

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

**CITOGENÉTICA E CITOMETRIA DE FLUXO DE ESPÉCIES DE  
*Dorstenia* (MORACEAE) ENDÊMICAS DA FLORESTA ATLÂNTICA**

ALDA FRANCISCA RODRIGUES DE SOUSA FERNANDES

ALEGRE - ES  
2015

ALDA FRANCISCA RODRIGUES DE SOUSA FERNANDES

CITOGENÉTICA E CITOMETRIA DE FLUXO DE ESPÉCIES DE *Dorstenia*  
(MORACEAE) ENDÊMICAS DA FLORESTA ATLÂNTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Milene Miranda  
Praça Fontes.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana  
Tavares Carrijo.

ALEGRE - ES  
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito  
Santo, ES, Brasil)

F363c Fernandes, Alda Francisca Rodrigues de Sousa, 1988-  
Citogenética e citometria de fluxo de espécies de *Dorstenia*  
(Moraceae) endêmicas da Floresta Atlântica / Alda Francisca  
Rodrigues de Sousa Fernandes. – 2015.  
57 f. : il.

Orientador: Milene Miranda Praça Fontes.

Coorientadores: Tatiana Tavares Carrijo.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. *Dorstenia*. 2. Citometria de fluxo. 3. Citogenética. 4. Floresta  
atlântica. I. Fontes, Milene Miranda Praça. II. Carrijo, Tatiana Tavares.  
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Agrárias. IV. Título.

CDU: 575:631.52


ALDA FRANCISCA RODRIGUES DE SOUSA FERNANDES


CITOGENÉTICA E CITOMETRIA DE FLUXO DE ESPÉCIES DE *Dorstenia*  
(MORACEAE) ENDÊMICAS DA FLORESTA ATLÂNTICA

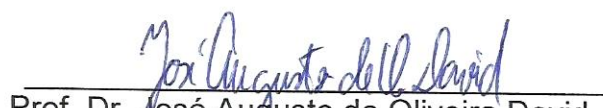
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovada: 27/02/2015.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Milene Miranda Praça Fontes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Orientadora)

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Tavares Carrijo  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Coorientadora)

  
Prof. Dr. José Augusto de Oliveira David  
Universidade Federal do Espírito Santo

*Ao meu amado esposo Miquéias Fernandes;  
ao meu querido filho Isaac Rodrigues Fernandes;  
e aos meus queridos pais  
Joel Rodrigues de Sousa e Francisca Rodrigues de Santana.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a realização desse sonho me dando força e sabedoria em cada momento.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós - Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Milene Miranda Praça Fontes, pela orientação, ensinamentos, dedicação, paciência, compreensão, confiança e amizade.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Tavares Carrijo, pela coorientação, informações e coleta em campo das *Dorstenias*.

Ao Prof. Dr. Wellington Ronildo Clarindo, pela realização da Citometria de Fluxo.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto de Carvalho e ao Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, pelo auxílio e concretização da Citometria de Fluxo.

Aos professores do Programa de Pós - Graduação em Genética e Melhoramento, pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Ao coordenador do curso prof. Dr. Adésio Ferreira, pelo apoio para conclusão deste trabalho.

À Sabrina, secretária do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela disponibilidade, esclarecimentos e compreensão.

Ao amigo do Laboratório de Citogenética Darley Tavares, pelo apoio e enorme ajuda com o sistema de hidroponia.

À Jaqueline Lubber, pelas fotos de *D. hirta* e *D. arifolia* e pelas informações das espécies em campo.

Ao Karlo Gregório Guidoni Martins, pelas fotos de *D. bonijesu*.

A todos os amigos do laboratório de Citogenética: Kati, Thaís, Kália, Liliana, Lucas, Renata, Paulo, Geovana, Victor, Natália, Stefany, Michele, Anelise, pela contribuição de cada um na minha pesquisa e pela convivência de harmonia.

À amiga Marina Santos Carvalho, pelo apoio, pelos conselhos, pela amizade e ótima convivência desde a graduação.

Aos professores da graduação Francielle Alline Martins, José Evando Aguiar, Agda Alves e Frank Magno, pelo incentivo de ingresso na Pós.

Aos amigos da turma de Genética e Melhoramento, pelos momentos compartilhados.

À Kati, Marcinha e Luara que me abrigaram quando cheguei aqui em Alegre, e ainda estava sem local para morar.

Ao meu esposo Miquéias Fernandes, pelo amor, companheirismo, paciência, incentivo e grande ajuda em cada momento. Te Amo Muito!

Aos meus pais Joel Rodrigues de Sousa e Francisca Rodrigues de Santana, pelo amor, confiança, incentivo, e investimento na minha vida acadêmica. Ao meu irmão Renan Rodrigues de Sousa, pelos conselhos e estímulo a não desistir. Amo Muito vocês.

A todos os meus familiares: avos, tios (as), primos (as) que sempre torceram e torcem pelo meu sucesso.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

*“E ainda que eu tivesse o dom de profecia,  
e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,  
e ainda que tivesse toda a fé, de maneira que transportasse os montes,  
e não tivesse amor, nada seria”.*

(I Coríntios 13: 2)



## **BIOGRAFIA**

Alda Francisca Rodrigues de Sousa Fernandes, nascida em Santa Cruz do Piauí, em 07 de outubro de 1988. Filha de Joel Rodrigues de Sousa e Francisca Rodrigues de Santana, cursou o Ensino Fundamental em Floresta do Piauí na Unidade Escolar Dirceu Mendes Arcoverde até a sétima série. Na oitava série foi transferida para o Instituto Santo Agostinho em Teresina - PI em 2005, onde concluiu o ensino fundamental. Cursou o ensino médio na Escola Técnica Estadual “Gov. Dirceu Mendes Arcoverde”, Teresina - PI. No primeiro semestre de 2009, ingressou no curso de graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Piauí, Campus/Núcleo “Prof. Barros Araújo” em Picos - PI. Durante a graduação, participou de projeto de pesquisa na situação de bolsista (2011-2012) e estagiou no Laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Estadual do Piauí, Campus de Teresina - PI e no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, no Departamento de Genética, da Universidade Federal de Pernambuco. Em março de 2013 recebeu o título de Licenciada em Ciências Biológicas e ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2015.

## RESUMO

FERNANDES, Alda Francisca Rodrigues de Sousa, M. S. Universidade Federal do Espírito Santo, Fevereiro de 2015. **Citogenética e Citometria de Fluxo de espécies de *Dorstenia* (Moraceae) endêmicas da Floresta Atlântica.** Orientadora: Milene Miranda Praça Fontes. Coorientadora: Tatiana Tavares Carrijo.

Moraceae compreende plantas latescentes de porte arbóreo como as figueiras (*Ficus*), de porte arbustivo como as espécies de *Sorocea*, ou herbáceas como as espécies de *Dorstenia*. O gênero *Dorstenia* é o único herbáceo dentro da família, com cerca de 105 espécies, e possui princípios ativos ligados a diversas funções terapêuticas. Além do uso medicinal, os carapiás, como são conhecidas popularmente as espécies de *Dorstenia*, também apresentam grande potencial como plantas ornamentais. Alguns estudos envolvendo sistemática, filogenia, molecular e fitoquímica são relatados para algumas espécies de *Dorstenia*. No entanto, são poucos os relatos a respeito dos dados citogenéticos e conteúdo de DNA no gênero, provavelmente em virtude da dificuldade de encontrar populações naturais em campo e à situação vulnerável que compromete grande parte das espécies. Dados citomorfológicos associados com o valor 2C de DNA podem gerar informações sobre a evolução cromossômica e colaborar com os aspectos sistemáticos e taxonômicos de um grupo. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar, por meio da citogenética e citometria de fluxo, três espécies de *Dorstenia*: *D. arifolia* Lam., *D. bonijesu* Carauta & C. Valente e *D. elata* Hook. Para isso, o número cromossômico foi determinado, parâmetros morfométricos e de assimetria intercromossômica ( $A_2$ ) foram estabelecidos e o conteúdo de DNA nuclear foi mensurado. O material vegetal foi coletado em Mata das Flores, ES. Para a citogenética, raízes foram obtidas por meio de sistema hidropônico, tratadas com APM nas concentrações de 3, 4 e 5  $\mu\text{M}$ , por 16 a 18 h e fixadas em metanol: ácido acético (3:1), para posterior digestão, coloração e observação das lâminas. Para citometria de fluxo indivíduos jovens foram coletados. As folhas foram utilizadas como material de análise para

quantificar o conteúdo de DNA nuclear. A metodologia citogenética possibilitou a obtenção de material adequado para análise. Encontraram-se 32 cromossomos e foi possível montar o primeiro cariograma para as três espécies. Com os dados morfométricos, a classificação dos cromossomos foi determinada e foram confirmadas as diferenças entre os três kariótipos. O índice de assimetria  $A_2$  variou entre as espécies: *D. bonijesu* apresentou  $A_2 = 0,16$ , seguido por *D. arifolia*  $A_2 = 0,14$  e *D. elata*  $A_2 = 0,13$ . As análises de citometria de fluxo possibilitaram mensurar o conteúdo de DNA nuclear de  $2C = 3,49$  picogramas (pg) para *D. elata*,  $2C = 4,05$  pg para *D. bonijesu*, e  $2C = 5,47$  pg para *D. arifolia*. Apesar das três espécies apresentarem o mesmo número de cromossomos ( $2n = 32$ ), os valores de conteúdo de DNA evidenciados pela citometria de fluxo e os resultados do índice assimétrico foram diferentes. De acordo com os valores de  $A_2$  e dados descritos na literatura *D. elata* pode ser a espécie mais derivada em relação a *D. bonijesu* e *D. arifolia*, por possuir o menor índice de assimetria e menor conteúdo de DNA nuclear. Assim, os dados da presente pesquisa permitiram caracterizar, pela primeira vez, três espécies de *Dorstenia*, contribuindo para diferentes áreas como ecologia, filogenia, sistemática e evolução.

**Palavras-chave:** *Dorstenia*. Citometria de fluxo. Citogenética.

## ABSTRACT

FERNANDES, Alda Francisca Rodrigues de Sousa, M. S. Federal University of Espírito Santo, February, 2015. **Cytogenetics and flow cytometry of *Dorstenia* (Moraceae) species endemic to the Atlantic Forest.** Advisor: Milene Miranda Praça Fontes. Coadvisor: Tatiana Tavares Carrijo.

Moraceae comprises late-succulent plant tree size as the fig trees (*Ficus*), shrub species as *Sorocea*, or herbaceous species as *Dorstenia* species. The *Dorstenia* is the only herbaceous within the family, with about 105 species, and it has active ingredients linked to several therapeutic functions. Besides the medical use, the "carapiás", as popularly known, the *Dorstenia* species also have a high potential as ornamental plants. Some studies involving systematic, phylogeny, molecular and phytochemical are reported to some species of *Dorstenia*. However, there are few reports about the cytogenetic data and DNA content in the genus, probably due to the difficulty to find natural populations in the field and the vulnerable situation that affects most species. Cytomorphological data associated with the DNA 2C value can generate information on the chromosomal evolution and cooperate with systematic and taxonomic aspects of a group. That being said, the objective of this study was to characterize, by using cytogenetics and flow cytometry, three species of *Dorstenia*: *D. arifolia* Lam., *D. bonijesu* Carauta & C. Valente and *D. elata* Hook. For this, the chromosomal number was determined, morphometric and intrachromosomal asymmetry ( $A_2$ ) parameters were established and nuclear DNA content was measured. The plant material was collected in Mata das Flores, ES. To cytogenetics, roots were obtained by using the hydroponic system, treated with APM in the concentrations of 3, 4 and 5  $\mu\text{M}$ , for 16 to 18 h and fixed in methanol: acetic acid (3:1), for later digestion, coloring and observation of the slides. For flow cytometry young individuals were collected. The leaves were used as material of analysis to quantify the nuclear DNA content. The Cytogenetic methodology allowed to obtain suitable material for analysis. It was found 32 chromosomes and it was possible to mount the first karyogram to the three species. With the morphometric data, the classification of chromosomes was

determined and the differences were confirmed between the three karyotypes. The  $A_2$  asymmetry index varied between the species: *D. bonijesu* showed  $A_2 = 0.16$ , followed by *D. arifolia*  $A_2 = 0.14$  and *D. elata*  $A_2 = 0.13$ . The flow cytometric analysis allowed to measure the nuclear DNA content of  $2C = 3.49$  picograms (pg) for *D. elata*,  $2C = 4.05$  pg for *D. bonijesu* , and  $2C = 5.47$  pg for *D. arifolia*. Despite of the fact that the three species have the same chromosome number ( $2n = 32$ ), the DNA content values obtained by flow cytometry and the results of the asymmetric index were different. According to the  $A_2$  values and data described in the literature *D. elata* can be the species more derivative in relation to *D. bonijesu* and *D. arifolia*, for having the lowest asymmetry index, and the lowest content of nuclear DNA. Therefore, the present research data allowed to characterize, for the first time, three species of *Dorstenia*, contributing to different areas such as ecology, phylogeny, systematics and evolution.

