



DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE
QUATRO ESPÉCIES BRASILEIRAS DE
ALSTROEMERIA (ALSTROEMERIACEAE)
COM AS TÉCNICAS DE FISH, CMA, DAPI E
AgNOR**

LIAMAR ZANELA

**Campinas, SP
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO AGRONÔMICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
TROPICAL E SUBTROPICAL

CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE QUATRO
ESPÉCIES BRASILEIRAS DE *ALSTROEMERIA*
(ALSTROEMERIACEAE) COM AS TÉCNICAS DE FISH,
CMA, DAPI E AgNOR

LIAMAR ZANELA

Orientadora: Dra. Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio
Co-orientadora: Dra. Marta Camargo de Assis

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical Área de concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia.

Campinas, SP
Março 2009

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agrônômico

Z28c Zanela, Liamar.
Caracterização cariotípica de quatro espécies brasileiras de *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) com as técnicas de FISH, CMA, DAPI e AgNOR./ Liamar Zanela. Campinas, 2009. 79 fls.

Orientadora: Dra. Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio
Co-orientadora: Dra. Marta Camargo de Assis
Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Instituto Agrônômico

1. *Alstroemeria* 2. Plantas ornamentais 3. Técnica citomolecular
I. Maglio, Cecília Alzira Ferreira Pinto II. Assis, Marta Camargo de III. Título

CDD. 635.977



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRÔNOMICO
Pós-Graduação
Av. Barão de Itapura 1481 Caixa Postal 28
13001-970 Campinas, SP - Brasil
(019) 3231-5422 ramal 194
pgiac@iac.sp.gov.br



Curso de Pós-Graduação
Agricultura Tropical e Subtropical
Certificado de Aprovação

Título: **Caracterização cariotípica de quatro espécies brasileiras de *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) com as técnicas de FISH, CMA, DAPI e AgNOR**

Aluno: **Liamar Zanela**

Área de Concentração: **Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia**

Processo SAA nº: **12174/07**

Orientadora: **Dra. Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio**

Aprovado pela Banca Examinadora:

Dra. Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio - IAC

Dra. Julie Henriette Antoinette Dutilh - UNICAMP

Dra. Neiva Izabel Pierozzi - IAC

Visto:

Adriana Parada Dias da Silveira
Coordenadora
Pós-Graduação Instituto Agrônomo

Campinas, 23 de abril de 2009

Aos meus pais
Orides e Vitalina,
DEDICO

Aos meus irmãos,
Cleide, Ivonete, Claudir e Leandro
cujo apoio foi indispensável,
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela força e coragem na superação de muitas das dificuldades encontradas ao longo do curso;
- À pesquisadora científica Dra. Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio, pela paciência, amizade, confiança a mim dispensada e ensinamentos no decorrer do curso que contribuíram não só para a realização deste trabalho, mas para meu enriquecimento profissional e pessoal;
- À Dra. Marta Camargo de Assis pela co-orientação com sugestões e críticas que contribuíram muito para a realização deste trabalho;
- Ao Dr. Ricardo Lombello pela amizade, esclarecimentos no decorrer deste trabalho com informações e sugestões valiosas, incentivo e auxílio em algumas etapas fundamentais desta tese;
- As pesquisadoras Dra. Sigrid Luiza Jung-Mendacoli e Dra. Roseli Buzanelli Torres e a estagiária Ariane Saldanha de Oliveira do Centro de Botânica do Instituto Agronômico de Campinas pela disposição e auxílio na secagem, preparação e digitação dos dados dos materiais herborizados;
- À pesquisadora Dra. Neiva Pierozzi pela amizade e desde já pela disposição em ler este trabalho e pelas críticas de pré-banca que contribuirão muito para a finalização desta tese;
- Aos membros desta banca, pela disposição em ler este trabalho e pelas críticas que complementarão meus conhecimentos e aprendizados adquiridos no decorrer do curso;
- A minha família pelo apoio, confiança e pelas críticas que contribuíram para meu fortalecimento pessoal;
- Aos colegas do Laboratório de Citogenética do Instituto Agronômico de Campinas, José Emilio Bettiol Neto, Juliana Guardia e Laís Moreira Granato pela amizade, coleguismo, paciência e incentivo em muitos momentos;
- Aos professores da área de concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia pelas dicas e ensinamentos;
- Aos funcionários da PG-IAC, pelo auxílio e amizade no decorrer do curso;
- Aos colegas da Pós-Graduação que participaram desta etapa da minha carreira e de uma forma ou de outra contribuíram na realização desse trabalho;

- Aos colegas professores, pela credibilidade e apoio em muitos momentos de necessidade.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Aspectos econômicos do gênero <i>Alstroemeria</i> L.....	03
2.2 Caracterização botânica da família Alstroemeriaceae.....	04
2.3 Espécies do gênero <i>Alstroemeria</i> estudadas.....	08
2.3.1 <i>Alstroemeria cunha</i> Vell.....	08
2.3.2 <i>Alstroemeria inodora</i> Herb.....	08
2.3.3 <i>Alstroemeria longistaminea</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.....	08
2.3.4 <i>Alstroemeria psittacina</i> Lehm.....	09
2.4 Estudos citogenéticos para o gênero <i>Alstroemeria</i> L.....	09
2.5 Coloração com Giemsa.....	13
2.6 Bandamento com corantes fluorescentes - CMA ₃ e DAPI.....	15
2.7 Hibridação <i>in situ</i>	18
2.8 Bandamento cromossômico com nitrato de prata – AgNOR.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Material.....	25
3.2 Métodos.....	28
3.2.1 Germinação de sementes.....	28
3.2.2 Pré-tratamento de raízes e fixação.....	28
3.2.3 Hidrólise e preparações citológicas.....	28
3.2.4 Microscopia e análise das imagens.....	29
3.2.5 Coloração com Giemsa.....	29
3.2.6 Bandamento com CMA ₃ /DA (Cromomicina A ₃ /distamicina).....	30
3.2.7 Bandamento com DAPI/AMD (4'-6-diamidino-2-fenilindol/actinomicina D).....	30
3.2.8 Bandamento com nitrato de prata - AgNOR.....	31
3.2.9 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente.....	32
3.2.9.1 Sondas.....	32
3.2.9.2 Hibridação molecular <i>in situ</i> de sondas de DNA ribossomais de 45S e 5S... ..	32
3.2.10 Medidas dos cromossomos.....	33
4 RESULTADOS.....	34
4.1 <i>Alstroemeria cunha</i>	34
4.1.1 Microscopia de fase e coloração com Giemsa.....	34
4.1.2 Bandamento CMA ₃ /DA.....	34
4.1.3 Bandamento DAPI/AMD.....	34
4.1.4 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	36
4.1.5 Bandamento AgNOR.....	36
4.1.6 Medidas cromossômicas.....	37
4.2 <i>Alstroemeria inodora</i>	39
4.2.1 Microscopia de fase e coloração com Giemsa.....	39
4.2.2 Bandamento CMA ₃ /DA.....	39
4.2.3 Bandamento DAPI/AMD.....	40
4.2.4 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	41
4.2.5 Bandamento AgNOR.....	42

4.2.6 Medidas cromossômicas.....	43
4.3 <i>Alstroemeria longistaminea</i>	44
4.3.1 Microscopia de fase e coloração com Giemsa.....	44
4.3.2 Bandamento CMA ₃ /DA.....	46
4.3.3 Bandamento DAPI/AMD.....	46
4.3.4 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	46
4.3.5 Bandamento AgNOR.....	47
4.3.6 Medidas cromossômicas.....	49
4.4 <i>Alstroemeria psittacina</i>	50
4.4.1 Microscopia de fase e coloração com Giemsa.....	50
4.4.2 Bandamento CMA ₃ /DA.....	50
4.4.3 Bandamento DAPI/AMD.....	50
4.4.4 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	51
4.4.5 Bandamento AgNOR.....	52
4.4.6 Medidas cromossômicas.....	53
5 DISCUSSÃO.....	58
6 CONCLUSÕES.....	68
7 REFERÊNCIAS.....	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Espécies de <i>Alstroemeria</i> encontradas no Brasil, com seus respectivos locais de origem e autores que descreveram as espécies pela primeira vez, segundo MEEROW et al. (1999) e ASSIS (2002, 2003, 2004, 2006, 2009).....	06
Tabela 2 -	Relação das espécies de <i>Alstroemeria</i> com contagem cromossômica, segundo GOLDBLATT (1981, 1984, 1985, 1988) e MISSOURI BOTANICAL GARDEN (2008).....	11
Tabela 3 -	Espécies de <i>Alstroemeria</i> usadas neste estudo, seus respectivos locais de coleta e o número de introdução no herbário do IAC.....	25
Tabela 4 -	<i>Alstroemeria cunha</i> - Médias dos comprimentos totais dos pares cromossômicos, coeficientes de variação das médias (CV%), médias dos braços curtos, índices centroméricos (IC) e classificação.....	39
Tabela 5 -	<i>Alstroemeria inodora</i> - Médias dos comprimentos totais dos pares cromossômicos, coeficientes de variação das médias (CV%), médias dos braços curtos, índices centroméricos (IC) e classificação.....	44
Tabela 6 -	<i>Alstroemeria longistaminea</i> - Médias dos comprimentos totais dos pares cromossômicos, coeficientes de variação das médias (CV%), médias dos braços curtos, índices centroméricos (IC) e classificação.	49
Tabela 7 -	<i>Alstroemeria psittacina</i> - Médias dos comprimentos totais dos pares cromossômicos, coeficientes de variação das médias (CV%), médias dos braços curtos, índices centroméricos (IC) e classificação.....	54
Tabela 8 -	Relação das espécies estudadas do gênero <i>Alstroemeria</i> . Número cromossômico (2n), variação de tamanho dos cromossomos, comprimento total da cromatina (CTC), índice de assimetria TF%, fórmula cariotípica (m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico e T = telocêntrico) e número fundamental.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ramos reprodutivos de <i>Alstroemeria</i> . (A) <i>A. cunha</i> ; (B) <i>A. inodora</i> ; (C) <i>A. longistaminea</i> ; (D) <i>A. psittacina</i> . Fotos de M.C. de Assis.....	10
Figura 2 - Ramos reprodutivos de espécies do gênero <i>Alstroemeria</i> em cultivo na estufa do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), caracterizadas citologicamente neste trabalho. A, B, e C – <i>A. cunha</i> ; D, E e F – <i>A. inodora</i> . Fotos de C. A.F. Pinto-Maglio.....	26
Figura 3 - Ramos reprodutivos e frutos de espécies do gênero <i>Alstroemeria</i> em cultivo na estufa do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), que foram usadas no trabalho. A, B, C e D – <i>A. longistaminea</i> ; E e F – <i>A. psittacina</i> ; G – Frutos de <i>A. cunha</i> . Fotos de C.A.F. Pinto-Maglio.....	27
Figura 4 - Cromossomos somáticos de <i>Alstroemeria cunha</i> . (A) Imagem em microscopia de fase; (B) Coloração com corante Giemsa; (C) Cariograma. Barra = 10µm.....	35
Figura 5 - Cromossomos somáticos de <i>Alstroemeria cunha</i> . (A) Bandamento com CMA ₃ /DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação <i>in situ</i> fluorescente (vermelho) com sonda de rDNA 45S - pTa71; (D) Sinais de hibridação (verde) com sonda de rDNA 5S - pScT7. Barra = 10µm.....	37
Figura 6 - <i>Alstroemeria cunha</i> – Ideogramas representativos. (A) Bandamento com CMA ₃ /DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação <i>in situ</i> para sequências de rDNA 45S com a sonda pTa71; (D) Sinais de sequências de rDNA 5S com a sonda pScT7; (E) Representação do conjunto de resultados das técnicas CMA ₃ /DA, DAPI/AMD e hibridação <i>in situ</i> para rDNA 45S e 5S.....	38
Figura 7 - Cromossomos somáticos de <i>Alstroemeria inodora</i> . (A) Imagem em microscopia de fase; (B) Coloração com Giemsa; (C) Cariograma. Barra = 10µm.....	40
Figura 8 - Cromossomos somáticos de <i>Alstroemeria inodora</i> . (A) Bandamento com CMA ₃ /DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação <i>in situ</i> fluorescente (vermelho) com sonda de rDNA 45S - pTa71; (D) Sinais de hibridação (verde) com sonda de rDNA 5S - pScT7. Barra = 10µm.....	42

Figura 9 -	<i>Alstroemeria inodora</i> – Ideogramas representativos. (A) Bandamento com CMA ₃ /DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação <i>in situ</i> para seqüências de rDNA 45S com a sonda pTa71; (D) Sinais de seqüências de rDNA 5S com a sonda pScT7; (E) Representação do conjunto de resultados das técnicas CMA ₃ /DA, DAPI/AMD e hibridação <i>in situ</i> para rDNA 45S e 5S....	43
Figura 10 -	Cromossomos somáticos de <i>Alstroemeria longistaminea</i> . (A) microscopia de fase; (B) Coloração com Giemsa; (C) Cariograma. Barra = 10µm.....	45
Figura 11 -	Cromossomos somáticos de <i>Alstroemeria longistaminea</i> . (A) Bandamento com CMA ₃ /DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação <i>in situ</i> fluorescente (vermelho) com sonda de rDNA 45S - pTa71; (D) Sinais de hibridação (verde) com sonda de rDNA 5S - pScT7. Barra = 10µm.....	47
Figura 12 -	<i>Alstroemeria longistaminea</i> – Ideogramas representativos. (A) Bandamento com CMA ₃ /DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação <i>in situ</i> para seqüências de rDNA 45S com a sonda pTa71; (D) Sinais de seqüências de rDNA 5S com a sonda pScT7; (E) Representação do conjunto de resultados das técnicas CMA ₃ /DA, DAPI/AMD e hibridação <i>in situ</i> para rDNA 45S e 5S.....	49
Figura 13 -	Cromossomos somáticos de <i>Alstroemeria psittacina</i> . (A) Imagens em microscopia de fase; (B) coloração com Giemsa; (C) Cariograma. Barra = 10µm.....	51
Figura 14 -	Cromossomos somáticos de <i>Alstroemeria psittacina</i> . (A) Bandamento com CMA ₃ /DA. (B) Bandamento com DAPI/AMD. (C) Sinais de hibridação <i>in situ</i> fluorescente (vermelho) com sonda de rDNA 45S - pTa71. (D) Sinais de hibridação <i>in situ</i> fluorescente (verde) com sonda de rDNA 5S - pScT7. Barra = 10µm.....	52
Figura 15 -	<i>Alstroemeria psittacina</i> – Ideogramas representativos. (A) Bandamento com CMA ₃ /DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação <i>in situ</i> para seqüências de rDNA 45S com a sonda pTa71; (D) Sinais de seqüências de rDNA 5S com a sonda pScT7; (E) Representação do conjunto de resultados das técnicas CMA ₃ /DA, DAPI/AMD e hibridação <i>in situ</i> para rDNA 45S e 5S.....	53
Figura 16 -	<i>Alstroemeria</i> - ideogramas indicativos dos pares de cromossomos que apresentam polimorfia para sítios de hibridação das seqüências de rDNA. (A) <i>A. cunha</i> - 45S; (B) <i>A. inodora</i> - 45S e 5S; (C) <i>A. longistaminea</i> - 45S.....	55

Figura 17 - Cromossomos somáticos de <i>A. cunha</i> com a técnica de impregnação com prata (AgNOR). Barra = 10µm.....	56
Figura 18 - Cromossomos somáticos com a técnica de impregnação com prata (AgNOR). (A) <i>A. longistaminea</i> ; (B) <i>A. psittacina</i> ; (C) <i>A. inodora</i> . Barra = 10µm.....	57

ZANELA, Liamar. **Caracterização cariotípica de quatro espécies brasileiras de *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) com as técnicas de FISH, CMA, DAPI e AgNOR.** 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Pós-Graduação – IAC.

RESUMO

O gênero *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) possui atualmente cerca de 90 espécies nativas principalmente do Brasil e Chile. No Brasil são encontradas cerca de 39 espécies. O valor destas plantas no mercado de ornamentais vem crescendo visto que, as espécies brasileiras embora com flores menores, apresentam uma maior diversificação de padrões de flores o que torna a criação de híbridos, unindo estes dois aspectos um fator de grande interesse. Conseqüentemente, o interesse pelas espécies nativas brasileiras deste gênero vem aumentando gradativamente devido à demanda de bancos de germoplasma visando à conservação e ao desenvolvimento de programas de melhoramento genético para a produção de híbridos. No presente trabalho objetivou-se a caracterização cariotípica de quatro espécies nativas de *Alstroemeria*, a saber: *A. cunha*, *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina* através da aplicação de técnicas tradicionais de coloração, como o Giemsa e também se efetuou a diferenciação longitudinal de cromossomos através do bandamento com os fluorocromos Cromomicina A₃ com distamicina (CMA₃/DA) e 2'4'-diamidino-2-fenilindol com actinomicina (DAPI/AMD). Adicionalmente, foram mapeadas as regiões organizadoras do nucléolo através da impregnação pela prata (bandamento AgNOR) e através da técnica de hibridação fluorescente de ácidos nucléicos *in situ* (FISH) utilizando-se como sondas as sequências de rDNA 45S e 5S. Os resultados obtidos a partir da aplicação das técnicas de bandamento CMA₃/DA e DAPI/AMD, bandamento NOR, e FISH para rDNA são inéditos para espécies brasileiras de *Alstroemeria*. Os resultados obtidos para as referidas espécies mostram cariótipos assimétricos, com $2n = 2x = 16$ cromossomos, confirmando o número somático relatado na literatura para o gênero. Os complementos cromossômicos das quatro espécies analisadas apresentam em comum a fórmula cariotípica $2m+1sm+1st+4T-sat$. Através do bandamento com os fluorocromos, DAPI/AMD e CMA₃/DA foi possível a caracterização das espécies pela diferenciação longitudinal dos cromossomos. O emprego de FISH com as sequências de rDNA 45S e 5S, resultou em número variado de sinais em diferentes posições nos conjuntos cromossômicos, complementando as informações que permitiram a individualização das

espécies. Alguns pares de homólogos apresentam polimorfismo para as regiões de rDNA. Através da impregnação pela prata foram detectados sítios ativos para organização nucleolar, alguns deles coincidentes com os sinais de FISH para rDNA 45S nas quatro espécies estudadas. Foi estimado o comprimento total da cromatina (CTC), o índice centromérico (IC), o índice de assimetria cariotípica (TF%) e o coeficiente de variação das médias dos comprimentos totais dos cromossomos (CV%). O conjunto de dados obtidos permitiu a distinção entre os cariótipos das quatro espécies resultando num avanço expressivo na diferenciação interespecífica deste grupo de plantas.

Palavras-chave: Cariótipo, hibridação *in situ*, técnica citomolecular, bandamento, fluorocromos, impregnação pela prata, diferenciação longitudinal de cromossomos, planta ornamental.

ZANELA, Liamar. **Karyotype characterization of four Brazilian species of the genus *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) with techniques FISH, CMA, DAPI and AgNOR.** 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Pós-Graduação – IAC.

ABSTRACT

The genus *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) is native from Brazil and Chile and at present includes about 90 diploid species. In Brazil are found about 39 species. The value of these plants in the market of ornamentals is increasing, and the Brazilian species, even with little flowers, present more diversification of flowers, so the creation of hybrids joining these two aspects is a factor of great interest. Consequently the interest for the Brazilian native species of this genus is also increasing gradually due to the demand for banks of germoplasm aiming at to the conservation and the development of programs of genetic improvement for the production of hybrids. The aim of this study was the karyotype characterization of four native species of *Alstroemeria*, namely: *A. cunha*, *A. inodora*, *A. longistaminea* and *A. psittacina* through karyotype elaboration with traditional staining techniques, as Giemsa, and longitudinal differentiation chromosomes through banding with the fluorochromes Chromomycin A₃/distamycin (CMA₃/DA) and 2' 4' - diamidino-2-phenylindole/actinomycin (DAPI/AMD). Additionally were mapped the nucleolus organizer regions through staining of the chromosomes with silver staining (AgNOR) and with the cytomolecular technique of fluorescent *in situ* hybridization of nucleic acids (FISH) with sequences of rDNA 45S and 5S as probes. The results obtained from the application of banding techniques CMA₃/DA and DAPI/AMD, banding NOR, and FISH for rDNA are presented for the first time to the Brazilian species. The results show asymmetrical karyotypes, with $2n = 2x = 16$ chromosomes, confirming the somatic number mentioned in literature for the genus. The chromosome complements of the four analyzed species, present the karyotype formula $2m+1sm+1st+4T-sat$. Through the fluorochromes banding with DAPI/AMD and CMA₃/DA the characterization of the species for the longitudinal differentiation of the chromosomes was possible. The application of FISH with the sequences of rDNA 45S and 5S resulted in varied number of signals in different positions in the chromosome sets, which complement the information that had allowed the individualization of the species. Some pairs of homologous present polymorphism for the regions of rDNA. Through the impregnation with silver nitrate, active nucleolar

regions had been detected and some of them were coincident with the signals for FISH-rDNA 45S in the four studied species. The chromatin total length (CTC); the centromeric index (IC); the index of karyotype asymmetry (TF%) and the coefficient of variation of the averages of the total lengths of the chromosomes (CV%) were determined and these data set has allowed the karyotypes distinction for the four species resulting in an advance importance in the interspecific differentiation of this group of plants.

Word-key: Karyotype, *in situ* hybridization, cytomolecular technique, banding, fluorochromes, silver staining, longitudinal differentiation of chromosomes, ornamental plant.

1 INTRODUÇÃO

As cerca de 90 espécies pertencentes ao gênero *Alstroemeria* L. (monocotiledôneas, Alstroemeriaceae) estão distribuídas na América do Sul. A maioria delas é originária do Brasil e Chile. O gênero é caracterizado principalmente por plantas herbáceas, eretas, com inflorescência em cimeira umbeliforme e de flores zigomorfas. As espécies do gênero possuem número básico de cromossomos $x = 8$ ($2n = 2x = 16$).

O gênero é constituído por espécies com potencial ornamental devido à durabilidade e a beleza de suas flores. Mundialmente já há um bom reconhecimento dessas plantas como ornamentais de cultivo e de corte.

Na Holanda as espécies de *Alstroemeria* estão entre as dez flores de corte mais comercializadas e o mercado de exportação de mudas está bem estabelecido. Neste país têm sido utilizadas principalmente espécies chilenas como base para o melhoramento. O mercado japonês também se destaca por ter estas flores como uma das mais comercializadas.

No Brasil, o cultivo e a importância econômica de flores de *Alstroemeria* também vêm aumentando gradativamente, porém tanto o cultivo como as flores comercializadas ainda são dependentes de material importado, como espécies chilenas e/ou híbridos destas com algumas espécies brasileiras, desenvolvidos fora do país. As espécies brasileiras embora com grande potencial para utilização em programas de cruzamento visando à produção de híbridos, devido à diversidade de cores e padrões de suas flores, ainda encontram-se pouco estudadas. Devido a isto há a necessidade de se ampliar os conhecimentos básicos para as espécies silvestres brasileiras, como também de pré-melhoramento, de forma a caracterizar sobremaneira os bancos de germoplasma existentes ou incrementar a criação de novos bancos. Dados citológicos são importantes na pré-avaliação de afinidade genética entre espécies parentais, quando de cruzamentos para produção de híbridos, e após os cruzamentos, na avaliação da estabilidade de híbridos.

A falta de conhecimentos citogenéticos para as espécies brasileiras de *Alstroemeria* e o interesse econômico crescente dessas plantas requer entre outros estudos, uma análise detalhada dos cromossomos dessas espécies visando complementar a caracterização das mesmas no Banco de Germoplasma do IAC o qual foi constituído visando não somente a preservação das espécies em si como também a

sua utilização em programas de cruzamento para a produção de híbridos com potencial ornamental.

Diferentes técnicas citogenéticas clássicas e técnicas de citogenética molecular, tais como a coloração com Giemsa, o bandamento com os fluorocromos 4'-6-diamidino-2-fenilindol com actinomicina D (DAPI/AMD) e Cromomicina A₃ com distamicina (CMA₃/DA) como também a técnica de hibridação *in situ* de ácidos nucléicos fluorescente (FISH) com sequências específicas, têm sido importantes na caracterização de espécies de plantas e animais. Assim o bandamento com os fluorocromos DAPI/AMD e CMA₃/DA, que diferenciam os cromossomos longitudinalmente, permitindo a sua individualização e conseqüentemente o complemento cromossômico de espécies pela composição de bases do DNA presente na cromatina dos cromossomos; a técnica FISH de sequências específicas de DNA ribossômico (rDNA) para determinação do número e localização de regiões organizadoras do nucléolo (NOR), presentes no complemento cromossômico das espécies, bem como a técnica de impregnação com prata (AgNOR) para a identificação das NORs ativas no último ciclo celular; facilitam sobremaneira não somente a caracterização das espécies em si mas também a discriminação de espécies com características morfológicas particulares a serem utilizadas em programas de cruzamento para a obtenção de progênies com características especiais para floricultura.

Este trabalho teve como objetivo a caracterização citogenética de quatro espécies brasileiras do gênero *Alstroemeria*: *A. cunha*, *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina* através da aplicação das técnicas de coloração Giemsa, bandamento com os fluorocromos DAPI/AMD e CMA₃/DA, hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para as sequências específicas de DNA ribossômico (rDNA) 18S-5,8-26S e 5S e a impregnação pela prata (AgNOR-banda NOR).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos econômicos do gênero *Alstroemeria* L.

Alstroemeria é um gênero que possui algumas espécies que são cultivadas pelo valor ornamental de suas flores, principalmente as espécies nativas do Chile, que apresentam flores de tamanho maior, comparativamente às espécies nativas brasileiras.

No Brasil, o valor no mercado dessas plantas como ornamentais vem crescendo, visto que as alstroemérias brasileiras embora com flores menores, apresentam maior diversificação de padrões de flores o que torna a criação de híbridos unindo estes dois aspectos, tamanho e variedade, um fator de grande interesse.

A produção de plantas ornamentais é uma atividade agrícola e trata-se de um setor altamente competitivo, que exige a utilização de tecnologia avançada, conhecimento técnico pelo produtor, além de um sistema eficiente de distribuição e comercialização.

O mercado de exportação de mudas de *Alstroemeria* é um segmento bastante importante na Holanda, que tem utilizado como base para o melhoramento as espécies chilenas, mas demonstrando interesse crescente pelas espécies brasileiras (PINTO-MAGLIO et al., 1995).

O Brasil possuía, em 1996, cerca de 10.285 ha de área de cultivo de flores. Também segundo a IBRAFLOR, (Instituto Brasileiro de Floricultura-<http://www.ibraflor.com.br>), em São Paulo eram cultivados, neste mesmo ano, 3.457 ha, mostrando já nessa época a importância em relação aos demais estados brasileiros. Ainda de dados fornecidos pelo IBRAFLOR, em 2001, a área total utilizada na produção de flores e plantas ornamentais aproximava-se de 5.000 ha, sendo que a região Sudeste do Brasil respondia por 75% dessa área. Em 2003 a produção nacional de flores estava distribuída em 12 pólos, sendo que, dos 2.500 produtores catalogados, a maioria localizava-se em São Paulo, ou seja, quase 70%.

A produção brasileira ainda está voltada basicamente para o mercado interno, sendo que 97,1% dos produtores não exportam. Iniciativas vêm sendo tomadas de forma a aumentar o fornecimento no mercado regional e também no mercado internacional. Especialistas garantem um crescimento médio aproximado de 20% ao ano, o que tornará a floricultura uma das cadeias produtivas mais promissoras no agronegócio mundial. Segundo indica a IBRAFLOR, apesar de não terem ainda se firmado definitivamente no mercado internacional, as flores brasileiras em geral, já são

consideradas de qualidade. Em 2006 a floricultura brasileira movimentou cerca de US\$ 15 milhões (VENCATO et al., 2006), sendo os principais países importadores a Holanda (50,09%), Estados Unidos (21,29%), Itália (9,63%), Japão (4,94%) e Bélgica (4,41%), além desses países, foi registrado a entrada de novos países compradores que foram seduzidos pelos produtos brasileiros (<http://www.ibraflor.com.br>).

Atualmente o estado de São Paulo tem a liderança em tecnologia, produção e lançamento de produtos sendo o comércio de plantas ornamentais liderados pelo Veiling - Holambra (leilão através da Cooperativa), pela CEAGESP (Cia de Entrepósito de Armazéns Gerais de São Paulo) e pela CEASA-Campinas (Central de Abastecimento S.A.). Apenas o Veiling - Holambra responde por 30% do comércio brasileiro de flores, enquanto a CEAGESP corresponde a 23% (JUNQUEIRA & PEETZ, 2008).

Especificamente para *Alstroemeria*, a cotação do mercado permanente de flores do dia 12/01/2009, na Ceasa-Campinas o valor da dúzia de hastes variou de R\$ 6,00 a R\$ 8,00, valor esse que oscila conforme a época de produção das mesmas (<http://www.ceasacampinas.com.br>).

Devido a esse vigente crescimento e desenvolvimento do setor de plantas ornamentais no país, observa-se a necessidade simultânea de ampliar as pesquisas de caracterização e conservação de espécies nativas com essas características potencialmente econômicas e efetuar a domesticação e utilização racional das mesmas na área de melhoramento.

