

Pedro Marcos de Almeida

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BANDEAMENTO COM
LARANJA DE ACRIDINA DOS CROMOSSOMOS DE PIMENTÃO
(*Capsicum annuum* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2003**

**Dedico o presente trabalho
a Deus,
aos meus pais e irmãos,
a minha namorada Fran e ao meu filho Lucas.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pelo incentivo e pela oportunidade de realização do Curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Aos meus pais e aos meus irmãos, pelo carinho e incentivo, que foram fundamentais para o término deste trabalho.

À Francielle Aline Martins, pela dedicação, pela paciência e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Professor Carlos Roberto de Carvalho, pela orientação, dedicação e amizade no decorrer do Curso.

Aos meus conselheiros Professores Luiz Sérgio Saraiva e Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pela amizade e pelo fornecimento das sementes para o desenvolvimento desta tese.

Ao Doutor Luiz Arthur, pela atenção e pelo fornecimento de sementes para a continuação deste trabalho.

À Professora Sílvia das Graças Pompolo, pelas sugestões e pela atenção durante o Curso.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética Vegetal Maria Andréia, Wellington, Tatiana, Isane, Bárbara e Bruno, pelo auxílio técnico, pela amizade e pela diversão no ambiente de trabalho.

Ao José Francisco (Zé Chico), pelo auxílio profissional e pela amizade.

A todos os meus professores, pela contribuição ao meu crescimento profissional.

BIOGRAFIA

PEDRO MARCOS DE ALMEIDA, filho de Celso Guimarães de Almeida e Maria das Graças de Paiva Almeida, nasceu em Santos Dumont, Minas Gerais, no dia 26 de junho de 1976.

Em 1997, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, graduando-se em junho de 2001.

Durante o período de graduação, foi monitor da disciplina Biologia Celular e bolsista do PIBIC/FAPEMIG no Departamento de Biologia Geral, onde desenvolveu atividades de pesquisa em Citogenética Vegetal.

Em agosto de 2001, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Genética e Melhoramento da UFV, submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2003.

CONTEÚDO

| | Página |
|--|--------|
| RESUMO..... | vii |
| ABSTRACT..... | ix |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1. Aspectos gerais | 3 |
| 2.2. Aspectos citogenéticos e moleculares..... | 6 |
| 2.3. Bandeamento com laranja de acridina..... | 15 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | |
| 3.1. Material..... | 18 |
| 3.2. Pré-tratamento e fixação das raízes..... | 18 |
| 3.3. Preparação da lâmina..... | 19 |
| 3.5. Técnica de coloração uniforme com Giemsa..... | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6. Bandeamento com laranja de acridina..... | 20 |
| 3.7. Análise de imagem..... | 20 |
| 4. RESULTADOS | |
| 4.1. Efeito dos pré-tratamentos e da coloração convencional Giemsa em <i>Capsicum annuum</i> | 21 |
| 4.2. Coloração convencional Giemsa em <i>Capsicum annuum</i> | 22 |
| 4.3. Bandeamento com laranja de acridina (LA)..... | 27 |
| 5. DISCUSSÃO | |
| 5.1. Efeito dos pré-tratamentos e da coloração convencional Giemsa em <i>Capsicum annuum</i> | 37 |
| 5.2. Bandeamento com laranja de acridina (LA)..... | 40 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 43 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 45 |

RESUMO

ALMEIDA, Pedro Marcos de, M. S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2003. **Caracterização morfológica e bandeamento com laranja de acridina dos cromossomos de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Conselheiros: Luiz Sérgio Saraiva e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Capsicum é um dos membros economicamente mais importantes de Solanaceae. Das 25 espécies reconhecidas, cinco são extensivamente cultivadas, sendo *C. annuum* L. a mais importante comercialmente, sobretudo pelo seu valor agrônômico como especiaria. Apesar da sua importância econômica, a caracterização citogenética em *C. annuum* é conflitante na literatura quanto à posição do centrômero, do satélite e da região organizadora do nucléolo (NOR). Essas regiões têm sido reconhecidas citogeneticamente pela presença de constrições secundárias, por métodos convencionais de preparação e coloração; e pelas marcações produzidas pelo bandeamento AgNOR. O presente estudo teve como objetivos desenvolver metodologias para sincronização do ciclo celular de regiões meristemáticas, aplicar técnicas de dissociação celular e secagem ao ar, identificar prováveis pontos de fusão cromossômica e utilizar a metodologia RFA (bandeamento reverso com laranja de acridina) para verificar o seu potencial na identificação de segmentos associados à NOR. As preparações citogenéticas de meristemas radiculares de *C. annuum* 'Fortuna Super', 'Criollo de Morelos', 'Athenas' e milho foram realizadas pelas técnicas de maceração enzimática, dissociação celular e secagem ao ar. O milho foi utilizado como padrão de NOR, conhecida no cromossomo de número 6. As amostras foram submetidas à coloração convencional Giemsa, enquanto outras, à técnica de RFA. As metáfases foram observadas com objetiva e capturadas diretamente por uma

videocâmara acoplada ao microscópio e a um computador. Determinou-se que a concentração e o tempo de exposição apropriados em *C. annuum* foram de 2 mM de hidroxuréia por 18 h, enquanto o tratamento com orizalina a 5 µM, durante 3 e 4 h, permitiu o acúmulo de células sincronizadas em prometáfases e metáfases. Em milho, os mesmos pré-tratamentos permitiram o acúmulo de células em prometáfases. Nos três acessos de *C. annuum*, foi evidenciado um cariótipo-padrão diplóide de $2n=24$ cromossomos, sendo 10 pares metacêntricos (1-10), um submetacêntrico com satélite (11) e um acrocêntrico (12). A morfologia desses cromossomos permitiu a diferenciação das constrições primárias e secundárias e a detecção de possíveis pontos de fusão entre cromossomos de *C. annuum* 'Fortuna Super'. O bandeamento com laranja de acridina, nos três acessos de *C. annuum*, revelou uma banda fluorescente verde-amarelada, subterminal no cromossomo 5, e duas bandas mais fortemente marcadas, flanqueando a constrição secundária, no braço curto do cromossomo 11. Já no milho utilizado como padrão de NOR conhecida no cromossomo de número 6 esse bandeamento resultou em bandas flanqueando a constrição secundária desse cromossomo, mostrando a especificidade da técnica nessa região. A técnica RFA aplicada em plantas teve a sua nomenclatura substituída pela Hsc-FA (bandeamento fluorescente da heterocromatina associada à constrição secundária com uso de laranja de acridina).

ABSTRACT

ALMEIDA, Pedro Marcos, M. S., Universidade Federal de Viçosa, August 2003.
Morphologic characterization and banding with acridine orange of pepper chromosomes (*Capsicum annuum* L.). Adviser: Carlos Roberto de Carvalho.
Committee members: Luiz Sérgio Saraiva and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Capsicum is a Solanaceae member with higher economic importance. From the 25 species that are known, 5 are extensively cultivated, being *C. annuum* L. the most important commercially, mainly by its agronomic value as spice. Despite its economical importance, the cytogenetic characterization in *C. annuum*, is still unclear in the literature in relation to centromeric, satellite and nucleolar organized region (NOR) positions. In *C. annuum*, these regions have been recognized cytogenetically by the presence of secondary constrictions, staining conventional methods and banding AgNOR. In this study, methods of cell cycle synchronization in meristematic regions were developed. It was also used the cell dissociation technique and air dryness and the RFA method (R-bands by fluorescence using acridine orange). Pepper and maize, used as standard, root tips were washed and placed in freshly prepared enzyme solution. Slides were prepared by meristematic cellular dissociation, air-dried and placed on a hot-plate (50 °C). Some samples were immediately stained with a Giemsa solution, washed twice in distilled water and air-dried. Others samples were stained by RFA technique of the. Figures of chromosomes were captured with a CCD video camera on an OlympusTM BX 60 fluorescence microscope with a WB filter. The optimal concentration and time of exposure was 2 mM hydroxyurea for during 18 hours. The treatment with 5 µM oryzalina during 3 and 4 hours, resulted in accumulation of synchronized cells in

prometaphase and metaphase. In maize, the same pre-treatment resulted in accumulation in prometaphase cells. In *C. annuum* 'Fortuna Super', 'Athenas' and 'Criollo de Morelos', was found $2n = 24$ chromosomes, being 10 pairs metacentrics (1-10), one pair submetacentric with satellite (11) and one pair acrocentric (12). The chromosome morphology resulted in the differentiation of primary and secondary constrictions and showed probable chromosome fusion points in *C. annuum*, 'Fortuna Super'. Pepper chromosomes showed one weak band emitting yellowish green fluorescence in the secondary constriction of the short arm of chromosome 5 and two more intense bands flanking the secondary constriction in chromosome 11. In the maize line 2-NOR used as a standard, the chromosome 6 showed similar results in the secondary constriction corresponding to the NOR position. In this study, RFA band nomenclature was replaced by Hsc-FA bands (secondary constriction heterochromatin-associated bands by fluorescence using acridine orange).

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* (Solanaceae) é constituído de espécies cultivadas e silvestres originadas das Américas do Sul e Central (PARAN *et al.*, 1998). As espécies cultivadas incluem *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens* (PICKERSGILL, 1991; BELLETTI *et al.*, 1998). *C. annuum* destaca-se como a mais importante comercialmente (REIFSCHNEIDER, 2000).

Estudos citogenéticos em *Capsicum* têm demonstrado que todas as espécies são diplóides, com $2n=24$ cromossomos. Em *C. annuum*, apesar da similaridade quanto à morfologia dos cromossomos, há conflitos na literatura quanto à posição do centrômero, do satélite e da região organizadora do nucléolo (NOR) (PICKERSGILL, 1971; BERTÃO, 1993; LANTERI e PICKERSGILL, 1993; MOSCONE, 1993; MOSCONE *et al.*, 1996; AARESTRUP, 2001).

De acordo com a posição do centrômero, a maioria dos cromossomos de *C. annuum* foi classificada como metacêntrica (1-11). Entretanto, variações quanto à classificação, incluindo pares submetacêntrico, subtelocêntrico ou acrocêntrico, dos cromossomos 10, 11 e 12 foram citadas na literatura (TANKSLEY, 1984; PICKERSGILL, 1991; MOSCONE, 1993; AARESTRUP, 2001).

Nesta espécie, relatos da posição de satélites vêm sendo conflitantes em relação à caracterização cromossômica. O cromossomo 12 tem sido classificado como subtelocêntrico (BERTÃO, 1993; MOSCONE, 1993; MOSCONE *et al.*, 1996) e acrocêntrico (PICKERSGILL, 1971, 1991; LANTERI e PICKERSGILL, 1993) com a presença de satélite. Por sua vez, AARESTRUP (2001) identificou satélite no cromossomo de número 8.

A localização da NOR em *C. annuum* tem apresentado diferentes resultados. TANKSLEY *et al.* (1988), usando sondas de DNA para rRNA 45S, identificaram apenas um sinal de hibridização na região subterminal do cromossomo 5. MOSCONE *et al.* (1995) evidenciaram, em diferentes citótipos, a presença de uma banda Ag-NOR no cromossomo número 11, entretanto observaram a presença de uma banda adicional no cromossomo número 12 apenas em um dos citótipos. AARESTRUP (2001) identificou somente uma banda Ag-NOR no braço curto do cromossomo número 8. Já MOSCONE *et al.* (1996), utilizando cromomicina (CMA) específica para CG e 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) específico para AT, identificaram uma banda subterminal CMA-positiva/DAPI-negativa no cromossomo 6 e uma banda associada aos satélites nos cromossomos 11 e 12.

Em estudos meióticos, translocações e inversões foram evidenciadas como alterações cromossômicas estruturais entre híbridos interespecíficos de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. tovarii* e *C. frutescens* (TANKSLEY 1984; KUMAR *et al.*, 1987; RAO *et al.*, 1992; LANTERI e PICKERSGILL, 1993; TONG e BOSLAND, 1999). AARESTRUP (2001) identificou prováveis pontos de fusão no cromossomo número 1 em *C. annuum*. Em termos moleculares, translocações e inversões foram evidenciadas por mapas comparativos entre pimentão e tomate (TANKSLEY *et al.*, 1988; PRINCE *et al.*, 1993; LEFEBVRE *et al.*, 1995; LIVINGSTONE *et al.*, 1999).

Considerando as controvérsias quanto à posição do centrômero, do satélite e da NOR em *Capsicum annuum*, o presente estudo teve como objetivos:

- Aplicar metodologias para sincronização do ciclo celular de regiões meristemáticas como fonte de cromossomos em número e com morfologia adequada para estudos de caracterização.
- Aplicar técnicas de dissociação celular e secagem ao ar, que possam ampliar a resolução de estudos quanto aos aspectos morfológicos do cariótipo de *C. annuum*.
- Avaliar possíveis características morfológicas dos cromossomos que possam subsidiar futuros estudos carioevolutivos desta espécie.
- Aplicar a técnica RFA (bandeamento reverso com laranja de acridina) para verificar o seu potencial na identificação de segmentos associados à NOR em cromossomos de *C. annuum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma das espécies de hortaliças mais cultivadas em todo o mundo (REIFSCHNEIDER, 2000), com uma produção de 650.763.397 toneladas, ocupando uma área de 40.824.347 ha, juntamente com outras hortaliças (FAO, 2003). A produção de pimentão no Brasil em 2002 foi de 58.678 toneladas (FAO, 2002). Segundo dados estatísticos da CEAGESP-SP, seu volume comercializado no Estado de São Paulo no ano de 2001 foi de 39.634 toneladas, e em 2002 estimou-se um total de 22.412 toneladas até julho (AGRIANUAL, 2003). Estado de Minas Gerais apresentou a segunda maior área plantada, com 1.300 ha, correspondendo a 17,6% do total (Ishikawa, 1998, citado por KOBORI, 1999). Considerando as pimentas do gênero *Capsicum*, REIFSCHNEIDER (2000) estimou a área plantada no país em 15.000 ha, com uma receita anual de 79 milhões de reais. Entretanto, enfatizou a carência de dados estatísticos confiáveis sobre essa cultura no Brasil.

Os frutos de *Capsicum* são importantes em muitos países como especiaria e fonte de vitaminas, por aumentar o sabor dos alimentos e por seus atributos sensoriais de cor, pungência e aroma (JOHN e ABRAHAM, 1994; CONTRERAS-PADILLA e YAHIA, 1998). Podem ser consumidos como vegetais frescos ou cozidos e utilizados como tempero na alimentação e até como medicinal (LEFEBVRE *et al.*, 2002).

A pungência ou o sabor picante, características únicas do gênero, são importantes nas espécies de *Capsicum*. O sabor picante é causado por sete alcalóides ou capsaicinóides, mas a capsaicina (8-metil-N-vanil-6-nonenamido) e

a hidrocapsaicina respondem por cerca de 90% da pungência (JOHN e ABRAHAM, 1994). Além de aumentar o sabor dos alimentos, a capsaicina ($C_6H_{14}O_2$) tem aplicações na medicina, como em tratamentos reumáticos, de secreções e inflamações da garganta e de gastrites provocadas pelo uso de bebidas alcoólicas (BERTÃO, 1993). Algumas espécies são utilizadas como plantas ornamentais, em virtude da variação da coloração dos frutos durante a maturação (SOUZA e CASALI, 1984). No México, a pimenta representa uma tradição como o alimento mais importante da culinária (CONTRERAS-PADILLA e YAHIA, 1998).

