

JULIANA RORIZ AARESTRUP

ANÁLISE MORFOLÓGICA 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
2001

A Deus,
aos meus pais,
agradeço a oportunidade de viver.

Metamorfose

Aqui dentro, nesse recinto pequeno, escuro e abafado,
sinto medo, angústia, solidão; porém, proteção.

Não sei se é dia ou noite, se neva ou faz sol.
Como será o mundo lá fora?
Preto e branco ou colorido? Mas que seja menos sofrido.

Surpreendentemente, por um minúsculo orifício,
passa uma energia prateada.
Sinto-me mais forte. Parece que meus músculos surgiram do infinito.
- O que é isso, meu Deus? Solto um grito.

O orifício está se ampliando cada vez mais e, com ele,
sinto-me crescer.
Ao abrir os olhos, uma surpresa. Tudo é tão ... Quero andar, voar,
cantar.

Que coisa bonita! Isso é a vida!!

Juliana Roriz Aarestrup

AGRADECIMENTO

A Deus, pela paz e segurança, pelo conforto e ensinamento, nos momentos de desequilíbrio espiritual, cansaço e angústia.

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

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao meu pai, José Luiz Aarestrup Alves, pelo amor incondicional e pelos outros sentimentos nobres e fundamentais para que minha jornada fosse concluída com dignidade.

Ao meu irmão, Henrique Roriz Aarestrup Alves, pelo carinho e pelo ombro amigo que sempre me amparou nos momentos críticos.

Ao Cláudio Roberto Fernandes, pelas incansáveis e pacientes horas de incentivo, pela renúncia e dedicação, pelo amor e carinho.

À minha mãe, Vera Roriz da Costa Alves, pelos momentos alegres, pelas cartas de apoio e pelas boas risadas que demos juntas.

Aos meus avós, Agnes Aarestrup Alves e Arildes Alves Pereira (*in memoriam*), pela confiança no meu potencial e pelo apoio em mais essa conquista.

Às minhas amigas do coração, Andréa Raposo e Maria Rita de Cássia Campos, pelas várias horas de consolo e de conversa, pelas dicas, pelo carinho, pela diversão em festas, pelo companheirismo ...

Ao professor Carlos Roberto de Carvalho, pela orientação e dedicação no decorrer do curso.

Aos meus conselheiros, professor Wagner Campos Otoni e professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pela amizade, pela atenção e pelas consideráveis sugestões.

Aos professores Luiz Sérgio Saraiva e Sílvia das Graças Pompolo, pelas importantes contribuições científicas dadas ao trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Vegetal, Bárbara, Pedro, Juliana Lima, Ana Cristina, Wellington, Livia e Rúbia e do Laboratório de Citogenética de Insetos, Eliane e André, pela amizade, pelo apoio e pela diversão no ambiente de trabalho.

Aos meus amigos de Belo Horizonte, Izabella, Marilene, Sandrinha, Marcela, Zuleika, Daniela, Kércia, Luciano e Renato, pelas brincadeiras, cartas, pelos telefonemas, pelo incentivo e carinho.

Ao Luiz Arthur, pelo fornecimento das sementes, que proporcionaram o desenvolvimento do meu trabalho e, também, pela amizade.

Ao José Francisco (Zé Chico), pela colaboração profissional e pelo convívio sempre agradável.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, professor Paulo Sávio Lopes, pela atenção e disponibilidade.

A todos os professores, pela contribuição no meu crescimento profissional.

Aos colegas do curso, que tornaram mais agradável essa etapa de minha vida.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e do Departamento de Biologia Geral, particularmente à Rita, pelo carinho, auxílio e colaboração sempre que requisitados.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos, o meu sincero muito obrigada.

BIOGRAFIA

JULIANA RORIZ AARESTRUP, filha de José Luiz Aarestrup Alves e Vera Roriz da Costa Alves, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, no dia 24 de fevereiro de 1973.

Concluiu seus estudos de primeiro grau na escola Hotto Von Gericke, em Berlim, Alemanha, e de segundo grau no Colégio Roma, em Belo Horizonte, M G.

Em 1994, ingressou na Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, graduando-se bióloga em dezembro de 1997.

Durante o período de graduação, foi monitora da disciplina Morfologia Vegetal I e estagiária do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, onde desenvolveu atividades de pesquisa em Sistemática Vegetal.

Em outubro de 1998, iniciou o Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em março de 2001.

CONTEÚDO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. A importância da citogenética.....	5
2.2. Aspectos morfológicos dos cromossomos.....	8
2.3. Técnicas de coloração e bandeamento cromossômico.....	12
2.3.1. Coloração com Giemsa.....	13
2.3.2. Bandeamento com DAPI.....	13
2.3.3. Bandeamento Q.....	17
2.3.4. Bandeamento C.....	20
2.3.5. Bandeamento NOR (Ag-NOR).....	22
2.4. Variações cromossômicas e evolução cariotípica.....	29

2.5.O gênero <i>Capsicum</i>	48
2.5.1. Taxonomia e evolução.....	48
2.5.2. Origem e domesticação.....	52
2.5.3. Características qualitativas e importância comercial.....	54
2.5.4. Aspectos citogenéticos e moleculares.....	59
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
3.1. Material.....	78
3.2. Métodos.....	79
3.2.1. Armazenamento e germinação das sementes.....	79
3.2.2. Preparação do material citogenético.....	79
3.2.2.1. Pré-tratamento e fixação de raízes.....	79
3.2.2.2. Maceração enzimática.....	81
3.2.2.3. Técnica de dissociação celular e secagem ao ar..	81
3.2.3. Técnicas de coloração e bandeamento cromossômico..	82
3.2.3.1. Coloração uniforme com Giemsa.....	82
3.2.3.2. Bandeamento com DAPI.....	83
3.2.3.3. Bandeamento Q.....	84
3.2.3.4. Bandeamento C.....	85
3.2.3.5. Bandeamento NOR (Ag-NOR).....	85
3.2.4. Fotografia e análise de imagem.....	86
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
4.1. Preparação do material citogenético.....	87
4.2. Análise do cariótipo.....	89
4.2.1. Coloração uniforme com Giemsa.....	89

4.2.2. Coloração com DAPI.....	92
4.3. Distribuição da heterocromatina.....	99
4.4. Bandeamento NOR(Ag-NOR).....	105
4.5. Evidências de rearranjos cromossômicos.....	108
5. CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

RESUMO

AARESTRUP, Juliana Roriz, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Análise morfológica dos cromossomos de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Conselheiros: Wagner Campos Otoni e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Capsicum é um dos membros mais importantes, economicamente, da família Solanaceae. De suas 25 espécies, cinco são extensivamente cultivadas, principalmente pelo seu valor agrônomo como especiaria. Apesar desta importância econômica, estudos citogenéticos para a compreensão de aspectos carioevolutivos das espécies de *Capsicum* ainda não foram realizados. *C. annuum* L., a espécie mais cultivada do gênero, não teve seu cariótipo claramente caracterizado quanto à morfologia cromossômica. No presente trabalho, diversas técnicas citogenéticas foram aplicadas em linhagens e variedades cultivadas de *Capsicum annuum* L., com o objetivo de caracterizar o cariótipo da espécie. A eficiência dos pré-tratamentos, utilizando 8-hidroxiqiloneína, amiprofos-metil, orizalina, trifluralina e brometo de etídio, em diferentes concentrações e tempos de exposição,

foi verificada em meristemas radiculares. A preparação das lâminas pela técnica de dissociação celular e secagem-ao-ar com maceração enzimática foi realizada em cromossomos fixados. Com metodologias citogenéticas de coloração convencional e bandeamentos DAPI, Q, C e NOR (Ag-NOR), foi possível elaborar kariogramas e idiogramas, pelo cálculo do índice centromérico, da área e do perfil de densidade óptica média e pelas medidas absolutas e relativas dos cromossomos. Dentre as principais características citogenéticas encontradas, nas amostras estudadas, destacou-se o kariótipo com $2n=24$ cromossomos, composto de 11 pares metacêntricos, semelhantes morfológicamente, e 1 par acrocêntrico. Não se observaram regiões positivas em cromossomos submetidos às técnicas de bandejamento DAPI, Q e C. A técnica de bandejamento NOR (Ag-NOR) evidenciou apenas uma região organizadora nucleolar localizada, distalmente, no braço curto do par cromossômico de número 8. Verificou-se a presença de outras constrições secundárias, que sugerem ser vestígios citogenéticos de rearranjos por fusão de cromossomos.

ABSTRACT

AARESTRUP, Juliana Roriz, M.S., Universidade Federal de Viçosa, march of 2.001. **Morphologic analysis of pepper (*Capsicum annuum* L.) chromosomes.** Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Committee members: Wagner Campos Otoni and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Economically, *Capsicum* is one of the most important members of the Solanaceae family. Five of its 25 species are extensively cultivated, mainly because of its agronomic value as spices. Despite its economical importance, cytogenetic studies for the comprehension of the caryevolutionary aspects of the *Capsicum* species still have not been made. This way, *C. annuum* L. hasn't had its caryotype clearly characterized as far as its morphology chromosome. In this study many cytogenetic techniques were applied to lines and variety of *C. annuum* L. cultivated, with the main goal of having its caryotype characterized. The efficiency of the pre-treatment using 8-hydroxiuilonein, amiprofos-metil, oryzalin, tryfluralin and ethidium

bromide, in different concentration and exposition time, was verified in radical meristems. The slide preparation using the cell disassociation technique and air dryness with enzymatic maceration was done in fixed chromosomes. With cytogenetic methodology of conventional coloring and banding DAPI, Q, C and NOR (Ag-NOR) it was possible to elaborate caryograms and idyograms, by the index of the centromeric calculus, the area and the profile of optical median density and by absolute and relative measurements of the chromosomes. Among the mainly cytogenetic characteristics found, distinguish the karyotype with $2n=24$ chromosomes, formed by 11 metacentric pairs, morphologically similar, and one nucleolar organized region, located at the end of the short arm on the number 8 pair. It was verified the presence of other secondary constrictions, which suggested being cytogenetic vestiges of rearrangements by fusion of chromosomes.

1. INTRODUÇÃO

A citogenética, ciência que surgiu com a associação da citologia com a genética (GIANNONI et al., 1988; GUERRA, 1988), propõe análises do genoma, fornecendo informações sobre a peculiaridade das espécies. Essa área de estudo, que proporciona conhecimentos com relação à organização genômica, é indispensável na contagem do número cromossômico, na observação da morfologia de cromossomos mitóticos e meióticos, no estabelecimento de padrões cariotípicos, e na análise do comportamento meiótico de híbridos intra-específicos e interespecíficos (BERTÃO, 1993; SHI et al., 1996).

Desde 1960, houve um incremento do interesse em desenvolver tecnologias auxiliares à caracterização citogenética dos cromossomos (BERTÃO, 1993). Burkholder (1988) e Macgregor (1993), citados por CARVALHO (1995), relataram que o progresso da citogenética, no que diz respeito à melhoria da qualidade de preparações cromossômicas, promoveu a expansão dessa ciência, bem como a sua interação com a bioquímica e o melhoramento vegetal e animal. Segundo HESLOP-HARRISON e SCHWARZACHER (1993), a integração entre a citogenética e a biologia

molecular permitiu o surgimento da citogenética molecular, auxiliando na compreensão de fenômenos genéticos das espécies.

Técnicas de bandeamentos cromossômicos e de alta resolução têm sido desenvolvidas, fornecendo informações significativas sobre a origem, localização e quantidade de heterocromatina, além de auxiliar em estudos evolutivos (GUERRA, 1988; CREMONINI, 1992; BERTÃO, 1993; MOSCONE et al., 1993; KAMSTRA et al., 1997).

No gênero *Capsicum* (Solanaceae), acessos para a compreensão dos aspectos evolutivos têm incluído investigações de comparação morfológica, análise cariotípica e estudos de melhoramento genético (Mc LEOD et al., 1983). Entretanto, pesquisas citogenéticas que auxiliem na verificação das relações interespecíficas nesse gênero ainda não foram realizadas (KUMAR, 1987).

Alguns sistematas têm designado todos os pimentões como derivados de uma única espécie ancestral, enquanto outros têm proposto múltiplas e independentes linhas de domesticação (Mc LEOD et al., 1986). Ainda, segundo BERTÃO (1993), cruzamentos entre espécies selvagens e cultivadas de pimentão são possíveis, o que coloca em dúvida se todas as espécies existentes do gênero foram descritas na literatura.

Análises citogenéticas de cromossomos mitóticos evidenciaram que as espécies de *Capsicum* são diplóides (BERTÃO, 1993; MOSCONE et al., 1993), e permitiram observar alterações no número e no comprimento cromossômicos, como também na posição e no número de constrições secundárias (PICKERSGILL et al., 1979; KUMAR et al., 1987; BERTÃO, 1993). O número básico $X=12$ é típico não somente do gênero, mas de toda a família Solanaceae (MOSCONE, 1990).

Segundo MOSCONE (1999), a heterocromatina constitutiva em cromossomos de *Capsicum* ainda não tem sido bem estudada, desde o trabalho de Shopova (1996), que apresentou dados muito provisórios sobre algumas espécies do gênero. Em nível celular, o método de marcação com prata, o qual demonstra atividade gênica de sítios rDNA, foi aplicado em

Capsicum, pela primeira vez, por MOSCONE et al. (1995). Muitos membros do gênero apresentaram variações intra-específicas na morfologia cromossômica. Observou-se que escassas diferenças de tamanho e de morfologia na maioria dos cromossomos dificultam suas corretas identificações por métodos convencionais de coloração.

Dentro da espécie *C. annuum*, as variedades selvagens apresentam maior quantidade de variação cariotípica do que as variedades cultivadas. Os efeitos da domesticação, nessa espécie, incluem a diversidade cariotípica. Em *Capsicum*, a diversidade genética poderá ser mais bem relatada por amostragens de diferentes populações. Quebras cromossômicas seguidas de rearranjos estruturais têm ocorrido durante a divergência de diferentes espécies do gênero. Contudo, a diversidade genética dentro de espécies cultivadas tem sido pouco explorada (PICKERSGILL, 1997).

Alterações cromossômicas ou variações estruturais, tais como duplicações, inversões, deleções e translocações, podem ser localizadas, e o reconhecimento da região do cromossomo afetada pode ser feito pelos padrões de bandas (SUMNER, 1990). As trocas cromossômicas têm sido usadas na construção de novos cariótipos e, no meio ambiente, permitido a evolução e a especiação de várias culturas (SINGH, 1993).

Translocações espontâneas em *Capsicum* foram observadas, pela primeira vez, por ABIDA et al., em 1984. Rearranjos cromossômicos foram estudados em espécies do gênero (PRAKASH et al., 1992). Análises de outras espécies de Solanaceae mostraram que genes ribossomais em plantas têm a habilidade de mudar de posição entre os cromossomos do genoma (LEFEBVRE et al., 1995). Essas alterações cromossômicas estruturais indicam a importância desses eventos na evolução do gênero e dentro das espécies de *C. annuum* (CONICELLA et al., 1990).

Dentro desse contexto, o presente estudo citogenético de *Capsicum annuum* L. teve os seguintes objetivos:

- a) Caracterizar o cariótipo quanto ao número e à morfologia dos cromossomos metafásicos mitóticos;
- b) Aplicar técnicas de bandeamentos DAPI, Q, C e Ag-NOR em cromossomos mitóticos;
- c) Montar o kariograma e o idiograma da espécie;
- d) Determinar a área e o perfil de densidade dos cromossomos mitóticos com o uso da metodologia de análise de imagem; e
- e) Verificar se as características identificadas na morfologia dos cromossomos da espécie permitem esclarecer alguns aspectos evolutivos de seu cariótipo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A importância da citogenética

No início do século XX, estabeleceu-se a importância fundamental dos cromossomos na herdabilidade de características genéticas. Análises genômicas foram iniciadas em 1930 e 1940 (OHMIDO, 1995). Burkholder (1988), citado por CARVALHO (1995), relatou que investigações citogenéticas têm sido realizadas em nível da organização do material nuclear e da sua transmissão para seus descendentes.

Longley (1937), citado por CAIXETA (1998), relatou que o estudo da morfologia dos cromossomos, tal como o tamanho cromossômico, permitiu a caracterização individual do complemento genômico de plantas e animais pelos primeiros pesquisadores, no final do século XIX. Segundo GIANNONI et al. (1988) e SYBENGA 1992), a análise do genoma, em termos de número e morfologia cromossômicos, é chamada cariótipo, que é típico de cada espécie. Os cromossomos podem ser visualizados por microscopia ótica, já que, durante a divisão celular, mais precisamente na fase de metáfase mitótica, a dimensão e a localização das constrições

primária (centrômero) e secundária (região organizadora nucleolar) podem ser observadas com facilidade.

Funcionalmente, os aspectos morfológicos mais importantes dos cromossomos são o centrômero, a constrição secundária e o telômero (GUERRA, 1988; SYBENGA, 1992).

O centrômero corresponde a uma constrição limitante em cromossomos metafásicos mitóticos e, normalmente, é um componente estrutural único e visível (THOMPSON et al., 1991; SYBENGA, 1992). É o local onde ocorre a reunião das cromátides-irmãs. Ao final da divisão celular, as cromátides se separam, sendo denominadas de cromossomos (GIANNONI et al., 1988; CHOO, 1997). Termos especiais são usados para designar a posição do centrômero: mediano, submediano, subterminal e terminal; e os cromossomos com as correspondentes posições centroméricas: metacêntrico, submetacêntrico, subacrocntrico e telocêntrico (SYBENGA, 1992; FUKUI e NAKAYAMA, 1996).

Como resultado de rearranjos cromossômicos, alguns cromossomos apresentam dois centrômeros. Na maioria dos casos, a presença de dois centrômeros resulta em irregularidades durante a divisão nuclear por causa da orientação independente das partes irmãs. Algumas vezes, um dos centrômeros é inativado. Quando essa inativação é completa, a constrição não é visível e ocorre ausência de proteínas centroméricas específicas no local. Caso essa inativação seja incompleta, alguma proteína centromérica específica pode estar presente, e a constrição se torna visível, apesar de não apresentar nenhuma ação clara de microtúbulos (SYBENGA, 1992).

A região organizadora nucleolar (NOR) é um segmento cromossômico que apresenta gene cópias múltiplas (de 500 a 1.000 cópias) dos dois maiores fragmentos 18S e 28S de rRNA (SYBENGA, 1992; FUKUI e NAKAYAMA, 1996; CAIXEIRO, 1999). O gene que codifica o menor fragmento de rRNA (5S), que também é representado em cópias múltiplas, está localizado em outra região do genoma, distribuído em muitos locos ou

concentrado em apenas um loco (SYBENGA, 1992; CAIXEIRO, 1999). Durante o estágio de contração mitótica dos cromossomos, a NOR ativa na fase de interfase se torna visível como uma constrição, denominada de constrição secundária. Essa região cromossômica constitui uma característica morfológica e funcional importante, quando presente no cromossomo (SYBENGA, 1992).

Os telômeros são estruturas localizadas nas extremidades distais dos cromossomos e que promovem a proteção das terminações de DNA contra o ataque de nucleases ou contra a fusão cromossômica (SYBENGA, 1992; KIPLING, 1995). Quando um cromossomo é seccionado e ocorre perda do telômero, a extremidade terminal formada apresenta forte tendência de se associar a outro fragmento cromossômico. Dessa forma, alterações cromossômicas e genômicas podem surgir (GUERRA, 1988; KIPLING, 1995).