Grande parte da variabilidade das plantas comercializadas tem origem em hibridações (BUITENDIJK et al., 1995; DE JEU & JACOBSEN, 1995) ou através de tratamentos mutagênicos (LU & BRIDGEN, 1997), no entanto, essas metodologias têm gerado híbridos com diferentes graus de incompatibilidade. Uma maneira de se efetuar a avaliação da estabilidade dos híbridos, antes de serem colocados no mercado, é conhecer citogeneticamente, tanto as espécies parentais como os híbridos formados.

2.2 Caracterização botânica da família Alstroemeriaceae

A família Alstroemeriaceae (monocotiledônea), descrita por DUMONTEIR (1829), segundo a APGII (2003) pertence ao clado (ordem) Liliales, possui cerca de 190 espécies distribuídas desde a região central do México até o Sul da América do Sul (ASSIS, 2001).

A família é dividida em três gêneros: *Alstroemeria* L., *Bomarea* Mirb., e *Leontochir* Phil. (SANSO & XIFREDA, 2001). No Brasil são encontrados apenas os gêneros *Alstroemeria* L. e *Bomarea* Mirb. (ASSIS, 2002).

O gênero *Alstroemeria* L., foi descrito por Linnaeus em 1762, o qual deu o nome de *Alstroemeria* em homenagem ao seu amigo Alstroemer (SANSO, 1996). O gênero *Alstroemeria* pertencia à família Amaryllidaceae até meados de 1820 quando DUMONTEIR (1829) descreveu a família Alstroemeriaceae e incluiu nesta, os gêneros *Alstroemeria* L e *Bomarea* Mirb.

Durante varias décadas, vários autores não reconheceram a família Alstroemeriaceae mantendo a classificação do gênero *Alstroemeria* dentro da família Amaryllidaceae.

Hallier (1903 apud ASSIS, 2001) descreveu espécies de *Alstroemeria* como pertencentes à família Alstroemeriaceae que na época estava incluída na ordem Liliflorae. Anos depois, TAKHTAJAN (1969) incluiu a família Alstroemeriaceae na ordem Liliales, mudança que não foi aceita por vários autores. RUDALL et al. (2000), posicionaram a família Alstroemeriaceae na ordem Liliales, reafirmando a posição de TAKHTAJAN (1969), que é aceita na atual classificação da APGII (2003).

O gênero *Alstroemeria* L. é caracterizado principalmente por plantas herbáceas, eretas, com inflorescências em cimeira umbeliforme e de flores zigomorfas com padrões de listras nas tépalas. São originárias da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai (SANSO, 1996; ASSIS, 2001; SANSO & XIFREDA, 2001), sendo Brasil e Chile os países que apresentam maior número de espécies.

Restritas à América do Sul, há cerca de 90 espécies do gênero *Alstroemeria* L., sendo que no Brasil ocorrem 39 delas (Tabela 1). As diferentes espécies brasileiras de *Alstroemeria* podem ser encontradas em quase todos os tipos de habitats como: florestas, cerrados, campos de altitudes, brejos, afloramentos rochosos e caatinga, em altitudes que variam de 300 m até 2.300 m. A maioria das espécies possui distribuição de habitat relativamente restrita. (ASSIS, 2001).

Para as espécies brasileiras do gênero *Alstroemeria*, a série de trabalhos mais completos sobre taxonomia foi desenvolvida por ASSIS (2002, 2003, 2006, 2009) onde foram descritas novas espécies ocorrentes no Brasil, sendo seis delas no estado de Minas Gerais: *A. calliantha* M.C.Assis, *A. julieae* M.C.Assis, *A. ochracea* M.C.Assis, *A. penduliflora* M.C.Assis, *A. rupestris* M.C.Assis, *A. variegata* M.C.Assis; uma no estado do Paraná a espécie *A. amabilis* M.C. Assis; uma no estado do Espírito Santo a *A.*

capixaba M.C.Assis, uma no estado do Pará a espécie *A. paraensis* M.C.Assis e uma no estado do Rio Grande do sul a *A. albescens* M.C.Assis.

Tabela 1 – Espécies de *Alstroemeria* encontradas no Brasil, com seus respectivos locais de origem e autores que descreveram as espécies pela primeira vez, segundo MEEROW et al., (1999) e M.C.ASSIS, (2002, 2003, 2004, 2006, 2009).

Espécies	Locais onde são encontradas	Autor
<i>A. albescens</i>	Afloramento rochoso. RS	M.C.ASSIS, 2009
<i>A. amabilis</i>	Locais úmidos e elevados. PR e SC.	M.C.ASSIS, 2003
<i>A. amazônica</i>	Matas secas de solos pedregosos. PA.	DUCKE, 1915
<i>A. apertiflora</i>	Argentina, Paraguai e Brasil. Em regiões brejosas. GO, MG e RS.	BAKER, 1888
<i>A. brasiliensis</i>	Locais úmidos nos cerrados. GO e MT.	SPRENG, 1825
<i>A. burchellii</i>	Locais úmidos em afloramentos rochosos e cerrados. GO.	BAKER, 1877
<i>A. caiaponica</i>	Cerrados. GO e MT.	RAVENNA, 2000
<i>A. calliantha</i>	Áreas de transição de caatinga com floresta estacional em locais sombreados. MG.	M.C.ASSIS, 2009
<i>A. capixaba</i>	Interior das florestas estacionais semidecíduas. ES.	M.C.ASSIS, 2003
<i>A. caryophyllaea</i>	Locais úmidos e sombreados. MG e RJ.	JACQUIN, 1804
<i>A. chapadensis</i>	Cerrados. MT.	HOEHNE, 1915
<i>A. cunha</i>	No interior de florestas estacionais semidecíduas. ES, MG, PR, RJ e SP.	VELLOZO, 1829
<i>A. foliosa</i>	Serras. MG. RJ e SP.	MARTIUS, 1829
<i>A. fuscovinosa</i>	Capoeira e interior de floresta estacional semidecídua. MG e SP.	RAVENNA, 2000
<i>A. gardneri</i>	Cerrado. BA, MG, MT, GO e DF.	BAKER, 1877
<i>A. inodora</i>	Interior das florestas estacionais semidecíduas. SC, SP, PR, RS.	HERBERT, 1837
<i>A. isabelleana</i>	Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil. Regiões brejosas. MG e RS.	HERBERT, 1837
<i>A. julieae</i>	Cerrado. MG.	M.C.ASSIS, 2002

Tabela 1..... Continuação

<i>A. longistaminea</i>	Locais sombreados das caatingas. Pernambuco, Sergipe e BA.	MARTIUS, 1829
<i>A. longistyla</i>	Campos brejosos. DF, GO, MG.	SCHENK, 1955
<i>A. malmeana</i>	Campos úmidos. PR e RS.	KRAENZL, 1913
<i>A. monticola</i>	Locais sombreados de solo arenoso e pedregoso. BA e MG.	MARTIUS, 1829
<i>A. ochracea</i>	No interior ou na borda de matas. MG.	M.C.ASSIS, 2002
<i>A. orchidioides</i>	Matas semi-decíduas. DF e GO.	MEEROW, 1999
<i>A. paraensis</i>	Florestas estacionais semidecíduas. PA.	M.C.ASSIS, 2006
<i>A. penduliflora</i>	Afloramentos rochosos e cerrados de altitudes. MG.	M.C.ASSIS, 2002
<i>A. piaubyensis</i>	Ilhas de florestas ombrófilas abertas e nas caatingas. Piauí, Pernambuco e Ceará.	GARDNER, 1888
<i>A. plantaginea</i>	Afloramentos rochosos e campo sujo. BA, MG e SP.	MARTIUS, 1829
<i>A. psittacina</i>	Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil. Locais sombreados no interior ou na orla de mata. MS, MT, PR, RS e SP.	LEHMAN, 1826
<i>A. punctata</i>	Cerrados. DF e GO.	RAVENNA, 2000
<i>A. radula</i>	Mata de altitude e em solo arenoso. ES e RJ.	DUSÉN, 1905
<i>A. rupestris</i>	Afloramentos rochosos. MG.	M.C.ASSIS, 2002
<i>A. sellowiana</i>	Regiões brejosas. PR, RS e SC.	SEUB., 1855
<i>A. speciosa</i>	Matas higrófilas em elevadas altitudes SP.	M.C.ASSIS, 2004
<i>A. stenopetala</i>	Cerrados, campos úmidos e em afloramentos rochosos. DF, GO e MG.	SCHENK, 1855
<i>A. stenophylla</i>	Afloramentos rochosos e borda da mata ciliar. GO e MG.	M.C.ASSIS, 2002
<i>A. tombolatoan</i>	Cerrados. TO, GO e MT.	M.C.ASSIS, 2004
<i>A. variegata</i>	Altitudes elevadas em afloramentos rochosos. MG.	M.C.ASSIS, 2002
<i>A. viridiflora</i>	Cerrado e borda de mata ciliar. DF, GO, MG, MS e MT.	WARMING, 1872

2.3 Espécies do gênero *Alstroemeria* estudadas

2.3.1 *Alstroemeria cunha* Vell.

A espécie *A. cunha* foi descrita por Vellozo (1829 apud ASSIS, 2001). Posteriormente em 1831, a mesma espécie foi publicada com o nome de *A. cunea*. A grafia *A. cunha* foi mantida como correta por ter sido publicada anteriormente a *A. cunea*.

A espécie é frequentemente encontrada no interior de florestas estacionais semidecíduas no Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (ASSIS, 2001) e apresenta porte herbáceo.

O florescimento ocorre esporadicamente ao longo do ano, sendo a ocorrência mais intensa de florescimento nos meses de novembro a março.

A. cunha (Figura 1A) se assemelha à espécie *A. inodora* (Figura 1B), sendo ambas encontradas no mesmo tipo de habitat. No entanto, elas podem ser diferenciadas pela presença de flores com listras ou manchas nas tépalas externas em *A. inodora* o que não ocorre em *A. cunha* (ASSIS, 2001).

2.3.2 *Alstroemeria inodora* Herb.

A espécie *A. inodora* foi descrita por Herbert (1837 apud ASSIS, 2001). Esta espécie ocorre no interior das florestas estacionais semidecíduas de São Paulo, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul e apresenta porte herbáceo (ASSIS, 2001) e seu florescimento ocorre geralmente, entre os meses de outubro a janeiro e frutifica em dezembro e março.

A espécie *A. inodora* (Figura 1B) é caracterizada por apresentar flores de tépalas externas rubro-variegadas e internas rubro-lineadas. Esta espécie também se assemelha à espécie *A. psittacina* (Figura 1D) da qual se diferencia por possuir flores com tépalas externas e internas rubro-maculadas (ASSIS, 2001).

2.3.3 *Alstroemeria longistaminea* Mart. ex Schult. & Schult.f.

A espécie *A. longistaminea* foi descrita por Martius (1829 apud ASSIS, 2001). É encontrada nos afloramentos rochosos em locais sombreados das caatingas de Pernambuco, Sergipe e Bahia (ASSIS, 2001) e apresenta porte herbáceo.

O florescimento da espécie ocorre na estação mais seca, principalmente nos meses de maio a agosto, podendo às vezes florescer em setembro e outubro; frutifica em agosto e setembro.

A espécie é conhecida na Bahia (BA) como salsaparrilha e no Sergipe (SE) como Bico-de-nanbu.

A. longistaminea (Figura 1C) é facilmente identificável por suas flores pêndulas, suas tépalas externas elípticas a obovadas, filetes e estiletes papilosos e seu hábito vegetativo com folhas membranáceas glabras e patentes (ASSIS, 2001).

2.3.4 *Alstroemeria psittacina* Lehm.

A espécie *A. psittacina* foi descrita por Lehman (1826 apud ASSIS, 2001). Além do Brasil esta espécie é encontrada também na Argentina, Uruguai e Paraguai. No Brasil a espécie é encontrada em locais sombreados no interior ou na orla de mata nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (ASSIS, 2001) e apresenta porte herbáceo.

Seu florescimento ocorre nos meses de novembro, dezembro, fevereiro e maio e frutifica em novembro.

A. psittacina (Figura 1D) é caracterizada pelas flores vermelhas, com o terço distal verde, e também por apresentar todas as tépalas rubro-maculadas. Esta espécie se assemelha muito a *A. inodora* (Figura 1B) da qual se diferencia pelas flores que em *A. inodora* se apresentam com as tépalas externas rubro-variegadas e internas rubro-lineadas e não rubro-maculadas como ocorre com as flores de *A. psittacina* (ASSIS, 2001).

2.4 Estudos citogenéticos para o gênero *Alstroemeria* L.

As primeiras contagens cromossômicas para o gênero *Alstroemeria* foram realizadas por TSUCHIYA et al. (1987). Estudando nove cultivares e dois híbridos de *A. ligtu*, estes autores determinaram para dois dos cultivares e para os dois híbridos um número cromossômico diplóide ($2n = 16$); para seis cultivares um número triplóide ($2n = 24$) e para apenas um dos cultivares, um número tetraplóide ($2n = 2x + 1 = 33$). Posteriormente, TSUCHIYA & HANG (1987) determinou o número cromossômico para nove espécies (*A. aurantiaca*, *A. psittacina*, *A. pulchella*, *A. pelegrina*, *A. versicolor*, *A. haemantha*, *A. chilensis*, *A. caryophyllaea* e *A. hookeri*) e mais 25 cultivares. Todas as espécies apresentaram cariótipo diplóide com $2n = 2x = 16$ cromossomos. Dos cultivares, quatro deles apresentaram número diplóide ($2n = 16$), 13 eram triplóides ($2n = 24$) e oito eram tetraplóides ($2n = 32$).

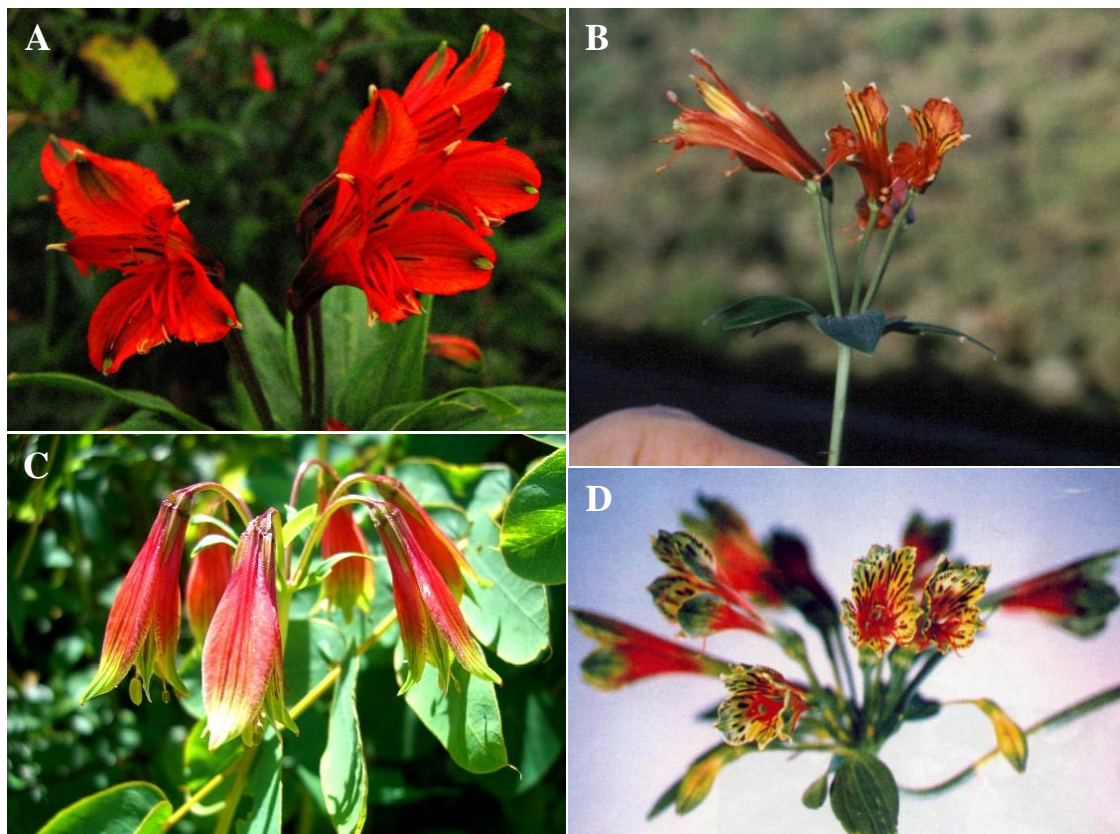


Figura 1 – Ramos reprodutivos de *Alstroemeria*. (A) *A. cunha*; (B) *A. inodora*; (C) *A. longistaminea*; (D) *A. psittacina*. Fotos de M. C. de Assis.

HANG & TSUCHIYA (1988) publicaram o número cromossômico de 11 cultivares, sendo dois deles diplóides ($2n = 16$), sete triplóides ($2n = 24$) e dois tetraplóides ($2n = 32$). Os cultivares poliplóides, determinados pelos autores acima citados, eram resultantes de duplicação cromossômica e da formação de híbridos interespecíficos ao acaso.

TSUCHIYA & HANG (1989) estudaram 11 espécies (*A. aurantiaca*, *A. caryophyllaea*, *A. chilensis*, *A. haemantha*, *A. hookeri*, *A. ligtu*, *A. pelegrina*, *A. psittacina*, *A. pulchra*, *A. versicolor*, *A. violacea*). Nesse trabalho os autores confirmaram o número cromossômico diplóide igual a $2n = 16$ para sete espécies que os mesmos já haviam estudado em 1987 e determinaram o número cromossômico para outras três espécies (*A. ligtu*, *A. pulchra*, *A. violacea*) como sendo $2n = 2x = 16$. Estudos posteriores também confirmaram que as espécies do gênero *Alstroemeria* são diplóides com $2n = 2x = 16$ cromossomos (HUNZIKER & XIFREDA, 1990; PINTO-MAGLIO et al., 1995; SANZO, 2002). Uma relação com contagens cromossômicas neste gênero, disponíveis na literatura especializada, encontram-se na (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação das espécies de *Alstroemeria* com contagem cromossômica, segundo GOLDBLATT (1981, 1984, 1985, 1988) e MISSOURI BOTANICAL GRADEN (2008).

Espécie	n	2n	Referência
<i>A. haemantha</i>	8		CORTAZAR, 1948
<i>A. patagonica</i>		16	MOORE, 1981
<i>A. pulchra</i>	8		NORDENFLYCHT, 1981
<i>A. caryophyllaea</i>		16	TSUCHIYA & HANG, 1989
<i>A. aurantiaca</i>	8II	16	TSUCHIYA & HANG, 1989
<i>A. chilensis</i>		16	TSUCHIYA & HANG, 1989
<i>A. haemantha</i>	8II	16	TSUCHIYA & HANG, 1989
<i>A. hookeri</i>		16	TSUCHIYA & HANG, 1989
<i>A. ligtu</i>	8II, 7II+ 2I	16	TSUCHIYA & HANG, 1989
<i>A. pelegrina</i>	8II, 7II + 2I	16	TSUCHIYA & HANG, 1989
<i>A. psittacina</i>	8II	16	TSUCHIYA & HANG, 1989
<i>A. pulchella</i>	8II	16	TSUCHIYA & HANG, 1989
<i>A. pulchra</i>	8II, 7II + 2	16	TSUCHIYA & HANG, 1989
<i>A. versicolor</i>	8II	16	TSUCHIYA & HANG, 1989
<i>A. violácea</i>	8II	16	TSUCHIYA & HANG, 1989
<i>A. pelegrina</i>		16	STEPHENS et al., 1993
<i>A. aurea</i>		16	BUITENDIJK & RAMANNA, 1996
<i>A. inodora</i>		16	BUITENDIJK & RAMANNA, 1996
<i>A. philippii</i>		16	BUITENDIJK & RAMANNA, 1996
<i>A. psittacina</i>		16	BUITENDIJK & RAMANNA, 1996
<i>A. ligtu</i>		16	BUITENDIJK et al., 1998
<i>A. magnifica</i>		16	BUITENDIJK et al., 1998
<i>A. hygrophila</i>		16	MEEROW et al., 1999
<i>A. orchidioides</i>		16	MEEROW et al., 1999

HUNZIKER & XIFREDA (1990) realizaram estudos cromossômicos meióticos para duas espécies coletadas na argentina, *A. aurea* e *A. psittacina*, esta última também encontrada no Brasil, e para duas espécies do gênero *Bomarea*, a espécie argentina *B. edulis* e a espécie colombiana *B. setacea*. Estes autores determinaram para as espécies

de *Alstroemeria* número haplóide de cromossomos $n = 8$ e para as espécies de *Bomarea* $n = 9$. Embora as espécies de *Bomarea* apresentem um par cromossômico a mais, estas espécies apresentam cromossomos com comprimentos menores em relação aos das espécies de *Alstroemeria*. Segundo os autores, esses resultados sugerem que *Alstroemeria* pode ter se derivado de *Bomarea* por translocações de material genético para outros cromossomos, pela perda de um centrômero e ainda pela adição de cópias repetitivas de DNA em todos os cromossomos.

Trabalho semelhante foi realizado por SANSO & HUNZIKER (1998) onde foram realizados estudos cariotípicos e meióticos de duas espécies *A. isabellana* Herb. e *A. psittacina* Lehm., espécies estas encontradas na Argentina e Brasil, e duas espécies argentinas de *Bomarea* (*B. boliviensis* Baker e *B. edulis* Herb). Com os estudos meióticos e mitóticos, os autores confirmaram o número cromossômico para o gênero *Alstroemeria* como sendo $n = 8$ e $2n = 16$ e para o gênero *Bomarea* $n = 9$ e $2n = 18$. Os autores constataram que os dois gêneros apresentam consideráveis diferenças entre si no número cromossômico e também na fórmula cariotípica. Da mesma forma que os autores anteriores, eles sugerem a hipótese de que há uma tendência à diminuição do número básico de $x = 9$ para $x = 8$, e um aumento do comprimento total da cromatina (CTC) já que as espécies de *Alstroemeria* apresentam maior CTC que as espécies de *Bomarea*.

Estudos para diversas espécies argentinas de *Alstroemeria* foram realizados por SANSO (1996) e SANSO & XIFREDA (2001) e para espécies chilenas por BAYER (1987) e MUNOZ-SCHICK (2003). A partir de um estudo de SANSO (2002), foram adicionadas novas identificações de espécies argentinas e chilenas, a saber: *A. andina* ssp. *venustula*, *A. hookeri* ssp. *cummingrana*, *A. hookeri* ssp. *recumbens*, *A. palliada*, *A. patagonica*, *A. pseudospathulata* e *A. pygmaea*. Para as espécies *A. andina* ssp. *venustula* e a *A. pygmaea* foi feita a cariotipagem e para as demais espécies (*A. patagonica*, *A. pseudospathulata*, *A. hookeri* ssp. *recumbens*, *A. palliada* e a *A. hookeri* ssp. *cummingrana*) foram realizados adicionalmente estudos meióticos. Para todas estas espécies estudadas o número de cromossomos encontrado foi $2n = 2x = 16$ cromossomos.

Com o uso da técnica de bandamento-C, BUITENDIJK & RAMANNA (1996) estudaram duas espécies brasileiras de *Alstroemeria* (*A. inodora* e *A. psittacina*), três espécies e três subespécies chilenas (*A. aurea*, *A. pelegrina*, *A. philippii* e as subespécies *A. angustifolia*, *A. magnífica*, e *A. ligtu*) e dez híbridos interespecíficos.

Mediante a técnica de bandamento foi possível estabelecer os pares cromossômicos de todas as espécies e subespécies estudadas. A partir dos padrões de banda-C, os autores verificaram similaridade cariotípica entre as espécies estudadas; para as subespécies foram verificadas diferenças no padrão de banda-C.

Para discriminar espécies de *Alstroemeria* envolvidas na formação de híbridos interespecíficos, KUIPERS et al. (1997) usaram uma combinação da técnica de hibridação *in situ* genômico (GISH) com slot-blot e hibridação southern blot. Com a técnica de GISH foi possível discriminar claramente as espécies parentais envolvidas na formação dos híbridos interespecíficos entre as espécies chilenas e entre espécies chilenas e brasileiras. Todas as espécies parentais envolvidas na formação dos híbridos e os próprios híbridos eram todos diplóides com $2n = 2x = 16$ cromossomos.

Estudos de comportamento de cromossomos meióticos e também de bandamento-C foram realizados por ISHIKAWA & ISHIZAKA (2002). Estes autores estudaram espécies diplóides de *A. ligtu* e *A. pelegrina* e seus híbridos interespecíficos triplóides e tetraplóides ($2n = 16$, $3n = 24$, $4n = 32$).

2.5 Coloração com Giemsa

O corante Giemsa é um corante que marca os cromossomos uniformemente assim como a técnica do corante carmim acético. Essas técnicas consideradas convencionais são limitantes qualitativamente, e muitas vezes não proporcionam uma diferenciação longitudinal dos cromossomos. Com o emprego destas técnicas, é possível determinar: o número cromossômico das espécies, as medidas dos cromossomos, o comprimento total da cromatina, o índice de assimetria, a visualização da região centromérica, da constrição secundária e do segmento satélite a ela associada, quando presente, a classificação dos cromossomos em categorias, que vão de metacêntrico a telocêntrico e o estabelecimento da fórmula cariotípica.

A obtenção de vários dados cromossômicos através da utilização das técnicas convencionais usadas por muitos autores, e em alguns casos a apresentação do cariótipo simplesmente corado com corantes convencionais, é insuficiente para uma caracterização intraespecífica e/ou interespecífica de espécies, pelo fato dessa metodologia não ser capaz de especificar características morfológicas detalhadas, muitas vezes necessárias para a identificação individual dos cromossomos.

Para citar alguns exemplos, temos primeiramente o trabalho realizado por SILVEIRA et al. (2006) que, utilizando a técnica de Giemsa, determinaram o número

cromossômico e as medidas dos cromossomos de duas espécies do gênero *Myrciaria*, popularmente conhecida como jabuticaba, a espécie silvestre *Myrciaria trunciflora* e a cultivada *Myrciaria cauliflora*, como sendo $2n = 22$ cromossomos para a espécie cultivada e $2n = 48$ cromossomos para a nativa. Estes dados permitiram estabelecer a divergência presente entre as espécies quanto ao número cromossômico.

LOMBELLO & FORNI-MARTINS (1998) utilizando a técnica de Giemsa determinaram o número cromossômico de 11 espécies pertencentes a sete diferentes famílias de trepadeiras. A caracterização destas espécies foi possível com a complementação dos dados das medidas de cada par cromossômico e do cálculo do índice centromérico. Esses mesmos autores determinaram também através deste tipo de coloração o número cromossômico, para outras cinco espécies pertencentes à família Sapindaceae, sendo a caracterização das mesmas, também complementada pelas medidas e índice centromérico.

Seguindo basicamente os mesmos dados das análises apresentadas acima, ANDRADE et al. (2008) caracterizaram citogeneticamente a espécie *Crotalaria lanceolata* como sendo um diplóide com $2n = 16$ cromossomos e fórmula cariotípica $12M + 4SM$.

FELIX et al. (2008) confirmaram a grande variabilidade cariotípica intraespecífica existente no gênero *Zephyranthes* Herb. (Amaryllidaceae: Hippeastreae). Neste estudo apesar das análises dos cromossomos terem sido feitas apenas com os corantes convencionais Giemsa e hematoxilina, a determinação cariotípica de 32 indivíduos de uma população da espécie *Zephyranthes sylvatica* possibilitou a identificação de três citotipos diferentes.

ORTOLANI et al. (2007) utilizaram a técnica de Giemsa para efetuar a cariotipagem da espécie *Schlumbergera truncata* (Cactaceae) que apresenta plantas com flores de diferentes colorações, e também a cariotipagem do híbrido *Schlumbergera X buckleyi*. A diferenciação das espécies nesse gênero, através de características fenotípicas, não proporciona por si só uma separação confiável. No entanto, o uso da técnica de Giemsa juntamente com o bandamento-C e as medidas cromossômicas, foram suficientes para que os autores conseguissem identificar as espécies pelo cariótipo, com exceção de apenas uma delas, que não foi identificada nem mesmo com a aplicação de bandamento-C.

As primeiras contagens cromossômicas para o gênero *Alstroemeria*, realizadas por TSUCHIYA et al. (1987), foram efetuadas usando-se o corante convencional

carmin acético. PINTO-MAGLIO et al. (1995) usando igualmente corante convencional, como o Giemsa, determinaram também o número cromossômico para algumas espécies do gênero *Alstroemeria*. Estes autores verificaram que a coloração com Giemsa era insuficiente para a diferenciação cromossômica intraespecífica e interespecífica, visto as espécies do gênero não apresentarem diferenças no número de cromossomos e nem diferenças morfológicas nos complementos cromossômicos. Com base nesses resultados esses autores iniciaram experimentos inicialmente aplicando as técnicas de bandamento com CMA e DAPI, com resultados positivos quanto à diferenciação cromossômica das espécies analisadas (dados não publicados). O presente trabalho deu continuidade a esta caracterização cariotípica de espécies de *Alstroemeria* não somente através das técnicas de bandamento CMA/DAPI, mas ainda complementada com o mapeamento das regiões organizadoras do nucléolo (NOR) através do uso das técnicas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e da impregnação com prata (AgNOR), estando os resultados descritos nesta dissertação.

Embora as técnicas convencionais de coloração cromossômica, como a coloração pelo corante Giemsa permita a diferenciação de espécies, muitas vezes são necessárias técnicas de bandamento para uma caracterização mais detalhada dos cromossomos individualmente. Técnicas de bandamento-C, bandamento-NOR, bandamento com fluorocromos CMA e DAPI entre outras, permitem maior detalhamento da estrutura e morfologia dos cromossomos individuais.