O gênero *Capsicum* (Solanaceae) é constituído de espécies, cultivadas e silvestres, originadas das Américas do Sul e Central. Cinco espécies cultivadas se destacam em termos de importância agrônômica: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens* (PICKERSGILL, 1991; BELLETTI *et al.*, 1998; PARAN *et al.*, 1998). *C. annuum* é a mais importante comercialmente, tanto como vegetal quanto tempero (PICKERSGILL, 1991), e apresenta maior variabilidade morfológica (CASALI e COUTO, 1984). As populações silvestres de *C. annuum* L. se estendem desde o sul dos EUA até a América Central e o norte da América do Sul. A essa espécie pertencem os pimentões, alguns acessos de pimenta e poucos cultivares ornamentais (CASALI e COUTO, 1984). Além das cultivadas, cerca de 20 espécies silvestres de *Capsicum* foram relatadas, sendo algumas utilizadas pelo homem, a exemplo de *C. cardenasii*, *C. chacoense*, *C. eximium*, *C. galapagoense*, *C. praetermissum* e *C. tovarii* (BELLETTI *et al.*, 1998).

Segundo BERTÃO (1993), as espécies de *Capsicum* têm apresentado uma ampla variabilidade quanto aos seus principais caracteres morfológicos, como formato, tamanho, cor e posição de flores e frutos, número de pedicelos por nó e folhas, entre outros, o que condiciona uma ampla diversidade de tipos. A distinção entre as diferentes espécies tem sido feita, considerando-se várias características morfológicas, bioquímicas e citológicas em conjunto (McLEOD *et al.*, 1983).

De modo geral, os caracteres típicos do gênero são as flores hermafroditas, contendo um estigma e, em geral, cinco anteras. O comprimento do estilete varia entre as espécies. O estigma está pronto para ser fecundado já na fase de botão floral até três horas após a abertura da flor (CASALI *et al.*, 1984). Nas espécies cultivadas, ele se encontra na mesma altura das anteras, elevando a possibilidade de autopolinização e diminuindo a fecundação cruzada

original (PICKERSGILL, 1991). A taxa de polinização cruzada varia de 0,5 a 36%, sendo influenciada pelo comprimento do estilete e pela frequência de visitas de agentes polinizadores à flor (CASALI *et al.*, 1984). Embora a hibridação seja dificultada, o cruzamento entre as espécies de *Capsicum* é importante, pois sementes de híbridos interespecíficos têm sido usadas em programas de melhoramento para incorporar resistência a determinadas doenças (BELLETTI *et al.*, 1998).

A taxonomia do gênero *Capsicum* tem sido dificultada pelas diferentes opiniões a respeito da evolução histórica e da relação sistemática entre as espécies, silvestres e cultivadas (McLEOD *et al.*, 1986). Davenport (1970), Ramalingam (1972) e Jett (1973), citados por McLEOD *et al.* (1983), relataram que as espécies cultivadas originaram-se de um único progenitor silvestre, *C. frutescens*, enquanto Heiser *et al.* (1971) e Pickersgill (1972), citados por McLEOD *et al.* (1983), propuseram mais de um progenitor silvestre. Heiser *et al.* (1971) indicaram quatro ou cinco táxons domesticados, que surgiram a partir de formas silvestres. Para investigação e entendimento evolutivos do gênero, vários métodos foram utilizados, incluindo análises morfológicas, comparativas e cariotípicas (McLEOD *et al.*, 1983).

Outra hipótese, baseada em estudos de eletroforese em locos que codificam para proteínas não-enzimáticas e enzimáticas, foi proposta por McLEOD *et al.* (1983). Esses autores relataram a origem de três linhagens cultivadas, *C. baccatum* var. *pendulam* originou-se de *C. baccatum* silvestre da Bolívia; *C. pubescens* originou-se de *C. eximium*/*C. cardenasii*; e, finalmente, uma terceira linha, composta por *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. annuum*, desenvolveu-se a partir de um ancestral comum silvestre da Amazônia (Figura 1).

As espécies de *Capsicum* foram diferenciadas também pela coloração das flores e divididas em dois grupos: o grupo de flores brancas e o grupo de flores púrpuras. No grupo das flores brancas estão as espécies cultivadas e silvestres: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. praetermissum*, *C. chacoense* e *C. galapagoense*. O grupo de flores púrpuras inclui *C. pubescens*, *C. eximium*, *C. cardenasii* e *C. tovarii* (Tabela 1) (PICKERSGILL, 1991). Esses resultados foram similares aos obtidos pela subdivisão dos grupos quanto à quantidade de heterocromatina pela técnica de bandeamento-C (MOSCONE *et al.*, 1993), bandeamento com fluorocromos (cromomicina A3-CMA e 4'-6-

diamidino-2-phenilindole – DAPI) (MOSCONE *et al.*, 1996) e quanto à posição da NOR pela técnica de bandeamento AgNOR (MOSCONE *et al.*, 1995), que têm auxiliado a identificação e diferenciação de cada cromossomo do complemento.

2.2. Aspectos citogenéticos e moleculares

A citogenética é uma ciência cujo progresso está associado aos avanços de equipamentos e técnicas. Entre esses avanços na citogenética de plantas estão o aprimoramento das preparações cromossômicas pelas técnicas de dissociação celular e secagem ao ar (CARVALHO e SARAIVA, 1993), os diversos tipos de bandeamentos (SUMNER, 1990) e as metodologias de hibridização *in situ* não isotópica (PINKEL *et al.*, 1986; JONG *et al.*, 1999; GUZZO *et al.*, 2000; ROGAN *et al.*, 2001), além da utilização de imagens digitalizadas dos cromossomos por computador (CARVALHO, 1995).

A utilização de técnicas citogenéticas, associadas a metodologias de pré-tratamentos com inibidores do fuso mitótico, tem permitido a análise do número e da morfologia dos cromossomos (SUMNER, 1990; CARVALHO e SARAIVA, 1993; SHARMA e SHARMA, 1999).

O acúmulo de células em metáfases pode ser obtido a partir de pré-tratamentos para inibição do fuso mitótico, permitindo a obtenção de cromossomos com morfologia bem-definida, especialmente as constrições. Esse efeito pode ser produzido por tratamento com baixa temperatura ou com substâncias químicas, como colchicina, hidroxiquinoleína, bromonaftaleno e paradiclorobenzeno, em condições diversas de concentração e temperatura, dependendo da espécie a ser estudada (SINGH, 1993; SHARMA e SHARMA, 1999). Algumas substâncias de ação herbicida, como orizalina, trifluralina e amiprofos-metila (APM), têm sido também usadas com sucesso no estudo de cromossomos de plantas (DOLEZEL *et al.*, 1992; CARVALHO, 1995; LUCRETTI e DOLEZEL, 1995; LEE *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 1997; NEUMANN *et al.*, 1998; DOLEZEL *et al.*, 1999; AARESTRUP, 2001).

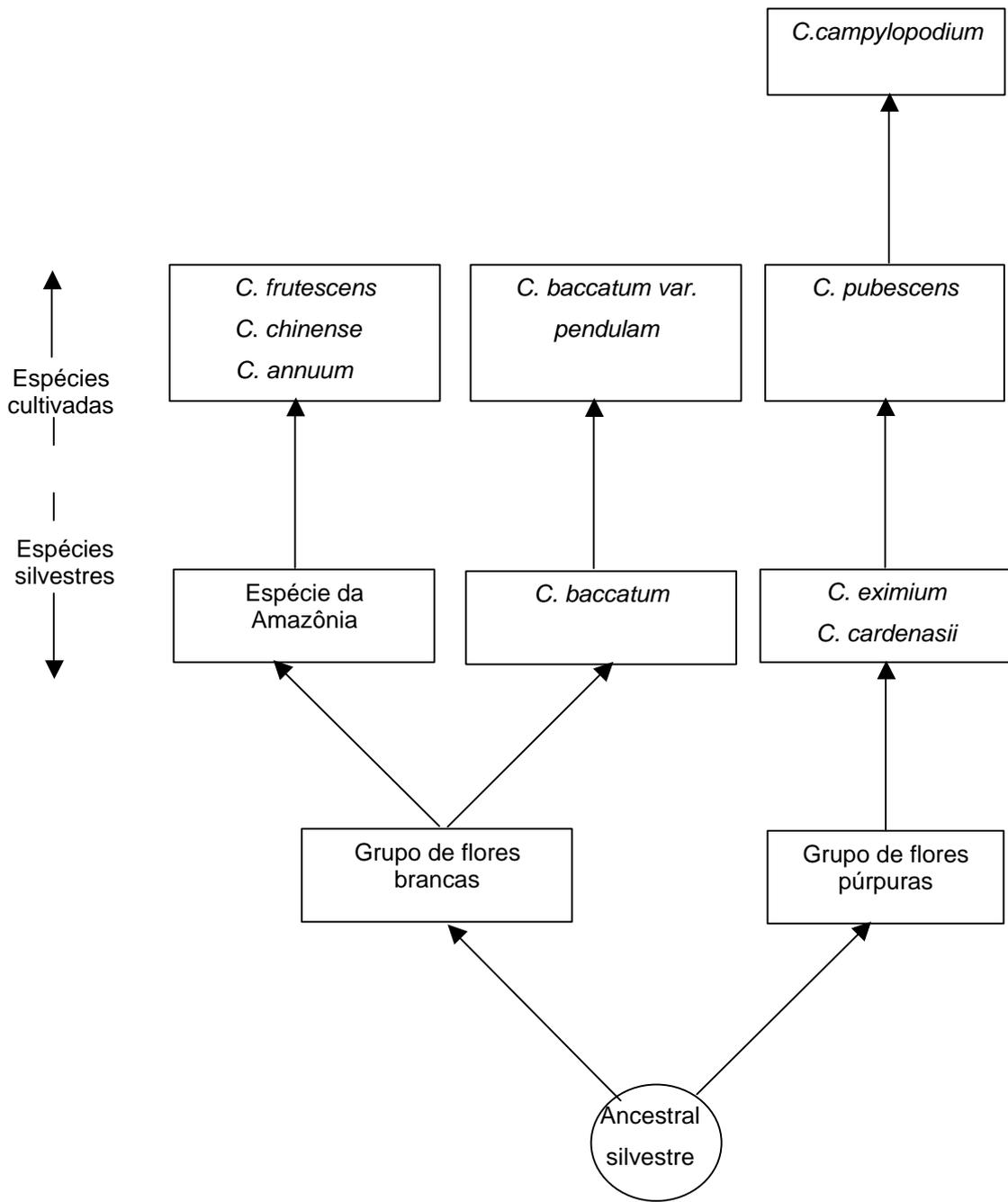


Figura 1- Esquema adaptado da seqüência evolutiva das espécies cultivadas e silvestres no gênero *Capsicum*, com base nos dados de McLEOD *et al.* (1983).

Tabela 1- Espécies cultivadas e silvestres de *Capsicum*

| Espécie | Cultivada/ Domesticada | Distribuição Geográfica |
|-------------------------------------|-----------------------------------|---|
| A- Grupo de flores brancas | | |
| 1. <i>C. annuum</i> | Silvestre Domesticada | Sudeste dos Estados Unidos ao sul da Colômbia Regiões pantropicais, países subtropicais e temperados |
| 2. <i>C. chinense</i> | Silvestre Domesticada | Leste da América do Sul Norte da América do Sul até a Costa Rica, península Yucattan, oeste da Índia e oeste da África |
| 3. <i>C. frutescens</i> | Silvestre e domesticada | Regiões Pantropicais (nativo das Américas) |
| 4. <i>C. baccatum</i> | Silvestre e domesticada | Peru, Bolívia, Paraguai, Brasil e Argentina Região dos Andes, Paraguai e Brasil |
| 5. <i>C. praetermissum</i> | Silvestre | Sudeste do Brasil |
| 6. <i>C. chacoense</i> | Silvestre | Nordeste da Argentina, Bolívia e Paraguai |
| 7. <i>C. galapagoense</i> | Silvestre | Ilhas Galápagos |
| B- Grupo das flores púrpuras | | |
| 8. <i>C. pubescens</i> | Domesticada | Região dos Andes, região montanhosa do norte da América Central ao México |
| 9. <i>C. cardenasii</i> | Silvestre | Bolívia |
| 10. <i>C. eximium</i> | Silvestre | Bolívia, nordeste da Argentina |
| 11. <i>C. tovarii</i> | Silvestre | Andes e parte central do Peru |

Fonte: PICKERSGILL (1991).

Outra estratégia que tem sido utilizada é a sincronização do ciclo celular por meio de bloqueio reversível da fase S da intérfase. Esse bloqueio pode ser realizado por agentes químicos, como a hidroxiuréia (HU) ou afidilcolina (APH). Tais inibidores químicos, empregados como agentes sincronizantes, apresentam características especiais, como ação específica sobre determinada fase do ciclo celular e eficiência em baixas concentrações (PLANCHAIS *et al.*, 2000). A HU atua inibindo a enzima ribonucleotídeo redutase, responsável pela produção de desoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeos. Ao se remover a HU, o ciclo celular é reiniciado, com grande parte das células no mesmo estágio (HESLOP-HARRISON e SCHWARZACHER, 1996).

Em *Capsicum*, pré-tratamentos com substâncias químicas como colchicina, hidroxiquinoleína, paradiclorobenzeno, orizalina e brometo de etídio têm permitido o acúmulo de células em metáfase. Esses diversos estudos citogenéticos vêm demonstrando que a maioria das espécies é diplóide, com $2n=24$ cromossomos, e que, apesar da similaridade quanto à morfologia dos cromossomos, existe variabilidade cariotípica intra e interespecífica (PICKERSGILL, 1971; BERTÃO, 1993; LANTERI e PICKERSGILL, 1993; MOSCONE, 1993; MOSCONE *et al.*, 1996; AARESTRUP, 2001).

As espécies com $2n=24$ cromossomos pertencem aos três complexos: *C. annuum*, que inclui *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. chacoense* e *C. galapagoense*; *C. baccatum*, que consiste de *C. baccatum*, *C. praetermissum* e *C. tovarii*; e *C. pubescens*, que contém *C. pubescens*, *C. cardenasii* e *C. eximium* (PICKERSGILL, 1991; TONG e BOSLAND, 1999). Segundo PICKERSGILL (1991), os táxons com $x=13$ conhecidos dentro do gênero *Capsicum* são: *C. campylopodium* (Sudeste do Brasil), *C. rhomboideum* (Equador) - citado como *C. ciliatum* -, *C. sp.* (Sudeste do Brasil) e vários acessos do Sudeste brasileiro de *C. mirabile* Mart (Moscone, 1989, citado por MOSCONE, 1990).

A classificação dos cromossomos quanto à posição do centrômero em *C. annuum* tem sido conflitante na literatura. PICKERSGILL (1991), MOSCONE (1993) e AARESTRUP (2001) evidenciaram 11 pares metacêntricos (1 ao 11) e um subtelocêntrico ou acrocêntrico (12). Pares metacêntrico (1-10), submetacêntrico (11) e subtelocêntrico (12) foram relatados na literatura (BERTÃO, 1993; MOSCONE *et al.*, 1993; MOSCONE *et al.*, 1995; MOSCONE *et al.*, 1996), enquanto PICKERSGILL (1971, 1991), TANKSLEY (1984) e LANTERI

e PICKERSGILL (1993) evidenciaram dois a três pares de acrocêntricos em diferentes espécies domesticadas de *C. annuum* (Tabela 2).

Além das variações observadas quanto à posição do centrômero em *C. annuum*, relatos da posição de satélites também têm sido conflitantes em relação à caracterização cromossômica (Tabela 2). O cromossomo 12 tem sido classificado como acrocêntrico (PICKERSGILL, 1971, 1991; LANTERI e PICKERSGILL, 1993) e subtelocêntrico (BERTÃO, 1993; MOSCONE, 1993; MOSCONE *et al.*, 1996), com a presença de satélite. Esses resultados foram obtidos pelas técnicas de esmagamento e coloração pelo reativo de Schiff.

No cromossomo de número 11, a presença de satélite tem sido identificada pela técnica de banda-C (MOSCONE *et al.*, 1993) e pelos fluorocromos cromomicina e DAPI (MOSCONE *et al.*, 1996). Entretanto, esses autores identificaram uma banda CMA/DAPI adicional no cromossomo 12 em outro citótipo. AARESTRUP (2001), utilizando técnica de dissociação celular, secagem ao ar e coloração convencional Giemsa, identificou a presença de satélite no cromossomo classificado como o de número 8.

