrescente de braço curto. a) 1463 b) 1480 c) 4171 d) C.V mineirão. Barra 1,5 μ m.

4.4 CITOMETRIA DE FLUXO

Tecidos foliares de acessos de *Stylosanthes* cultivados em BOD por processo de aclimação foram utilizados para a realização da análise de citometria de fluxo. As análises foram realizadas em *S.hipocampoides*, *S.gracilis*, *S. grandifolia*, e em quatro variedades de *S. guianensis* (4171, 1480, 1463 e C.V mineirão).

A análise da intensidade de fluorescência relativa de núcleos isolados de folhas jovens produz um histograma com um pico dominante que corresponde aos núcleos que se encontram na fase G₁ do ciclo celular e um pico menor que corresponde aos núcleos na fase G₂. Para estimar o nível de ploidia, a posição do pico G₁ de um histograma foi comparado com o pico de uma planta padrão com um nível de ploidia conhecido (DOLEŽEL, 1997). No presente trabalho, *Pisum sativum* (9,09 pg) foi o padrão de referência que melhor se adequou às amostras, visto que a sua quantidade de DNA propiciou que uma melhor estimativa fosse realizada. Com relação à escolha do tampão, testes prévios foram realizados com WPB.

Dentre as espécies analisadas, *S. gracilis* apresentou uma média de 2,50 pg (Figura 11a) de DNA e o coeficiente de variação dos picos G₀/G₁ foi de 4,48 %. Esse parâmetro é considerado importante para a validação das estimativas por muitos autores, que consideram satisfatórios valores de CV menores que 5%. Neste caso, considera-se que as amostras tenham alto nível de resolução e indicam que o preparo das suspensões nucleares permitiu a obtenção de núcleos intactos e com coloração uniforme (GALBRAITH et al., 2002; DOLEŽEL e BARTOS, 2005; PRAÇA-FONTES et al., 2011). Já *S. hipocampoides* foi caracterizado com 2,53 pg de DNA (cv 3,85%). *S. grandifolia*, por sua vez, apresentou 2,4 pg de DNA (cv 4,21%, figura 11 c). Devido à indisponibilidade de tecido foliar, a quantidade de DNA de *S. acuminata* foi estimada por meio de um “pool” de 4 sementes, apresentando 2,19 pg (cv 4,19 %, figura 11d).

Com relação às diferentes variedades de *S. guianensis*, observou-se respectivamente 2,80; 3,07, 2,81 e 3,02 pg de DNA para as cultivares C.V mineirão, 4171, 1463 e 1480. Histogramas representativos das estimativas e os respectivos coeficientes de variação podem ser vistos na figura 12.

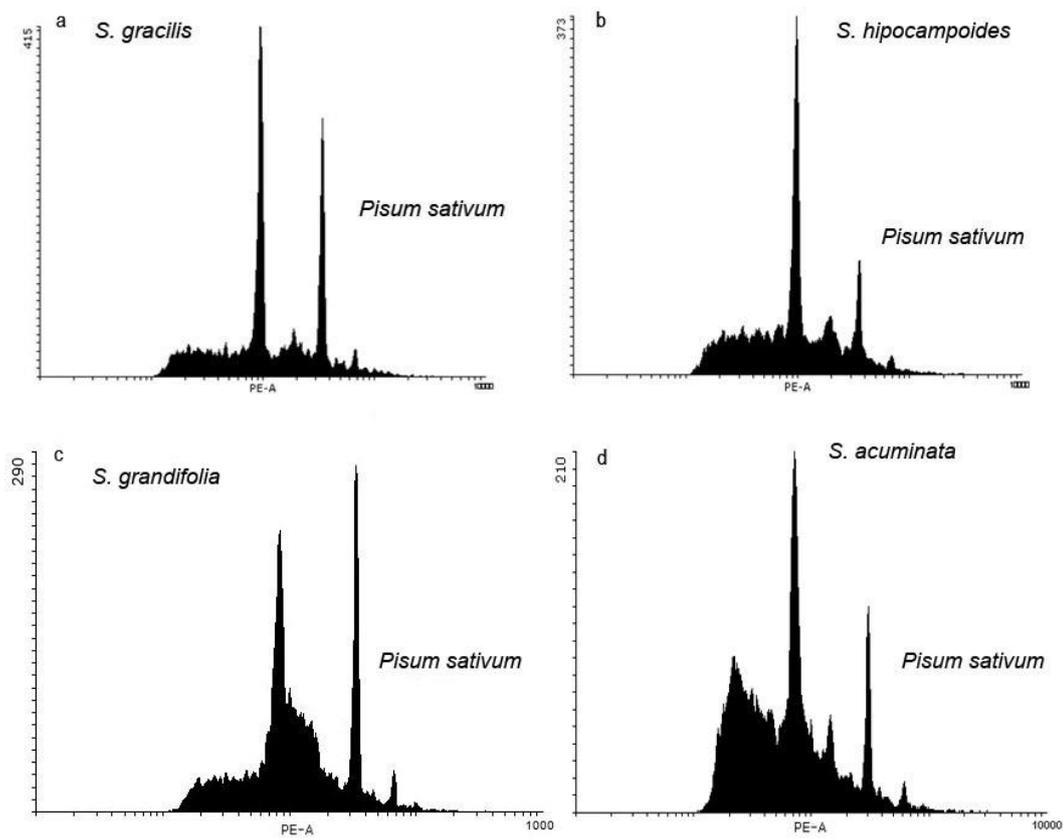


Figura 11: Histogramas representativos da estimativa da quantidade de DNA estimada por citometria de fluxo de espécies de *Stylosanthes*, sendo a ervilha (*Pisum sativum*) utilizada como padrão de referência. a) *S. gracilis* com 2,50 pg de DNA, CV de 4,48% b) *S. hippocampoides* com 2,53 pg de DNA, CV de 3,85% c) *S. grandifolia* com 2,4 pg de DNA, CV de 4,21% d) *S. acuminata* com 2,19 pg de DNA C.V de 4,19%.

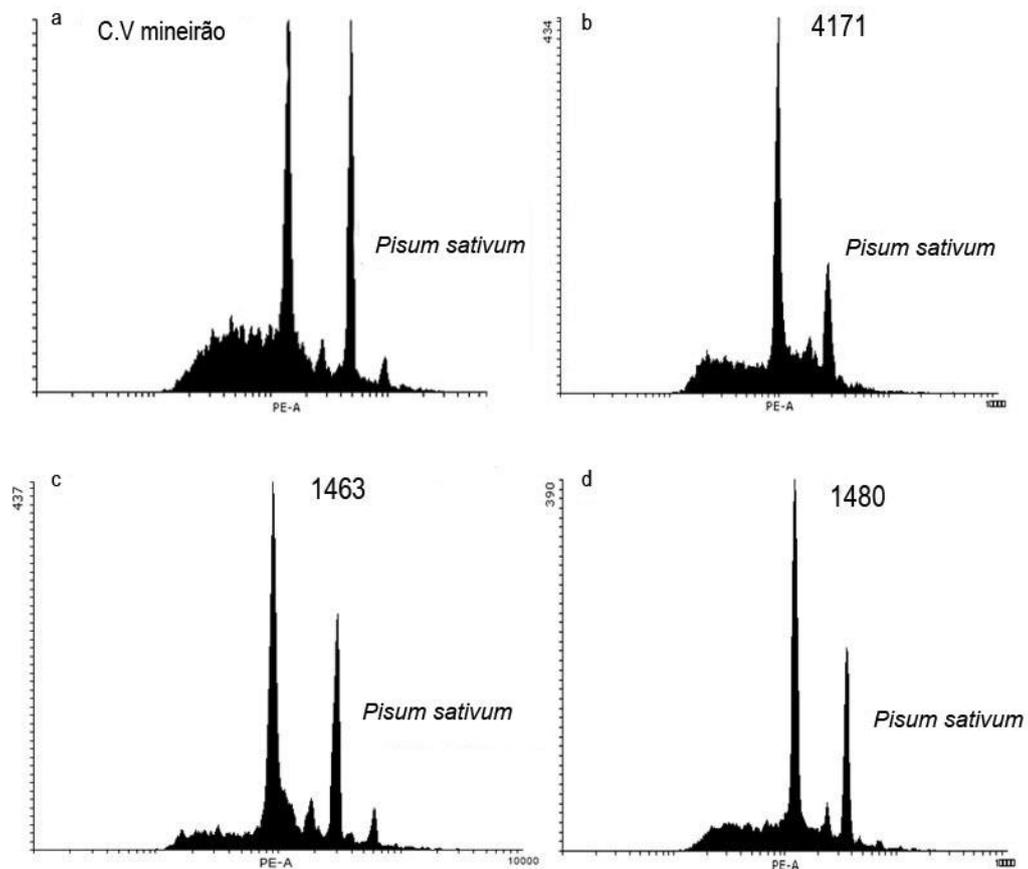


Figura 12: Histogramas representativos da estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo de acessos de *S. guianensis*, sendo a ervilha (*Pisum sativum*) utilizada como padrão de referência a) C.V. mineirão com 2,80 pg de DNA, CV 3,06% b) 4171 com 3,07 pg de DNA, CV 4,11% c) 1463 com 2,81 pg de DNA, CV 4,66% d) 1480 com 3,02 pg de DNA, CV 3,48%.

Para verificar as diferenças das médias das quantidades de DNA entre as variedades de *S. guianensis*, realizou-se análise de variância ($F=44.28$; $p<0,01$) e posteriormente o teste de agrupamento de Scott Knott a 5% de nível de significância. Não foi encontrada diferença significativa entre as médias.