2.6 Bandamento com corantes fluorescentes - CMA₃ e DAPI

A técnica de coloração utilizando corantes fluorescentes (fluorocromos) para bandamento tem sido usada para a obtenção de padrões diferenciais característicos de bandas fluorescentes nos cromossomos o que proporciona uma análise mais refinada dos conjuntos cromossômicos. Os fluorocromos mais utilizados atualmente são o 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e a Cromomicina A₃ (CMA₃).

Segundo SCHWEIZER (1976), preparações cromossômicas com os fluorocromos DAPI e CMA₃ produzem padrões de bandamento de acordo com a afinidade de bases do DNA. O corante fluorescente CMA₃ é um fluorocromo que se liga as regiões heterocromáticas ricas em bases nitrogenadas guanina e citosina (GC), já o DAPI é um fluorocromo que se liga às regiões cromossômicas ricas em bases nitrogenadas adenina e timina (AT). Estes fluorocromos podem ser associados a antibióticos como a distamicina e actinomicina, respectivamente, para incrementar o

contraste do bandamento. O fluorocromo CMA₃ pode ser usado associado ao antibiótico distamicina (CMA₃-DA) o qual age como um contracorante que se liga às bases AT, permitindo um maior contraste nas regiões ricas em GC. Da mesma forma, o DAPI quando associado ao antibiótico actinomicina (AMD) faz com que este funcione também como um contracorante, neste caso ligando-se às bases GC promovendo maior contraste das regiões ricas em AT.

Os resultados obtidos com o uso de corantes fluorescentes têm permitido um melhor entendimento sobre a origem e evolução dos cariótipos de plantas pelo fato dessas técnicas permitirem uma comparação entre os padrões de bandas fluorescentes, e sua composição, nos diferentes cromossomos e nos diferentes complementos. Caracterizações citogenéticas de espécies ornamentais, mediante bandamento cromossômico com o uso de fluorocromos, foram realizadas por vários autores.

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

Com o objetivo de encontrar informações adicionais de diferenciação e organização genômica para espécies do gênero *Hypochaeris* (Asteraceae) CERBAH et al. (1998) realizaram bandamento com CMA₃, impregnação com prata e hibridação *in situ* com sequências de rDNA 18S-5.8S-28S e 5S. Todas as espécies analisadas apresentaram bandas CMA₃⁺, bandas NOR e sinais de hibridação *in situ* localizados, principalmente, na região do satélite e nas constrições secundárias. Todas as bandas CMA₃ positivas corresponderam às localizações das bandas NOR e dos sinais de hibridação com rDNA 18S-5.8S-28S. Baseados nos dados resultantes destas técnicas, os autores puderam estudar a evolução cariotípica do gênero.

Caracterização citogenética com as técnicas de bandamento-C, bandamento com fluorocromos CMA e DAPI e hibridação *in situ* para rDNA, foi também realizada por RAN et al. (1999) para quatro espécies do gênero *Clivia* as quais possuíam número e forma de cromossomos muito semelhantes. As diferenças nos padrões de bandamento, obtidas entre as espécies permitiram que as mesmas fossem perfeitamente identificadas. Para as quatro espécies o padrão de bandamento-C foi muito similar ao do bandamento DAPI. Os sítios de rDNA variaram de um a três e coincidiram com as bandas de CMA⁺ e com a impregnação com prata para duas espécies (*C. miniata* e *C. gardenii*).

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

Para diferenciação de espécies do gênero *Lilium* (*L. pyrenaicum* Gouan, *L. pomponium* L. e *L. carniolicum* Bernh.) que possuem todas $2n = 24$ cromossomos, SILJAK-YAKOVLEV et al. (2003) utilizaram as técnicas de impregnação com prata, bandamento com os fluorocromos DAPI e CMA₃ e hibridização *in situ* para rDNA. O número e a posição das bandas de CMA e o número e localização de sítios de rDNA, permitiram que as espécies fossem diferenciadas a nível cromossômico.

A fim de compreender melhor a citogenética e a evolução do gênero *Selaginella* (Pteridophyta) MARCON et al. (2005) realizaram estudos citogenéticos em sete espécies brasileiras do gênero (*S. muscosa* Spring, *S. simplex* Baker, *S. willdenowii* Baker, *Selaginella* sp., *S. producta* Baker, *S. plana*, *S. convoluta* Spring) utilizando diferentes métodos de coloração. Determinaram a distribuição de sítios de rDNA 45S, bandamento com os fluorocromos CMA com distamicina e DAPI e impregnação com prata. O bandamento com os fluorocromos CMA e DAPI mostrou uma fraca diferenciação cromossômica. As bandas CMA⁺ mostraram sintenia com os sítios de rDNA 45S. As espécies estudadas apresentaram grande variação no comprimento cromossômico, quando comparadas entre elas, e o número cromossômico variou de $2n = 18, 20$ e 24 . A partir destes dados associados à localização dos sítios de rDNA, os autores concluíram que grandes variações estruturais cariotípicas contribuíram para a evolução do gênero, e que as variações do número básico do gênero $x = 9$ e $x = 10$ poderiam ter surgido, neste grupo, duas ou mais vezes independentemente.

MONDIN et al. (2007) também caracterizaram cromossomicamente a espécie *Crotalaria juncea* (Fabaceae) utilizando técnicas de bandamento-C, impregnação com prata, bandamento com fluorocromos e hibridação *in situ* para as sequências de rDNA 18S-5.8S-26S e 5S. Os autores descreveram que todos os cromossomos de *C. juncea* apresentaram bandas-C e bandas CMA/DA na região do centrômero, a coloração com DAPI resultou em bandas negativas e a hibridação *in situ* revelou dois sinais de rDNA

18S-5.8S-26S e um de rDNA 5S. A coloração com prata revelou bandas coincidentes com alguns dos sítios de rDNA.

As técnicas de coloração com os fluorocromos CMA e DAPI foram usadas por KOEHLER et al. (2008) para rever a delimitação e propor uma classificação mais estável para o gênero *Christensonella* (Orchidaceae). Os dados citogenéticos indicaram o número de cromossomos variando de $2n = 36$, 38 e 76 . Embora estudos complementares sejam ainda necessários para uma melhor compreensão do gênero *Christensonella*, os padrões de bandas e a contagem cromossômica sugerem a ocorrência de fusão cêntrica e/ou fissão, especialmente para *C. ferdinandiana*; os resultados sugerem também que as espécies com número cromossômico igual a $2n = 36$ evoluíram das espécies com número cromossômico igual a $2n = 38$. Portanto, os padrões de heterocromatina e outros dados cariotípicos, provaram ser de grande importância para entender os padrões evolutivos dentro do gênero.

Em alguns dos estudos acima ficou claro que a utilização do bandamento com fluorocromos é uma ferramenta importante para a diferenciação, caracterização e até mesmo uma visualização dos processos evolutivos das espécies.

Para o gênero *Alstroemeria* não existem dados publicados sobre a caracterização cromossômica através de bandamento com os fluorocromos CMA₃ e DAPI. No presente trabalho os resultados da aplicação das técnicas de bandamento com CMA e DAPI são originais, e são aqui relatados pela primeira vez. Assim, apesar de BAEZA et al. (2006; 2007) terem usado fluorocromo DAPI para caracterizar os cromossomos das espécies chilenas *A. ligtu* subsp. *ligtu* e *A. ligtu* subsp. *samsii*, *A. aurea*, *A. hookeri* e *A. presliana* não foram descritos padrões de bandas para as referidas espécies.

2.7 Hibridação *in situ*

A hibridação *in situ* (HIS) é uma técnica empregada para a visualização de sequências definidas de ácidos nucleicos, DNA alvo (DNA ou RNA), em preparações celulares, através da hibridação com sequências complementares conhecidas (DNA sonda). O objetivo final da hibridação *in situ*, consiste basicamente na verificação se a célula, tecido ou cromossomos possuem sequências de nucleotídeos do DNA utilizado como sonda. Esse método foi descrito pela primeira vez por GALL & PARDUE (1969). A técnica proporciona a interação entre conhecimento da biologia celular, citogenética clássica e genética molecular.

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (fluorescence *in situ* hybridization - FISH) difere da anterior HIS por utilizar corantes fluorescentes para detectar os nucleotídeos marcados da sonda. Nesta técnica podem ser usadas como sonda, sequências únicas ou repetitivas (organizadas em tandem) ou ainda o DNA genômico total de um organismo, neste caso denominando-se a técnica de GISH (genomic *in situ* hybridization). Essa técnica vem sendo utilizada na construção de mapas físicos de cromossomos, na análise e investigação da estrutura, função e evolução dos cromossomos, e na detecção de genomas (LEITCH et al., 1994).

As sondas mais comumente utilizadas são aquelas de sequências repetitivas por serem mais facilmente detectadas e por isto proporcionam sinais mais evidentes. Das sondas de sequências repetitivas, uma das mais aplicadas são as sequências de rDNA 45S e 5S. A sonda de rDNA conhecida como pTa71 possui 9,0 Kb e corresponde à sequência de DNA ribossômico de *Triticum aestivum*, que abrange as regiões 28S, 5.8S e 26S e foi clonada no plasmídeo pUC19 (GERLACK & BEDBROOK, 1979) e a sonda de rDNA 5S conhecida como pScT7 corresponde à sequência de DNA ribossômico 5S isolada de *Secalle cereale*, possui 300-500 pb e foi clonada no plasmídeo pUC8, (LAWRENCE & APPELS, 1986).

Com a finalidade de construir uma árvore filogenética ADAMS et al. (2000) usaram a técnica de FISH para verificar a distribuição das sequências de rDNA 5S e 18S-5.8S-26S em 13 espécies de *Aloe* (Asphodelaceae). As espécies possuem vários níveis de ploidia, estão distribuídas em várias regiões geográficas e apresentam uma gama de tipos morfológicos diferentes. Os autores constataram que a distribuição de sinais de rDNA 5S era semelhante em posição em todas as espécies analisadas, já a distribuição de sítios de rDNA 18S-5.8S-26S mostrou-se instável e variável em número, localização e tamanho. Os resultados demonstraram claramente que essa região de rDNA 45S mudou ao longo da especiação nesse grupo de plantas.

A fim de determinar a variabilidade de sítios de rDNA 5S e 45S em 20 espécies de *Passiflora* com vários níveis de ploidia, MELO & GUERRA (2003) usaram a técnica de hibridação *in situ* com sondas de rDNA 5S e 45S para investigar a origem da variação do número cromossômico básico, propostos para o gênero como sendo $x = 6$, com $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$. O número e a localização dos sítios de rDNA 5S e 45S foram consistentes com a hipótese de $x = 6$ ser o provável genoma ancestral para o gênero.

Localização de regiões organizadoras do nucléolo (NORs) para a determinação da origem poliplóide das espécies do subgênero *Rosa*, foi investigada por FERNÁNDEZ-ROMERO et al. (2001) pela técnica de hibridação *in situ* (FISH). Regiões NORs reveladas pela hibridação *in situ*, foram localizadas em cinco espécies diplóides com $2n = 2x = 14$ cromossomos (*Rosa gigantea* Coll., *Rosa moschata* Herrm., *Rosa multiflora* Thunb., *Rosa rugosa* Thunb. e *Rosa sempervirens* L.), em uma espécie triplóide com $2n = 3x = 21$ cromossomos (*Rosa chinensis* Koehne) e em uma espécie tetraplóide com $2n = 4x = 28$ cromossomos (*Rosa gallica* L.). As espécies diplóides, a triplóide e a tetraplóide apresentaram respectivamente dois, três e quatro sítios de rDNA. Estas análises juntamente com análises meióticas, levaram os autores a concluir que a espécie *R. chinensis* Koehne é um autotriplóide e *R. gallica* L. é um aloploplóide natural.

Informações sobre o cariótipo, organização do genoma e a evolução de sítios de rDNA para o gênero *Silene*, foram determinados por SIROKÝ et al. (2001). Quatro espécies (*S. latifolia*, *S. vulgaris*, *S. pendula*, *S. chalcedonica*) pertencentes a diferentes seções foram estudadas e todas apresentam mesmo número cromossômico, $2n = 2x = 24$. A hibridação *in situ* com duas sondas de rDNA 45S e 5S simultaneamente, revelou acentuada variação no número e localização dos loci de rDNA. Com isso, os autores indicaram que o genoma das espécies, altamente diversificado, é resultante de inúmeras amplificações de DNA e translocações.

Visando aumentar a compreensão da história evolutiva da espécie *Camellia reticulata* e esclarecer a origem de poliplóides, GU & XIAO (2003) utilizaram a técnica de hibridação *in situ* com sonda de rDNA 18S-26S para a construção de mapas físicos para três tipos de ploidia da espécie *C. reticulata* e suas espécies afins, *C. japonica*, *C. yunnanensis*, *C. pitardii* e *C. saluenensis*. Foram observados oito, 12 e 18 sítios de rDNA no genoma diplóide, tetraplóide e hexaploide respectivamente. Os autores verificaram através da multiplicidade de número, de tamanho, e da localização dos sítios de rDNA que o comportamento dos sítios de rDNA era extremamente complexo, impedindo qualquer conclusão a respeito dos possíveis parentais dessas espécies poliplóides.

Com o objetivo de esclarecer a ascendência de espécies poliplóides do gênero *Hordeum* de origem americana, TAKETA et al. (2005) utilizaram a técnica de hibridação *in situ* com as sondas de rDNA 5S e 18S-25S. Os autores determinaram que, todas as espécies estudadas apresentavam variação nas sequências de rDNA. Seis

espécies tetraplóides diferenciaram-se no número de sítios de rDNA e quatro espécies hexaplóides foram similares em número e localização dos sítios correspondentes às duas sondas. Baseado nesses dados os autores concluíram que as espécies tetraplóides parecem ser alopoliplóides com genoma de uma espécie diplóide asiática e de outra espécie diplóide americana.

Trabalho semelhante, de investigação parental, foi realizado por LIM et al. (2007) os quais utilizaram ferramentas da citogenética molecular para investigar a suposta origem do alopoliplóide *Iris versicolor* envolvendo os progenitores *Iris virginica* ($2n = 70$) e *Iris setosa* ($2n = 38$). A técnica de GISH mais a de FISH com as sondas de rDNA 5S e 18-26S foram utilizadas para identificar a origem parental dos cromossomos. A técnica de GISH aplicada nos cromossomos da espécie *I. versicolor* mostrou que esta herdou o complemento cromossômico das duas espécies em questão e o FISH revelou que todos os sítios de rDNA 18-26S presentes em *I. versicolor* são herdados de *I. virginica*. Em contraste, os dois sítios de rDNA 5S presentes em *I. versicolor* são encontrados, um em cada espécie, *I. setosa* e *I. virginica*. Estes dados confirmaram a hipótese de que *I. versicolor* é um alopoliplóide envolvendo as espécies *I. virginica* e *I. setosa*.

Como no gênero *Lilium* as espécies podem se reproduzir através da apomixia, MARASEK et al. (2004) realizaram estudo através da utilização de métodos citológicos e citogenética molecular para confirmar a natureza de plantas obtidas a partir de cruzamentos de *Lilium henryi* com as cultivares ‘Marco polo’ e ‘Expression’. De acordo com análises citológicas, todos os genótipos testados apresentaram $2n = 2x = 24$ cromossomos. A técnica de GISH e de FISH com as sondas de rDNA 5S e 25S foram utilizadas para a verificação a origem dos cromossomos parentais dessas plantas. A presença dos marcadores cromossômicos característicos de cada um dos genótipos parentais confirmou que as plantas obtidas do referido cruzamento eram realmente híbridas.

Comparação cariotípica entre populações de duas espécies de *Grindelia* Willd. ($2n = 12$) e três espécies de *Haplopappus* Cass. ($2n = 10$ e $2n = 12$) de origem chilena pertencentes à família Asteraceae, foram realizadas por BAEZA & SCHRADER (2005). A realização da hibridação *in situ* com as sondas de rDNA 45S e 5S, confirmou a hipótese de que os cariótipos das espécies *Grindelia* e *Haplopappus* não passaram por grandes mudanças durante a evolução, não havendo dúvidas entretanto, quanto à

ocorrência de pequenos rearranjos cromossômicos, principalmente nos sítios de rDNA 5S.

Estudando polimorfismo cromossômico dos genes ribossomais do gênero *Oryza*, CHUNG et al. (2008) com o uso da técnica FISH e sondas de rDNA 18S-5.8S-28S determinou que inversões cromossômicas e transposição de sequências de rDNA podem ter ocorrido durante a evolução da espécie *Oryza*.

Um dos primeiros estudos em espécies de *Alstroemeria* usando a técnica de hibridação *in situ*, foi o de KUIPERS et al. (1998). Estes autores efetuaram a caracterização de quatro espécies chilenas e brasileiras de *Alstroemeria* (*A. aurea*, *A. inodora*, *A. pelegrina*, e *A. psittacina*) baseada na localização física de sequências repetitivas e de retrotransposons. Os autores utilizaram a técnica de FISH com a sonda de rDNA 18S-5.5S-25S (pTa71) para a detecção da sequência ribossomal e as sondas A001-I e D32-18 para as demais sequências repetitivas. As análises de sequências amplificadas, correspondentes Ty1-copia, mostraram grande heterogeneidade entre sequências de aminoácidos e revelaram algumas bandas características para cada uma das espécies brasileiras e chilenas. A técnica de hibridação *in situ* mostrou ainda grande dispersão na distribuição dos retrotransposons.

KAMSTRA et al. (1999), empregaram a técnica de hibridação *in situ* (FISH) e a técnica de hibridação *in situ* genômica (GISH) para estimar a extensão e a localização de cromossomos homeólogos e cromossomos recombinantes na meiose de plantas híbridas, obtidas do cruzamento de *A. aurea* X *A. inodora*. Quatro diferentes sondas foram utilizadas para a análise do FISH: A001-1, D32-13, pTa71 e pTa794. As análises com GISH e FISH permitiram a identificação precisa dos cromossomos das plantas híbridas.

Recentemente BAEZA et al. (2007) caracterizaram acessos de cinco espécies de *Alstroemeria* L. chilenas (*A. aurea*, *A. hookeri*, *A. ligtu*, *A. pelegrina* e *A. presliana*) usando a técnica de FISH com uma sonda de sequência repetitiva denominada A001-1 além de sondas de rDNA 5S e 45S. Para o rDNA5S os autores constaram alto grau de polimorfismo entre diferentes populações de uma das espécies estudadas. O número de pares de cromossomos com o sítio de rDNA 5S variou também entre as espécies analisadas sendo em números de 5, 7, 5, 3 e 7 respectivamente em *A. aurea*, *A. hookeri*, *A. ligtu*, *A. pelegrina* e *A. presliana*. Comparativamente o número de sítios de rDNA 45S variou em menor grau tendo sido registrado respectivamente 7, 7, 6, 5 e 7 respectivamente para as mesmas espécies acima mencionadas. Os autores visualizaram

ainda a co-localização de sinais dessas três sondas em graus diferentes para cada uma das espécies. Os autores enfatizaram que essas observações relativas às regiões das sequências de rDNA revelam uma alta dinâmica evolucionária no gênero *Alstroemeria*.

Apesar de KUIPERS et al. (1998) e KAMSTRA et al. (1999), terem usado a técnica de FISH para estudos cromossômicos de espécies brasileiras de *Alstroemeria* (duas delas caracterizadas no presente trabalho) e também híbridos entre espécies brasileiras e entre espécies brasileiras e chilenas, os autores não caracterizaram essas espécies, pois não descreveram o número de sítios de rDNA ou a localização destes sítios nos cariótipos das referidas espécies.

Para as espécies brasileiras do gênero *Alstroemeria* não existem dados publicados sobre caracterização cariotípica que incluem técnicas de mapeamento das regiões de rDNA através da técnica de FISH. No presente trabalho são apresentadas pela primeira vez caracterizações cariotípicas para quatro espécies brasileiras de *Alstroemeria* que inclui este tipo de análise.

2.8 Bandamento cromossômico com nitrato de prata – AgNOR

Os cromossomos podem ser bandados aplicando-se diversas metodologias, entre as quais o bandamento NOR (nucleolar organizer regions), o qual evidencia as regiões cromossômicas responsáveis pela organização nucleolar durante a interfase mitótica. Essas regiões foram caracterizadas pela primeira vez por McCLINTOCK (1934), que atribuiu a essas regiões o nome de NOR (ou região organizadora do nucléolo - RON).

A técnica da banda-NOR utiliza o nitrato de prata, o qual tem afinidade por proteínas nucleolares presentes nos nucléolos e constrições secundárias de cromossomos que possuem genes de rDNA envolvidos na formação da NOR. Esta técnica por impregnação de prata detecta unicamente NORs que estiveram ativas na última divisão celular (GOODPASTURE & BLOOM, 1975).

Com a finalidade de identificar as NORs de seis espécies de *Lathyrus*, (*L. blepharicarpus* Boiss., *L. cassius* Boiss., *L. hirsutus* L., *L. odoratus* L., *L. sativus* L., *L. tingitanus* L.) MURRAY et al. (1992) utilizaram a coloração com a técnica de impregnação com prata e a técnica de hibridização *in situ*. As espécies apresentaram, nos seus complementos cromossômicos, diferentes números de cromossomos metacêntricos e acrocêntricos e diferentes números e posições de constrições secundárias. A impregnação com prata ocorreu na região do centrômero na maioria das

espécies e os sinais de hibridação *in situ* ocorreram em número de dois e quatro sítios. Os sítios de hibridação presentes nos complementos corresponderam às bandas de prata.

Um elevado número de constrições secundárias está presente na espécie *Allium sphaerocephalon*. Para a confirmação se todas as constrições secundárias estariam envolvidas na formação nucleolar, GARRIDO-RAMOS et al. (1992) analisaram o cariótipo dessas espécies usando o bandamento com prata. Os resultados citológicos demonstraram que todas as constrições secundárias poderiam estar envolvidas na organização nucleolar.

Estudo cromossômico para seis espécies do gênero *Stevia* (*S. leptophylla*, *S. myriadenia*, *S. ophryophylla*, *S. rebaudiana*, *S. selloi*) foi realizado por FREDERICO et al. (1996), utilizando da técnica de impregnação com prata. Pela análise da morfologia cromossômica os autores identificaram cada espécie, as quais apresentaram número diplóide de cromossomos ($2n = 22$), porém com diferenças no comprimento dos braços cromossômicos entre os complementos cromossômicos das espécies. No entanto, a reação positiva para a impregnação com a prata foi observada apenas no braço curto do cromossomo três da espécie *S. rebaudiana*, confirmando a presença de uma região organizadora do nucléolo, o que levou os autores a sugerirem que a evolução no gênero *Stevia* tenha ocorrido através de inversões pericêntricas.

Em alguns dos estudos acima ficou claro que a utilização da técnica de impregnação com a prata é de fundamental importância para melhor entendimento das regiões organizadoras do nucléolo e sua relação com a evolução dos complementos cromossômicos. Em espécies do gênero *Alstroemeria* também não se tem relatos de estudos com bandamento NOR, portanto são inéditos os resultados da aplicação da técnica de impregnação com a prata AgNOR apresentados no presente trabalho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foram utilizadas raízes de quatro espécies do gênero *Alstroemeria*. As plantas utilizadas no presente estudo (Tabela 3) encontram-se em cultivo na estufa do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais e constituem parte do Banco de Germoplasma de Plantas Ornamentais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (Figuras 2 e 3). As exsicatas dos materiais estudados foram depositadas no Herbário do IAC.

Tabela 3: Espécies de *Alstroemeria* usadas neste estudo, seus respectivos locais de coleta e o número de introdução no herbário do IAC.

Espécie	Local de coleta	Registro no herbário
<i>A. cunha</i> Vell.	Barra do Turvo – SP.	IAC - 50436
<i>A. inodora</i> Herb.	Bairro Alto do Campestre em São Bento do Sapucaí – SP.	IAC - 49693
<i>A. longistaminea</i> Mart.	Distrito de Santa Terezinha em Castro Alves – BA.	IAC - 50435
<i>A. psittacina</i> Lehm.	Barra do Ouro Rio Grande do Sul – RS.	-

As espécies aqui estudadas são nativas do Brasil e podem ser encontradas em diferentes ambientes. Habitualmente, *A. cunha* e *A. inodora* são encontradas no interior de florestas estacionais semidecíduas; *A. longistaminea* é encontrada em afloramentos rochosos e em locais sombreados das caatingas e *A. psittacina* é encontrada em locais sombreados no interior ou na orla de mata. A espécie *A. psittacina*, além do Brasil, é encontrada também na Argentina, Uruguai e Paraguai (SANSO & HUNZIKER, 1998; ASSIS, 2001).

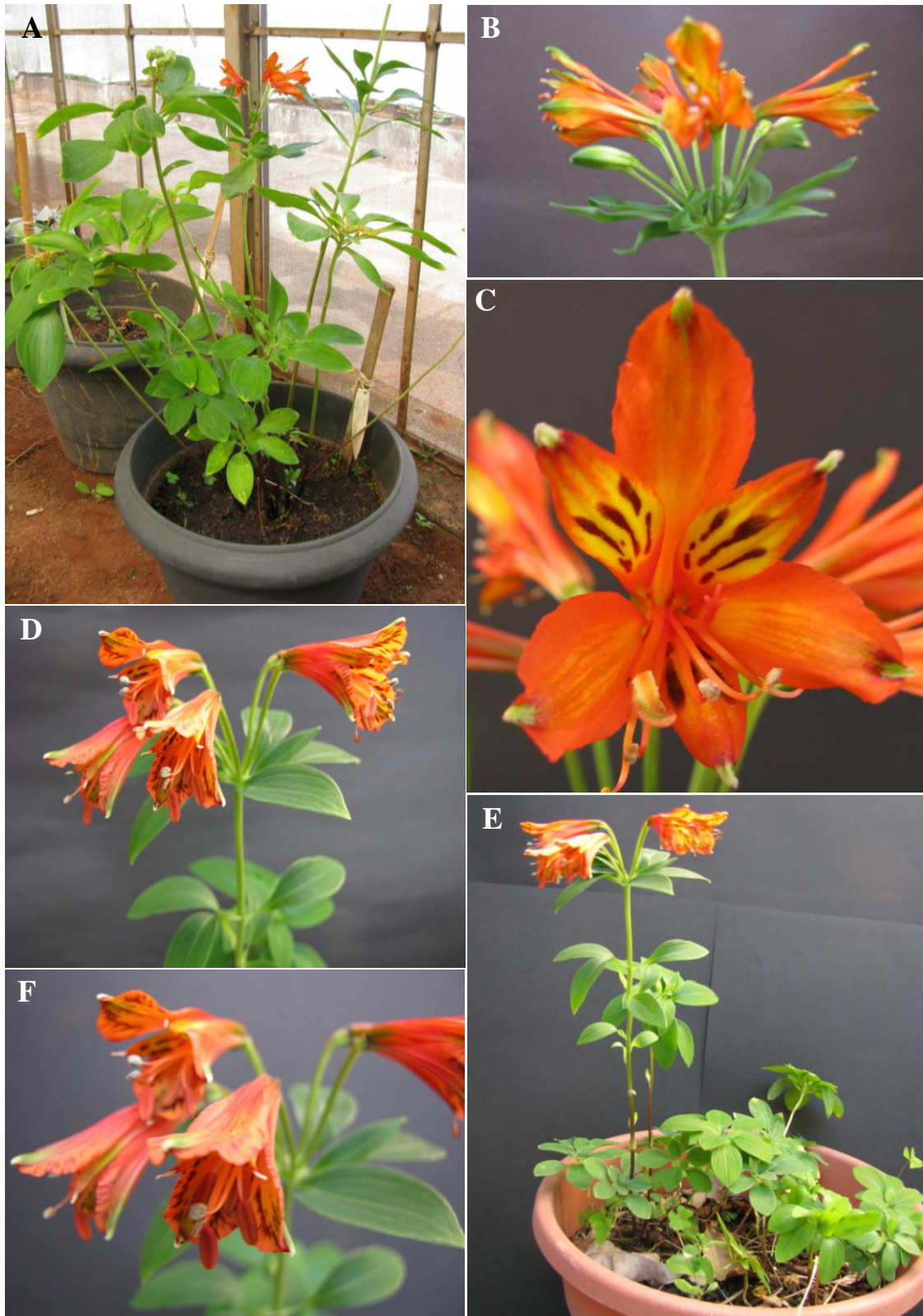


Figura 2 – Ramos reprodutivos de espécies do gênero *Alstroemeria* em cultivo na estufa do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), caracterizadas citologicamente neste trabalho. A, B e C – *A. cunha*; D, E e F – *A. inodora*. Fotos de C.A.F. Pinto-Maglio.



Figura 3 – Ramos reprodutivos e frutos de espécies do gênero *Alstroemeria* em cultivo na estufa do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), que foram usadas no trabalho. A, B, C e D – *A. longistaminea*; E e F – *A. psittacina*; G – Frutos de *A. cunha*. Fotos de C. A.F. Pinto-Maglio.

3.2 Métodos

3.2.1 Germinação de sementes

Sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada. As placas foram mantidas à temperatura ambiente, em fotoperíodo de 8 horas sob luz incandescente e fluorescente simultaneamente.

Após um período de aproximadamente dois a três meses, as raízes com comprimento de 3 mm (aproximadamente igual ao diâmetro da semente) foram coletadas e pré-tratadas com anti-mitótico.

3.2.2 Pré-tratamento de raízes e fixação

O pré-tratamento das raízes, para se obter maior quantidade de células na fase de metáfase, foi realizado com o anti-mitótico para-diclorobenzeno (PDB) (solução saturada) por 9 horas à temperatura de 15°C.