As regiões organizadoras do nucléolo (NORs) e segmentos associados têm sido identificados, citogeneticamente, usando diferentes métodos. Os resultados têm sido conflitantes. TANKSLEY *et al.* (1988), utilizando sondas de DNA para rRNA 45S, identificaram apenas um sinal de hibridização na região subterminal do cromossomo 5. MOSCONE *et al.* (1995) evidenciaram, em diferentes citótipos, a presença de uma banda AgNOR no cromossomo de número 11. Esses autores observaram a presença de uma banda adicional, no cromossomo número 12, apenas em um dos citótipos. AARESTRUP (2001) identificou apenas uma banda Ag-NOR no braço curto do cromossomo número 8. MOSCONE *et al.* (1996), utilizando cromomicina (CMA) e 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), identificaram uma banda subterminal CMA-positiva/DAPI-negativa no cromossomo 6 e uma banda associada aos satélites dos cromossomos 11 e 12.

Tabela 2 - Morfologia e número de cromossomos em *Capsicum annuum*

| Espécie | 2n | Fórmula cariotípica (n) | Satélite (par) | Referência |
|--|-----------|--------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> | 24 | 10 m/sm + 2 ac | 11 e/ou12 | PICKERSGILL (1971) |
| <i>C. annuum</i> var. <i>minimum</i> | 24 | 11 m/sm + 1 ac | 12 | PICKERSGILL (1971) |
| <i>C. annuum</i> cv. NM6-4 | 24 | 10 m/sm + 2 ac | - | TANKSLEY (1984) |
| <i>C. annuum</i> Doux des Landes | 24 | 10 m/sm + 2 ac | - | TANKSLEY (1984) |
| <i>C. annuum</i> silvestre | 24 | 11 m/sm + 1 ac | 12 | PICKERSGILL (1991) |
| <i>C. annuum</i> domesticada | 24 | 9 m/sm + 3 ac | - | PICKERSGILL (1991) |
| <i>C. annuum</i> | 24 | 10 m/sm + 1 sm + 1 st | 11 e 12 | BERTÃO (1993) |
| <i>C. annuum</i> (C70-7a) | 24 | 10 m/sm + 2 ac | 12 | LANTERI e PICKERSGILL (1993) |
| <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> RS e EAM 4142 RS e EAM 4166 | 24 | 11 m + 1 st | 5 e 12 | MOSCONE (1993) |
| <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> EAM 193 | 24 | 10 m + 1 sm + 1 st | 11 | MOSCONE <i>et al.</i> (1993) |
| <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> Citótipo 1 (EAM 193 e EAM 203) | 24 | 10 m + 1 sm + 1 st | 11 | MOSCONE <i>et al.</i> (1995) |
| <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> Citótipo 2 (EAM 204) | 24 | 10 m + 1 sm + 1 st | 11 e 12 | MOSCONE <i>et al.</i> (1996) |
| <i>C. annuum</i> ('Criollo de Morelos, L-3436 e 'Califórnia Wonder') | 24 | 11 m + 1 ac | 8 | AARESTRUP (2001) |

m- metacêntrico

sm- submetacêntrico

ac- acrocêntrico

st- subtlocêntrico

(-) Os autores não relataram a posição do satélite

Em estudos meióticos, alterações cromossômicas estruturais foram relatadas em híbridos interespecíficos de *Capsicum*. Entre *C. annuum* e *C. chinense* foi evidenciada a presença de no mínimo uma translocação recíproca (TANKSLEY, 1984; LANTERI e PICKERSGILL, 1993). Provavelmente, o cromossomo acrocêntrico de número 12 em *C. annuum* originou-se de uma translocação recíproca entre dois cromossomos metacêntricos (Koompai, 1976; Pickersgill *et al.*, 1978, citados por TANKSLEY, 1984). KUMAR *et al.* (1987) reportaram que o genoma de *C. annuum* difere de *C. chinense* por duas translocações e de *C. baccatum* por duas translocações e uma inversão.

Segundo TONG e BOSLAND (1999), sugeriram que a espécie *C. tovarii* difere de *C. baccatum* por no mínimo uma translocação recíproca. Esses resultados indicam que *C. tovarii* é geneticamente mais relacionada a *C. baccatum* do que a *C. annuum* ou a *C. pubescens*. Egawa e Tanaka (1986) reportaram que os genomas de *C. annuum* e *C. baccatum* diferem-se por no mínimo três translocações (KUMAR *et al.*, 1987) e *C. baccatum* é diferente de *C. frutescens* por duas ou três trocas (RAO *et al.*, 1992). AARESTRUP (2001), por sua vez, sugeriu a hipótese de fusão não-cêntrica entre um cromossomo acrocêntrico e outro submetacêntrico no par número 1 em *C. annuum*. Essa autora observou que a similaridade morfológica e o grau de compactação cromossômico dificultaram a identificação e a classificação de outros cromossomos que possam ter sido originados por fusão.

Outro aspecto importante na análise de rearranjos cromossômicos em Solanaceae, incluindo pimentão, tomate, berinjela e batata, refere-se à construção de mapas genéticos (Tabela 3). A comparação de mapas de ligação entre tomate (*Lycopersicon esculentum*) e berinjela (*Solanum melongena*) indicou que as diferenças cromossômicas entre essas duas espécies podem ser explicadas por um total de 23 inversões paracêntricas e cinco translocações, incluindo quatro recíprocas e uma não-recíproca (DOGANLAR *et al.*, 2002). BONIERBALE *et al.* (1988), TANKSLEY *et al.* (1992) e DOGANLAR *et al.* (2002) mostraram que os genomas de tomate e batata (*Solanum tuberosum*) diferem-se por cinco inversões paracêntricas.

Tabela 3- Mapa genético comparativo entre as espécies de Solanaceae

| Rearranjos estruturais | Total | Espécie | Autor |
|--|--------------|--|--|
| - Inversões e translocações | 32 | <i>Capsicum annuum</i> e <i>Lycopersicon esculentum</i> | TANKSLEY <i>et al.</i> (1988) |
| - Inversões e translocações | 15 | <i>Capsicum annuum</i> e <i>Lycopersicon esculentum</i> | PRINCE <i>et al.</i> (1993) |
| - Inversões e translocações | 16 | <i>Capsicum annuum</i> e <i>Lycopersicon esculentum</i> | LEFEBVRE <i>et al.</i> (1995) |
| - Inversões paracêntricas | 10 | <i>Capsicum annuum</i> e <i>Lycopersicon esculentum</i> | LIVINGSTONE <i>et al.</i> (1999) |
| - Inversões pericêntricas | 2 | | |
| - Dissociações ou associações das regiões genômicas destes gêneros | 4 | | |
| - Translocações | 5 | | |
| - Inversões paracêntricas | | <i>Solanum melongena</i> e <i>Solanum tuberosum</i> | DOGANLAR <i>et al.</i> (2002) |
| • braço inteiro | 1 | | |
| • braço parcial com quebras centroméricas | 2 | | |
| • braço parcial com quebras não-centroméricas | 16 | | |
| - Translocações recíprocas | | | |
| • quebra centromérica | 3 | | |
| • quebra não-centromérica | 1 | | |
| - Translocações não-recíprocas | 1 | | |
| - Inversões paracêntricas | 5 | <i>Lycopersicon esculentum</i> e <i>Solanum tuberosum</i> | DOGANLAR <i>et al.</i> (2002), BONIERBALE <i>et al.</i> (1988) e TANKSLEY <i>et al.</i> (1992) |
| - Inversões paracêntricas | | <i>Solanum melongena</i> e <i>Lycopersicon esculentum</i> | DOGANLAR <i>et al.</i> (2002) |
| • braço inteiro | 5 | | |
| • braço parcial com quebras centroméricas | 2 | | |
| • braço parcial com quebras não-centroméricas | 16 | | |
| - Translocações recíprocas | | | |
| • quebra centromérica | 3 | | |
| • quebra não-centromérica | 1 | | |
| - Translocações não-recíprocas | 1 | | |

Entre os genomas de tomate e pimentão (*C. annuum*) foram observados numerosos rearranjos cromossômicos. TANKSLEY *et al.* (1988) encontraram 32 quebras cromossômicas, incluindo translocações e inversões, entretanto relataram que a evolução cromossômica nessas espécies não está restrita a eventos de quebras cêntricas. PRINCE *et al.* (1993) demonstraram a ocorrência de 15 eventos de quebras cromossômicas (inversões e translocações), enquanto LEFEBVRE *et al.* (1995) enumeraram 16 quebras. LIVINGSTONE *et al.* (1999) estimaram um número mínimo de 21 quebras, incluindo cinco translocações, 10 inversões paracêntricas, duas inversões pericêntricas e quatro dissociações ou associações das regiões genômicas desses gêneros. Observaram, também, translocação recíproca, translocação-não recíproca, duplicação ou deleção, que diferenciam as duas espécies parentais de *Capsicum* (*C. annuum* e *C. chinense*).

Segundo PRINCE *et al.* (1993), a diferença do número de quebras deve-se à resolução do mapa atual, baseando-se em um grande número de marcadores. LIVINGSTONE *et al.* (1999) relataram que a provável causa sejam as diferentes regiões do genoma do tomate em cada estudo. Segundo LEFEBVRE *et al.* (1995), as alterações cromossômicas estruturais no material genético do tomate podem ter originado o cariótipo atual do pimentão.

A comparação de mapas de ligação do tomate e berinjela revelou que a evolução cromossômica dessas espécies, a partir de um ancestral comum, ocorreu principalmente por inversões de segmentos colineares do genoma (DOGANLAR *et al.*, 2002). Foi proposto que as inversões são mais freqüentes do que as translocações em populações silvestres, porque as trocas cromossômicas usualmente têm efeito negativo sobre a fertilidade dos organismos (Burnham, 1962, citado por DOGANLAR *et al.*, 2002).

TANKSLEY *et al.* (1992) relataram que os genomas do tomate e da batata são praticamente idênticos, exceto por cinco regiões invertidas paracentricamente. LIVINGSTONE *et al.* (1999) encontraram que 12 dos 21 rearranjos que distinguem tomate e pimentão foram resultados de inversões e que a maioria destas (83%) foi paracêntrica. Na família Brassicaceae, a maioria dos rearranjos entre as espécies tem sido atribuída a eventos de inversão (LAGERCRANTZ, 1998).

A baixa freqüência das inversões pericêntricas em Solanaceae, outras plantas e em *Drosophila* está provavelmente relacionada aos efeitos do “crossing

over” dentro da porção invertida do genoma. Tais efeitos foram sumarizados por Burnham (1962), que relatou que o “crossing over” em regiões invertidas pericentricamente resulta em altos níveis de abortos tanto de óvulos quanto de pólen e freqüente aborto de zigotos em *Drosophila*. Ao contrário, “crossing over” em regiões cromossômicas invertidas paracentricamente reduz somente a viabilidade do pólen em plantas e tem pouco ou nenhum efeito na sobrevivência do zigoto em *Drosophila*. Assim, indivíduos que possuem inversões paracêntricas no genoma são mais facilmente transmitidos do que aqueles com inversões pericêntricas (DOGANLAR *et al.*, 2002).

Das 23 inversões paracêntricas que diferenciam berinjela e tomate, a maioria (69%) envolve braços cromossômicos parciais e quebras não-centroméricas. Similarmente, batata e berinjela são diferenciadas principalmente por inversões não-centroméricas e que envolvem braços cromossômicos parciais (DOGANLAR *et al.*, 2002). Ao contrário, um número quase igual de inversões paracêntricas não-centroméricas e centroméricas distingue tomate e pimentão, e somente inversões que envolvem o braço inteiro diferenciam tomate e batata (TANKLEY *et al.*, 1992; LIVINGSTONE *et al.*, 1999).

Dessa forma, os rearranjos que diferenciam berinjela, tomate, batata e pimentão, segundo DOGANLAR *et al.* (2002), podem ser atribuídos a dois principais mecanismos de evolução cromossômica: translocações e inversões paracêntricas. Contudo, comparações de tipos de rearranjos que diferenciam os cromossomos das espécies de Solanaceae indicaram que as inversões paracêntricas favoreceram a evolução. Observações relatadas no mapa de ligação genético foram similares aos estudos de filogenia em Solanaceae com base na variação de sítios de restrição em cloroplastos. Esses estudos evidenciaram que tomate e batata estão mais relacionados e se encontram no mesmo clado, enquanto berinjela e pimentão estão mais distantes filogeneticamente de tomate e batata e pertencem a diferentes clados (Olmstead e Palmer, 1997, citados por DOGANLAR *et al.*, 2002).

2.3. Bandeamento com laranja de acridina

Laranja de acridina (LA) é um fluorocromo catiônico que se intercala entre os pares de bases do DNA, emitindo fluorescências vermelho-alaranjada e verde-

amarelada quando se ligam, respectivamente, à fita simples do ácido nucléico e à fita dupla (SHARMA e SHARMA, 1999; EXBRAYAT, 2000).

A utilização do LA na citogenética humana tem evidenciado um padrão de bandeamento reverso (RFA) aos bandeamentos Q e G (VERMA e LUBS, 1975, 1976). O bandeamento reverso obtido pelo fluorocromo laranja de acridina recebeu a denominação RFA, de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana (ISCN) em 1985, citado por VERMA e BABU (1995). Esse bandeamento produz variações na intensidade de coloração ao longo dos cromossomos de vertebrados superiores, particularmente mamíferos (Hsu, 1974, citado por SUMNER, 1990). A aplicação da técnica RFA em cromossomos humanos destacou-se pela marcação evidente na posição terminal dos cromossomos, sendo importante para estudos de translocações (VERMA e BABU, 1995), deleções (BARCH *et al.*, 1997) e quebras ao longo dos cromossomos, pela diferenciação de cores (VERMA *et al.*, 1976). Segundo CLARK e WALL (1996), essa técnica é usual em diagnóstico citogenético humano ao se examinarem deleções teloméricas, uma vez que os cromossomos são fracamente corados pelo bandeamento-G nessas regiões. PEREIRA e SOUZA (2000) evidenciaram regiões de heterocromatina pericentromérica em cromossomos do gafanhoto (*Phaeoparia megacephala*) pré-tratados com bandeamento-C e corados com LA.

Ao contrário de humanos e animais, padrões de bandeamento-G são ausentes em plantas devido ao alto grau de condensação dos cromossomos metafásicos ou por limitações técnicas (GREILHUBER, 1977), portanto não se esperam bandas reversas.

Alguns autores utilizaram a técnica de coloração com laranja de acridina associada ao bandeamento-C ao invés do tampão fosfato utilizado em RFA. Com essa modificação, GENDEL e FOSKET (1978) identificaram bandas teloméricas em cromossomos de *Allium cepa*. SATO (1988) evidenciou em *Vicia faba*, *Allium fistulosum*, *Chrysanthemum coronarium*, *Lycoris aurea* e *Nothoscordum fragrans* três categorias de segmentos cromossômicos: heterocromatina associada às constrições secundárias (NOR H-segmentos), que emitiram fluorescência verde-amarelada; segmentos eucromáticos, que variaram de laranja a laranja-amarelado; e outras regiões, que variaram de vermelho-alaranjado a amarelo, dependendo da planta em estudo. Em cromossomos de *Helianthus argophyllus* e

H. annuus, somente NOR H-segmentos apareceram marcados (CUÉLLAR *et al.*, 1999).

O laranja de acridina tem sido utilizado com outras finalidades, como relatado por JUAN *et al.* (1996), autores que, trabalhando com linfócitos, observaram que a cromatina de células mitóticas é mais sensível à desnaturação do que a cromatina em núcleos interfásicos. A sensibilidade do DNA à desnaturação, nesses estudos, foi analisada pela exposição das células ao calor ou ao ácido, usando-se o LA como um marcador do grau de desnaturação do DNA.