**Keywords:** *Dorstenia*. Flow cytometry. Cytogenetics.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fragmentos de Mata Atlântica: Parque Estadual de Mata das Flores–ES, 20° 35' 54" S e 41° 10' 53" W.....28
- Figura 2 – Histogramas gerados a partir da análise de suspensões nucleares coradas com iodeto de propídeo. O padrão interno utilizado foi *S. lycopersicum* (2C = 2,00 pg) padronizado no canal 200. (a) Pico representando os núcleos nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de *D. elata* (2C = 3,49 pg) no canal 349. (b) Pico representando os núcleos nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de *D. bonijesu* (2C = 4,05 pg) no canal 405. (c) Pico representando os núcleos nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de *D. arifolia* (2C = 5,47 pg) no canal 547. (d) *D. elata* em Mata das Flores – ES. (e) *D. bonijesu* em Mata das Flores – ES. (f) *D. arifolia* em Mata das Flores – ES.....33
- Figura 3 – Cromossomos metafásicos de espécies do gênero *Dorstenia* (2n = 32 cromossomos), obtidos de células meristemáticas tratadas com APM 4 µM, durante 16h, (a) *D. arifolia*; e tratadas com APM 4 µM, durante 18h, (b) *D. bonijesu* e (c) *D. elata*. Cromossomos corados com Giemsa 5%. Barra = 5 µm.....35
- Figura 4 – Cariogramas de espécies do gênero *Dorstenia* (2n = 32 cromossomos), montados a partir de cromossomos metafásicos obtidos de raízes tratadas com APM 4 µM, durante 16h, (A) *D. arifolia*; e tratadas com APM 4 µM, durante 18h, (B) *D. bonijesu* e (C1 e C2) *D. elata*. Todos os cromossomos foram corados com Giemsa 5%. Observar os diferentes graus de compactação dos cromossomos em *D. elata*. Barra = 5 µm.....36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Morfometria dos cromossomos metafásicos de <i>D. arifolia</i> , <i>D. bonijesu</i> e <i>D. elata</i> ( $2n = 32$ ).....	39
--	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	20
2.1 Família Moraceae .....	20
2.2 Características gerais do gênero <i>Dorstenia</i> .....	21
2.3 Caracterização do genoma na família Moraceae e gênero <i>Dorstenia</i> .....	24
3. OBJETIVOS .....	27
3.1 Objetivo geral .....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	28
4.1 Material vegetal .....	28
4.2 Citometria de fluxo.....	28
4.3 Citogenética.....	29
4.4 Análise morfométrica .....	30
5. RESULTADOS .....	32
5.1 Citometria de fluxo.....	32
5.2 Citogenética.....	34
5.3 Análise morfométrica .....	38
6. DISCUSSÃO .....	40
6.1 Citometria de fluxo.....	40
6.2 Citogenética.....	42
6.3 Análise morfométrica .....	44
7. CONCLUSÕES.....	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48



## 1. INTRODUÇÃO

A família Moraceae é pantropical e compreende plantas de porte arbóreo como as figueiras (*Ficus*), de porte arbustivo como as espécies de *Sorocea*, ou herbáceas como as espécies de *Dorstenia*, geralmente presentes nos estágios mais avançados de remanescentes florestais (PEDERNEIRAS et al., 2011). O gênero *Dorstenia* L. possui cerca de 105 espécies, ocupando a segunda posição dentro da família Moraceae, perdendo apenas para *Ficus* L. (figos, com 750 espécies) (BERG e HIJMAN, 1999; BERG, 2001). É o único gênero herbáceo dentro da família e muito susceptível a interferência antrópica nos ambientes naturais (CARAUTA 1978). Várias espécies encontram-se vulneráveis, dentre elas *D. arifolia*, *D. cayapia*, *D. elata* e *D. sucrei* (criticamente em perigo) (FAHRIG, 2003).

O gênero *Dorstenia*, junto com *Ficus* e *Cecropia*, são provavelmente, os mais importantes da família Moraceae para os seres humanos, por causa da presença de furanocumarinas, um princípio ativo ligado a diversas funções terapêuticas. Além do uso medicinal, os carapiás, como são conhecidas as espécies de *Dorstenia*, também apresentam grande potencial como plantas ornamentais, contribuindo para a retirada predatória do campo (CARVALHO, 2008). Com isso torna-se importante a conservação de tais espécies, sendo a maioria classificadas como vulneráveis. Uma forma de conservação seria por meio do cultivo in vitro, que contribuiria para não retirada das espécies em campo.

Em algumas espécies da família Moraceae, tem sido realizados estudos citogenéticos, como por exemplo, a jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), classificada como tetraplóide com número básico de 14 cromossomos ( $x = 14$ ) (HAQ, 2006). Já a figueira comum, *Ficus carica* L., apresenta número diplóide ( $2n$ ) de 26 cromossomos (PEREIRA e NACHTIGAL, 1999). Segundo Fagerlind (1944), os membros da família Moraceae são diplóides, com número básico de cromossomos 12, 13, 14, e em casos raros, 15 ou 16. O autor aponta *Dorstenia mannii* Hook. f. como uma espécie tetraploide, com  $2n = 48$ , sendo o único exemplar do gênero citogeneticamente descrito.

Cariótipos poliploides têm sido documentados desde o início do último século com trabalhos de Lutz (1907) e Gates (1909) no gênero *Oenothera*.

Aparentemente, essa é uma condição em que todas as angiospermas passam, apresentando, no mínimo, um evento de poliploidização durante a evolução (ADAMS e WENDEL 2005; OTTO 2007; SOLTIS et al., 2009).

Informações citogenéticas são consideradas fundamentais na compreensão das relações filogenéticas, tanto dentro de pequenos táxons, como espécies e gêneros, quanto em níveis mais superiores, como famílias e divisões (STEBBINS, 1971; GUERRA, 2000). A análise de cariótipos, envolvendo a avaliação de dados como número e tamanho dos cromossomos, relação entre braços cromossômicos e presença de constrição secundária ou satélites, pode trazer informações valiosas para comparar espécies ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie (GUERRA et al., 1997; VENORA e PADULOSI, 1997).

Poucos relatos são citados na literatura sobre o conteúdo de DNA nuclear com a família Moraceae. Loureiro et al. (2007) estimou o valor 2C em 0,73 pg (picogramas) para a espécie *Ficus carica*, corroborando com o valor encontrado por (OHRI e KHOSHOO, 1987). Em *F. elastica* o valor é estimado em 2C = 1,52 pg (KOLAR et al., 2012), podendo ser observado uma variação no conteúdo de DNA nuclear no gênero *Ficus*.

Saha et al. (2014) analisando o gênero *Corchorus* (Malvaceae), o número e a assimetria de cromossomo e o conteúdo de DNA, apresentou resultados que proporcionaram uma compreensão da relação entre as espécies do gênero. Informações citogenéticas (GUERRA 1988), bem como a quantidade de DNA nuclear (KRON et al., 2007) são úteis em inferências filogenéticas e taxonômicas em grupos de plantas, por fornecerem relevantes dados acerca do processo evolutivo sofrido pelas espécies (OLIVEIRA, 2011).

Diferentes estudos acerca da sistemática, filogenia, molecular e fitoquímica são documentados para algumas espécies de *Dorstenia* (CELEGHINI et al., 2007; RODRIGUES e CARVALHO, 2001; GUARIM NETO e MORAIS, 2003; OLIVEIRA et al., 2003; KROGSTRUP et al., 2005). No entanto, poucos relatos existem sobre dados citogenéticos e conteúdo de DNA no gênero.

Nesse contexto, resultados citomorfológicos associados com o valor 2C podem gerar subsídios para inferências sobre a evolução cromossômica e

colaborar com os aspectos sistemáticos e taxonômicos dentro do gênero *Dorstenia*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Moraceae

Moraceae inclui espécies pantropicais, de porte arbóreo como as figueiras (*Ficus*), de porte arbustivo como as espécies de *Sorocea* dentre outros, ou herbáceas como as espécies de *Dorstenia*, geralmente presentes nos estágios mais avançados das florestas (PEDERNEIRAS et al., 2011). Segundo Rohwer (1993), a família é formada de 37 gêneros e cerca de 1100 espécies. Moraceae foi nomeada por Link em 1841 para designar as plantas relacionadas às amoreiras (moriformes) (CARAUTA, 1989).

No Brasil encontram-se cerca de 30% dos gêneros da família Moraceae (BERG, 2001; DATWYLER e WEIBLEIN, 2004), reunidos na floresta amazônica, onde ocorre a maioria das espécies. Os representantes de Moraceae no Brasil são reconhecidamente importantes em diversos aspectos. Nos levantamentos florísticos, a família aparece frequentemente entre as quinze primeiras com maior número de espécies. Muitas vezes, uma espécie de Moraceae pode ter um alto índice de valor de importância (parâmetro fitossociológico), como em florestas do Mato Grosso, onde predomina o condurú (*Brosimum rubescens*) (MARIMON et al., 2001). Nas interações com a fauna de vertebrados terrícolas, chamam a atenção por fornecerem frutos carnosos, muitas vezes em grandes quantidades (DUMONT et al., 2004; FIGUEIREDO, 1993; 1999).

Muitas espécies se destacam economicamente. Na fruticultura, as espécies de Moraceae mais utilizadas são o figo (*Ficus carica*), a fruta-pão (*Artocarpus altilis*), a jaca (*A. heterophyllus*) e a amora (*Morus nigra*). A utilização como plantas ornamentais também é recorrente. Várias espécies exóticas e nativas de *Ficus* são frequentemente utilizadas na arborização urbana e rural (CARAUTA e DIAZ, 2002), assim como muitas espécies de *Dorstenia*, principalmente as africanas, cultivadas como plantas suculentas e ornamentais.

Várias espécies em diferentes gêneros de Moraceae encontram-se regionalmente vulneráveis, como *Dorstenia arifolia* Vell., *Ficus gomelleira* Kunth, *F. nevesiae* Carauta, *F. pulchella* Miq. e *Sorocea guilleminiana* Gaudich (PEDERNEIRAS et al., 2011). A maioria das espécies está presente em florestas

úmidas ou em suas adjacências e no cerrado. Esses ambientes são atualmente ameaçados, tornando a perpetuação de seus habitantes vulneráveis. De maneira geral, a principal ameaça é a diminuição do habitat associado às expansões das fronteiras agrícolas e urbanas e ao uso não controlado dos recursos silvestres. Dessa forma, várias espécies de Moraceae estão de alguma forma ameaçada (LUZ et al., 2011).

## 2.2 Características gerais do gênero *Dorstenia*

O gênero *Dorstenia*, pertencente à tribo Dorsteniae, foi descrito por Carl Linnaeus em 1753, e se diferencia dos demais gêneros dentro da família Moraceae pela presença de rizomas e pelo hábito herbáceo (SANTOS e NETO, 2012). O nome *Dorstenia* trata-se de uma homenagem de Charles Plumier, a Theodor Dorsten (1492-1552), médico de Marbug (Alemanha), e autor de *Botanicon Continens Herbarum*, Frankfurt (CARVALHO, 2008). É o segundo maior gênero dentro da família Moraceae, com cerca de 105 espécies distribuídas pela África e região neotropical, com uma espécie que se estende para a Ásia. No Brasil encontram-se cerca de 37 espécies, sendo a maioria endêmicas (ROMANIUC NETO et al., 2010). São mais conhecidas popularmente por carapiás, embora sejam também nominadas de caapiá (do guarani ka'a=erva, pia=pequeno), contra-erva, tiú, figueirilha, chupa-chupa, liga-liga, capa-homem, conta-de-cobra, sabugo-roxo, liga-osso, figueirinha, figueira-da-terra (CARAUTA, 1978; LIFCHITZ, 1981).

As espécies de *Dorstenia* teriam surgido no Cretáceo há cerca de 100 milhões de anos, quando a América do Sul e a África estavam parcialmente unidas (CARAUTA e VALENTE, 1974; MCLOUGHIN, 2001). De acordo com Misiewicz e Zerega (2012) há uma hipótese que essas espécies podem representar uma forma intermediária na evolução da inflorescência aberta e polinização pelo vento em *Morus* L. (amoras) à especializada polinização em *Ficus*. Porém, apesar da distribuição exclusiva, morfologia e posição evolutiva dentro da família Moraceae, pouco se sabe sobre a história evolutiva do gênero *Dorstenia*.

Berg e Hijman (1999) distribuíram as espécies de *Dorstenia* em nove seções. Algumas espécies são utilizadas na medicina popular e na fitoterapia, principalmente representantes da Seção *Emygodia*, onde estão os caapiás ou carapiás. A essas espécies são atribuídas propriedades expectorantes e broncodilatadoras, e curativas da doença de Chagas (PIO-CORREA, 1984). Além disso, os seguintes usos etnofarmacológicos foram identificados para o carapiá: eupética, tônica digestiva, afecções da pele, antiespasmódica, emenagoga, febrífuga, antidiarréica, diurética, para consolidação de fraturas (BOTSARIS e MACHADO, 1999), atividade antioxidante (ABEGAZ et al., 2002), atividade citotóxica (ABEGAZ et al., 2002), atividade giardicida (AMARAL et al., 2006), efeitos anti-hipertensivos e diminuição nos níveis de colesterol e insulina (DIMO et al., 2001). Existem relatos ainda contra doenças de pele, pela presença de furanocumarinas (CARDOSO et al., 2002) e compostos do tipo terpenóides têm sido relatados como os responsáveis pelo uso popular destas plantas como antiofídicos (VILEGAS et al., 1997).