Após o pré-tratamento, as raízes foram fixadas em Carnoy (solução de álcool etílico e ácido acético, na proporção 3:1) sendo o material, neste estágio, submetido ao vácuo durante 3 minutos. Em seguida à fixação, o material permaneceu durante 24 horas à temperatura ambiente. Após as 24 horas, o fixador foi trocado e o material transferido para geladeira (4 –5°C) onde permaneceu também por mais 24 horas. Em seguida, foi armazenado em freezer (-18°C) até a sua utilização nas preparações citológicas.

3.2.3 Hidrólise e preparações citológicas

Para as preparações citológicas, as pontas das raízes já fixadas e armazenadas no freezer, foram lavadas com água destilada e na sequência, em tampão citrato (citrato trissódico-hidratado mais ácido cítrico-monohidratado, pH 4.5). Em seguida, para o amolecimento do meristema, as raízes foram hidrolisadas em solução enzimática (0,2% celulase, 0,2% citohelicase, 0,2% pectoliase diluídas em 2 mM de tampão citríco-citrato pH 4,5) à 37°C em banho maria por 30 a 40 minutos. Após a hidrólise das raízes, foram montadas as preparações citológicas, isolando-se o tecido meristemático diretamente numa lâmina com o auxílio de um bisturi e lupa, e em seguida esmagando-o em ácido acético 45%. O material foi coberto com lamínula, a lâmina foi aquecida em chama, e o esmagamento completado pressionando-se a preparação aquecida entre duas folhas de papel filtro para retirar o excesso de ácido acético e promover o espalhamento dos cromossomos. Em seguida, as preparações foram analisadas em microscópio com

condensador de contraste de fase. As preparações que apresentavam grande número de células na fase de metáfase foram selecionadas e imersas rapidamente em nitrogênio líquido para a retirada das lamínulas. Após a retirada da lamínula, as lâminas permaneceram secando em temperatura ambiente durante um dia e após este período, foram armazenadas na geladeira até serem utilizadas para as diferentes técnicas.

3.2.4 Microscopia e análise das imagens

Todas as preparações citológicas deste estudo foram analisadas em um microscópio Olympus BX50 com acessório para epifluorescência e câmera digital refrigerada Olympus Q-Color 3.

Para as lâminas com as técnicas de bandamento fluorescente e com a técnica de hibridação *in situ* usaram-se os seguintes filtros: U-MWU para DAPI (AZUL/UV – excitação a 330/385 nm e emissão a 420 nm), U-MWBV para CROMOMICINA (VERDE/UV – excitação a 400/440 nm e emissão a 475 nm) e U-MNB2 para FITC (VERDE/UV – excitação a 450 nm e emissão a 570 nm) para os sinais de fluoresceína na hibridação *in situ*. Para as análises das lâminas sem coloração, as coradas com corante Giemsa e as impregnadas pela prata, usou-se o mesmo microscópio com o condensador para contraste de fase.

As imagens foram capturadas através de um sistema de análise de imagens computadorizado e com o software Image-ProPlus versão 6.0 (Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, USA).

3.2.5 Coloração com Giemsa

Para a coloração com Giemsa, as lâminas preparadas e armazenadas conforme item 3.2.3, foram retiradas da geladeira e mantidas em suporte até ficarem completamente secas.

Após a secagem, as lâminas foram colocadas em uma cuba contendo Giemsa 2% (98 ml de água e 2 ml de Giemsa) e mantidas por 3 minutos. O tempo ideal de coloração foi estabelecido monitorando-se, ao microscópio, as lâminas submetidas a diferentes tempos de coloração com Giemsa.

Após os 3 minutos as lâminas foram lavadas com água destilada e mantidas em temperatura ambiente para secarem. Após a secagem foram montadas com PermOUNT. Em seguida as lâminas foram analisadas conforme descrito no item 3.2.4.

3.2.6 Bandamento com CMA₃/DA (Cromomicina A₃/distamicina)

Para a coloração com CMA₃/DA foi usado o procedimento descrito por SCHWEIZER (1976). As lâminas mantidas na geladeira foram retiradas e deixadas em suporte até atingirem a temperatura ambiente.

Sobre as lâminas secas foram aplicados 50 µl de tampão com CMA₃ sendo a seguir cobertas com lamínulas e mantidas a temperatura ambiente no escuro por uma hora. Em seguida as lamínulas foram retiradas, as lâminas lavadas com água deionizada e deixadas a secar ao ar, no escuro, por aproximadamente 20 minutos.

Nas lâminas já secas, foram adicionadas 50 µl da solução de distamicina, 0,1 mg/ml, as quais foram incubadas durante 20 minutos, no escuro, e em temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas passaram por uma rápida lavagem com água deionizada e novamente deixadas a secar, no escuro, à temperatura ambiente.

Depois de secas, colocou-se a solução de Cloreto de Magnésio 1M e tampão McIlvane nas lâminas, as quais permaneceram em incubação em estufa à temperatura de 37°C durante três dias. Após a incubação, as lâminas foram analisadas em microscópio com filtro apropriado e as imagens capturadas conforme item 3.2.4.

3.2.7 Bandamento com DAPI/AMD (4'-6-diamidino-2-fenilindol/actinomicina D)

Para a coloração com o DAPI/AMD seguiu-se também o procedimento descrito por SCHWEIZER (1976). As lâminas mantidas na geladeira foram retiradas e deixadas em suporte até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida foram aplicados sobre cada lâmina 100 µl da solução de actinomicina D (AMD) (0,2 mg/ml em uma ampola de água deionizada) tendo-se o cuidado de colocar uma lamínula. Essas lâminas assim preparadas foram mantidas no escuro por um período de 20 minutos, em seguida lavadas rapidamente com água deionizada e deixadas secar ao ar no escuro.

Após a secagem das lâminas, foram aplicados 50 µl da solução de DAPI (2 µl da solução estoque de DAPI acrescido de 198 µl de água), foi colocada uma lamínula, e as preparações citológicas permaneceram mais 30 minutos no escuro. Em seguida, as lâminas passaram por uma rápida lavagem com água deionizada e novamente foram deixadas secar ao ar no escuro.

Depois de secas, as lâminas foram montadas com 5 µl de uma mistura de glicerina para fluorescência e água (proporção de 1:4), e em seguida analisadas em

microscópio com filtro específico para o fluorocromo DAPI e as imagens documentadas conforme item 3.2.4.

3.2.8 Bandamento com nitrato de prata - AgNOR

Para o bandamento com nitrato de prata, seguiu-se o protocolo de HOWELL & BLACK (1980). As lâminas armazenadas em geladeira foram transferidas e mantidas em temperatura ambiente até secarem.

Nas preparações citológicas foram colocadas duas soluções sendo a primeira delas composta de 0,02 g/ml de gelatina e 0,01 ml de ácido fórmico diluído em água e a segunda composta por 0,5 g/ml de nitrato de prata dissolvido em água. Essas soluções foram colocadas sequencialmente e na proporção de 1: 2 respectivamente.

As lâminas foram cobertas com lamínulas 24 X 40 mm e incubadas na estufa a 70°C por um tempo variando de 3 a 4 minutos. A determinação do tempo ideal de coloração foi realizada monitorando-se, ao microscópio, as lâminas submetidas a diferentes tempos de incubação. Quanto maior o tempo de incubação maior a oxidação da prata e escurecimento da coloração.

Após a incubação as lâminas foram lavadas com água deionizada e deixadas em temperatura ambiente para secar. Depois de secas, foram montadas com meio de montagem Permount, analisadas em microscopia de fase e as imagens registradas conforme descrito no item 3.2.4.

3.2.9 Hibridação *in situ* fluorescente

3.2.9.1 Sondas

Para a hibridação *in situ*, foram usadas duas sondas de rDNA; a pTa71 que corresponde à sequência de DNA ribossômico de *Triticum aestivum*, que abrange as regiões 18S, 5.8S e 26S, com 9,0 Kb (GERLACK & BEDBROOK, 1979) clonada no plasmídeo pUC19. E a sonda pScT7 correspondente à sequência de DNA ribossômico 5S isolado de *Secalle cereale* com 300-500 pb (LAWRENCE & APPELS, 1986) clonada no plasmídeo pUC8.

3.2.9.2 Hibridação molecular *in situ* de sondas de DNA ribossomais de 45S e 5S

Para a técnica de hibridação *in situ* fluorescente foi utilizado o protocolo descrito por PENDAS et al. (1993) e modificado por PINTO-MAGLIO et al. (2000). Este protocolo consta das seguintes etapas:

a) Amplificação e marcação de sonda

A marcação das sondas foi feita através de reação de “nick translation” usando digoxigenina-11-dUTP (Roche) conforme instruções do fabricante.

b) Pré-tratamento das preparações citológicas

Antes da hibridação, o material foi pré-tratado com RNase e pepsina para reduzir a ocorrência de hibridações não específicas e interações com proteínas ou outros componentes celulares.

c) Desnaturação da sonda e cromossomos

A desnaturação das sondas e dos cromossomos das preparações citológicas, com o objetivo de obter fitas simples de DNA, foi realizada separadamente. A sonda marcada foi primeiramente diluída numa mistura contendo sais (20XSSC), formamida, tampão fosfato e dextran sulfato e a desnaturação propriamente dita foi feita submetendo-se a sonda diluída a uma temperatura de 99°C por 8 minutos em banho-maria. Os cromossomos foram desnaturados, adicionando-se às preparações citológicas, uma mistura contendo: sais, formamida e tampão fosfato e em seguida submetidas a uma temperatura 80°C por 2 minutos.

d) Hibridação

Para a hibridação, as preparações foram incubadas em câmara úmida e mantidas em estufa a 42°C por aproximadamente 16 horas (overnight).

e) Lavagens após hibridação

Após a hibridação as lâminas foram lavadas em soluções salinas estringentes com o objetivo de remover o excesso das sondas não hibridadas ou não inteiramente associadas, de modo a permanecer nas preparações citológicas, somente as ligações das seqüências perfeitamente hibridadas.

f) Detecção dos sinais da hibridação

Após a hibridação e lavagens estringentes foi realizada reação tipo antígeno anticorpo para a detecção dos sinais de hibridação nos cromossomos. Para isto colocou-se nas lâminas, 15 µl de anti-digoxigenina conjugada com isocianato de fluoresceína (FITC) as quais permaneceram incubadas em câmara úmida a 37°C por 45 minutos.

As lâminas foram finalizadas com o meio de montagem para fluorescência Vectashield (Vector Laboratories) com o contracorante 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

A visualização de sítios de hibridação é decorrente da excitação do fluorocromo através de luz de comprimento de onda adequado ao fluorocromo escolhido. Os sinais

obtidos por emissão foram analisados no microscópio de fluorescência com filtros apropriados e as imagens capturadas conforme descrito no item 3.2.4.

Como as duas sondas foram marcadas com digoxigenina, e detectadas com anti-digoxigenina com FITC ambas resultaram em sinais que foram visualizados na cor verde. Para uma melhor distinção dos sinais correspondentes às duas sondas, alterou-se, através do software Image-ProPlus, a cor do sinal visualizado para a sonda pTa71 como sendo correspondente à cor vermelha do fluorocromo Cy3.

3.2.10 Medidas dos cromossomos

Para a obtenção das medidas dos cromossomos foi usado o programa MicroMeasure versão 3.3 (MM) próprio para análises das medidas cromossômicas e disponibilizado no site <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure> pelo departamento de Biologia da Colorado State University (REEVES & TEAR, 2000; REEVES, 2001). A partir de imagens capturadas pelo analisador de imagens os cromossomos foram medidos em 10 células de cada espécie, sendo utilizado como padrão a média da medida dos pares cromossômicos e dos braços, incluindo a posição centromérica. A nomenclatura para a morfologia cromossômica adotada foi a de LEVAN (1964) e os pares cromossômicos foram alinhados pelos centrômeros e numerados em ordem decrescente de tamanho.

Para a caracterização do cariótipo foram utilizadas medidas dos CTC (comprimento total de cromatina), calculado mediante somatória do tamanho individual de todos os cromossomos, IC (índice centromérico) de cada par cromossômico calculado de acordo com LEVAN (1964), e do índice TF% (índice de assimetria) calculado de acordo com HUZIWARA, (1962). Também foi calculado o número fundamental (número de braços cromossômicos no complemento cromossômico), de acordo com MATTHEY (1945) e o coeficiente de variação da média dos pares classificados segundo GOMES (2000).

Os cariogramas foram montados a partir das imagens capturadas em contraste de fase as quais foram editadas com o programa Corel Draw. Os ideogramas foram feitos com o uso do programa Microsoft Word com base nas médias das medidas dos braços dos cromossomos.

4 RESULTADOS

4.1. *Alstroemeria cunha*

4.1.1 Microscopia de fase e coloração com Giemsa

A partir das análises realizadas nas preparações citológicas sem corante capturadas em microscopia de fase (Figura 4A) e nas coradas com coloração Giemsa (Figura 4B) visualizaram-se os cromossomos com coloração homogênea, sem a ocorrência de regiões diferenciadas exceto a região centromérica. Essas análises indicam que a espécie *A. cunha* apresenta número cromossômico diplóide $2n = 2x = 16$. O complemento apresenta cromossomos com morfologias distintas (Figura 4C), sendo os pares 1 e 7 metacêntricos, o par 8 submetacêntrico, o par 2 subtelocêntrico e os pares 3, 4, 5 e 6 telocêntricos conforme tabela 4.

Nos cromossomos da espécie *A. cunha*, observados com Giemsa e em contraste de fase, foi registrada a presença de microssatélites nos braços curtos dos pares cromossomos telocêntricos 3, 4, 5 e 6 (Figuras 4A e 4C).

4.1.2 Bandamento CMA₃/DA

O bandamento dos cromossomos da espécie *A. cunha* com o fluorocromo CMA₃/DA revelou bandas fluorescentes localizadas na região do centrômero dos quatro pares telocêntricos, os pares 3, 4, 5 e 6 (Figuras 5A - setas, 6A e 6E). Nos demais pares cromossômicos, 1, 2, 7 e 8 bandas fluorescentes de CMA₃/DA não foram observadas. Esta técnica foi aplicada pela primeira vez nesta espécie no presente trabalho.

4.1.3 Bandamento DAPI/AMD

O bandamento com o fluorocromo DAPI/AMD revelou bandas fluorescentes específicas para cada um dos pares cromossômicos do complemento desta espécie (Figura 5B). Esses resultados, com a técnica de DAPI/AMD para a espécie *A. cunha* são apresentados pela primeira vez no presente trabalho.

No par cromossômico 1 foram identificadas três bandas fluorescentes, duas terminais, uma em cada braço, e a outra pericentromérica localizada em um dos braços. Os pares cromossômicos 2, 7 e 8 caracterizam-se pela presença de uma única banda em cada um dos braços. Nos cromossomos 2 e 7 a banda localizada no braço curto toma quase toda a sua extensão e no cromossomo 8 a banda é relativamente menor e terminal. Nestes cromossomos as bandas localizadas no braço longo dos três pares são terminais

sendo que a banda do par 2 apresenta-se relativamente maior que as demais (Figuras 5B, 6B e 6E).

Os quatro cromossomos telocêntricos não apresentaram bandas DAPI positivas na extremidade correspondente ao braço curto. Dentre estes cromossomos o par 3 destacou-se dos demais pelo maior número de bandas no braço longo. Em seguida os pares 4 e 6 apresentam também no braço longo bandas terminais, destacando-se entre eles o par 4 por ter uma banda relativamente maior. O par 5 destaca-se dos telocêntricos e demais cromossomos do complemento por apresentar apenas 2 bandas no braço longo (Figuras 5B, 6B e 6C). Não foi encontrada qualquer banda DAPI⁺ localizada na região do centrômero.

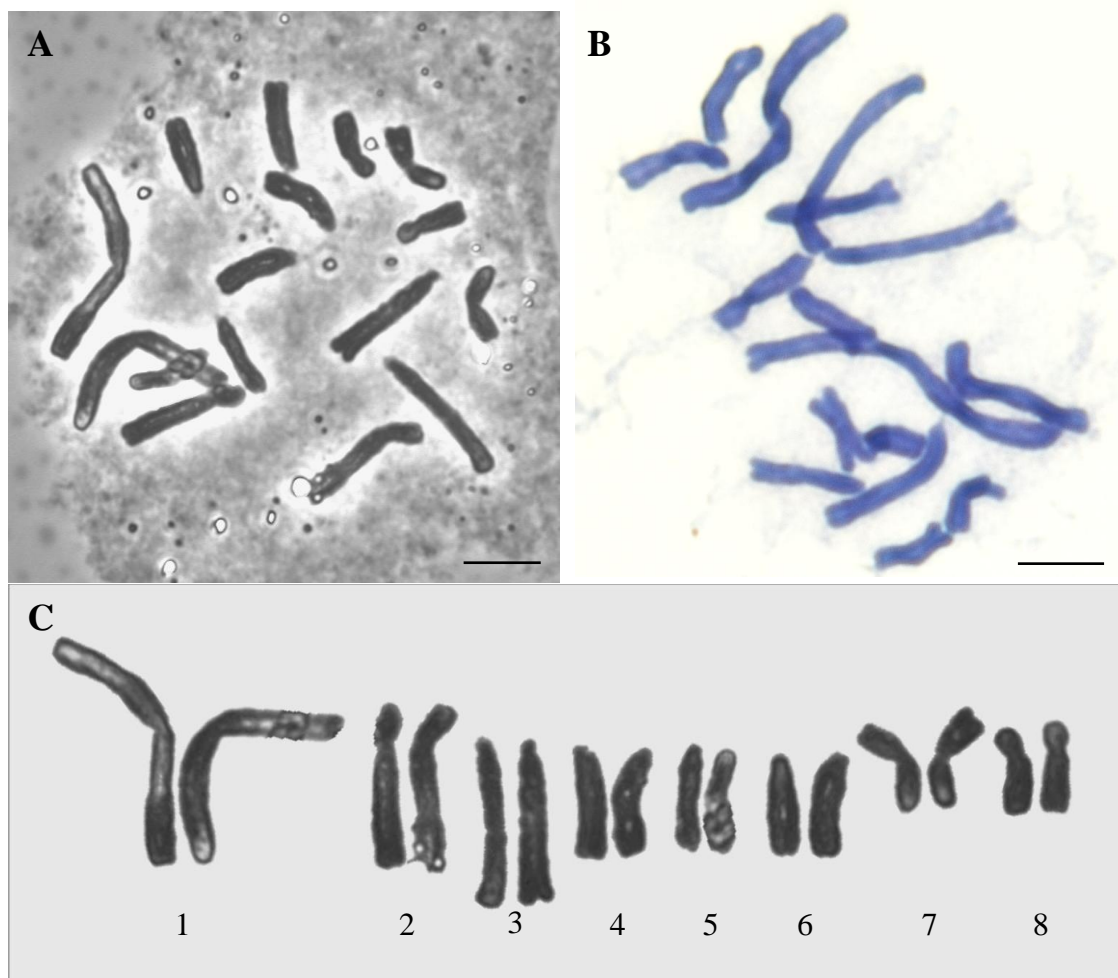


Figura 4 - Cromossomos somáticos de *Alstroemeria cunha*. (A) Imagem em microscopia de fase; (B) Coloração com Giemsa; (C) Cariograma. Barra = 10 μ m.

4.1.4 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A hibridação *in situ* (FISH), com a sonda pTa71, ou sequência de rDNA 45S, nos cromossomos de *A. cunha* resultou na identificação de vinte e três sítios, distribuídos entre os 8 pares de cromossomos (Figura 5C).

No par 1 metacêntrico foram identificados dois sinais, cada um deles localizados nas regiões terminais dos diferentes braços. Este par apresentou-se dimórfico em relação a um destes sinais que foi observado em apenas um dos cromossomos do par (Figuras 5C – seta e 16A).

O par cromossômico 2 caracteriza-se por apresentar 3 sinais, o maior número de sítios de hibridação de rDNA 45S registrado para esta espécie. Neste cromossomo o sinal terminal do braço maior apresenta-se geralmente como sinal quádruplo, ou seja, um sinal em cada uma das cromátides já duplicadas (cromonemas) (Figuras 5C e 6C). Todos os cromossomos telocêntricos (pares 3, 4, 5, 6) apresentam sinais de hibridação na região centromérica, com exceção do par 3 que apresenta adicionalmente um sinal na extremidade do braço longo. No par 4 o sítio de hibridação para a sequência 45S se apresenta polimórfico, com tamanhos diferentes nos cromossomos homólogos (Figuras 5C, 6C, 6E e 16A). Os pares 7 e 8 apresentam igualmente os sinais de hibridação exatamente na região do centrômero, sendo que o sinal do par 8 é extremamente pequeno e comparativamente igual em tamanho a um dos sinais do par 4.

O uso da sonda pScT7 resultou na visualização de sítios de hibridação em três pares cromossômicos. No par cromossômico metacêntrico 1 os sinais estão situados na região terminal de um dos braços. Nos pares cromossômicos 2 (submetacêntricos) e 3 (telocêntricos) os sinais estão localizados nas regiões centroméricas, sendo o sítio de hibridação do par 2, extremamente pequeno e de difícil visualização (Figura 5D - seta). A aplicação de FISH com sequências de rDNA 45S e 5S é inédita para esta espécie.

4.1.5 Bandamento AgNOR

Com relação ao bandamento com nitrato de prata para a espécie *A. cunha*, a visualização de bandas indicadoras de regiões NOR foi positiva em poucas células. Nestas células, embora com bandas visíveis, não foi possível definir o número e a localização exata das mesmas nos respectivos cromossomos. Verificou-se apenas que são numerosas (Figuras 17A e 17B). Este resultado também é inédito para esta espécie.

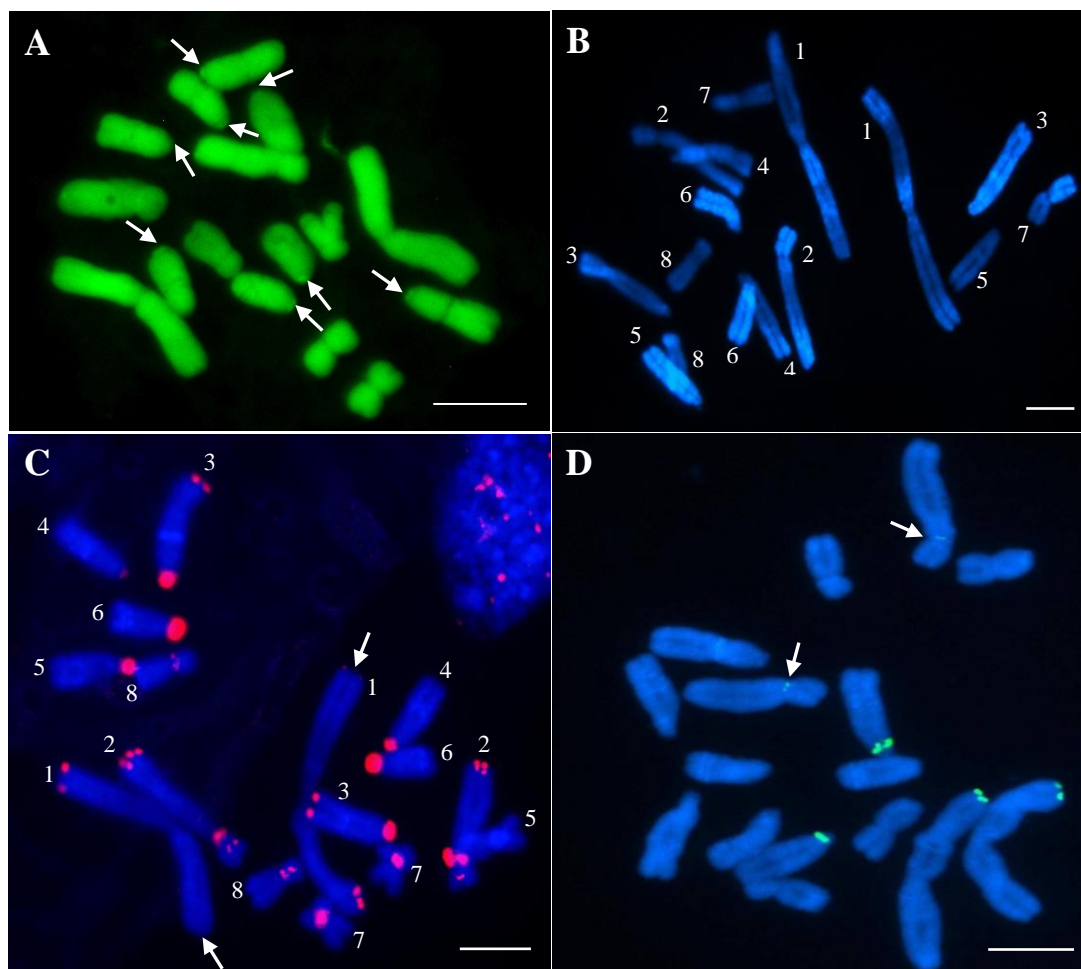


Figura 5 - Cromossomos somáticos de *Alstroemeria cunha*. (A) Bandamento com CMA₃/DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação *in situ* fluorescente (vermelho) com sonda de rDNA 5S - pScT7; (D) Sinais de hibridação (verde) com sonda de rDNA 45S - pTa71; Barra = 10µm.

4.1.6 Medidas cromossômicas

As medidas dos comprimentos totais dos cromossomos da espécie *A. cunha* variaram de $8,06 \pm 0,58 \mu\text{m}$ a $30,05 \pm 4,17 \mu\text{m}$ e os respectivos coeficientes de variação (CV%) dessas medidas foram menores que 20% (Tabela 4). O comprimento total da cromatina (CTC) para a espécie *A. cunha* foi de $216,41 \pm 15,82 \mu\text{m}$ e o índice de assimetria TF% de 22,40% (Tabela 8).

Observou-se que a espécie *A. cunha* apresenta cariótipo assimétrico com fórmula cariotípica $2m+1sm+1st+4T\text{-sat}$ (dois pares cromossômicos metacêntricos; um par cromossômico submetacêntricos; um par cromossômico subtelocêntricos e quatro pares cromossômicos telocêntricos) (Tabela 8). Os oito pares cromossômicos identificados foram classificados em três grupos cromossômicos conforme o tamanho (Tabela 4).

Um grupo formado por dois pares relativamente grandes (pares 1 e 2) sendo o par 1 metacêntrico e o par 2 subtelocêntrico; um segundo grupo formado por três pares medianos todos telocêntricos (pares 3, 4 e 5); e por ultimo, um grupo de três pares cromossômicos relativamente pequenos (pares 6, 7 e 8) sendo o par 6 telocêntrico, o par 7 metacêntrico e o par 8 submetacêntrico (Figuras 2C e 3E e Tabela 4). A espécie *A. cunha* apresenta cariótipo assimétrico com número fundamental igual a 12, ou seja, o complemento cromossômico da espécie possui 12 braços, excluindo-se os braços curtos dos telocêntricos (Tabela 4).

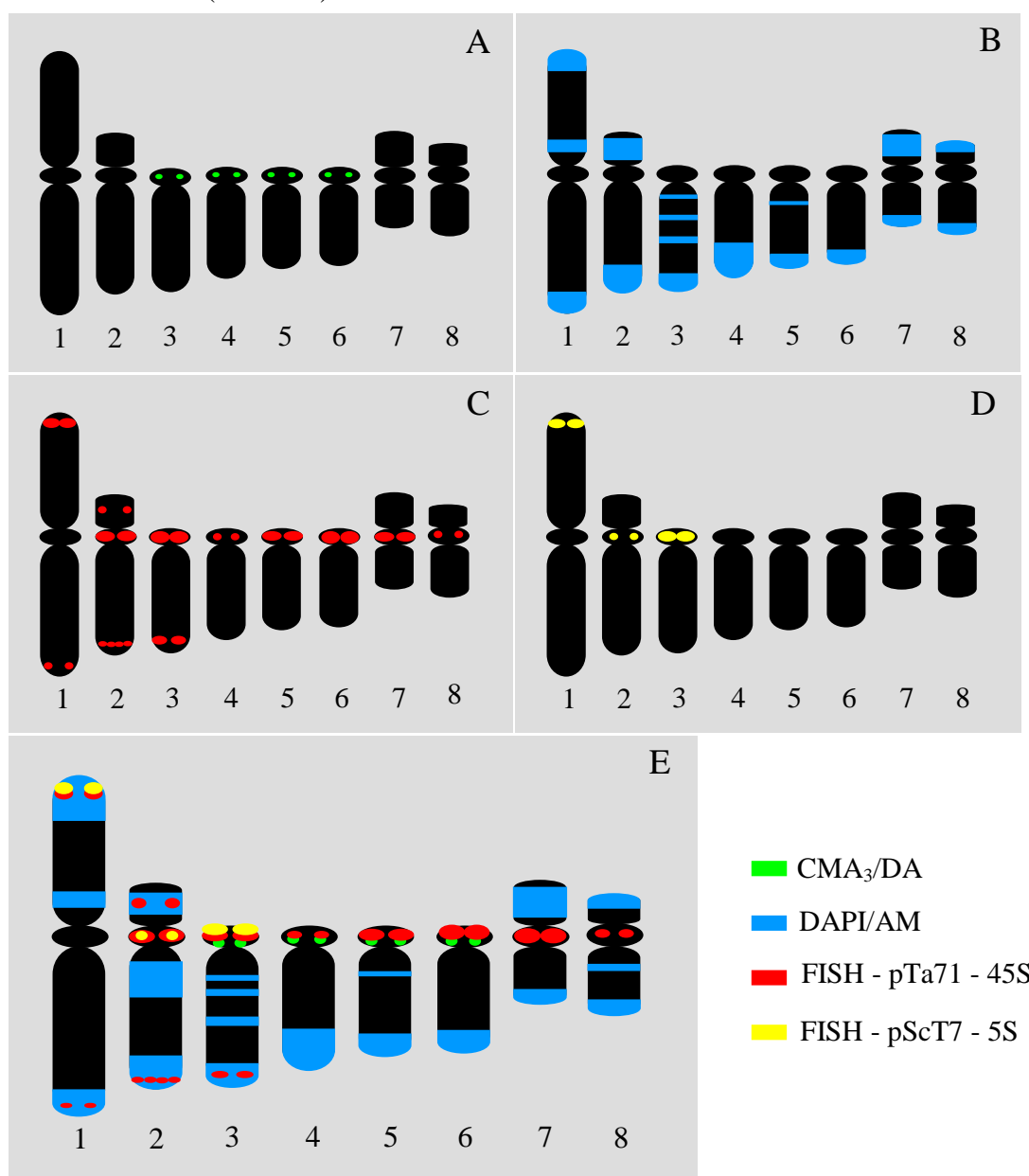


Figura 6 – *Alstroemeria cunha* – Ideogramas representativos. (A) Bandamento com CMA₃/DA; (B) Bandamento com DAPI/AM; (C) Sinais de hibridação *in situ* para seqüências de rDNA 45S com a sonda pTa71; (D) Sinais de seqüências de rDNA 5S com a sonda pScT7; (E) Representação do conjunto de resultados das técnicas CMA₃/DA, DAPI/AM e hibridação *in situ* para rDNA 45S e 5S.