A tabela 10 a seguir apresenta um resumo de todos os dados obtidos para as espécies estudadas no presente trabalho. Estão representados o número de cromossomos, o valor médio da quantidade de DNA e os marcadores cromossômicos em *Stylosanthes*.

Tabela 10. Dados citogenéticos de espécies de *Stylosanthes*

Espécie	n° crom.	Valor DNA 2C (pg)	Marcadores cromossômicos		
			CMA+	DNAr 5S	DNAr 45S
<i>S. hippocampoides</i>	2n=20	2,53	2	2	2
<i>S. acuminata</i>	2n=20	2,19	4	2	4
<i>S. gracilis</i>	2n=20	2,5	2	2	2
<i>S. grandifolia</i>	2n=20	2,4	4	2	2
<i>S. guianensis</i> var. 1480	2n=20	3,02	2	2	2
<i>S. guianensis</i> var. 1463	2n=20	2,81	2	2	2
<i>S. guianensis</i> var. 4171	2n=20	3,07	2	2	2,3 ou 4
<i>S. guianensis</i> var. Mineirão	2n=20	2,80	4	2	2

Número cromossômico (n° crom); Valor de DNA 2C em picogramas por Citometria de Fluxo; Sítios mapeados por Bandeamento e FISH.

5 DISCUSSÃO

O número cromossômico diploide $2n=20$ encontrado nas espécies aqui estudadas corroboram com dados encontrados previamente para *Stylosanthes* (VIEIRA et al, 1993; LIRA et al, 2014). As análises morfométricas dos cariótipos no presente estudo revelaram que o padrão cromossômico geral foi similar em todas as espécies. Por meio da análise e descrição do cariótipo de doze espécies brasileiras de *Stylosanthes*, Vieira, Aguiar-Perencin e Martins (1993) discutiram implicações sobre a evolução e taxonomia do gênero. Foram estudados os cariótipos de algumas variedades de *S. guianensis* (*S.g. canescens*, *S.g. microcephala*, *S.g. vulgaris* e *S.g. pauciflora*) além de *S. montevidensis*, *S. gracilis*, *S. grandifolia*, *S. campestris*, *S. viscosa*, *S. humilis*, *S. pilosa* e *S. macrocephala*. Em *S. gracilis*, o comprimento relativo por eles encontrado variou de 7,92% a 11,97%, valores próximos aos encontrados no presente trabalho (5,36% a 12,4%). Os autores relataram que o padrão cromossômico geral foi similar em todas as espécies, porém, algumas variações foram detectadas principalmente no tamanho de alguns cromossomos, que em algumas espécies como *S. humilis* se apresentavam menores que em outras. No estudo de Vieira, Aguiar-Perencin e Martins (1993), uma variedade de *S. guianensis* (*S.g. pauciflora*) apresentou um par de cromossomos de tamanho relativamente maior que os demais o que reforça a presença de diferenças genômicas intraespecíficas no complexo. Foi discutido ainda, que as diferenças cariológicas poderiam ter sido originadas não somente por rearranjos cromossômicos (inversões e translocações), mas também por mudanças no conteúdo de DNA nuclear durante a especiação dentro do gênero.

No presente trabalho, *S. acuminata* foi a única espécie que apresentou constrição secundária visível em um par de cromossomos, sendo que tal região foi marcada pelo bandeamento como CMA⁺ e pela FISH, evidenciando o DNAr 45S, abordagens que serão discutidas mais adiante. Em leguminosas, evidências interessantes de mudanças no conteúdo de DNA têm sido reportadas na literatura, como foi o caso do gênero *Lathyrus*, nas quais se refletem na quantidade de eucromatina e heterocromatina, além das sequências repetitivas, não repetitivas e simetria cariotípica. (NARAYAN e DURRANT, 1983).

Comparando-se o tamanho médio dos cromossomos das espécies de *Stylosanthes* aqui estudadas com os valores relatados para outros gêneros da mesma tribo Papilionoideae (*Phaseolus*, *Vigna* e *Macroptilium*), observa-se que os valores do

tamanho médio dos cromossomos destas espécies variam de 1 μm a 3 μm (FORNIMARTINS, 1989). Entretanto, outras espécies de Papilionoideae apresentam variações maiores de tamanho cromossômico, como relatado em *Cratylia* sp., com variação entre 31,61 e 44,38 μm (VARGAS, 2008). A predominância de cromossomos metacêntricos nas espécies do presente trabalho indica uma tendência de manutenção do cariótipo simétrico, que já foi observada em outros membros de Fabaceae e em alguns representantes da subfamília *Caesalpinioideae* e *Papilionoideae* (KUMARI e BIR, 1989; FONSECA e PEDROSA-HARAND, 2013).

Dentre as espécies de *Stylosanthes* aqui caracterizadas, a presença de algumas variações genômicas intra e interespecíficas foram observadas por meio das diferentes análises citogenéticas. Considerando a importância da técnica de bandeamento CMA₃/DAPI como ferramenta utilizada para caracterizar regiões heterocromáticas ricas em bases GC e AT, há poucos estudos na literatura relacionados ao gênero *Stylosanthes*. Lira (2015) realizou a análise com dupla coloração CMA₃/DAPI em acessos da espécie diploide *S. seabrana* e em *S. scabra*, que é tetraploide. Nos diploides, a autora observou a presença de dois blocos CMA⁺ na região terminal de um par de cromossomos metacêntricos. Já nos acessos tetraploides, quatro blocos CMA⁺ foram localizados. No presente estudo, a maioria das espécies diploides aqui caracterizadas, mostraram a presença de duas marcas CMA⁺ (*S. gracilis*, *S. hippocampoides* e três acessos de *S. guianensis*: 1480, 1463 e 4171) (Figuras 3 e 4) enquanto outras apresentaram quatro marcas (*S. grandifolia*, *S. acuminata* e a cultivar *S. guianensis* C.V mineirão). Tal fato pode indicar que, dentro do gênero, as espécies apresentam certa variabilidade na composição do genoma ainda que possuam o mesmo número cromossômico. A variação no número de marcas de CMA₃ entre plantas com o mesmo nível de ploidia pode ser atribuída a rearranjos cromossômicos e eventos transponíveis (SCHWEIZER, 1976; GUERRA, 2008).

Do ponto de vista intraespecífico apenas *S. guianensis* C.V mineirão apresentou diferença no número de marcas CMA⁺ perante aos demais acessos. Este cultivar denominado Mineirão foi coletado em 1979, no Estado de Minas Gerais, pelo pesquisador Nuno Maria Sousa Costa. A Embrapa Cerrados e a Embrapa Gado de Corte iniciaram os trabalhos de avaliação fenotípica em 1979 e 1983 respectivamente, sendo que em 1995 foi lançado no mercado.

O número e a posição das marcas CMA podem contribuir para discutir a composição de genoma e as relações evolutivas em leguminosas, como podemos notar no estudo de Sousa, Reis e Viccini (2013), no qual oito populações de *Mimosa caesalpinhiifolia* (Mimosoideae) foram submetidas a técnicas de bandeamento com cromomicinaA₃/DAPI, hibridização *in situ* e coloração com prata (bandeamento Ag-NOR) e todas as populações mostraram cariótipos com $2n=2x=26$ cromossomos, embora alguns indivíduos tenham exibido $2n=4x=52$. Verificou-se ainda, a presença de cromossomos B adicionais em algumas populações e foi possível a detecção de um grande heteromorfismo da RON em um único par que continha o sítio 45S e bandas CMA positivas, o que propiciou a identificação de grande atividade nucleolar na espécie.

Dentro dos acessos de *S. guianensis*, as variações no número de marcas 45S ocorreram graças aos satélites que eventualmente se distenderam dos cromossomos, especialmente na variedade 4171 (Figura 7). Costa (2006), em uma revisão botânica do gênero, enfatizou que *S. guianensis* é a espécie com mais ampla distribuição e também com a maior variabilidade, colecionando desde o início da sua classificação um elevado número de taxa infraespecíficos à medida que contradições ocorriam entre os botânicos. Algumas possuem hábito ereto, outras hábitos marcadamente prostrados, diferenças no tamanho das inflorescências, cores de sementes variadas, entre outras características morfológicas distintas. Com o presente trabalho, a análise das espécies sob o ponto de vista cariotípico, que ainda não tinha sido explorado anteriormente, nos trouxe informações adicionais que reforçam a perspectiva de diferenciação intraespecífica em *S. guianensis*, bem como auxilia na elucidação de novos pontos-chaves a serem considerados em uma caracterização mais completa da espécie.

No que diz respeito à presença de variações interespecíficas, foi possível observar que *S. acuminata* foi a única espécie que apresentou 4 sítios de DNAr 45S bem delimitados, contrariamente às demais. *S. acuminata* já foi considerada uma variedade de *S. guianensis* (var. *marginata*) por t' Mannetje (1984) e posteriormente Ferreira e Costa (1977) reconheceram-lhe a categoria específica por se separar completamente de *S. guianensis* graças às diferenças morfológicas como raiz levemente espessada, caule sempre ereto, entre outras. De acordo com Costa (2006), a espécie ocorre principalmente sobre solos arenosos ou argiloarenosos, em áreas de Cerrado Arbóreo a Campo Limpo de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul,

São Paulo e Paraná no Brasil e no Paraguai. O presente trabalho permitiu detectar mais diferenças a nível citogenético, pois *S. acuminata* foi a única espécie que apresentou constrição secundária visível no cromossomo 7. Já *S. grandifolia*, também se diferenciou das demais por apresentar quatro marcas CMA positivas no bandeamento. Segundo caracterizações botânicas previamente realizadas, a espécie é vista como a mais distinta morfológicamente entre todas as outras espécies do gênero (FERREIRA e COSTA, 1977; COSTA, 2006), ocorrendo em vários tipos de vegetação e solos que vão desde regiões de cerrado no Sul do Brasil, passando pela caatinga na Bahia até as zonas de matas secundárias no Pará e Amapá, além de ampla dispersão que inclui regiões desde a Argentina até as Guianas. Isto posto, podemos notar que no genoma de *S. grandifolia* o número de marcas CMA positivas sugere que a distribuição do conteúdo de bases CG nos cromossomos difere das demais espécies, sendo semelhante apenas a *S. guianensis* C.V mineirão, que também apresentou o mesmo aspecto.