Moys et al., em 1989, citaram que a caracterização telomérica de *Arabidopsis* e de humanos tem revelado que a estrutura e a sequência de DNA da maioria dos telômeros de eucariotos são muito similares. Na maioria dos organismos estudados, o telômero consiste de muitas cópias repetidas em *tandem* de sequências ricas em adenina e timina (AT). Os telômeros mostram função na manutenção da estrutura e da integridade dos cromossomos. Suas estruturas dinâmicas (diminuem de tamanho com certa facilidade) são características peculiares da replicação telomérica. Em muitos eucariotos, os telômeros estão associados, citogeneticamente, a outras sequências de DNA repetidas em *tandem*, chamadas de DNA satélite. Por hibridização *in situ*, tem sido demonstrado que o DNA satélite está localizado perto ou dentro dos telômeros (GANAL et al., 1991).

Heitz, em 1928, introduziu o conceito de eucromatina e de heterocromatina. O autor mostrou, por técnicas de coloração simples, que certos segmentos cromossômicos, denominados de heterocromatina constitutiva, permanecem visíveis após a fase de telófase do ciclo mitótico.

Em contraste, a eucromatina se descondensa e é indistingüível, na forma de corpos cromossômicos discretos, após a telófase (SUMNER, 1990).

2.2. Aspectos morfológicos dos cromossomos

As metodologias de pesquisa desenvolvidas com a finalidade de verificar a estrutura e os componentes químicos cromossômicos têm proporcionado refinamentos graduais da citogenética. Essas metodologias promoveram a resolução detalhada de cromossomos no que diz respeito à localização de locos gênicos e à análise de seus componentes químicos. Esse foi um passo significativo na ciência, já que o estudo da estrutura, função e do comportamento dos componentes cromossômicos são de grande importância na compreensão da biodiversidade e evolução das espécies (SHARMA e SHARMA, 1999).

Cromossomos prometafásicos, especialmente de plantas com cromossomos pequenos e que se condensam intensamente no estágio metafásico, têm sido conhecidos por proporcionarem informações importantes, e que não poderiam ser vistas se os cromossomos não estivessem em um grau menor de compactação (CLARK e WALL, 1992; FUKUI e NAKAYAMA, 1996).

Cromossomos mais distendidos também podem ser bandeados (apresentando maior número de bandas), e a principal importância de sua utilização em estudos morfológicos tem sido a determinação exata das bandas e dos pontos de quebra-fusão, quando ocorrem alterações cromossômicas (THERMA e SUSMAN, 1992). Dessa forma, as técnicas de bandejamento cromossômico têm contribuído para a identificação de alterações cromossômicas e seus locais de ocorrência no genoma (GIANNONI et al., 1988).

A obtenção de células metafásicas normais sem o uso de técnicas físicas ou químicas, não é um caminho viável para a análise detalhada do genoma de uma espécie, pois os cromossomos não se apresentam de forma linear (SYBENGA, 1992). SUMNER, em 1990, relatou que o tratamento de células com várias substâncias produz efeitos significativos na aparência dos cromossomos.

Segundo RIEGER et al. (1991) e KING et al. (1993), os termos C metáfase, C meiose e C mitose se referem às metáfases obtidas pelo tratamento de uma população de células com substâncias de ação bloqueadora. O acúmulo de figuras metafásicas ocorre pelo bloqueio parcial ou completo da formação das fibras do fuso que, normalmente, direcionam a distribuição cromossômica na célula.

As técnicas de preparações cromossômicas surgiram com o desenvolvimento de métodos que proporcionaram a obtenção de cromossomos espalhados sobre a lâmina. Muitas das técnicas de pré-tratamentos foram elaboradas para obter coleções de células mitóticas com metáfases sem sobreposições de cromossomos (SYBENGA, 1992; FUKUI e NAKAYAMA, 1996). Esses métodos, denominados de pré-tratamentos, têm sido utilizados com alguns propósitos: ocorre paralisação da formação das fibras do fuso por causa do aumento da viscosidade do citoplasma (SYBENGA, 1992; SINGH, 1993; SHARMA e SHARMA, 1999), proporcionando, assim, o acúmulo maior do número de células metafásicas; e os cromossomos são compactados longitudinalmente. Contudo, as constrições primárias e secundárias (quando presentes) aparecem distintas e fáceis de serem detectadas (RIEGER et al., 1991; SINGH, 1993; SHARMA e SHARMA, 1999); as soluções de fixação penetram com mais facilidade no material por causa da remoção de material celular dispensável (SINGH, 1993).

Alguns agentes bloqueadores afetam partes eucromáticas e outros, regiões heterocromáticas dos cromossomos (SUMNER, 1990). Como consequência, após tratamento adequado, os cromossomos permanecem

distendidos, retilíneos e bem espalhados, o que permite a caracterização detalhada do cariótipo da espécie em estudo (SUMNER, 1990; SYBENGA, 1992).

Segundo SHARMA e SHARMA (1999), a formação das fibras do fuso depende do equilíbrio entre a viscosidade citoplasmática e os componentes dessas fibras. Qualquer alteração do estado coloidal do citoplasma acarreta um distúrbio nos mecanismos da fibra, reduzindo a sua força de ligação aos cromossomos. Essa modificação celular também afeta os cromossomos que apresentam hidratação diferencial de seus segmentos. Nessas condições, as constrições surgem como regiões mais claras.

Testes comparativos de vários pré-tratamentos são realizados com o intuito de se fazer contagens cromossômicas (KATO, 1997). A colchicina é um agente bloqueador muito utilizado para obter células metafásicas, quando administrada em baixa concentração (cerca de 0,5%). É uma substância presente nas células da raiz de *Colchicum autumnale*, que foi isolada, pela primeira vez, por Zeisel, em 1883. Sua reação química promove modificação da viscosidade do citoplasma, e é ativa em uma larga faixa de temperatura (SYBENGA, 1992; SHARMA e SHARMA, 1999). Estudos realizados com feijão demonstraram que o uso de colchicina facilita a entrada do fixador na célula (SINGH, 1993), mantendo a integridade dos cromossomos sem causar distorções (SHARMA e SHARMA, 1999).

Os herbicidas têm sido utilizados, também, pelo mesmo fundamento do uso da colchicina. Pesquisando-se essas substâncias, observou-se que elas apresentam afinidade maior pela tubulina das fibras do fuso do que a colchicina. Dessa forma, também podem ser úteis em pré-tratamentos de células. Os herbicidas mais empregados são: 8-hidroxiquinoleína, hidroxiuréia, amiprofos-metil (APM), trifluralina e orizalina (KATO, 1997a).

De acordo com SINGH (1993), o uso da 8-hidroxiquinoleína em estudos cromossômicos é útil por proporcionar boa visualização das

constricções primária e secundária. Contudo, o bloqueador altera a viscosidade dos cromossomos, favorecendo, assim, a sua aglomeração.

O óxido de nitrogênio é uma substância gasosa que também apresenta um efeito antimicrotúbulo, e tem sido usada em trigo (KIHARA e TSUNEWAKI, 1960; HANSEN et al., 1988), cevada (SUBRAHMANYAM e KASHA, 1975) e batata (MONTEZUMA-DE-CARVALHO, 1967).

Tratamentos de congelamento-aquecimento-congelamento aumentam a condensação e a dispersão dos cromossomos de milho (KATO, 1997). Em geral, a etapa a frio é realizada por 18 a 24 horas, pois tempos mais longos de exposição ocasionam a formação de cromossomos muito compactados em cereais (SINGH, 1993).

O brometo de etídio é um fluorocromo que pode ser utilizado tanto na coloração (técnicas de bandeamentos) como, também, nos pré-tratamentos dos cromossomos. Quando administrado em doses adequadas, promove a obtenção de cromossomos metafásicos menos condensados. Dessa forma, cromossomos menos retorcidos e com suas estruturas evidentes podem ser visualizados (FUKUI e NAKAYAMA, 1996).

A aplicação de soluções fixadoras também tem sido realizada por manterem as células no estágio de divisão sem causar a distorção dos cromossomos (SINGH, 1993). Particularmente, o uso de solução fixadora de metanol-ácido-acético tem sido conveniente por proporcionar aumento relativo do número de preparações de boa qualidade (GOSDEN, 1994).

Emsweller e Stuart (1944), citados por FUKUI e NAKAYAMA (1996), sugeriram, pela primeira vez, a possibilidade do uso de maceração enzimática para preparar boas amostras de cromossomos de plantas. A combinação dessa metodologia com a técnica de secagem-ao-ar é usada, com sucesso, em muitas investigações científicas. Conforme SYBENGA (1992), a maceração é necessária para auxiliar no espalhamento dos cromossomos sobre a lâmina. Entretanto, macerações de longa duração destroem ou reduzem a estabilidade cromossômica.

2.3. Técnicas de coloração e bandeamento cromossômico

Segundo SUMNER (1990), o termo bandeamento cromossômico se refere ao processo de produção de bandas por meio de variação das propriedades de coloração ao longo do cromossomo. Em muitos casos, os cromossomos são submetidos a pré-tratamentos e à coloração com corantes, objetivando revelar o nível de organização cromossômica.

Darlington e La Cour (1938) foram os primeiros pesquisadores a observar cromossomos bandeados, com possibilidades de diferenciar pares de cromossomo (CREMONINI, 1992). Desde a sua descoberta, o bandeamento cromossômico emergiu como uma ferramenta importante na identificação dos pares de homólogos e segmentos cromossômicos (RICHER e DROUIN, 1990; SHARMA e SHARMA, 1999), já que as técnicas convencionais de coloração não permitiam a diferenciação dos cromossomos com morfologia semelhante (SHARMA e SHARMA, 1999).

Análises estruturais, morfológicas e funcionais dos cromossomos, utilizando técnicas de bandeamento, têm sido realizadas com o objetivo de ampliar os conhecimentos cariotípicos e evolutivos de espécies de plantas e animais (SUMNER, 1990). Regiões cromossômicas, funcionalmente diferenciadas como regiões nucleolares ou ribossomais, possuem padrões específicos de bandeamentos após coloração com corantes específicos para DNA (FUKUI e NAKAYAMA, 1996; SHARMA e SHARMA, 1999).

Experimentos foram desenvolvidos com a finalidade de determinar o efeito de vários tratamentos em proteínas histônicas e não-histônicas, quando realizados em bandeamentos cromossômicos. Os resultados demonstraram a ocorrência de alterações quantitativas e qualitativas dessas proteínas com a utilização das técnicas de bandeamento. Assim, cada técnica de bandeamento produz alterações protéicas (BURKHOLDER e DUCZEK, 1982).

2.3.1. Coloração com Giemsa

O Giemsa é um corante que marca os cromossomos, mesmo quando estes são muito pequenos. Entretanto, por coloração convencional, as regiões densamente coradas podem não ser notadas por causa da densidade da cromatina (GUERRA, 1988).

De acordo com SYBENGA (1992), a apresentação do cariótipo simplesmente pelo cariograma corado por coloração uniforme com Giemsa não é o suficiente, pois essa metodologia não é capaz de especificar todas as características morfológicas necessárias para a identificação individual dos cromossomos. O problema se torna ainda maior quando o genoma é composto de cromossomos morfolologicamente semelhantes, pois podem ocorrer vários equívocos na ordenação dos cromossomos com base no comprimento e posição centromérica.

Algumas substâncias podem afetar a estrutura cromossômica de tal maneira que, corando-os apenas por coloração convencional ou Giemsa, os cromossomos já apresentam bandas (SUMNER, 1990; SYBENGA, 1992). Em roedores *Clyomys laticeps*, os cromossomos corados com Giemsa permitiram a visualização de um par de constrições secundárias, as quais foram confirmadas como regiões organizadoras nucleolares pela técnica de bandeamento Ag-NOR (GUERRA, 1988).

2.3.2. Bandeamento com DAPI

Uma grande variedade de fluorocromos tem sido usada na marcação de cromossomos e na produção de padrões característicos de fluorescência (VERMA e BABU, 1995) por proporcionarem uma análise mais refinada das amostras cromossômicas (SHARMA e SHARMA, 1999). Os fluorocromos ou substâncias fluorescentes podem ser categorizados em dois

tipos diferentes, com relação às suas afinidades pelos pares de bases do DNA, que são adenina e timina ou citosina e guanina (VERMA e BABU, 1995).

Muitos dos procedimentos de marcação são amplamente utilizados em padrões de bandeamento, quando em combinação com outro DNA ligante apropriado. Esses métodos envolvem a marcação dos cromossomos com duas substâncias quimicamente diferentes e, também, são conhecidos como dupla marcação e contraste. O fluorocromo, cuja fluorescência é observada, é designado como marcador primário, enquanto que o DNA ligante é o contrastante, que não apresenta a mesma intensidade de fluorescência (VERMA e BABU, 1995).

O DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole) é um fluorocromo que se liga, preferencialmente, às regiões cromossômicas ricas em bases nitrogenadas adenina e timina (AT). Como essa substância fluoresce na presença de estruturas compostas de DNA, a sua utilização na produção de bandas vem sendo realizada com sucesso (GALBRAITH et al., 1995; FUKUI e NAKAYAMA, 1996).

O método de bandeamento cromossômico fluorescente foi aplicado em espécies de Pinaceae, e revelou ser uma ferramenta útil para a identificação individual de cromossomos. Os cromossomos de *P. jezoensis* var. *jezoensis* e *P. jezoensis* var. *hondoensis* foram submetidos à coloração com DAPI para relatar a relação filogenética dentro do gênero *Picea* (HIZUME et al., 1989).

Segundo Schweizer (1976), preparações cromossômicas têm sido feitas com os fluorocromos DAPI e Cromomicina A₃, produzindo padrões de bandeamentos complementares de acordo com a composição de bases do DNA (AMBROS e SUMNER, 1987).

Essa metodologia foi aplicada em espécies de *Pinus* e *Larix*. A marcação com DAPI/ cromomicina A₃ indicou que o DAPI tem preferência pelas bases AT do DNA, enquanto que a cromomicina A₃ fluoresce na

presença da base guanina. Desse modo, as regiões coradas com cromomicina A₃ permaneceram escuras com o DAPI. Com o auxílio dessas duas substâncias, o cariótipo da espécie foi caracterizado. No gênero *Picea*, os padrões de bandeamento forneceram dados importantes sobre a filogenia das espécies (HIZUME et al., 1989).

O bandeamento fluorescente com DAPI e Cromomicina A₃ foi realizado em espécies de *Citrus*. Verificou-se o potencial da técnica em seis espécies, em que cada genoma pôde ser distinguido e os cromossomos do complemento das espécies foram diferenciados entre si, mostrando padrões cromossômicos distintos. A morfologia e o tamanho cromossômicos, bem como a posição centromérica, foram demonstrados com facilidade. Observou-se grande quantidade de heterocromatina, sendo a maior parte corada com DAPI. Os resultados revelaram alto grau de heterozigosidade das espécies. Os padrões de bandeamento, nesse gênero, demonstraram que a técnica tem utilidade em estudos evolutivos e em programas de melhoramento. Os resultados indicam, quanto à evolução no gênero, que os padrões de bandeamento não trouxeram evidência clara sobre eventos de translocação ou inversão cromossômicas, mas consideram a hipótese de origem híbrida de algumas espécies (GUERRA, 1993).

Schweizer (1976), citado por AMBROS e SUMNER (1987), relatou que a técnica DAPI/ Cromomicina A₃ foi utilizada para comparar a produção de bandas em cromossomos mitóticos e meióticos de células humanas. Os cromômeros de cromossomos paquitênicos mostraram-se DAPI positivos e Cromomicina A₃ negativos. Os dados sugeriram que a maioria dos cromômeros em cromossomos paquitênicos humanos são correspondentes às bandas DAPI positivas em cromossomos mitóticos. Verificou-se que as regiões teloméricas da maioria dos cromossomos humanos apresentam propriedades de marcação distintiva, o que indica que essas regiões são compostas por constituições singulares de DNA.

Sumner (1982) relatou que os cromossomos mostraram maior intensidade da fluorescência quando corados com DAPI do que quando submetidos à coloração com Cromomicina A₃. Portanto, cromômeros paquitênicos humanos, por serem DAPI positivos, possuem seus conteúdos de DNA ricos em bases adenina e timina. Contudo, a porção de cromômeros dos telômeros mostram propriedades opostas, pois fluorescem fortemente com Cromomicina A₃ e fracamente com DAPI. Assim, os telômeros são caracterizados como regiões de DNA ricas em bases citosina e guanina (AMBROS e SUMNER, 1987).

Segundo GUERRA (1989), Schweizer (1976) informou que, para fornecer uma compreensão melhor sobre as características cariológicas, os cromossomos de *Azima tetracantha* foram marcados com DAPI e cromomicina A₃, verificando-se, assim, a arquitetura cromossômica e a constituição heterocromática. Os resultados sugerem que a heterocromatina dessa espécie apresenta maior quantidade de DNA rico em bases citosina e guanina (CG), pois a região se cora, mais freqüentemente, com cromomicina do que com DAPI. Quanto aos cromossomos acrocêntricos, indicou que apresentam os braços longos muito similares aos braços dos cromossomos metacêntricos, levando à hipótese de que evento do tipo fissão cêntrica pode ter ocorrido durante a evolução desse grupo.

Conforme relatos de OKADA (1991), estudos comparativos entre a marcação com DAPI/cromomicina A₃ e o bandeamento C contribuíram para análises da diversidade citogenética na espécie *Aconitum sanyoense*.

A heterocromatina constitutiva de plantas e animais, freqüentemente, contém grande quantidade de seqüências de DNA repetitivo. John e Miklos (1979) relataram que, contudo, pouco se sabe sobre as suas funções e os princípios que governam sua evolução. Os segmentos cromossômicos heterocromáticos podem influenciar na quantidade e na localização de recombinações meióticas (DEUMLING, 1982).

Em alguns grupos de plantas superiores, ocorrem diferenças interespecíficas na quantidade e na distribuição da heterocromatina constitutiva, proporcionando os estudos de taxonomia em nível do DNA. *Scilla siberica* possui a maior parte de seu DNA satélite e de sua heterocromatina já estudados. Para ampliar ainda mais os conhecimentos citológicos da espécie, foram utilizadas técnicas de bandeamento fluorescente com quinacrina, DAPI e cromomicina A₃. Em alguns casos, a fluorescência diferencial da heterocromatina foi influenciada pela duração da fixação do material. Esse dado sugere que outros constituintes cromatínicos (além do DNA), provavelmente proteínas, também são marcados pelo fluorocromo (DEUMLING, 1982).

2.3.3. Bandeamento Q

Em 1968, Caspersson e outros autores publicaram seus primeiros trabalhos, utilizando a coloração de cromossomos com uma substância fluorescente ou fluorocromo, conhecida como quinacrina mostarda (SUMNER e EVANS, 1973; LIN, et al., 1975; SUMNER, 1990). A técnica foi designada como bandeamento Q, que representa a mais antiga e versátil das metodologias modernas de produção de padrões de bandas fluorescentes, proporcionando variações de intensidade da marcação (SELANDER e DE LA CHAPELLE, 1977). Caspersson e colaboradores demonstraram a heterogeneidade da composição de bases do DNA cromossômico com a utilização do corante, que reage especificamente com certas bases nitrogenadas (SUMNER e EVANS, 1973; LIN, et al., 1975; SUMNER, 1990). Foi iniciada, então, uma nova era do bandeamento cromossômico. A descoberta tem fornecido contribuições fundamentais para a citogenética sobre a estrutura e a organização cromossômicas (SELANDER e DE LA CHAPELLE, 1977).

O bandeamento Q parece ser sensível à preparação da lâmina (LIN et al., 1975). Segundo SUMNER e EVANS (1973), os cromossomos fixados em metanol/ácido acético contêm pouca ou nenhuma proteína histônica. Dessa forma, os cromossomos submetidos a essa solução fixadora devem apresentar cadeias de DNA associadas a proteínas não-histônicas, em arranjos favoráveis para a ligação da quinacrina. Observou-se que toda perda de estrutura de proteínas em cromossomos resultou em perda da afinidade entre a substância e o DNA. Mesmo que a exposição do DNA nativo ao fixador resultar em considerável desnaturação, a fixação de células nessa solução não altera a natureza do DNA cromossômico. Assim, os padrões de bandeamento observados em cromossomos fixados em metanol/ácido acético e corados com quinacrina não podem ser considerados um reflexo de uma desnaturação diferencial do DNA.