Os dados farmacológicos sobre o gênero *Dorstenia* são escassos, no entanto diversas substâncias já foram isoladas, incluindo: psoraleno e bergapteno (BAUER e NOLL, 1986); ácidos graxos, triterpenos pentacíclicos, esteróides e furanocumarinas (VILEGAS et al., 1992); butirospermol (TSOPMO et al., 1998); furanocumarinas (psoraleno, bergapteno, pimpinelina e isopimpinelina) (CARDOSO et al., 2002); catequina e epicatequina (CACERES et al., 2001); um análogo do psoraleno, denominado dorstenina (LOPES et al., 2001); psoraleno, bergapteno, beta-sitosterol e seus derivados D-glucopiranosídicos (ABEGAZ et al., 2002); dorstenona; flavonóides prenilados (NGADJUI et al., 2002) e siriogenina (CASAGRANDE et al., 1974), entre outros.

O ambiente sombreado por árvores, onde a maioria das dorstênias habita, torna os carapiás sensíveis à degradação ambiental, pois uma vez destruída a floresta, determina-se condição desfavorável à sobrevivência desses indivíduos, muito sensíveis à variação de luminosidade. Outro problema é a forma de coleta para fins medicinais, pois as partes mais utilizadas, como fonte de princípios ativo, são os rizomas, visto que, para serem extraídos, arranca-se a planta inteira. Os rizomas são vendidos a ervanários ou grandes laboratórios, que comercializam

produtos nos quais entram como composição única ou de forma composta (LUZ et al., 2011).

As espécies neotropicais de *Dorstenia* apresentam pequenas áreas de distribuição, à exceção de *D. brasiliensis* e *D. contrajerva*, algumas ocorrem em uma única localidade devido às exigências ecológicas restritas de grande parte das espécies (BERG, 2001). Essas características associadas ao fato do gênero ocorrer em biomas ameaçados, tais como a Floresta Atlântica e Floresta de adjacência (MEYERS et al. 2000), contribuem para o sério risco de ameaça da maioria das espécies (CARAUTA e CASTRO 1982). Dentre as espécies ameaçadas encontra-se *D. arifolia*, *D. cayapia* e *D. elata* (vulnerável) e *D. sucrei* (criticamente em perigo) - utilizados na aromatização de fumo para cachimbo. Com essa finalidade, seus rizomas são extraídos, sem posterior reposição (MENDONÇA e LINS, 2000). Tais fatos mostram a importância em realizar trabalhos de conservação com determinadas espécies.

Em condições ecológicas favoráveis, os carapiás florescem e frutificam o ano todo (CARAUTA, 1978). Os frutos são do tipo drupa (GRANVILLE, 1971), mas pouco se conhece sobre o papel do exocarpo na dispersão das espécies de carapiás (KAUFMANN et al., 1991), embora se saiba que, quando maduro, exerce pressão e ejeta o endocarpo contendo a semente (BERG, 1977).

As inflorescências bissexuais possibilitam a anemofilia e a polinização por insetos que utilizam essas inflorescências como sítio de acasalamento segundo Berg (2001). Algumas características morfológicas como a forma dos cenantos, incluindo apêndices (brácteas), cor e, em alguns casos, odor, podem estar associadas à forma de propagação (BERG, 2001).

A biologia floral de algumas espécies de *Dorstenia* foi analisada por Granville (1971). Ao contrário da tendência geral são encontradas espécies que reúnem indivíduos subarborescentes a herbáceos. Carauta (1978) sugere que o surgimento de grupos de tamanho reduzido está relacionado ao estresse hídrico, e também culmina nos representantes da seção *Emygodia*. Não existem, entretanto, estudos testando essa hipótese. Para *Dorstenia*, é notável a redução no porte das espécies americanas em relação às africanas (BERG, 2001); as

espécies brasileiras relacionadas com *Dorstenia elata* Hook são as que mais se aproximam em hábito às africanas.

As diferentes espécies do gênero *Dorstenia* podem diferir em alguns detalhes com relação às características botânicas e ao habitat. *Dorstenia arifolia* e *D. bonijesu* possuem raízes filiformes, rizomas escamosos, folhas dispostas em espiral, estípulas persistentes e cenantos com margens providas de brácteas deltóides e foliáceas (BERG, 2001). As duas espécies ocorrem em áreas úmidas e sombreadas de sub-bosques da Floresta Atlântica, no sudeste brasileiro (CARAUTA e VALENTE, 1983; BERG, 2001). *D. arifolia*, considerada espécie vulnerável (IBAMA, 1998) já desapareceu de várias áreas na Zona da Mata mineira, em virtude ao desmatamento ilegal das matas ciliares ou à invasão de gado nas matas remanescentes, correndo sério risco de destruição. *D. bonijesu* apresenta distribuição restrita a apenas quatro localidades nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais e encontra-se em risco (ARAÚJO et al., 2007). *D. Cayapia* Vellozo, também se encontra vulnerável na Floresta da Encosta Atlântica (CARVALHO, 2008).

### **2.3 Caracterização do genoma na família Moraceae e gênero *Dorstenia***

Estudos citogenéticos têm sido realizados com algumas espécies da família Moraceae. A jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), por exemplo, é um tetraplóide com o número básico de 14 cromossomos ( $x = 14$ ) (HAQ, 2006). Outro exemplo é a figueira comum, *Ficus carica* L., em que a espécie apresenta um número diplóide ( $2n$ ) de cromossomos igual a 26 (PEREIRA e NACHTIGAL, 1999). De acordo com Fagerlind (1944), os membros da família Moraceae são diplóides, com número básico de cromossomos 12, 13, 14, e em casos raros, 15 ou 16 cromossomos. Krause (1931) investigou espécies cultivadas em jardins botânicos alemães: *D. psilurus* Welw, *D. scabra* (Bureau) Engl, e *D. massonii* Bureau e descreveu  $2n = 40$  cromossomos. Uma única espécie, *Dorstenia mannii* Hook. f. foi apontada como tetraplóide com  $2n = 48$  (Fagerlind, 1944).

Cariótipos poliplóides foram investigados desde o início do século passado, com o trabalho de Lutz (1907) e Gates (1909) em *Oenothera*. Atualmente, afirma-se que todas as angiospermas tiveram pelo menos um evento de poliploidização



durante a evolução (ADAMS e WENDEL 2005; OTTO 2007; SOLTIS et al., 2009). Apesar de rara nos animais, a poliploidia é muito comum entre as plantas, com a notável exceção das gimnospermas. Entre 30 e 35% das plantas com flores são poliplóides (STEBBINS, 1971), outros trabalhos estimam que essa percentagem seja de 95% nas pteridófitas e até 80% nas angiospermas (LEITCH e BENNET, 1997).

A poliploidia é um dos eventos citogenéticos mais importantes na evolução das plantas superiores (STEBBINS, 1971). A idéia de que a formação de poliplóides seja um evento raro na natureza foi desafiada pelo trabalho de Soltis e Soltis (1995) e cada vez mais surge evidências de que, em muitos casos, espécies poliploides originaram-se mais de uma vez, ou seja, que a poliploidia tem múltiplas origens (LEITCH e BENNET, 1997; SEGRAVES et al., 1999; SCHIFINO-WITTMANN et al., 1999).

Dados citomorfológicos associados com o valor 2C podem gerar subsídios para inferências sobre a evolução cromossômica e colaborar com os aspectos sistemáticos e taxonômicos de um grupo. Saha et al. (2014) analisando o gênero *Corchorus* (Malvaceae) e o número de cromossomos, conteúdo de DNA e a assimetria dos resultados obtidos do cariótipo, proporcionaram uma compreensão da relação entre as espécies. Estudos envolvendo análise do cariótipo e a determinação conteúdo de DNA também permitem inferências sobre a evolução cromossômica relacionada com rearranjos cromossômicos.

Na família Moraceae existem poucos relatos sobre o conteúdo de DNA nuclear. Em *Ficus carica*, Loureiro et al. (2007) estimou o valor 2C em 0,73 pg (picogramas), corroborando com o valor encontrado por Ohri e Khoshoo (1987). Já a espécie *F. elastica* tem valor estimado em  $2C = 1,52$  pg (KOLAR et al., 2012), podendo ser observado uma variação no conteúdo de DNA nuclear no gênero *Ficus*. Com relação ao gênero *Dorstenia* não existem trabalhos envolvendo o estudo de citometria de fluxo.

Grande parte das aplicações da citometria de fluxo na área da botânica está relacionada com análise do conteúdo de DNA nuclear, seja em termos relativos, como análises de nível de ploidia, seja em termos absolutos, como estimativas do tamanho do genoma (LOUREIRO, 2007). As metodologias

desenvolvidas e aplicadas são baseadas no isolamento e coloração de núcleos vegetais. O método mais simples e eficaz foi desenvolvido em 1983 por Galbraith e colaboradores (GALBRAITH et al., 1983).

A metodologia consiste em obtenção do tecido vegetal (preferencialmente folhas jovens frescas, mas também sementes ou outros tecidos), posteriormente cortado com uma lâmina de barbear em uma placa de Petri com tampão de isolamento de núcleos. Trata-se de uma análise relativamente simples que permite quantificar o número de células que se encontra nas diversas fases do ciclo celular (G1, S e G2), cada fase com conteúdo de DNA distintos: na fase de crescimento celular (G1), uma célula diplóide apresenta um conteúdo 2C (i.e., duas cópias de cada gene); durante a fase (S) ocorre a duplicação do genoma; e na segunda fase de crescimento celular (G2), o conteúdo de DNA nuclear é de 4C. Mesmo folha bastante jovens, o histograma apresenta um pico dominante que corresponde aos núcleos na fase G1, e um pico menor que corresponde aos núcleos na fase G2 (LOUREIRO, 2007). As análises do conteúdo de DNA nuclear utilizam um padrão de referência cujo tamanho do genoma seja previamente conhecido. O padrão deve ser escolhido de acordo com a espécie estudada e com um conteúdo de DNA próximo, que não seja sobreposto aos picos 2C e 4C da planta a analisar (LOUREIRO, 2007). Para estimar o nível de ploidia, a posição do pico G1 de um histograma é comparada com o pico de uma planta padrão com uma ploidia conhecida (DOLEZEL 1997a).

A análise do conteúdo de DNA nuclear por meio da citometria de fluxo nas células em interfase é uma boa alternativa aos métodos microscópicos clássicos de contagem de cromossomos. A citometria de fluxo apresenta as seguintes vantagens: é conveniente, pois a preparação da amostra é fácil, rápida com o processamento de dezenas de amostras num único dia de trabalho, não necessita de células em divisão, é uma metodologia não destrutiva (uma amostra pode ser preparada, p.e., a partir de 50 mg de tecido foliar) e é capaz de detectar mixoploidias. Por estes motivos, a citometria de fluxo é uma metodologia utilizada em diferentes áreas que vão desde a investigação básica até ao melhoramento de plantas e indústria (DOLEZEL, 1997a).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Contribuir para o conhecimento citogenético do gênero *Dorstenia*: *D. arifolia* Lam., *D. bonijesu* Carauta & C. Valente e *D. elata* Hook.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar o número cromossômico;
- Estabelecer parâmetros morfométricos;
- Montar o primeiro kariograma para as três espécies;
- Realizar um estudo morfométrico com base no índice de assimetria intercromossômica;
- Mensurar o conteúdo de DNA nuclear por meio da citometria de fluxo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

Expedições de campo para coletas de exemplares de *Dorstenia* foram realizadas periodicamente em fragmentos de Mata Atlântica no Parque Estadual de Mata das Flores – ES, 20° 35' 54" S e 41° 10' 53" W (Figura 1). Foram coletados indivíduos e ramos vegetativos de *D. arifolia*, *D. bonijesu* e *D. elata*, espécies envolvidas no presente estudo.

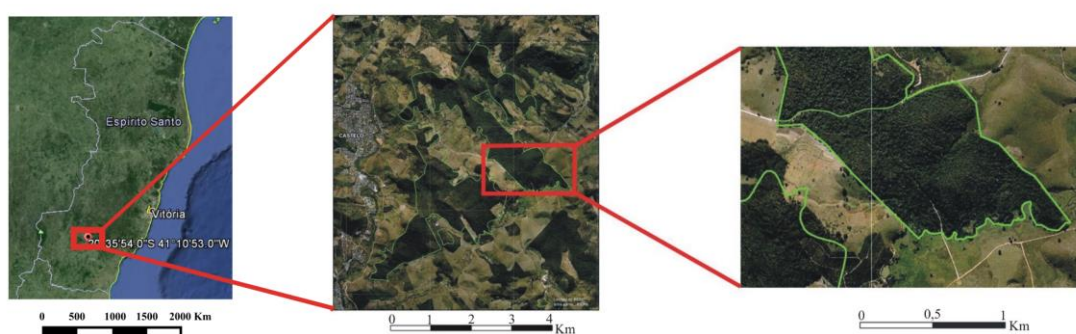


Figura 1: Fragmentos de Mata Atlântica: Parque Estadual de Mata das Flores–ES, 20° 35' 54" S e 41° 10' 53" W. Fonte: Jaqueline Luber.