Além de corar DNA e RNA, o LA cora pequenas vesículas subcelulares, como relatado por HIBBS e SAUL (1994). Esses autores estudaram uma população de pequenas vesículas dentro do citoplasma de células sangüíneas infectadas pelo *Plasmodium falciparum*, causador da malária. Tais vesículas foram observadas em microscopia confocal e coradas com LA para monitorar o seu movimento dentro do citoplasma das células sangüíneas infectadas. Também, podem ser um importante componente no transporte de proteínas, através do citoplasma de células sangüíneas infectadas. CONDE *et al.* (2000), utilizando o LA para corar núcleos de *Trichomonas vaginalis* e estudando o ciclo celular desse protozoário, observaram que os núcleos das células vivas apresentaram fluorescências verde (DNA) e laranja (RNA).

DEEPESH e GHOSH (1994) realizaram estudos sobre a localização do “scaffold” (esqueleto) cromossômico em espermatócitos de gafanhotos, utilizando uma solução de prata e LA como contra-corante. Devido à coloração com LA, os componentes da cromatina ficaram amarelados, e o “scaffold”, corado com prata, mostrou-se localizado centralmente na região de cromatina. Esse corante também tem sido utilizado em citometria de fluxo para analisar a fluorescência emitida em espermatozoides de peixe (*Clarias gariepinus*), peru (*Meleagris gallapova*), rato (*Rattus norvegicus*), hamster (*Mesocricetus auratus*), macaco (*Macaca fascicularis*) e humano. A diferença observada quanto à fluorescência entre as espécies deve-se à dificuldade de ligação do corante a determinadas regiões heterocromáticas e a proteínas que diminuem a interação do corante com o DNA (LEWIN *et al.*, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Sementes de pimentão *C. annuum* dos acessos Fortuna Super, Criollo de Morelos e Athenas foram cedidas pelo Professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Sementes de milho *Zea mays* da linhagem 2-NOR, utilizadas como padrão da presença de NOR, conhecida e identificada no cromossomo de número 6, foram cedidas pelo “Maize Genetics Stock Center” (University of Illinois, USA). As análises foram realizadas no Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Biologia Geral da UFV, Brasil.

3.2. Pré-tratamento e fixação das raízes

Sementes de *C. annuum* foram germinadas em placas de Petri a 30 °C, por quatro a cinco dias. As raízes foram submetidas aos procedimentos de sincronização do ciclo celular durante a interfase e despolimerização de microtúbulos durante a mitose. Os pré-tratamentos foram realizados, preferencialmente, em raízes com cerca de 1 cm de comprimento.

Os pré-tratamentos foram divididos em três etapas distintas: sincronização, recuperação e despolimerização.

Na etapa de sincronização, as raízes germinadas foram tratadas com solução de hidroxauréia a 1,5; 2; e 2,5 mM por 18 h, a 30 °C. Após a etapa de sincronização, as sementes com raízes foram lavadas em água durante 20 min e transferidas para outro recipiente, apenas com água destilada, e mantidas nas

mesmas condições de germinação, dando início à etapa de recuperação, com duração mínima de 2 h.

Após 2 h mínimas de recuperação e com a finalidade de acumular células em metáfases, iniciou-se a terceira etapa, a despolimerização dos microtúbulos. As raízes foram incubadas em solução de 3, 4 e 5 μM de orizalina e mantidas nas mesmas condições de germinação. No final de cada período de 3 e 4 h de tratamento, as raízes foram lavadas, durante 20 min, em água destilada e fixadas em metanol/ácido acético na proporção 3:1. O fixador foi trocado três vezes em intervalos de 15 min e o material, armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um a vários dias. Sementes de milho, utilizadas como padrão, germinaram por 33 h e foram submetidas ao mesmo tratamento.

3.3. Preparação das lâminas

As raízes de pimentão foram lavadas e digeridas com uma solução enzimática industrial (10 μL Flaxzyme, Novo Ferment TM em 140 μL de água destilada) a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h e 20 min. As raízes de milho foram digeridas com solução enzimática (7,5 g de Ultrazym TM 100 G, Novo Ferment TM, em 50 mL de solução-tampão com 2,1 g de ácido cítrico e 2,95 g de citrato de sódio, em 50 ml de água destilada, ajustado para pH 4,2), a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 1 h 45 min. As raízes foram lavadas por 20 min em água destilada, fixadas em metanol/ácido acético (3:1) e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular do meristema apical e subsequente secagem ao ar e em placa aquecedora ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 20 min (CARVALHO e SARAIVA, 1993, 1997).

3.4. Técnica de coloração convencional Giemsa

Algumas lâminas foram imediatamente coradas em solução de Giemsa (Merck) 5% em tampão fosfato (pH 6,8) por 5 min, lavadas duas vezes em água destilada, secadas ao ar e em placa aquecedora ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$), enquanto outras lâminas foram submetidas ao bandeamento com laranja de acridina.

3.5. Bandeamento com laranja de acridina

A técnica utilizada para obter padrões de bandeamento em cromossomos de pimentão e de milho, com laranja de acridina, seguiu os mesmos procedimentos da técnica RFA descrita para cromossomos humanos por VERMA *et al.* (1977). Lâminas envelhecidas por 15 a 20 dias foram incubadas em tampão fosfato, pH 6,5, a 85 °C, por 15 a 20 min, dependendo da idade da lâmina, e coradas com solução de laranja de acridina 0,01% (w/v), por 15 min. Nesse procedimento, a linhagem de milho 2-NOR foi utilizada como padrão da presença de NOR, conhecidamente identificada no cromossomo de número 6 (McClintock, 1942).

3.6. Análise de imagem

Imagens de cromossomos foram capturadas por meio de uma CCD video-câmera conectada ao microscópio OlympusTM BX 60, equipado com sistema de epifluorescência (filtro WB), com objetiva de imersão (100x), e processadas em um computador MacintoshTM (G4). As análises da morfologia dos cromossomos foram realizadas usando o Programa Image SXM de domínio público (BARRETT, 2002), o qual pode ser obtido via internet (<http://reg.ssci.liv.ac.uk>). Os braços de cada cromossomo foram medidos em pixels e convertidos em escala de micrômetros. A razão entre os braços longo/curto foi determinada segundo o critério de classificação morfológica dos cromossomos descrito por LEVAN *et al.* (1964) e revisado por GUERRA (1986).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito dos pré-tratamentos com hidroxiuréia e orizalina em *Capsicum annuum*

O pré-tratamento com hidroxiuréia (HU) a 2 mM por 18 h permitiu a inibição reversível da fase de síntese de DNA em *C. annuum* 'Fortuna Super', 'Athenas' e 'Criollo de Morelos'. A concentração e o tempo de exposição à HU resultaram na sincronização das células no mesmo estágio do ciclo celular. Por sua vez, a utilização e o monitoramento da substância antimitótica orizalina a 5 µM por 3 e 4 h permitiram o acúmulo de cromossomos em prometáfases e metáfases.

Em 'Fortuna Super', as células sincronizadas com HU e tratadas com orizalina a 5 µM por 3 h resultaram cromossomos prometafásicos e alguns metafásicos (Figura 2 a). Já o tratamento por 4 h, no mesmo tempo e concentração do bloqueador, resultou células em metáfase (Figuras 2b e 3a). Em 'Criollo de Morelos' (Figura 3b) e 'Athenas' (Figura 3c), cromossomos metafásicos foram evidenciados durante 4 h em orizalina a 5 µM, após a sincronização das células em HU.

As preparações citogenéticas realizadas em meristemas pré-tratados, com aplicação da técnica de secagem ao ar e pelo método de coloração convencional Giemsa, resultaram em cromossomos morfologicamente preservados e relativamente com baixo índice de sobreposição.

4.2. Coloração convencional Giemsa em *Capsicum annuum*

Na Figura 3a-c, metáfases completas com $2n=24$ cromossomos e com constrições primária e secundária bem-definidas facilitaram a classificação e o pareamento dos homólogos para montagem de kariogramas. A montagem dos kariogramas de 'Fortuna Super' (Figura 3d), 'Criollo de Morelos' (Figura 3e) e 'Athenas' (Figura 3f), em ordem decrescente de tamanho, permitiu a classificação dos cromossomos quanto à posição do centrômero, sendo 10 pares metacêntricos (1-10), um submetacêntrico (11) e um acrocêntrico (12). Em todos os kariogramas analisados, a posição da constrição secundária foi consistente no par número 11. A identificação de cada cromossomo a partir dos kariogramas montados foi realizada com base no comprimento total e na razão entre os braços (Tabelas 4, 5 e 6).

Alguns cromossomos de pimentão, que têm apresentado conflitos de classificação na literatura, foram selecionados de prometáfases e metáfases para serem analisados em diferentes graus de compactação (Figura 4). Um desses cromossomos contém uma constrição secundária e um satélite bem-evidente no braço curto. Morfologicamente, ele foi classificado como o de número 11 e submetacêntrico, pelo critério de excluir do cálculo da razão (2,44) entre os braços longo/curto as regiões da constrição secundária e do satélite. Não se observou no menor cromossomo do complemento, classificado como o de número 12, a presença de constrições secundárias ou satélites. O cálculo da razão (3,27) entre os braços indicou uma classificação morfológica dos tipos acrocêntrico ou subteloacêntrico, segundo a terminologia de GUERRA (1986) e de LEVAN *et al.* (1964), respectivamente.

Na Figura 5, cromossomos espalhados de *C. annuum* 'Fortuna Super' no início da anáfase foram obtidos no pré-tratamento com hidroxiuréia 2 mM por 18 h e com orizalina 5 μ M por 3 h. Nesses cromossomos foram observados pontos de tração e possíveis outros de fusão cromossômica.

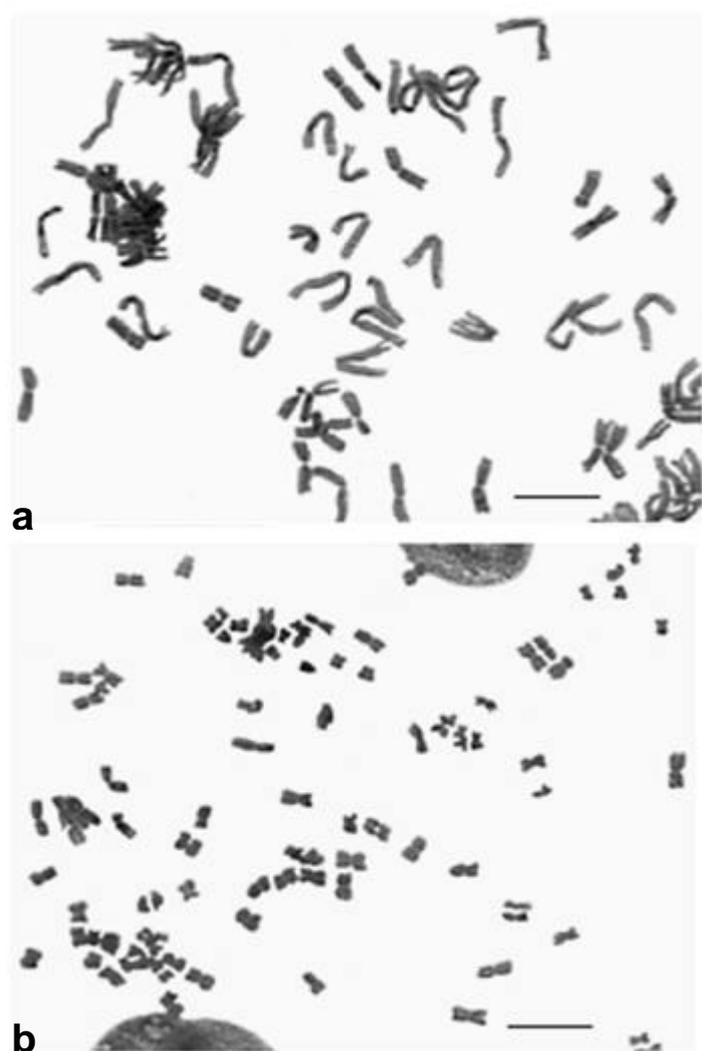


Figura 2 – Cromossomos obtidos de células meristemáticas de *Capsicum annum* 'Fortuna Super' e corados com solução de Giemsa 5%: (a) células prometafásicas e metafásicas pré-tratadas com hidroxiuréia 2 mM e por 3 h de orizalina 5 µM a 29 °C; e (b) células metafásicas pré-tratadas com hidroxiuréia 2 mM e por 4 h de orizalina 5 µM a 29°C. Barra = 10 µm.

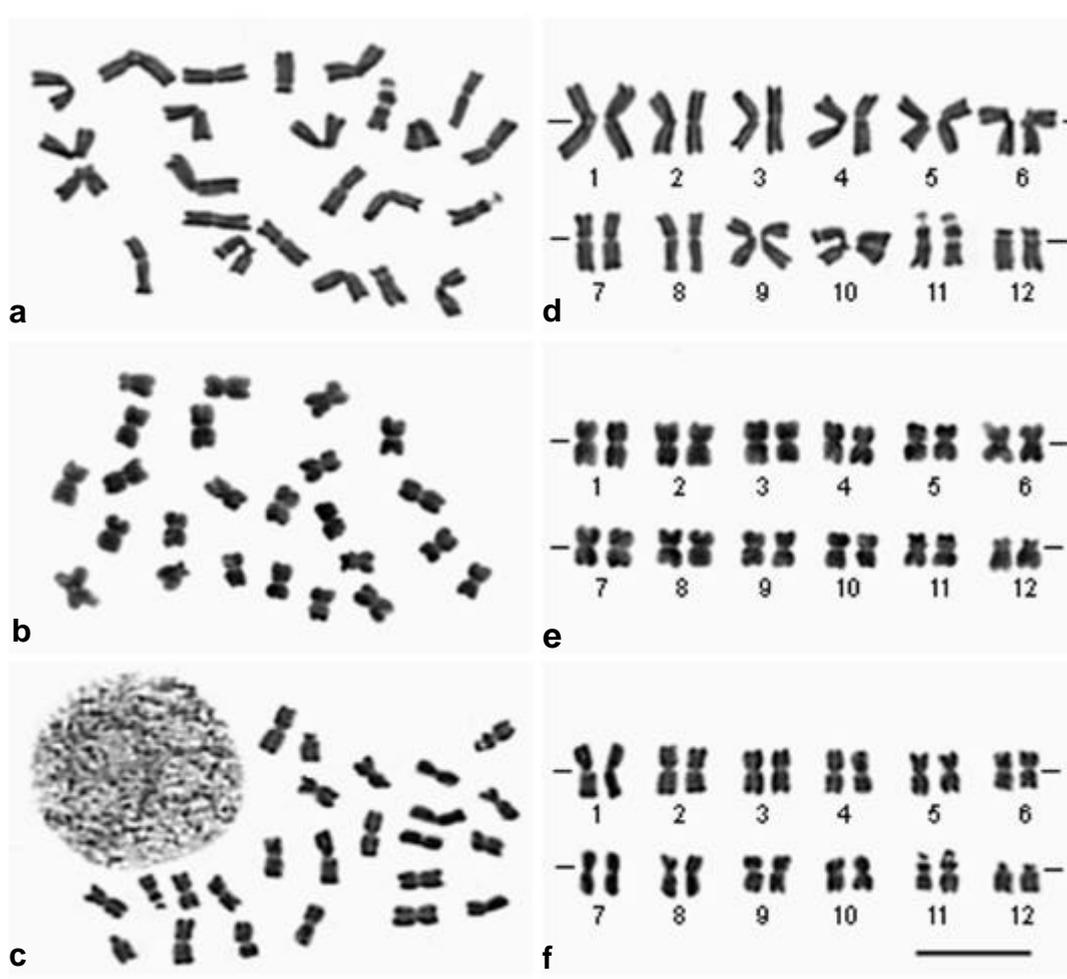


Figura 3 – Cromossomos obtidos de células meristemáticas de *Capsicum annuum* ‘Fortuna Super’, ‘Criollo de Morelos’ e ‘Athenas’, pré-tratados com hidroxauréia a 2 mM por 4 h em orizalina 5 μ M a 29 °C e corados com solução de Giemsa 5%. Cromossomos metafásicos espalhados com constrições primárias e secundárias em ‘Fortuna Super’ (a), ‘Criollo de Morelos’ (b) e ‘Athenas’ (c). Cariogramas montados a partir dos cromossomos metafásicos de ‘Fortuna Super’ (d), ‘Criollo de Morelos’ (e) e ‘Athenas’ (f). Observe-se a constrição secundária no par 11 dos três cariogramas. Barra = 10 μ m.

