

## **Citogenética vegetal aplicada à taxonomia e ao melhoramento.**

Natoniel Franklin de Melo

Pesquisador da Embrapa Semi-Árido, C.P.23, Petrolina-PE, 56302-970

(natoniel@cpatsa.embrapa.br)

A utilização de dados citogenéticos na sistemática vegetal é considerada fundamental 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, 2000a). 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 & Padulosi, 1997).

As técnicas citogenéticas introduzidas nas últimas décadas têm fornecido novos dados na citotaxonomia e na caracterização de muitas espécies de interesse econômico. Dentre estas, pode-se destacar o bandeamento C, a coloração com fluorocromos, a localização de regiões organizadoras do nucléolo através da impregnação pela prata, a hibridização *in situ*, entre outras (Appels *et al.*, 1998).

### **Número cromossômico básico**

A variação no número cromossômico pode surgir por diferentes meios, mas do ponto de vista evolucionário os mais importantes são a poliploidia e a disploidia (Stebbins, 1971; Grant, 1982a, b). Os poliplóides têm três ou mais conjuntos de cromossomos por núcleo, ao invés de dois como encontrado nos diplóides, sendo a poliploidia não somente um acontecimento comum, mas também recorrente em algumas espécies (Leitch & Bennett, 1997). Entre as angiospermas, a variação do nível de ploidia pode ser muito alta, variando de  $2n=4$ , como observado, por exemplo, em *Rhynchospora tenuis* (Vanzela *et al.*, 1996), a  $2n= ca.640$  em *Sedum suaveolens* (Uhl, 1978).

Embora Stebbins (1971) tenha considerado cinco tipos de poliplóides, atualmente pode-se dividi-los em dois tipos principais: os neopoliplóides e os paleopoliplóides (Ehrendorfer, 1980; Guerra 2000a). Neopoliplóides são poliplóides de origem mais recente, onde os diplóides relacionados ainda são representados nos dias atuais. Todos

os poliplóides intraespecíficos e muitos infragenéricos são exemplos de neopoliplóides, como relatado, por exemplo, em algumas espécies de *Hordeum* (Linde-Laursen *et al.*, 1995), no primeiro caso, e na família Iridaceae, no segundo (Goldblatt & Takei, 1997). Paleopoliplóides, por outro lado, são poliplóides antigos sem diplóides próximos relacionados, encontrados em gêneros monotípicos, como *Voanioala*, nesse caso, com  $2n=596$  cromossomos em *V. gerardii* (Johnson *et al.*, 1989), ou em táxons com alto número cromossômico e características primitivas. Vale salientar que embora os poliplóides sejam sempre derivados de diplóides, em muitos táxons algumas espécies ou gêneros poliplóides (paleopoliplóides) são mais primitivos que os diplóides relacionados (Guerra, 2000a, b).

A disploidia corresponde a mudanças no número cromossômico devido a rearranjos cromossômicos estruturais, tais como a fusão Robertsoniana e a fissão cêntrica (Guerra, 1988). Fusão (disploidia descendente) é mais comum que fissão (disploidia ascendente), mas os dois tipos têm sido encontrados em vários gêneros. Goldblatt & Takei (1993), por exemplo, mostraram uma série displóide descendente com  $n=10, 9, 8, 7, 6, 5, 4$  e  $3$  no gênero *Lapeirousia*, além da combinação de poliploidia e disploidia descendente secundária nas espécies da seção *Paniculata*. Na família Arecaceae, Röser (1994) também encontrou freqüente redução do número de cromossomos em diversas subfamílias, como a Coryphoideae ( $2n=36$  a  $2n=28$ ), Calamoideae ( $2n=36$  a  $2n=26$ ), Ceroxyloideae ( $2n=34$  a  $2n=26$ ) e Arecoideae ( $2n=36$  a  $2n=28$ ).

O conceito de número básico é definido como um dos números haplóides, observados em um táxon, que explica o mais parcimoniosamente possível a variabilidade cromossômica deste grupo e que demonstra um claro relacionamento com os números básicos de grupos próximos relacionados (Guerra, 2000a). Em alguns casos, a identificação do número básico é relativamente direta, devido a presença de apenas um número haplóide no grupo, como por exemplo,  $n=17$  em Barbacenioideae (Melo *et al.*, 1997), ou pela existência de apenas uma série poliplóide, como observado em *Triticeae* com  $n= 7, 14, 28, 35$  e  $42$  (Sakamoto, 1991).