### 4.2 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi desenvolvida no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal da Universidade Federal de Viçosa – UFV, com o auxílio do Prof. Dr. Carlos Roberto de Carvalho.

Suspensões nucleares foram extraídas por meio de fragmentos de folhas jovens da planta padrão *Solanum lycopersicum* L., com conteúdo de DNA conhecido (2C = 2,00 picogramas; PRAÇA-FONTES et al., 2011), e das amostras de *D. arifolia*, *D. elata* e *D. bonijesu*.

O processamento e análise das amostras obtidas foram adaptados da metodologia sugerida por Galbraith et al. (1983), em que o tecido foliar (aprox. 50 mg) foi cortado (“chopped”) com uma lâmina de barbear, numa placa de Petri

contendo o tampão de lise OTTO-I, a 4°C (OTTO, 1990) suplementado com 2 mM de ditiotreitol e 50 ng mL<sup>-1</sup> de RNase (PRAÇA-FONTES et al., 2011).

Posteriormente, a suspensão foi filtrada por uma rede de nylon com cerca de 50 µm, de forma a eliminar a maior parte dos resíduos obtidos, e em seguida centrifugada a 100 xg durante 5 min (CLARINDO; CARVALHO, 2009). As amostras foram ressuspensas em 100 µL de tampão OTTO-I e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente, coradas com 1,5 mL de OTTO-I:OTTO-II (1:2) (OTTO, 1990), misturado com solução de ditiotreitol a 2 mM, 50 µg mL<sup>-1</sup> de iodeto de propídio (IP) e 50 µg mL<sup>-1</sup> RNase (PRAÇA-FONTES et al., 2011).

Em seguida as preparações foram analisadas em citômetro de fluxo Partec PAS® (Partec® GmbH, Munster, Germany), equipado com uma fonte de laser (488 nm), gerando os histogramas usados para mensurar o conteúdo de DNA nuclear das espécies.

O tamanho do genoma do gênero *Dorstenia* foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$2C_D = \left(\frac{C_1}{C_2}\right) \cdot 2C_S$$

Em que:

2C<sub>D</sub>: valor do conteúdo de DNA 2C (pg) de cada espécie de *Dorstenia*.

C<sub>1</sub>: média do canal do pico G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub> das espécies de *Dorstenia*.

C<sub>2</sub>: média do canal do pico G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub> de *S. lycopersicum*.

2C<sub>S</sub>: valor do conteúdo de DNA 2C de *S. lycopersicum* (2,00 pg).

### 4.3 Citogenética

As análises citogenéticas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias da UFES.

Ramos, de aproximadamente 15 cm e com um par de folhas, foram excisados e desinfestados com uma solução NaOCl<sub>2</sub> a 1% durante 15 min. Esse material foi mantido em sistema hidropônico para a obtenção de raízes. O sistema foi oxigenado por um compressor acoplado a mangueira de plástico, o qual foi imerso em H<sub>2</sub>O.

As raízes obtidas foram excisadas ao atingirem o tamanho de 0,5 – 1,0 cm de comprimento. As mesmas foram submetidas ao tratamento com o bloqueador amiprofos-metil (APM) nas concentrações de 3, 4 e 5µM por um período de 16 a 18h, a uma temperatura aproximada de 4 °C.

Posteriormente, as raízes foram lavadas 3 vezes por 5 min em dH<sub>2</sub>O e submetidas a 3 trocas de 10 min em solução fixadora, metanol: ácido acético na proporção de 3:1. Após três trocas, as raízes foram mantidas em solução fixadora de mesma proporção, sendo armazenadas a -20 °C, por no mínimo 24h (CARVALHO et al., 2007).

Após esse período as raízes foram retiradas da solução fixadora e lavadas duas vezes por 10 min em dH<sub>2</sub>O e secas em papel-filtro. Em seguida, foram transferidas de duas em duas raízes para microtubos (Eppendorf®) de 1,5 ml, contendo enzima pectinase (Sigma®) e dH<sub>2</sub>O, na proporção variando de 1:10 (10 µl enzima : 100 µl água) a 1:80 (10 µl enzima : 800 µl água), por 45 min a 2h30 min à 34 °C em banho-maria. Após a maceração enzimática, as raízes foram novamente lavadas em dH<sub>2</sub>O por um período de 15 min, e fixadas com três trocas de metanol: ácido acético, também na proporção de 3:1, e armazenadas à -20 °C, até o preparo das lâminas.

Em seguida realizou-se a maceração do meristema radicular, sendo as lâminas preparadas por dissociação celular e técnicas de secagem ao ar e em placa aquecedora à 50 °C (Carvalho et al., 2007). Logo após, as lâminas foram coradas em solução Giemsa 5% (Merck®), num intervalo de tempo entre 8-10 min, lavadas em dH<sub>2</sub>O por duas vezes e secas em placa e ao ar.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio Nikon eclipse 80i. As metáfases de interesse foram capturadas na objetiva Nikon Plan Fluor 100x/1.30 oil OFN25 DIC H/N2, com câmera Nikon DS – Fi1c acoplada ao microscópio. As imagens capturadas foram editadas no programa Adobe® Photoshop® CS6.

#### **4.4 Análise morfométrica**

Os cromossomos das três espécies de *Dorstenia* foram caracterizados de acordo com relação entre os braços ( $r = \text{longo} / \text{curto}$ ), como proposto por Levan

et al. (1964) e revisado por Guerra (1986). Para isso, a fórmula utilizada foi:  $r = LL / LS$ , onde:  $r$  = razão entre os braços;  $LL$  = comprimento do braço longo;  $LS$  = comprimento do braço curto.

A assimetria do cariótipo foi avaliada usando o método proposto por Romero Zarco (1986), com a seguinte fórmula:

$$A_2 = \frac{s}{\bar{X}}$$

Em que,  $A_2$  = índice de assimetria intercromossômica;  $s$  = desvio padrão e  $\bar{X}$  = média do comprimento cromossômico.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Citometria de fluxo

As suspensões nucleares obtidas no presente estudo geraram histogramas com picos  $G_0/G_1$  exibindo coeficientes de variação em torno de 3,45%. A partir das análises desses histogramas foi possível calcular o valor para o conteúdo médio de DNA nuclear das três espécies de *Dorstenia* pela primeira vez.

Os valores foram  $2C = 3,49$  pg ( $1C = 1,71$  bp  $\times 10^9$ ) para *D. elata*,  $2C = 4,05$  pg ( $1C = 1,98$  bp  $\times 10^9$ ) para *D. bonijesu*, e  $2C = 5,47$  pg ( $1C = 2,67$  pb  $\times 10^9$ ) para *D. arifolia* (Figura 2). O valor médio de *D. arifolia* foi 36,20% maior do que *D. elata* e 26,00% maior do que *D. bonijesu*, e *D. bonijesu* possui um conteúdo de DNA 13,83% maior do que *D. elata*. Baseado nestes valores, uma variação interespecífica foi encontrada no tamanho do genoma nuclear entre as espécies.



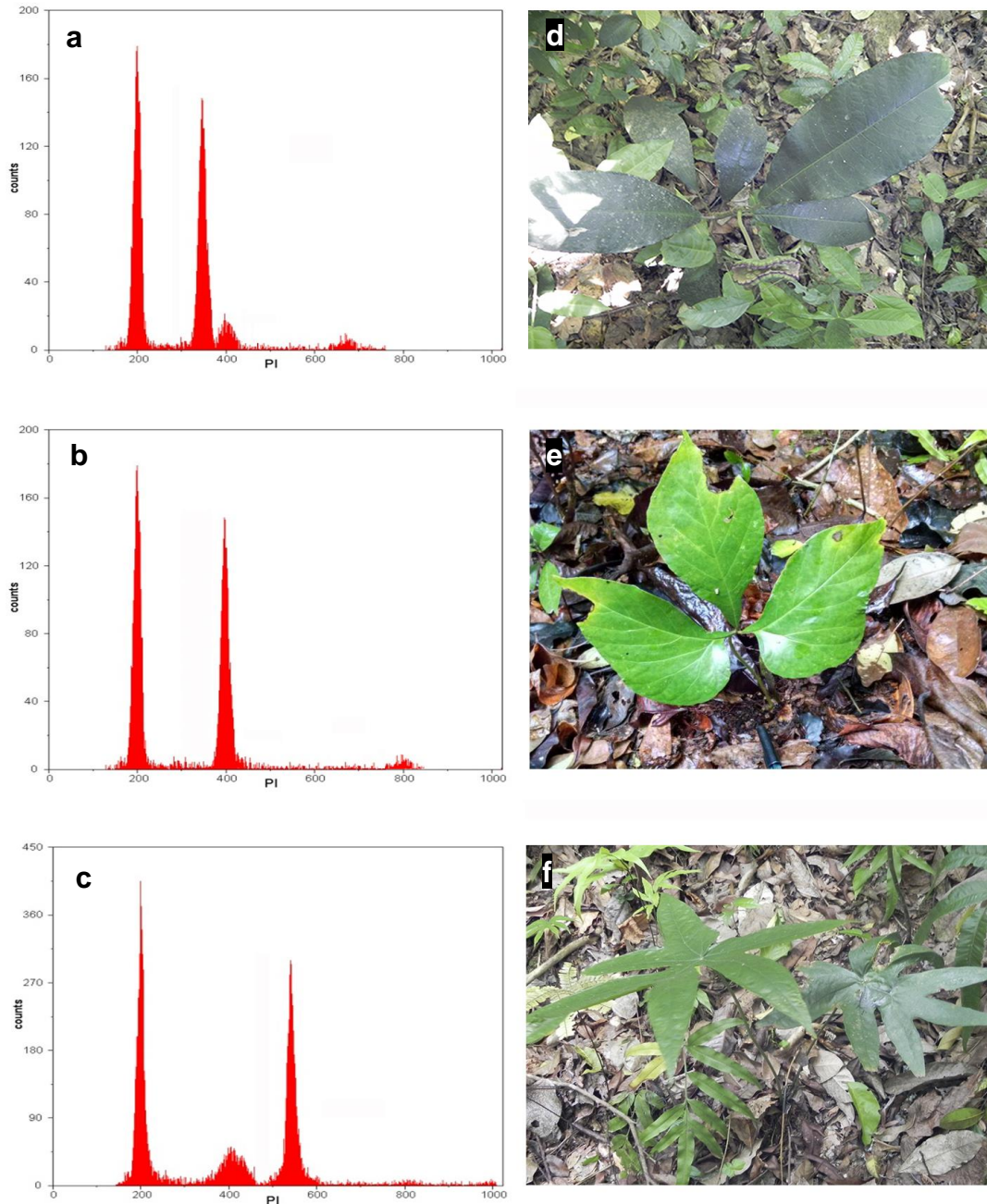


Figura 2: Histogramas gerados a partir da análise de suspensões nucleares coradas com iodeto de propídeo. O padrão interno utilizado foi *S. lycopersicum* ( $2C = 2,00$  pg) padronizado no canal 200. (a) Pico representando os núcleos nas fases  $G_0/G_1$  de *D. elata* ( $2C = 3,49$  pg) no canal 349. (b) Pico representando os núcleos nas fases  $G_0/G_1$  de *D. bonijesu* ( $2C = 4,05$  pg) no canal 405. (c) Pico representando os núcleos nas fases  $G_0/G_1$  de *D. arifolia* ( $2C = 5,47$  pg) no canal 547. (d) *D. elata* em Mata das Flores – ES (Foto: Jaqueline Lubber, 2013). (e) *D. bonijesu* em Mata das Flores – ES (Foto: Karlo Gregório Guidoni Martins, 2015). (f) *D. arifolia* em Mata das Flores – ES (Foto: Jaqueline Lubber, 2013).

## 5.2 Citogenética

As raízes utilizadas na preparação das lâminas foram obtidas por meio do sistema de hidroponia, cujas raízes surgiram após 40 dias. A desinfestação do material vegetal com solução NaOCl<sub>2</sub> a 1% contribuiu para enraizamento relativamente rápido em virtude da ausência de contaminação durante o experimento.

Levando-se em consideração a falta de estudos citogenéticos para o gênero *Dorstenia* foram empregados diferentes tratamentos com o inibidor de microtúbulos APM. Notou-se que meristemas tratados com 4µM apresentou melhor resultado em relação às demais concentrações, com tempo adequado para *D. arifolia* de 16h e para *D. bonijesu* e *D. elata* de 18h, à 4°C.