Tabela 4 – Caracterização cariotípica dos cromossomos metafásicos de *Capsicum annuum* ‘Fortuna Super’

| ‘Fortuna Super’ | | | | | | | |
|------------------------|------------|------------|-------|------|--------|-------------------------|--------|
| Número Cromossômico | Total (µm) | Braço (µm) | | r | Classe | Comprimento Relativo(%) | |
| | | Curto | Longo | | | | |
| 1 | 7,13 | 3,16 | 3,97 | 1,26 | m | 11,48 | |
| 2 | 5,69 | 2,42 | 3,27 | 1,35 | m | 9,16 | |
| 3 | 5,62 | 2,35 | 3,27 | 1,39 | m | 9,05 | |
| 4 | 5,61 | 2,52 | 3,09 | 1,23 | m | 9,03 | |
| 5 | 5,25 | 2,17 | 3,08 | 1,42 | m | 8,45 | |
| 6 | 5,22 | 2,36 | 2,86 | 1,21 | m | 8,40 | |
| 7 | 5,18 | 2,13 | 3,05 | 1,43 | m | 8,34 | |
| 8 | 4,95 | 2,32 | 2,63 | 1,13 | m | 7,97 | |
| 9 | 4,88 | 2,22 | 2,66 | 1,20 | m | 7,86 | |
| 10 | 4,85 | 2,64 | 2,21 | 0,84 | m | 7,81 | |
| 11 | 3,97 | 1,22 | 2,75 | 2,25 | sm | 6,39 | |
| 12 | 3,77 | 0,47 | 3,30 | 7,02 | ac | 6,07 | |
| | | | | | | 62,12 | 100,00 |

r – razão entre os braços longo e curto

m - metacêntrico

sm - submetacêntrico

ac – acrocêntrico

Tabela 5 – Caracterização cariotípica dos cromossomos metafásicos de *Capsicum annuum* ‘Criollo de Morelos’

| ‘Criollo de Morelos’ | | | | | | | |
|-----------------------------|------------|------------|-------|------|--------|-------------------------|--------|
| Número Cromossômico | Total (µm) | Braço (µm) | | r | Classe | Comprimento Relativo(%) | |
| | | Curto | Longo | | | | |
| 1 | 3,95 | 1,65 | 2,30 | 1,39 | m | 10,33 | |
| 2 | 3,64 | 1,55 | 2,09 | 1,35 | m | 9,52 | |
| 3 | 3,54 | 1,66 | 1,88 | 1,13 | m | 9,26 | |
| 4 | 3,30 | 1,65 | 1,65 | 1,00 | m | 8,63 | |
| 5 | 3,16 | 1,41 | 1,75 | 1,24 | m | 8,26 | |
| 6 | 3,12 | 1,41 | 1,71 | 1,21 | m | 8,16 | |
| 7 | 3,08 | 1,88 | 1,20 | 0,64 | m | 8,05 | |
| 8 | 3,07 | 1,41 | 1,66 | 1,18 | m | 8,03 | |
| 9 | 3,02 | 1,28 | 1,74 | 1,36 | m | 7,90 | |
| 10 | 2,95 | 1,28 | 1,67 | 1,30 | m | 7,71 | |
| 11 | 2,82 | 0,94 | 1,88 | 2,00 | sm | 7,37 | |
| 12 | 2,59 | 0,47 | 2,12 | 4,51 | ac | 6,77 | |
| | | | | | | 38,24 | 100,00 |

r – razão entre os braços longo e curto

m - metacêntrico

sm - submetacêntrico

ac – acrocêntrico

Tabela 6 – Caracterização cariotípica dos cromossomos metafásicos de *Capsicum annuum* ‘Athenas’

| ‘Athenas’ | | | | | | |
|---------------------|------------|------------|-------|------|--------|-------------------------|
| Número Cromossômico | Total (µm) | Braço (µm) | | r | Classe | Comprimento Relativo(%) |
| | | Curto | Longo | | | |
| 1 | 4,52 | 2,01 | 2,51 | 1,25 | m | 10,96 |
| 2 | 4,24 | 1,88 | 2,36 | 1,26 | m | 10,28 |
| 3 | 4,01 | 1,88 | 2,13 | 1,13 | m | 9,73 |
| 4 | 3,76 | 1,88 | 1,88 | 1,00 | m | 9,12 |
| 5 | 3,53 | 1,65 | 1,88 | 1,14 | m | 8,56 |
| 6 | 3,45 | 1,66 | 1,79 | 1,08 | m | 8,37 |
| 7 | 3,40 | 1,88 | 1,52 | 0,81 | m | 8,25 |
| 8 | 3,34 | 1,41 | 1,93 | 1,37 | m | 8,10 |
| 9 | 3,07 | 1,43 | 1,64 | 1,15 | m | 7,45 |
| 10 | 2,83 | 1,20 | 1,63 | 1,36 | m | 6,86 |
| 11 | 2,60 | 0,94 | 1,66 | 1,77 | sm | 6,31 |
| 12 | 2,48 | 0,47 | 2,01 | 4,28 | ac | 6,02 |
| | | | | | | 41,23 |
| | | | | | | 100,00 |

r – razão entre os braços longo e curto

m - metacêntrico

sm - submetacêntrico

ac – acrocêntrico

Na Figura 6, a montagem dos kariogramas de ‘Fortuna Super’ a partir de cromossomos comparativamente mais condensados (Figura 6ab) e menos condensados (Figura 6c) auxiliaram o pareamento dos homólogos dos cromossomos da Figura 5. No kariograma 6a, o maior grau de compactação dificultou a observação de prováveis pontos de fusão entre os cromossomos. Na Figura 6b, observam-se pontos de tração similares aos cromossomos da Figura 5. Na Figura 6c, possíveis pontos de fusão foram visualizados em cromossomos menos condensados do que os anteriores. A partir das prováveis evidências apresentadas, foi possível montar o kariograma dos cromossomos em início de anáfase (Figura 6d). Nesse kariograma, os possíveis pontos de fusão foram evidenciados nos cromossomos 1, 2, 5, 7, 8 e 9 e os pontos de tração, em todos os cromossomos.

Na Figura 7a-c, os cromossomos 1, 2, 5, 7, 8 e 9, nos estágios de prometáfase e no início da anáfase, foram morfológicamente comparados. Nesses cromossomos mantidos na mesma escala de aumento, prováveis pontos de fusão e de tração foram evidenciados na mesma posição. Na Figura 7c, o cromossomo de número 1 apresentou um ponto de fusão provavelmente correspondendo à fusão entre um cromossomo submetacêntrico e um

acrocêntrico. O ponto de tração desse cromossomo corresponde ao centrômero ativo, que, possivelmente, poderia corresponder a outro ponto de fusão entre cromossomos metacêntricos. Nos cromossomos 2, 5, 7, 8 e 9, evidenciaram-se dois prováveis pontos de fusão e um ponto de tração que pode corresponder a um outro ponto de fusão. Na Figura 7d, idiogramas dos cromossomos da Figura 7c representam os possíveis pontos de fusão ao longo dos cromossomos. Na Figura 7a₁-c₁), os cromossomos de cada exemplar da Figura 7a-c foram plotados em gráficos tridimensionais, permitindo a observação dos prováveis pontos de tração e fusão entre os cromossomos.

4.3. Bandeamento com laranja de acridina (LA)

O bandeamento com LA, em 'Criollo de Morelos', revelou uma banda fluorescente verde-amarelada, subterminal no cromossomo 5, e duas bandas flanqueando a constrição secundária, no braço curto do cromossomo 11 (Figura 8ab). Quatro pontos fluorescentes verde-amarelados foram observados nos núcleos interfásicos de pimentão (Figura 8c). Na linhagem 2-NOR de milho, utilizada como padrão da NOR conhecida, verificou-se, de maneira similar, a presença de bandas verde-amareladas flanqueando a constrição secundária, correspondente à NOR, no cromossomo número 6 (Figura 8de). A presença de quatro pontos fluorescentes também foi observada em núcleos interfásicos de milho (Figura 8f), cujos cromossomos foram classificados conforme critérios descritos por McCLINTOCK (1942) (Figura 8d).

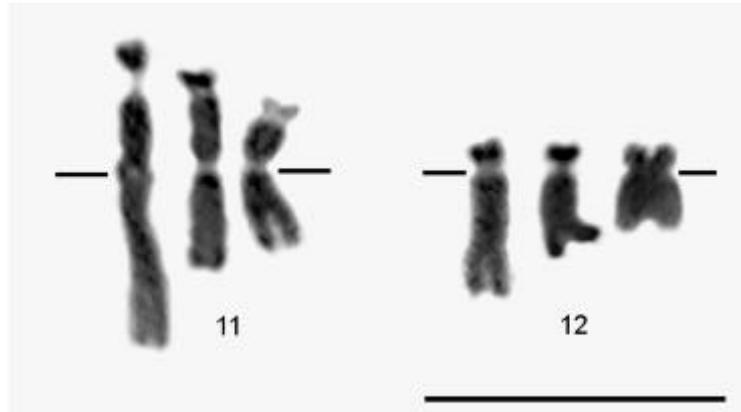


Figura 4 - Coleção de cromossomos 11 e 12 em diferentes níveis de compactação, obtidos de células de meristemas radiculares de *Capsicum annuum*, 'Fortuna Super' e 'Criollo de Morelos', corados pela técnica de coloração convencional Giemsa 5%. (a) Observem-se a posição da constrição primária, que possibilita classificar o cromossomo 11 como submetacêntrico, e a presença da constrição secundária no braço curto. Notem-se a ausência de satélites e a localização da constrição primária que permitem classificar o cromossomo 12 como acrocêntrico. Barra = 10 μ m.



Figura 5 - Cromossomos espalhados no início da anáfase obtidos de células de meristemas radiculares de *Capsicum annuum* 'Fortuna Super' e corados pela técnica de coloração convencional Giemsa 5%. Pontos de tração e prováveis pontos de fusão entre cromossomos são observados. Barra = 10 μ m.

Figura 6 - Cariogramas montados a partir de cromossomos em diferentes níveis de condensação obtidos de células de meristemas radiculares de *Capsicum annuum* 'Fortuna Super' e corados pela técnica de coloração convencional Giemsa 5%. (a) e (b) cromossomos comparativamente mais condensados, dificultando a observação de prováveis pontos de fusão; (c) cromossomos menos condensados, com prováveis pontos de fusão nos cromossomos 1, 7 e 9; e (d) cariograma montado a partir de cromossomos no início da anáfase, evidenciando pontos de tração e possíveis pontos de fusão nos cromossomos 1, 2, 5, 7, 8 e 9. Barra = 10 μ m.

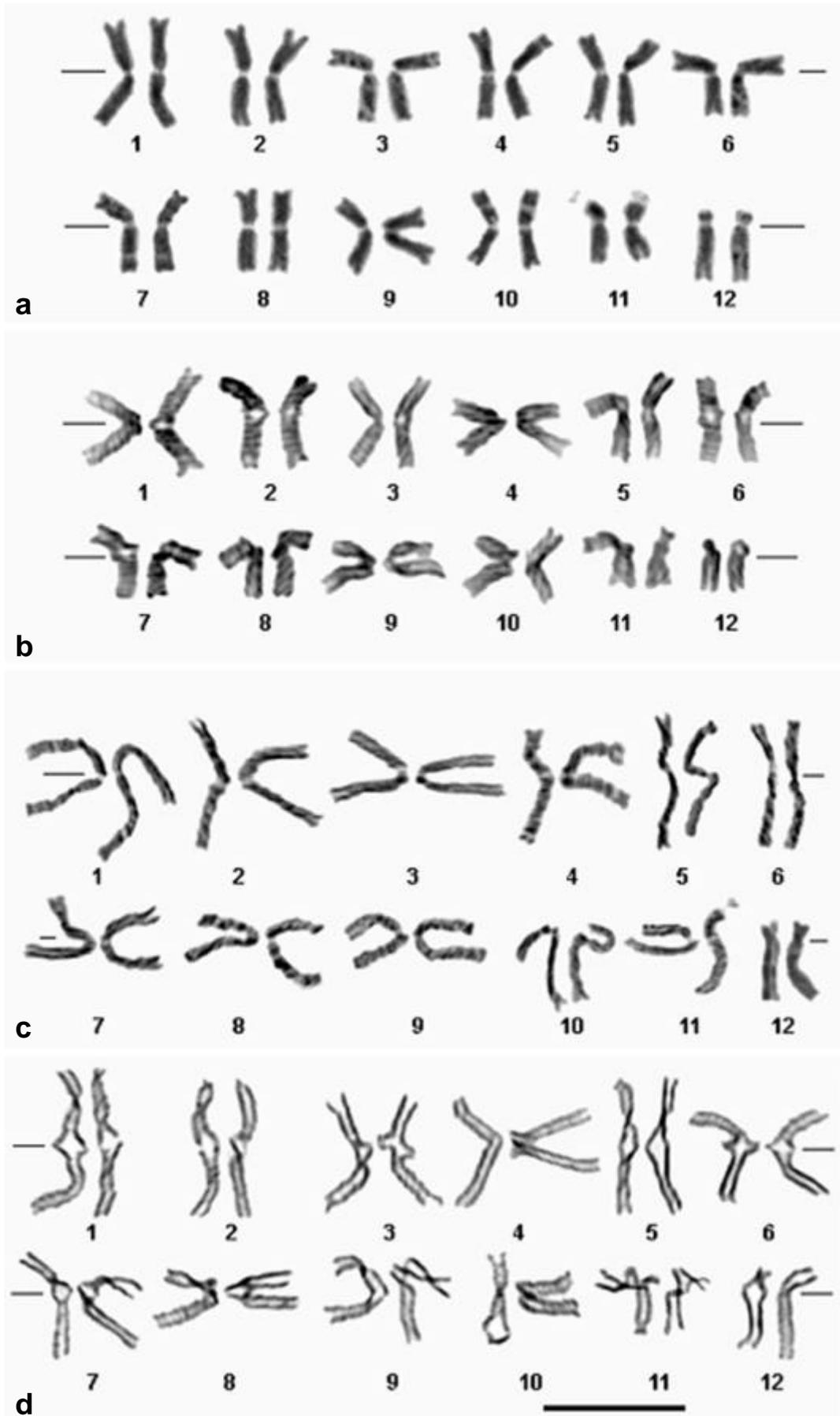
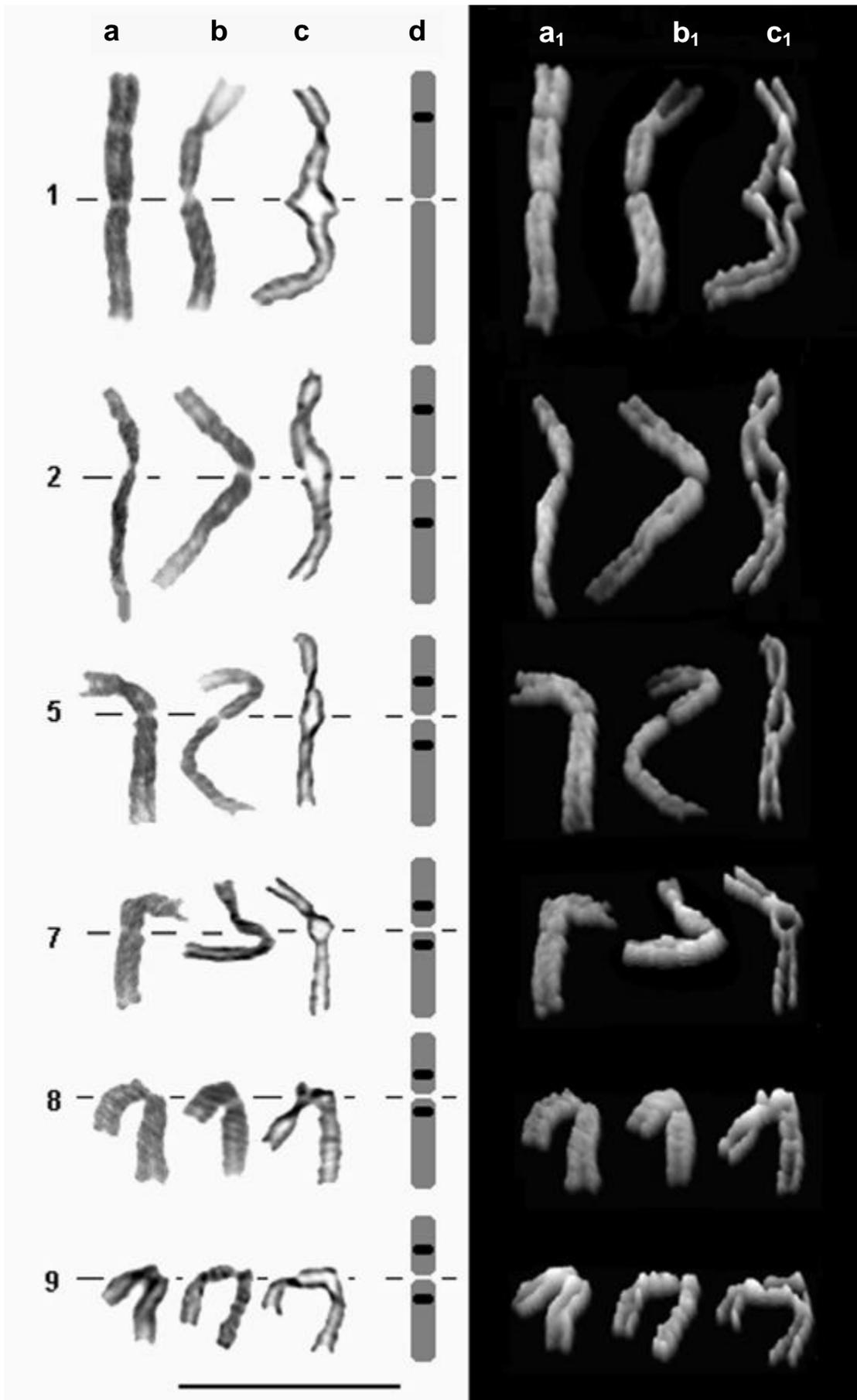