Estes pontos que foram mapeados dentro do genoma pela abordagem empregada no presente trabalho, evidenciaram pela primeira vez as variações na constituição genômica em *Stylosanthes*, relacionadas a posição das marcas de DNAr 45S. Além de todas as espécies terem possuído tal região localizada no menor par cromossômico, *S. acuminata* teve dois sítios a mais que as outras dentro do mesmo nível de ploidia e uma das variedades de *S. guianensis* (4171) apresentou porções cromossômicas extras que carregavam os sítios 45S. Tal região é uma das repetições mais bem caracterizadas, composta pelos genes ribossomais (rDNA 45S), espaçadores intergênicos transcritos (ITS) e, espaçadores intergênicos não transcritos (IGS). As regiões codantes do rDNA 45S são altamente conservadas entre os eucariotos, enquanto as regiões IGS variam amplamente mesmo entre espécies relacionadas, ou seja, é altamente polimórfica (FLAVELL, 1989; HESLOP-HARRISON, 2000). O mapeamento de tais regiões é bastante útil, pois os genes ribossomais 45S possuem atividade transcricional em células ativas para assegurar o suprimento de ribossomos necessário à síntese proteica. A atividade destes genes resulta na região organizadora de nucléolo (RON), no qual ocorre parte da biogênese ribossomal. A RON apresenta-se na forma de uma constrição secundária em cromossomos metafásicos, que se condensam progressivamente durante a mitose e descondensam ao final da telófase quando a reestruturação do nucléolo se inicia (SCHWARZACHER e WACHTLER, 1983; SUMNER, 2003). Portanto, em

Stylosanthes o mapeamento desta região foi mais um parâmetro relevante identificado, evidenciando variabilidade intra e interespecífica.

Os poucos estudos citogenéticos prévios realizados no gênero *Stylosanthes*, incluíram apenas a contagem do número cromossômico, morfometria (VIEIRA, AGUIAR-PERENCIN e MARTINS, 1993) e bandeamento CMA/DAPI em *S. scabra* e *S. seabrana* (LIRA, 2015). Para as espécies do presente trabalho, a técnica está sendo aplicada pela primeira vez. Vieira, Aguiar-Perencin e Martins (1993) relataram a existência de constrição secundária no menor par cromossômico de espécies diploides de *Stylosanthes*, o que corrobora a existência das marcas DNAr 45S também observadas na região terminal do menor par cromossômico das espécies diploides do presente trabalho.

Alguns autores relataram a existência de correspondência entre as regiões evidenciadas pelo bandeamento CMA⁺ com regiões que apresentam sinais positivos de hibridações *in situ* com sequências de rDNA 45S (CERBAH et al., 1998; FORNI-MARTINS e GUERRA, 1999; RAN et al., 1999; SILJAK-YAKOVLEV et al., 2003; MARCON et al., 2005). Nos resultados obtidos para todas as espécies aqui estudadas, também ocorreu uma co-localização no menor par de cromossomos com relação aos sítios 45S e as marcas CMA⁺. Além disso, foi possível observar na cultivar C.V mineirão de *S. guianensis* e em *S. grandifolia* que duas, das quatro marcas CMA⁺, foram co-localizadas também com o sítio 5S, situação que é menos comum. Portanto, é curioso ressaltar que somente tais espécies tiveram os sítios 5S e 45S co-localizados com as marcas CMA⁺. O significado biológico de tal co-localização consiste no fato de que ambas as técnicas marcam regiões heterocromáticas. A FISH é capaz de detectar as regiões ribossomais repetitivas, que se forem ricas em GC como a maioria dos blocos heterocromáticos, também serão detectadas no bandeamento em alguns casos (FORNI-MARTINS e GUERRA, 1999).

Uma vez que os cariótipos estão constantemente sujeitos às pressões de seleção não é surpreendente, que os mesmos apresentem tanto a constância, quanto a variação. Constância na forma e na fidelidade da replicação dos cromossomos através dos contínuos ciclos de divisão celular para garantir a continuidade do conteúdo da informação genética, e variação que constitui a base para a adaptação e mudanças evolutivas (JONES, 1995).

Variações citogenéticas intra e interespecíficas também foram encontradas no gênero *Arachis*, que é um dos gêneros de leguminosas mais proximamente

relacionados a *Stylosanthes* (COSTA, 2006). Inicialmente, Custódio, Seijo e Valls (2013) relataram a presença de número variável de marcas de DNAr 45S em cinco espécies diploides, onde dois (*A. gregoriy*) e até oito sítios (*A. glandulifera*) foram evidenciados. Em *A. magna*, os autores identificaram acessos diferentes desta mesma espécie com dois, quatro e seis sítios de DNA 45S, além de *A. gregoryi*, onde acessos com dois e quatro sítios foram verificados. É pertinente salientar que tais leguminosas em *Arachis* também possuem $2n=20$, assim como as espécies de *Stylosanthes* do presente trabalho e que o número de marcas 5S também foi mais estável nas espécies de ambos os gêneros, o que nos faz notar que apesar do número cromossômico não variar, o mapeamento principalmente da região 45S reforça a percepção de que variações genômicas vão além do nível de ploidia.

Com o avanço dos estudos, outros resultados relevantes foram encontrados no gênero *Arachis*, onde a maioria das leguminosas são diploides com $x=10$ e somente quatro espécies possuem $x=9$ cromossomos. Para estudar a homeologia dos genomas das espécies $x=9$ e sua relação com outros genomas do gênero, também foi aplicada a hibridização *in situ* fluorescente para DNAr 5S e 45S e bandeamento com DAPI. Os resultados revelaram diferenças significativas e concluiu-se que as espécies com $x=9$ da seção *Arachis* formam um grupo monofilético caracterizado por um tipo de genoma diferentes das demais (SILVESTRI, ORTIZ e LAVIA, 2015).

Dentro da família Fabaceae, o gênero *Crotalaria* apresenta, citogeneticamente, uma diminuição do tamanho dos cromossomos de acordo com o nível de especialização floral, com as espécies florais não especializadas possuindo cromossomos maiores que espécies florais especializadas. O cariótipo de espécies pertencentes à subseção *Macrostachyae*, dentro do gênero *Crotalaria*, foi caracterizado por uma inversão no par de cromossomo 1 em relação a espécies florais especializadas. Sítios adicionais de DNAr 45S e 5S nas espécies foram assumidos como sendo um resultado de eventos de transposição e a variação nas posições indicaram possíveis rearranjos cromossômicos e modificações nas sequências de DNA altamente. Observou-se portanto, que as características cariotípicas corroboraram a classificação morfológica relacionada à especialização floral no gênero (MORALES, AGUIAR-PERECIN e MONDIN, 2011). Logo, a utilização de marcadores cromossômicos, gerados por colorações com fluorocromos e hibridação molecular *in situ*, combinados a dados botânicos previamente estabelecidos

constituem uma estratégia importante no estudo taxonômico de plantas, principalmente naquelas que possuem número constante de cromossomos e morfologia similar, como é o caso de *Stylosanthes*.

Análises envolvendo a técnica de hibridização *in situ* ainda são inexistentes para todas as espécies de *Stylosanthes*, não havendo dados suficientes para comparar com os resultados obtidos no presente trabalho, que veio contribuir com um panorama cariotípico mais aprofundado para parte das espécies do gênero.

É válido ressaltar as espécies aqui investigadas possuem nível de ploidia semelhante e que de acordo com recentes estudos filogenéticos em *Stylosanthes* baseados em análises moleculares, estão agrupadas em um único clado (dados não publicados) sendo portanto, consideradas mais relacionadas. Explorando em nível citogenético, o mapeamento com sondas de DNA ribossomais e principalmente o padrão de bandas CMA+ revelaram que a constituição cromossômica se mantém relativamente constante e que, as espécies de *Stylosanthes* analisadas no presente trabalho apresentaram estabilidade cariotípica. Tal fato é esperado pois o grupo possui uma diversificação muito recente (<5Mya) (LAVIN et al, 2004), o que se reflete numa baixa diferenciação morfológica e cariotípica, similaridade filogenética de loci plastidiais e nucleares, além do predomínio da autogamia, que também favorece a estabilidade do cariótipo (LAVIN et al, 2001; 2004; FONSECA e PEDROSA-HARAND, 2013; PINTO et al, 2015). Comparando-se a variabilidade do número de marcas CMA e dos sítios 5S e 45S de *Stylosanthes* com outros gêneros próximos em Papilionoideae, notamos um padrão relativamente estável, o que poderia justificar a relação entre tempo de origem e diversidade cariotípica. Em *Swartzia* a análise das taxas evolutivas dos dados de sequencias de DNA indicam que o gênero se diversificou rapidamente após sua origem, provavelmente durante o Mioceno (TORKE, 2006). Tais informações somadas aos estudos citogenéticos, onde os cromossomos se apresentaram relativamente pequenos, dois sítios de DNAr 5S e 45S nas metáfases bem como duas marcas CMA positivas, constituem evidência preliminar de um padrão de cariótipo fortemente conservado em *Swartzia* (PINTO et al, 2015). Tal estabilidade cariotípica também é vista em *Phaseolus* (FONSECA e PEDROSA-HARAND, 2013).