Tempos distintos também foram testados com a maceração enzimática. O melhor resultado foi obtido com tempo de 1 h 45 min em banho-maria a 34 °C, na proporção de 1:60 µl (10 µl enzima: 600 µl água) com duas raízes em cada Eppendorf. Com relação à coloração, o melhor tempo de exposição das lâminas ao corante Giemsa foi de 8 min.

As preparações e técnicas citogenéticas empregadas resultaram em metáfases adequadas para a caracterização do cariótipo das espécies de *Dorstenia*. Não houve sobreposição dos cromossomos metafásicos, e os mesmos apresentaram centrômero bem definido e com estrutura da cromatina preservada (Figura 3). Além destes aspectos, os distintos níveis de compactação da cromatina evidenciada entre as metáfases de cada espécie possibilitaram a análise morfométrica e a montagem dos cariogramas (Figura 4; Tabela 1). Todas as espécies de *Dorstenia* apresentaram um número conservado de 32 cromossomos.

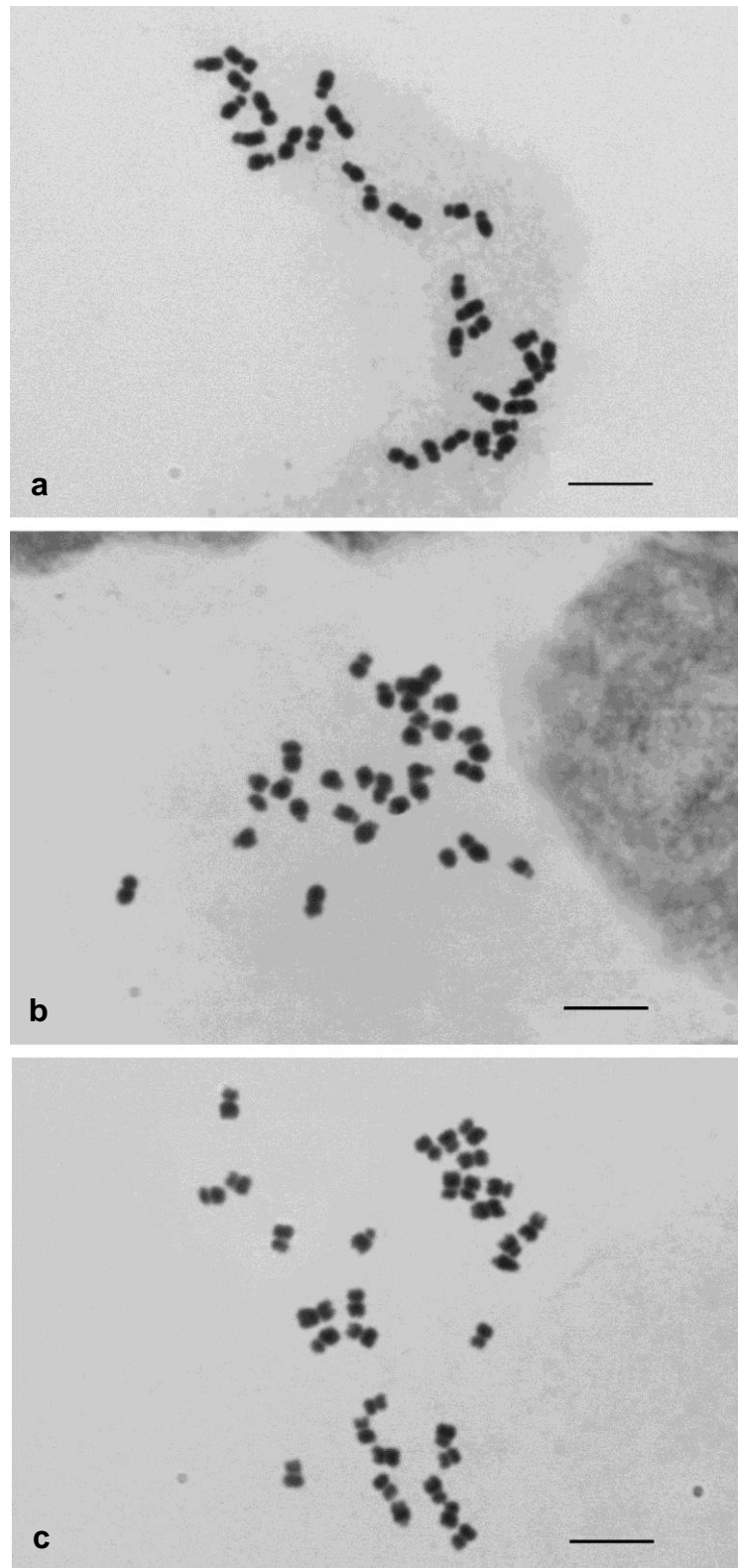


Figura 3: Cromossomos metafásicos de espécies do gênero *Dorstenia* ( $2n = 32$  cromossomos), obtidos de células meristemáticas tratadas com APM  $4 \mu\text{M}$ , durante 16h, (a) *D. arifolia*; e tratadas com APM  $4 \mu\text{M}$ , durante 18h, (b) *D. bonijesu* e (c) *D. elata*. Cromossomos corados com Giemsa 5%. Barra =  $5 \mu\text{m}$ .

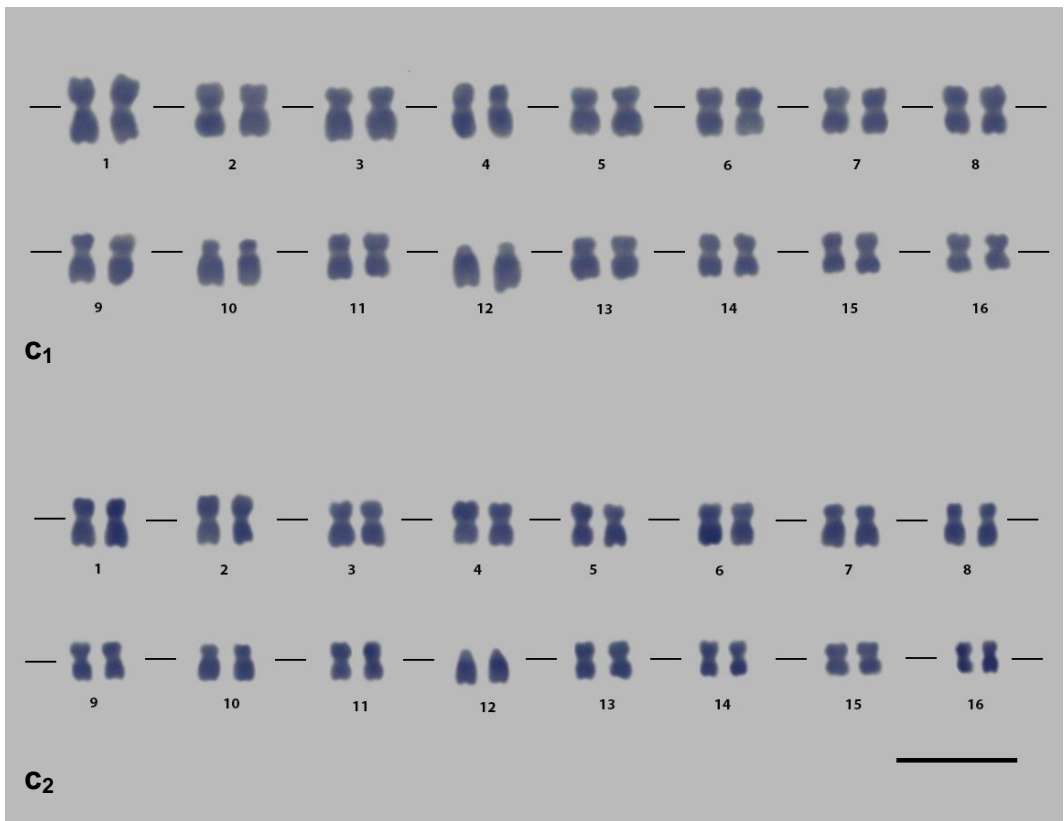
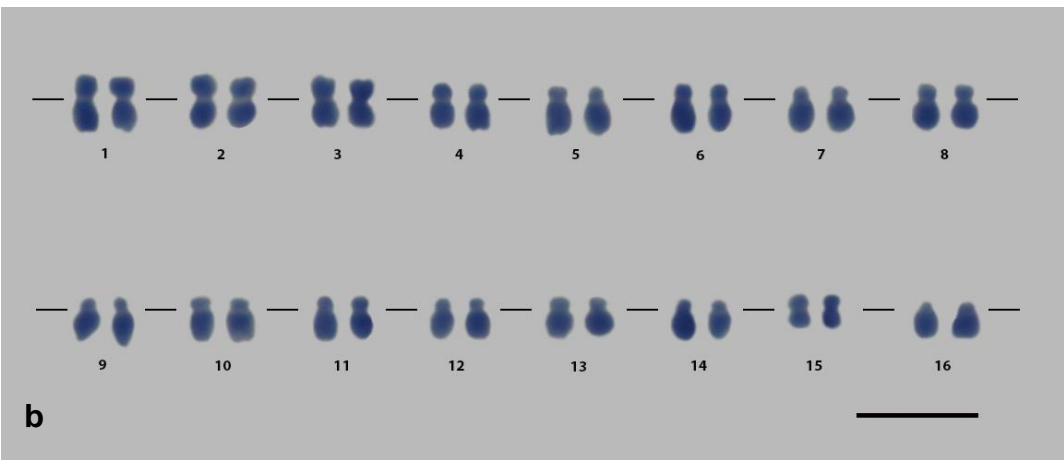
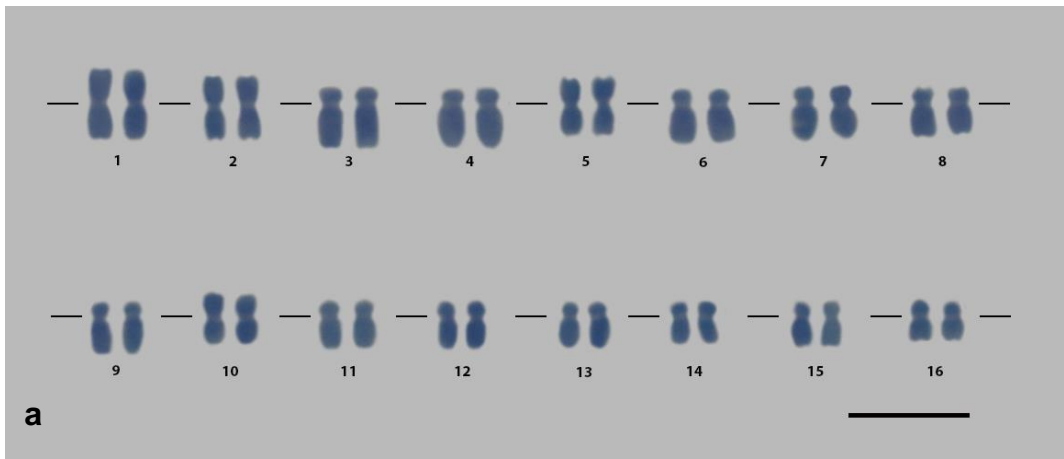


Figura 4: Cariogramas de espécies do gênero *Dorstenia* ( $2n = 32$  cromossomos), montados a partir de cromossomos metafásicos obtidos de raízes tratadas com APM  $4 \mu\text{M}$ , durante 16h, (a) *D. arifolia*; e tratadas com APM  $4 \mu\text{M}$ , durante 18h, (b) *D. bonijesu* e ( $c_1$  e  $c_2$ ) *D. elata*. Todos os cromossomos foram corados com Giemsa 5%. Observar os diferentes graus de compactação dos cromossomos em *D. elata*. Barra =  $5 \mu\text{m}$ .

### 5.3 Análise morfométrica

Os valores médios do somatório do comprimento total, dos braços curtos e longos, também diferiram entre as espécies. *D. arifolia* apresentou o maior comprimento total, comprimento dos braços curto e longo em relação às outras duas espécies, corroborando com dados da citometria de fluxo.

*D. bonijesu* exibiu um valor médio de conteúdo de DNA e apresentou o menor comprimento total de cromossomos e braço curto. Em comparação com *D. elata*, *D. bonijesu* apresentou um valor médio maior para o braço longo (Tabela 1).

O índice  $A_2$  também oscilou entre as espécies: *D. bonijesu* apresentou o cariótipo com  $A_2 = 0,16$ , seguido por *D. arifolia*  $A_2 = 0,14$  e *D. elata*  $A_2 = 0,13$ .

A partir dos dados morfométricos, a classificação dos cromossomos foi determinada e foram confirmadas as diferenças entre os cariótipos para as três espécies. *D. arifolia* apresentou quatro pares de cromossomos metacêntricos (1, 2, 4, 10) e 12 pares submetacêntricos (3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16) (Tabela 1). *D. bonijesu* apresentou quatro pares metacêntricos (1, 2, 3, 15), dez pares submetacêntricos (4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14) e dois pares acrocêntricos (7 e 16) (Tabela 1). Em *D. elata* foram evidenciados doze pares metacêntricos (1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16), três pares submetacêntricos (3, 6 e 10) e um par acrocêntrico (11) (tabela 1).