A técnica de bandeamento Q aplicada em cromossomos fixados com metanol/ácido acético proporcionou a ligação exclusiva da quinacrina mostarda ao DNA. Foi verificado, também, que os padrões de bandeamento não variam entre diferentes tecidos de uma mesma espécie. Isso indica que os constituintes tecidos-específicos dos cromossomos não estão envolvidos na marcação (SUMNER e EVANS, 1973)

Ellison e Barr (1972), citados por CAIXEIRO (1999), relataram que os cromossomos banda Q positivos apresentam uma série de regiões fluorescentes intensas, intercaladas por regiões escuras, ao longo de todo o comprimento cromossômico. Esse padrão de bandas é característico de cada cromossomo e auxilia, portanto, na identificação individual dos mesmos.

Quando a lâmina submetida ao bandeamento Q é exposta a longo tempo de exposição microscópica, ocorre perda da fluorescência do material. Com o objetivo de suprir esse problema, foram examinados os fatores envolvidos na produção de banda Q. O pH ideal para a técnica está entre 4,5 e 5,5. Em ambos os pHs, houve produção de bandas, e a fluorescência apareceu brilhante e destacada. O aumento da fluorescência

com a utilização desses pHs ocorreu com a ionização do grupo amino da molécula de quinacrina (LIN, et al., 1975).

Alguns autores relataram que o efeito da variação na composição de bases do DNA é bem documentado por bandeamento fluorescente com quinacrina (COMINGS e DRETS, 1975). Considera-se que regiões cromossômicas, compostas de DNA rico em adenina e timina, são destacadas com fluorescência mais intensa (SUMNER e EVANS, 1973; SELANDER e DE LA CHAPELLE, 1977; CAIXEIRO, 1999).

Cromossomos *in situ*, diferencialmente destacadas por coloração fluorescente, indicam as diferenças de conteúdo das bases do DNA. Observou-se que o baixo conteúdo de CG promove maior intensidade da fluorescência. Assim, o aumento na porcentagem de bases CG acarretou em decréscimo da intensidade da fluorescência. Esses dados sugerem que existe relação entre a temperatura de desnaturação do DNA e a intensidade da fluorescência. Como o DNA rico em CG necessita de temperatura de desnaturação mais elevada do que o DNA rico em AT, a intensidade da fluorescência em seqüências ricas em CG fluorescem menos. Essa hipótese é reforçada pela observação de que regiões cromossômicas banda Q positivas desnaturam a temperaturas mais baixas do que regiões banda Q negativas. A importância das proteínas nos bandeamentos cromossômicos ainda é obscura. Contudo, a composição protéica, bem como a agregação e a interação dessas proteínas com o DNA, devem contribuir para a produção de bandeamento Q (SELANDER e DE LA CHAPELLE, 1977).

Alguns autores relataram que a variação na composição de bases do DNA em todo o comprimento cromossômico pode ser a base primária (CAIXEIRO, 1999), mas não a única característica responsável pela ocorrência de bandeamento. A fluorescência decresce fortemente na presença de guanina. Contudo, não existe indicação de que bandas fluorescentes positivas são ricas em adenina e timina (AT). De fato, a heterocromatina centromérica de cromossomos de ratos e regiões das constrições secundárias de cromossomos humanos têm sido caracterizadas

como ricas em seqüências AT, mas que não fluorescem com quinacrina. Porém, as mesmas regiões fluorescem com a substância na intérfase (SUMNER e EVANS, 1973; COMINGS e DRETS, 1975).

As evidências não suportam a idéia de que bandas Q refletem as diferenças de composição de bases dos cromossomos, e a variabilidade sugere que a fluorescência é afetada pela influência de proteínas associadas à condensação do DNA, mais do que pela composição de bases. Assim, as condições apropriadas necessárias ao bandeamento dependem, também, da relação entre o DNA e as proteínas não-histônicas (SUMNER e EVANS, 1973; COMINGS e DRETS, 1975). A melhor maneira tem sido selecionar o componente que fornece maior evidência das bandas fluorescentes, mas que seja insensível à variação na composição de bases (COMINGS e DRETS, 1975).

2.3.4. Bandeamento C

Segundo SUMNER (1990), a técnica de bandeamento C é de grande importância na compreensão dos aspectos evolutivos das espécies, pois evidencia aberrações cromossômicas, como translocações e inversões.

O bandeamento C tem sido utilizado em plantas, já que, em geral, apresentam grande quantidade de heterocromatina (FUKUI e NAKAYAMA, 1996). A visualização de figuras cromossômicas positivas para esse bandeamento permite a localização de heterocromatina, e pode ser utilizada na identificação e na comparação de cromossomos, quanto ao tamanho e à posição centromérica (GUERRA, 1988; BERTÃO, 1993). Dessa forma, o mapa cromossômico de *Triticum aestivum* pôde ser construído, baseando-se nos polimorfismos das bandas C (GILL et al., 1991). A técnica foi utilizada por Vosa e Marchi (1972) em *Vicia faba*, *Allium carinatum*, *Scilla siberica*, *Tulbaghia leucantha*, *T. verdoonii*, *T. alliacea* e *Zea mays*, revelando

numerosas regiões heterocromáticas extracentroméricas (CREMONINI, 1992).

O pré-tratamento com ácido (HCl) atua na depurinação do DNA, sem que ocorra quebra da dupla hélice. Em seguida, a utilização de hidróxido de bário (BaOH) promove a desnaturação do DNA, que é fragmentado em pequenos segmentos. Com essa metodologia, o DNA de regiões eucromáticas é extraído, proporcionando o destaque das regiões heterocromáticas por coloração com Giemsa (SUMNER, 1990).

Aguiar-Perecin e Vosa (1985b), citados por BERTÃO (1993), demonstraram, por meio do bandejamento C, que ocorrem variações do comprimento relativo dos cromossomos somáticos em diversas raças de *Zea mays*. A técnica proporcionou verificar que esse aumento ocorre por causa de um acréscimo de heterocromatina no complemento da espécie. Os autores indicam, também, que o polimorfismo encontrado no padrão de bandas C permite a caracterização das raças de milho.

A identificação de cromossomos somáticos de batata é dificultada pelo pequeno tamanho e similaridade morfológica dos cromossomos. Entretanto, o alto grau de polimorfismo cromossômico, após a técnica de bandejamento C, permitiu a construção do cariótipo mitótico. Em associação, foi utilizada a técnica de hibridização *in situ*, a qual revelou que as unidades transcritas de genes rRNA são altamente conservadas nessa espécie (WAGENVOORT et al., 1994).

Apesar da grande contribuição citogenética que o bandejamento C tem proporcionado, muitas espécies apresentam as regiões heterocromáticas dispersas pelo genoma ou em quantidade tão reduzida que não ocorre formação de bandas. Assim, a diferenciação linear dos cromossomos não se torna possível por essa metodologia (BERTÃO, 1993).

2.3.5. Bandeamento NOR (Ag-NOR)

Os genes ribossomais presentes em organismos eucariotos (rRNA) são: 5,8S, 18S e 28S. Esses rRNAs são processados a partir de um transcrito primário produzido pela RNA polimerase I, e 100 a 1.000 cópias arranjadas estão presentes em longas repetições em *tandem*, onde as plantas apresentam os números mais altos de cópias desses genes (COPENHAVER e PIKAARD, 1996; HABERER et al., 1996; PEDROSA et al., 1997).

Mc Clintock (1934) relatou que quando se localizam em apenas um loco, os genes rRNA repetidos em *tandem* são conhecidos como região organizadora nucleolar (COPENHAVER e PIKAARD, 1996); mas podem estar agrupados na heterocromatina de uma ou mais NORs (GECHEFF e HVARLENA, 1994; LÓPEZ-LEÓN et al., 1995).

CERMEÑO et al. (1984), COPENHAVER e PIKAARD (1996) e PEDROSA et al. (1997) citaram que, nas regiões organizadoras nucleolares, são localizados os genes rRNA responsáveis pela formação do nucléolo que é um sítio de síntese ribossômica organizado ao redor dos genes rRNA durante a intérfase. Mc Clintock, em 1934, relatou que as NORs em cromossomos metafásicos apresentam, em geral, dois componentes : o sítio de formação nucleolar interfásico e a heterocromatina adjacente, denominada satélite (VON KALM e SMYTH, 1983).

As NORs são os locos genéticos mais estudados na citogenética, por causa de suas peculiaridades de função e estrutura. São observadas em pelo menos um dos cromossomos do conjunto haplóide das espécies (LAY, 1978; GUERRA, 1988; FUKUI e NAKAYAMA, 1996; PEDROSA et al., 1997), e apresentam grande variação nos seus números, tamanhos e localizações dentro de uma mesma espécie, por causa do seu alto índice de repetição. O segmento terminal também é variável em tamanho e, quando a NOR é terminal, esse segmento não se torna evidente (VAUGHAN et al., 1993; PEDROSA et al., 1997).

A localização e a expressão de cada NOR podem ser facilmente visualizadas pela marcação diferencial de cromossomos profásicos e, ou, metafásicos (LAY, 1978; GUERRA, 1988; FUKUI e NAKAYAMA, 1996; PEDROSA et al., 1997), com o uso de microscopia convencional (GECHEFF e HVARLENA, 1994).

De acordo com Dover (1982), citado por HABERER et al. (1996), as regiões organizadoras nucleolares são características muito estudadas em plantas superiores, e constituem um sistema extensivamente útil em pesquisas de fins evolutivos, pois as regiões codificadoras presentes no rDNA repetitivo são altamente conservadas entre as espécies, e as regiões espaçadoras também são conhecidas por permanecerem homogêneas ao longo da evolução das espécies.

Em 1978, Miller et al. mostraram a importância do bandeamento de regiões organizadoras nucleolares como parte de estudos de identificação de rearranjos cromossômicos. Foi observado que, em células de ratos, a ocorrência de translocações robertsonianas são mais frequentes entre cromossomos carregados de NOR do que entre os do genoma (VERMA e BABU, 1995).

Procedimentos moleculares, técnicas de bandeamento cromossômico e desenvolvimento de metodologias mais sofisticadas (como a hibridização *in situ*) proporcionam a análise do rDNA e das funções e organizações genética e molecular de genes rRNA (GECHEFF e HVARLENA, 1994).

O bandeamento cromossômico que evidencia as NORs pela marcação com nitrato de prata é denominado Ag-NOR (PENDÁS et al., 1993). A marcação nucleolar com nitrato de prata tem sido conhecida desde 1890; e Ag-NORs, em cromossomos metafásicos, foram observadas em 1910. A utilização da técnica em cromossomos mitóticos, meióticos e núcleos interfásicos foi ampliada, bem como a sua importância como ferramenta citogenética, já que constitui parte essencial da caracterização cariotípica das espécies (SUMNER, 1990).

Geber e Schweizer (1988) e Murray et al. (1992) citaram que estudos de várias espécies de *Lathyrus* têm revelado que preparações cromossômicas procedidas pela técnica de secagem-ao-ar marcadas pelo nitrato de prata resultam em variação do padrão de bandas Ag-NOR (MURRAY, 1994).

A metodologia de preparação de lâminas por secagem-ao-ar resulta em achatamento e bom espalhamento dos cromossomos, que se mostram ausentes de parede celular e de resíduo citoplasmático. As constrições primária e secundária dos cromossomos são facilmente observadas, e não existe evidência de que os cromossomos tenham sido degradados pelo tratamento enzimático utilizado na técnica. Geber e Schweizer (1988) e Murray et al. (1992) sugerem que a marcação com prata depende da presença de aminoácidos aromáticos no DNA (particularmente a tirosina), que permitem a ligação e a posterior precipitação da prata. Já que essas bandas somente são vistas em preparações secas-ao-ar, pode-se dizer que as enzimas utilizadas na elaboração das lâminas são seletivas e alteram as proteínas associadas à cromatina (MURRAY, 1994).

Alguns aspectos sobre a natureza do material cromossômico marcado com prata devem ser considerados e investigados como a identidade de macromoléculas marcadas, o grupo químico preciso responsável pela redução da prata, e a função e morfologia da marcação. As proteínas nucleolares ditas como fosfoproteínas têm sido consideradas como substratos para a marcação com prata. Essa idéia é suportada pela observação de que a marcação Ag-NOR decresce ou se anula pela digestão do material com fosfatases. Certamente, NORs contém altas concentrações de proteínas sulfídricas e dissulfídricas, mas ainda não se sabe exatamente qual o grupo de proteínas responsável pela marcação (SUMNER, 1990).

Hubbell et al. (1979), citados por LAY (1978), CERMEÑO et al. (1984), GUERRA (1988), MURRAY (1994), FUKUI e NAKAYAMA (1996) e MANDRIOLI et al. (1999), propuseram a idéia de que a técnica Ag-NOR

detecta proteínas agregadas à prata por serem as responsáveis pela transferência de ribonucleoproteínas do nucléolo, por auxiliarem no empacotamento do rRNA na região fibrilar do nucléolo e por constituírem parte do complexo transcricional do rRNA.

Tem sido esclarecido que o bandeamento Ag-NOR não revela todos os sítios de genes rRNA. Isso ocorre porque a técnica só destaca NORs funcionalmente ativas durante a interfase precedente. Outra evidência é que a quantidade de regiões coradas com prata em núcleo interfásico é maior do que em cromossomos metafásicos, refletindo a supressão da transcrição na mitose (LOIDL e GREILHUBER, 1983; CERMEÑO et al., 1984; GECHEFF HVARLENA, 1994; CUÑADO et al., 1985; SUMNER, 1990; MANDRIOLI et al., 1999).

O número relativo de genes rDNA em cada NOR tem sido determinado pela contagem dos grãos de prata. Em geral, a quantidade relativa de grãos de prata depositados em cada NOR é constante dentro de um tipo celular e é uma propriedade celular herdável (VON KALM e SMYTH, 1983; MANDRIOLI et al., 1999). Concluiu-se, então, que a quantidade diferencial de genes rRNA e a variabilidade de suas atividades transcripcionais é que produzem o heteromorfismo entre NORs homólogos. A ocorrência desigual de crossing-over mitótico parece ser a explicação mais viável para o heteromorfismo das NORs. A ocorrência de recombinação somática entre sítios de rDNA homólogos e não-homólogos resultou em trocas assimétricas das seqüências de DNA em levedura. O mesmo fenômeno tem sido descrito em *Drosophila*, humanos, outros primatas e, também, em plantas, como *Triticum aestivum* e *Allium* (MANDRIOLI et al., 1999).

O tamanho relativo da banda de prata em cada cromossomo com NOR tem refletido a sua atividade transcricional. A heterocromatina adjacente à NOR, normalmente, é banda C positiva e pode ser destacada pelo uso de uma variedade de substâncias. Em milho, a maioria dos genes

rRNA estão localizados na heterocromatina NOR e não na constrição nucleolar (VON KALM e SMYTH, 1983).

A subestrutura da NOR em cromossomos mitóticos de *Lilium* tem sido examinada. O tamanho estimado da banda Ag-NOR tem sido verificado para análise da atividade transcricional em cada NOR. A quantidade de heterocromatina em cada NOR também foi avaliada. Com esses procedimentos, pôde-se verificar se a atividade de genes rRNA está relacionada com o número de genes nesse gênero. A conclusão que os autores chegaram foi que a atividade de genes rRNA em NORs individuais não parecem ser o reflexo do número de genes presentes nessa região. Esse fato também foi verificado em células de humanos e de ratos, onde ocorre um número maior de genes rRNA do que a sua real atividade NOR (VON KALM e SMYTH, 1983). Contudo, uma correlação entre o tamanho das NORs e o número de genes rDNA tem sido encontrada em espécies de plantas tais como trigo, centeio, cevada, *Vicia sativa* e *Nigella damascena* (MURRAY, 1994).

A caracterização de regiões organizadoras nucleolares foi realizada em *Nicotiana*, em níveis celular e molecular, com a finalidade de verificar suas morfologias e atividades. Marcadores moleculares com padrões específicos de seqüências de DNA repetitivo foram detectados, utilizando metodologia de citogenética molecular (KENTON et al., 1993).

Em combinação com a técnica de Ag-NOR, a FISH (hibridização *in situ* por fluorescência) tem fornecido dados sobre a localização de genes rDNA, e tem proporcionado a estimativa da fração de genes ribossomais que estejam em atividade (MANDRIOLI et al., 1999).

Apesar dos conhecimentos que se tem a respeito da estrutura e da organização do rDNA, pouco se sabe sobre a regulação e a manutenção da expressão dos diferentes genes presentes em várias NORs. Por esse motivo, a maioria dos estudos tem se concentrado na análise da competição nucleolar, também conhecida como anfiplastia ou dominância nucleolar. Em geral, essa competição ocorre em híbridos interespecíficos, e pode ser

identificada por meio de técnicas citogenéticas, associadas ou não aos métodos moleculares (LÓPEZ-LÉON et al., 1995).

Navashin (1928) foi o primeiro a estabelecer que, em híbridos interespecíficos de *Crepis*, a formação da constrição secundária pode ser suprimida no cromossomo de um dos parentais. Esse fenômeno tem sido observado em vários híbridos interespecíficos de plantas e animais (CERMEÑO et al., 1984; GECHEFF e HVARLENA, 1994).

Em híbridos de trigo e centeio, somente os cromossomos de trigo formam nucléolo na intérfase. Esse dado evidencia a completa supressão da atividade NOR (anfiplastia total) dos cromossomos de centeio pela presença do material genético de trigo (MURRAY, 1994). O mesmo fato foi observado por Navashin (1928), quando analisou híbridos do cruzamento das espécies *Aegilops mutica* e *Triticum aestivum*, em que os cromossomos da primeira espécie suprimem a atividade das NORs da segunda espécie em questão (PANAYOTOV e TSUJIMOTO, 1997).

Em indivíduos poliplóides, freqüentemente, existem menos NORs visíveis no complemento cromossômico do que o esperado pela soma dos genomas diplóides. Em tetraplóides, por exemplo, ocorre somente um único par de cromossomos com NOR, como é o caso de *Scilla scilloides* e *Milium montianum*. A redução do número ou da expressão de NORs deve ter ocorrido no decorrer da poliploidização e pode ser o resultado da supressão nucleolar (VAUGHAN et al., 1993).

Em alguns híbridos interespecíficos de plantas diplóides e poliplóides, as NORs derivadas de um dos parentais não são expressas como constrições secundárias visíveis no complemento cromossômico, ou seja, ocorre anfiplastia. A NOR inativa, contudo, pode ser reativada em cruzamentos subseqüentes, demonstrando que a supressão não é uma condição permanente no cariótipo. A anfiplastia está relacionada com a redução do número de NORs nos genomas poliplóides. Uma alternativa explicativa é que a deleção de todos ou partes de genes ribossomais, ou

elementos controladores, ocorreu durante ou após a geração do poliplóide (VAUGHAN et al., 1993).

Scilla autumnalis é uma planta da família Liliaceae que apresenta o fenômeno da anfiplastia. A aplicação de técnicas de marcação com prata, bandeamento C, fluorescência e hibridização *in situ*, em complementos cromossômicos de diplóides, alotetraplóides e auto-alohexaplóides dessa espécie, têm demonstrado que a capacidade de organização nucleolar do genoma A foi eliminada por deleção dos genes ribossomais e da heterocromatina adjacente (GECHEFF e HVARLENA, 1994).