De maneira geral, a evolução do cariótipo só pode ser interpretada corretamente quando a relação entre as espécies é fortemente apoiada por dados externos (GUERRA, 2008). Uma árvore filogenética robusta é necessária para

entender as relações entre as espécies e sua evolução cariotípica. Inferências evolutivas baseadas somente em tendências cariotípicas devem ser vistas com precaução e associadas a outras informações (GUERRA, 2012).

Estudos evolutivos foram feitos por meio da citogenética apenas no gênero *Mimosa*, também pertencente à família Fabaceae, onde parâmetros de tamanho cromossômico mostraram diferenças estatisticamente significativas entre espécies próximas. A comparação com espécies de diferentes níveis de ploidia sugeriu que uma possível hibridização possa ter ocorrido para o surgimento de algumas espécies. Os autores concluíram, portanto, que a auto ou a alopoliploidia provavelmente tenham sido importantes processos dentro da história do gênero (MORALES et al, 2013).

No que diz respeito à citometria de fluxo, nota-se que um problema com a determinação do DNA nuclear por esta técnica é a possibilidade de interferência por componentes do tecido da planta, que são revelados durante a preparação da amostra (PRICE et al., 2000). A estrutura da parede celular de muitas leguminosas, principalmente as forrageiras como *Stylosanthes*, contém forte presença de lignina, que possui importante participação no alimento forrageiro (HATFIELD et al., 1999). É possível que a lignina interfira na elaboração das amostras lidas pelo citômetro, o que aumenta a importância de uma escolha cautelosa entre os diferentes tampões. Walker, Moñino e Correal (2004) perceberam diferenças nos resultados de citometria em *Bituminaria bituminosa*, uma leguminosa perene que possui elevados níveis de furanocumarinas em suas folhas. Estes compostos atuam como repelentes contra a herbivoria e sua concentração nas folhas varia de acordo com a localização clima. Os autores observaram que a estimativa de DNA nuclear feita com folhas coletadas no verão foram significativamente menores que aquelas obtidas no inverno, onde viviam sob baixas temperaturas. Tal fato ocorreu devido à diferença na acumulação de furanocumarina, que se encontra em maiores níveis nas folhas durante o verão, sob altas temperaturas.

As espécies aqui analisadas, apesar de serem diploides ($2n=20$), mostraram pequenas variações na quantidade de DNA. De uma maneira geral, o valor médio encontrado foi de 2,50 pg de DNA, como podemos observar em *S. hippocampoides* e *S. gracilis*. Entre as variedades de *S. guianensis* a quantidade de DNA estimada ficou entre 2,80 (C.V mineirão) e 3,07 (4171). Apesar de 4171 ter apresentado uma quantidade de DNA maior que as demais variedades, estatisticamente não houve diferença significativa entre elas. Tal variedade

apresentou variações cariotípicas identificadas pela citogenética no presente estudo, reforçando as diferenças existentes no complexo *S. guianensis*. Costa (2006), em um amplo trabalho sobre *Stylosanthes*, lembrou as dificuldades pelas quais os botânicos passaram ao tentar classificar *S. guianensis*, que, dentre as demais espécies do gênero, é a que possui maior variação morfológica. Muitas vezes, até mesmo pequenas características como a medida em milímetros dos folíolos lineares eram levadas em consideração no momento da diferenciação de espécie (MOHLENBROCK, 1958). Com os resultados aqui observados, pode-se observar portanto, que as variações não se apresentam somente em nível morfológico como os estudiosos antigos já haviam reparado, mas também podem ocorrer a nível genômico. Atualmente, os avanços nas técnicas e metodologias no estudo das plantas nos permitem obter conhecimentos mais profundos e intrínsecos, que vão além da observação botânica, ampliando a perspectiva de classificação de materiais vegetais. As estimativas de quantidade de DNA aqui realizadas são um exemplo deste avanço, pois o conteúdo de DNA proveniente dos núcleos das células vegetais constituem mais um parâmetro de comparação intra e interespecífica.

Dentro do gênero *Stylosanthes*, Chandra e Kaushal (2009) identificaram 10 novas linhagens de *S. seabrana* ($2n=20$) em um banco de germoplasma que, até então, possuía apenas acessos do alotetraploides de *S. scabra* ($2n=40$). A diferenciação destas duas espécies não poderia ser feita apenas visualmente, pois compartilham um nível muito elevado de similaridade para características morfológicas, como hábito de crescimento, perenidade e formato do fruto, além de coexistirem proximamente na natureza. Para tentar diferenciar as espécies pertencentes ao banco, os autores utilizaram marcadores genômicos STS (*sequence-tagged-sites*) e observaram, não somente uma diferença nos padrões de bandas entre as duas possíveis espécies, mas ainda compararam estas bandas com *S. viscosa* ($2n=20$), que, juntamente com *S. seabrana*, foram anteriormente indicadas como possíveis progenitoras de *S. scabra*. A fim de confirmar os dados encontrados com as técnicas moleculares, os autores aplicaram a técnica de citometria de fluxo em sementes de *S. viscosa*, *S. scabra* e *S. seabrana* para encontrar a quantidade de DNA por célula. Em *S. seabrana*, foi encontrado o valor $2C$ de 5,42 pg de DNA, sendo considerada uma espécie diploide, assim como *S. viscosa*. Já em *S. scabra*, os acessos por eles analisados exibiram em média 9,76 pg de DNA por célula, caracterizando-a como uma espécie poliploide. As análises moleculares associadas à

citometria permitiram, portanto, que dentre todos os acessos presentes no banco de germoplasma, *S. scabra* fosse identificada como tetraploide enquanto *S. seabrana*, como diploide, onde, associada a *S. viscosa*, seriam progenitoras de *S. scabra*. Nota-se portanto que a citometria de fluxo tem se mostrado uma ferramenta rápida e de confiança para a identificação de conteúdo de DNA e está sendo utilizada em uma variedade de plantas, bem como na determinação e variação de ploidia dentro da mesma espécie ou de espécies semelhantes.

Repara-se, portanto, que a quantidade de DNA 2C encontrada nas sementes dos diploides *S. seabrana* e *S. viscosa* no estudo de Chandra e Kaushal (2009) (2C= 5,42pg) difere do conteúdo do tecido foliar das espécies aqui estudadas. Em comparação, tais espécies apresentaram quantidades de DNA muito maiores do que as encontradas nos diploides do presente trabalho. No que se refere a outros membros de Fabaceae, a quantidade de DNA em *Stylosanthes* apresenta-se intermediária. Como exemplo, *Leucaena macrophylla* possui valor 2C= 0,62 pg, *Trifolium arvense* com 2C= 0,78 pg e *Lotus coimbrensis* com 2C= 0,90 pg. Já *Lathyrus latifolius* (2C= 21,76 pg) e *Vicia faba* (54,8pg) possuem alto conteúdo de DNA dentro da família (KEW ROYAL BOTANICAL GARDENS, 2017).

A taxonomia ainda controversa de *Stylosanthes*, requer mais atenção e mais parâmetros para comparar as espécies.

Paralelamente às espécies de interesse econômico, como as do gênero *Stylosanthes*, é extremamente válido o conhecimento do nível de ploidia, pois esse dado é útil para delinear estratégias de melhoramento genético. Todavia, o baixo número de estudos com o gênero nessa área, nos impede de realizar comparações aprofundadas e discussões mais abrangentes, o que reforça a importância do presente estudo, que visa aprimorar cada vez mais a técnica de citometria de fluxo para o estudo do gênero.

6 CONCLUSÕES

- As análises morfométricas evidenciaram um cariótipo simétrico nas espécies de *Stylosanthes*, com poucas variações na morfologia cromossômica.
- O bandeamento CMA/DAPI evidenciou estabilidade cariotípica relacionada às regiões ricas em GC no genoma das diferentes espécies e variedades do gênero.
- A hibridização *in situ* permitiu que sítios de DNAr 5S e 45S fossem mapeados pela primeira vez sendo possível evidenciar diferenças genômicas nas espécies diploides de *Stylosanthes* proximamente relacionadas.
- As estimativas de quantidade de DNA revelaram valores 2C variando de 2,19 a 3,07 pg.

Os dados aqui obtidos utilizando a técnica de hibridização *in situ*, o bandeamento com fluorocromo DAPI/CMA e citometria de fluxo, embora restritos a algumas espécies de *Stylosanthes*, podem ser considerados importantes pontos de caracterização, ao passo que a marcação cromossômica como um todo é de grande importância em programas de melhoramento genético. Tais dados, devem ser significativamente levados em conta também nos estudos filogenéticos, visto que são parâmetros adicionais de comparação que podem auxiliar na organização da taxonomia do gênero, que ainda está passando por frequentes mudanças e permanece indefinida.