Figura 7 - Cromossomos em diferentes aspectos morfológicos obtidos de células de meristemas radiculares de *Capsicum annuum* 'Fortuna Super' após o tratamento com HU associado à orizalina e corados pela técnica de coloração convencional Giemsa 5%. (a) e (b) prováveis pontos de fusão são evidenciados nos cromossomos prometafásicos 1, 2, 5, 7, 8 e 9; (c) o cromossomo de número 1 provavelmente possui apenas um ponto de fusão. Os cromossomos 2, 5, 7, 8 e 9 foram evidenciados dois prováveis pontos de fusão e o ponto de tração; (d) idiogramas dos cromossomos da Figura c, representando os possíveis pontos de fusão ao longo dos cromossomos; (a₁, b₁, c₁) cromossomos de cada exemplar da Figura a-c plotado em gráficos tridimensionais, permitindo a observação dos prováveis pontos de tração e fusão entre os cromossomos. Barra = 10 µm.



O bandeamento com laranja de acridina em cromossomos morfológicamente similares resultou uma banda subterminal fluorescente no cromossomo 5 de 'Fortuna Super' (Figura 9a), 'Criollo de Morelos' (Figura 9b) e 'Athenas' (Figura 9c). Já, no cromossomo 11 dos três acessos, bandas flanqueadoras da constrição secundária foram evidenciadas (Figura 9).

As Figuras 10ab correspondem a gráficos que representam a densidade relativa, em 256 tonalidades de cinza, medida ao longo dos cromossomos 5 e 11 de 'Athenas', corados com laranja de acridina. Os limites determinados, no eixo da abscissa, entre os pontos inicial e final da área ocupada pela plotagem de densidade correspondem ao comprimento total, em micrômetro, dos cromossomos analisados. No cromossomo 5, um "pico" e uma "depressão" foram observados. O "pico" corresponde à banda fluorescente e a "depressão", ao centrômero, enquanto no cromossomo 11 dois "picos" e duas "depressões" foram evidenciados. Os picos correspondem às bandas flanqueadoras da constrição secundária, que estão separadas por uma "depressão", ao passo que a outra "depressão" corresponde ao centrômero.

As melhores preparações foram obtidas com lâminas envelhecidas em estufa a 35 °C, por 15 a 20 dias, período de incubação em tampão fosfato por 15 a 20 min, dependendo da idade da lâmina, e coradas por 15 min em solução de laranja de acridina 0,01%.

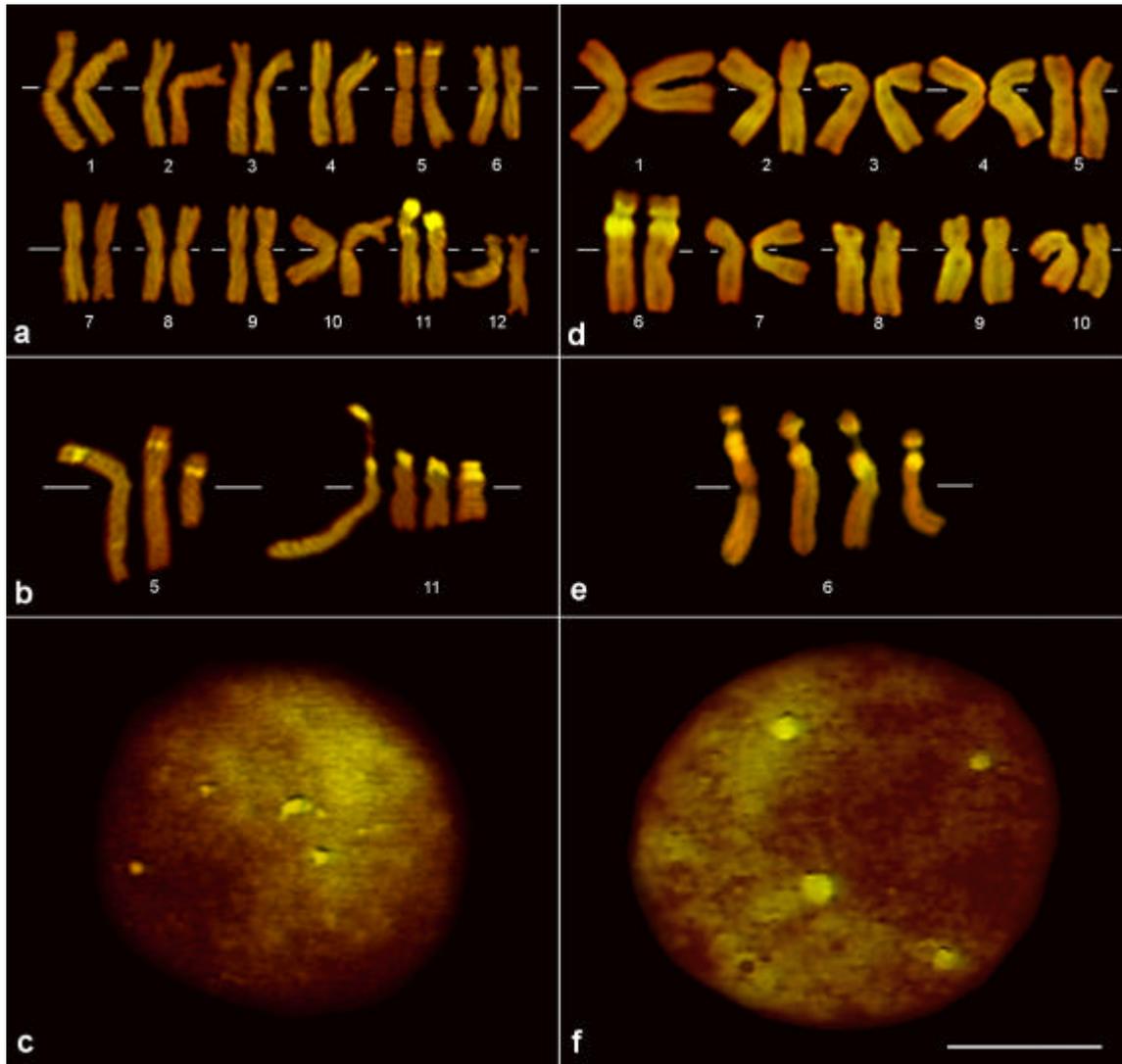


Figura 8 - Cariogramas, cromossomos e núcleos obtidos de células de meristemas radiculares de *Capsicum annuum* 'Criollo de Morelos' (a, b, c) e *Z. mays* usados como padrão (d, e, f), pré-tratados e corados com laranja de acridina 0,01%. (a) complemento ($2n=24$) evidenciando padrão de bandeamento subterminal no cromossomo 5 e na constrição secundária do 11; (b) coleção de cromossomos em diferentes níveis de condensação, destacando-se a posição da banda positiva na região subterminal do cromossomo 5 e da flanqueadora na constrição secundária do 11; (c) núcleo interfásico com quatro pontos fluorescentes correspondentes às regiões flanqueadoras presentes na NOR do cromossomo 11; (d) complemento ($2n=20$) evidenciando bandas fluorescentes na região flanqueadora da NOR do cromossomo 6 em metáfase e em diferentes níveis de condensação; e (e) e (f) núcleo interfásico mostrando quatro pontos correspondentes à NOR. Observe-se que os pontos estão em torno do nucléolo, visualizado em imagem negativa. Barra = 10 μm .

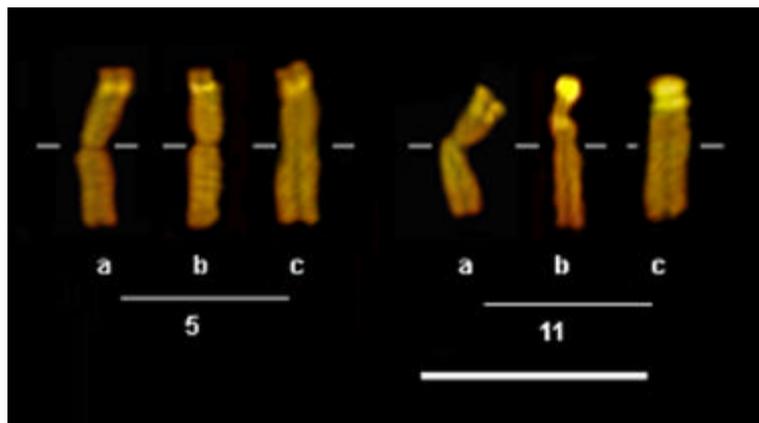


Figura 9 - Cromossomos 5 e 11 de *Capsicum annum* 'Fortuna Super' (a), 'Criollo de Morelos' (b) e 'Athenas' (c) corados com laranja de acridina 0,01%. Banda fluorescente subterminal no cromossomo 5 e bandas fluorescentes flanqueando a constrição secundária no 11. Barra=10 μ m.

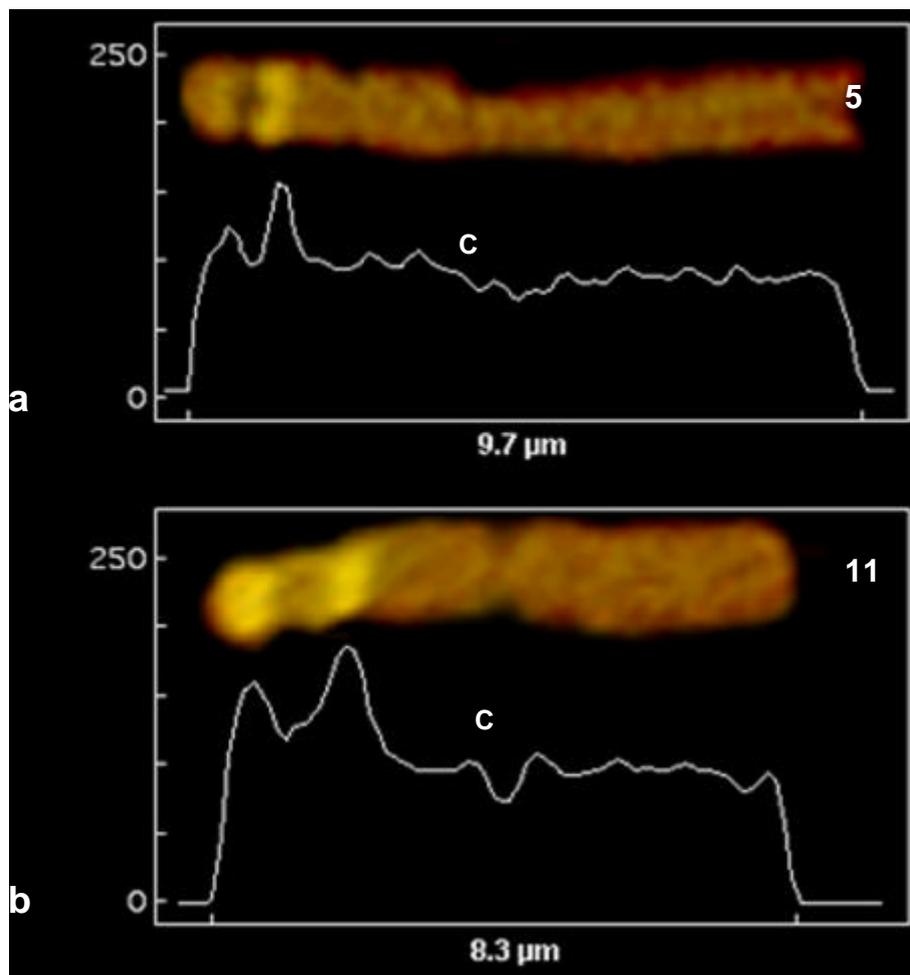


Figura 10 – Análises de imagens digitalizadas dos cromossomos 5 e 11 obtidos de células de meristemas radiculares de *Capsicum annuum* 'Athenas'. Os gráficos (a) e (b) representam a densidade relativa, em 256 tonalidades de cinza, dos cromossomos 5 e 11 corados com laranja de acridina 0,01%. No cromossomo 5, o “pico” corresponde à banda fluorescente e a letra “c”, ao centrômero; e, no cromossomo 11, os “picos” correspondem às bandas flangeadoras da constrição secundária, que estão separadas por uma “depressão”, e a letra “c” corresponde ao centrômero. Barra = 10 μm.

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeito dos pré-tratamentos e coloração convencional Giemsa em *Capsicum annuum*

A técnica de sincronização do ciclo celular com hidroxauréia (HU) associada à substância antimetabólica orizalina permitiu o acúmulo de células sincronizadas com cromossomos em diferentes graus de compactação, desde prometáfásicas até metafásicas. Em *C. annuum* 'Fortuna Super', Criollo de Morelos' e 'Athenas', a concentração de 2 mM de HU e o tempo de 18 h de tratamento foram utilizados no presente estudo, correspondendo à melhor concentração que produziu inibição de síntese da fase S e ao tempo suficiente para completar, no mínimo, um ciclo nuclear. Em outras plantas, diferentes concentrações de HU têm sido relatadas para tratamentos de sincronização do ciclo celular em meristema de raiz, como em *Triticum aestivum*, 1,25 mM (LEE *et al.*, 1997); *Zea mays*, 1,6 mM (CARVALHO, 1995); *Vicia faba*, 2,5 mM (DOLEZEL *et al.*, 1992; LUCRETTI e DOLEZEL, 1995; DOLEZEL *et al.*, 1999); e *Zea mays*, 5 mM (LEE *et al.*, 1996).