Tabela 4 - *Alstroemeria cunha* - Médias dos comprimentos totais dos pares cromossômicos, coeficientes de variação das médias (CV%), médias dos braços curtos, índices centroméricos (IC) e classificação.

Pares	Comprimento Cromossômico	CV%	Braço curto	IC	Classificação
1	30,05 ± 4,17	13,88	14,29 ± 2,04	47,55	metacêntrico
2	17,76 ± 1,79	10,08	3,97 ± 0,28	22,35	subtelocêntrico
3	13,40 ± 1,83	13,66	0.0	0.0	telocêntrico
4	11,02 ± 0,41	3,72	0.0	0.0	telocêntrico
5	10,67 ± 1,11	10,40	0.0	0.0	telocêntrico
6	8,85 ± 1,37	15,48	0.0	0.0	telocêntrico
7	8,36 ± 0,38	4,54	3,87 ± 0,38	46,29	metacêntrico
8	8,06 ± 0,58	7,19	2,46 ± 0,47	30,52	submetacêntrico

4.2. *Alstroemeria inodora*

4.2.1 Microscopia de fase e coloração com Giemsa

As análises dos cromossomos não corados em microscopia de fase (Figura 7A) e após o emprego da solução Giemsa (Figura 7B) apresentaram coloração homogênea sem ocorrência de regiões diferenciadas nos cromossomos exceto as centroméricas e indicaram que a espécie *A. inodora* possui número cromossômico diplóide, $2n = 2x = 16$ (Figura 7C).

O complemento desta espécie apresenta pares de cromossomos com morfologia distinta e conforme localização do centrômero tem-se os pares 1 e 7 metacêntricos, o par 8 submetacêntrico, o par 2 subtelocêntrico, e os pares 3, 4, 5 e 6 telocêntricos (Tabela 5 e Figura 7C). Nos pares de cromossomos telocêntricos 3, 4, 5 e 6, observados com Giemsa e em contraste de fase foi registrada a presença de microssatélites nos braços curtos (Figuras 7A e 7C).

4.2.2 Bandamento CMA₃/DA

Os cromossomos da espécie *A. inodora* bandados com fluorocromo CMA₃/DA, apresentaram bandas fluorescentes localizadas na região centromérica dos quatro pares de cromossomos telocêntricos, os pares 3, 4, 5 e 6 (Figuras 8A, 9A e 9E). Nos demais pares cromossômicos 1, 2, 7 e 8 bandas fluorescentes de CMA₃/DA não foram

observadas. Os resultados com bandamento CMA₃/DA, aqui apresentados para a espécie *A. inodora* são inéditos.

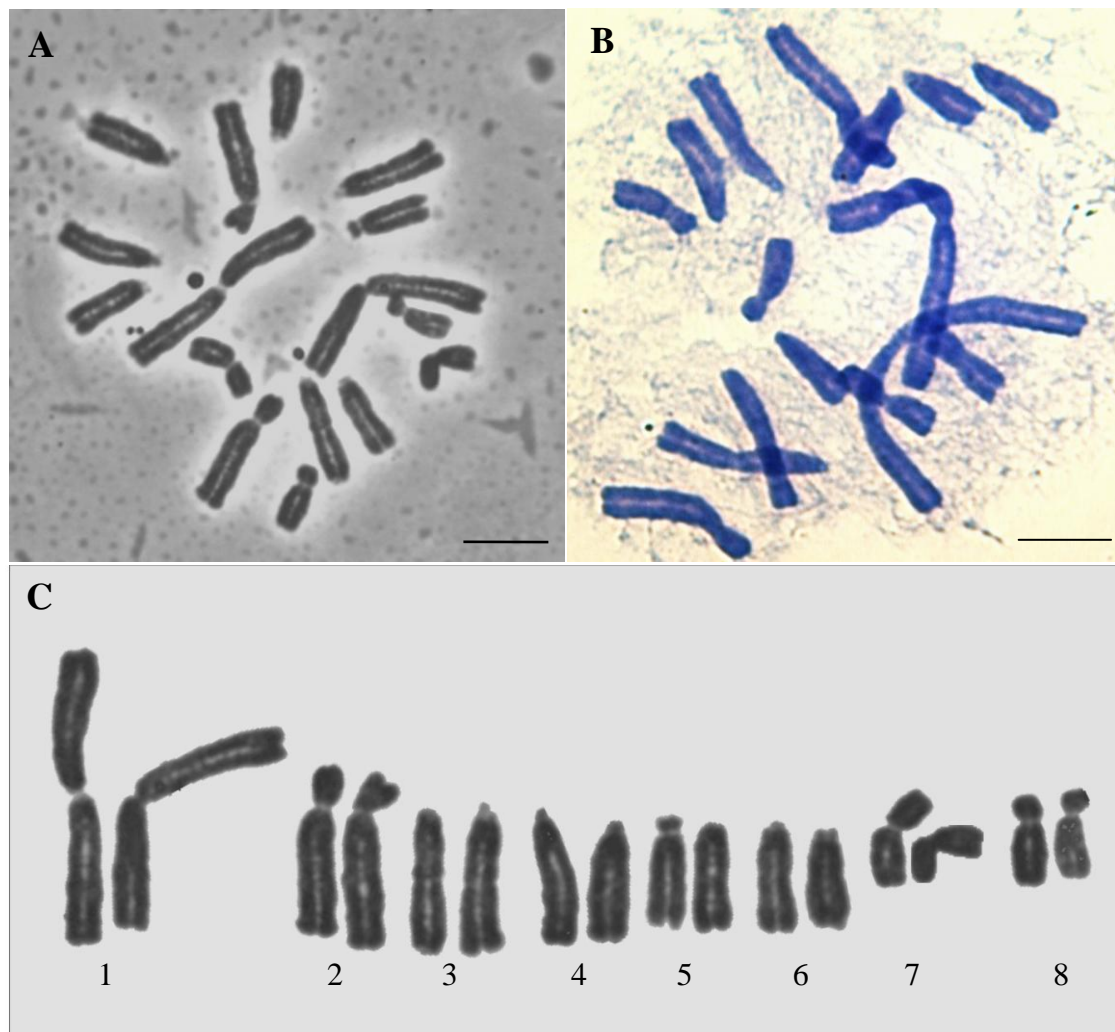


Figura 7 – Cromossomos somáticos de *Alstroemeria inodora*. (A) imagem em microscopia de fase; (B) Coloração com Giemsa; (C) Cariograma. Barra = 10µm.

4.2.3 Bandamento DAPI/AMD

O bandamento com a utilização do fluorocromo DAPI/AMD aplicado nas preparações citológicas de *A. inodora*, resultou em bandas positivas em todos os cromossomos, sendo o presente trabalho, o primeiro a apresentar resultados de bandamento com DAPI/AMD em *A. inodora* (Figura 8B).

Os pares cromossômicos 1 e 8 caracterizam-se por apresentarem duas bandas, uma delas localizada no centrômero e a outra em um dos braços, na região intercalar no par 1 e na região terminal do braço longo no par 8. O par cromossômico 2 destacou-se

por apresentar uma única banda em cada um dos braços e uma banda na região do centrômero (Figuras 8B, 9B e 9E).

Os pares cromossômicos 3, 4 e 6 também apresentaram uma única banda no braço longo, sendo que nos dois primeiros pares a banda se localiza na região intercalar e no par 6 a banda foi terminal (Figuras 8B, 9B e 9C).

O par telocêntrico 5 destacou-se dos demais telocêntricos por apresentar três bandas distribuídas no braço longo. O par metacêntrico 7 caracterizou-se por apresentar uma única banda na posição centromérica (Figuras 8B, 9B e 9C).

4.2.4 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A hibridação *in situ* (FISH) com a sonda pTa71 (rDNA 45S), inédita para a espécie *A. inodora*, permitiu a identificação de doze sítios de rDNA localizados em cinco pares cromossômicos (Figura 8C).

No par cromossômico metacêntrico 1 verificam-se dois sinais de hibridação localizados na região terminal dos dois braços. Um destes sinais, extremamente pequeno e de difícil visualização, é polimórfico, pois foi observado em apenas um cromossomo do par homólogo (Figuras 8C – seta, 9C, 9E e 16B). Nos pares 3, 5, 6 e 7 os sinais de hibridação localizam-se na região centromérica. Os sinais dos pares 3 e 6 são relativamente grandes quando comparados ao sinal de hibridação dos pares cromossômico 5 e 7, sendo o sinal do par 5 quase imperceptíveis (Figuras 8C – cabeça de seta, 9C e 9E).

A hibridação com a sonda pScT7 de rDNA 5S, também realizada pela primeira vez na espécie *A. inodora*, resultou na visualização de oito sítios localizados em quatro pares cromossômicos (Figura 8D).

No par cromossômico metacêntrico 1 foi observado um único sítio de rDNA 5S localizado terminalmente em um dos braços (Figuras 8D, 9D e 9E). Os pares cromossômicos 2, 3 e 5 caracterizam-se por apresentarem um sinal de rDNA 5S exatamente no centrômero. Os sinais de hibridação dos pares metacêntrico 1, e subteloicêntrico 2 são relativamente pequenos e de difícil visualização (Figuras 8D, 9D e 9E). Nos pares cromossômicos 3 e 5, os sítios de hibridação também localizados no centrômero apresentam-se de forma heteromórfica, ou seja, e um dos cromossomos do par, apresenta a região de rDNA 5S maior que a do homólogo correspondente (Figuras 8D – seta, 9D, 9E e 16B).

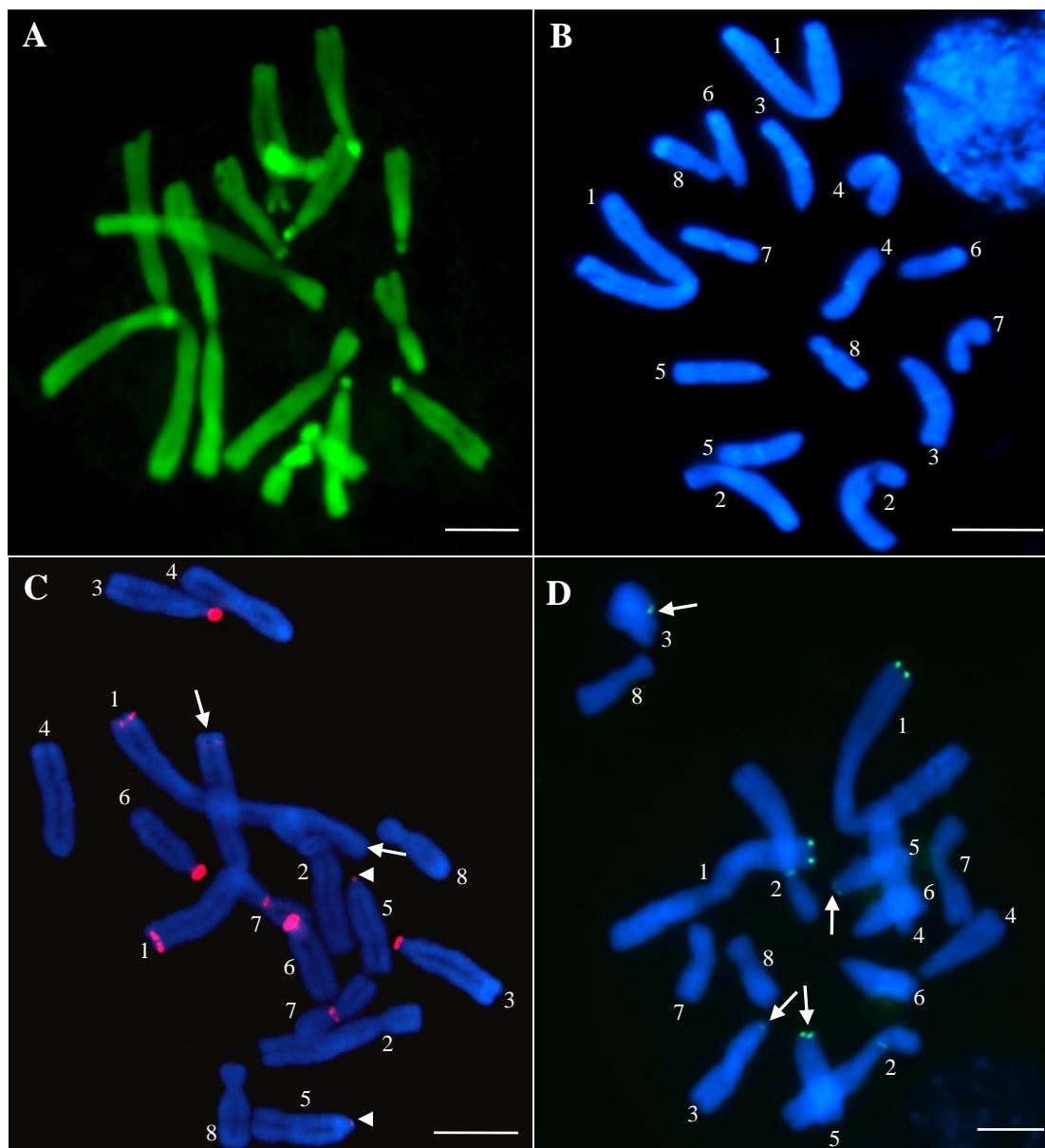


Figura 8 – Cromossomos somáticos de *Alstroemeria inodora*. (A) Bandamento com CMA₃/DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação *in situ* fluorescente (vermelho) com sonda de rDNA 45S - pTa71; (D) Sinais de hibridação (verde) com sonda de rDNA 5S - pScT7. Barra = 10µm.

4.2.5 Bandamento AgNOR

O bandamento com nitrato de prata para a espécie *A. inodora*, permitiu a visualização de um número máximo de seis bandas. As bandas localizam-se nos braços curtos de três pares de cromossomos telocêntricos (Figuras 18C) havendo coincidência com os sítios de rDNA 45S (Figura 9C) para estes cromossomos. Este tipo de bandamento foi realizado pela primeira vez no presente trabalho para *A. inodora*.

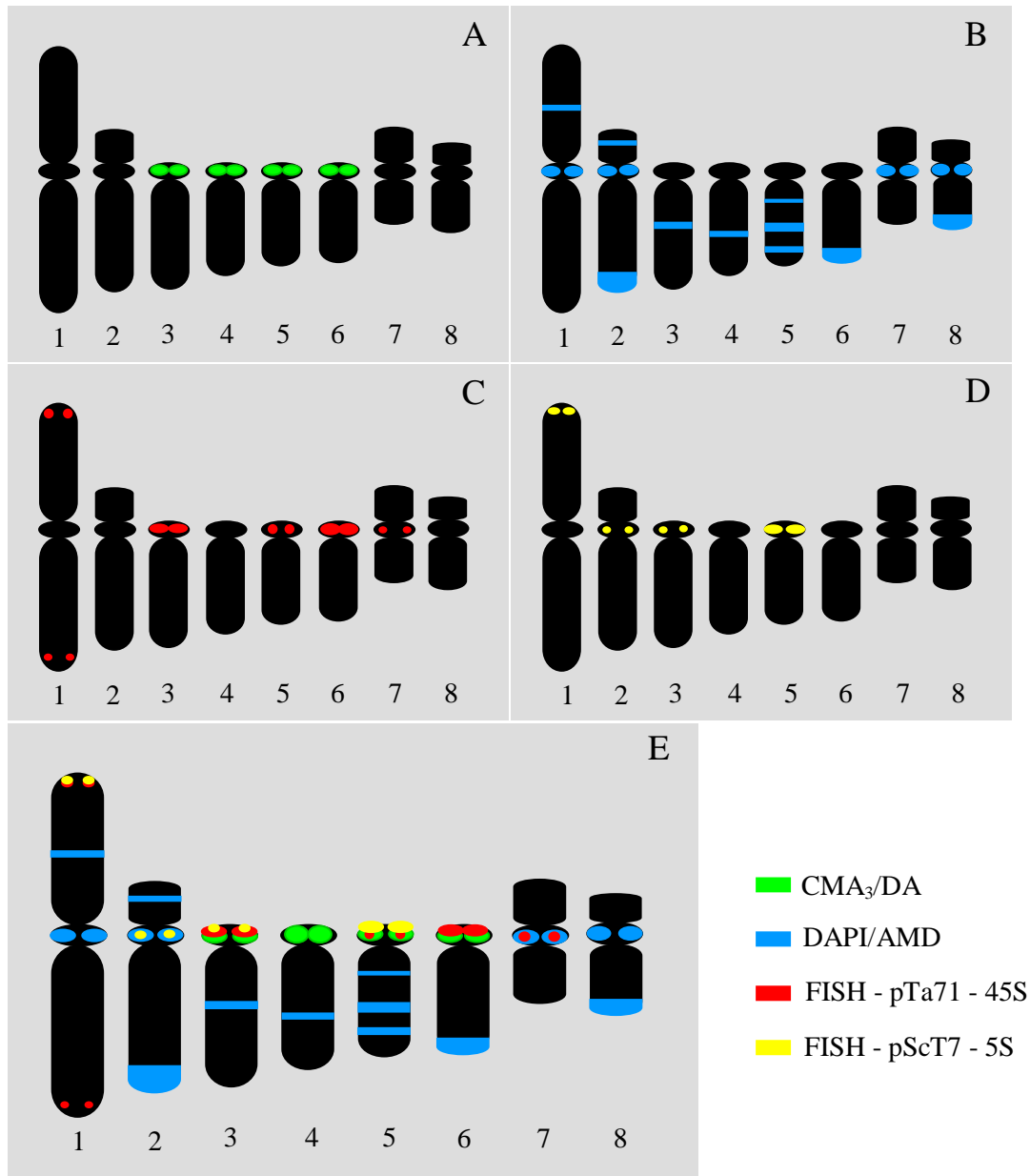


Figura 9 - *Alstroemeria inodora* – Ideogramas representativos. (A) Bandamento com CMA₃/DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação *in situ* para seqüências de rDNA 45S com a sonda pTa71; (D) Sinais de seqüências de rDNA 5S com a sonda pScT7; (E) Representação do conjunto de resultados das técnicas CMA₃/DA, DAPI/AMD e hibridação *in situ* para rDNA 45S e 5S.

4.2.6 Medidas cromossômicas

As medidas dos cromossomos da espécie *A. inodora*, realizadas em células submetidas às diferentes técnicas de coloração, variou de $8,89 \pm 1,12 \mu\text{m}$ a $29,85 \pm 4,76 \mu\text{m}$ (Tabela 4). Todos os pares cromossômicos apresentaram coeficiente de variação menor que 20%. O comprimento total da cromatina (CTC) para esta espécie foi de $220,97 \pm 28,64 \mu\text{m}$ e o índice de assimetria TF% de 22,48% (Tabela 8).

Observou-se que a espécie *A. inodora* apresenta cariótipo assimétrico com fórmula cariotípica $2m+1sm+1st+4T-sat$ (dois pares cromossômicos metacêntricos; um par cromossômico submetacêntrico; um par cromossômico subtelocêntrico e quatro pares cromossômicos telocêntricos) (Tabela 5).

Baseado no comprimento cromossômico, os oito pares de cromossomos do complemento da espécie *A. inodora* formam três grupos: um grupo com dois pares relativamente grandes (pares 1 e 2), sendo o par 1 metacêntrico e o par 2 subtelocêntrico; um segundo grupo formado por três pares medianos telocêntricos (pares 3, 4 e 5) e um terceiro grupo formado por três pares cromossômicos pequenos (pares 6, 7 e 8) sendo o par 6 telocêntrico, o par 7 metacêntrico e o par 8 submetacêntrico (Tabela 5). O número fundamental do conjunto cromossômico é igual a 12, ou seja, o complemento cromossômico de *A. inodora* apresenta um total de 12 braços (Tabela 8).

Tabela 5 - *Alstroemeria inodora* - Médias dos comprimentos totais dos pares cromossômicos, coeficientes de variação das médias (CV%), médias dos braços curtos, índices centroméricos (IC) e classificação.

Pares	Comprimento Cromossômico	CV%	Braço curto	IC	Classificação
1	29,85 ± 4,76	15,94	14,00 ± 2,20	46,90	metacêntrico
2	17,56 ± 2,08	11,85	3,96 ± 0,43	22,55	Subtelocêntrico
3	13,05 ± 1,88	14,41	0.0	0.0	telocêntrico
4	11,51 ± 2,20	19,10	0.0	0.0	telocêntrico
5	10,24 ± 1,61	15,72	0.0	0.0	telocêntrico
6	9,85 ± 1,64	16,65	0.0	0.0	telocêntrico
7	9,55 ± 1,45	15,18	4,24 ± 0,69	44,40	metacêntrico
8	8,89 ± 1,12	12,60	2,64 ± 0,28	29,70	Submetacêntrico

4.3. *Alstroemeria longistaminea*

4.3.1 Microscopia de fase e coloração com Giemsa

Os cromossomos não corados analisados em microscopia de fase (Figura 10A) e os corados com o emprego da solução Giemsa (Figura 10B) apresentaram-se com aspecto homogêneo, ou seja, sem a ocorrência de regiões diferenciadas ao longo do

comprimento cromossômico exceto a região centromérica. Os diferentes pares cromossômicos apresentam morfologia distinta quanto ao comprimento e posição centromérica (Figuras 10A e 10B). Dessas análises constatou-se também que a espécie *A. longistaminea* apresentou número cromossômico diplóide, $2n = 2x = 16$ (Figura 10C).

O complemento dessa espécie é igualmente formado por 8 pares de cromossomos sendo os pares 1 e 7 metacêntricos, o par 8 submetacêntrico, o par 2 subteloacêntrico e os pares 3, 4, 5 e 6 telocêntricos (Tabela 6). No complemento desta espécie, também foram observados microssatélites nos braços curtos dos pares cromossômicos 3, 4, 5 e 6 (Figuras 10A, 10B e 10C).

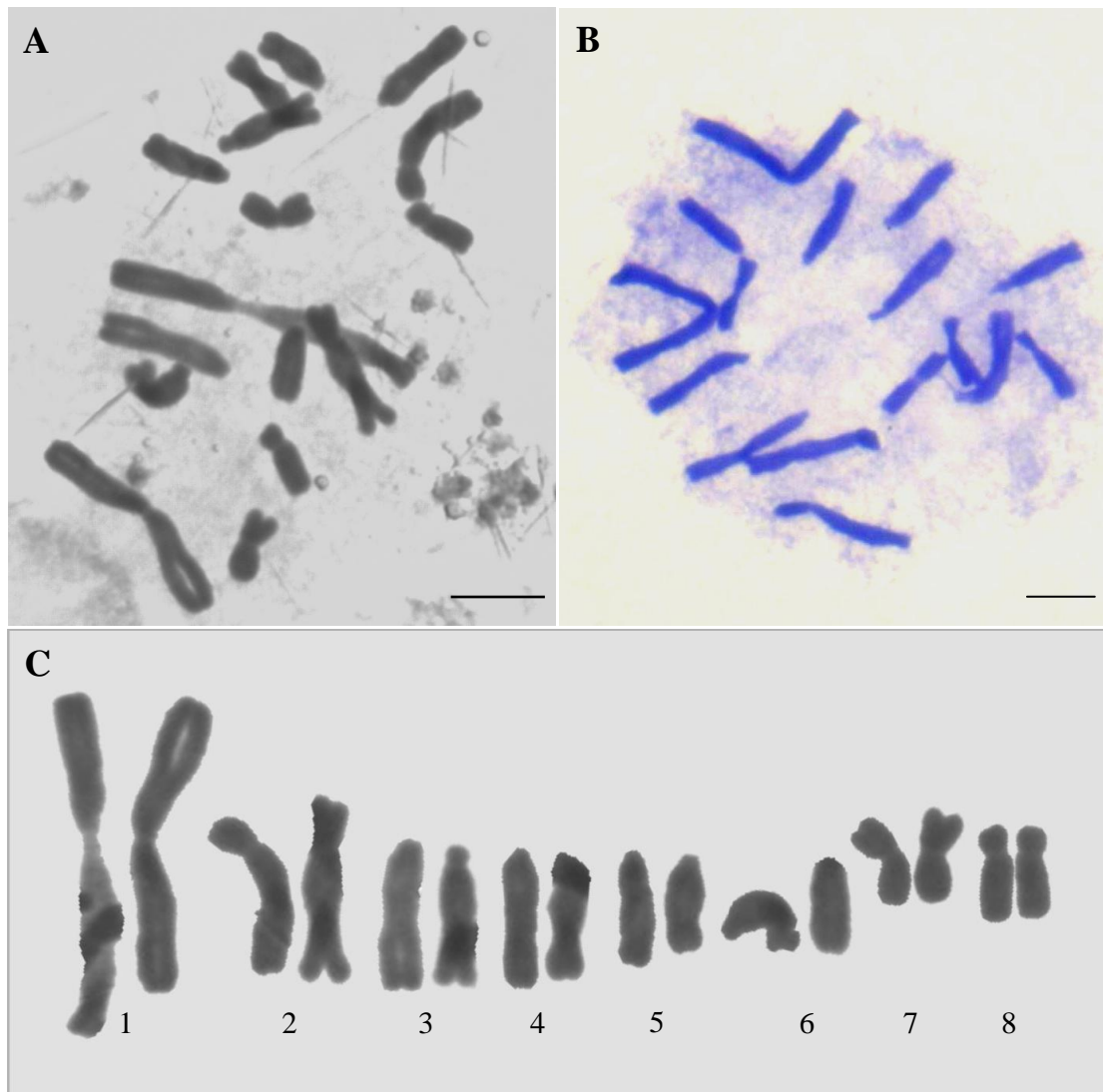


Figura 10 - Cromossomos somáticos de *Alstroemeria longistaminea*. (A) microscopia de fase; (B) Coloração com Giemsa; (C) Cariograma. Barra = 10 μ m.

4.3.2 Bandamento CMA₃/DA

Nas preparações citológicas de *A. longistaminea* submetidas ao bandamento com cromomicina CMA₃/DA foi observado um total de quatro bandas fluorescentes em dois pares cromossômicos (Figura 11A). Resultados do bandamento CMA₃/DA para a espécie *A. longistaminea* também são inéditos e estão apresentados pela primeira vez no presente trabalho.

A ocorrência de uma única banda na região centromérica dos pares cromossômicos 3 e 5 caracterizou o conjunto cromossômico da espécie *A. longistaminea* pelo bandamento com CMA₃/DA (Figuras 11A – setas, 12A e 12E). Nos demais pares cromossômicos 1, 2, 4, 6, 7 e 8 não foram identificadas bandas CMA₃/DA.

4.3.3 Bandamento DAPI/AMD

As análises das preparações citológicas de *A. longistaminea* bandadas com DAPI/AMD, revelaram um total de vinte e oito bandas distribuídas nos oito pares do complemento cromossômico (Figura 11B).

Os pares cromossômicos 1, 2, 7 e 8 são caracterizados por bandas DAPI/AMD situadas na região centromérica, sendo que o par 8 possui ainda, uma segunda banda terminal no braço longo. Os pares telocêntricos 3, 4, 5 e 6 apresentam número variado de bandas DAPI/AMD, sendo em número de três, três, uma e duas bandas respectivamente no braço longo. O terceiro par telocêntrico se destaca por apresentar a maior banda, quando comparado com os demais pares telocêntricos (Figuras 11B, 12B e 12E). O padrão de bandamento com DAPI/AMD para a espécie *A. longistaminea* também é inédito.

4.3.4 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* com sonda pTa71 nos cromossomos de *A. longistaminea* revelou oito sítios de hibridação distribuídos em quatro pares cromossômicos (Figura 11C).

Somente os cromossomos telocêntricos do complemento, os pares 3, 4, 5 e 6, apresentaram sinais de hibridação referente ao rDNA 45S localizados todos no centrômero. O par cromossômico 6 apresentou uma heteromorfia referente ao tamanho do sinal de hibridação, sendo um deles quase imperceptível quando comparando com o sinal do cromossomo homólogo (Figuras 11C – seta, 12C, 12E e 16C).