Com isso, pode-se notar a relevância de se estudar um grupo sob diferentes aspectos bem como enxergá-lo sob diversos níveis, pois a busca por dados confiáveis que possam retratar um panorama fidedigno da constituição e estruturação das espécies é cada vez mais rigorosa. Apenas com a junção de técnicas variadas como os recursos da citogenética e da genética molecular é que seria possível conhecer melhor o genoma, que possui tamanha complexidade, e a partir de então, prosseguir para objetivos maiores como o difícil ato de classificar espécies e utilizá-las para fins biológicos, medicinais e econômicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKINS, S. W.; SIMPSON, G. M.; NAYLOR, J. M. The physiological basis of seed dormancy in *Avena fatua* VII. Action of organic acids and pH. *Plant Physiology*, v. 65, p. 310-316, 1985.
- AHMED, L.; BEGUM, R.; NOOR, S. S.; ZAMAN, M.A.; ALAM, S.S. Reversible fluorescent chromosome banding in three *Crinum* spp. (Amaryllidaceae). *Cytologia*, v. 69, n.1, p. 69-74, 2004.
- ALENCAR, K.M.C.; LAURA, V.A.; DUTRA, J.D.; CONTREIRAS-RODRIGUES, A.P.D. Tratamentos térmicos em sementes de três espécies de *Stylosanthes* spp. In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE CORTE, 3, 2007, Campo Grande. Anais... Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2007.
- ALENCAR, K.M.C.; LAURA, V.A.; RODRIGUES, A.P.D.C.; RESENDE, R.M.S. Tratamento térmico para superação da dormência em sementes de *Stylosanthes* SW. (Fabaceae Papilionoideae). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 31, n. 2, p. 164-170, 2009.
- ALMEIDA, C.; PEDROSA-HARAND, A. Contrasting rDNA Evolution in Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) and Common Bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). *Cytogenetic Genome Research*, v. 32, p. 212–217, 2011.
- ANDRADE, C.M.S.; ASSIS, G.M.L.; SALES, M.F.L. Estilosantes Campo Grande: Leguminosa Forrageira Recomendada para Solos Arenosos do Acre. In: Circular técnica 55, Rio Branco: Embrapa Acre, 2010.
- ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T. O uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGEM, 2000. Anais...Lavras: Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000. p. 273-309.
- ARAUJO, E. F.; ARAUJO, C. F.; ARAUJO, R. F.; GALVÃO, J.C.C.; SILVA, R.F. Efeito da escarificação das sementes e dos frutos de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. na germinação. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 18, n. 1, p. 73-76, 1996.
- ARROYO, M. T. K. 1981. Breeding systems and pollination biology in *Leguminosae*. In: *Advances in Legume Systematics Part 2*. Eds. Polhill, R.M.; Raven, P.H. Royal Botanic Gardens: Kew, 1981. p. 723-69.
- ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 9, p. 229–241, 1991.
- BAH, S.; DIALLO, D.; DEMBELE, S.; PAULSEN, B.S. Ethnopharmacological survey of plants used for the treatment of schistosomiasis in Niono District, Mali. *Journal of Ethnopharmacology*, Shannon, v. 5, n. 3, p. 387-399, 2006.
- BATTISTIN, A. Estudo biossistemático de diferentes táxons do gênero *Stylosanthes* Sw. (Leguminosae-Papilionoideae). 1981. 106f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BAZIZ, K.; BENAMARA-BELLAGHA, M.; PUSTAHIJA, F.; BROWN, S.S.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; KHALFALLAH, N. First karyotype analysis, physical rDNA mapping, and genome size assessment in four North African *Astragalus* taxa (Fabaceae). Turkish Journal of Botany, v. 38, p. 1248-1258, 2014.

BENNET, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. Annals of Botany, v.76, p. 113-176, 1995.

BIRADAR, D. P.; PEDERSEN, W. L. E.; RAYBURN, A. L. Nuclear-DNA analysis of maize seedlings treated with the triazole fungicide, Triticonazole. Pesticide Science, v. 41, n. 4, p. 291-295, 1994.

BOLSHEVA, N. L.; ZELENIN, A. V.; NOSOVA, I. V.; AMOSOVA, A. V.; SAMATADZE, T. E.; YURKEVICH, O. Y.; MELNIKOVA, N. V.; ZELENINA, D. A.; VOLKOV, A. A.; MURAVENKO, O. V. The Diversity of Karyotypes and Genomes within Section Syllinum of the Genus *Linum* (Linaceae) Revealed by Molecular Cytogenetic Markers and RAPD Analysis. PLoS ONE, v. 10, n.4, e0122015, 2015.

BORTOLETI, K. C. A.; BENKO-ISEPPON, A. M.; MELO, N. F.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. Chromatin differentiation between *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek and *V. unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae). Plant Systematic and Evolution, v. 298, p. 689–693, 2012.

BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; ANDRÉIA CAVERZAN, A. Citogenética vegetal: da era clássica à molecular. 2007. Embrapa Trigo, Documentos Online, 85, 9 p. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm> Acesso em 3 de abril de 2016

BRAMMER, S.P 2010, Disponível em: < <http://www.paginarural.com.br/artigo/2085/para-que-servem-os-estudos-citogeneticos-no-melhoramento-de-trigo> > Acesso em 3 de abril de 2016.

BRASILEIRO-VIDAL, A. N.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002, p. 277-298.

BROLMANN, J.B. Distribution and significance of *Stylosanthes hamata* (L.) Taub. In south Florida. Florida Scientist, v. 42, p. 63-64, 1979.

BURKART, A. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. Acme: Buenos Aires, 1952.

BURT, R.L. 1984. Natural variation in *Stylosanthes*. In: STACE, H.M.; EDYE, L.A. The biology and agronomy of *Stylosanthes*. North Ryde, Academic Press Australia, p. 103-123.

CAMERON, D. F. Chromosome number and morphology of some introduced *Stylosanthes* species. Australian Journal of Agricultural Research, v. 18, p. 375-379, 1967a.

- CAMERON, D.F. Hardseededness and seed dormancy of Townsville lucerne (*Stylosanthes humilis*) selections. Australian journal of experimental agriculture and animal husbandry, v. 7, p. 237-240, 1967b.
- CARDOSO, D.; QUEIROZ, L.P.; LIMA, H.C.; SUGANUMA, E.; VAN DEN BERG, C.; LAVIN, M. A molecular phylogeny of the vataireoid legumes underscores floral evolvability that is general to many early-branching papilionoid lineages. American Journal of Botany, v. 100, p. 403–421, 2013.
- CARDOSO, D.; QUEIROZ, P. G.; LIMA, H. C. A taxonomic revision of the South American papilionoid genus *Luetzelburgia* (Fabaceae). Botanical Journal of the Linnean Society, v.175, p. 328–375, 2014.
- CARDOSO, D.; SÃO-MATEUS, W. M. B.; CRUZ, D. T.; ZARTMAN, C. E.; KOMURA, D. L.; KITE, G.; PRENNER, G.; WIERINGA, J. J.; CLARK, A.; LEWIS, G.; PENNINGTON, R. T.; QUEIROZ, L. P. Filling in the gaps of the papilionoid legume phylogeny: The enigmatic Amazonian genus *Petaladenium* is a new branch of the early-diverging Amburaneae clade. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 84, p.112–124, 2015.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique in maize chromosomes. Heredity, v. 70, p. 515-519, 2003.
- CARVALHO, L.J.C.B.; MOSQUIM, P.R.; RENA, A.B. Resposta ao alumínio e fósforo por plantas de *Stylosanthes humilis* Sw coletadas em solo de cerrado com diferentes características químicas. In: EMBRAPA -CPAC (ed), VI SIMPÓSIO SOBRE CERRADO E SAVANAS: ALIMENTO E ENERGIA. Anais...Planaltina: EMBRAPA, 1988, p. 423-443.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. Hereditas, v. 136, p. 159-168, 2002.
- CASTIGLIONE, M. F.; FREDIANI, M.; GELATI, M. T.; VENORA, G.; GIORGETTI, L.; CAPUTO, P.; CREMONINI, R. Cytological and molecular characterization of *Vicia barbazitae* Ten. & Guss. Protoplasma, v. 249, p. 779–788, 2012.
- CERBAH, M.; COULAUD, J.; SILJAK-YAKOVLEV, S. rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). Heredity, v. 89, n.4, p. 312-318, 1998.
- CHALUP, L.; GRABIELE, M.; NEFFA, S.V.; SEIJO, G. DNA content in South American endemic species of *Lathyrus*. Journal of Plant Research, v. 127, p. 469–480, 2014.
- CHALUP, L.; SAMOLUK, S.S.; NEFFA, V.S.; SEIJO, G. Karyotype characterization and evolution in South American species of *Lathyrus* (*Notolathyrus*, Leguminosae) evidenced by heterochromatin and rDNA mapping. Journal Plant Reserch, v. 128, p. 893–908, 2015.

CHANDRA, A.; KAUSHAL, P. Identification of Diploid *Stylosanthes seabrana* Accessions from Existing Germplasm of *S. scabra* Utilizing Genome-Specific STS. *Molecular Biotechnology*, v. 42, n. 3, p. 282-291, 2009.

CHANDRA, A.; PATHAK, P.S.; BHATT, R.K. *Stylosanthes* research in India: Prospects and challenges ahead. *Current Science*, v. 90, n.7, p. 915-921, 2006.

CHANDRA, A.; TIWARI, K.K.; NAGAICH, D.; DUBEY, N.; KUMAR, S.; ROY, A.K. Development and characterization of microsatellite markers from tropical forage *Stylosanthes* species and analysis of genetic variability and cross-species transferability. *Genome*, v. 54, p. 1016–1028, 2011.

CHAVES, I.S. Contribuição da barreira tegumentar para a germinação de sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CHAVES, J. S.; BARAÚNA, A. C.; MOSQUEIRA, C. A.; GIANLUPPI, V.; ZILLI, J. E.; SILVA, K. *Stylosanthes spp.* from Amazon savanna harbour diverse and potentially effective rhizobia. *Applied Soil Ecology*, v.108, p. 54–61, 2016.