O procedimento de eliminação de NOR também foi verificado em espécies de trigo. O controle da expressão de NORs em trigo é complexo: em poliplóides, do gênero *Aegilops*, o número de locos rRNA é maior do que o número de pares de cromossomos contendo NOR, indicando a freqüente ocorrência de anfiplastia. Em *Triticum aestivum*, quando a anfiplastia é removida, os organizadores tornam-se ativos (GECHEFF e HVARLENA, 1994).

Estudos têm sido realizados com cromossomos de gafanhoto, em nível intra-específico. Com o objetivo de desenvolver um modelo explicativo do padrão de atividade de diferentes NORs em *Locusta migratoria*, sugeriu-se que essa ativação de diferentes NORs fosse seqüencial, e que existisse interferência entre elas (LÓPEZ-LÉON et al., 1995).

Foi constatado que, na ausência de heterocromatina supernumerária, a atividade de cada NOR é independente no genoma de *Eyprepocnemis plorans*. Os autores observaram que a presença de cromossomos B ou de segmentos supernumerários não afetam a atividade NOR total da célula, mas interferem na independência das NORs. Quando cromossomos apresentam segmentos supernumerários adjacentes à NOR, esses cromossomos mostram dominância sobre outros cromossomos, que contém NOR ausente de segmentos supernumerários em suas proximidades (LÓPEZ-LÉON et al., 1995).

Em *Hordeum vulgare* L. (cevada), normalmente, aparecem dois pares de cromossomos com NOR (6 e 7). Em híbridos interespecíficos do gênero, ocorre anfiplastia, a qual está relacionada à transposição de NORs por rearranjo cromossômico. Esse tipo de supressão nucleolar não tem sido associado ao desaparecimento das regiões de constrição secundária. Em um mutante cromossômico estrutural, apenas um par cromossômico é detectado. Foi demonstrada, molecularmente, a ocorrência de deleção dos genes rRNA na NOR do cromossomo 6. A deleção parece envolver toda a NOR, e o local exato foi confirmado pela técnica de hibridização *in situ*. O sinal proporcionado pelo bandejamento permitiu a visualização de genes rRNA em atividade (GECHEFF e HVARLENA, 1994).

Em *Allium schoenoprasum*, a maioria da população possui NOR somente no braço curto do cromossomo número 8. Em algumas populações, sítios adicionais ocorrem nos braços curtos do par 7. Essa variação tem sido atribuída a diferentes processos, como deleções e transposições. Nessa espécie, a deleção de sítios tem ocorrido durante a evolução (VAUGHAN et al., 1993).

2.4. Variações cromossômicas e evolução cariotípica

Segundo GUPTA e TSUCHIYA (1991), a citogenética tem sido útil em estudos evolutivos. Bennett, Smith e Heslop-harrison (1982), citados por NARAYAN (1998), relataram que a estrutura e o funcionamento dos genomas são similares na maioria das espécies eucarióticas. Segundo KNOX et al. (1993), dessa forma, são necessárias informações sobre o número cromossômico, os quais fornecem dados essenciais sobre a história evolutiva de espécies de plantas e animais.

As documentações filogenética, morfológica e genética dos cromossomos de espécies correlacionadas, e a integração desses dados

com estudos estruturais e funcionais de cromossomos, fornecem conhecimentos evolutivos importantes (QUMSIYEH, 1994).

Variações no tamanho cromossômico são mais estudadas e compreendidas em angiospermas do que em outros grupos vegetais (GUSTAFSON et al., 1986; BENNETT e LEITCH, 1998). Em muitos gêneros e famílias de plantas superiores são encontradas trocas no número básico, ocorrendo, muitas vezes, em nível diplóide, sem promover a multiplicação do conjunto cromossômico ou de cromossomos individuais. O princípio que governa esse tipo de acontecimento ainda não está bem estabelecido na literatura citológica (STEBBINS, 1950).

NARAYAN (1998) relatou que a variação do tamanho cromossômico não está relacionada com a especiação evolutiva, e não existe evidência de que variações no tamanho genômico influenciam na frequência de recombinação genética. Assim, o índice quiasmático entre espécies varia de forma independente do tamanho genômico e a diferenciação filogenética envolve reorganização do complemento cromossômico, o que também pode vir acompanhada de perda ou ganho de DNA. Entretanto, QUMSIYEH (1994) considera que o alto número diplóide de $2n=102$ cromossomos, em mamíferos roedores da espécie *Tympanoctomys barrerae*, contribui para o desenvolvimento de rearranjos na evolução do grupo.

Em *Solanum tuberosum*, as relações taxonômicas têm sido baseadas em caracteres morfológicos, hibridização interespecífica, componentes secundários e, mais recentemente, polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição. Diferentes linhagens melhoradas do gênero foram analisadas, sendo observadas partes cariotípicas de espécies selvagens integradas nos seus genomas (BORISJUK e BORISJUK, 1993).

Goldblatt (1980) e Lewis (1980) relataram que a poliploidia ocorre em 70% das angiospermas, e é um dos mecanismos citogenéticos mais importantes na evolução de plantas. Bennetzen e Kellogg (1997) sugeriram

que a evolução cariotípica, nesses casos, é acompanhada por um aumento do tamanho genômico (OHRI, 1998).

Na maioria dos casos, a quantidade de DNA aumenta com o nível de ploidia, exceto, em algumas espécies como *Betula* (Grant, 1969), *Festuca* (Seal, 1983), *Leucanthemum* (Marchi, et al., 1983), *Bulnesia* (Poggio e Hunzicker, 1986), *Piper* (Samuel, Smith e Bennett, 1986), *Larrea* (Poggio, Burghardt e Hunzicker, 1989), *Bulbini* (Watson, 1987) e *Pratia* (Murray, Cameron e Standring, 1992), em que ocorre diminuição quantitativa de DNA por genoma com o aumento da ploidia. Já, em espécies de *Hordeum*, *Celosia*, *Bougainvillea*, *Chrysanthemum*, *Narcissus*, *Tulipa* e *Prunus persica*, existe correlação positiva entre o conteúdo de DNA e a ploidia dos organismos. Dessa forma, o tamanho genômico tem auxiliado em estudos taxonômicos das espécies (OHRI, 1998).

Os genomas completos de duas espécies diferentes podem ser combinados em uma única célula por hibridação somática simétrica. Se as duas espécies são suficientemente correlacionadas, espera-se que o híbrido resultante seja geneticamente balanceado e, conseqüentemente, a soma do complemento cromossômico de seus parentais. Contudo, em indivíduos poliplóides, a simples diferença numérica de cromossomos pode gerar a separação dos genomas no híbrido. A diferença no número cromossômico entre as espécies constitui uma barreira genética efetiva para espécies simpátricas separadas evolutivamente (SYBENGA, 1992).

Desde a publicação da teoria evolutiva de Darwin, em 1859, contínuas demonstrações foram realizadas sobre a diversidade genética de organismos selvagens e domesticados, sendo relatado que os processos evolutivos dependem dessa diversidade e da seleção de variações favoráveis (GUSTAFSON et al., 1986).

Segundo STEBBINS (1950), a variação ou as diferenças que ocorrem entre os indivíduos, são responsáveis pela origem e divergência de linhas evolutivas. A compreensão da evolução das espécies é possível pela análise de suas diferenças entre indivíduos e entre populações, pois

variações de herdabilidade individual são a base da evolução, e as forças atuantes nas populações são os mecanismos proporcionadores de variações.

As variações vistas entre indivíduos de uma população são baseadas em três fatores: modificações ambientais, recombinação genética e mutação. A recombinação é um fator de variação que origina imediata variabilidade para a ação de seleção e outras forças externas que direcionam a evolução de populações (STEBBINS, 1950; BADAIEVA et al., 1995).

A maior parte da variação genotípica em populações de fecundação cruzada ocorre por causa da segregação e da recombinação de diferenças genéticas que tenham existido por muitas gerações. Sumner (1942) relatou que mutações proporcionam alterações não somente quando ocorrem por várias gerações, mas também quando a adaptação a algum novo ambiente é acompanhada de segregações variadas de uma população heterozigota (STEBBINS, 1950).

Alguns mecanismos têm sido identificados como responsáveis pela evolução de diferentes grupos de plantas: 1) hibridação intergenérica ou interespecífica procedidas por poliploidização; 2) autopoliploidia; 3) trocas cromossômicas estruturais; 4) perdas ou ganhos cromossômicos; 5) fusão cêntrica ou translocação robertsoniana; 6) fissão cêntrica, originando cromossomos telocêntricos a partir de cromossomos metacêntricos; 7) mutações gênicas, levando a alterações em padrões de pareamento cromossômico; 8) trocas nas seqüências de nucleotídeos de diferentes genes e de aminoácidos de proteínas durante o tempo de evolução molecular; 9) modificações do sistema de melhoramento, levando à esterilidade por poliploidia; e 10) origem de cromossomos B (GUPTA e TSUCHIYA, 1991; NARAYAN, 1998).

Os rearranjos cromossômicos também são conhecidos como intercâmbio de segmentos cromossômicos, alterações cromossômicas, translocações recíprocas ou, simplesmente, translocações. Foram

observados, pela primeira vez, por Gates (1908) em *Oenothera rubinervis*, onde mais de dois cromossomos se uniram para formar um anel. Belling e Blakeslee (1926) concluíram a hipótese de que a troca segmental nesse gênero advém de uma translocação recíproca (SINGH, 1993).

A variação mais comum é chamada de translocação robertsoniana recíproca (SCHUBERT et al., 1992; JONES, 1998). Os primeiros trabalhos relatados na literatura se referiram aos rearranjos robertsonianos como fusões e fissões cêntricas, na convicção de que centrômeros podem se separar ou se fundir (QUMSIYEH, 1994).

Segundo SYBENGA (1992), as primeiras translocações em plantas foram observadas por Burnham, em 1956. Contudo, SINGH (1993) e LUKASZEWSKI (1995) relataram que McClintock (1930) foi a primeira a confirmar as evidências citológicas de trocas entre cromossomos não-homólogos de milho. A autora estudou, extensivamente, o mecanismo de quebras cromossômicas em milho, e descreveu ciclos de quebra-fusão-ponte nessa planta.

Os rearranjos cromossômicos podem ser formados tanto em células somáticas quanto em gametas, espontaneamente ou de forma induzida (radiações ionizantes ou agentes mutagênicos). A constatação da ocorrência de fusão ou fissão cêntricas em cariótipos somáticos tem sido simples, devido à ocorrência do aumento ou diminuição do número cromossômico, respectivamente. Quando alteram a morfologia (alterações estruturais) e, ou, o número dos cromossomos (alterações numéricas), elas podem ser identificadas em segregações das progênies (SYBENGA, 1992).

O mapeamento cromossômico de genes específicos tem sido realizado com o uso de marcadores de DNA. Os genes identificados e clonados são utilizados no estudo das estruturas gênicas e de suas seqüências regulatórias (GUPTA, 1991).

Procedimentos de citogenética molecular têm sido utilizados, e a identificação de marcadores genéticos tem auxiliado na detecção de translocações cromossômicas (KENTON et al., 1993). O desenvolvimento

das técnicas de análise de cromossomos meióticos ampliou as possibilidades de detecção das alterações estruturais, já que, durante a diacinese, é possível verificar se os cromossomos translocados formam alguma alteração conformacional (BEIGUELMAN, 1974).

SCHUBERT et al. (1992) utilizaram a hibridização *in situ* com seqüências teloméricas de cromossomos pseudo-aneuplóides de plantas e animais, e verificaram que cromossomos podem aumentar ou diminuir em número durante recentes rearranjos cromossômicos. Os metacêntricos, resultantes da fusão de cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos, apresentaram sinais de hibridização nas posições centroméricas.

Os rearranjos cariotípicos alteram ou não a morfologia dos cromossomos (GIANNONI et al., 1988), e podem ser quantitativos ou numéricos, quando envolvem a alteração do número cromossômico diplóide como maneira de preservar o número de braços cromossômicos longos (SCHUBERT et al., 1992). Quando estas alterações afetam apenas um par de cromossomos, são chamadas de aneuploidia, e quando alteram múltiplos numéricos do genoma, são conhecidas como euploidias (GIANNONI et al., 1988); o que é muito comum em mamíferos roedores, primatas, outros grupos de animais, e também em plantas (SCHUBERT et al., 1992).

Quando as alterações ocasionam mudanças morfológicas nos cromossomos, são designadas como qualitativas ou estruturais, e podem envolver conjuntos cromossômicos inteiros, cromossomos individuais ou parte de cromossomos (SCHUBERT et al., 1992). Podem ocorrer erros de ligação entre segmentos cromossômicos após a quebra, o que resulta em rearranjos (GIANNONI et al., 1988). Os tipos mais comuns de alterações cromossômicas estruturais são a deficiência, a duplicação, a inversão e a translocação, em que um ou mais segmentos cromossômicos são removidos, duplicados e invertidos no cromossomo, além de serem deslocados de sua posição original para outro local do genoma, respectivamente (SYBENGA, 1992).

Caso ocorra aumento ou diminuição do número cromossômico simplesmente via fissão ou fusão, pré-requisitos têm que ser considerados: todo o material da cromatina deve ser preservado durante o processo de troca para garantir a reversibilidade; se acrocêntricos com braços curtos reorganizados se fundirem, um dos centrômeros pode vir a ser inativado para permitir a estabilidade mitótica e meiótica típica de cromossomos dicêntricos; se telocêntricos com braços curtos, consistindo de somente seqüências teloméricas, se fundirem, o metacêntrico resultante deve possuir uma estrutura centromérica com bipartes (duas partes teloméricas de ambos os cromossomos originais); e somente os cromossomos metacêntricos originários de fusão de dois teloméricos podem sofrer fissão, originando cromossomos telocêntricos estáveis (SCHUBERT et al., 1992).

Darlington (1937) informou que existem condições que favorecem a perda ou o ganho de cromossomos. Se dois cromossomos não-homólogos apresentarem centrômeros subterminais, então, uma troca segmental, envolvendo o braço longo de um cromossomo e o braço curto do outro, poderá produzir um cromossomo longo com centrômero mediano (metacêntrico), e outro muito curto. Ele reportou que o número básico irá aumentar ou diminuir em consequência de translocações diferenciais, dependendo de qual região cromossômica seja ativada (STEBBINS, 1950).

Alguns citogeneticistas argumentam que a proximidade física dos cromossomos é um fator importante na indução de alterações cromossômicas (IMAI, 1988), e que as trocas entre cromossomos ocorrem, primeiramente, na heterocromatina, podendo estar associadas ao DNA satélite (GUSTAFSON et al., 1986). De fato, estudos têm demonstrado que a fusão dicêntrica é mais freqüente, quando o tamanho dos braços curtos heterocromáticos é aumentado (IMAI, 1988).

A hipótese de fusão assume que o ancestral apresentava um cariótipo com um grande número de cromossomos acrocêntricos e, depois, o cariótipo sofreu um processo de redução do número de cromossomos pela associação dicêntrica, formando cromossomos metacêntricos. Essa

hipótese tem sido aceita em espécies de mamíferos, e constitui a única interpretação viável para rearranjos robertsonianos em princípios clássicos de estrutura cromossômica (IMAI, 1988).

Em indivíduos de *Oryzomys yunganus*, observaram-se quatro translocações robertsonianas; e em roedores da família Gerbillidae, rearranjos cromossômicos que resultaram em possível divergência filogenética na maioria dos casos. A constituição cromossômica primitiva para a família, provavelmente, é de $2n=52$. O estudo evolutivo das espécies indicou que houve, claramente, translocação robertsoniana. Estudos com outros roedores, como Arvicolidae, Muridae e Sigmodontidae, em observações similares, verificaram a proliferação de rearranjos cariotípicos ao longo de muitas linhagens. Translocações robertsonianas no gênero *Geomys* têm sido reportadas, mostrando a incidência de heterozigotos na população. Esse fato indica que não existe desvantagem seletiva para heterozigotos (QUMSIYEH, 1994).

O mapeamento físico de centeio foi realizado, e observaram-se cinco translocações envolvendo os cromossomos 1R, 3R e 5R. A posição do ponto de quebra de cada translocação foi determinada, e esses pontos foram utilizados como referência para facilitar a localização física dos locos de rDNA 5S. Todos os cromossomos translocados foram identificados, citologicamente (ALONSO-BLANCO et al., 1994).

As translocações por quebra centromérica - fusão cromossômica são encontradas em muitas espécies de plantas e animais, e têm proporcionado a sua evolução cariotípica (BADAIEVA et al., 1995; JONES, 1998). Essas translocações podem criar novos blocos de ligação de significância adaptativa. As consequências genéticas podem ser a ocorrência de univalentes (assinapse), onde os braços translocados são diferentes do tipo parental e, também, a supressão de recombinação dos cromossomos que participaram da translocação como prevenção de quebra do complexo gênico adaptativo (BADAIEVA et al., 1995).

A probabilidade da translocação ocorrer em populações naturais é muito pequena. Contudo, esse tipo de alteração cromossômica é comum em *T. araraticum* em mais de 70% da população analisada. A alta frequência desse fenômeno evidencia a sua importância evolutiva. Conseqüentemente, translocações que originam novos blocos de ligação, ou complexo gênico adaptativo, devem ser essenciais para a sobrevivência das espécies em condições ambientais variáveis (BADAIEVA et al., 1995).

A fusão e a fissão são detectáveis em estudos comparativos de padrões cariotípicos. O número de casos reportados de fusão e fissão em plantas superiores tem aumentado, mas ainda é pequeno, e a maioria desses casos reportados ocorrem por comparações casuais de cariótipos, sem nenhuma investigação mais avançada do assunto. Esses dois eventos resultam em mudanças na morfologia e, ou, no número dos cromossomos, e são facilmente detectáveis quando os cromossomos são compridos, pois as alterações morfológicas podem ser claramente identificadas. A importância dessas trocas na evolução cariotípica é mostrada por sua alta incidência em animais, ocorrendo em moluscos, insetos, répteis e mamíferos (JONES, 1998).

A fusão cêntrica é um fenômeno evidente que ocorre na heterocromatina pericentromérica de dois cromossomos acrocêntricos não-homólogos (STEBBINS, 1950; IMAI, 1988), e se inicia pela quebra de cromossomos acrocêntricos. Em um dos cromossomos envolvidos, a quebra ocorre no braço curto, em outro, no braço longo (BEIGUELMAN, 1974). A redução do número básico envolve perda de centrômero e de uma pequena quantidade de material cromossômico adjacente (STEBBINS, 1950).

Estudos citogenéticos têm sido realizados com *Tradescantia* por ser uma planta que evoluiu por fusão robertsoniana (KENTON e DRAKEFORD, 1989; JONES, 1998). A espécie *T. cymbispatha* originária do Peru foi examinada e comparada com espécies do México e da América Central. Foram observadas espécies mexicanas com número cromossômico de $2n=12,14,16, 22, 28, 30$ e 36 (série de poliploidização, fusão e

hibridação), demonstrando que a teoria da evolução por poliploidização e fusão é um mecanismo de evolução cariotípica. A forte seleção cariotípica resultou em complementos cromossômicos compostos de telocêntricos de tamanhos similares e metacêntricos derivados de um processo de fusão (KENTON e DRAKEFORD, 1989).

A espécie *T. melinoides* ($2n=14M$) possui um pareamento meiótico máximo de três quadrivalentes e dois anéis univalentes. Esse citotipo surgiu por fusão robertsoniana do complemento ancestral. Em *T. standleyi* ($2n=12M+4T$), a fusão foi incompleta. Em *T. cymbispatha*, os braços cromossômicos de tamanhos similares foram combinados para originar cromossomos metacêntricos. Os cromossomos telocêntricos e pequenos metacêntricos se uniram em dois pares, distinguindo-os pelas características morfológicas de tamanho, sugerindo, assim, que o cariótipo de *T. cymbispatha* é derivado de um complemento alotetraplóide de cromossomos telocêntricos por fusão robertsoniana. O mesmo caminho evolutivo ocorreu na espécie *T. standleyi*. O decréscimo do tamanho genômico é acompanhado de estresse (KENTON e DRAKEFORD, 1989).