Das três espécies analisadas *D. elata* apresentou o maior comprimento relativo (8.01%) para o tamanho do cromossomo 1 e *D. bonijesu* o menor valor (4.59%) para o cromossomo 16. Esses valores correspondem ao tamanho de cada cromossomo no cariótipo das espécies.

Tabela 1 – Morfometria dos cromossomos metafásicos de *D. arifolia*, *D. bonijesu* e *D. elata* (2n = 32)

Nº Crom.	<i>Dorstenia arifolia</i>						<i>Dorstenia bonijesu</i>						<i>Dorstenia elata</i>					
	Total (µm)	Braço		r	Clas. R	Comp. (%)	Total (µm)	Braço		r	Clas. r	Comp. (%)	Total (µm)	Braço		r	Clas. r	Comp. (%)
		Curto	Longo					Curto	Longo					Curto	Longo			
1	5.39	2.57	2.82	1.10	M	7.93	4.50	1.95	2.55	1.31	M	7.97	4.72	2.09	2.63	1.26	M	8.01
2	5.21	2.45	2.76	1.13	M	7.67	4.27	1.90	2.37	1.25	M	7.56	4.27	2.00	2.27	1.14	M	7.25
3	4.87	1.48	3.39	2.29	SM	7.17	4.04	1.81	2.23	1.23	M	7.15	4.21	1.66	2.55	1.54	SM	7.15
4	4.81	2.27	2.54	1.12	M	7.08	4.00	1.45	2.55	1.76	SM	7.08	3.87	1.78	2.09	1.17	M	6.57
5	4.69	1.39	3.30	2.37	SM	6.9	3.86	1.27	2.59	2.04	SM	6.83	3.84	1.75	2.09	1.19	M	6.52
6	4.36	1.42	2.94	2.07	SM	6.42	3.81	1.45	2.36	1.63	SM	6.75	3.81	1.48	2.33	1.57	SM	6.47
7	4.33	1.39	2.94	2.12	SM	6.37	3.72	0.90	2.82	3.13	A	6.59	3.81	1.69	2.12	1.25	M	6.47
8	4.18	1.45	2.73	1.88	SM	6.15	3.59	1.22	2.37	1.94	SM	6.36	3.72	1.57	2.15	1.37	M	6.32
9	4.18	1.27	2.91	2.29	SM	6.15	3.59	1.22	2.37	1.94	SM	6.36	3.66	1.54	2.12	1.38	M	6.21
10	3.93	1.81	2.12	1.17	M	5.78	3.54	1.00	2.54	2.54	SM	6.27	3.59	1.13	2.46	2.18	SM	6.10
11	3.93	1.36	2.57	1.89	SM	5.78	3.40	0.95	2.45	2.58	SM	6.02	3.54	0.63	2.91	4.62	A	6.01
12	3.84	1.39	2.45	1.76	SM	5.65	3.04	0.86	2.18	2.53	SM	5.38	3.48	1.63	1.85	1.13	M	5.91
13	3.78	1.21	2.57	2.12	SM	5.56	2.95	0.95	2.00	2.11	SM	5.22	3.30	1.33	1.97	1.48	M	5.60
14	3.63	1.18	2.45	2.08	SM	5.34	2.95	0.81	2.14	2.64	SM	5.22	3.24	1.42	1.82	1.28	M	5.50
15	3.51	1.24	2.27	1.83	SM	5.16	2.63	1.09	1.54	1.41	M	4.66	3.03	1.30	1.73	1.33	M	5.14
16	3.33	1.21	2.12	1.75	SM	4.9	2.59	0.59	2.00	3.39	A	4.59	2.81	1.36	1.45	1.07	M	4.77
Total	67.97	25.09	42.88	-	-	100.00	56.48	19.42	37.06	-	-	100.00	58.9	24.36	34.54	-	-	100.00

r - razão entre braços longo e curto; M – metacêntrico; SM – submetacêntrico; A – acrocêntrico.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Citometria de fluxo

As suspensões nucleares geraram histogramas com picos  $G_0/G_1$  exibindo coeficientes de variação (CV = desvio padrão dividido pela média) em torno de 3,45%. Para uma análise de qualidade, esse coeficiente pode apresentar valores, em células vegetais, entre 1 e 10% (DOLEZEL, 1991). Vários autores têm demonstrado a importância dos CVs nos picos  $G_1$  para boas estimativas da quantidade de DNA, em trabalhos com citometria de fluxo. De acordo com Dolezel e Bartos (2005), valores de CV inferiores a 5% são considerados adequados para análises citométricas. Galbraith et al. (2002) também definiram valores abaixo de 5% como ideal para quantificações em plantas.

A partir das análises desses histogramas foi possível calcular o valor para o conteúdo médio de DNA nuclear das três espécies de *Dorstenia*, que variou de  $2C = 3,49$  pg a  $2C = 5,47$  pg para as espécies *D. elata* e *D. arifolia*, respectivamente. Tais valores permitiram inferir que *D. elata* é mais derivada em relação às outras duas espécies, por possuir menor conteúdo de DNA. Diferentes técnicas possibilitam determinar o tamanho do genoma de uma espécie, no entanto a citometria de fluxo pode ser utilizada na pesquisa em plantas para a determinação do conteúdo de DNA nuclear, nível de ploidia, para a análise de ciclo celular, identificação de cromossomos específicos, organização do genoma no núcleo, e para a determinação do sexo (DOLEZEL e GOHDE, 1995). A citometria de fluxo é uma metodologia precisa de fácil aplicação, reprodutível, e que demanda poucas amostras de material vegetal, e a obtenção de resultados é rápida (SOUZA et al., 2008).

Diferenças encontradas no conteúdo de DNA como as documentadas no presente trabalho, podem envolver sequências repetitivas, que não traduzem proteínas funcionais (FLAVELL, 1986), variações cromossômicas causadas por deleções, duplicações, aneuploidias espontâneas e poliploides, cromossomos B e, em alguns casos, cromossomos sexuais (GREILHUBER, 1998). Sabe-se que existe, quase sempre, algum grau de variação do cromossomo dentro da



população, que irão, naturalmente, provocar algumas variações no conteúdo de DNA entre os indivíduos (GREILHUBER, 1998).

O valor do conteúdo de DNA nuclear das espécies de *Dorstenia* foi obtido por comparação com um padrão de referência. Johnston et al. (1999) consideraram que a escolha do padrão é um passo crítico para estas estimativas e recomendam que este tenha um conteúdo de DNA próximo, mas não sobreposto aos picos 2C e 4C da planta analisada. O padrão *S. lycopersicum*, utilizado no presente estudo, é considerado um dos melhores, de acordo com Praça- Fontes et al. (2011), pois quando analisado com os demais, mostrou-se como um padrão primário de referência ideal para mensuramento via citometria de fluxo.

No presente estudo foi utilizado o tampão Otto (OTTO, 1990). Segundo Dolezel e Bartos (2005) e Loureiro et al. (2006), esse tampão provê histogramas que apresentam núcleos G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> com resolução adequada, sendo, por esse motivo, considerado ideal em análises envolvendo espécies com conteúdo de DNA nuclear relativamente baixo. O Triton X-100 é geralmente usado em todos os tampões como detergente não iônico. Por vezes, são adicionados ao tampão, agentes redutores (mercaptoetanol, polivinilpirrolidona, etc.) que têm como função inibir a ação de compostos fenólicos (ENDEMANN et al., 2002; GALBRAITH et al., 2002).

O corante usado para corar os núcleos das espécies de *Dorstenia* em suspensão foi o iodeto de propídio. O IP é um dos corantes mais utilizados para avaliação do conteúdo de DNA, pois tem a propriedade de se intercalar em pequenas sequências de bases nucleotídicas e fluoresce na faixa do espectro luminoso visível do vermelho (617nm), quando excitado por um laser 488 nm (azul) (SANTOS et al., 2014).

Nas angiospermas os valores C podem variar até 600 vezes, de menos de 0,2 pg em *Arabidopsis thaliana* a 127,4 pg em *Fritillaria assyriaca* (BENNET e LEITCH, 1997). O valor médio do conteúdo de DNA nuclear de *D. arifolia* foi 36,20% maior do que *D. elata* e 26,00% maior do que *D. bonijesu*, e *D. bonijesu* possui um conteúdo de DNA 13,83% maior do que *D. elata*. Fundamentado nestes valores, sugere-se que uma variação interespecífica foi encontrada no tamanho do genoma nuclear entre as espécies.

A citometria de fluxo tem sido uma ferramenta eficiente na identificação de variações intra e interespecíficas, como exemplo no gênero *Pinus*, o que possibilita melhor entendimento dos mecanismos de plasticidade do DNA e auxilia no esclarecimento do processo evolutivo das espécies (NUNES, 2008). A mesma autora realizou um trabalho onde foram avaliadas as espécies *P. oocarpa* Schiede ex Schltda, *P. patula* Schltdl e Cham e *P. tecunumanii* Eguiluz e J. P. Perry, todas com  $2n = 24$  cromossomos. Um dos objetivos foi observar a ocorrência de variações na quantidade de DNA nuclear através da citometria de fluxo. Em *P. patula* foi encontrado o maior conteúdo de DNA entre as três espécies e em *P. tecunumanii* houve variação intraespecífica no conteúdo de DNA de quatro procedências analisadas.

Oliveira (2011), também observou diferença na quantidade de DNA nuclear entre *Eutерpe edulis*, *E. oleracea* e *E. precatoria*. Os valores foram significativamente maiores em *E. precatoria* que nas outras duas espécies, indicando a ocorrência de rearranjos estruturais que poderiam ter levado a essa diferenciação.

O valor C de DNA é um caráter de significado biológico fundamental e o conhecimento da quantidade de DNA nuclear em um grupo de organismos pode ser útil em vários campos da pesquisa, como biologia molecular e celular, ecologia e sistemática (BENNET; LEITCH, 1995). O conhecimento do tamanho do genoma também é importante para outros campos da investigação, incluindo taxonomia e evolução (KRON; SUDA; HUSBAND, 2007). Este conhecimento tem sido bastante útil também em estudos de relações filogenéticas (ZOLDOS et al., 1998; LYSÁK et al., 1999; TORRELL e VALLES, 2001; MOSCONE et al., 2003; SUDA et al., 2003).

## **6.2 Citogenética**

Meristemas radiculares das plantas de *Dorstenia*, obtidas por meio do sistema de hidroponia, tratados com APM 4  $\mu\text{M}$  apresentaram melhores resultados em relação às demais concentrações. De acordo, Dolezel et al. (1999) e Planchais et al. (2000), o APM apresenta alta afinidade de ligação com tubulinas vegetais e impede acontecimento da anáfase.

No presente estudo, o fixador utilizado na proporção de 3:1 (metanol: ácido acético) foi essencial para manter a integridade dos cromossomos, assim como observado por Yoshitome et al. (2008) em *Theobroma speciosum* (L.) Willd. Outra etapa considerada importante refere-se à maceração enzimática das espécies. A enzima utilizada neste estudo foi pectinase (Sigma<sup>®</sup>), com melhor resultado na proporção de 1:60 µl a 34 °C. Com isso a parede celular foi eliminada, sem intervir na morfologia dos cromossomos.

A melhor coloração foi obtida com exposição das lâminas em corante Giemsa por um período de 8 min. A orceína acética, o carmim acético e o reativo de Schiff são, geralmente, os corantes mais utilizados para vegetais. Por outro lado, o corante Giemsa (uma mistura de corantes estabelecida por Gustav Giemsa) é o mais utilizado na citogenética humana e animal (principalmente para vertebrados). Posteriormente, o uso desse corante foi aplicado também a vegetais e, com a citogenética de plantas, a coloração com Giemsa, ou com hematoxilina, produz os melhores resultados, tanto para mitose quanto para meiose (GUERRA e SOUZA, 2002). A visualização dos cromossomos mitóticos, para estudo do cariótipo e análise do ciclo celular, é geralmente feita pela coloração convencional. A respeito dessa técnica, o uso do corante Giemsa é um dos mais empregados para o estudo dos cromossomos metafásicos, os quais são corados por igual sem nenhuma preferência por determinado tipo de cromatina, composição de DNA ou de proteínas (GUERRA; SOUZA, 2002).

As preparações e técnicas citogenéticas empregadas possibilitaram encontrar metáfases adequadas para a caracterização do cariótipo das três espécies de *Dorstenia*. Apesar de elas apresentarem o mesmo número de cromossomos ( $2n = 32$ ), a mensuração do conteúdo de DNA e as análises morfométricas dos cariótipos evidenciaram diferenças entre as mesmas. Comparação entre cariótipos também foi documentada por Oliveira (2011) para as espécies *E. edulis*, *E. oleracea* e *E. precatória*. Todas as espécies apresentaram  $2n=36$  cromossomos, sendo eles distintos quanto ao tamanho e morfologia, sugerindo  $x = 18$  como número básico para o gênero. Apesar da igualdade numérica, *Euterpe* mostrou-se um grupo que apresenta diferenças quanto à morfologia cromossômica, sugerindo que alterações estruturais podem ter contribuído para a diversificação do gênero.