COHN, M. A.; CHILES, L. A.; HUGHES, J. A.; BOULLION, K. J. Seed dormancy in red rice VI. Monocarboxylic acids: a new class of pH-dependent germination stimulants. *Plant Physiology*, v. 84, p. 716-719, 1987.

COSTA, A.M. Uso de marcadores RAPD e do sistema de informação geográfica no estudo da variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferr et S. Costa. 2004. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) Universidade Católica de Brasília, Brasília.

COSTA, N. 2006. Revisão do gênero *Stylosanthes*. 470 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica), Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

COSTA, N.M. E FERREIRA, M.B. Some Brazilian species of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M.; EDYE, L.A. (Org). *The biology and agronomy of Stylosanthes*. North Ryde: Academic Press Australia, 1984, p. 23-48.

COSTA, N. M. S.; SCHULTZE-KRATF, R. Biogeografia de *S. capitata* Vog. E de *Stylosanthes guianensis* Sw. Var. *pauciflora*. *Pasturas Tropicales*, v.15, n. 1, p. 10-15, 1993.

EMBRAPA GADO DE CORTE. Cultivo e uso do Estilosantes-campo-grande. Campo Grande, MS: Comunicado técnico, v. 105, 2007.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

CUSTÓDIO, A. R.; SEIJO, G.; VALLS, J. F. M. Characterization of Brazilian accessions of wild *Arachis* species of section *Arachis* (Fabaceae) using heterochromatin detection and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetics and Molecular Biology*, v. 36, n. 3, p. 364-370, 2013.

- DARMENCY, M. A.; PRADO-VIVANT, E.; CHELYSHEVA, L.; POUTHIER, T. Variation in rDNA locus number and position among legume species and detection of 2 linked rDNA loci in the model *Medicago truncatula* by FISH. *Genome*, v. 48, p. 556–561, 2005.
- DING, X.; JIA, Q.; LUO, X.; ZHANG, L.; CONG, H.; LIU, G.; BAI, C. Development and characterization of expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers in tropical forage legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. *Molecular Breeding*, v. 35, p. 202, 2015.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry*, Malden, v. 51A, n. 2, p. 127-128, 2003.
- DOLEZEL, J. Flow cytometry analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis*, v. 2, p. 143-154, 1991.
- DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, v. 95, p. 99–110, 2005.
- DOLEZEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, v. 31, n. 2, p.113-120, 1989.
- DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J., SUDA, J. Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes chromosomes and genomes. Editora Wiley: VCH, 2007.
- DONKPEGAN, A. S. L.; DOUCET, J.L.; DAINOU, K.; HARDY, O. L. Microsatellite development and flow cytometry in the african tree genus *Azelia* (Fabaceae, Caesalpinioideae) reveal a polyploid complex. *Applications in Plant Sciences*, v. 3 n. 1, p. 1400097, 2015.
- EDYE, L. A. Commercial development of *Stylosanthes* pastures in Northern Australia. I. Cultivar development within *Stylosanthes* in Australia. *Tropical Grasslands*, St. Lucia, v. 31, n. 5, p. 503-508, 1997.
- ENDEMANN, M.; HRISTOFOROGLU, K.; STAUBER, T. E.; WILHELM, E. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. *Biologia Plantarum*, v. 44, n. 3, p. 339-345, 2002.
- Environmental and Conservation Programs Neotropical Live Plant Photos Site. Disponível em < <http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/view.asp?checkbox=18944> >. Acesso em: 22 janeiro 2017.

FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. 1979. O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil. Belo Horizonte, EPAMIG, 208p.

FINCH-SAVAGE, W. W.; CADMAN, C. S.; TOOROP, P. E.; LYNN, J. R.; HILHORST, H. W. Seed dormancy release in *Arabidopsis Cvi* by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. *The Plant Journal*, v. 51, n. 1, p. 60-78, 2007.

FLAVELL, R.B. Variation in structure and expression of ribosomal DNA loci in wheat. *Plant Molecular Genetics*, v. 31, p. 963-968, 1989.

FONSÊCA, A.; PEDROSA-HARAND, A. Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. *Genome*, v. 56, p. 335–343, 2013.

FORAGES Tropical *Stylosanthes*. Disponível em: <<http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Stylosanthes> >, Acesso em: 05 de Jan de 2016.

FORNI-MARTINS, E. R. Cariótipo e sua análise numérica como subsídio a estudos taxonômicos e evolutivos de *Phaseolus* L., *Vigna Savi* e *Macroptilium* (Benth) Urban – Leguminosae, Papilionoideae. 1989. 146 f. Tese de Doutorado, Universidade de Campinas, Campinas.

FORNI-MARTINS, E.R.; GUERRA, M. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania scop.* Species (Fabaceae). *Caryologia*, v. 52, n. 1-2, p. 87-103, 1999.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. *Science*, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, 1983.

GALBRAITH, D.W.; LAMBERT, G.; MACAS, J.; DOLEZEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: ROBINSON, J.; AXMI, A.; TUTOIS, S. (Org). *Current protocols in cytometry*. J. Wiley: New York, 2002, p. 345-365.

GAN, Y.; LIU, F.; CHEN, D.; WU, Q.; QIN, G.; WANG, C.; LI, S.; ZHANG, X.; WANG, Y.; WANG, K. Chromosomal Locations of 5S and 45S rDNA in *Gossypium* Genus and Its Phylogenetic Implications Revealed by FISH. *PLoS ONE*, v. 8, n.6, p. e68207, 2013.

GARCIA, É. N.; BASEGGIO, J. Poder germinativo de sementes de *Desmodium incanum* DC. (Leguminosae). *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 5, n. 3, p. 199-202, 1999.

GERLACK, W. L.; BEDBROOK, J. R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acid Research*, v. 7, p.1869-1885, 1979.

GOMES, S. S. L.; SALDANHA, C. W.; NEVES, C. S.; TREVIZANI, M.; RAPOSO, N. R. B.; NOTINI, M. M.; SANTOS, M. O.; CAMPOS, J. M. S.; OTONI, W. C.; VICCINI, L. F. Karyotype, genome size, and in vitro chromosome doubling of *Pfaffia glomerata*

(Spreng.) Pedersen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 118, n. 1, p. 45-56, 2014.

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C. G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology Evolution Systematic*, v. 36, p. 47-79, 2005.

GORYACHKINA, O.V; BADAIEVA, E.D.; MURATOVA, E.N.; ZELENIN, A.V. Molecular cytogenetic analysis of Siberian *Larix* species by fluorescence in situ hybridization. *Plant Systematics and Evolution*, v. 299, p. 471–479, 2012.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 120, p. 339–350, 2008.

GUERRA, M. Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, v. 146, p. 703–710, 2012.

GUODAO, L.; PHAIKAEW, C.; STUR, W. W. Status of *Stylosanthes* development en other countries. II. *Stylosanthes* development and utilizacion in China and south-east Asia. *Tropical Grasslands*, v. 31, n. 4, p 460-466, 1997.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Celi wall structural foundations molecular basis for improving forage digestibilities. *Crop Science*, v. 39, p. 27-37, 1999.

HAVANANDA, T.; BRUMMER, E. C.; DOYLE, J. J. Complex patterns of autopolyploid evolution in alfalfa and allies (*Medicago sativa*; Leguminosae). *American Journal of Botany*, v. 98, p. 1633-1646, 2011.

HESLOP-HARRISON, J.S. RNA, genes and chromosome: repetitive DNA sequences in plants. *Chromosome Today*, v. 13, p. 45-46, 2000.

HUANG, C. Q.; LIU, G. D.; BAI, C. J; WANG, W. Q.; TANG, J. Application of SRAP markers in the identification of *Stylosanthes guianensis* hybrids. *Molecular Biology Reports*, v. 41, p. 5923–5929, 2014.

JOHNSON, J. S.; BENNETT, M. D.; RAYBURN, A. L.; GALBRAITH, D. W.; PRICE, H.J. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*, v. 86, p. 609–613, 1999.

KARIA. C. T. Caracterização genética e morfoagronômica de germoplasma de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) SW. 2008. 140 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Goiás, Goiás.

KAUSHAL, P.; ROY, A. K.; KHARE, A.; MALAVIYA, D. R.; ZADOO, S.N.; CHOUBEY, R. N. Crossability and characterization of interspecific hybrids between sexual *Pennisetum glaucum* (pearl millet) and a new cytotype (2n = 56) of apomictic *P. squamulatum*. *Cytologia*, v. 72, p. 111–118, 2007.

KAZAN, K.; MANNERS, J.M.; CAMERON, D.F. Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 85, p. 822-888, 1993.

KEW ROYAL BOTANIC GARDENS. Disponível em:
<<http://data.kew.org/cvalues/CvalServlet?querytype=2> > Acesso em: 5 abril 2017.

KSIĄŻCZYK, T.; ZWIERZYKOWSKA, E.; MOLIK, K.; TACIAK, M.; KRAJEWSKI, P.; ZWIERZYKOWSKI, Z. Genome-dependent chromosome dynamics in three successive generations of the allotetraploid *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* hybrid. *Protoplasma*, v. 252, p. 985–996, 2014.

KUMAR, S.; SANE, P.V. 2003. Legumes of South Asia. Royal Botanic Gardens, Kew, 536 p.

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

LAVANIA, U. C.; KUSHWAHA, J. S.; LAVANIA, S.; BASU, S. Chromosomal localization of rDNA and DAPI bands in solanaceous medicinal plant *Hyoscyamus niger* L. *Journal of Genetics*, v. 89, n. 4, p. 493–496, 2010.