Em espécies de *Tradescatia*, ocorreram fusões envolvendo somente cromossomos telocêntricos e acrocêntricos ausentes de braços cromossômicos pequenos e heterocromáticos. Supõe-se que a posição e a uniformidade molecular da heterocromatina cêntrica tenham promovido a fusão dos cromossomos acrocêntricos. Em *T. cymbispatha*, indivíduos diplóides possuem somente complementos telocêntricos, enquanto que os autopoliplóides apresentam complementos metacêntricos (KENTON e DRAKEFORD, 1989).

No gênero *Aeshna*, 25 espécies têm sido estudadas, citogeneticamente, e o número diplóide variou de 16 a 27. A evolução cariotípica nas espécies foi analisada, e fusões envolvendo os autossomos e, ou, cromossomos sexuais foram verificadas. Mas o número diplóide não foi alterado (MOLA e PAPESCHI, 1994).

O complemento cromossômico de *A. bonariensis* ($2n=26$) foi originado da fusão do cromossomo X com o par autossômico maior, resultando no sistema novo-XY. Uma situação muito similar tem ocorrido em *A. grandis*, espécie em que o novo-XY é o maior par, sendo facilmente identificado pelo seu heteromorfismo. O complemento cromossômico de *A. corrigera planaltica* ($2n=16$), que é o menor dentre as espécies estudadas, é originado de seis fusões: cinco ocorreram entre os cromossomos autossomos e uma entre o cromossomo X e o menor par autossômico. O grande tamanho dos cromossomos de *A. corrigera planaltica*, quando comparado com *A. confusa* e *A. bonariensis*, sugere que todas as fusões, que deram origem aos complementos com cromossomos reduzidos, foram acompanhadas de pequena perda de DNA. O conteúdo de DNA, entretanto, nem sempre está correlacionado com o número e o tamanho dos cromossomos (MOLA e PAPESCHI, 1994).

Em insetos, diferentes situações têm sido encontradas. Espécies com o cariótipo contendo uma ou mais fusões podem apresentar o conteúdo de DNA constante, como é o caso de *Thyanta* e *Banasa*. Mas existem espécies com diferenças significativas no tamanho do genoma, como foi descrito em algumas espécies de *Belostoma*. Ainda foram descritas espécies contendo o mesmo número diplóide de cromossomos, porém, apresentando diferenças no conteúdo de DNA, como é o caso de espécies dos gêneros *Triatoma* e *Belostoma* (MOLA e PAPESCHI, 1994).

VANZELA et al. (1996) observaram variações cromossômicas em protoplastos de trigo, e verificaram que extensivas variações cromossômicas numéricas e estruturais estão presentes em todas as linhagens estudadas. Os números cromossômicos freqüentemente observados foram de $2n=32$, indicando perda de cromossomos do complemento normal de trigo ($2n=6X=42$). Tem sido proposto que essa perda ocorreu durante a seleção das linhagens.

LUKASZEWSKI (1995) demonstrou que, quando presente em genoma de trigo, alguns cromossomos de centeio são capazes de induzir

extensivas quebras em alguns cromossomos de trigo. Ainda não foi estabelecido qual cromossomo de centeio é responsável pela quebra, mas foi verificado que o genoma B é mais predisposto a quebras do que os genomas A e D. Cromossomos com suas extremidades quebradas mostraram alta tendência à fusão com outros cromossomos também seccionados. Essas fusões produzem cromossomos dicêntricos.

Em espécies de *Secale*, variedades selvagens e cultivadas são separadas por um efetivo isolamento reprodutivo e por translocações recíprocas, o que tem permitido o desenvolvimento da evolução de cultivares do gênero. Pijnacker et al. (1987, 1989) reportaram que, em híbridos somáticos de *Solanum tuberosum* com *S. phureja*, cromossomos de *S. phureja* foram eliminados (SINGH, 1993).

As fusões têm acompanhado a especiação de vários animais, já que cromossomos acrocêntricos ocorrerem com mais frequência em genomas desse grupo (SYBENGA, 1992). Translocações robertsonianas são comuns em humanos, com incidência de 0,1% (QUMSIYEH, 1994). A maioria dos cromossomos metacêntricos desse grupo se originaram de fusões, e apresentam dois centrômeros, sendo um deles inativado, funcionalmente. A fusão cêntrica, nesses casos, é interpretada como um tipo de translocação dicêntrica, diferente das translocações recíprocas clássicas. Segundo IMAI, 1988, o termo mais viável para esse tipo de rearranjo é conhecido como fusão dicêntrica. A supressão ou inativação centromérica tem sido observada em cromossomos humanos dicêntricos.

Os cromossomos dicêntricos têm tido importância citogenética por serem altamente deletérios e por não poderem funcionar eficientemente (STEBBINS, 1950), já que formam pontes cromossômicas na anáfase (IMAI, 1988).

Recentes estudos moleculares mostraram variabilidade nos locais de quebras e os cromossomos que sofreram fusões são dicêntricos, apesar de um dos centrômeros ser inativado. Como o centrômero se torna ativo ou inativo durante esses eventos, não se sabe. Estudos recentes sugerem que

as proteínas centroméricas foram perdidas durante o processo de inativação (QUMSIYEH, 1994).

Trabalhos realizados com hamsters, ratos e outras espécies de animais, mostraram fortes sinais de hibridização com sondas teloméricas ao redor dos centrômeros de alguns cromossômicos metacêntricos, o que parece suportar a hipótese de fusão/fissão de Holmquist e Dancis, em 1980. A observação de fusões cromossômicas espontâneas em *Sigmondom mascotensis* também mantém essa hipótese. Os sinais em posições intersticiais sugerem a possibilidade de ocorrência de eventos em pontos distantes do centrômero, ocasionando perda ou inativação de um dos centrômeros (SCHUBERT et al., 1992).

A hipótese de translocação tem explicado a perda de produtos de pequena translocação cêntrica, assim como o surgimento de um centrômero adicional, no caso da formação de metacêntricos. Uma análise molecular de quatro centrômeros humanos monocêntricos ou dicêntricos revelaram pontos de quebra da translocação em diferentes posições do cromossomo acrocêntrico. Isso indica a possibilidade de translocações recíprocas e fusões/fissões que resultaram em translocações robertsonianas (SCHUBERT et al., 1992).

A evolução cromossômica em eucariotos se procede como um processo de minimização de interações cromossômicas deletérias. O aumento do número cromossômico por fissão cêntrica é considerado uma adaptação evolutiva (HIRAI et al., 1994); é teoricamente possível e tem sido documentado em hamsters, ratos, cães, zebras e humanos (IMAI, 1988). Contudo, os cromossomos telocêntricos originados são instáveis (HIRAI et al., 1994).

A fissão cêntrica é um mecanismo efetivo de eliminação de regiões de heterocromatina constitutiva extras, podendo ser observado, utilizando técnicas de citologia molecular pela localização de DNA em cariótipos, que são considerados derivados de um ancestral comum, mas que apresente diferentes números cromossômicos. Genes rDNA são um dos

melhores candidatos a esse tipo de experimento por estarem presentes no genoma em grandes quantidades, e também podem ser encontrados em regiões de heterocromatina constitutiva (BORISJUK e BORISJUK, 1993; HIRAI et al., 1994).

Assim como a fusão cêntrica, a fissão cêntrica constitui um paradigma na evolução cromossômica (IMAI, 1988). O aumento do número cromossômico deve envolver, primeiramente, a duplicação cromossômica ou a fragmentação do centrômero (STEBBINS, 1950; JONES, 1998), e é interpretado como consequência de uma dissociação cêntrica, um tipo de translocação recíproca que ocorre em um cromossomo metacêntrico, gerando dois cromossomos acrocêntricos (IMAI, 1988; JONES, 1998).

Rearranjos cromossômicos têm sido importantes fatores evolutivos e de diversidade intra-específica de trigo poliplóide, pois foram observadas translocações espécie-específicas durante a origem desse grupo de plantas. *Triticum turgidum* L. e *T. timopheevii* são espécies tetraplóides que apresentam translocação espécie-específica. Baseando-se em amostras de bandeamento C, foi reportado que *T. araraticum* possui translocações cromossômicas com quebras em regiões centroméricas. Contudo, tem sido difícil caracterizar a localização exata dos pontos de quebra por bandeamento C, fazendo-se necessária a utilização de técnica de hibridização *in situ* (GISH), para identificar o local de quebra de translocações intergenômicas em acessos de *T. araraticum*. Análises por GISH mostraram que os pontos de translocação, previamente identificados por Bandeamento C, como quebra centromérica - fusão cromossômica, também ocorrem em regiões dentro do centrômero ou em suas regiões intersticiais (BADAEVA et al., 1995).

A aneuploidia pode ser causada pela não-disjunção dos cromossomos na anáfase, por formação de fibra multipolar, ou por pontes anafásicas resultantes de rearranjos ou cromossomos dicêntricos. Uma alta porcentagem de aneuploidia foi observada em híbridos somáticos de tomate e batata. Cada híbrido resultante obteve um padrão genômico específico:

ocorreram fusões dos genomas dos parentais, e os cromossomos recombinantes, provavelmente, sofreram translocação robertsoniana, resultantes de quebra - fusão de cromossomos dos dois genomas e seus centrômeros; os cromossomos de tomate foram eliminados; em híbridos com $2n=34$, um cromossomo de tomate e um de batata foram perdidos, sugerindo que não há preferência de eliminação dos cromossomos de uma espécie. O surgimento de um cromossomo anormal deve ser uma das causas das irregularidades ocorridas durante a anáfase mitótica, pois os híbridos mostram alta porcentagem de anáfases aberrantes (JONES, 1998).

Segundo JIANG e GILL (1994), a técnica de hibridização *in situ* tem sido utilizada, com sucesso, no mapeamento de famílias gênicas de plantas e, em trigo, revelou que o número de cópias de cada loco gênico 18S e 26S varia em diferentes populações, em decorrência de uma translocação não-recíproca entre o cromossomo 5A e outro cromossomo desconhecido do componente genômico. De acordo com os autores, essa alteração cromossômica ocorreu durante a evolução de trigos poliplóides, e é encontrada no cromossomo 5A em *Triticum turgidum* e *T. timopheevii*, os quais tiveram um sítio de hibridização na região terminal do braço curto, que está presente em todos os cromossomos, nas regiões teloméricas e subteloméricas de *T. aestivum speltoides*, mas não nos cromossomos de *T. monococum*. O sítio presente no cromossomo 4AL é derivado do cromossomo 7B, por uma translocação cíclica entre 4A-5A-7B. Os genes 18S e 26S de rRNA provaram ser excelentes marcadores citológicos no estudo de evolução genômica de trigo.

Em centeio, translocações têm sido utilizadas como marcadores citogenéticos. Comparações entre plantas com translocações, envolvendo os cromossomos 1R e 5R, e plantas normais têm sido realizadas. Na mitose, os dois cromossomos translocados foram facilmente identificados pelos seus aspectos morfológicos e pelos padrões de bandejamento C (ALONSO-BLANCO et al., 1993).

Translocações cromossômicas em trigo (*Triticum aestivum*) e várias outras espécies de plantas são fenômenos de interesse para programas citogenéticos e de melhoramento genético. Tem sido demonstrado que translocações estão presentes em espécies de trigo europeu e brasileiro (LUKASZEWSKI, 1983).

Plantas híbridas do cruzamento entre trigo e centeio foram analisadas, constatando-se a presença de translocações cromossômicas. Não houve indicação de que essas translocações sejam o resultado de pareamento homeólogo de cromossomos das duas espécies. O índice de ocorrência de bivalentes durante a meiose foi muito baixo, o que indica a alta frequência de translocações. A maioria das translocações descritas é resultante da divisão não total dos univalentes na meiose e posterior fusão dos cromossomos telocêntricos. As fusões são responsáveis pela maioria das translocações ocorridas no híbrido. A estabilidade das plantas foi alcançada pelo aumento da proporção de univalentes de um mesmo grupo, ampliando a possibilidade de fusão de braços cromossômicos homólogos (LUKASZEWSKI, 1983).

Certamente, a ocorrência de translocações por fusão de cromossomos telocêntricos depende das suas tendências de se dividirem na meiose e da habilidade desta divisão proporcionar futuras fusões com outros cromossomos telocêntricos. A frequência de divisão varia entre os diferentes cromossomos do complemento. Os resultados indicaram que cromossomos e braços cromossômicos apresentam diferentes tendências de fusão com cromossomos telocêntricos (LUKASZEWSKI, 1983).

Os efeitos das alterações cromossômicas são diversos, dependendo de vários fatores, como o tamanho do segmento cromossômico envolvido, e a importância do conteúdo gênico (GIANNONI et al., 1988). A produção artificial de trigo e centeio alopoliplóides origina plantas resistentes a doenças e com flores múltiplas, mas também com instabilidade genética e baixa fertilidade, o que limita a aplicação direta de novas variedades (BADAIEVA et al., 1985).

Cromossomos de centeio ou suas partes têm sido incluídos no genoma de trigo por translocações ou substituições. Os cromossomos formados parecem ter surgido como resultado de uma separação irregular dos bivalentes na anáfase e, em seguida, da fusão de cromossomos telocêntricos. Como consequência do evento de hibridação, rearranjos estruturais foram encontrados, e regiões organizadoras nucleolares derivadas do genoma de Triticale foram inativadas (BADAIEVA et al., 1985).

O cruzamento do trigo comum com outras formas de Triticale tem dado resultado de introdução de genes importantes no genoma de trigo. Esses genes são responsáveis por propriedades economicamente importantes, tais como a resistência a pragas e doenças, dentre outras características. Em muitas plantas da segunda geração, houve um decréscimo do número cromossômico, quando comparadas às espécies parentais. Os cariótipos dos híbridos foram caracterizados pelo alto índice de ocorrência de alterações cromossômicas (BADAIEVA et al., 1985).

Fusões e fissões são rearranjos cromossômicos fáceis de serem identificados durante a evolução cariotípica de Heteroptera. Muitos autores consideram que determinação de sistemas múltiplos de cromossomos sexuais em Heteroptera se originaram de fissões cromossômicas. Geralmente, é aceito que esses tipos de alterações cromossômicas causam a perda de DNA. A fissão requer a cicatrização das recentes terminações para a garantia da estabilidade e do comportamento normal dos novos cromossomos durante as divisões meiótica e mitótica (PAPESCHI, 1994).

Em populações naturais de *Belostoma plebejum*, observaram-se rearranjos cromossômicos, sugerindo que tanto a fusão quanto a fissão ocorreram na divisão mitótica do embrião ou foram herdadas de uma geração anterior. O comportamento meiótico dos novos complementos permaneceu regular. O pareamento cromossômico foi completo, como foi observado em células paquitênicas. Não foi detectado nenhum cromossomo extra. Esses dados sugerem que, após a fragmentação, os novos cromossomos desenvolveram telômeros funcionais nos pontos de quebra.

Uma hipótese para esse tipo de evento é que o cromossomo X original apresentava seqüências teloméricas em posições internas, fazendo com que essas seqüências se tornassem funcionais quando a quebra ocorreu em suas proximidades. Portanto, sugeriu-se que a evolução cariotípica dentro do gênero *Belostoma* tenha ocorrido por fusão de cromossomos autossomos, fissão do cromossomo X e variações na heterocromatina constitutiva (PAPESCHI, 1994).

MIURA et al. (1995) relataram, pela primeira vez, o mecanismo de rearranjos cromossômicos associados à especiação de anfíbios de padrões de bandeamento de replicação tardia. Espécies de sapo marrom são divididas em dois grupos de acordo com o número cromossômico: $2n=24$ e $2n=26$. Com base em análises eletroforéticas de enzimas e proteínas sanguíneas em 12 espécies de sapo marrom (distribuídas nas regiões paleártica e América do Norte), observou-se que três das espécies derivaram de um ancestral e, depois, os sapos remanescentes foram divididos em dois grupos de espécies de acordo com os números cromossômicos citados anteriormente.

Recentemente, bandas de replicação têm sido mostradas na indução múltipla de bandas em cromossomos metafásicos de anfíbios. Métodos de bandeamento C foram realizados para examinar rearranjos cromossômicos associados à especiação, principalmente o mecanismo de redução do número cromossômico de 26 para 24 ou o aumento de 24 para 26. Uma comparação detalhada de padrões de bandeamento mostrou alta conservação de padrões de bandas de replicação tardia e a ocorrência de inversões em muitos cromossomos. Foi constatado que fusões de terminações cromossômicas de dois pares cromossômicos causaram a redução do número cromossômico de 26 para 24 (MIURA et al., 1995).

Espécies européias de *Rana* apresentaram cariótipo com $2n=26$, sendo 5 pares de cromossomos maiores e 8 pares de cromossomos menores. Em *R. arvalis*, o cariótipo é caracterizado por $2n=24$, com seis pares cromossômicos maiores e seis pares cromossômicos menores.

Análises comparativas dos tamanhos e posições centroméricas de cada cromossomo indicaram que o cromossomo número 6 de *R. arvalis* e 6 e 10 de espécies com $2n=26$ não são cópias uns dos outros. Contudo, foi concluído que o cromossomo 6 de *R. arvalis* foi produzido por uma fusão dos cromossomos 6 e 10 de espécies $2n=26$. Mas como os tamanhos dos cromossomos 6 e 10 de espécies $2n=26$ são maiores do que o cromossomo 6 de *R. arvalis*, a fusão ocorreu por translocação recíproca desigual, com perda de algum material cromossômico (MIURA et al., 1995).

Green (1983), que examinou o cariótipo e realizou técnica de bandeamento C em *R. dybowskii* da Coreia, verificou que a redução do número cromossômico de 26 para 24 em sapos marrons é o resultado de processos que envolvem produção inicial de pequenos cromossomos telocêntricos por inversões pericêntricas e suas subseqüentes fusões. Essa explicação também foi postulada por Morescal (1981) como mecanismo de redução do número cromossômico em sapos africanos (MIURA et al., 1995).

O cariótipo de oito espécies de sapos pardos foram examinados, utilizando metodologias de marcação convencional dos cromossomos. Cinco das espécies em estudo apresentaram cariótipo de $2n=26$, e as outras três, $2n=24$. Nishioka et al. (1987) presumiram que somente processos singulares foram envolvidos na produção do cromossomo 6. Com base em análise comparativa dessas espécies, foi citado que o cariótipo $2n=24$ surgiu da fusão do cromossomo 11 com o 12 ou 13 no ancestral com $2n=26$. Ainda, o cromossomo 6 de espécies $2n=24$ ocorreu por fusão de dois cromossomos pequenos, sem ter sido influenciado por nenhum processo de inversão ou perda de segmento cromossômico, como havia sido relatado em estudos anteriores. Isso foi demonstrado pela aplicação da técnica de bandeamento C, a qual indicou que o cromossomo 11 se fusionou ao 13 em espécies ancestrais $2n=26$, e que o centrômero do cromossomo 13 foi inativado após a fusão, concluindo-se, então, que espécies $2n=24$ se originaram da fusão cromossômica de espécies ancestrais com $2n=26$ (MIURA et al., 1995).

Existe a hipótese de que o número diplóide decresceu durante a evolução dos mamíferos por progressivas fusões. Outros autores sugerem que o processo de evolução no grupo dos mamíferos ocorreu via fissão. Tanto fissões como fusões ocorreram, claramente, em algumas espécies. Só que, em alguns instantes, as fusões foram mais freqüentes (QUMSIYEH, 1994). Assim, a fusão tem sido mais importante para a evolução cariológica de mamíferos (IMAI, 1988).