A hibridação com a sonda pScT7 resultou na visualização de dois sítios de hibridação no par telocêntrico 4 que estão localizados na região do centrômero (Figuras 11D, 12D e 12E). Os pares cromossômicos 1, 2, 7 e 8 não apresentaram sinais de hibridação correspondentes a nenhuma das sondas de rDNA, tanto 45S ou 5S. Os resultados de FISH com as sondas das sequências de rDNA 45S e 5S para a espécie *A. longistaminea* são apresentados pela primeira vez no presente trabalho.

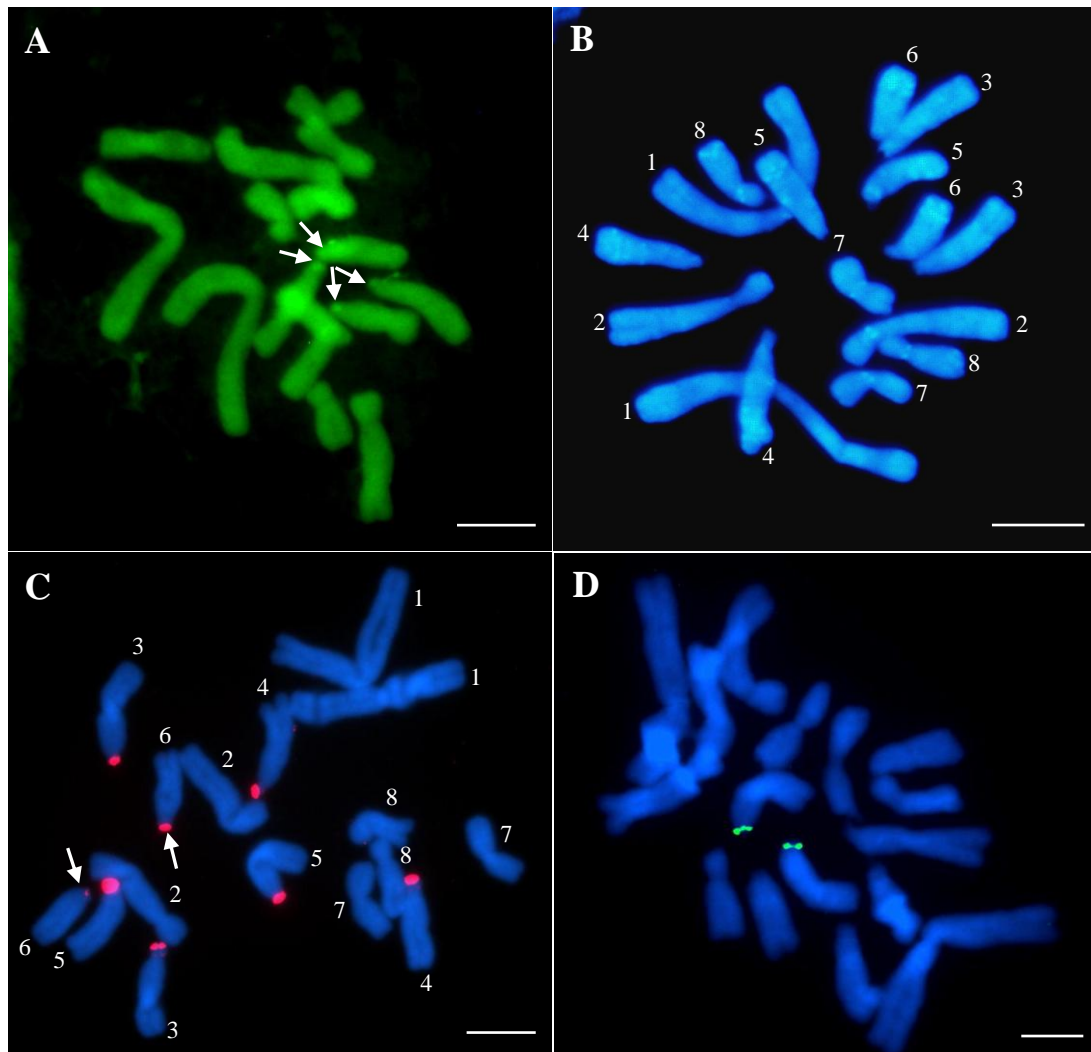


Figura 11 – Cromossomos somáticos de *Alstroemeria longistaminea*. (A) Bandamento com CMA₃/DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação *in situ* fluorescente (vermelho) com sonda de rDNA 45S - pTa71; (D) Sinais de hibridação (verde) com sonda de rDNA 5S - pScT7. Barra = 10μm.

4.3.5 Bandamento AgNOR

Nas preparações citológicas de *A. longistaminea* submetidas ao bandamento com nitrato de prata, foi observado, um total de quatro bandas localizadas nos braços curtos

de dois pares cromossômicos telocêntricos (Figura 18A). As bandas de prata coincidem com sítio de rDNA 45S (Figura 12C). Estes dados de AgNOR para esta espécie são inéditos.

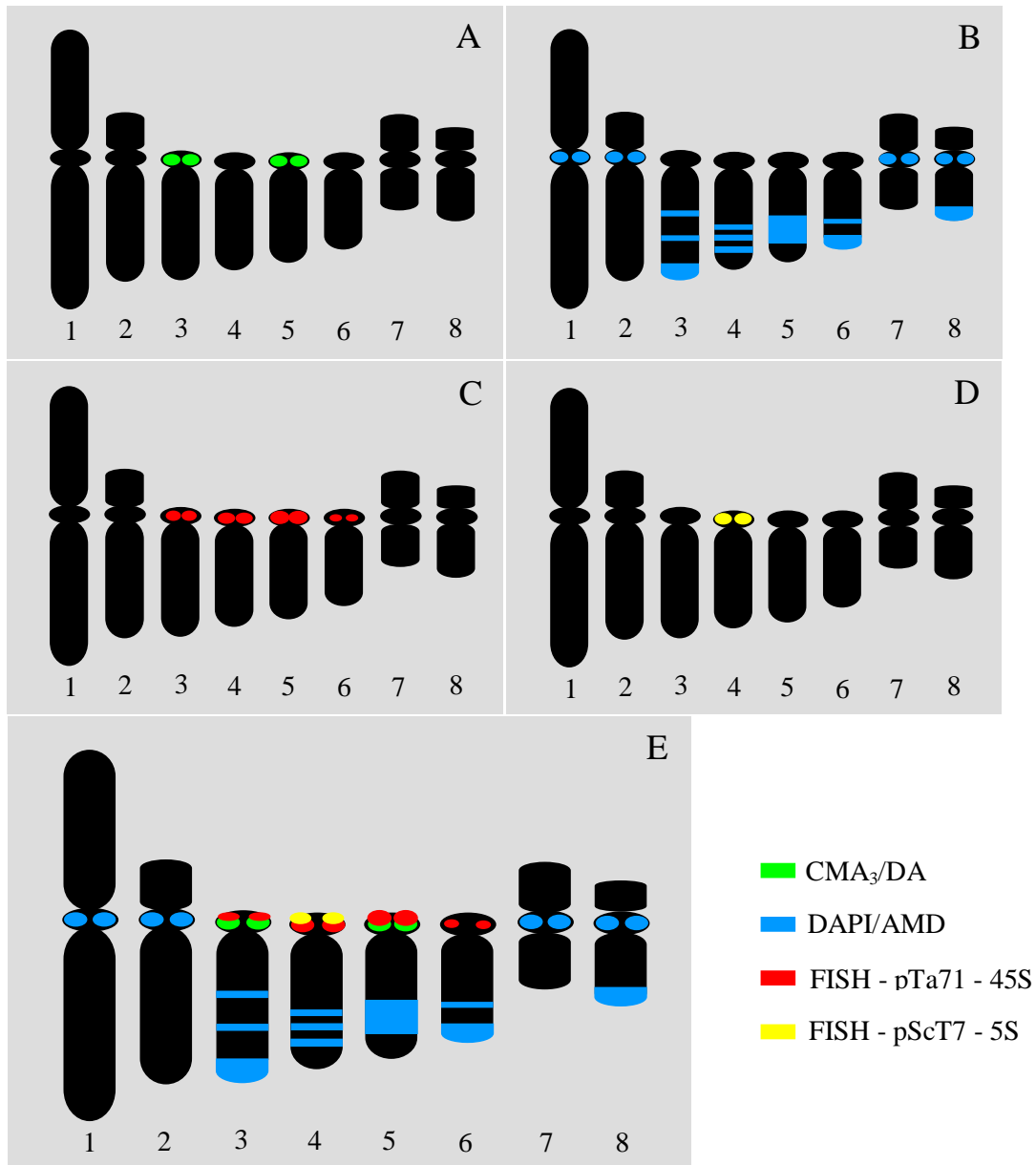


Figura 12 - *Alstroemeria longistaminea* – Ideogramas representativos. (A) Bandamento com CMA₃/DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação *in situ* para seqüências de rDNA 45S com a sonda pTa71; (D) Sinais de seqüências de rDNA 5S com a sonda pScT7; (E) Representação do conjunto de resultados das técnicas CMA₃/DA, DAPI/AMD e hibridação *in situ* para rDNA 45S e 5S.

4.3.6 Medidas cromossômicas

A medida dos comprimentos dos cromossomos de *A. longistaminea* variou de $9,38 \pm 0,27 \mu\text{m}$ a $33,38 \pm 3,44 \mu\text{m}$ e o coeficiente de variação para todos os pares cromossômicos foi menor que 20% (Tabela 6). O comprimento total da cromatina (CTC) medido para a espécie foi de $240,13 \pm 26,87 \mu\text{m}$ e o índice de assimetria TF% de 22,66% (Tabela 8).

Observou-se que a espécie *A. longistaminea* apresenta cariótipo assimétrico com fórmula cariotípica $2m+1st+1sb+4T\text{-sat}$, ou seja, dois pares cromossômicos metacêntricos; um par cromossômico submetacêntrico; um par cromossômico subteloentrico e quatro pares cromossômicos telocêntricos (Tabela 6).

Em relação ao tamanho dos cromossomos, os oito pares cromossômicos do complemento da espécie *A. longistaminea* formaram três grupos: a) um grupo composto por dois pares cromossômicos relativamente grandes (pares 1 e 2) sendo o par 1 metacêntrico e o par 2 subteloentrico; b) um segundo grupo formado por três pares cromossômicos medianos (pares 3, 4 e 5) todos telocêntricos e por último, c) um grupo formado por três pares cromossômicos pequenos (pares 6, 7 e 8) sendo o par 6 telocêntrico, o par 7 metacêntrico e o par 8 submetacêntrico (Tabela 6). O número fundamental do complemento cromossômico é igual a 12, ou seja, o complemento cromossômico apresenta um total de 12 braços (Tabela 8).

Tabela 6 - *Alstroemeria longistaminea* - Médias dos comprimentos totais dos pares cromossômicos, coeficientes de variação das médias (CV%), médias dos braços curtos, índices centroméricos (IC) e classificação.

Pares	Comprimento Cromossômico	CV%	Braço curto	IC	Classificação
1	$33,38 \pm 3,44$	10,31	$15,32 \pm 2,52$	45,89	metacêntrico
2	$19,25 \pm 0,49$	2,54	$4,63 \pm 0,09$	24,05	subtelocêntrico
3	$14,22 \pm 1,54$	10,83	0.0	0.0	telocêntrico
4	$12,51 \pm 1,10$	8,79	0.0	0.0	telocêntrico
5	$11,81 \pm 0,43$	3,64	0.0	0.0	telocêntrico
6	$9,94 \pm 1,05$	10,56	0.0	0.0	telocêntrico
7	$9,74 \pm 0,68$	6,98	$4,57 \pm 0,41$	46,92	metacêntrico
8	$9,38 \pm 0,27$	2,88	$2,72 \pm 0,03$	29,00	submetacêntrico

4.4. *Alstroemeria psittacina*

4.4.1 Microscopia de fase e coloração com Giemsa

Os cromossomos analisados em microscopia de fase (Figura 13A) e os corados com Giemsa (Figura 13B) apresentam-se, à semelhança dos resultados apresentados para as demais espécies, com aspecto homogêneo, sem a ocorrência de regiões diferenciadas ao longo do comprimento dos cromossomos exceto a região centromérica (Figuras 13A e 13B). Constata-se também que a espécie *A. psittacina* apresenta número cromossômico diplóide, $2n = 2x = 16$ cromossomos (Figura 13C).

Baseado na posição centromérica os pares cromossômicos 1 e 7 são metacêntricos, o par 8 em submetacêntrico, o par 2 subteloentríco, e os pares 3, 4, 5 e 6 são telocêntricos (Figura 13C e Tabela 7). No conjunto cromossômico dessa espécie foram observados microssatélites localizados nos braços curtos dos quatro pares cromossômico telocêntrico, ou seja, nos pares 3, 4, 5 e 6 (Figuras 13B e 13C).

4.4.2 Bandamento CMA₃/DA

Nas análises dos cromossomos da espécie *A. psittacina* com a técnica de coloração fluorescente CMA₃/DA, observaram-se bandas fluorescentes localizadas no centrômero de dois pares cromossômicos telocêntricos 4 e 5 (Figuras 14A– seta, 15A e 15E). Os demais cromossomos do complemento desta espécie, os pares 1, 2, 6, 7 e 8, não apresentam bandas CMA₃/DA positivas. Estes dados são também inéditos para a espécie *A. psittacina*.

4.4.3 Bandamento DAPI/AMD

As análises dos complementos cromossômicos da espécie *A. psittacina* com DAPI/AMD, apresentou um total de vinte e seis bandas distribuídas entre os oito pares cromossômicos (Figura 14B).

O par cromossômico 1 se caracteriza por apresentar três bandas DAPI/AMD uma localizada no centrômero e as outras duas em cada um dos braços. Os pares 2 e 8 se caracterizam por apresentarem bandas localizadas no centrômero e uma banda adicional no braço menor no par 2, e no braço maior no par 8 (Figuras 14B, 15B e 15E).

Os pares de cromossomos telocêntricos 3, 4 e 6 são identificados por apresentarem uma única banda de DAPI/AMD bastante evidente se comparado as bandas dos demais cromossomos do complemento, diferenciando-se do par telocêntrico 5 que apresenta duas bandas localizadas em posição intercalar, uma mais proximal e

outra mais distal, no mesmo braço longo. O par 7 destaca-se por apresentar uma única banda situada no centrômero (Figuras 14B, 15B e 15E). O padrão de DAPI/AMD aqui descrito para a espécie *A. psittacina* estão sendo publicados pela primeira vez no presente trabalho.

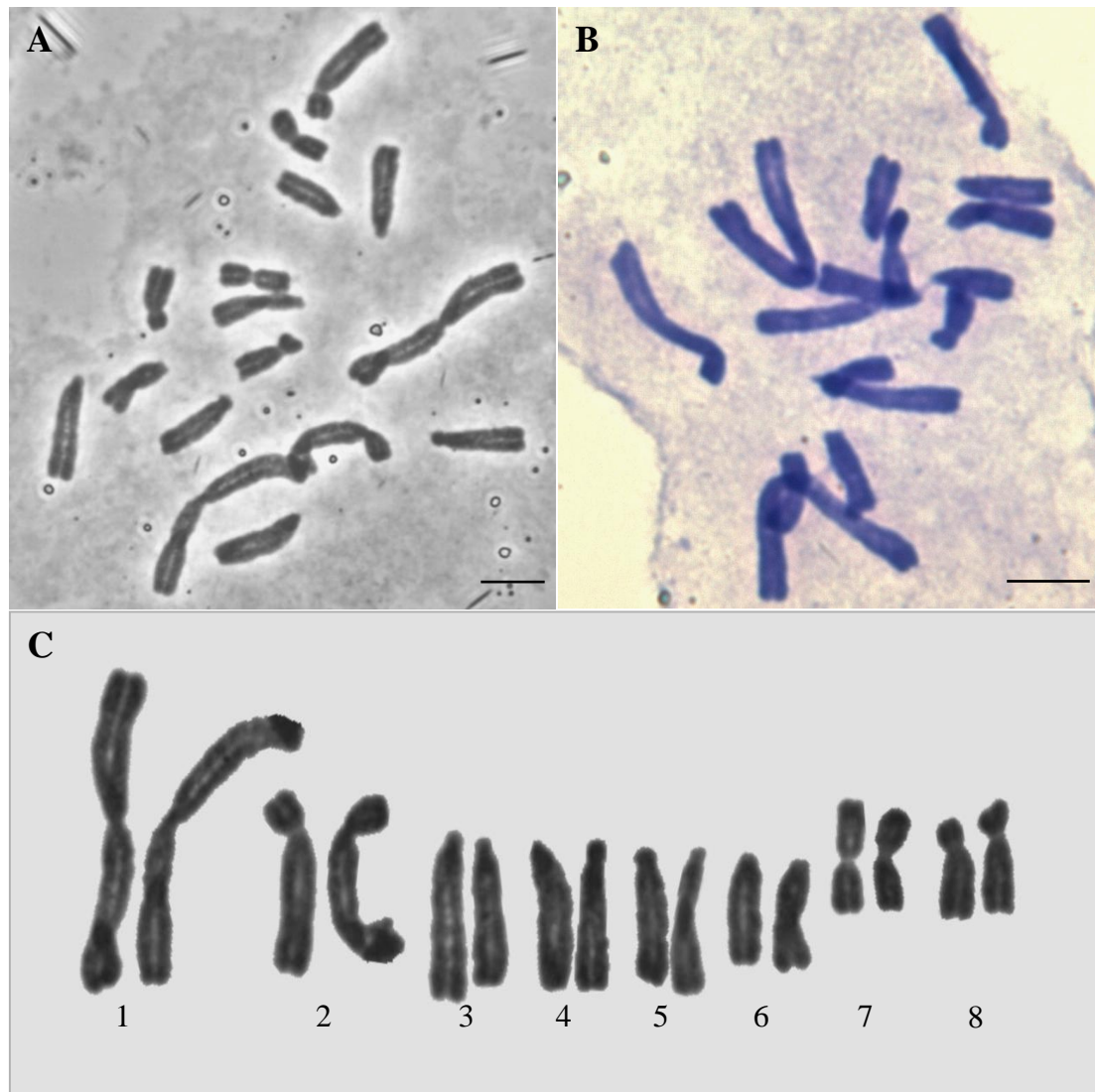


Figura 13 – Cromossomos somáticos de *Alstroemeria psittacina*. (A) Imagens em microscopia de fase; (B) coloração com Giemsa; (C) Cariograma. Barra = 10µm.

4.4.4 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* utilizando-se a sonda pTa71 nos cromossomos da espécie *A. psittacina*, revelou um total de oito sítios distribuídos em quatro pares cromossômicos telocêntricos 3, 4, 5 e 6 os quais se localizam na região centromérica (Figuras 14C, 15C e 15E). A diferença entre eles resume-se ao tamanho relativo dos diferentes sinais. Os sítios de hibridação dos pares cromossômico 3 e 6 são

pequenos, se comparados aos sítios dos demais pares telocêntricos, sendo o sinal do par 6 quase imperceptível (Figuras 14C – seta, 15C e 15E).

Na hibridação *in situ* com a sonda pScT7, observaram-se apenas dois sítios de hibridação no par cromossômico 3, localizados nas regiões centroméricas (Figuras 14D, 15D e 15E). Os pares cromossômicos 1, 2, 7 e 8 do complemento não apresentam sítios de hibridação para as duas sondas testadas. Estes dados de FISH para ambas as sondas são inéditos para esta espécie.

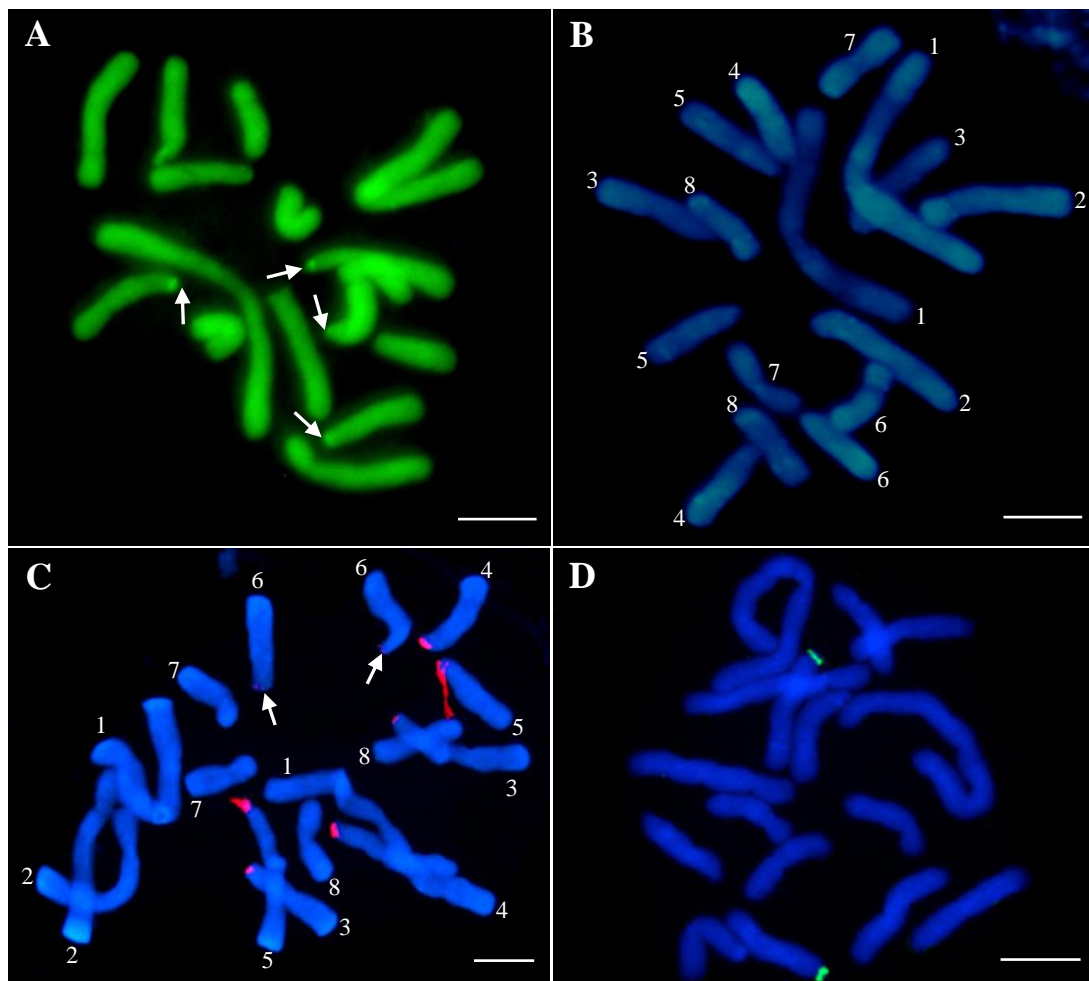


Figura 14 - Cromossomos somáticos de *Alstroemeria psittacina*. (A) Bandamento com CMA₃/DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação *in situ* fluorescente (vermelho) com sonda de rDNA 45S - pTa71; (D) Sinais de hibridação *in situ* fluorescente (verde) com sonda de rDNA 5S - pScT7. Barra = 10µm.

4.4.5 Bandamento AgNOR

Com relação ao bandamento com nitrato de prata, a espécie *A. psittacina* apresentou seis bandas localizadas nos braços curtos de três pares cromossômicos telocêntricos (Figura 18B). As bandas de prata coincidem com os sítios de rDNA 45S

(Figura 15C). Estes resultados de bandamento NOR na espécie *A. psittacina* são apresentados pela primeira vez no presente trabalho.

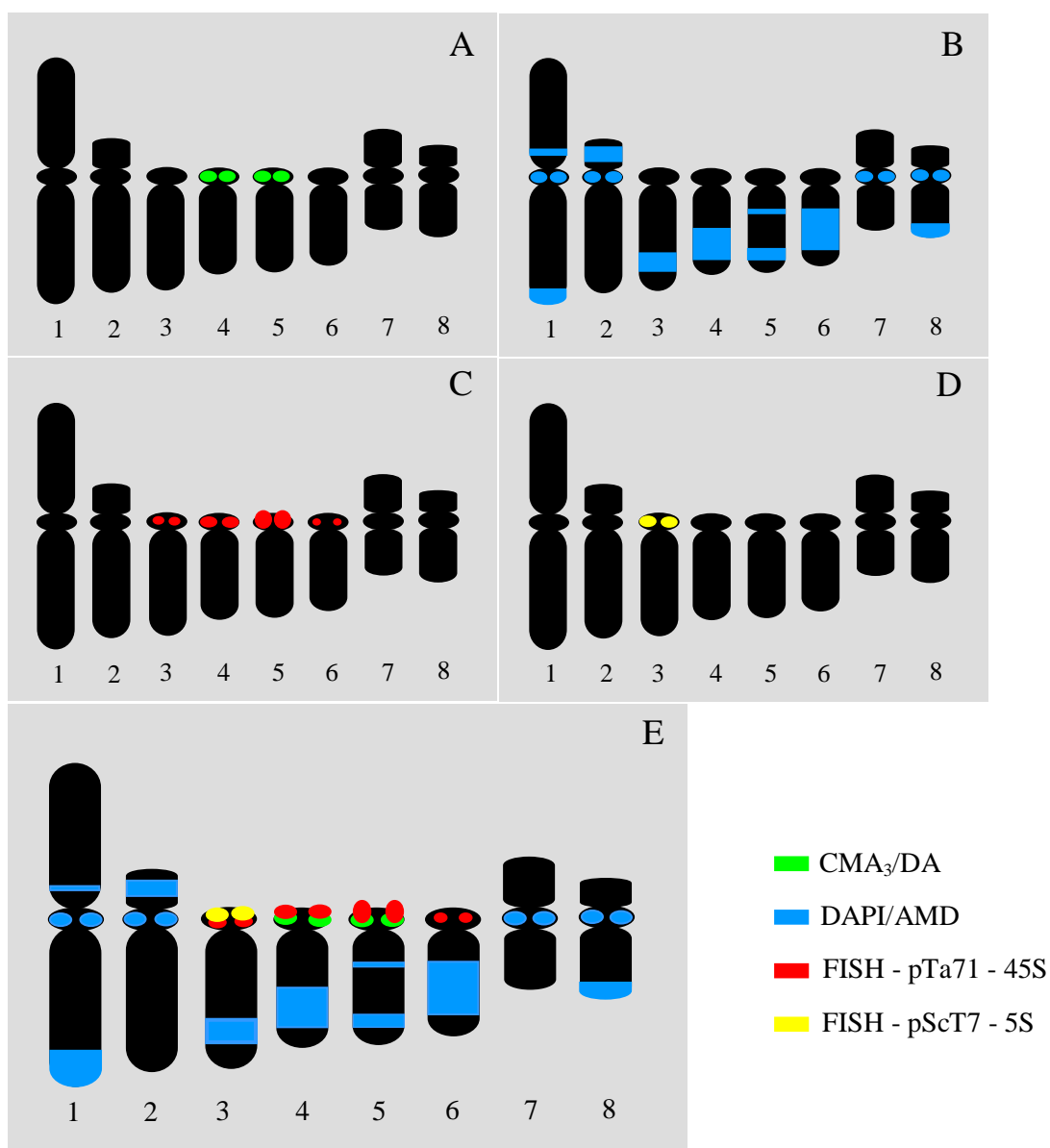


Figura 15 - *Alstroemeria psittacina* – Ideogramas representativos. (A) Bandamento com CMA₃/DA; (B) Bandamento com DAPI/AMD; (C) Sinais de hibridação *in situ* para seqüências de rDNA 45S com a sonda pTa71; (D) Sinais de seqüências de rDNA 5S com a sonda pScT7; (E) Representação do conjunto de resultados das técnicas CMA₃/DA, DAPI/AMD e hibridação *in situ* para rDNA 45S e 5S.

4.4.6 Medidas cromossômicas

As medidas obtidas para os comprimentos totais dos cromossomos da espécie *A. psittacina* variaram de $8,98 \pm 0,23 \mu\text{m}$ a $28,45 \pm 0,60 \mu\text{m}$ e todos os pares apresentaram um coeficiente de variação menor que 20% (Tabela 7). O comprimento total da

cromatina (CTC) para esta espécie foi de $218,75 \pm 22,34 \mu\text{m}$ e o índice de assimetria TF% de 22,45% (Tabela 8).

Observou-se que a espécie *A. psittacina* apresenta cariótipo assimétrico com fórmula cariotípica $2m+1st+1sb+4T\text{-sat}$ (dois pares cromossômicos metacêntricos; um par submetacêntrico; um par subtelocêntrico e quatro pares telocêntricos, (Tabela 7).

Em relação ao tamanho, os cromossomos de *A. psittacina* foram divididos em três grupos: a) um grupo formado por dois pares relativamente grandes (1 e 2) sendo o par 1 metacêntrico e o par 2 subtelocêntrico; b) um segundo grupo formado por três pares medianos (3, 4 e 5) todos telocêntricos; e por último c) um grupo formado por três pares relativamente pequenos (pares 6, 7 e 8), sendo o par 6 telocêntrico, o 7 metacêntrico e o par 8 submetacêntrico (Figuras 13C e 14E); tabela 7. O número fundamental do complemento cromossômico desta espécie também corresponde a um total de 12 braços (Tabela 8).

Tabela 7 - *Alstroemeria psittacina* - Médias dos comprimentos totais dos pares cromossômicos, coeficientes de variação das médias (CV%), médias dos braços curtos, índices centroméricos (IC) e classificação.