LAVIN, M.; PENNINGTON, R. T.; KLITGAARD, B. B.; SPRENT, J. I.; LIMA H. C.; GASSON, P. E. The dalbergioid legumes (*Fabaceae*): delimitation of a pantropical monophyletic clade. *American Journal of Botany*, v. 88, p. 503-533, 2001.

LAVIN, M.; SCHRIRE, B.P.; LEWIS, G.; PENNINGTON, R.T.; DELGADO-SALINAS, A.; THULIN, M.; HUGHES, C.E.; MATOS, A.B.; WOJCIECHOWSKI, M.F. Metacommunity process rather than continental tectonic history better explains geographically structured phylogenies in legumes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 359, p. 1509– 1522, 2004.

LAWRENCE, G. J.; APPELS, R. Mapping the nucleolus organizer region, seed protein loci and isozyme loci on chromosome 1R in rye. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 71, p. 742-749, 1986.

LEITCH, A.R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I.J. *In situ* hybridization: a practical guide. Bios Scientific Publishers Limited, 1994.

LEVIN, D.A. The role of chromosomal change in plant evolution. New York: Oxford University Press, 2002.

LIRA, I.C.S.A. Caracterização citogenética e morfoagronômica de acessos de *Stylosanthes* spp. (*Fabaceae*-*Papilionoideae*) coletados no nordeste brasileiro. 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

LIU, C. J.; MUSIAL, J. M. The application of chloroplast DNA clones in identifying maternal donos for polyploidy species of *Stylosanthes*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 102, n. 1, p. 73-77, 2001.

LIU, Z. L.; ZHANG, D.; WANG, X. Q.; MA, X. F.; WANG, X. R. Intragenomic and interspecific 5S rDNA sequence variation in five Asian pines. *American Journal of Botany*, v. 90, p. 17-24, 2003.

LIU, P. D.; XUE, Y. B.; CHEN, Z. J. C.; LIU, G. D.; TIAN, J. Characterization of purple acid phosphatases involved in extracellular dNTP utilization in *Stylosanthes*. *Journal of Experimental Botany*, v. 67, n. 14, p. 4141-4154, 2016.

LPWG [Legume Phylogeny Working Group]. Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, v. 62, p. 217–248, 2013.

MAASS, B. L.; SAWKINS, M. History, relationship and diversity among *Stylosanthes* species of commercial significance. In: CHAKRABORTY, S. (Org.) High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems. Adelaide: Australian Centre for International Agricultural Research, 2004, p. 9-26.

MALAIRAJAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G.; NARASIMHAN, S.; VENI, K.J.K. Analgesic activity of some Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, Shannon, v. 106, n. 3, p. 425-428, 2006.

MANNETJE L'T. Considerations on the taxonomy of the genus *Stylosanthes*. In: STACE, H.M.; EDYE, L.A. (Org.) The biology and agronomy of *Stylosanthes*. North Ryde: Academic Press Australia, 1984, p. 1-22.

MARASCHIN, G. E. Oportunidade do uso de leguminosas em sistemas intensivos de produção animal a pasto. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM. 1997. Anais... Piracicaba. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1997, p. 139-160

MARSCHNER, H. 1995. Function of mineral nutrients: micronutrients. In: Marschner H. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press London, UK, 379–396.

MARCON, A. B.; BARROS, I. C. L.; GUERRA, M. Variation in chromosome numbers, CMA bands and 45S rDNA sites in species of *Selaginella* (Pteridophyta). *Annals of Botany*, v. 95, p. 271-276, 2005.

Markers and Flow Cytometry, and Their Molecular Characterization. *Molecular Biotechnology*, v. 42, p. 282–291.

McIVOR, F. G. Germination characteristics of seven *Stylosanthes* species. *Australian journal of experimental agriculture and animal husbandry*, v. 16, p. 723-728, 1976.

McKEON, G. M.; MOTT, J. J. Seed biology of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M.; EDYE, L.A. The biology and agronomy of *Stylosanthes*. North Ryde, Academic Press Australia, 1984. cap. 16, p.311-332.

MOHLENBROCK, R. H. A revision on the Genus *Stylosanthes*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 44, p. 299-354, 1958.

MOHLENBROCK, R. H. Recent studies in the Leguminous Genus *Stylosanthes*. *Rhodora*, v. 62, p. 340-343, 1960.

MORALES, A. G.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; MONDIN, M. Karyotype characterization reveals an up and down of 45S and 5S rDNA sites in *Crotalaria* (Leguminosae-Papilionoideae) species of the section Hedriocarpae subsection Macrostachyae. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 59, p. 277–288, 2011.

MORALES, M.; WULFF, A. F.; FORTUNATO, R. H.; POGGIO, L. Chromosome studies in southern species of *Mimosa* (Fabaceae, Mimosoideae) and their taxonomic and evolutionary inferences. *Plant Systematics and Evolution*, v. 300, p. 803-817, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAGANOWSKA, B.; WOLKO, B.; SLIWINSKA, E.; KACZMAREK, Z. Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus *Lupinus* (Fabaceae). *Annals of Botany*, v. 92, p. 349-355, 2003.

NARAYAN, R. K. J.; DURRANT, A. DNA distribution in chromosomes of *Lathyrus* species. *Genética*, v. 61, p. 47-53, 1993.

NASCIMENTO, D. J. 1986. Leguminosas: espécies disponíveis, fixação de nitrogênio e problemas fisiológicos para manejo da consorciação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PASTAGENS, Piracicaba. Anais... Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1986, p. 389-411.

NATH, S.; JHA, T. B.; MALLICK, S. K.; JHA, S. Karyological relationships in Indian species of *Drimys* based on fluorescent chromosome banding and nuclear DNA amount. *Protoplasma*, v. 252, p. 283–299, 2014.

PADILLA, F. M.; PUGNAIRE, F.I. The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. *Front Ecology Environment*, v. 4, p. 196–202, 2006.

PELACANI, C. R.; BARROS, R. S.; RIBEIRO, D. M.; FRIGERI, R. B. C. Breaking dormancy of *Stylosanthes humilis* seeds with low pH solutions. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 27, n. 3, p. 387-393, 2005.

PEREIRA, J.M. Produção e persistência de leguminosas em pastagens tropicais. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS: Temas em Evidências. 2001. Anais... Universidade Federal de Lavras/ NEFOR, Lavras, 2001. p. 111-141.

PIERRE, P. M. C.; SOUSA, S. M.; DAVIDE, L. C.; MACHADO, M. A.; VICCINI, L. F. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). *Academia Brasileira de Ciências*, v. 83, p. 993-1005, 2011.

PINTO, R. B.; MANSANO, V. F.; TORKE, B. M.; FORNI-MARTINS, E. R. Evidence for a conserved karyotype in *Swartzia* (Fabaceae, Papilionoideae): Implications for

the taxonomy and evolutionary diversification of a species-rich neotropical tree genus. *Brittonia*, v. 68, n.1, p.93-101, 2016.

POTOKINA, E.; SREENVASULU, N. Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional and Integrative Genomics*, v. 2, p. 28-39, 2002.

PRAÇA-FONTES, M. M.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; CRUZ, C. D. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. *Plant Cell Reports*, v. 30, p. 1183-1191, 2011.

PRICE, H. J.; CHAMBERS, K. L.; BACHMAN, K.; RIGGS, J. Inheritance of nuclear 2C DNA content variation in intraspecific and interspecific hybrids of *Microseris* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, v. 70, p. 1133–1138, 1983.

PRICE, H. J.; HODNETT, G.; JOHNSTON, J. S. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. *Annals of Botany*, v. 86, p. 929–934, 2000.

PUCCIARELO, O.; ORTIZ, A.M.; FERNANDEZ, A.; LAVIA, G. Chromosome analysis of the *Arachis pintoi* x *a. repens* (Leguminosae) hybrid by classical and molecular cytogenetics. *Boletín Da La Sociedad Argentina de Botânica*, v. 48, n. 1, p. 111-119, 2013.

RAN, J.; MURRAY, B. G.; HAMMETT, K. R. W. Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and *in situ* hybridization. *Euphytica*, v. 106, p. 139-147, 1999.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2001.

REDDY, U. K.; ARYAL, N.; ISLAM-FARIDI, N.; TOMASON, Y. R.; LEVI, A.; NIMMAKAYALA, P. Cytomolecular characterization of rDNA distribution in various *Citrullus* species using fluorescent *in situ* hybridization. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 60, p. 2091–2100, 2013.

REIS, A. C.; SOUSA, S. M.; VALE, A. A.; PIERRE, P. M. O.; FRANCO, A. L.; CAMPOS, J. M. S.; VIEIRA, R. F.; VICCINI, L. F. *Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autopolyploid complex? *American Journal of Botany*, v. 101, n. 06, p. 1002–1012, 2014.

REIS, M. S.; MARTINS, P. S. Determinação de parâmetros genéticos relacionados com a dormência das sementes de espécies de *Stylosanthes* Sw. *Ceres, Viçosa*, v. 33, n. 188, p. 363-371, 1986.

RIBEIRO, D. M.; MAPELI, A. A.; DELATORRE, C. A.; CARNELOSSI, M. A .G.; BARROS, R. M. Action of ferric and aluminium ions on the dormancy breakage of *Stylosanthes humilis* seeds. *Acta Physiology Plant*, v. 33, p. 2117–2123, 2011.

ROA, F.; GUERRA, M. Distribution of 45s rDNA sites in chromosome of plants: structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, p. 225-238, 2012.