De fato, a fusão cêntrica é abundante em humanos, enquanto a fissão é rara. O cariótipo de ratos apresenta cromossomos acrocêntricos. Existe evidência de que os braços curtos heterocromáticos tendem a se associar no paquíteno, mas nem todo cromossomo acrocêntrico formará cromossomo metacêntrico (IMAI, 1988). Segundo a hipótese de Marescalchi's (1990), a tendência geral da evolução é a fusão cromossômica. A fissão só ocorre ocasionalmente (SCHUBERT et al., 1992).

STEBBINS (1950) relatou que espécies mais primitivas apresentam número básico maior, pois a redução do número básico tem sido acompanhada de uma especialização da morfologia externa. Sendo assim, segundo QUMSIYEH (1994), a única conclusão possível é a procedência da evolução cromossômica por fusões e fissões em diferentes espécies.

2.5. O gênero *Capsicum*

2.5.1. Taxonomia e evolução

O pimentão (*Capsicum* sp.) é um membro da família Solanaceae, assim como o tomate, a batata, a petúnia e o tabaco (PRINCE, 1992). É classificado como Angiospermae, classe Dicotyledoneae, subclasse Metachlamydeae, ordem Tubiflorae, família Solanaceae, tribo Solaneae e

gênero *Capsicum*. A divisão subgenérica não é bem definida (LIMAYE e PATIL, 1989; BERTÃO, 1993).

Os primeiros taxonomistas e outros pesquisadores fizeram uso apenas dos caracteres do fruto para distinguir as espécies pertencentes ao gênero *Capsicum*. Assim, houve grande incidência de sobreposição de nomes específicos, conduzindo a uma denominação errada de espécies e variedades (BERTÃO, 1993). É constituído de 20 a 30 espécies, incluindo quatro ou cinco cultivadas: *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*. (Mc LEOD et al., 1986); sendo a espécie *C. annuum* cultivada em alta escala (LIMAYE e PATIL, 1989).

Uma classificação taxonômica satisfatória do gênero ainda tem sido dificultada por causas das diferenças de opiniões sobre a história evolutiva de *Capsicum* e das relações sistemáticas entre espécies, principalmente entre selvagens e cultivadas (Mc LEOD et al., 1986), o que tornou a taxonomia um tanto confusa (MOSCONE et al., 1993).

Os caracteres típicos do gênero são: 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. A abertura da flor ocorre, freqüentemente, nas três primeiras horas do dia, permanecendo aberta por 24 horas. A taxa de polinização cruzada varia de 0,5% a 36%, sendo influenciada pelo comprimento do estilete e pela freqüência de visitas de agentes polinizadores na flor (CASALI et al., 1984).

O cariótipo de uma espécie, em geral, é constante, e pode ser uma característica útil na taxonomia. Contudo, a presença ou ausência de um ou mais segmentos cromossômicos em indivíduos de uma população, conhecida como polimorfismos, podem surgir e alterar o padrão cariotípico da espécie (SYBENGA, 1992).

A técnica de eletroforese foi utilizada para análise evolutiva de *Capsicum*. Foram usadas diferentes freqüências alélicas para elucidar relacionamentos dentro do gênero. Análises eletroforéticas seqüenciais,

variando o pH e, ou, a concentração do gel, revelaram variações adicionais dentro dos alelomorfos (Mc LEOD et al., 1983).

As formas/espécies cultivadas de *Capsicum* ocupam extensivas áreas, resultando em variações genótípicas com relação às condições do ambiente (LIMAYE e PATIL, 1989). Os primeiros efeitos associados à domesticação do gênero incluem a diversidade cariotípica em *C. annuum* e o polimorfismo ou monomorfismo para um gene de *C. baccatum*, que se interage com o citoplasma de *C. chinense* (BERTÃO, 1993; PICKERSGILL, 1997).

BERTÃO (1993) relatou que o estudo das relações entre espécies selvagens e cultivadas de pimentão permite o estabelecimento de hipóteses sobre o processo de domesticação específica e a evolução no gênero. Os aspectos morfológicos e a distribuição geográfica das espécies cultivadas de *Capsicum* e de seus possíveis parentais selvagens devem ser considerados para facilitar a compreensão da evolução no gênero.

Segundo PICKERSGILL (1971), formas de *C. annuum* cultivadas passaram por translocação ou inversão, o que converteu um par de cromossomos acrocêntricos em um cromossomo metacêntrico.

Pickersgill et al. (1978) e Koompai (1976) verificaram que as variedades cultivadas de *C. annuum* diferem das espécies cultivadas de *C. chinense* por uma translocação recíproca. O cromossomo número 12 de *C. annuum*, provavelmente, originou-se de uma translocação recíproca irregular de dois cromossomos metacêntricos. Esses dados foram confirmados em estudos isozimáticos (TANKSLEY, 1984).

Segundo Mc LEOD et al. (1983), uma hipótese para a origem e a evolução de muitas espécies de plantas cultivadas, especialmente no nível de ploidia, é a ocorrência de um evento singular na história de um gênero. Posteriormente, houve domesticação de um ancestral selvagem, e a subsequente seleção e radiação em outras espécies cultivadas.

Davenport (1973) propôs que todas as espécies cultivadas de *Capsicum* surgiram de *C. frutescens*. Jett (1973) tem dado suporte a essa

hipótese. Outra suposição feita por Heiser et al. (1971) foi de que cada espécie cultivada derivou de um ancestral selvagem específico por eventos de separação evolutiva. Esse modelo sugere que quatro espécies cultivadas surgiram, independentemente, de formas selvagens, por ter sido obtida por dados morfológicos, cariotípicos e de melhoramento genético (Mc LEOD et al., 1983).

Uma terceira hipótese supõe a origem independente de três linhagens cultivadas, com *C. baccatum* var. *pendulum* surgindo de *C. baccatum* selvagem da Bolívia, *C. pubescens* de ancestrais *C. eximium*/*C. cardenasii* e uma terceira linha composta por *C. frutescens* cultivada, *C. chinense* e *C. annuum* (ancestral da Amazônia). Cada população parece consistir de uma ou mais subpopulações altamente homogêneas. A maior porcentagem de locos polimórficos indica grande quantidade de variabilidade genética. Existe uma distribuição relativamente uniforme dos genótipos da mesma espécie (Mc LEOD et al., 1983).

Sob o aspecto bioquímico, *C. cardenasii* tem alto grau de similaridade com *C. eximium*. As duas espécies formam híbridos férteis com facilidade. Esbaugh (1970) e Pickersgill et al. (1979) sugeriram que *C. baccatum* var. *baccatum* é o mais provável progenitor selvagem da variedade *pendulum*. O subgrupo de flores brancas, *C. annuum*, é um enigma. Contudo, eletroforeticamente, as espécies são muito similares. Pickersgill et al. (1979) sugerem que o terceiro taxon selvagem (*C. annuum* var. *aviculare*, *C. frutescens* e *C. chinense*) forma um complexo que é diferenciado em muitas regiões geográficas. Assim, ocorreram domesticações independentes das formas locais (Mc LEOD et al., 1983).

Estudos evolutivos no gênero têm sugerido a hipótese de que *C. frutescens* constitui o único progenitor selvagem de todas as cultivares, com três linhas evolutivas independentes: 1) *C. baccatum*; 2) *C. pubescens* e 3) *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* (Mc LEOD et al., 1983).

Pickersgill (1971) propôs que as variedades cultivadas evoluíram de progenitores selvagens invasores (BERTÃO, 1993). Dentre as cinco

espécies cultivadas de *Capsicum*, quatro evoluíram de ancestrais selvagens coespecíficos. O ancestral selvagem de *C. pubescens* permanece incerto. Quando cruzada com *C. cardenasii* selvagem e *C. eximium*, a espécie *C. pubescens* demonstra ter os mesmos arranjos cromossômicos finais, diferindo somente em sua significativa morfologia e caracteres moleculares (PICKERSGILL, 1997). Autores indianos têm classificado *Capsicum* em duas espécies: *C. annuum* e *C. frutescens* (DATTA, 1968).

Lefebvre et al. (1993), em um estudo de RFLP, encontraram cultivares de pimentão de origem européia e da América do Norte com alto grau de similaridade entre si. Tanto em espécies selvagens quanto em espécies cultivadas, a diversidade genética interpopulacional é considerada maior do que dentro da própria população. Esses dados confirmam as expectativas para as espécies originárias, predominantemente, de cruzamentos intrapopulacionais (PICKERSGILL, 1997).

Geralmente, sobre o ponto de vista numérico, a evolução ocorre de um pequeno número para um grande número cromossômico. A presença de longos cromossomos com centrômero mediano ou submediano indicam a natureza primitiva, e o aumento do número de constrições secundárias é um avanço evolutivo. Assim, a variedade *acuminatum* apresenta cromossomos grandes, indicando ser uma variedade primitiva, enquanto que a var. *grossum* possui aumento da ploidia e, também, o número de constrições secundárias demonstram que essa variedade representa uma distinta linhagem de evolução (DATTA, 1968).

2.5.2. Origem e domesticação

O pimentão (*Capsicum* sp.) é uma hortaliça originária da América do Sul (CASALI e COUTO, 1984; LIMAYE e PATIL, 1989; BERTÃO, 1993; PICKERSGILL, 1997), e é o segundo vegetal mais cultivado nos países do

terceiro mundo, depois do tomate (LEFEBVRE et al., 1995). Cerca de 1.331.770 ha no mundo são destinados para o plantio dessa planta. A produção chega a 16.392.700 toneladas, sendo a China o maior produtor mundial, com 7.002.180 toneladas por ano (LEITE, 1999). Estudos arqueológicos, realizados nas Américas Central e do Sul, indicam que a utilização de espécies de *Capsicum* pelas civilizações antigas iniciou-se entre os anos 5.000 e 7.000 a.C. (PICKERSGILL, 1969a).

A dispersão do gênero pela Europa começou por intervenção de navegantes da Península Ibérica, que exploravam terras da América tropical à procura da pimenta-do-reino, *Piper nigrum* (CASALI e COUTO, 1984). Os primeiros cultivares de *Capsicum* surgiram no Brasil por seleções realizadas pelos imigrantes italianos e espanhóis (SOUZA e CASALI, 1984; TAVARES e MALUF, 1994).

O gênero tem distribuição cosmopolita (Mc LEOD et al., 1986; PRINCE, 1992), com especial importância em regiões tropicais e subtropicais (Mc LEOD et al., 1986). As espécies cultivadas no Brasil distribuem-se em regiões de clima tropical, já que temperaturas baixas e geadas interferem no crescimento, desenvolvimento e rendimento dessas culturas. Em locais serranos e de temperaturas brandas, o cultivo é realizado na estação de verão e, dependendo da altitude da região, pode ser estendido até as estações de primavera e outono. A produção tem tido maior rentabilidade em regiões de altitude baixa (PÁDUA et al., 1984).

Os frutos de *Capsicum* são cultivados e consumidos em quase todo o mundo como condimentos culinários. Segundo Bosland (1992), o consumo é amplo em países europeus, africanos (BOSLAND, 1993) e asiáticos (PICKERSGILL, 1997). Porém, particularmente, as áreas de maior importância na produção de pimentão estão situados nas Américas do Sul e Central, na Índia, Hungria, Espanha, Itália e sudoeste dos Estados Unidos (PRINCE, 1992). Algumas espécies são utilizadas como plantas ornamentais, em razão da variação de coloração dos frutos no processo de maturação (SOUZA e CASALI, 1984).

O complexo *C. annuum* inclui três espécies correlacionadas: *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* (PICKERSGILL, 1997). A espécie *C. annuum* L. var. *annuum* é o representante mais importante entre as cinco espécies cultivadas do gênero em todo o mundo, e teve sua origem na América (MOSCONE, 1993). Foi cultivada no México e depois dispersa para os outros trópicos. As outras duas espécies, mesmo após a domesticação, predominam na América Latina (PICKERSGILL, 1997).

Mudanças ocorreram nas espécies de *Capsicum* em virtude da domesticação realizada pela espécie humana, tal como a modificação da posição do fruto de ereto para pendente (PICKERSGILL, 1969). Um outro efeito da domesticação do gênero foi o aumento da frequência de autopolinização. Nas espécies cultivadas, o estigma se encontra na mesma altura das anteras, elevando a possibilidade de autopolinização. Já nas espécies selvagens, o estigma está acima do nível das anteras, favorecendo a fecundação cruzada entre elas (CASALI e COUTO, 1984).

2.5.3. Características qualitativas e importância comercial

Especiarias e condimentos são extensivamente consumidos para aumentar a qualidade dos alimentos, e também utilizados como componentes em muitas preparações medicinais (JOHN e ABRAHAM, 1994). No México, por mais de oito séculos, a pimenta representou uma tradição como elemento mais importante da culinária mexicana (CONTRERAS-PADILLA e YAHIA, 1998). No Brasil, o Estado de Minas Gerais apresenta condições climáticas favoráveis e apropriadas ao cultivo da hortaliça, ampliando as perspectivas de comercialização na região (CASALI et al., 1984).

Capsicum é importante em muitos países como especiaria e como 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).

O pimentão vermelho (*Capsicum annuum*) tem sido cultivado por todo o mundo em virtude de seu valor como condimento (Mc LEOD et al., 1986; JOHN e ABRAHAM, 1994). Constitui fonte importante de nutrientes, como pró-vitamina A, vitaminas B1, B3, C e E, além de cálcio, ferro e fósforo (BERTÃO, 1993; BOSLAND, 1993).

Davies et al., em 1970, citaram que espécies de *Capsicum* compreendem uma das plantas mais ricas em vitamina C. Os frutos frescos podem conter até 340 mg/100g dessa vitamina. Com a maturidade, o valor quantitativo de vitamina C decresce no fruto. Essa vitamina foi extraída, pela primeira vez, no gênero *Capsicum*, em 1928, pelo bioquímico Albert Szent Györgyi. Tal descoberta lhe valeu o prêmio nobel. A extração de oleoresinas também é empregada, por conferir aroma e sabor às refeições (BOSLAND, 1993).

A pungência ou o sabor condimentar picante é fator de extrema importância nas espécies de *Capsicum* (BERTÃO, 1993), sendo características únicas do gênero (BERTÃO, 1993; CONTRERAS-PADILLA e YAHIA, 1998). O sabor picante é causado por sete alcalóides ou capsaicinóides, mas a capsaicina (8-metil-N-vanil-6-nonenamido) e a hidrocapsaicina são responsáveis por cerca de 90% da pungência (BERTÃO, 1993; JOHN e ABRAHAM, 1994). Fujikawai et al. (1982) determinaram que a biossíntese de capsaicinóides ocorre na placenta do fruto (CONTRERAS-PADILLA e YAHIA, 1998). Iwai et al. (1979^a) sugeriram que a produção de capsaicinóides aumenta com a maturidade do fruto até certo ponto; depois, decresce com a degradação de até 60% (CONTRERAS-PADILLA e YAHIA, 1998).

Além de aumentar o sabor dos alimentos, a capsaicina (C₆H₁₄O₂) também 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; CONTRERAS-PADILLA e YAHIA, 1998).

A coloração e o ardume do fruto do pimentão são devidos à presença de genes responsáveis por essas características (CASALI et al., 1984; BOSLAND, 1993). A coloração dos frutos se deve à mistura de pigmentos, tais como carotenóides (capsasantina), xantofilas e outros. Cerca de 20 carotenóides são responsáveis pela coloração. Alguns autores citaram que existem fatores genéticos associados às condições climáticas e à idade do fruto, que afetam o valor quantitativo do componente capsaicinóide (BOSLAND, 1993). No entanto, poucos estudos sobre o aroma e o sabor característico do fruto foram realizados, bem como a metodologia utilizada para a quantificação dos pigmentos (CASALI e STRINGHETA, 1984).

Práticas de cultivo adequadas produzem alta qualidade de colheitas, embora variações ambientais afetem a coloração do fruto, qualidade nutricional, pungência e suscetibilidade a doenças (BOSLAND, 1993).

As espécies cultivadas de *Capsicum* apresentam variações relacionadas aos caracteres do fruto (PICKERSGILL, 1997; CONTRERAS-PADILLA e YAHIA, 1998). O mercado brasileiro tem preferência por frutos com uniformidade de maturação, tamanho e formato. Consumidores dos grandes centros urbanos preferem a coloração verde-escura, a cutícula deve estar brilhante e ausente de rugosidades. Algumas regiões do Rio Grande do Sul, do nordeste e do norte do país valorizam o fruto de formato quadrado. Já na região Sudeste, a preferência é pelo formato cônico e tamanho grande. Essas exigências satisfazem não somente os consumidores, mas também os comerciantes, já que os frutos mantidos em suas integridades resistem melhor ao transporte pós-colheita (CASALI et al., 1984).

Para fins de industrialização, as características físico-químicas do fruto são importantes, como o teor de sólidos solúveis, a coloração, o tamanho e a espessura da polpa do fruto. Os produtos industrializados são

utilizados no preparo de alimentos, no processamento de conservas e na indústria de embutidos de carnes e sopas de preparo instantâneo. O pó de pimentão tem sido utilizado como flavorizante e como corante. A coloração do pó de pimentão é muito valorizada pelo mercado consumidor, o que depende da matéria-prima utilizada, ou seja, do cultivar, e também do armazenamento do produto (CASALI e STRINGHETA, 1984).

Pesquisas para fins comerciais vêm sendo realizadas no Brasil, com relação ao armazenamento do pó de pimentão (CASALI et al., 1984). Entretanto, o país ainda importa condimentos derivados do fruto. Estudos aprimorados e detalhados sobre a capacidade de retenção da cor pelos frutos também são de interesse econômico (CASALI e STRINGHETA, 1984).

As variedades de pimentão destinadas ao processamento de oleoresinas apresentam dois dos corantes naturais mais usados na indústria alimentícia. A obtenção de linhagens ricas em carotenóides (basicamente os vermelhos) é o pré-requisito mais exigido, desde que sua qualidade esteja relacionada ao poder de coloração. Normalmente, a troca da cor na superfície do pimentão é o resultado de uma degradação da clorofila e um considerável aumento no seu conteúdo carotenóide, que é influenciado pela temperatura e iluminação aos quais os frutos são expostos (GUEVARA e PARDO-GONZÁLEZ, 1996).

Muitos genes têm sido caracterizados em pimentão, principalmente os genes relacionados aos caracteres do fruto, e à resistência a doenças. Apesar do pimentão apresentar muitas vantagens em estudos genéticos, o desenvolvimento de um mapa de ligação tem sido pouco desenvolvido, em parte, por causa dos esforços concentrados nas linhagens de milho e tomate (PRINCE, 1992).

O amadurecimento dos frutos é um processo genético programado que envolve trocas nas estruturas das organelas e no metabolismo celular. Ricos em macromoléculas, os frutos (especialmente os já maduros) são vulneráveis às infecções por patógenos, pois as plantas não possuem um sistema imunológico como se encontra em vertebrados

superiores, e suas resistências são baseadas num dinâmico sistema de defesa, composto de barreira física, respostas químicas e proteínas antimicrobianas de diferentes classes (MEYER et al., 1996).

Para caracterizar aspectos de expressão gênica durante o amadurecimento dos frutos de *C. annuum*, isolaram-se genes que promovem defesa específica acumulada nos frutos maduros, sugerindo que a síntese e o acúmulo do gene são regulados e controlados por sinais ambientais, como ferimentos; e que o gene é, provavelmente, o responsável por uma proteína secretória envolvida no sistema de defesa do fruto. A localização extracelular da proteína em frutos maduros aumenta a chance de manutenção da integridade do fruto e da maturação das sementes (MEYER et al., 1996).