Pares	Comprimento Cromossômico	CV%	Braço curto	IC	Classificação
1	$28,45 \pm 0,60$	2,11	$13,60 \pm 2,00$	47,8	metacêntrico
2	$17,31 \pm 3,46$	19,99	$3,68 \pm 0,15$	21,31	subtelocêntrico
3	$13,05 \pm 0,30$	2,30	0.0	0.0	telocêntrico
4	$11,06 \pm 1,65$	14,92	0.0	0.0	telocêntrico
5	$10,78 \pm 1,39$	12,89	0.0	0.0	telocêntrico
6	$9,97 \pm 1,72$	17,25	0.0	0.0	telocêntrico
7	$9,80 \pm 0,52$	5,31	$4,66 \pm 0,49$	47,55	metacêntrico
8	$8,98 \pm 0,23$	2,56	$2,61 \pm 0,36$	29,06	submetacêntrico

Tabela 8 - Relação das espécies estudadas do gênero *Alstroemeria*. Número cromossômico (2n), variação de tamanho dos cromossomos, comprimento total da cromatina (CTC), índice de assimetria TF%, fórmula cariotípica (m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subteloentrico e T = telocêntrico) e número fundamental.

Espécies	2n	Variação de tamanho (µm)	CTC (µm)	TF%	Fórmula cariotípica	Número fundamental
<i>A. cunha</i>	16	8,06 - 30,05	216,41 ± 15,82	22,40	2m + 1sm + 1st + 4T-sat	12
<i>A. inodora</i>	16	8,89 - 29,85	220,97 ± 28,64	22,48	2m + 1sm + 1st + 4T-sat	12
<i>A. longistaminea</i>	16	9,38 - 33,38	240,13 ± 26,87	22,66	2m + 1sm + 1st + 4T-sat	12
<i>A. psittacina</i>	16	8,98 - 28,45	218,75 ± 22,34	22,45	2m + 1sm + 1st + 4T-sat	12

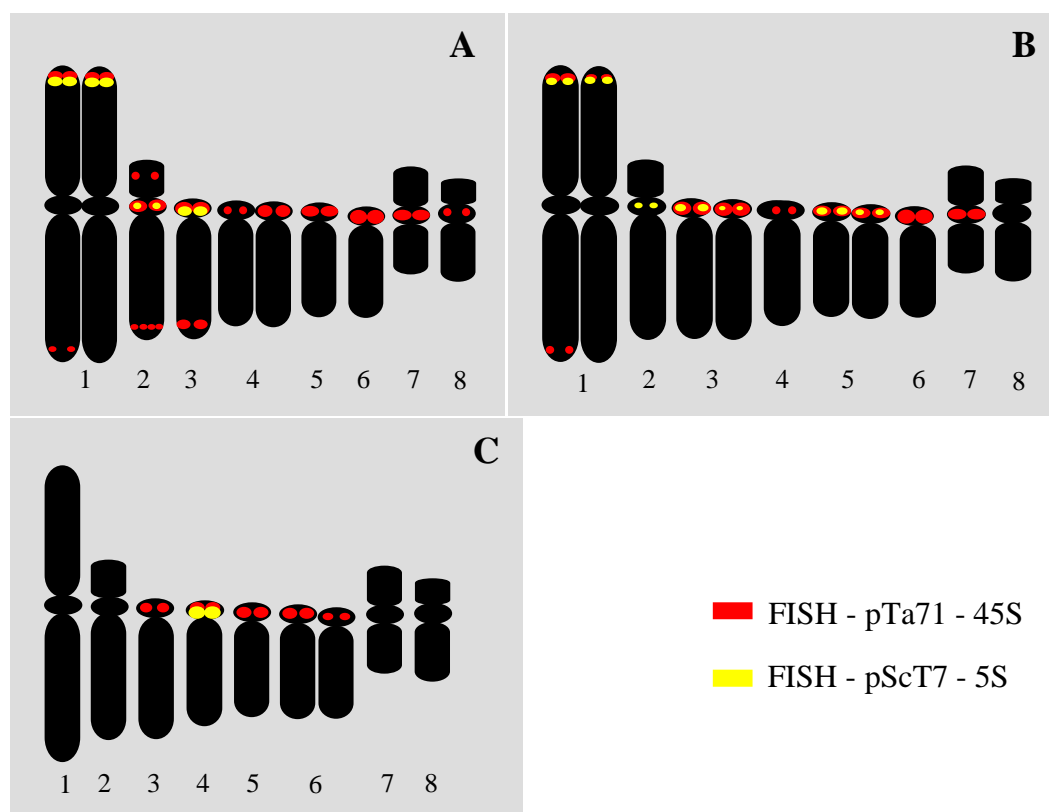


Figura 16- *Alstroemeria* - ideogramas indicativos dos pares de cromossomos que apresentam polimorfia para sítios de hibridação das sequências de rDNA. (A) *A. cunha* - 45S; (B) *A. inodora* - 45S e 5S; (C) *A. longistaminea* - 45S.

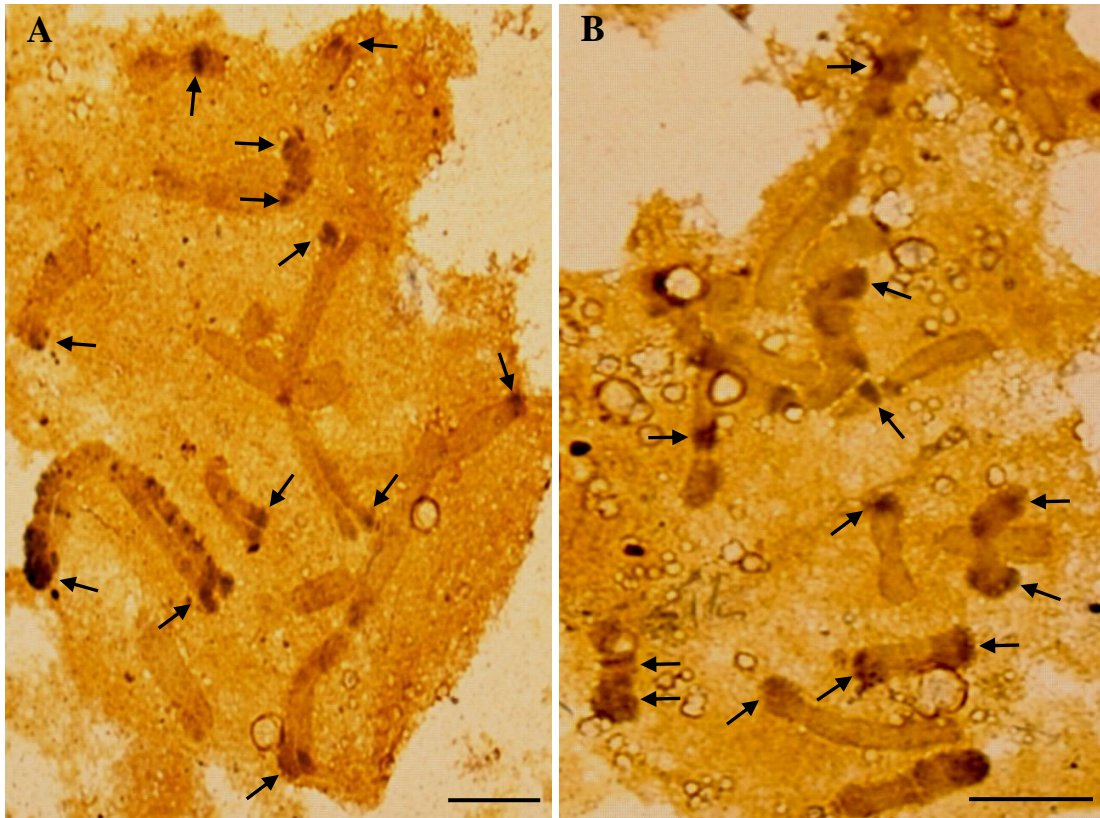


Figura 17 - Cromossomos somáticos de *A. cunha* com a técnica de impregnação com prata (AgNOR). Barra = 10 μ m.

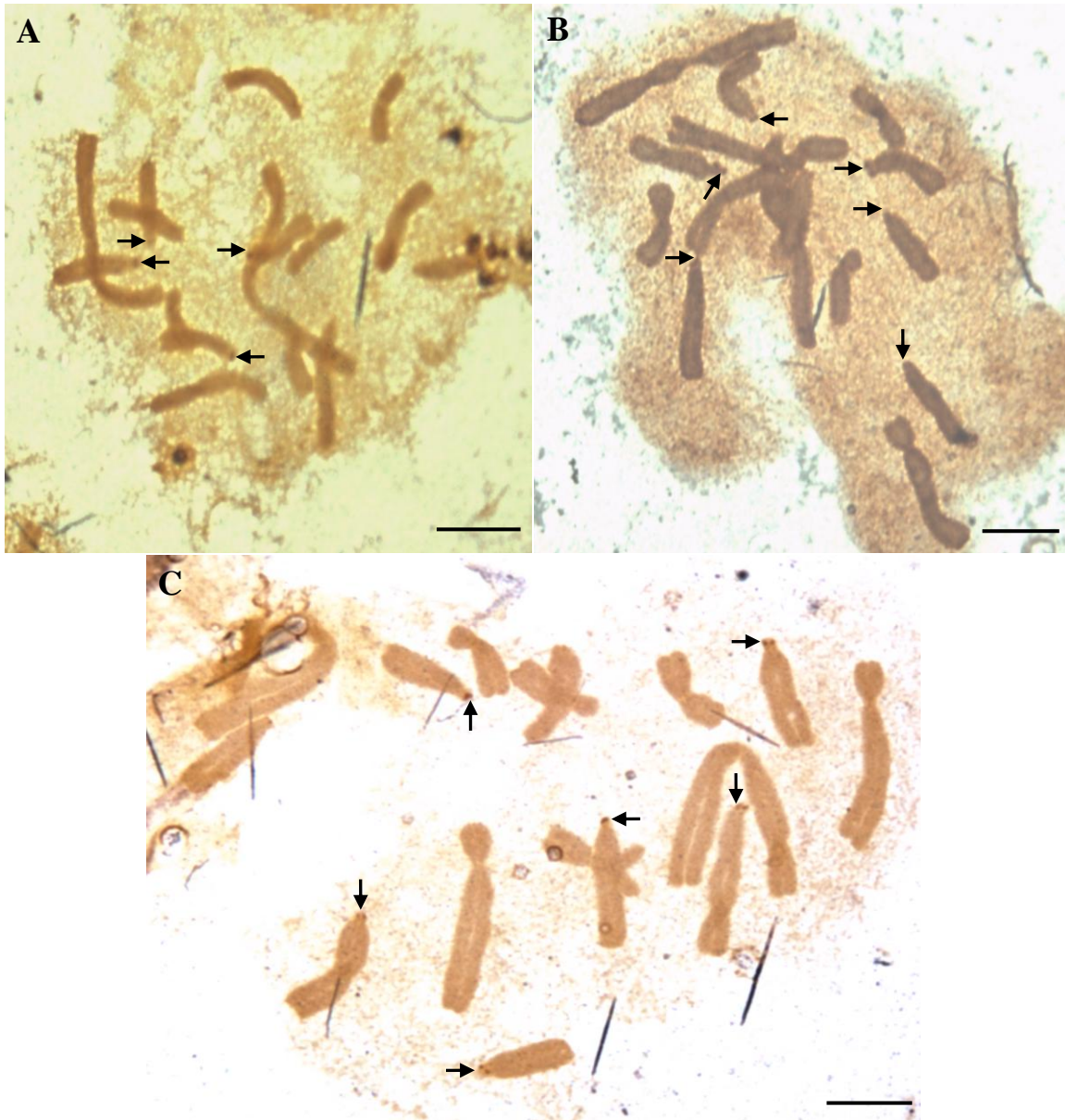


Figura 18 - Cromossomos somáticos com a técnica de impregnação com prata (AgNOR). (A) *A. longistaminea*; (B) *A. psittacina*; (C) *A. inodora*. Barra = 10 μ m.

5 DISCUSSÃO

O número cromossômico diplóide de $2n = 2x = 16$ para as espécies, *A. cunha*, *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina* constatado neste trabalho, corrobora os dados de número cromossômico, registrados na literatura, para as espécies *A. inodora* (BUITENDIJK & RAMANA, 1996; BUITENDIJK et al., 1997; KUIPERS et al., 1997; KAMSTRA et al., 1999), e *A. psittacina* (TSUCHIYA & HANG, 1987; TSUCHIYA & HANG, 1989; HUNZIKER & XIFREDA, 1990; BUITENDIJK & RAMANA, 1996; BUITENDIJK et al., 1997; SANZO & HUNZIKER, 1998).

Para as espécies *A. cunha* e *A. longistaminea* não existem relatos de número cromossômico, sendo assim, a contagem cromossômica para essas espécies é inédita, e está sendo registrado pela primeira vez no presente trabalho.

De modo geral, o número de cromossomos $2n = 2x = 16$ é constante para o gênero *Alstroemeria* não tendo sido relatadas variações de números cromossômicos para as espécies conhecidas até o momento. Para as espécies chilenas e argentinas foi registrado igualmente $2n = 2x = 16$ (TSUCHIYA et al., 1987; KUIPERS et al., 1997; BUITENDIJK et al., 1998; SANZO & HUNZIKER, 1998; ISHIKAWA et al., 1999; ISHIKAWA & ISHIZAKA, 2002; SANZO, 2002; BAEZA et al., 2006; BAEZA et al., 2007) com exceção de poliplóides resultantes de duplicação cromossômica induzida (LU & BRIDGEN, 1997; ISHIKAWA et al., 1999; LIN et al., 2000) ou da formação de híbridos interespecíficos sintéticos (BUITENDIJK et al., 1995; DE JEU & JACOBSEN, 1995; ISHIKAWA et al., 1997) ou híbridos ao acaso (TSUCHIYA & HANG, 1987, HANG & TSUCHIYA, 1988).

Os complementos cromossômicos das quatro espécies aqui estudadas, *A. cunha*, *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina* apresentaram a mesma fórmula cariotípica $2m + 1sm + 1st + 4T\text{-sat}$ (Figuras 4A, 4B, 4C, 7A, 7B, 7C, 10A, 10B, 10C, 13A, 13B e 13C e Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8) concordando com a fórmula cariotípica descrita para a espécie argentina *A. psittacina* (SANZO & HUNZIKER, 1998) e para as espécies brasileiras *A. inodora* e *A. psittacina* (BUITENDIJK & RAMANA, 1996). Embora as quatro espécies aqui analisadas tenham apresentado igual fórmula cariotípica, esta característica não é comum para as espécies do gênero. Diferentemente do número cromossômico, algumas espécies do gênero *Alstroemeria* apresentam diversidade na fórmula cariotípica sendo que para a espécie argentina *A. pygmaea* SANZO (2002) determinou $2m + 1sm + 1 sm\text{-st} + 4t$. No caso de *A. pygmaea* a diferença está presente

num par classificado como sendo submetacêntrico-subtelocêntrico (sm-st) e em dois pares considerados metacêntricos perfeitos (2M). A variação da fórmula cariotípica foi também constatada em cinco espécies chilenas, e inclusive em diferentes acessos dessas espécies, por BAEZA et al. (2007); *A. aurea*, *A. hookeri* e *A. pelegrina* apresentaram fórmula $3m + 1sm + 4t$; *A. ligtu* a fórmula $4m + 1sm + 3t$ e um único acesso de *A. hookeri* apresentou $2m + 2sm + 2st + 2t$, diferente da fórmula padrão determinada para esta espécie.

Em todos os pares de cromossomos telocêntricos dos complementos das espécies analisadas neste trabalho, *A. cunha*, *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina* foram observados microssatélites localizados no braço menor desses cromossomos, visíveis principalmente nas observações em microscopia de fase e CMA₃ (Figuras 4C, 5A, 7C, 8A, 10C, 11A, 13C e 14A). A presença de microssatélites parece ser também uma característica comum, principalmente nos pares de telocêntricos dos complementos cromossômicos das espécies do gênero *Alstroemeria*, pois diversos autores descrevem essa característica cromossômica, observada através da aplicação de diferentes técnicas. Com a aplicação da técnica de bandamento-C foi registrada a presença de microssatélites também para as espécies *A. inodora* e *A. psittacina* por BUITENDIJK & RAMANA (1996) estando estes igualmente localizadas nos braços curtos dos quatro pares cromossômicos telocêntricos. Semelhantes resultados foram obtidos por SANZO & HUNZIKER (1998) que identificaram para a espécie *A. psittacina*, microssatélites presentes nos braços curtos dos pares telocêntricos 3, 4 e 6 e uma constrição secundária no braço longo do par cromossômico 2. Para a espécie *A. pygmaea*, SANZO (2002), identificou microssatélites também nos pares telocêntricos 3, 5 e 6. Com a aplicação da técnica de bandamento com DAPI (BAEZA et al. 2006) e da técnica de hibridização *in situ*, (BAEZA et al. 2007), também foram identificados microssatélites localizados nas regiões terminais dos braços cromossômicos de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e acima da região do centroméricas dos cromossomos telocêntricos para algumas espécies chilenas de *Alstroemeria*.

Assim a elaboração do cariótipo padrão para cada uma das espécies, *A. cunha*, *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina*, mediante análises de cromossomos corados com corantes convencionais como Giemsa ou analisados simplesmente em microscopia de fase, não foram suficientes para a caracterização cromossômica intraespecífica ou a discriminação dessas espécies, já que as mesmas apresentaram fórmulas cariotípicas idênticas. No entanto a aplicação das técnicas de bandamento DAPI e CMA₃ permitiu a

diferenciação longitudinal dos cromossomos de cada um dos complementos, devido aos padrões específicos de bandas obtidos, e conseqüentemente uma melhor caracterização das espécies.

Apesar de ser uma técnica que tem sido bastante utilizada em diversas espécies vegetais para a caracterização de regiões heterocromáticas ricas em bases GC tais como *Citrus* (GUERRA, 1993), *Hypochoeris* (CERBAH et al., 1998), *Clivia* (RAN et al., 1999), *Pinus densiflora* (HIZUME et al., 2001), *Crinum* (AHMED, 2004) e *Selaginella* (MARCON et al., 2005), a técnica de bandamento com o fluorocromo CMA₃/DA foi pela primeira vez aplicada em cromossomos de espécies do gênero *Alstroemeria* durante este trabalho.

Todas as espécies de *Alstroemeria* aqui estudadas apresentaram nos seus complementos, cromossomos com bandas fluorescentes CMA₃/DA⁺. Comparando-se os resultados para CMA₃/DA⁺ entre as espécies *A. cunha* e *A. inodora*, verifica-se que apesar de apresentarem em comum bandas de CMA₃/DA em todos os quatro pares telocêntricos, a diferenciação entre estas espécies pode ser feita através das diferenças observadas no tamanho relativo das bandas. A espécie *A. cunha* apresentou bandas menores do que as bandas de *A. inodora*, sendo que em algumas células, estas são quase imperceptíveis (Figuras 5A, 6A, 6E, 8A, 9A e 9E). Para as espécies *A. longistaminea* e *A. psittacina*, o bandamento foi positivo para apenas dois pares telocêntricos do complemento dessas espécies. Apesar de apresentarem bandas em pares telocêntricos distintos, o fato dos mesmos possuírem comprimentos cromossômicos aproximados, dificulta uma diferenciação entre as duas espécies. Portanto o uso da técnica de CMA₃ isoladamente não permitiu uma diferenciação entre estas duas últimas espécies. (Figuras 11A, 12A, 12E, 14A, 15A e 15E).

Alguns autores relataram a existência de correspondência entre as regiões evidenciadas pelo bandamento CMA⁺ com regiões que apresentam sinais positivos de hibridações *in situ* com seqüências de rDNA 45S, (CERBAH et al., 1998; FORNI-MARTINS & GUERRA, 1999; RAN et al., 1999; SILJAK-YAKOVLEV et al., 2003; MARCON et al., 2005). Nos resultados obtidos com esse fluorocromo para as espécies aqui estudadas, houve coincidência entre a localização da maioria das bandas CMA₃/DA⁺ com os sítios de rDNA 45S, exceto para o par cromossômico 4 da espécie *A. inodora*, que não apresentou sinal de rDNA45S mas apresentou banda positiva de CMA₃/DA⁺ (Figuras 8A, 8C, 9A e 9C).

Nos cromossomos telocêntricos da espécie *A. cunha* as bandas CMA₃/DA⁺ se mostraram pouco evidentes, porém estas são coincidentes com a localização dos sítios de hibridação de sequências de rDNA 45S, diferentemente do que ocorreu com alguns cromossomos telocêntricos das demais espécies. Assim apesar do que foi citado acima sobre o grande número de relatos onde as bandas CMA₃/DA⁺ coincidem com sítios de hibridação de sequências de rDNA 45S, devido estar associadas a regiões ricas em bases GC, DOUDRICK et al. (1995) relataram que nem todas as regiões ricas em bandas GC correspondem a sítios de rDNA de 45S. Sendo assim, para a espécie de *A. cunha*, são necessários mais estudos para se poder confirmar a presença destas regiões diferenciadas pelo fluorocromo CMA₃/DA.

A coloração com o fluorocromo DAPI/AMD, também revelou bandas positivas para as quatro espécies. A espécie *A. cunha* se diferencia das demais por ser a única espécie a não apresentar cromossomos com bandas DAPI/AMD positivas localizadas na região do centrômero. Contrariamente, as espécies *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina* possuem em comum, bandas DAPI/AMD positivas, localizadas nas regiões centroméricas dos pares cromossomos 1, 2, 7 e 8 de seus complementos (Figuras 8B, 9B, 9E, 11B, 12B, 12E, 14B, 15B e 15E). Apesar desta característica comum entre estas três espécies, *A. longistaminea* pode ser facilmente diferenciada de *A. inodora* e *A. psittacina* pelo fato de apresentar bandas DAPI/AMD localizadas exclusivamente na região do centrômero dos pares cromossômicos 1, 2 (Figuras 8B, 9B, 9E, 11B, 12B e 12E) ao passo que os pares correspondentes (1 e 2) nas espécies *A. inodora* e *A. psittacina* apresentam bandas adicionais à banda centromérica. As espécies *A. inodora* e *A. psittacina* se diferenciam, quanto ao bandamento DAPI, por apresentarem bandas de tamanho e intensidade diferente, principalmente aquelas localizadas nos braços longos dos telocêntricos (Figuras 8B, 9B, 9E, 14B, 15B e 15E). De modo geral, as bandas DAPI/AMD localizadas nos braços dos cromossomos das espécies *A. cunha* e *A. psittacina* são mais numerosas, (principalmente em *A. cunha*) e mais evidentes, quando comparadas com as bandas DAPI/AMD existentes nos braços cromossômicos do complemento das espécies *A. longistaminea* e *A. inodora*.

Estudos com o bandamento DAPI/AMD são escassos para o gênero. Os únicos trabalhos realizados com aplicação desta técnica foram o de KUIPERS et al. (1998) onde os autores afirmaram que a espécie *A. inodora* possuía bandas positivas para DAPI, porém não fizeram qualquer descrição da localização/padrão das bandas; e o de BAEZA et al. (2006) no qual, apesar de constarem figuras de cromossomos com bandas

DAPI visíveis, estas não foram propriamente utilizadas na diferenciação linear cromossômica ou ainda para caracterizar as espécies chilenas estudadas no trabalho.

Os dados aqui obtidos para o bandamento com o fluorocromo DAPI/AMD, embora restritos a quatro espécies de *Alstroemeria*, podem ser considerados como um fator de diferenciação entre as mesmas e poderão servir como marcadores cromossômicos comparativos para novos estudos citogenéticos com diferentes espécies e populações visando uma possível caracterização evolutiva no gênero, ou até mesmo como marcadores de espécies a serem usadas em programas de melhoramento genético.

Trabalhos envolvendo análises com a técnica de hibridação *in situ* para o gênero *Alstroemeria*, também são escassos na literatura e devido a isto, não existem dados de espécies do gênero suficientes para comparar com os resultados obtidos no presente estudo.

Os resultados advindos da aplicação da técnica de hibridação *in situ*, correspondentes às sequências de rDNA 45S e 5S, quando analisados isoladamente das demais técnicas utilizadas neste trabalho, permitiram a diferenciação das espécies *A. cunha* e *A. inodora*, não sendo efetivos porém para discriminar *A. longistaminea* de *A. psittacina*. A espécie *A. cunha* é diferenciada facilmente das demais por possuir maior número de sítios de rDNA 45S distribuídos entre os oito pares cromossômicos de seu conjunto cromossômico (Figuras 5C, 6C e 6E). As espécies *A. cunha* e *A. inodora* são as únicas a apresentarem sítios de rDNA 45S no par cromossômico 1. Em ambas as espécies estes sítios de rDNA 45S do par 1 coincidem em número e na localização, além de serem ambos os pares polimórficos em relação a um dos dois sinais (Figuras 16A e 16B). No entanto, estas duas espécies se diferenciam entre si não somente pelo fato da espécie *A. cunha* apresentar maior número de sítios de hibridação, relativos ao rDNA 45S, mas pelo fato dos pares 2, 4 e 8 de *A. inodora* não apresentarem sítios de hibridação 45S (Figuras 5C, 6C, 6E, 8C, 9C e 9E). Já as espécies *A. longistaminea* e *A. psittacina* não podem ser diferenciadas pelos sítios de hibridação de rDNA 45S, pois ambas possuem igual número de sinais com mesma localização nos quatro pares telocêntricos (Figuras 11C, 12C, 12E, 14C, 15C e 15E). Portanto, os sítios de hibridação *in situ*, com a sonda de rDNA 45S, isoladamente não podem ser usados na diferenciação destas duas últimas espécies.

Quanto aos números de sítios obtidos e relacionados às sequências de rDNA 45S, que correspondem às regiões responsáveis pela organização do nucléolo dentro dos complementos das quatro espécies, verifica-se que há um número bastante variável de

sítios entre elas (Figuras 5C, 8C, 11C e 14C), contrariando, de certa forma, o fato mais comum de que em cada complemento cromossômico diplóide, existe um par de cromossomos responsável pela organização nucleolar. Mesmo em condição diplóide em todas estas quatro espécies de *Alstroemeria* existem múltiplos sítios com sequências de rDNA 45S.

A variação no número de sítios de rDNA entre espécies de angiospermas tem sido atribuído a fatores tais como: ploidia, onde as regiões de rDNA ribossômicas adicionais podem ter origem em plantas poliplóides pela duplicação do complemento cromossômico; rearranjos cromossômicos; eventos de transposição e até mesmo ao silenciamento de genes (MOSCONE et al., 1999). Dentre as razões acima, a observação relativa à ploidia, não seria a explicação plausível para a origem dos sítios adicionais de rDNA 45S das espécies aqui estudadas, *A. cunha*, *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina*, visto todas elas serem comprovadamente diplóides. Existem evidências de que o rDNA 45S apresenta características de elemento transposição. Neste contexto pode-se mencionar o trabalho de KUIPERS et al. (1998) onde foi realizada hibridação *in situ* em espécies de *Alstroemeria*, usando-se como sonda a sequência repetitiva Tyl1 que é semelhante à retrotransposons. Essa sequência foi detectada em diversos pontos de hibridação em varias regiões dos diferentes cromossomos no complemento das espécies estudadas. Portanto uma explicação para os vários pontos de hibridação principalmente das sequências 45S nas espécies estudadas no presente trabalho seria a de que as sequências de rDNA 45S poderiam estar associadas à retrotransposons, apresentando assim varias cópias situadas nos cromossomos do complemento de cada espécie, ou estariam se comportando como tal.

Os resultados da hibridação *in situ* com sequências de rDNA 5S, revelaram menos sinais de hibridação e em menor número de cromossomos por complemento comparado as sequências de rDNA 45S. As espécies *A. cunha* e *A. inodora* apresentam três sítios de rDNA 5S em comum, ou seja, nos mesmos pares cromossômicos, 1, 2, e 3 e nas mesmas posições, sendo a única diferença entre os complementos, a presença de um quarto sinal de rDNA 5S adicional presente no par 5 da espécie *A. inodora*, não existente em *A. cunha* (Figuras 5D, 6D, 6E, 8D, 9D e 9E). As espécies *A. psittacina* e *A. longistaminea* caracterizam-se pela presença de apenas um único sinal de rDNA 5S localizados no centrômero dos pares cromossomos telocêntricos 3 e 4 respectivamente. Neste último caso, levando-se em conta o tamanho e a morfologia, destes cromossomos, verificou-se que ambos são muito semelhantes, e este fato impede que as duas espécies

sejam diferenciadas facilmente, baseando-se apenas nestes sinais de rDNA 5S (Figuras 11D, 12D, 12E, 14D, 15D e 15E).

Vários pares de cromossomos das diferentes espécies aqui analisadas apresentam mesmo número e mesma localização de sítios de hibridação de rDNA 45S e rDNA 5S. Este fato impede de se fazer uma associação de sinais com uma certeza absoluta. Este problema poderia ser solucionado efetuando-se uma hibridação dupla, ou seja, simultânea com as duas sondas de rDNA. A não realização deste tipo de hibridação impediu de se assegurar que os sítios dos dois tipos de rDNA estejam presentes exatamente na mesma região cromossômica (Figuras 6E, 9E, 12E e 15E).

Sítios de rDNA 5S presentes no centrômero dos dois telocêntricos 3 e 5 de *A. inodora*, embora considerados como não organizadores de nucléolo, apresentaram-se em posições que coincidem com a localização de bandas de CMA₃/DA e também com sítios de rDNA 45S que são mais comumente associados às regiões organizadoras do nucléolo (Figuras 8A, 8C, 8D, 9A, 9C, 9D e 9E). Este resultado pode também ser considerado inusitado, pois relatos na literatura, sobre a correspondência entre sítios de rDNA 5S e sinais fluorescentes com CMA não são comuns, tendo sido observado apenas em poucas espécies, como por exemplo no gênero *Hypochaeris* (CERBAH, 1998) e *Lilium* (SILJAK-YAKOVLEV et al., 2003).