ROBINSON, P. J.; BURT, R. L.; WILLIAMS, W. T. Network analysis of genetic resources data. II. The use of isozyme data in elucidating geographical relationships. *Agroecosystems*, v.6, n. 2, p. 111-118, 1980.

RODRIGUES, R. S.; CORRÊA, A. M.; MARTINS E. F.; TOZZI, A. M. G. A. Número cromossômico em espécies de *Acosmium* Schott e *Leptolobium* Vogel (Leguminosae, Papilionoideae). *Acta Botanica Brasilica*, v. 23, n.3, ISSN 1677-941, 2009.

SAMOLUK, S. S.; CHALUP, L.; ROBLEDO, G.; SEIJO, J.G. Genome sizes in diploid and allopolyploid *Arachis* L. species (section *Arachis*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 62, p. 747–763, 2015.

SANTOS-GARCIA, M.O.; KARIA, C.T.; RESENDE, R.M.S.; CHIARI, L.; VIEIRA, M. L. C.; ZUCCHI, M. I.; SOUZA, A. P. Identification of *Stylosanthes guianensis* varieties using molecular genetic analysis. *AoB Plants*, pls 001: doi: 10. 1093/aobpla/pls001, 2012.

SANTOS-GARCIA, M. O.; RESENDE, R. M. S.; CHIARI, L.; ZUCCHI, M. I.; SOUZA, A. P. Mating systems in tropical forages: *Stylosanthes capitata* Vog. and *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. *Euphytica*, v. 178, p.185–193, 2011.

SHE, C. W.; JIANG, X. H.; OU, L.J.; LIU, J.; LONG, K. L.; ZHANG, L. H.; DUA, W. T.; ZHAO, W.; HU, J. C. Molecular cytogenetic characterization and phylogenetic analysis of the seven cultivated *Vigna* species (Fabaceae). *Plant Biology*, v.17, p. 268–280, 2015.

SCHWARZACHER, H. G.; WACHTLER, F. Nucleolus Organizer Regions and Nucleoli. *Human Genetics*, v. 63, p. 89-99, 1983.

SCHULTZE-KRATF, R.; COSTA, N. M. S.; FLORES, A. *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferr. & Sousa Costa- collection and preliminary agronomic evaluation of a new tropical pasture legume. *Tropical Agriculture*, v.61, n. 3, p. 230-240, 1984.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, v. 58, n. 4, p. 307-324, 1976.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. In: STAHL, J.M.; LUCINANI, A.M.; VAGNER-CAPODANO, A.M. *Chromosomes Today*. Allen and Unwin: Londres, 1987, p. 61-74.

SHELTOM, H. M.; FRANZEL, S.; PETERS, M. Adoption of tropical legume technology around the world: analysis of success. In: MCGILLOWAY, D. A. (Ed.) *Grassland: a global resource*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2005. cap 1, p. 149-166.

SILJAK-YAKOVLEV, S.; PECCENINI, S.; MURATOVIC, E.; ZOLDOS, V.; ROBIN, O.; VALLÈS, J. Chromosomal differentiation and genome size in three European mountain *Lilium* species. *Plant Systematic and Evolution*, v. 236, p. 165-173, 2003.

SILVA, M. P. & ZIMMER, A. H. Avaliação agronômica de consorciações de braquiárias e *Andropogon gayanus* com novos acessos de estilosantes sob pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2004, Campo Grande. Resumos... Campo Grande, 2004.

SILVA, S. J. B. Caracterização citogenética de acessos de *Stylosanthes* Sw. ocorrentes no semiárido brasileiro. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2009, Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. p. 62-67.

SILVESTRI, M.C.; ORTIZ, A.M. LAVIA, G.I. rDNA loci and heterochromatin positions support a distinct genome type for 'x = 9 species' of section *Arachis* (*Arachis*, Leguminosae). *Plant Systematic and Evolution*, v. 301, p. 555–562, 2015.

SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology*, v. 60, p. 561-88, 2009.

SOUSA, S. M.; REIS, A. C.; VICCINI, L. F. Polyloidy, B chromosomes, and heterochromatin characterization of *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Fabaceae-Mimosoideae). *Tree Genetics & Genomes*, v. 9, p. 613-619, 2013.

STACE, H. M.; EDYE, L. A. The biology and agronomy of *Stylosanthes*. North Ryde: Academic Press Austrália, 1984.

STACE, H.M. Genetic systems in *Stylosanthes*. In: STACE, H.M.; EDYE, L.A. (Org). The biology and agronomy of *Stylosanthes*. North Ryde: Academic Press Australia, 1984. cap. 7, p. 147-161.

STACE, H.M.; CAMERON, D. Cytogenetics and the evolution of *Stylosanthes*. In: Stace, H.M.; Edye, L.A. (eds) The Biology and Agronomy of *Stylosanthes*. Academic Press Australia, 1984. cap. 3, p. 49-72.

STACE, H.M.; CAMERON, D. Citogenetic review of taxa in *Stylosanthes hamata* sensu lato. *Tropical Grasslands*, v.21, n.4, 1987.

STARR, C. R.; CORRÊA, R. S.; FILGUEIRAS, T. S.; HAY, J. D. V.; SANTOS, P.F. Plant colonization in a gravel mine revegetated with *Stylosanthes spp.* in a Neotropical savanna. *Landscape and Ecological Engineering*, v. 9, p.189–201, 2013.

SUMNER, A. T. Chromosome banding. 1st ed. London Unwin Hyman Ltd, 1990.

SUMNER, A.T. Chromossomes: Organization and Function. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company, p. 133-141, 2003.

TEDESCO, S. B.; STEFANELLO, M. O.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; BATTISTIN, A.; DALL'AGNOL, M. Superação de dormência em sementes de espécies de *Adesmia* DC. (Leguminosae). *Revista Brasileira de Agrociência*, v.7, n. 2, p. 89-92, 2001.

TIMBO, A.L.O. Duplicação cromossômica e identificação do nível de ploidia utilizando citometria de fluxo em *Brachiaria spp.* 2011. 101 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TORKE, B. M. 2006. Systematics and evolutionary diversification in the species-rich neotropical tree genus *Swartzia* (Leguminosae - Papilionoideae). Dissertação (PhD) Washington University, Missouri, USA.

TUNA, M.; VOGEL, K. P.; ARUMUGANATHAN, K.; GILL, K. S. DNA content and ploidy determination of bromegrass germplasm accessions by flow cytometry. *Crop Science*, v. 41, p. 1629–1634, 2001

VALLÈS, J.; GARNATJE, T.; ROBIN, O.; YAKOVLEV, S. S. Molecular cytogenetic studies in western Mediterranean *Juniperus* (Cupressaceae): a constant model of GC-rich chromosomal regions and rDNA loci with evidences for paleopolyploidy. *Tree Genetics & Genomes*, v. 11, 43, doi:10.1007/s11295-015-0860-3, 2015.

VANDER STAPPEN, J.; CAMPENHOUT, S.; GAMA, S.; VOLCKAERT, G. Sequencing of the internal transcribed spacer region ITS1 as a molecular tool detecting variation in the *Stylosanthes guianensis* complex. *Theoretical Applied Genetics*, v. 96, n. 6, p. 869-877, 1998.

VANDER STAPPEN, J.; WELTJENS, I.; VOLCKAERT, G. Microsatélite markers in *Stylosanthes guianensis*. *Molecular Ecology*, v.8, n. 3, p. 514-517, 1998.

VANDER STAPPEN, J.; MARANT, S.; VOLCKAERT, G. Molecular characterization and phylogenetic utility of the rDNA external transcribed spacer region in *Stylosanthes* (Fabaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, v. 107, p. 291-298, 2003.

VARGAS, S. M. Citogenética de acessos de *Cratylia sp.* (FABACEAE – PAPILIONOIDEAE). 2005. 48 f. Dissertação, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VIEIRA, H. D.; BARROS, R. S. Responses of seed of *Stylosanthes humilis* to germination regulators. *Plant Physiology*, v. 92, p. 17-20, 1994.

VIEIRA, M. L. C.; AGUIAR-PERENCIN, M. L. R.; MARTINS, P. S. A cytotaxonomic study in twelve taxa of *Stylosanthes* Sw., Leguminosae. *Cytologia*, v. 58, p. 305-311, 1993.

VIEIRA, M. L. C.; FUNGARO, M. H. P.; JUBIER, M. F.; LEJEUNE, B. Determination of taxonomic relationships among Brazilian taxa of *Stylosanthes* SW., Leguminosae, using RAPD markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 32, n. 3, p. 305-310, 1997.

VILELA, H. Seleção e Escolha de Espécies Forrageiras: Formação de Pastagens. Viçosa: CTP, 2000.

WALKER, D. J.; MOÑINO, I.; CORREAL, E. Genome size in *Bituminaria bituminosa* (L.) C.H. Stirton (Fabaceae) populations: separation of “true” differences from

environmental effects on DNA determination. *Environmental and Experimental Botany*, v. 55, p. 258–265, 2004.

WU, F. H.; YU, X. D.; ZHUANG, N. S.; LIU, G. G.; LIU, J. P. Induction and identification of *Stylosanthes guianensis* tetraploids. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 4, p. 12692-12698, 2015.

YANPAISAN, W.; NICHOLAS, J.; KING, G.; DORAN, P. M. Flow cytometry of plant cells with applications in large escale bioprocessing. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 3-27, 1999.

ZANELA, L. Caracterização cariotípica de quatro espécies brasileiras de *Alstroemeria* (Alstromeriaceae) com as técnicas de FISH, CMA, DAPI E AgNOR. 2009. 96f. Dissertação de Mestrado. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.