Estudos epidemiológicos apontaram o fato de que o pó do pimentão vermelho tem sido um fator de risco para o câncer do trato digestivo, mostrando que esse vegetal é capaz de produzir quebras cromossômicas e outras anormalidades na divisão celular. Como o pimentão vermelho é extensivamente utilizado na preparação de alimentos, a pesquisa objetivou verificar a atividade do componente capsaicinóide em células da medula óssea de camundongos. O experimento investigou o efeito de diferentes doses da especiaria administradas, oralmente, em camundongos. Foram utilizadas doses de 200, 300 e 400 mg/kg no período de 30 dias consecutivos. Tratamentos usando pimentão vermelho aumentaram a frequência de células com anormalidades na divisão celular (JOHN e ABRAHAM, 1994).

Estudos têm mostrado que a incorporação do pimentão preto na dieta de camundongos (50 a 200 mg/kg) induz anormalidades estruturais e numéricas em células da medula óssea (JOHN e ABRAHAM, 1991). A administração induziu quebras cromossômicas e inibiu a formação regular do fuso. Células com numerosos fragmentos foram observadas nos diferentes tratamentos. A porcentagem de células poliplóides foi de 2,68% em tratamentos com dosagens mais baixas, e de 14,96% nos tratamentos mais severos. Células com aumento ou diminuição do número

cromossômico apareceram, ocasionalmente. A ocorrência de células aneuplóides foi muito baixa. Afilamento dos cromossomos, dissolução da matriz cromossômica e desespiralização cromossômica são algumas das anormalidades encontradas. A porcentagem de células anormais aumentou com o aumento da administração das doses. Os resultados sugerem uma consideração mais cuidadosa do uso excessivo na dieta e na medicina (JOHN e ABRAHAM, 1994).

O pimentão vermelho é suspeito por ter proporcionado o desenvolvimento de câncer oral e estomacal, em populações humanas oriundas da Índia. A ação da capsaicina como substância mutagênica foi verificada em coelhos, quando administrada a 6-11 mg/kg. O pimentão preto tem sido reportado por induzir quebras cromossômicas em *Vicia faba*. Apenas 0,95% das células de *Vicia faba* apresentaram anormalidades, mostrando irregularidade na divisão celular. As quebras cromossômicas foram o tipo de anormalidade predominante. Distúrbios na anáfase ocorreram devido à inativação das fibras do fuso. Observou-se que houve aumento da porcentagem de anormalidade com o aumento da concentração da substância. A concentração de 0,2% foi tóxica. Não existe forte evidência de estudos epidemiológicos, experimentais e químicos, que sugerem as causas do câncer. Em camundongos, desenvolveram-se tumores estomacais e, em coelhos, cirrose (JOHN e ABRAHAM, 1991).

2.5.4. Aspectos citogenéticos e moleculares

Estudos genéticos e citogenéticos com *Capsicum* começaram em 1940 (BERTÃO, 1993). Por ser um dos membros mais importantes, economicamente, da família Solanaceae, o gênero foi foco de pesquisas citogenéticas por um longo período (MOSCONE et al., 1995). Entretanto, deixou-se de ser pesquisado por um tempo, provavelmente, por causa de

investimentos em outros vegetais, como o tomate e a ervilha (BERTÃO, 1993).

Sinha (1950) reportou que os cromossomos das espécies de *Capsicum* são grandes. Já Christensen e Bamford (1943) e Marks (1952) relataram que o tamanho cromossômico é pequeno (LIMAYE e PATIL, 1989).

Lippert et al.(1966) revisaram o primeiro trabalho taxonômico e citogenético de *Capsicum* e sugeriram que os cromossomos apresentam centrômeros medianos, submedianos ou subterminal. Foi observado que o número de cromossomos contendo NOR varia dentro da mesma espécie, e que esses cromossomos com NOR apresentaram centrômero mediano (LIMAYE e PATIL, 1989), existindo diferenças entre o número de bandas Ag-NORs na metáfase e o de nucléolos na intérfase (MOSCONI, 1999). Dessa forma, estudos sugerem a não-especificidade dos cariótipos das espécies do gênero (LIMAYE e PATIL, 1989).

A variação no comprimento dos cromossomos nas espécies de *Capsicum* pode ser atribuída à diferença significativa no grau de espiralização e condensação linear, múltiplas deleções, não-correspondência nos estádios relativos das metáfases selecionadas e erros de observação (LIMAYE e PATIL, 1989).

Espécies cultivadas de *Capsicum*, tais como *C. annuum*, *C. testiculatum*; *C. frutescens*, *C. pendulum*, *C. pubescens* e *C. chinense*, foram analisadas. Em todas as espécies o número cromossômico tem sido reportado como $2n=24$. O tamanho total do complemento haplóide foi de 20,75 μm (*C. testiculatum*) a 90,00 μm (*C. pubescens*). Variações de tamanho entre o cromossomo mais longo e o menor têm sido observadas em *C. annuum*. Essas variações em espécies selvagens (*C. baccatum* e *C. chacoense*) são relativamente raras por causa de suas ocorrências restritas no centro de origem (LIMAYE e PATIL, 1989).

O número de cromossomos com NOR foi de um a dois, sendo quatro em *C. microcarpum*, *C. pendulum* e *C. angulosum*. Ohta (1962)

observou dois pares de cromossomos contendo NOR em *C. frutescens*, *C. pendulum* e *C. microcarpum*, e somente um par em *C. annuum* e *C. pubescens*. Essas variações no número de NORs devem ser por causa da anfiplastia diferencial, envolvendo perda ou adição de satélite no processo de especiação. NORs não foram observadas em *C. annuum* var. Devnally, provavelmente, por causa das suas perdas no curso da evolução/especiação. As NORs sempre foram encontradas nos braços curtos. Sob o ponto de vista da deleção, duplicação ou translocação, a localização das NORs não foi mantida em todos os casos (LIMAYE e PATIL, 1989).

Os conhecimentos cariotípicos de *C. chacoense*, relatados na literatura, são poucos e contraditórios. Duas populações, dessa espécie, oriundas da Argentina, foram analisadas, citogeneticamente. O número cromossômico somático foi caracterizado por $2n=24$. O cariótipo de ambas as populações apresenta 11 pares de cromossomos metacêntricos e 1 par subtelocêntrico, e esses dados foram correspondentes aos relatos de Pickersgill, em 1977. Em contraste, Ohta (1962) descreveu o cariótipo com todos os cromossomos contendo centrômeros medianos. (MOSCONE, 1990).

Observou-se a existência de dois pares de cromossomos com satélites terminais e que uma população difere da outra em um par de NORs. A diferença de tamanho entre os complementos cromossômicos das duas populações foi atribuída a um diferente grau de condensação dos cromossomos. A variação cariotípica intra-específica tem sido encontrada em maior ocorrência do que a variação cariotípica interespecífica. Nesse gênero, são encontradas translocações espontâneas em *C. annuum* e *C. chinense*, sendo mais comum a translocação recíproca igual, que tem tido importante influência na evolução das espécies (MOSCONE, 1990).

Variedades de *Capsicum annuum* L. foram comparadas citogeneticamente, e foi verificado que os genomas se diferenciaram no número e tamanho dos cromossomos, bem como na posição e no número

das constrições secundárias. *C. annuum* var. *acuminatum* Fingh possui $2n=24$ cromossomos; var. *conoides* Irish pode possuir $2n=24$ ou $2n=26$; e a var. *grossum* Sendt pode possuir $2n=24$, 36 ou 48. Estudos com outras espécies de *Capsicum* também mostraram $2n=24$ ou $2n=48$ cromossomos. O número básico para espécies de *Capsicum* é 12 e poliplóides têm sido importantes na especiação e na evolução de diferentes variedades (DATTA, 1968).

As espécies *C. parvifolium* e *C. annuum* L. var. *annuum* apresentam cariótipos simétricos, com cromossomos de tamanhos bastante homogêneos. Contudo, a primeira espécie relatada se distingue da segunda por apresentar dimensão cromossômica maior, sendo todos os cromossomos metacêntricos, e com apenas um par de cromossomos com NOR no genoma. Em *C. annuum* L. var. *annuum*, as duas amostras analisadas obtiveram cariótipo idêntico. Entretanto, outros autores relataram a existência de uma variação cariotípica entre diferentes populações dessa mesma espécie. Em muitos casos, faltam medições cromossômicas precisas. Conseqüentemente, essas comparações realizadas são relativas (MOSCONE, 1993).

De acordo com a nomenclatura de Levan et al. (1964), em *C. annuum*, a maioria dos cromossomos é metacêntrica, sendo que apenas um ou dois pares (excepcionalmente três) são subtelocêntricos, e, em poucos casos, aparecem cromossomos submetacêntricos. Nas outras espécies do gênero, o cariótipo é caracterizado por possuir pares cromossômicos metacêntricos, acompanhados de um par subtelocêntrico e, às vezes, alguns pares submetacêntricos. Na sua maioria, aparecem um ou dois pares de cromossomos contendo NORs, apesar de alguns exemplares reportados possuírem três a quatro pares. Em algumas Solanaceae, a presença de NOR não é uma característica constante. As análises realizadas confirmaram a existência de um grande polimorfismo intra-específico no gênero (MOSCONE, 1993).

Amostras de *Capsicum baccatum* var. *umbilicatum* (pimentão picante de hábito herbáceo e extensivamente cultivado na América) foram estudadas, e foi relatado que a espécie possui cariótipo simétrico com $2n=24$ cromossomos. Os procedimentos de bandeamento Ag-NOR e de fluorescência indicaram ser valiosos marcadores para discriminar os cromossomos de *C. baccatum* var. *umbilicatum*, tal como ocorre com outros representantes do gênero, previamente estudados com as mesmas técnicas (MOSCONE, 1999).

Dados sobre a atividade nucleolar foram obtidos de análises de cromossomos metafásicos, com os objetivos de ampliar a caracterização cariológica de espécies de *Capsicum* e explorar possíveis direções evolutivas do cariótipo. O gênero foi caracterizado por conter de duas a oito NORs ativas na metáfase do complemento diplóide (MOSCONE et al., 1995).

Em três amostras de *C. annuum* var. *annuum*, duas exibiram de uma a duas NORs por célula e, a outra, quatro por célula. Em cinco amostras de *C. baccatum* var. *pendulum*, duas mostraram um número máximo de seis NORs por célula, duas exibiram sete, e uma, um número de oito NORs por célula. As espécies examinadas tiveram suas NORs localizadas no braço cromossômico curto, geralmente em posição subterminal. Somente um sítio de rDNA ativo foi encontrado em cada cromossomo. Em muitos casos, os tamanhos relativos das NORs variaram dentro e entre as células da mesma planta. O número e a posição das NORs nos cultivares examinados tiveram correspondência com os dados obtidos pela marcação, utilizando-se da técnica de bandeamento C (MOSCONE et al., 1995).

Em *Capsicum*, o mecanismo responsável pela variação do número, tamanho e da posição das NORs, em níveis intra-específico e interespecífico, deve ter sido a mutação cromossômica, assim como a transposição de genes móveis rDNA. Com base nos dados apresentados, a hipótese da evolução de cromossomos contendo NOR pode ser proposta.

As NORs presentes nos cromossomos número 1 e 12 são características ancestrais, e são preservadas nas espécies *C. chacoense* e *C. frutescens*. O aspecto evolutivo de espécies cultivadas com características derivadas é a de que a NOR aparece no cromossomo número 11, como é o caso de *C. annuum* (MOSCONE et al., 1995).

C. annuum e *C. chinense* têm sido objeto de pesquisas moleculares de mapeamento gênico, incluindo a localização de genes rRNA (rDNA) por técnica de hibridização *in situ*. A técnica de Ag-NOR auxilia na identificação de cromossomos, juntamente com outras técnicas de bandeamento, identificando quais os cromossomos relacionados com as NORs. Essas técnicas têm sido usadas somente em sete Solanáceas: duas espécies de *Solanum* (incluindo *S. tuberosum*) e cinco espécies de *Cestrum* (MOSCONE et al., 1995).

Em nível celular, métodos de marcação com prata, que demonstram atividade de sítios gênicos de rDNA (NOR), ainda não têm sido aplicados em *Capsicum*. Todos os dados sobre a atividade nucleolar no gênero advêm de análises de constrições secundárias de cromossomos com NOR, observados na metáfase pelo método de coloração convencional. Variação intra-específica no número e na posição das constrições secundárias tem sido encontrada (MOSCONE et al., 1995).

As amostras de *Capsicum* foram estudadas e, por meio da técnica de marcação com a prata, regiões positivas foram identificadas em metáfases somáticas e no núcleo interfásico. As NORs em cromossomos metafásicos obtiveram coloração escura com nitrato de prata. O restante do cromossomo mostrou-se da cor de palha. Na fórmula cariotípica, o número de NORs por metáfase e o número máximo de nucléolo por núcleo interfásico foram observados, onde foram encontradas de duas a oito NORs ativas por complemento diplóide. Em *Capsicum annuum* var. *annuum*, as amostras exibiram de duas a quatro NORs por célula. Todas as espécies de *Capsicum* examinadas apresentaram: Ag-NORs localizadas nos braços curtos dos cromossomos, em posição subterminal e somente um sítio ativo

de rDNA por Ag-NOR. Em muitos casos, os tamanhos relativos das Ag-NORs variaram dentro e entre as células da mesma planta (MOSCONE et al., 1995).

Em todas as espécies de *Capsicum* estudadas, o número de nucléolos por núcleo interfásico foi menor do que o número de Ag-NORs em cromossomos metafásicos. Em *C. annuum* var. *annuum*, alguns indivíduos exibiram um número máximo de quatro nucléolos por núcleo e três Ag-NORs por metáfase. Geralmente, o tamanho relativo do nucléolo e das Ag-NORs variou dentro e entre as células da mesma planta. Em apenas poucos casos, houve correlação entre o tamanho das Ag-NORs e dos nucléolos. O número maior de Ag-NORs metafásicas do que o número de nucléolos interfásicos se deve à fusão ou à competição entre diferentes organizadores nucleolares do complemento. (MOSCONE et al., 1995).

Variação intra-específica no número de pares cromossômicos com constrições secundárias (de uma a duas, excepcionalmente três) tem sido reportada em cariótipos de *Capsicum annuum* corados, convencionalmente. As amostras exibiram correspondência com o material analisado por Pickersgill (1971), para a variedade *annuum*, que possui dois pares de cromossomos acrocêntricos. Um dos cariótipos apresentou um par de cromossomos acrocêntricos com constrição secundária (MOSCONE et al., 1995).

Segundo MOSCONE et al. (1995), os procedimentos de impregnação com prata, conjugados a outras técnicas de bandeamentos, são úteis na identificação dos cromossomos e na interpretação das variações cromossômicas encontradas no gênero. A comparação entre os cariótipos bandeados com Ag-NOR e com bandejamento C e fluorocromos demonstrou correspondência entre Ag-NORs e constrições secundárias.

Tem sido observado que a intensidade da marcação com prata está relacionada com a expressão das constrições secundárias. O polimorfismo de Ag-NORs entre indivíduos, células e, ainda, em cromossomos homólogos de *Capsicum*, pode ser atribuído a vários fatores,

como o número de genes ribossomais, o nível de transcrição e o estágio de condensação da cromatina de cada NOR. Os mecanismos responsáveis pela variação do número, da posição e do tamanho das NORs em níveis intra e interespecíficos podem ter sido translocações, deleções e transposições de genes rDNA móveis. As NORs em *tandem*, observadas em alguns casos do gênero, provavelmente, surgiram de duplicações, como tem ocorrido em espécies de *Hordeum* e *Anura* (MOSCONE et al., 1995).

MOSCONE et. al. (1993) elaboraram um programa de bandeamento C para relatar o padrão da heterocromatina constitutiva em espécies, variedades e cultivares de *Capsicum*. As plantas observadas foram caracterizadas pela presença de bandas C centroméricas em todos os cromossomos. Em *C. chacoense*, *C. parvifolium*, *C. annuum*, as bandas apareceram fracamente marcadas e pouco visíveis. Contudo, em *C. baccatum*, *C. pubescens* e *C. campylopodium*, as bandas foram fortemente representadas. A respeito de seus cariótipos, diferenças significativas no número e na distribuição de bandas C foram identificadas entre as amostras de *Capsicum* estudadas. Com base nessas características cariotípicas, as espécies puderam ser claramente distinguidas entre si e subdivididas em dois grupos. O grupo I inclui plantas de baixo conteúdo de heterocromatina constitutiva, tais como *C. chacoense*, *C. parvifolium*, e *C. annuum* var. *annuum* e *C. baccatum* var. *pendulum*. O grupo II é compreendido de plantas com alto conteúdo de heterocromatina constitutiva, incluindo *C. pubescens* e *C. campylopodium*.

Em Solanaceae, o bandeamento cromossômico fluorescente tem sido aplicado somente em espécies de *Cestrum* e *Nicotiana*. O primeiro estudo sobre a caracterização citoquímica da heterocromatina constitutiva dos cromossomos de *Capsicum*, por procedimentos de marcação fluorescente, foi realizado por MOSCONE et al. (1996); Com o objetivo de melhorar a caracterização cariológica das espécies, variedades e cultivares, contribuindo para a exploração de características evolutivas do gênero.

Analisaram-se cromossomos interfásicos e metafásicos somáticos de *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. annuum* L. var. *annuum*, *C. baccatum* L. var. *pendulum* e *C. pubescens*. A tripla marcação com cromomicina A₃, distamicina A e DAPI (CMA/DA/DAPI) foi executada, verificou-se que os padrões de bandeamento fluorescente, obtidos com CMA/DA, são o reverso dos padrões adquiridos com os fluorocromos DA/DAPI. A maioria dos cromossomos não se bandeou, quando apresentaram fluorescência. Esses dados associados às homologias encontradas entre os cromossomos do complemento impossibilitaram a resolução de casos de similaridade morfológica. O heteromorfismo das regiões heterocromáticas fluorescentes entre os cromossomos homólogos se limitou às diferenças de tamanho dos satélites. Foram realizados, também, procedimentos de bandeamento C, em que os autores verificaram que *C. annuum* é a espécie do gênero que apresenta o conteúdo mais baixo de heterocromatina, reforçando o objetivo proposto. *C. annuum* L. var. *annuum* apresenta pequena proporção de bandas fluorescentes, representando somente 2 a 3% do tamanho cariotípico total. (MOSCONE et al., 1996).

A maioria das espécies de *Capsicum* possui cariótipo similar, em que os cromossomos apresentaram poucas diferenças morfológicas. A presente observação sugere a necessidade de se utilizar outros métodos de bandeamento cromossômico, associados às técnicas de fluorescência, para que se consiga obter padrões de bandeamento e análises citogenéticas com maior segurança. Nas espécies de *Capsicum*, o tamanho cariotípico e o conteúdo de DNA nuclear tiveram menos variações do que a quantidade de heterocromatina fluorescente (MOSCONE et al., 1996).

A quantidade, a distribuição e o tipo de heterocromatina têm se diversificado durante a evolução das espécies de *Capsicum*. As espécies *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. annuum* L. var. *annuum* e *C. baccatum* L. var. *pendulum* apresentaram pouca quantidade de heterocromatina, e os

cromocentros fluorescentes de núcleos interfásicos são poucos, numericamente (MOSCONE et al., 1996).

É proposto que, no mínimo, três linhas evolutivas ancestrais independentes originaram espécies cultivadas de *Capsicum*: a primeira inclui membros selvagens do complexo *C. annuum*, com flores brancas e pouca heterocromatina, e, também, *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq.. As três espécies são tratadas como grupos distintos, apesar de apresentarem as mesmas características morfológicas. A segunda inclui espécies com flores brancas, porém, com grande quantidade de heterocromatina, como é o caso de *C. baccatum* L. var. *pendulum*. A terceira inclui espécies com flores púrpuras e com grande quantidade de heterocromatina. As espécies que constituem esse terceiro grupo são: *C. eximium* e *C. cardenasii*.