A ocorrência de polimorfismo foi constatada para o tamanho dos sinais dos sítios de hibridação rDNA 45S e 5S e para a presença ou ausência dos mesmos em pares de homólogos das espécies *A. cunha*, *A. inodora* e *A. longistaminea* (Figura 16).

Nas espécies *A. cunha* e em *A. inodora* o polimorfismo foi observado para o par cromossômico 1 onde o sinal para 45S está presente em apenas um dos cromossomos dos pares. A espécie *A. cunha* apresenta ainda um sinal no par 4 o qual se apresenta de tamanho diferente entre os homólogos (Figura 16A e 16B). Ainda na espécie *A. inodora*, verifica-se que os sinais de rDNA 5S nos pares 3 e 5 se apresentam de tamanhos diferentes (Figura 16B). Em *A. longistaminea* foi verificado polimorfismo de tamanho de sinal nas regiões 45S no par 6 (Figura 16C). A espécie *A. psittacina* não apresentou polimorfismo para o tamanho dos sinais dos sítios de hibridação rDNA 45S e 5S e nem para a presença ou ausência dos mesmos.

Para as espécies chilenas *A. aurea* e *A. hookeri*, *A. ligtu*, *A. pelegrina* e *A. presliana* BAEZA et al. (2007) também detectaram polimorfismo para vários sítios de hibridação 5S e 45S semelhante ao tipo de polimorfismo encontrado no presente trabalho. Outras condições polimórficas para estas regiões de rDNA foram encontradas

também em *Brachyscome* (HOUBEN et al., 2000), *Allium* (MAGGINI & CARMONA, 1981; SCHUBERT & WOBUS, 1985), *Boronia* (SHAN et al., 2003) e *Hypochaeris* (RUAS et al., 2005).

Analisando-se o comprimento total da cromatina (CTC) das quatro espécies verificou-se que o mesmo apresentou grande variação, de $216,41 \pm 15,82 \mu\text{m}$ em *A. cunha* a $240,13 \pm 26,87 \mu\text{m}$ em *A. longistaminea* (Tabela 8), sendo o valor desta última espécie o maior, em relação às demais, pelo fato desta espécie possuir cromossomos maiores ($9,38$ a $33,38 \mu\text{m}$). As espécies, *A. cunha*, *A. inodora* e *A. psittacina* possuem valores de CTC próximos variando de $216,41 \pm 15,82 \mu\text{m}$ a $220,97 \pm 28,64 \mu\text{m}$. Para as espécies *A. inodora* e *A. psittacina* o comprimento total da cromatina, obtida nesse trabalho, respectivamente de $220,97 \pm 28,64 \mu\text{m}$ e $218,75 \pm 22,34 \mu\text{m}$, é maior do que o apresentado por BUITENDIJK & RAMANA (1996) para genomas haplóides das espécies brasileiras *A. inodora* ($78 \pm 1 \mu\text{m}$) e *A. psittacina* ($78 \pm 3 \mu\text{m}$). O valor aqui obtido para *A. psittacina* ($218,75 \pm 22,34 \mu\text{m}$) também é maior do que o registrado por SANSO & HUNZIKER (1998) que foi de $183,14 \pm 1,76 \mu\text{m}$.

Segundo KUIPERS et al. (1998) as espécies do gênero *Alstroemeria* possuem um genoma extenso, fato confirmado por BUITENDIJK et al. (1997) baseando-se no valor 2C de DNA que variou de 36.5 a 78.9 pg (17600-38000Mb). Com base nestas afirmações, acredita-se que as espécies de *Alstroemeria* apresentam grande quantidade de DNA repetitivo, sendo que as sequências repetitivas podem ser resultados de transposons que aumentam o DNA através da inserção de cópias de sequências existentes no DNA de diferentes regiões do genoma.

O índice de assimetria (TF%) para as quatro espécies estudadas (Tabela 8) apresentou pouca variação, de 22,40 a 22,66%, valores estes menores que 50%, o que comprova que os cariótipos das espécies estudadas são assimétricos, pois cariótipos assimétricos apresentam valores de TF% menores que 50%, enquanto cariótipos simétricos têm valores de TF% maiores e próximos a 50%; semelhante aos valores encontrados para espécies de *Sapindaceae* (LOMBELLO & FORNI-MARTINS, 1998), *Fabaceae* (LOMBELLO & FORNI-MARTINS, 1998), *Phaseolus* (MERCADO-RUARO & DELGADO-SALINS, 1998).

Segundo STEBBINS (1971) cariótipos simétricos são compostos por cromossomos com tamanhos aproximadamente iguais e com posição centromérica mediana ou submediana. Já nos cariótipos assimétricos, o complemento cromossômico é constituído de cromossomos com centrômeros em posição mediana a subterminal ou

terminal e com grandes diferenças nos comprimentos cromossômicos, formando um cariótipo heterogêneo. De acordo com esta definição, os complementos cromossômicos das espécies de *Alstroemeria* estudadas, também podem ser classificados como cariótipos assimétricos.

Os coeficientes de variação (CV%) dão uma idéia da precisão do experimento. Os CVs% obtidos para as médias dos comprimentos dos pares cromossômicos das espécies *A. cunha*, *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina* variaram entre 10% a 20% (Tabelas 4, 5, 6 e 7) estando estes dentro dos valores aceitáveis por GOMES (2000), o qual conceitua que experimentos com coeficientes de variação inferior a 10% podem ser considerados os mais precisos. No entanto, este autor considera que valores de CV% entre 10 % a 20% estão dentro de uma faixa de precisão aceitável. Dentre as quatro espécies estudadas; *A. cunha*, *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina*, a espécie *A. longistaminea* apresentou os valores de CV% mais precisos pela variação inferior a 10% (Tabela 6), o que também pode ser observado para as espécies *A. cunha* e *A. psittacina* que apresentaram CV% inferior a 10% para a maioria dos pares cromossômicos (Tabelas 4 e 7).

Os resultados obtidos com a aplicação da técnica de bandamento com prata, correspondem, em localização, com algumas sequências de rDNA 45S. Sendo essas regiões responsáveis pela organização nucleolar, o bandamento com prata revelou os sítios de rDNA que estiveram ativos na última divisão celular. Apesar das espécies apresentarem mais de um par de sítios responsáveis pela organização do nucléolo, nem todos os sítios de rDNA 45S mostraram-se ativos.

Para as espécies *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina* a técnica de bandamento com prata revelou bandas-NOR localizadas na região terminal de alguns cromossomos telocêntricos (Figuras 18A, 18B e 18C), sendo que para a espécie *A. inodora*, as regiões NOR coincidem em número com os sítios de rDNA 45S.

Embora tenham sido realizadas diversas aplicações desta técnica nos cromossomos da espécie *A. cunha*, não foi possível determinar o número e as localizações exatas das bandas correspondentes à impregnação com a prata, mas pôde ser constatado que a espécie *A. cunha* apresenta múltiplos sítios ativos responsáveis pela organização do nucléolo o que coincide com a detecção dos múltiplos sítios de rDNA 45S distribuídos no seu complemento os quais se localizam em sítios cromossômicos não usuais como as regiões centroméricas e terminais (Figuras 17A e 17B).

Assim como CERBAH et al. (1998) que usou as técnicas de bandamento DAPI, CMA e hibridação *in situ* (rDNA 5S e 18S-5.8S-28S) para determinar a relação evolutiva para o gênero *Hypochaeris* (Asteraceae), e MARCON et al. (2005) que usou as técnicas de bandamento com os fluorocromos CMA com distamicina, DAPI, hibridação *in situ* (rDNA 45S) e bandamento NOR, para esclarecer a evolução do gênero *Selaginella* (Pteridophyta), entre outros exemplos, a utilização destas técnicas em um número maior de espécies e até mesmo em populações de *Alstroemeria* seria uma das condições para esclarecer não só a filogenia evolutiva do gênero, como também os peculiares eventos relacionados ao mapeamento das sequências de rDNA nos complementos cromossômicos das espécies estudadas.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo conclui-se:

- a) As quatro espécies *A. cunha*, *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina* do gênero *Alstroemeria* não podem ser diferenciadas através de cariótipos estabelecidos a partir da morfologia e medidas cromossômicas, pois, apesar das espécies possuírem um cariótipo assimétrico a fórmula cariotípica é exatamente a mesma para todas elas.
- b) As técnicas de bandamento com os fluorocromos CMA₃, DAPI, FISH de rDNAs de sequências 45S e 5S e o bandamento com prata, possibilitaram um mapeamento detalhado dos cromossomos de todas as espécies analisadas permitindo a distinção dos diferentes complementos.
- c) A partir do mapeamento com as técnicas de bandamento com os fluorocromos CMA₃, DAPI, FISH de rDNAs de sequências 45S e 5S e o bandamento com prata é possível a caracterização e o reconhecimento das diferentes espécies.
- d) Os múltiplos sinais de FISH para as sequências de rDNA 45S para cada um dos complementos cromossômicos, comprovadamente diplóides, e múltiplos ao longo de um mesmo cromossomo, posicionados em regiões cromossômicas não usuais, como o centrômero, indicam que provavelmente esteja ocorrendo um processo semelhante à ação de transposons, ação esta que promove a multiplicação destas sequências dentro dos conjuntos cromossômicos.
- e) A fórmula cariotípica comum apresentada pelas quatro espécies estudadas *A. cunha*, *A. inodora*, *A. longistaminea* e *A. psittacina* indica que provavelmente a evolução das espécies não foi acompanhada por grandes mudanças cariotípicas.
- f) As diferenças de número e posições de sinais de FISH para a sequência de rDNA 45S nos complementos cromossômicos das quatro espécies, principalmente os múltiplos sinais da espécie *A. cunha*, indicam a possibilidade da evolução nestas espécies ter ocorrido como resultado de pequenos rearranjos cromossômicos.
- g) A partir da aplicação destas técnicas de mapeamento em um número maior de espécies e populações brasileiras do gênero, será possível estabelecer relações filogenéticas e possivelmente delinear um panorama evolutivo para este grupo.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, S.P.; LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D.; CHASE, M.W.; LEITCH, A.R. Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). **American Journal of Botany**. v.87, n.11, p.1578-1583, 2000.
- AHMED, L.; BEGUM, R.; NOOR, S.S.; ZAMAN, M.A.; ALAM, S.S. Reversible fluorescent chromosome banding in three *Crinum* spp. (Amaryllidaceae). **Cytologia**, v. 69, n.1, p. 69-74, 2004.
- ANDRADE, D.A.V.; ORTOLANI, F.A.; MORO, J.R.; VITTI MORO, F. Aspectos morfológicos de frutos e sementes e caracterização citogenética de *Crotalaria lanceolata* E. Mey. (Papilionoideae - Fabaceae). **Acta Botanica Brasilica**. v.22, n.3, p.621-625, 2008.
- APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v.141, p.399-436, 2003.
- ASSIS, M.C. *Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae) do Brasil. 2001. Tese de Dissertação (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.
- ASSIS, M.C. Novas espécies de *Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae) de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.2, p.177-182, 2002.
- ASSIS, M.C. Duas novas espécies de *Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae) para o Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n.2, p.179-182, 2003.
- ASSIS, M.C. New Species of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) from the Brazilian Savanas. **Novon**. v.14, n.1, p.17-19, 2004.
- ASSIS, M.C.; SILVA, R. M. Typifications and new name in *Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae). **Taxon**, v.53, n.1, p.182-184, 2004.

ASSIS, M.C. A new species of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) from Pará, Brasil. **Botanical Garden Press**, v.58, n.3, p.267-269, 2006.

ASSIS, M.C. New species of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) from Brazil. **Novon**, v.19, n.2, (no prelo), 2009.

BAEZA, C.; SCHRADER, O. Comparative karyotype analysis in *Haplopappus* Cass. and *Grindelia* Willd. (Asteraceae) by double FISH with rRNA specific genes. **Plant Systematics and Evolution**. v.251, p.161-172, 2005.

BAEZA, C.M.; SCHRADER, O.; RUIZ, E.; NEGRITTO, M. Análisis comparativo del cariotipo en poblaciones de *Alstroemeria ligtu* subsp. *ligtu* y *A. ligtu* subsp. *Simsii* (Alstroemeriaceae) de Chile. **Darwiniana**. v.44, n.2, p.313-318, 2006.

BAEZA, C.; SCHRADER, O.; BUDAHN, H. Characterization of geographically isolated accessions in five *Alstroemeria* L. species (Chile) using FISH of tandem repeated DNA sequences and RAPD analysis. **Plant Systematics and Evolution**. v.269, p.1-14, 2007.

BAYER, E. Die Gattung *Alstroemeria* in Chile. Mittheilungen der Botanischen Staatssammlung Munchen v.24, n.1, p.1-362. 1987.

BUITENDIJK, J.H.; PINSONNEAUX, N.; VAN DONK, A.C.; RAMANNA, M.S.; VAN LARNMEREN, A.A.M. Embryo rescue by half-ovule culture for the production of interespecific hybrids in *Alstroemeria*. **Scientia Horticulturae**. v.64, p.65-75, 1995.

BUITENDIJK, J.H.; RAMANNA, M.S. Giemsa C-banded karyotypes of eight species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. **Annals of Botany**, v.78, p.449-457, 1996.

BUITENDIJK, J.H.; BOON, E.J.; RAMANNA, M.S. Nuclear DNA content in twelve species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. **Annals of Botany**, v.79, p.343-353, 1997.

BUITENDIJK, J.H.; PETERS, A.; QUENÉ, R.J.; RAMANA, M.S. Genome size variation and C-band polymorphism in *Alstroemeria aurea*, *A. ligtu* and *A. magnifica* (Alstroemeriaceae). **Plant Systematics and Evolution**. v.212, p.87-106, 1998.

CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**. v.136, p.159-168, 2002.

CEASA – Central de abastecimento de Campinas S.A.
<http://www.ceasacampinas.com.br/index.htm> (07 fevereiro 2009).

CERBAH, M.; COULAUD, J.; SILJAK-YAKOVLEV, S. rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). **Heredity**. v.89, n.4, p.312-318, 1998.

CHUNG, M.C.; LEE, Y.I.; CHENG, Y.Y.; CHOU, Y.J.; LU, C.F. Chromosomal polymorphism of ribosomal genes in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**. v.116, p.745-753, 2008.

DE JEU, M.J.; JACOBSON, E. Early postfertilization ovule culture in *Alstroemeria* L. and barriers to interespecific hybridization. **Euphytica**. v.86, p.15-23, 1995.

DOUDRICK, R.L.; HESLOP-HARRISON, J.S.; NELSON, C.D.; SCHMIDT, T.; NANCE, W.L.; SCHWARZACHER, T. Karyotype of slash pine (*Pinus elliottii* var. *elliotti*) using patterns of fluorescence *in situ* hybridization and fluorochrome banding. **The Journal of Heredity**, v.86, p.289-296, 1995.

DUMONTEIR, B.C.J. Alstroemeriaceae. Analyse des familles des plantes. v.4, p.160. 1829.

FELIX, W.J.P.; DUTILH, J.H.A.; MELO, N.F.; FERNANDES, A.A.; FELIX, L.P. Inbterpopulational chromosome number variation in *Zephyranthes sylvatica* Baker (Amaryllidaceae: Hippeastreae) from Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n.2, p.371-375, 2008.

FERNÁNDEZ-ROMERO, M.D.; TORRES, A.M.; MILLÁN, T.; CUBERO, J.I. CABRERA, A. Physical mapping of ribosomal DNA on several species of the subgenus *Rosa*. **Theoretical and Applied Genetics**. v.103, p.835–838, 2001.

FORNI-MARTINS, E.R.; GUERRA, M. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. Species. **Caryologia**. v.52, p.97-103, 1999.

FREDERICO, A.P.; RUAS, P.M.; MARIN-MORALES, M.A.; RUAS, C.F.; NAKAJIMA, J.N. Chromosome studies in some *Stevia* Cav. (Compositae) species from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**. v. 19, n.4, p.605-609, 1996.

GALL, J.G.; PARDUE, M.L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Genetics**. v.63, p.378-383. 1969.

GARRIDO-RAMOS, M.A.; JAMILENA, M.; LOZANCO, R. REJÓN, C.R.; REJÓN, M.R. A cytogenetical and molecular analysis of the ribosomal cistrons of *Allium sphaerocephalon* L. (Liliaceae). **Heredity**. v.69, p.43-49, 1992.

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

GOLDBLATT, P. Index to plant chromosome numbers 1975-1978. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. v.5, p.553, 1981.

GOLDBLATT, P. Index to plant chromosome numbers 1979-81. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. v.8, p.427, 1984.

GOLDBLATT, P. Index to plant chromosome numbers 1982-83. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. v.13, p.224, 1985.

GOLDBLATT, P. Index to plant chromosome numbers 1984-85. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. v.23, p. 264, 1988.

GOMES, P. F. Curso de estatística experimental. Livraria Nobel S.A. São Paulo, SP, p. 477, 2000.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S.E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, v. 53, p. 37-50, 1975.

GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/ DAPI staining. **Heredity**. v.71, P234-241, 1993.

GU, Z.; XIAO, H. Physical mapping of the 18S-26S rDNA by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in *Camellia reticulata* polyploidy complex (Theaceae). **Plant Science**. v.164, p.279-285, 2003.

HANG, A.; TSUCHIYA, T. Chromosome studies in the genus *Alstroemeria* II. Chromosome constitutions of eleven additional cultivars. **Plant Breeding**. v.100, p.273-279, 1988.

HIZUME, M.; SHIBATA, F.; MARUYAMA, Y.; KONDO, T. Cloning of DNA sequences localized on proximal fluorescent chromosome bands by microdissection in *Pinus densiflora* Sieb. & Zucc. **Chromosoma**. v.110, p.345-351, 2001.

HOUBEN, A.; WANNER, G.; HANSON, L.; VERLIN, D.; LEACH, C.; TIMMES, J. Cloning and characterization of polymorphic heterochromatic segments of *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosoma**. v.109, p.206–213, 2000.

HOWELL, W.M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015, 1980.

HUNZIKER, J.H.; XIFREDA, C.C. Chromosome studies in *Bomarea* and *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). **Darwiniana**. v.30, n.1-4, p.179-183, 1990.

HUZIWARA, Y. Karyotype analysis in some genera of compositae VII. Further studies on the chromosome of *Aster*. **American Journal of Botany**. v, 49, p.116-119, 1962.

IBRAFLOR - Instituto brasileiro de floricultura. Dados disponíveis no site: <http://www.ibraflor.com.br> (10 Janeiro 2009).

ISHIKAWA, T.; TAKAYAMA, T.; ISHIZAKA, H.; ISHIKAWA, K.; MII, M. Production of interespecific hybrids between *Alstroemeria ligtu* L. hybrid and *A. pelegrina* L. var. *rosea* by ovule culture. **Breeding Science**. v.47, p.15-20, 1997.

ISHIKAWA, T.; TAKAYAMA, T.; ISHIZAKA, H. Amphidiploids between *Alstroemeria ligtu* L. hybrid and *A. pelegrina* L. var. *rosea* induced through colchicine treatment and their reproductive characteristics. **Scientia Horticulturae**. v.80, p.235-246, 1999.

ISHIKAWA, T.; ISHIZAKA, H. Chromosome association and Giemsa C-banding of meiotic chromosomes in interspecific hybrid of *Alstroemeria ligtu* L. hybrid and *A. pelegrina* L. var. *rosea*, its amphidiploid, and sesquidiploid between the amphidiploid and the parents. **Breeding Science**, v.52, p.27-33, 2002.

JUNQUEIRA, A.H; PEETZ, M.S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v.14, n.1, p.37 – 52. 2008.

KAMSTRA, S.A.; KUIPERS, A.G.J.; DE JEU, M.J.; RAMANA, M.S.; JACOBSEN, E. The extent and position of homoelogenous recombination in a distant hybrid of *Alstroemeria*: a molecular cytogenetic assessment of first generation backcross progenies. **Chromosoma**. v.108, p.52-63, 1999.

KOEHLER, S.; CABRAL J.S.; WHITTEN, W. M.; WILLIAMS, N.H.; SINGER, R.B.; NEUBIG, K.M.; GUERRA, M.; SOUZA, A.P.; AMARAL, M.C.E. Molecular Phylogeny of the Neotropical Genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): Species Delimitation and Insights into Chromosome Evolution. **Annals of Botany**. v.102, p.491–507, 2008.

KUIPERS, A.G.J.; VAN OS, D.P.M.; JONG, J.H.; RAMANNA, M.S. Molecular cytogenetics of *Alstroemeria*: identification of parental genomes in interspecific hybrids and characterization of repetitive DNA families in constitutive heterochromatin. **Chromosome Research**, v.5, p. 31-39, 1997.

KUIPERS, A.G.J.; HESLOP-HARRISON, J.S.; JACOBSEN, E. Characterization and physical localization of Ty1-copia-like retrotransposons in four *Alstroemeria* species. **Genome**. v.41, p357-367, 1998.

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

LEITCH, A.R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I.J. *In situ* hybridization: a practical guide. **Bios Scientific Publishers Limited**, 118 p, 1994.

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

LIM, K.Y.; MATYASEK, R.; KOVARIK, A.; LEITCH, A. Parental origin and genome evolution in the allopolyploid *Iris versicolor*. **Annals of Botany**. v.100, p.219-224, 2007.

LIN, H.S.; TOORN, C.V.D.; RAEMAKERS, K.J.J.M.; VISSER, R.G.F.; DE JEU, M.J.; JACOBSEN, E. genetic transformation of *Alstroemeria* using particle bombardment. **Molecular Breeding**. v.6, p.369-377, 2000.

LOMBELLO, R.A.; FORNI-MARTINS, E.R. Chromosomal studies and evolution in Sapinaceae. **Caryologia**. v.51, n.1, p.81-93, 1998.

LOMBELLO, R.A.; FORNI-MARTINS, E.R. Cytological studies in climbers of a Brazilian forest reserve. **Cytologia**. v.63, p.415-420, 1998.

LU, C.; BRIDGEN, M.P. Chromosome doubling and fertility study of *Alstroemeria aurea* X *A. caryophyllaea*. **Euphytica**. v.94, p.75-81, 1997.

MAGGINI, F.; CARMONA, M.J. Sequence heterogeneity of the ribosomal DNA in *Allium cepa* (Liliaceae). **Protoplasma**. v.108, p.163-171, 1981.

MARASEK, A.; HASTEROK, R.; WIEJACHA, K.; ORLIKOWSKA, T. Determination by GISH and FISH of hybrid status in *Lilium*. **Hereditas**. v.140, p.1-7, 2004.

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

MATHEY, R. L. L'évolution de la formule chromosomiale chez les vertébrés. **Experientia**. v.1, p.50, 1945.

McCLINTOCK, B. The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. **Zellforsch. Mik. Anat.** v.21, p.294-328, 1934.

MEEROW, A.W.; TOMBOLATO, A.F.C.; MEYER, F. Two new species of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) from Brazil. **Brittonia**. v.51, n.4, p.439-444, 1999.

MELO, N.F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**. v.92, p.309-316, 2003.

MERCADO-RUARO, P.; DELGADO-SALINS, A. Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). **American Journal of Botany**. v.58, n.1, p.1-9, 1998.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN, <http://www.mobot.org>, (20 Novembro 2008).

MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rDNA gene sites. **Genetics and Molecular Biology**. v.30, n.1, p.65-72, 2007.

MOSCONE, E.A.; KLEIN, F.; LAMBROU, M. FUCHS, J.; SCHWEIZER, D. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). **Genome**. v.42, p.1224-1233, 1999.

MUÑOZ-SCHICK, M. Tres nuevas monocotiledoneas descubiertas en Chile: *Alstroemeria mollensis* M. Muñoz et a. brinck (Alstroemeriaceae), *Miersia chilensis* var. *bicolor* M. Muñoz (Gilliesiaceae) y *calydorea chilensis* M. Muñoz (Iridaceae). **Gayana Botanica**, v.60, n.2, p.101-106, 2003.

MURRAY, B.G.; BENNETT, M.D.; HAMMETT, K.R.W. Secondary constrictions and NORs of *Lathyrus* investigated by silver staining and *in situ* hybridization. **Heredity**. v.68, p.473-478, 1992.

ORTOLANI, F.A.; MATAQUEIRO, M.F.; MORO, J.R. Caracterização citogenética em *Schlumbergera truncata* (Haworth) Moran e *Schlumbergera* × *buckleyi* (T. Moore) Tjaden (Cactaceae). **Acta Botanica Brasilica**. v.21, n.2, p.361-367, 2007.

PENDAS, A.M.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁZQUEZ E. Ribosomal genes are interspersed throughout a heterochromatic arm in Atlantic salmon. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 63, p.128-130, 1993.

PINTO-MAGLIO, C.A.F.; REIS, F.C.; TOMBOLATO, A.F.C. Estudos cromossômicos no gênero *Alstroemeria*. In: Resumo do Congresso Brasileiro de Floricultura, Campinas, p.11. 1995.

PINTO-MAGLIO, C.A.F.; CUÉLLAR, T.; BARBOSA, R.L. Aplicação de técnicas de citogenética molecular na caracterização dos cromossomos da espécie *Coffea arabica* L. I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, p. 444-446, 2000.

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

REEVES, A.; TEAR, J. MicroMeasure for Windows, version 3.3. Free program distributed by the authors over the Internet from <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>. 2000. (20 de Setembro de 2008)

REEVES, A. MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. **Genome**. v.44, p.439-443. 2001.

RUAS, C.; VANZELA, A.; SANTOS, M.; FREGONEZI, J.; RUAS, P.; MATZENBACHER, N.; AGUIAR-PEREIRA, M. Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochoeris* species (Asteraceae) from Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v.28, p.129-139, 2005.

- RUDALL, P.; STOBART, K.L.; HONG, W.P.; CONRAN, J.G.; FURNESS, C.A.; KITE, G.C.; CHASE, M.W. Consider the *Lilies*: systematics of *Liliales*. P. 347-357. 2000.
- SANSO, A.M. El género *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) em Argentina. **Darwiniana**, v. 34, p.349-382, 1996.
- SANSO, A.M.; HUNZIKER, J.H. Karyological studies in *Alstroemeria* and *Bomarea* (Alstroemeriaceae). **Hereditas**. v.129, p.67-74, 1998.
- SANSO, A.M.; XIFREDA, C.C. Generic delimitation between *Alstroemeria* and *Bomarea* (Alstroemeriaceae). **Annals of Botany**, v.88, n.6, p.1057-1069, 2001.
- SANSO, A.M. Chromosome studies in Andean taxa of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.138, p.451-459, 2002.
- SCHUBERT, I.; WOBUS, U. In hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. **Chromosoma**. v.92, p.143-148, 1985.
- SCHWEIZER, D. DAPI fluorescent of plant chromosome prestained with actinomycin D. **Experimental Cell Research**, v.102, n.2, p.408-413, 1976.
- SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, v.58, n.4, p.307-324, 1976.
- SHAN, F.; YAN, G.; PLUMMER, J.A. Cytoevolution of *Boronia* genomes revealed by fluorescent *in situ* hybridization with rDNA probes. **Genome**. v.46, p.507-513, 2003.
- SILJAK-YAKOVLEV, S.; PECCENINI, S.; MURATOVIC, E.; ZOLDOS, V.; ROBIN, O.; VALLÈS, J. Chromosomal differentiation and genome size in three European mountain *Lilium* species. **Plant Systematic and Evolution**, v.236, p.165-173, 2003.
- SILVEIRA, F.T.; ORTOLANI, F.A.; MATAQUEIRO, M.F.; MORO, J.R. Caracterização citogenética em duas espécies do gênero *Myrciaria*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.6, n.2, p.327-333, 2006.

SIROKÝ, J.; LYSÁK, M.A.; DOLEZEL, J.; KEJNOVSKÝ, E.; VYSKOT, B. Heterogeneity of rDNA distribution and genome size *Silene* spp. **Chromosome Research**. v.9, p. 387-393, 2001.

STEBBINS, G.L. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, London. 216p, 1971.

TAKETA, S.; ANDO, H.; TAKEDA, K.; ICHII, M.; BOTHMER, R.V. Ancestry of American polyploidy *Hordeum* species with the I genome inferred from 5S and 18S-25S rDNA. **Annals of Botany**. v.96, p.23-33, 2005.

TAKHTAJAN, A. Flowering plants: Origin and dispersal. Oliver and Boyd Ltda. Edinburgh. p. 309, 1969.

TSUCHIYA, T.; HANG, A.; HEALY, W. E.; HUGHES, H. Chromosome studies in the genus *Alstroemeria*. I. Chromosome numbers in 10 cultivars. **Botanical Gazette**. v. 148, n. 3, p. 519-524, 1987.

TSUCHIYA, T.; HANG, A. Chromosome studies in genus *Alstroemeria*. **Acta Horticulturae**. v.205, p.281-287, 1987.

TSUCHIYA, T.; HANG, A. Cytogenetics in the genus *Alstroemeria*. **Herbertia**. v.45, p.163-170. 1989.

VENCATO, A.; CORRÊA, S.; REETZ, E.; ROSA, G.R. da; RIGON, L.; BELING, R.R. Anuário Brasileiro de Flores 2006. Santa Cruz do Sul, editora Gazeta Santa Cruz. 112p, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)