No presente trabalho, o bloqueador orizalina resultou no acúmulo de células sincronizadas com HU em prometáfases e metafases. Em outras plantas, como *T. aestivum* (LEE *et al.*, 1997), *Zea mays* (CARVALHO, 1995; LEE *et al.*, 1996), *Pisum sativum* (NEUMANN *et al.*, 1998) e *Vicia faba* (DOLEZEL *et al.*, 1992; LUCRETTI e DOLEZEL, 1995; DOLEZEL *et al.*, 1999), bloqueadores como amiprofos-metila (APM), trifluralina e colchicina têm sido utilizados com a mesma finalidade do orizalina. Em plantas, a colchicina é efetiva em nível milimolar, enquanto herbicidas como orizalina, trifluralina e o APM têm sido preferencialmente aplicados para bloqueio mitótico de células vegetais em

concentrações micromolares, prevenindo a ocorrência de anormalidades no processo mitótico e a formação de micronúcleos (PLANCHAIS *et al.*, 2000).

Em *C. annuum* 'Fortuna Super', 'Criollo de Morelos' e 'Athenas', o número cromossômico ($2n=24$) e a posição do centrômero (10 metacêntricos, 1 submetacêntrico e 1 acrocêntrico) foram similares aos resultados obtidos por outros autores (BERTÃO, 1993; MOSCONE *et al.*, 1993; MOSCONE *et al.*, 1995; MOSCONE *et al.*, 1996). Entretanto, PICKERSGILL (1971, 1991), TANKSLEY (1984) e LANTERI e PICKERSGILL (1993) evidenciaram dois a três pares de cromossomos acrocêntricos. Por sua vez, PICKERSGILL (1991), MOSCONE (1993) e AARESTRUP (2001) relataram 11 pares de cromossomos metacêntricos (1-11) e um de cromossomo subteloentrico ou acrocêntrico (12).

Relatos da localização de constrições primárias e secundárias e da presença de satélites em *C. annuum* têm sido conflitantes na literatura em relação à caracterização cromossômica. AARESTRUP (2001) identificou a presença de NOR no cromossomo classificado como de número 8. Nesse caso, as regiões da constrição secundária e do satélite foram incluídas no cálculo da razão entre os braços. Se forem excluídas as medidas dessas regiões, o cromossomo com NOR positiva seria classificado como o 11 (Figura 4). Já o cromossomo 12 tem sido selecionado como subteloentrico (BERTÃO, 1993; MOSCONE, 1993; MOSCONE *et al.*, 1996) ou acrocêntrico (PICKERSGILL, 1971, 1991; LANTERI e PICKERSGILL, 1993), com a presença de satélite. Entretanto, no presente estudo não foi observado satélite, e o cálculo da razão entre os braços indicou uma classificação morfológica do tipo acrocêntrico (Tabelas 4, 5 e 6). Parte dessas diferenças podem ser atribuídas a polimorfismos intra-específicos ou a preparações citológicas, que não permitiram diferenciar claramente se a constrição era primária ou secundária.

A análise de cariogramas em diferentes graus de compactação permitiu a identificação de características morfológicas que possam fornecer evidências sobre rearranjos cromossômicos envolvidos no cariótipo de *C. annuum* 'Fortuna Super'. No presente trabalho, considerou-se que os centrômeros dos dois cromossomos envolvidos em cada fusão foram provavelmente inativos e que o ponto de tração corresponde à região centromérica ativa. Uma possível explicação é que não tem ocorrido inativação, mas que os dois centrômeros participem da migração durante a anáfase, desde que os centrômeros se

orientem para o mesmo pólo (John e Freeman, 1975, citados por TORRES, 2001). A existência de cromossomos dicêntricos por eventos de fusão já foi relatada na literatura por McCLINTOCK (1942). Para que não ocorram quebras durante a migração desses cromossomos na anáfase, os dois centrômeros devem segregar para o mesmo pólo, ou um dos centrômeros deve ser inativado para garantir a sua estabilidade meiótica (KING, 1993).

No presente trabalho, as constrições semelhantes ao centrômero foram observadas em cromossomos prometafásicos e no início da anáfase. Provavelmente, essas constrições referem-se a pontos de fusão cêntrica. Segundo SLIJEPCEVIC (1998), as fusões Robertsonianas podem ser originadas pela perda de seqüências teloméricas com o encurtamento do telômero, pelas quebras cromossômicas ou pela inativação completa ou parcial dos telômeros.

Os pontos de tração observados no presente estudo, que correspondem à região centromérica ativa, provavelmente se originaram de fusões entre cromossomos. Verificou-se que a perda do telômero pode resultar no aumento da freqüência de fusões em células somáticas humanas em envelhecimento, indicando que telômeros intactos normalmente impedem a fusão (Counter *et al.*, 1992, citados por SLIJEPCEVIC, 1998). Em humanos, BERTUCH (2002) relatou que a perda dos telômeros leva à degradação ativa das fitas de DNA e que a DNA ligase IV é responsável pela fusão entre os telômeros de cromossomos não-homólogos. As fusões teloméricas em cromossomos humanos são fenômenos comuns em tumores (SAWYER *et al.*, 1998), em células submetidas aos raios X e entre fumantes (MIÑO *et al.*, 2001).

Outro argumento que reforça a ocorrência de fusão sugerida no presente estudo é a presença de sinal telomérico intersticial (ITS). Essas seqüências indicam que as regiões teloméricas podem estar ligadas aos fenômenos de fusão (LIU e FREDGA, 1999). Os ITS têm sido identificados nas regiões pericentroméricas e centroméricas dos cromossomos de vertebrados (MEYNE *et al.*, 1990; OFFNER, 1994; GARAGNA *et al.*, 1997; SLIJEPCEVIC *et al.*, 1997; LIU e FREDGA, 1999; FINATO *et al.*, 2000). Entretanto, a ausência dos ITS pode ser devida à perda de seqüências teloméricas durante os eventos de fusão ou a dificuldades na identificação dessas seqüências pela FISH (hibridização *in situ* fluorescente) (GARAGNA *et al.*, 1997; PEREZ *et al.*, 1999). Os ITS relatados

nesses trabalhos pela técnica de FISH têm reforçado a hipótese de fusão proposta no presente estudo.

Em plantas, outros autores relataram situações similares à hipótese do presente trabalho. No gênero *Lycoris*, Inariyama (1951), citado por JONES (1998), reportou que a partir de um ancestral com 22 cromossomos telocêntricos foi originada a espécie $2n=12$ (10 M + 2 t), por meio de sucessivas fusões cromossômicas. Em tomate, os ITS foram mapeados próximos do centrômero de oito pares de cromossomos (3, 4, 5, 7, 8, 9, 11 e 12). Tais seqüências podem ter sido originadas por fusões teloméricas ou por inversões (PRESTING e FRARY, 1996). Segundo LAGERCRANTZ (1998), fusões diretas telômero-telômero podem ter sido importantes na reconstrução do genoma de *Brassica nigra*.

A hipótese apresentada no presente estudo foi citada por AARESTRUP (2001) para explicar a presença de constrições cromossômicas semelhantes ao centrômero no par número 1 em *C. annuum*. De maneira similar, TORRES (2001), analisando a morfologia dos cromossomos de baru (*Dipteryx alata* Vog) ($2n=16$), propôs a ocorrência de fusão. Para AARESTRUP (2001), a similaridade morfológica e o grau de compactação cromossômico dificultaram a identificação e a classificação de outros cromossomos que possam ter sido originados de fusão. No presente estudo, a obtenção de cromossomos em diferentes graus de condensação e com a morfologia das constrições bem-definidas permitiu a observação desses possíveis pontos de fusão nos cromossomos 1, 2, 5, 7, 8 e 9.

5.2. Bandeamento com laranja de acridina (LA)

A técnica de RFA aplicada em cromossomos de pimentão e milho evidenciou um padrão de bandeamento diferente daqueles já bem-consolidados na citogenética humana (VERMA e BABU, 1995). Nessas plantas, as bandas foram localizadas na região de constrição secundária, demonstrando que não se trata de bandas reversas. Portanto, neste trabalho a nomenclatura RFA foi substituída pela Hsc-FA (bandeamento fluorescente da heterocromatina associada à constrição secundária com o uso de laranja de acridina). Neste estudo, o milho foi utilizado como padrão de NOR conhecida por McCLINTOCK (1942), confirmando a especificidade do bandeamento com laranja de acridina à região de constrição secundária.

A resistência da constrição primária ao bandeamento Hsc-FA, nos cromossomos de pimentão e milho, pode ser justificada, admitindo-se que a heterocromatina que flanqueia a constrição secundária é diferente na estrutura, ou composição, daquela que flanqueia a região centromérica. Duas diferentes formas de heterocromatinas têm sido associadas às constrições primárias e secundárias em estudos com cromossomos humanos (TYLER-SMITH e WILLARD, 1993; DEMIRTAS *et al.*, 2000) e com regiões ativa e inativa geneticamente nos cromossomos de *Drosophila* (LOHE e HILLIKER, 1995). Segundo esses autores, a α -heterocromatina localiza-se principalmente na região centromérica, e a β -heterocromatina flanqueia as regiões de constrição secundária. BENNETZEN (2000) reportou, em estudos com *Arabidopsis*, uma situação similar às heterocromatinas α e β de *Drosophila* e confirmou a possibilidade de ocorrência em outros tipos de plantas. Dessa forma, as heterocromatinas α e β podem estar envolvidas com tais regiões dos cromossomos de pimentão e de milho e ter sido diferenciadas pelo tipo de condições desnaturantes da técnica. Nesse caso, de forma análoga, a β -heterocromatina seria a responsável pela banda Hsc-FA positiva nas regiões flangeadoras das constrições secundárias.

Citologicamente, os tipos de heterocromatina em milho têm sido diferenciados pelas técnicas de bandeamento HKG, que cora heterocromatina centromérica, intercalar e adjacente ao “Knob”, e pelo procedimento de bandeamento-C, que cora a região do “Knob” (CARVALHO e SARAIVA, 1993, 1997). Entretanto, apesar dos diversos tipos de heterocromatina em milho, no presente trabalho a técnica Hsc-FA evidenciou apenas heterocromatina flangeadora da NOR, confirmando a especificidade da técnica.

Padrão de bandeamento similar ao obtido no presente estudo foi relatado em outros organismos por diversos autores. Após o passo de pré-tratamento da técnica de bandeamento-C e coloração com LA, bandas positivas foram evidenciadas em *Vicia faba*, *Allium fistulosum*, *Chrysanthemum coronarium*, *Lycoris aurea* e *Nothoscordum fragrans* (SATO, 1988), *Helianthus argophyllus* e *H. annuus* (CUÉLLAR *et al.*, 1999) e em gafanhotos (*Arcyptera fusca*) (BELLA *et al.*, 1986).

As NORs têm sido identificadas com diferentes estratégias de técnicas citológicas convencionais, como a demonstração de heterocromatinas associadas (SATO, 1988), a presença de constrições secundárias e satélites (MOSCONE, 1993) e a coloração das proteínas por impregnação com nitrato de prata pela técnica de bandeamento AgNOR (SUMNER, 1990; GUERRA, 2000). Nesta pesquisa, foi interpretado que o padrão de bandeamento Hsc-FA obtido em duas constrições secundárias em pimentão está associado à NOR, considerando-se que essa região apresentou, de forma análoga, banda Hsc-FA positiva na constrição secundária no braço curto do cromossomo 6 de milho. Entretanto, a presença dessas bandas nos cromossomos 5 e 11 de *Capsicum* pode não diferenciar a NOR ativa da inativa. Esses resultados concordam em parte com as conclusões de TANKSLEY *et al.* (1988), que identificaram apenas um sinal de hibridização usando sondas de DNA para rRNA 45S, na região subterminal do cromossomo 5, mas admitiu problemas técnicos que poderiam não ter revelado um segundo loco ribossomal; e de MOSCONE *et al.* (1995), que evidenciaram uma banda AgNOR positiva no cromossomo de número 11.

Considerando esses aspectos, análises da distribuição de sítios de rDNA da subunidade maior por FISH indicam que elas estão sempre presentes em NOR e freqüentemente em outras regiões, nas quais as constrições secundárias não têm sido localizadas (GUERRA, 2000), mas sítios ativos são geralmente bandas AgNOR positivas (HUBBELL, 1985). No presente trabalho, quatro pontos fluorescentes também foram evidenciados, em torno da imagem negativa da NOR, de núcleos interfásicos de pimentão e de milho. Concluiu-se que o número desses pontos corresponde ao de bandas Hsc-FA flanqueadoras presentes nos cromossomos que apresentam NOR. Entretanto, não se observaram nesses núcleos os dois pontos que poderiam corresponder às pequenas bandas Hsc-FA subterminais presentes no cromossomo 5 de pimentão.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo evidenciaram a eficiência dos pré-tratamentos com hidroxiuréia (HU) para sincronização do ciclo celular e da substância química orizalina, que propiciaram o acúmulo de células sincronizadas em prometáfases e metáfases. Essa metodologia resultou na obtenção de cromossomos em número e morfologia adequados para estudos de sua caracterização morfológica.

As preparações citogenéticas realizadas em meristemas pré-tratados, com aplicação da técnica de secagem ao ar e pelo método de coloração convencional Giemsa, resultaram em cromossomos morfológicamente preservados e relativamente com baixo índice de sobreposição. Os resultados permitiram a caracterização da morfologia dos cromossomos de *Capsicum annuum* com $2n=24$ cromossomos, sendo 10 pares metacêntricos (1-10), um submetacêntrico (11) e outro acrocêntrico (12). Nos cariogramas montados a partir dos cromossomos de *C. annuum* 'Fortuna Super', 'Criollo de Morelos' e 'Athenas', foi verificada a presença da constrição secundária no par de número 11. No cromossomo de número 12, evidenciou-se apenas a constrição primária sem a presença de satélite, como relatado na literatura.

Os cromossomos nos estágios de prometáfases e no início da anáfase foram morfológicamente comparados. Provavelmente, as constrições semelhantes aos centrômeros dos cromossomos de *C. annuum* 'Fortuna Super' correspondem às regiões centroméricas inativas. Observou-se que essas constrições podem ser pontos de fusão entre cromossomos, enquanto o ponto de tração corresponde à região centromérica ativa.

A técnica de bandeamento Hsc-FA permitiu a identificação, no nível citológico, de segmentos heterocromáticos associados a sítios de rDNA presentes em regiões ativas e inativas de cromossomos de *C. annuum* e *Z. mays*. É possível que dois tipos de heterocromatinas (α e β) estejam associados a regiões de constrições primária e secundária e que a β -heterocromatina seria o principal componente flanqueador da constrição secundária.

A utilização das metodologias aplicadas no presente estudo permitiu a caracterização da morfologia cromossômica quanto à posição do centrômero e à presença de satélite e de possíveis pontos de fusão cromossômica em *Capsicum annuum*. Já a técnica Hsc-FA, conforme demonstrado em cromossomos de pimentão e milho, poderá ser útil na identificação dessas regiões em estudos com outras plantas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, J.R. **Análise morfológica dos cromossomos de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. Viçosa, M.G: UFV, 2001. 130 p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento).
- AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. FNP Consultoria e Agroinformativos. www.fnp.com.br, 2003.
- BARCH, M.J., KNUSTSEN, T., SPURBECK, J.L. **The AGT Cytogenetics Laboratory Manual**. 3ª edição, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 666 p. 1997.
- BARRETT, S.D. Software for scanning microscopy. **Proceedings of the Royal Microscopy Society** 37: 7-14, 2002.
- BELLA, J.L., GARCÍA-VEGA, C., LÓPEZ-FERNÁNDES, C., GOSÁLVES, J. Changes in acridine orange binding and its use in the characterization of heterochromatic regions. **Heredity** 57: 79-83, 1986.
- BELLETTI, P., MARZACHÌ, C., LANTERI, S. Flow cytometric measurement of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution** 209: 85-91, 1998.
- BENNETZEN, J.L. The many hues of plant heterochromatin. **Genome Biology** 1: 1-4, 2000.