Em outros casos, entretanto, dois ou mais números displóides diferentes são encontrados, e a identificação do número básico é interpretada por outros critérios. Guerra (2000a) enumerou os seguintes critérios: o número haplóide mais baixo, aplicado em séries poliplóides, o número haplóide mais alto, aplicado em séries displóides descendentes, dois ou mais números haplóides, aplicados quando se encontra uma extensa variação numérica no grupo, o número haplóide mais freqüente, indicando

o número básico ou o número ancestral com variação mais bem-sucedida, e um número monoplóide hipotético, utilizado em táxon de origem paleopoliplóide.

### **Bandeamento cromossômico**

As técnicas de bandeamento cromossômico são bastante valiosas na diferenciação de cromossomos ou cariótipos aparentemente similares com coloração convencional. Kenton (1978), por exemplo, demonstrou através de bandeamento-C, um alto polimorfismo da heterocromatina dentro e entre populações diplóides ( $2n=10$ ) e tetraplóides ( $2n=20$ ) de *Gibasis karwinskyana* e *G. consobrina*. No gênero *Alstroemeria*, o bandeamento-C foi usado para caracterizar o cariótipo de oito espécies brasileiras e chilenas, todas com número cromossômico diplóide  $2n=16$ . Um número variável de grandes blocos intercalares e teloméricos de bandas-C foi observado nas espécies chilenas, enquanto as espécies brasileiras mostraram apenas pequenos blocos de bandas-C, sugerindo que o genoma dos dois grupos evoluíram diferentemente (Buitendijk & Ramanna, 1996). Na família Rutaceae, os gêneros *Ruta* e *Dictamnus* estão classificados na mesma tribo, mas apresentaram características citológicas tão distintas, dentre as quais o padrão de bandas-C, que foi sugerido pertencerem a tribos diferentes (Guerra, 1985). Em alguns casos, a técnica de bandeamento-C também permite a identificação de vários tipos de heterocromatina, bem como de vários cromossomos, como relatado, por exemplo, em milho (Aguiar-Perecin, 1985a, b), sendo importante avaliar separadamente a distribuição de cada tipo de heterocromatina entre os diferentes cariótipos (Guerra, 2000c).

Por outro lado, a heterocromatina também pode ser caracterizada por apresentar seqüências repetitivas com maior freqüência de pares de bases GC (guanina/citosina) ou AT (adenina/timina). O número e a posição dessas seqüências podem variar entre espécies, sendo detectadas com corantes fluorescentes que permitem a visualização de bandas no cariótipo. Os fluorocromos mais utilizados em vegetais são a cromomicina A<sub>3</sub> (CMA), que cora preferencialmente regiões repetitivas ricas em GC, e o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), que cora preferencialmente regiões ricas em AT, embora a quinacrina e o Hoechst 33258, que coram preferencialmente heterocromatina rica em AT, além da mitramicina, que cora preferencialmente regiões ricas em GC, sejam também utilizados (Friebe *et al.*, 1996).

Na família Arecaceae, Röser (1994, 1995) ressaltou a possibilidade de diferenciar algumas subfamílias através do padrão de condensação profásico e pelo

padrão de coloração com fluorocromos. Forni-Martins & Guerra (1999) estudaram seis espécies de *Sesbania* com  $2n=12$ , relatando padrões variados de diferenciação cromossômica longitudinal através do bandeamento-C e coloração com os fluorocromos CMA e DAPI. Na subfamília Aurantioideae de Rutaceae, o padrão de bandeamento heterocromático foi estudado por Guerra *et al.* (2000) através da análise com CMA e DAPI. *Murraya paniculata* e *M. koenigii* apresentaram padrões de bandas CMA tão diferentes que foi sugerido a separação da última espécie no gênero *Bergera*, dentro da subtribo Clauseninae, enquanto *M. paniculata* seria classificada junto com o gênero *Merrillia*, dentro da subtribo Merrilliinae.