Em grupos de espécies que exibem número cromossômico conservado, variações no tamanho do genoma podem ser úteis na definição de divisões taxonômicas. De acordo com Guerra (1988), descrições citogenéticas bem como a quantidade de DNA nuclear (KRON et al., 2007) são úteis em inferências filogenéticas e taxonômicas em grupos de plantas, por fornecerem relevantes informações acerca do processo evolutivo sofrido pelas espécies (OLIVEIRA, 2011).

Eventos de poliploidização podem encontrar-se envolvidos na evolução das plantas, este tipo de modificações no genoma é provavelmente o fator mais importante na formação de espécies simpátricas (OTTO e WHITTON, 2000). Rearranjos cromossômicos posteriores ao processo de poliploidização colaboram com o isolamento reprodutivo que pode levar a especiação (RIESEBERG, 2001). Além de características reprodutivas, a poliploidia age sobre a evolução das vias metabólicas, atributos morfológicos e outras características adaptativas importantes (ADAMS e WENDEL, 2005).

A poliploidia é provavelmente a alteração citogenética mais importante na especiação e evolução vegetal (MADAIL, 2011).

A família Moraceae apresenta membros diplóides, com número básico de cromossomos 12, 13, 14, e em alguns casos, 15 ou 16 cromossomos (FAGERLIND, 1944). Na literatura existe relato de dados citogenéticos para poucas espécies do gênero *Dorstenia*. Espécies cultivadas em jardins botânicos alemães: *D. psilurus* Welw, *D. scabra* (Bureau) Engl, e *D. massonii* Bureau foram descritas com  $2n = 40$  cromossomos (KRAUSE, 1931). Dentro do gênero uma única espécie, *Dorstenia mannii* Hook. f. foi apontada como tetraplóide com  $2n = 48$  (FAGERLIND, 1944). Contudo evidências do presente trabalho mostram que as três espécies aqui estudadas podem ter uma origem poliploide, como observado pelas análises morfométricas.

### 6.3 Análise morfométrica

Os resultados do índice de assimetria cromossômica  $A_2$  variaram entre as espécies de *Dorstenia*. *D. bonijesu* apresentou  $A_2 = 0,16$ , seguido por *D. arifolia*  $A_2 = 0,14$  e *D. elata*  $A_2 = 0,13$ . A assimetria intercromossômica ( $A_2$ )

reflete a variação entre os cromossomos do complemento. O estudo minucioso desse índice de assimetria em alguns grupos de plantas permite uma compreensão clara do sentido da evolução cariotípica (BARELLA e KARSBURG, 2007).

Espécies de maior índice de assimetria cariotípica podem indicar plantas mais primitivas, enquanto que as mais recentes evolutivamente caracterizam-se por possuir índice com resultado menor (STEBBINS 1971). No presente estudo, *D. elata* apresentou menor valor, podendo ser considerada mais derivada em relação à *D. bonijesu* e *D. arifolia*. Misiewicz e Zerega (2012) realizaram um trabalho que apresentou a primeira filogenia molecular e o primeiro estudo da origem evolutiva e diversificação dentro do gênero *Dorstenia*. Uma árvore filogenética demonstrou a possível origem e diversificação de algumas espécies no Velho e Novo mundo. No referido trabalho, *D. elata* foi apresentada como mais recente em relação à *D. arifolia*. No entanto, os autores não realizaram uma comparação com *D. bonijesu*, o que impossibilita concluir claramente a posição de cada espécie evolutivamente.

Para assimetria cariotípica foi avaliado somente o índice  $A_2$  de Romero Zarco (1986). Esse índice representa um dos valores que podem ser utilizados principalmente entre táxons, para inferir sobre os aspectos taxonômicos e evolutivos (PASZKO, 2006). Para assimetria intracromossômica ( $A_1$ ), Paszko (2006) propõe o índice CVCI (índice centromérico de coeficiente de variação). No entanto, este índice não expressa a predominância de telocêntricos e acrocêntricos, mas a heterogeneidade entre os locais centroméricos de um cariótipo. Como existe uma lacuna a ser preenchida com as estimativas de assimetria intracromossômica (PERUZZI e EROGLU, 2013) esse índice não foi avaliado neste trabalho.

Oliveira (2011) calculou o índice assimétrico nas espécies: *E. edulis*, *E. oleracea* e *E. precatória*. As diferenças da posição do centrômero e do tamanho dos cromossomos se refletiram nos valores  $A_1$  e  $A_2$ , onde as três espécies do gênero *Euterpe* apresentaram níveis parecidos de assimetria com relação ao tamanho dos cromossomos, todavia, *E. oleracea* se diferenciou das outras duas, no que diz respeito à posição do centrômero, apresentando cariótipo mais simétrico.

Com a obtenção dos dados morfométricos, a classificação dos cromossomos foi determinada e foram constatadas diferenças entre os cariótipos para as três espécies. *D. arifolia* apresentou quatro pares de cromossomos metacêntricos e doze pares submetacêntricos; *D. bonijesu* apresentou quatro pares metacêntricos, dez pares submetacêntricos e dois pares acrocêntricos; e em *D. elata* foram evidenciados doze pares metacêntricos, três pares submetacêntricos e um par acrocêntrico. Com isso é possível observar que as três espécies apresentaram cariótipo simétrico. Um cariótipo simétrico é caracterizado pela predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos com aproximadamente o mesmo tamanho (PASZKO, 2006).

Fazendo uma comparação com o que foi citado anteriormente, observa-se, que nas três espécies analisadas nesse trabalho os cromossomos 1 e 2 são metacêntricos, os de número 6 são submetacêntricos, mas os de números 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 são todos diferentes (Tabela 1). Os pares 11, 12, 13 e 14 são semelhantes em *D. arifolia*. Em *D. bonijesu* os que mais se assemelharam foram os pares 1, 2 e 3. Em *D. elata* os pares 13, 14, 15 e 16 também são semelhantes. No cariograma de *D. elata* é possível visualizar os diferentes graus de compactação, bem como em alguns pares das outras duas espécies, que se encontram mais compactados em relação aos demais (Figura 4). Essas informações podem inferir em uma possível origem poliploide para tais espécies.

As três espécies possuem 32 cromossomos. Mas as mesmas apresentaram conteúdo de DNA bem como o índice de assimetria com resultados diferentes. Somado a isso as espécies habitam ambientes e apresentam morfologias diferentes (Figura 2).

Diante de tudo que foi exposto fica evidenciado que não existe correlação entre o número de cromossomos, o conteúdo de DNA, a morfometria cromossômica, o habitat e morfologia das plantas, pois mesmo as três espécies com número cromossômico igual ( $2n = 32$ ), elas demonstraram diferenças nas outras características observadas.

## 7. CONCLUSÕES

Embora as espécies *D. arifolia*, *D. bonijesu* e *D. elata* tenham apresentado uniformidade numérica com  $2n = 32$  cromossomos, *Dorstenia* mostrou-se um grupo heterogêneo quanto ao conteúdo de DNA nuclear, índice de assimetria cromossômica e morfologia. Alterações estruturais podem ter contribuído para a diversificação e evolução cariotípica do gênero.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGAZ, B. M.; NGADJUI, B. T.; DONGO, E.; NGAMENI, B.; NINDI, M. N.; BEZABIH, M. Chalcones and other constituents of *Dorstenia prorepens* and *Dorstenia zenkeri*. **Phytochemistry**. 59:877-883. 2002.

ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**. 8:135–141. 2005.

AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; REIS, A. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; MACEDO, R. O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16(Supl.): 696-720. 2006.

ARAÚJO, L. M.; VIEIRA, M. F.; GODOY, A. G. Biologia reprodutiva de *Dorstenia bonijesu* – Moraceae. **Albertoia** 28: 197-204. 2007.

BARELLA, A. P. W. ; KARSBURG, I. V. Caracterização morfológica dos cromossomos mitóticos de *Parkia pendula* (WILLD.) BENTH ex WALP. e *Dinizia excelsa* DUCKE (FABACEAE, MIMOSOIDEAE). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.5, n.1, p.85- 93, 2007.

BAUER, L.; NOLL, I. B. Furanocumarinas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. **Caderno de Farmácia** 2: 163-170. 1986.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amount in angiosperms. **Annals of Botany**. 76: 113 – 176. 1995.

BENNET, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: 583 new estimates. **Annals of Botany**. 80:2,169 – 196. 1997.

BERG, C. C. Urticales, their differentiation and systematic position. **Plant Systematics and Evolution** 1: 349-374. 1977.

BERG, C. C.; HIJMAN, M. E. E. The genus *Dorstenia* (Moraceae). **Ilicifolia**, 2: 1-211, 1999.

BERG, C. C. Moreae, Artocarpeae and *Dorstenia* (Moraceae). With introduction to the family and *Ficus* and with additions and corrections to Flora Neotropica Monograph 7. Fl. **Neotropica Monographs** 83: 1-346, 2001.

BOTSARIS, A. S.; MACHADO, P. V. Memento terapêutico. Rio de Janeiro. RJ, Laboratório Flora Medicinal. J. Monteiro da Silva, 1999.



- CACERES, A.; RASTRELLI, L.; DE SIMONE, F.; DE MARTINO, G.; SATURNINO, C.; SATURNINO, P.; AQUINO, R.. Furanocumarins from the aerial parts of *Dorstenia contrajerva*. **Fitoterapia** 72: 376-381. 2001.
- CARAUTA, J. P. P.; VALENTE, M. C. *Dorstenia* L. (Moraceae) dos estados da Guanabara e do Rio de Janeiro. **Rodriguésia** 39: 225-296, 1974.
- CARAUTA, J. P. P. *Dorstenia* L. (Moraceae) do Brasil e países limítrofes. **Rodriguésia** 29: 53-233, 1978.
- CARAUTA, J. P. P. ; CASTRO, M. W. Plantas em perigo de extinção: *Dorstenia*. Flora - alguns estudos – I. Série Trabalhos Técnicos no. 1/82: 29-65. **Cadernos FEEMA**, Rio de Janeiro. 1982.
- CARAUTA, J. P. P.; VALENTE, M. C. *Dorstenia* (Moraceae). Notas complementares IV. **Atas da Sociedade Botânica do Brasil**, 1:111-122, 1983.
- CARAUTA, J. P. P. *Ficus* (Moraceae) no Brasil: Conservação e taxonomia. **Albertoa** 2: 1-365. 1989.
- CARAUTA, J. P. P; DIAZ, E. B. **Figueiras no Brasil**. Rio de Janeiro, Ed. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.
- CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; BARISON, A.; HONDA, N. K. Simultaneous determination of furanocumarins in infusions and decoctions from “Carapiá” (*Dorstenia* species) by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50: 1465-1469. 2002.
- CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; ALMEIDA, P. M. Plant cytogenetics: still looking for the perfect mitotic chromosomes. **Nucleus** 50: 53-462. 2007.
- CARVALHO, A. F. ***Dorstenia cayapia*: Aspectos agronômicos**. 61p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2008.
- CASAGRANDE, C.; RONCHETTI, F.; RUSSO, G. Structure of syriogenin. **Tetrahedron** 30: 3587-3589. 1974.
- CELEGHINI, R. M. S.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M. Otimização das condições de extração hidroalcoólica das furanocumarinas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. por maceração com ultra-som e análise quantitativa por CLAE/UV e fluorescência. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 9: 61-66. 2007.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. Comparison of the *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 73–81, 2009.

DATWYLER, S. L.; WEIBLEIN, G. D. On the origin of the fig: Phylogenetic relationships of the Moraceae from *ndhF* sequences. **American Journal of Botany**. 91(5): 767-777, 2004.

DIMO, T.; RAKOTONIRINA, A.; TAN, P. V.; DONGO, E.; DONGMO, A. B.; KAMTCHOUING, P.; AZAY, J.; ABEGAZ, B. M.; CROS, G.; NGADJUI, T. B. Antihypertensive effects of *Dorstenia psilurus* extract in fructose-fed hyperinsulinemic, hypertensive rats. **Phytomedicine** 8: 101-106. 2001.

DOLEZEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis** . 2: 143 – 154. 1991.

DOLEZEL, J.; GOHDE, W. Sex Determination in Dioecious Plants *Melandrium album* and *M. rubrum* Using High-Resolution Flow Cytometry. **Cytometry**. 19: 103 – 106. 1995.

DOLEZEL, J.. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics** 38 (3): 285-302. 1997a.

DOLEZEL, J.; CIHALIKOVA, J.; WEISEROVA, J.; LUCRETTI, S. Cell cycle synchronization in plant root meristems. **Methods in Cell Science**, 21: 95-107, 1999.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. **Annals of Botany**. 95: 99 – 110. 2005.

DUMONT, E. R.; WEIBLEIN, G. D.; WINKELMANN, J. R. Preference of fig wasps and fruit bats for figs of functionally dioecious *Ficus pungens*. **Journal of Tropical Ecology**. 20: 233-238. 2004.

ENDEMANN, M. ; HRISTOFOROGLU, K.; STAUBER, T.; WILHELM, E. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. **Biologia Plantarum** 44 (3): 339-345. 2002.