- BERTÃO, M.R. **Evolução cariotípica no gênero *Capsicum* (Solanaceae)**. Piracicaba, S.P.: ESALQ, 1993. 148 p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- BERTUCH, A.A. Telomeres: the molecular events driving end-to-end fusions. **Current Biology** 12: 738-740, 2002.
- BONIERBALE, M.W., PLAISTED, R.L., TANKSLEY, S.D. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. **Genetics** 120: 1095-1103, 1988.
- CARVALHO, C.R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 127p. (Tese D.S.).
- CARVALHO, C.R., SARAIVA, L.S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. **Heredity** 70: 515-519, 1993.
- CARVALHO, C.R, SARAIVA, L.S. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. **Journal of Plant Research** 110:417-420, 1997.
- CASALI, V.W.D., COUTO, F.A. A Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe Agropecuário** 10 (113): 8-10, 1984.
- CASALI, V.W.D., PÁDUA, J.G., BRAZ, T.L. Melhoramento de pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário** 10 (113): 8-10, 1984.
- CLARK, M.S., WALL, W.J. **Chromosomes: the complex code**. Chapman & Hall, London, 345p. 1996.
- CONDE, E.G., LÓPEZ, R.M., JÁUREGUI, P.H., CAMACHO, M.G., ARROYO, R. *Trichomonas vaginalis*: Chromatin and mitotic spindle during mitosis. **Experimental Parasitology** 96: 130-138, 2000.

- CONTRERAS-PADILLA, M., YAHIA, E.M. Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chili peppers and relation with peroxidase activity. **Journal Agriculture Food Chemistry** 46: 2075-2079, 1998.
- CUÉLLAR, T., ORELLANA, J., VELASEN, E., BELLA, J.L. Chromosomal characterization and physical mapping of the 5S and the 18S-5.8S-25S ribosomal DNA in *Helianthus argophyllus*, with new data from *Helianthus annuus*. **Genome** 42: 110-115, 1999.
- DEEPESH, N., GHOSH, R. Localization of chromosome scaffold by transmitted- and incident-light fluorescence microscopy. **Current Science** 67 (2): 109-112, 1994.
- DEMIRTAS, H., CANDEMIR, Z., CÜCER, N., IMAMOGLU, N., DÖNMEZ, H., BÖKESÖY, I. Essay on the nucleoli survey by the α - and β -satellite DNA probes of the acrocentric chromosomes in mitogen-stimulated human lymphocytes. **Annales de Génétique** 43: 61-68, 2000.
- DOGANLAR, S., FRARY, A., DAUNAY, M.C., LESTER, R.N., TANKSLEY, S.D. A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae. **Genetics** 161: 1697-1711, 2002.
- DOLEZEL, J., CÍHALÍKOVÁ, J., LUCRETTI, S. A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L. **Planta** 188: 93-98, 1992.
- DOLEZEL, J., CÍHALÍKOVÁ, J., WEISEROVÁ, J., LUCRETTI, S. Cell cycle synchronization in plant root meristems. **Methods in Cell Science** 21: 95-107, 1999.
- EXBRAYAT, J.M. **Genome visualization by classic methods in light microscopy**. 195 p. Boca Raton, D.C.: CRC press. 2000.

FAO. **Agricultural production data collection** (disponível em <http://apps.fao.org>), 2002. Consultado em 25/03/2003.

FAO. **Agricultural production data collection** (disponível em <http://apps.fao.org>), 2003. Consultado em 25/03/2003.

FINATO, A.O., VARELLA-GARCIA, M., TAJARA, E.H., TADDEI, V.A., MORIELLE-VERSUTE, E. Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Eumops perotis* (Molossidae, Chiroptera). **Chromosome Research** 8: 563-569, 2000.

GARAGNA, S., RONCHETTI, E., MASCHERETTI, S., CROVELLA, S., FORMENTI, D., RUMPLER, Y., ROMANINI, M.G.M. Non-telomeric chromosomes localization of (TTAGGG)_n repeats in the genus *Eulemur*. **Chromosome Research** 5: 487-491, 1997.

GENDEL, S., FOSKET D.E. Differential rates of DNA denaturation and renaturation *in situ* in relation to the C-banding of *Allium cepa* chromosomes. **Cytobios** 21: 91-101, 1978.

GREILHUBER, J. Why plant chromosomes do not show G-bands. **Theoretical and Applied Genetics** 50: 121-124, 1977.

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

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology** 23: 1029-1041, 2000.

GUZZO, F., CAMPAGNARI, E., LEVI, M. A new FISH protocol with increased sensitivity for physical mapping with short probes in plants. **Journal of Experimental Botany** 51 (346): 965-970, 2000.

- HESLOP-HARRISON, J.S., SCHWARZACHER, T. Flow Cytometric and Chromosomes Sorting. In: FUKUI, K., NAKAYAMA, S. **Plant Chromosomes: laboratory methods**. Boca Raton: CRC, p. 85-106, 1996.
- HIBBS, A.R., SAUL, A. *Plasmodium falciparum*: Highly mobile small vesicles in the malaria-infected red blood cell cytoplasm. **Experimental Parasitology** 79: 260-269, 1994.
- HUBBELL, H.R. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. **Stain Technology** 60: 285-294, 1985.
- JOHN, A.T., ABRAHAM, S. Cytological abnormalities induced by red pepper in mouse bone marrow cells in vivo. **Caryologia** 47 (1): 53-58, 1994.
- JONES, K. Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. **The Botanical Review** 64 (3): 273-289, 1998.
- JONG, J.H., FRANZ, P., ZABEL, P. High resolution FISH in plants-techniques and applications. **Trends in Plant Science** 4: 258-263, 1999.
- JUAN, G., PAN, W., DARZYNKIEWICZ, Z. DNA segments sensitive to single-strand-specific nucleases are present in chromatin of mitotic cells. **Experimental Cell Research** 227: 197-202, 1996.
- KING, M. **Species evolution: the role of chromosome change**. Cambridge: Cambridge University, New York, USA, 336 p, 1993.
- KOBORI, R.F. **Controle da murcha de fitóftora (*Phytophthora Capsici*) em pimentão (*Capsicum annuum* L.) através da enxertia**. Botucatu-SP:UNESP, 1999. 138 p. (Tese D.S.).
- KUMAR, O.A, PANDA, R.C., RAO, G.R. Cytogenetics studies of the F1 hybrids of *Capsicum annuum* with *C. chinense* and *C. baccatum*. **Theoretical and Applied Genetics** 74: 242-246, 1987.

- LAGERCRANTZ, U. Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. **Genetics** 150: 1217-1228, 1998.
- LANTERI, S., PICKERSGILL, B. Chromosomal structural changes in *Capsicum annuum* L. and *C. chinense* JACQ. **Euphytica** 67: 155-160, 1993.
- LEE, J.H., ARUMUGANATHAN, K., KAEPLER, S.M., KAEPLER, H.F., PAPA, C.M. Cell synchronization and isolation of metaphase chromosomes from maize (*Zea mays* L.) root tips for flow cytometric analysis and sorting. **Genome** 39: 697-703, 1996.
- LEE, J.H., ARUMUGANATHAN, K., YEN, Y., KAEPLER, S.M., KAEPLER, H.F., BAENZIGER, P.S. Root tip cell cycle synchronization and metaphase-chromosome isolation suitable for flow sorting in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genome** 40: 633-638, 1997.
- LEFEBVRE, V., PALLOIX, A., CARANTA, C., POCHARD, E. Construction of an intra-specific integrated linkage map of pepper using molecular markers and double-haploid progenies. **Genome** 38: 112-121, 1995.
- LEFEBVRE, V., PFLIEGER, S., THABUIS, A., CARANTA, C., BLATTES, A., CHAUVET, J.C., DAUBÈZE, A.M., PALLOIX, A. Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. **Genome** 45: 839-854, 2002.
- LEVAN, A., FREDGA, A., SANDERBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position in chromosome. **Hereditas** 52: 201-220, 1964.
- LEWIN, L.M., GOLAN, R., FREIDLIN, P., SHOCHAT, L. 1999. A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometric. **Comparative Biochemistry and Physiology** 124: 133-137, 1999.

- LIU, W.S., FREDGA, K. Telomeric (TTAGGG)_n sequences are associated with nucleolus organizer regions (NORs) in the wood lemming. **Chromosome Research** 7: 235-240, 1999.
- LIVINGSTONE, K.D., LACKNEY, V.K., BLAUTH, J.R., WIJK, R.V., JAHN, M.K. Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the Solanaceae. **Genetics** 152: 1183-1202, 1999.
- LOHE, A.R., HILLIKER, A.J. Return of the H-word (heterochromatin). **Current Opinion in Genetic Development** 5: 746-755, 1995.
- LUCRETTI, S., DOLEZEL, J. Cell cycle synchronization, chromosome isolation, and flow-sorting in plants. **Methods in Cell Biology** 50: 61-83, 1995.
- McCLINTOCK, B. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**: 28, 459-463, 1942.
- McLEOD, M.J., ESHBAUGH, W.H., GUTTMAN, S.I., RAYLE, R.E. An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). **Evolution** 37: 562-574, 1983.
- McLEOD, M.J., GUTTMAN, S.I., ESHBAUGH, W.H. Genetics of Got in *Capsicum*. **Journal of Heredity**, v. 77, p. 469-470, 1986.
- MEYNE, J., BAKER, R.J., HOBART, H.H., HSU, T.C., RYDER, O.A., WARD, O.G., WILEY, J.E., WURSTER-HILL, D.H., YATES, T.L., MOYZIS, R.K. Distribution of nontelomeric sites of (TTAGGG)_n telomeric sequences in vertebrate chromosomes. **Chromosoma** 99: 3-10, 1990.
- MIÑO, C.P., PÉREZ, J.C., DÁVALOS, V., SÁNCHEZ, M.E., LEONE, P.E. Telomeric associations in cigarette smokers exposed to low levels of X-rays. **Mutation Research** 490: 77-80, 2001.

- MOSCONE, E.A., Chromosome studies on *Capsicum* (Solanaceae) I. Karyotype analysis in *C. chacoense*. **Brittonia** 42 (2): 147-154, 1990.
- MOSCONE, E.A. Estudios cromosomicos en *Capsicum* (Solanaceae) II. Analisis cariotipico de *C. parvifolium* y *C. annuum* var. *annuum*. **Kurtziana** 22: 9-18, 1993.
- MOSCONE, E.A., LAMBROU, M., EHRENDORFER, F. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution** 202: 37-63, 1996.
- MOSCONE, E.A., LAMBROU, M., HUNZIKER, A.T., EHRENDORFER, F. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution** 186: 213-229, 1993.
- MOSCONE, E.A., LOIDL, J., EHRENDORFER, F., HUNZIKER, A.T. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. **American Journal of Botany** 82: 276-287, 1995.
- NEUMANN, P., LYSÁK, M., DOLEZEL, J., MACAS, J. Isolation of chromosomes from *Pisum sativum* L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry. **Plant Science** 137: 205-215, 1998.
- OFFNER, S. Using Chromosomes to teach evolution. **The American Biology Teacher** 56 (2): 79-92, 1994.
- PARAN, I., AFTERGOOT, E., SHIFRISS, C. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. **Euphytica** 99: 167-173, 1998.
- PEREIRA, L.G., SOUZA, M.J. Nature and distribution of constitutive heterochromatin and NOR location in the grasshopper *Phaeoparia magacephala* (Romaleidae: Orthoptera). **Cytobios** 103 (403):111-119, 2000.

- PERES, J., MORAN P., GARCIA-VAZQUEZ, E. Cloning and physical mapping of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) telomeric sequences. **Heredity** 82: 409-414, 1999.
- PICKERSGILL, B. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). **Evolution** 25: 683-691, 1971.
- PICKERSGILL, B. Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In T. Tsuchiya and P.K. Gupta (eds.), **Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution**, part B, 139-160. Elsevier: Amsterdam, 1991.
- PINKEL D., STRAUME T., GRAY J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 83 (9): 2934-2938, 1986.
- PLANCHAIS, S.; GLAB, N.; INZÉ, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies (minireview). **Federation of European Biochemical Societies Letters** 476: 78-83, 2000.
- PRESTING, G.G., FRARY, A. Telomere-homologous sequences occur near the centromeres of many tomato chromosomes. **Molecular Gene Genetics** 251: 526-531, 1996.
- PRINCE, J.P., POCHARD, TANKSLEY, S.D. Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. **Genome** 36: 404-417, 1993.
- RAO, N.B., VALLI, T.S., LAKSHMI, N. Cytogenetics studies on the interspecific hybrid *Capsicum baccatum* L. x *C. frutescens* L. and its progeny. **Euphytica** 59: 135-140, 1992.
- REIFSCHNEIDER. **Capsicum. Pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, 2000. 113 p.

- ROGAN, P. K., CAZCARRO, P.M., KNOLL, J.H.M. Sequence-Based design of single-copy genomic DNA probes for Fluorescence In Situ Hybridization. **Genome Research** 11: 1086-1094, 2001.
- SATO, S. Color differential staining of NOR-associated heterochromatic segments using acridine orange. **Stain Technology** 63: 235-240, 1988.
- SAWYER, J.R., MILLER, J.P., ELLISON, D.A. Clonal telomeric fusions and chromosome instability in a subcutaneous sacrococcygeal myxopapillary ependymoma. **Cancer Genetic Cytogenetic** 100: 169-175, 1998.
- SHARMA, A.K., SHARMA, A. **Plant chromosomes: analysis, manipulation and engineering**. Harwood Academic Publishers, The Netherlands, 371p. 1999.
- SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC, Florida, United States, 390 p, 1993.
- SLIJEPCEVIC, P. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chromosoma** 107: 136-140, 1998.
- SLIJEPCEVIC, P., HANDE, M.P., BOUFFLER, S.D., LANSDORP, P., BRYANT, P.E. Telomere length, chromatin structure and chromosome fusigenic potential. **Chromosoma** 106: 413-421, 1997.
- SOUZA, R.J., CASALI, V.W.D. Cultivares de pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário** 10 (113): 14-18, 1984.
- SUMNER, A.T. **Chromosome banding**. London, Unwin Hyman, 434p. 1990.
- TANKSLEY, S.D. Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme-coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. **Chromosoma** 89: 352-360, 1984.

- TANKSLEY, S.D., BERNATZKY, R., LAPITAN, N.L., PRINCE, J.P. Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 85: 6419-6423, 1988.
- TANKSLEY, S.D., GANAL, J.P., PRINCE, M.C, VICENTE, D.E., BORNIERBALE, M.W. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics** 132: 1141-1160, 1992.
- TONG, N., BOSLAND, P.W. *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. **Euphytica** 109: 71-77, 1999.
- TORRES, G.A. **Morfologia e aspectos evolutivos dos cromossomos mitóticos de baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. Lavras MG: UFLA, 2001. 97 p. (Tesse D.S.).
- TYLER-SMITH, C., WILLARD, H.F. Mammalian chromosome structure. **Current Opinion in Genetic Development** 3: 390-397, 1993.
- VERMA, R.S., BABU, A. **Human chromosome: principles and techniques**. McGraw-Hill, Inc. New York, 419 p, 1995.
- VERMA, R.S, DOSIK, H., LUBS, H.A. Demonstration of color and size polymorphisms in human acrocentric chromosomes by acridine orange reverse banding. **The Journal of Heredity** 68: 262-263, 1977.
- VERMA, R.S., LUBS, H.A. A simple R banding technique. **American Journal of Human Genetics** 27: 110-117, 1975.
- VERMA, R.S., LUBS, H.A. Additional observations on the preparations of R-banded Human chromosomes with acridine orange. **Canadian Journal of Genetics and Cytology** 18: 45-50, 1976.

VERMA, R.S., PEAKMAN, D.C., ROBINSON, A. LUBS, H.A. Comparasion of G-, Q-, and R-banding in 28 cases of chromosomal abnormalities. **Cytogenetics Cell Genetics** 16: 479-486, 1976.