### **Hibridização *in situ***

Uma das técnicas mais recentes na citogenética é a hibridização *in situ*. Esta técnica foi desenvolvida há mais de 30 anos por Gall & Pardue (1969) para localizar seqüências de ácidos nucléicos diretamente nos cromossomos. Nos últimos anos, a hibridização *in situ* vem sendo empregada com sucesso para localizar regiões específicas das mais variadas espécies silvestres e cultivadas. Em *Vicia faba*, por exemplo, foram localizadas as seqüências de DNAr 5S, 45S, elementos *FokI*, DNA telomérico, genes para proteínas da semente, entre outros (Fuchs *et al.*, 1998a). No gênero *Saccharum* (cana-de-açúcar), D'Hont *et al.* (1998) estudaram o número e a localização do DNAr 5S e 45S em três das seis espécies que constituem o gênero, relatando uma correspondência entre nível de ploidia e número de sítios de DNAr. O mesmo foi relatado para o gênero *Aloe* (Adams *et al.*, 2000). No gênero *Passiflora*, Melo & Guerra (2003) verificaram o silenciamento de alguns sítios gênicos redundantes de DNAr 5S, em espécies consideradas de origem paleopoliplóide. Em cevada (*Hordeum vulgare*), foi feito um mapeamento físico através de hibridização *in situ* com seqüências de DNAr 5S e um sítio do gene da  $\alpha$ -amilase-2 (Leitch & Heslop-Harrison, 1993). Foi possível diferenciar cada braço cromossômico do cariótipo da cevada, além da localização do gene da  $\alpha$ -amilase-2, observando-se uma discrepância significativa entre o mapeamento genético e o mapeamento físico da localização relativa à distância do centrômero. Da mesma forma, Fuchs *et al.* (1998b) utilizaram a hibridização *in situ* com oligonucleotídeos, genes de RNAr e proteínas da semente na identificação de cada par cromossômico de ervilha (*Pisum sativum*).

Por outro lado, análises comparativas entre cultivares de uma dada espécie utilizando-se a hibridização *in situ*, têm sido pouco exploradas. Alguns estudos do

polimorfismo intraespecíficos no número de sítios de DNAr, por exemplo, foram relatados em *Phaseolus vulgaris* (Moscone *et al.* 1999). Neste caso, os loci do gene para RNAr em *P. vulgaris* mostraram variação intraespecífica no número e no tamanho do sinal. Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a variação no número, tamanho e posição dos sítios de DNAr. Dentre esses, pode-se citar rearranjos cromossômicos (translocação, deleção, inversão e duplicação), trocas cromatídicas desiguais e eventos de transposição (Schubert & Wobus, 1985; Leitch & Heslop-Harrison, 1993; Zurita *et al.*, 1997). Pedrosa *et al.* (2000) analisaram dez cultivares de *Citrus sinensis* através do padrão de bandas CMA/DAPI e por hibridização *in situ* com DNAr 5S e 45S, e verificaram um padrão invariável de bandas e sítios de DNAr entre as cultivares. Melo & Guerra (2001) também relataram estabilidade cariotípica entre quatro cultivares de aspargo (*Asparagus officinalis*), apesar da existência de um heteromorfismo de tamanho dos sítios de DNAr 45S em uma das cultivares.

### Referências Bibliográficas

- Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Chase MW, Leitch AR. 2000. Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *American Journal of Botany* **87**: 1578-1583.
- Aguiar-Perecin MLR. 1985 a. Bandamento-C e tipos de heterocromatina em milho. In: Aguiar-Perecin MLR, Martins OS, Bandel G (eds.). *Tópicos de Citogenética e Evolução Vegetal de Plantas*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto-SP, pp. 51-67.
- Aguiar-Perecin MLR, Vosa CG. 1985 b. C-banding in maize II. Identification of somatic chromosome. *Heredity* **54**: 37-42.
- Appels R, Morris R, Gill BS, May CE. 1998. *Chromosome biology*, 401pp., Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Buitendijk JH, Ramanna MS. 1996. Giemsa C-banded karyotypes of eight species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. *Annals of Botany* **78**: 449-457.
- D'Hont A, Ison D, Alix K, Roux C, Glaszmann JC. 1998. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome* **41**: 221-225.
- Ehrendorfer F. 1980. Polyploidy and distribution. In: Lewis WH (ed.). *Polyploidy: Biological Relevance*. pp.45-60. Plenum Press, New York.