FAGERLIND, F. Die Samenbildung und die Zytologie bei agamospermischen und sexuellen Arten von *Elatostema* und einigen nahestehenden Gattungen nebst Beleuchtung einiger damit zusammenhängender Probleme. Kungl. Sven. Vet. Akad. Handl Ser. 3: 21(4). 1944.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology and Systematics** 34: 487-515. 2003.

FIGUEIREDO, R. A. Ingestion of *Ficus enormis* seeds by howler monkeys (*Alouatta fusca*) in Brazil: effects on seed germination. **Journal of Tropical Ecology**. 9: 541-543. 1993.

FIGUEIREDO, R. A. A comparison of the quality of dispersion of *Ficus eximia* Schott (Moraceae) by birds and bats in southeastern Brazil. **Leandra** 14: 37-42. 1999.

FLAVELL, R. B. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B**. 312: 227 – 242. 1986.

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** 220 (4601): 1049-1051. 1983.

GALBRAITH, D.; LAMBERT, G.; MACAS, J. E DOLEŽEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. Current Protocols in cytometry, Eds Robinson, J., Azmi, A. e Tutois, S. John Wiley & Sons, Inc., New York. 2002.

GATES, R. R.. The stature and chromosomes of *Oenothera gigas*. De Vries. Arch. Zellforschung 3: 525-552. 1909.

GRANVILLE, J. J. Notes sur la biologie florale de quelques espèces du genre *Dorstenia* (Moracées). Cahiers ORSTOM. **Série Biologie**, 15: 61-97, 1971.

GREILHUBER, J. Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. **Annals of Botany**. 82 (Suppl. A): 27 – 35. 1998.

GUARIM NETO, G; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasílica**. 17: 561-594. 2003.

GUERRA, M. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**, 9: 741-743, 1986.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A.E.B.; CORNÉLIO, M.T.M.; SANTOS, K.; SOARES FILHO, W.S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. **Genetics and Molecular Biology**, 20: 489-496, 1997.

GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. [S. l.]: Guanabara, p.142, 1988.

GUERRA, M. Chromosome number variation and evolution in monocots. In WILSON, K.L.; MORRISON, D.A. (Eds.): **Monocots – Systematics and Evolution** – Vol.1 – Proceedings of the Second International Conference on the Comparative Biology of the Monocots, pp.125-134. Melbourne: CSIRO, 2000.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos : um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal, e humana** -- Ribeirão Preto, SP : Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002.

HAQ, N. **Fruits for the Future 10 – Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*)**. 2006. 192p. Monographs - Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK, 2006.

IBAMA 1998. Lista de espécies ameaçadas de extinção. www. Ibama.gov.br.

JOHNSTON, J.; BENNETT, M.; RAYBURN, A.; GALBRAITH, D.; PRICE, H. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **American Journal of Botany** 86 (5): 609-613. 1999.

KAUFMANN, S.; MCKEY, D. B.; HOSSAERT-MCKEY, M.; HORVITZ, C. C. Adaptations for a two-phase seed dispersal system involving vertebrates and ants in a hemiepiphytic fig (*Ficus microcarpa*: Moraceae). **American Journal of Botany** 78: 971-977 1991.

KOLAR, F.; LUCANOVA, M.; TESITEL, J.; LOUREIRO, J.; SUDA, J. Glycerol-treated nuclear suspensions—an efficient preservation method for flow cytometric analysis of plant samples. **Chromosome Research** DOI 10.1007/s10577-012-9277-0. 2012.

KRAUSE, O. Zytologische Studien bei den Urticales unter besonderer Berücksichtigung der Gattung *Dorstenia*. **Planta** 13, 29-84. 1931.

KROGSTRUP, P.; FIND, J. I.; GURSKOV, D. J.; KRISTENSEN, M. M. H. Micropropagation of Socotran fig, *Dorstenia gigas*. Scrweinf. **In vitro cellular & Developmental Biology-Plant** 41: 81-86. 2005.

KRON, P.; SUDA, J.; HUSBAND, B. C. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. **Annual Review Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, n. 38, p. 847-876, Dec. 2007.

LEVAN, A.; FREDGA, A.; SANDERBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position in chromosome. **Hereditas**, 52: 201-220, 1964.

LEITCH, I. J.; BENNET, M. D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.2, n.12, p.470-476, 1997.

LIFCHITZ A. **Plantas medicinales**. 5. ed. Buenos Aires: Kier, p139, 1981.

LOPES, D.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M. A. C.; LAGE, C. S.; LEITÃO, A.C. Photosensitization and mutation induced in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* strains by dorstenin, a psoralen analog isolated from *Dorstenia bahiensis*. **Plantamed** 67: 820-824. 2001.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, J.; SANTOS, C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany** 98: 679-689. 2006.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, J.; SANTOS, C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry – examination with 37 species. **Annals of Botany**, (submitted). 2007.

LUTZ, A. M. A preliminary note on the chromosomes of *Oenothera*. **Science** 657: 151-152. 1907.

LUZ, J. M. Q.; CARVALHO, A. F.; OLIVEIRA, M. C. Estaquia de rizomas do carapiá, planta medicinal em extinção. **Horticultura Brasileira** 29: 258-261. 2011.

LYSÁK, M.; DOLEZELOVÁ, M.; HORRY, J. ; SWENNEN, R. E DOLEZEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in Musa. **Theoretical and Applied Genetics** 98: 1344-1350. 1999.

MADAIL, R. H. **Descritores morfológicos e conteúdo de DNA na caracterização de acessos de bananeira**. Tese (doutorado). Lavras: UFLA, 104p. 2011.

MARIMON, B. S.; FELFILI, J. M.; HARIDASAN, M. Studies in dominant forests in eastern Mato Grosso, Brazil: I. A forest of *Brosimum rubescens* Taub. *Edinb. J. Bot.* 58(1): 123-137. 2001.

MCLOUGHLIN, S. The breakup history of Gondwana and its impact on pre-Cenozoic Xoristic provincialism. **Australian Journal of Botany**, 49: 271-300, 2001.

MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, Fundação Zôo-Botânica de Belo Horizonte, 2000.

MEYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 24: 853-858. 2000.

MISIEWICZ, T. M.; ZEREGA, N. C. Phylogeny, biogeography and character evolution of *Dorstenia* (MORACEAE). **EDINBURGH JOURNAL OF BOTANY** 69 (3): 413–440. 2012.

MOSCONE, E. A.; BARANYI, M.; EBERT, I.; GREILHUBER, J.; EHRENDORFER, F.; HUNZIKER, A. T. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and Feulgen densitometry. **Annals of Botany** 92 (1): 21-29. 2003.

NGADJUI, B. T.; DONGO, E.; ABEGAZ, B. M.; FOTSO, S.; TAMBOUE, H. Dinklagins A, B and C: three prenylated flavonoids and other constituents from the twigs of *Dorstenia dinklagins*. **Phytochemistry** 61: 99-104. 2002.

NUNES, J. D. **Bandeamento cromossômico e conteúdo de DNA em espécies tropicais de *Pinus***. 53p. Tese (Doutorado) Lavras: UFLA, 2008.

OHRI, D.; KHOSHOO, T. N. Nuclear DNA contents in the genus *Ficus* (Moraceae). **Plant Systematics and Evolution**, 156:1-4, 1987.

OLIVEIRA, F. Q.; JUNQUEIRA, R. G.; STEHMANN, J. R.; BRANDÃO, M. G. L. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 5: 23-31. 2003.

OLIVEIRA, L. C. **Palinologia, citogenética e conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Euterpe***. 92p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2011.

OTTO, F. J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. **Methods in Cell Biology** 33: 105-110. 1990.

OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploidy: Incidence and evolution. **Annual Review of Genetics** 34: 401-437. 2000.

OTTO, S. P. The evolutionary consequences of polyploidy. **Cell** 131:452-462. 2007.

PASZKO, B. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. **Plant Systematics and Evolution**, v. 258, p.39-48, 2006.

PEDERNEIRAS, L. C. et al. Moraceae das restingas do estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v. 62, n. 1. p77-92, 2011.

PEREIRA, F. M.; NACHTIGAL, J. C. Botânica, biologia e cultivares de figueira. In: CORRÊA, L. de S.; BOLIANI, A.C. **Cultura da figueira do plantio a comercialização**. Ilha Solteira: FAPES, p25-36, 1999.

PERUZZI, L.; EROGLU, H. E. Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure? **Comparative Cytogenetics** 7(1): 1-9. 2013.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do brasil**, vol. 2-3. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

PLANCHAIS, S.; GLAB, N.; INZÉ, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. **FEBS Letters**, 476: 78-83, 2000.

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** 30: 1183-1191.2011.

RIESEBERG, L.H. Polyploid evolution: keeping the peace at genomic reunions. **Current Biology**, London, v. 11, p. 925- 928. 2001.

RODRIGUES, V. E. G; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia** 25: 102-123. 2001.

ROHWER, J.G. Moraceae. In: K. Kubitzki, J.G. Rohwer & V Bittrich (eds.), The families and genera of vascular plants. Berlin, **Springer Verlag**. 1993.

ROMANIUC NETO, S.; CARAUTA, J. P. P.; VIANA-FILHO, M. D. M.; PEREIRA, R. A. S.; RIBEIRO, J. E. L. S.; MACHADO, A. F. P.; SANTOS, A.; PELISSARI, G. Moraceae. In: R.C. Forzza, et al.(org.). **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jacobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2: 1287-1295. 2010.

ROMERO ZARCO, C. A new method for estimating karyotype asymmetry. **Taxon**, v. 35, n. 3, p.526-530, 1986.

SAHA, P.; SARKAR, D.; KUNDU, A.; MAJUMDER, S.; DATTA, S. K.; DATTA, K. Karyotype analysis and chromosomal evolution in Asian species of *Corchorus* (Malvaceae s. l.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, 2014.

SANTOS, A.; ROMANIUC NETO, S. A new species of *Dorstenia* (Moraceae) from southeastern Brazil. **PhytoKeys** 12: 47–51. 2012.

SANTOS, A. M.; CUNHA, C. F.; SÁNCHEZ-ARCILA, J. C.; FERRAZ, R. Citometria de fluxo: imunofenotipagem e avaliação de células citotóxicas na resposta a patógenos. Ministério da saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Instituto Oswaldo Cruz**. Curso de Verão - 2014.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; CARDOSO, M.; BOFF, T. Chromosome numbers of *Leucaena* species: filling the gaps and discovering a new tetraploid species. **Leucnet News**, Oxford, v.6, p.10 -12, 1999.

SEGRAVES, K. A.; THOMPSON, J. N.; SOLTIS, P. S. et al. Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossularifolia*. **Molecular Ecology**, Oxford, v.8, p.253, 262, 1999.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. The dynamic nature of polyploidy genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, New York, v. 92, p.8089-8091, 1995.

SOLTIS, D. E.; ALBERT, V.A.; LEEBENS-MACK, J.; BELL, C.D.; PATERSON, A. H.; ZHENG, C.; SANKOFF, D.; PAMPHILIS, C. W.; WALL, P. K.; SOLTIS, P. S. Polyploidy and angiosperm diversification. **American Journal of Botany** 96(1): 336-348. 2009.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (*Passifloraceae*): a review emphasizing Brazilian species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 51(2): 247 – 258. 2008.

STEBBINS, G. L. Chromosomal evolution in higher plants. London: Arnold. Uhl CH. 1978. Chromosomes of Mexican *Sedum*. **II. Section Pachysedum**. *Rhodora* 80: 491-512, 1971.

SUDA, J.; KYNCL, T.; FREIOVA, R. Nuclear DNA amounts in Macaronesian angiosperms. **Annals of Botany** 92 (1): 153-164. 2003.

TORRELL, M.; VALLES, J. Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome* 44 (2): 231-238. 2001.



TSOPMO, A.; TENE, M.; KAMNAING, P.; NGNOKAM, D.; AYAFOR, J. F.; STERNER, O. Geranylated flavonoids from *Dorstenia poinsettifolia*. **Phytochemistry** 48: 345-348. 1998.

VENORA, G.; PADULOSI, S. Karyotypic analysis of wild taxa of *Vigna unguiculata* (L.) Walpers. **Caryologia**, 50: 125-138, 1997.

VILEGAS, W.; VILEGAS, J. H. Y.; POZETTI, G. L. Cromatografia de permeação em gel das furanocumarinas de *Dorstenia heringeri* Car. & Val. **Revista de Ciências Farmacêuticas** 14: 133-138. 1992.

VILEGAS, J. H. Y.; LANCAS, F. M.; VILEGAS, W.; POZETTI, G. L. Further triterpenes, steroids and furanocumarins from Brazilian medicinal plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** 8: 529-535. 1997.

YOSHITOME, M. Y.; SOUZA, M. F. P.; KARSBURG, I. V. Caracterização dos cromossomos mitóticos e índice meiótico de *Theobroma speciosum* (L.) WILLD. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.6, n.1, p.21-28, 2008.

ZOLDOS, V.; PAPE, D.; BROWN, S.; PANAUD, O.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter- and intra-population variation. **Genome** 41: 162-168. 1998.