- Forni-Martins ER, Guerra M. 1999.** Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. species (Fabaceae). *Caryologia* **52**: 97-103.
- Friebe B, Endo TR, Gill BS. 1996.** Chromosome-banding methods. In: Fukui K, Nakayama S. *Plant Chromosomes – Laboratory Methods*. pp.123-154. CRC Press, Tokyo.
- Fuchs J, Strehl S, Brandes A, Schweizer D, Schubert I. 1998 a.** Molecular-cytogenetic characterization of the *Vicia faba* genome – heterochromatin differentiation, replication patterns and sequence localization. *Chromosome Research* **6**: 219-230.
- Fuchs J, Kühne M, Schubert I. 1998 b.** Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent *in situ* hybridisation. *Chromosoma* **107**: 272-276.
- Gall JG, Pardue ML. 1969.** Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **63**: 378-383.
- Goldblatt P, Takei M. 1993.** Chromosome cytology of the African genus *Lapeirousia* (Iridaceae-Ixioideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **80**: 961-973.
- Goldblatt P, Takei M. 1997.** Chromosome cytology of Iridaceae – Patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **84**: 285-304.
- Grant V. 1982a.** Periodicities in the chromosome numbers of the angiosperms. *Botanical Gazette* **143**: 379-389.
- Grant V. 1982b.** Chromosome number patterns in primitive angiosperms. *Botanical Gazette* **143**: 390-394.
- Guerra M. 1985.** Cytogenetics of Rutaceae. III. Heterochromatin patterns. *Caryologia* **38**: 335-346.
- Guerra M. 1988.** Introdução a citogenética geral. Guanabara. Rio de Janeiro.
- Guerra M, Pedrosa A, Silva AEB, Cornélio MTM, Santos K, Soares Filho WS. 1997.** Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. *Genetics and Molecular Biology* **20**: 489-496.
- Guerra M. 2000a.** 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.

- Guerra M. 2000b.** Poliploidia e primitividade na família Rutaceae. *Tópicos Atuais em Botânica*. Palestras convidadas do 51<sup>o</sup> Congresso Nacional de Botânica, pp.40-44. Brasília.
- Guerra M. 2000c.** Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology* **23**: 1029-1041.
- Guerra M, Santos KGB, Barros e Silva AE, Ehrendorfer F. 2000.** Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae – A case of parallel chromosomal evolution. *American Journal of Botany* **87**: 735-747.
- Johnson MAT, Kenton AY, Bennett MD, Brandham PE. 1989.** *Voanioala gerardii* has the highest known chromosome number in the monocotyledons. *Genome* **32**: 328-333.
- Kenton A. 1978.** Giemsa C-banding in *Gibasis* (Commelinaceae). *Chromosoma* **65**: 309-324.
- Leitch IJ, Heslop-Harrison JS. 1993.** Physical mapping of four sites of 5S rDNA sequences and one site of the  $\alpha$ -amylase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* **36**: 517-523.
- Leitch IJ, Bennett MD. 1997.** Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* **2**: 470-476.
- Linde-Laursen I, Bothmer R, Jacobsen N. 1995.** Karyotype differentiation and evolution in the genus *Hordeum* (Poaceae). In: Brandham PE, Bennett MD (eds.). *Kew Chromosome Conference IV*, pp. 233-247. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Melo NF, Guerra M, Benko-Iseppon AM, Menezes NL. 1997.** Cytogenetics and cytotaxonomy of Velloziaceae. *Plant Systematics and Evolution* **204**: 257-273.
- Melo NF, Guerra M. 2001.** Karyotypic stability in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) cultivars revealed by rDNA *in situ* hybridisation. *Cytologia* **66**: 127-131.
- Melo NF, Guerra M. 2003.** Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* **92**: 309-316.
- Moscone EA, Klein, F, Lambrou M, Fuchs J, Schweizer, D. 1999.** Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* **42**: 1224-1233.
- Pedrosa A, Schweizer D, Guerra M. 2000.** Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theoretical and Applied Genetics* **100**: 361-367.

- Röser M. 1994.** Pathways of karyological differentiation in palms (Arecaceae). *Plant Systematics and Evolution* **189**: 83-122.
- Röser M. 1995.** Trends in the karyo-evolution of palms. In: Brandham PE, Bennett MD (eds.). *Kew Chromosome Conference IV*, pp. 249-265. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Sakamoto S. 1991.** The cytogenetic evolution of Triticeae grasses. In: Gupta PK, Tsuchiya T. (eds.). *Chromosome Engineering in Plants: Part A*, pp.469-481. New York: Elsevier.
- Schubert I, Wobus U. 1985.** In situ hybridisation confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* **92**: 143-148.
- Stebbins GL. 1971.** Chromosomal evolution in higher plants. London: Arnold.
- Uhl CH. 1978.** Chromosomes of Mexican *Sedum*. II. Section *Pachysedum*. *Rhodora* **80**: 491-512.
- Vanzela ALL, Guerra M, Luceño M. 1996.** *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes. *Cytobios* **88**: 219-228.
- Venora G, Padulosi S. 1997.** Karyotypic analysis of wild taxa of *Vigna unguiculata* (L.) Walpers. *Caryologia* **50**: 125-138.
- Zurita F, Sánchez A, Burgos M, Jiménez R, De La Guardia RD. 1997.** Interchromosomal, intercellular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and *in situ* hybridisation. *Heredity* **78**: 229-234.