Gottschalk et al. (1980), citados por PICKERSGILL (1997), observaram em um grande número de angiospermas que os cromossomos homólogos permaneceram unidos após o paquíteno. Celarier (1955), também citado por PICKERSGILL (1997), sugeriu que a redução da frequência de quiasmas deve ser um fator causador desse evento em *Tradescantia*. O fenômeno foi reportado em progênie de *C. frutescens*. A planta foi diferenciada por aspectos morfológicos, tais como baixa estatura e florescimento tardio.

LAKASHMI e NALINI (1989) fizeram o primeiro relato de plantas trissômicas de *C. annuum* L. Essas plantas podem ter sido originadas de um rearranjo heterozigoto, onde $n+1$ gametas foram formados como resultado de uma disjunção ocasional de um anel composto por quatro cromossomos. Esse mesmo fenômeno tem sido observado em cevada e *Pennisetum*.

Segundo HARINI et al. (1990), a existência de diferentes números cromossômicos euplóides no mesmo órgão é designada como mixopoliploidia, e a diferença entre os ramos de uma mesma planta é chamada de quimera. A origem desses fenômenos pode ser espontânea ou induzida.

Casos de mixopoliploidia foram reportados em *Capsicum*, onde plantas quimeras de *C. annuum* foram obtidas pelo tratamento com colchicina (0,3%) por 24 horas, em que ressaltou-se o aparecimento quatro ramos primários com diferentes morfologias, cujas folhas e flores variaram em tamanho, textura e cor. A análise citológica revelou que um ramo apresentou $2n=24$, dois apresentaram $2n=48$ e um apresentou $2n=24$ e $2n=48$ intermisturados. A existência de dois números euplóides diferentes na mesma antera confirmou a mixopoliploida. Na maioria das células (82,21%), a segregação anafásica foi regular, e cromossomos dispersos foram observados em baixa frequência. A fertilidade dos pólenes dos galhos diplóides, tetraplóides e mixopoliplóide foi de 81,92; 68,72 e 78,26%, respectivamente. Um alto número de cromossomos associados em anel e pontes foi observado. O duplo somático pode ser atribuído à ação química da colchicina. Pode-se dizer que a ação da droga é do tipo mosaico, devido à não-uniformidade da duplicação dos cromossomos não foi uniforme (HARINI et al., 1990).

Segundo DATTA (1968), a multiplicação do número cromossômico não está correlacionada com o aumento da quantidade da cromatina. Assim, a evolução não tem sido realizada apenas na ploidia, mas também na alteração do número cromossômico por deleção, fragmentação e outros eventos.

LAKASHMI (1995) observou, em células meióticas, a formação espontânea de gametas aneuplóides na espécie *Capsicum annuum*, característica de uma alteração que afeta o pareamento inicial de cromossomos homólogos. Outro estudo com essa espécie, realizado por PANDA et al. (1982), evidenciou que, com o uso de colchicina, é possível a indução de indivíduos octaplóides.

Os rearranjos cromossômicos estruturais são, sem dúvida, importantes ferramentas na evolução de variedades (DATTA, 1968), e a frequência de diferentes associações depende do tamanho do cromossomo envolvido ou do segmento duplicado, e também da ocorrência de quiasmas.

Alterações no número cromossômico provocadas pelo desemparelhamento dos cromossomos homólogos, após a fase de paquíteno, foram descritas em algumas amostras de *Capsicum annuum* e *C. frutescens* (LAKASHMI et al., 1989).

Observaram-se informações sobre análises citológicas de híbridos interespecíficos do cruzamento de *C. annuum* com *C. chinense* e *C. baccatum*. Em todas as amostras, o cariótipo foi determinado por $2n=24$. As células meióticas do botão floral jovem foram estudadas. A meiose se mostrou regular na maioria dos casos. Contudo, foram observadas poucas sinapses cromossômicas e, em dois cruzamentos, a meiose foi irregular. Uma associação de quatro cromossomos bivalentes foi observada nos híbridos de *C. annuum* com *C. chinense* (H1). A associação de três cromossomos, bivalentes e univalentes, originada de uma falha no pareamento entre os cromossomos dos dois parentais, estruturalmente diferentes, foram encontrados em híbridos do cruzamento de *C. annuum* com *C. baccatum* (H2), ambos na diacinese e metáfase I. A frequência de quiasmas foi muito pequena em F1 de ambos os cruzamentos, quando comparada com os parentais. Tais associações foram pontes, indicando o fenômeno de inversão (KUMAR, 1987).

A ocorrência de bivalentes foi de 37% em H1, e 21% em H2. Na anáfase I, houve disjunção irregular dos cromossomos; e cromossomos “perdidos” foram observados em 60% de H1. Fragmentos, segregação cromossômica irregular e cromossomos “largados” foram encontrados em 75% das células de H2. As irregularidades persistiram até o final da segunda divisão meiótica. Micronúcleos também foram observados e variaram de 0 a 4 nos híbridos F1. A fertilidade dos pólenes e o conjunto de sementes foram muito pequenos em F1, quando comparados com os parentais. Essa variação na fertilidade dos pólenes reflete as diferenças na arquitetura citogenética dos parentais, indicando que eles se diferem em vários genes (KUMAR, 1987).

Poucas sementes foram obtidas quando H2 foi inter cruzado com *C. annuum* parental e, alguns deles, não sobreviveram até a maturidade. Isso sugere que a manifestação da inviabilidade do híbrido e a fraqueza em estádios pré-zigóticos previnem a formação de plantas estéreis ou fracas nos estádios pós-zigóticos. A ocorrência de 12 bivalentes nos híbridos sugere que, apesar da divergência morfológica dos cromossomos, as espécies reteram suficiente homologia ancestral (KUMAR, 1987).

A desinapse originando univalentes deve ser um dos mecanismos de isolamento entre *C. annuum* e *C. baccatum*. Os híbridos F1(H1 e H2) indicam que *C. annuum* e *C. chinense* se diferem por duas translocações e alterações estruturais menores (KUMAR, 1987), e que o número de locos ribossomais também é uma característica diferencial entre as duas espécies (LEFEBVRE et al., 1995). A espécie *C. annuum* também se difere de *C. baccatum* por duas translocações, uma inversão e algumas alterações estruturais menores. Esses dados sugerem que, provavelmente, houve isolamento por acúmulo de diferenças genéticas (KUMAR, 1987).

Trocas cromossômicas são freqüentes em espécies de *Capsicum*. Duas raças cromossômicas foram identificadas em *C. annuum* e ambas não mostraram, aparentemente, diferenças morfológicas no cariótipo, mas diferiram entre si por uma troca simétrica, como foi observado na meiose pela presença de quadrivalentes. Trocas também foram observadas em cruzamentos de formas selvagens de *C. annuum* var. *minimum* e entre *C. annuum* var. *minimum* e *C. annuum* var. *annuum*, incluindo as formas cultivadas. Alguns acessos selvagens e tipos cultivados de *C. annuum* se diferenciaram por uma translocação (CONICELLA et al., 1990).

Estudos de cromossomos mitóticos e meióticos, e o uso de marcadores isozimáticos, têm sido empregados em genética por muitos propósitos, mas, principalmente, para estudar a variabilidade genética de populações, a definição de relações sistemáticas e filogenéticas e o mapeamento genético (CONICELLA et al., 1990; PRINCE, 1992).

A família Solanaceae tem sido de utilidade em estudos da evolução genômica (PRINCE, 1992). Cada espécie é caracterizada por suas peculiaridades na morfologia. Em *Capsicum*, isozimas foram usadas para o mapeamento de pontos de quebra de translocações cromossômicas, no relacionamento filogenético das espécies (TANKSLEY, 1984) e na distinção entre *C. annuum*, *C. chinense* e *C. baccatum* (CONICELLA et al., 1990), já que essas isoenzimas possuem afinidade por um mesmo substrato e fornecem uma avaliação direta da variação genética (TANKSLEY, 1984).

Estudos isozimáticos de *C. annuum* foram realizados com o objetivo de investigar a evolução da espécie. Análises meióticas e mitóticas de linhagens parentais e seus híbridos foram realizadas e o número cromossômico foi determinado por $2n=24$. Três sistemas de enzimas foram usados como extratos foliares: estrease, catalase e peroxidase. Não foi encontrada nenhuma variação de catalase e peroxidase, enquanto que três amostras de estrease foram verificadas. Os zimogramas com bandas numeradas foram representados. Os três tipos de zimogramas A, B e C apresentaram a banda número 1 em comum, A e C (a banda número 2), B e C (a banda número 4) e somente C apresentou a banda número 3. Dos 15 acessos, 8 obtiveram o zimograma A, 6 obtiveram o B e somente 1 obteve o C (CONICELLA et al., 1990).

Em cruzamentos de *C. annuum* e *C. chinense*, foram identificados quatro genes e somente dois deles estão presentes em *C. annuum*. Existe a hipótese que o gene desidrogenase alcoólica (ADH) foi originado de um processo de duplicação por um *crossing over* desigual. Especula-se que a duplicação gênica de um gene para estrease ocorreu em acessos de *C. annuum*, cujo padrão C de estrease é proposto. Tanksley (1984) observou em *C. annuum* uma duplicação de um gene para fosfoglucomutase (Pgm-3), localizado no cromossomo envolvido na troca que distingue *C. annuum* de *C. chinense* (CONICELLA et al., 1990).

Tanksley (1984) desenvolveu o primeiro mapa de ligação de pimentão, baseado em 14 isozimas com 9 locos isozimáticos, arranjados em

quatro grupos de ligação. Apesar de ambas as amostras de pimentão e tomate se hibridizarem com os DNAs genômicos, a ordem dos mesmos não se manteve nos cromossomos. Construiu-se um mapa de ligação de *Capsicum* com 192 marcadores, e também foram comparadas as relações de síntese entre o pimentão e o tomate. Os possíveis sítios de locos de ligação centromérica foram feitos, baseando-se na posição das sondas com alta densidade no mapa de tomate. Os sítios do ponto de quebra da translocação recíproca entre os mapas dos dois parentais de pimentão foram marcados e determinados pelas posições dos marcadores isozimáticos. O principal gene de controle da pungência do fruto foi encontrado em uma posição conservada (PRINCE, 1992).

A análise do mapa de ligação de pimentão realizada por TANKSLEY (1984) demonstrou que *C. annuum* e *C. chinense* diferenciam entre si pela presença de uma translocação cromossômica. Com base em estudos meióticos, Koompai (1976) e Pickersgill et al. (1978) chegaram a conclusões similares, o que sugere que as formas cultivadas de *C. annuum* se diferem das de *C. chinense* por uma translocação recíproca. Outros resultados mostraram a descoberta de uma aparente duplicação gênica em *C. annuum* (TANKSLEY, 1984).

Para ampliar o conhecimento e a compreensão da organização e da evolução dos cromossomos de plantas, os autores reportaram a construção de um mapa de ligação de pimentão, baseado na hibridização com as mesmas sondas utilizadas no desenvolvimento do mapa de tomate. O uso dessas sondas moleculares demonstrou ser um método rápido para a identificação e o mapeamento de genes ortólogos em espécies isoladas pelo aspecto reprodutivo, o que é um pré-requisito para a comparação do número e da ordem dos genes. O mapeamento de pimentão foi feito com o uso de 46 indivíduos derivados do cruzamento de *C. annuum* com a F1 de *C. chinense* X *C. annuum* (LEFEBVRE et al., 1995).

Existem dois mapas de ligação de pimentão, que incluem marcadores enzimáticos e RFLP (LEFEBVRE et al., 1995). Todas as

espécies do gênero possuem um complemento haplóide de 12 cromossomos. Assim, um mapa completo de RFLP de *Capsicum* deve ter 12 grupos de ligação (PRINCE, 1992). Os mapas indicaram que existem, em média, 30 marcadores comuns entre *C. annuum* e *C. chinense*. Vários genes controladores de características fenotípicas foram identificados. Porém, somente alguns desses caracteres foram relatados nos mapas moleculares. Assim, o estabelecimento de um mapa integrado pode fornecer informações genéticas de muitos cruzamentos, bem como um conjunto de marcadores a serem regularmente ordenado em todo o genoma. Trabalhos nessa área são úteis, em investigações de diversidade genética ou seleção de marcadores, por aumentarem a informação sobre caracteres quantitativos (LEFEBVRE et al., 1995).

O conteúdo haplóide de DNA das espécie de Solanaceae apresenta amplo espectro de variação: de 0,74 pg em tomate a 2,76 pg em pimentão, ainda que apresente o mesmo número cromossômico ($X=12$). Já que o número cromossômico básico é muito conservado nessa família, tem sido questionado se o número e a ordem dos genes também permaneceram conservados. Um mapa de ligação de tomate (*Lycopersicon esculentum*) foi construído, baseando-se nos locos detectados pela técnica de hibridização *in situ* com sondas de cDNA e de DNA de cópia-única (LEFEBVRE et al., 1995).

Embora o pimentão e o tomate sejam da mesma família, e ambos apresentem o mesmo número cromossômico, existe diferença entre os tamanhos genômicos. O pimentão possui de três a quatro vezes mais DNA do que o tomate (PRINCE, 1992; LEFEBVRE et al., 1995). Também, a ordem dos genes no mapa de RFLP tem sido, consideravelmente, rearranjada. Alterações cromossômicas também ocorreram na ordem dos marcadores, quando comparada com o tomate. Mas algumas regiões dos grupos de ligação mantiveram a mesma ordem dos marcadores presentes em tomate (PRINCE, 1992).

Três grupos de ligação inteiros de pimentão mostraram colinearidade com os cromossomos de tomate. Mas uma observação na ordem de marcadores no mapa de RFLP de pimentão, quando comparada com tomate, revela um mínimo de 15 quebras cromossômicas, que devem ter ocorrido na divergência evolutiva entre as duas plantas. Possíveis inversões cromossômicas entre tomate e pimentão ocorreram e foram detectadas na ordem de certos marcadores em pimentão. A adição de um número maior de marcadores nessas regiões indica a ocorrência dessa inversão (PRINCE, 1992).

LEFEBVRE et al. (1995) verificaram que a evolução cromossômica em pimentão e tomate se procedeu por eventos de quebra cêntrica, e que o DNA adicional em *Capsicum* se deve à maior incidência de eventos de duplicação gênica nesse gênero do que em *Lycopersicon*. Mesmo que o número de centrômeros tenha permanecido estático em tomate e pimentão, a composição cromossômica ao redor desses centrômeros passaram por extensos rearranjos.

Apesar de o pimentão e o tomate apresentarem o mesmo conjunto básico de genes, o número de cópias e de locos desses genes não foram completamente conservados. Em ambas as espécies, 88% dos indivíduos analisados apresentaram o mesmo número de locos. Observações constataram que um loco de tomate aparece três vezes em pimentão. As duas cópias adicionais em pimentão foram encontradas em grupos de ligação independentes. Se a disparidade do número de locos foi o resultado de uma duplicação gênica que ocorreu em pimentão, após a divergência com tomate, então todas as cópias do gene devem ter se dissociado com a mesma rigorosidade. Os dados indicam que os três locos em pimentão são o resultado de eventos de duplicação que ocorreram após a divergência do ancestral comum de pimentão e de tomate (LEFEBVRE et al., 1995).

Genes ribossomais são encontrados em apenas um loco em tomate, que se localiza no braço curto do cromossomo acrocêntrico (número

2). O mapeamento de *C. chinense* indicou a presença de três locos, sendo que um dos locos corresponde ao loco do cromossomo 2 de tomate. Dois sítios de hibridização em dois cromossomos diferentes de *C. chinense* foram observados, mas somente um deles foi encontrado em *C. annuum* e tomate. Os resultados indicam que parece haver uma pequena conservação dos grupos de ligação entre pimentão e tomate. O grupo de ligação de pimentão é composto de até três segmentos dos cromossomos número 1 e 2 do genoma de tomate (LEFEBVRE et al., 1995).

Comparando-se o mapa de tomate com o de pimentão, é possível determinar o número mínimo de quebras cromossômicas necessárias para alterar a ordem e a posição dos genes do mapa de tomate, e formar o complemento de pimentão. Assim, cerca de 32 quebras dos cromossomos de tomate foram estipuladas por originar trocas de posição dos genes em pimentão. Dessa forma, importantes rearranjos cromossômicos devem ter ocorrido e acompanhado a divergência dessas duas espécies (LEFEBVRE et al., 1995).

Capsicum e *Lycopersicon* parecem ter mais isozimas do que normalmente é encontrado em certos sistemas isozimáticos. Com o alto número de locos, ocorre aumento dos alelos nulos. *Capsicum* e *Lycopersicon* diferem na frequência individual desses alelos, o que em *Lycopersicon*, parecem ser raros. Em contraste, em *Capsicum*, muitas das espécies são fixadas para alelos nulos em um loco particular (Mc LEOD et al., 1983).

O mapa de ligação de batata é semelhante ao de tomate, na ordem dos marcadores. Os únicos rearranjos cromossômicos que parecem ter ocorrido entre batata e tomate são inversões paracêntricas. Em contraste, apesar de o pimentão apresentar, aparentemente, ter sofrido inversões ou eventos cromossômicos mais complicados, existem evidências de que eventos de quebra-fusão cêntrica estão ligados ao centrômero de diferentes cromossomos. Assim, pode-se concluir que a evolução genômica dentro da família Solanaceae ocorreu por extensivos rearranjos

cromossômicos entre pimentão e tomate, desde suas divergências (PRINCE, 1992).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

As sementes-teste de *Capsicum annuum* L., Criollo de Morelos, L-3436 (linhagem de melhoramento), o híbrido F1 do inter cruzamento das duas linhagens anteriores e California Wonder (cultivar comercial) foram obtidas no banco de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa (UFV), gentilmente cedidas pelo professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel. As análises mitóticas foram realizadas no Laboratório de Citogenética Vegetal, localizado no Departamento de Biologia Geral (DBG). A espécie, em questão, foi escolhida por suas características citogenéticas e sua importância agrônômica.

3.2. Métodos

3.2.1. Armazenamento e germinação das sementes

As sementes de *Capsicum annuum* L., para estudos citogenéticos dos cromossomos mitóticos, foram identificadas e acondicionadas em envelopes de armazenamento a 4°C, até o momento de uso.

Algumas das sementes, retiradas dos envelopes de armazenamento, foram tratadas durante 10 minutos em hipoclorito de sódio (NaOCl), a 5%, 10 minutos em água corrente e 5 minutos em água destilada. Outras foram lavadas somente em água corrente por 10 minutos e, em água destilada, por 5 minutos.

Em seguida, as sementes foram transportadas para placas de Petri, contendo papel-filtro e água destilada, apenas o suficiente para umedecer o papel. Cada placa de Petri foi devidamente identificada, constando o nome da linhagem utilizada e a data de início da germinação. Em cada placa, foram colocadas 20 sementes para germinar à temperatura de 28-30°C, em estufa de cultura e no escuro. As raízes com 0,5 a 1,0 cm de comprimento foram consideradas apropriadas para as etapas posteriores.

3.2.2. Preparação do material citogenético

3.2.2.1. Pré-tratamentos e fixação de raízes

As sementes de pimentão germinadas, segundo os procedimentos citados, foram submetidas a dois tipos de pré-tratamentos, com o uso das seguintes soluções: 1) APM (amiprofos-metila) a 5 e 10 µM; 2) trifluralina a 3, 8, 10, 15 e 20 µM; 3) orizalina a 5, 8, 10, 15 e 20 µM; 4) 8-hidroxiquinoleína a 2 mM; e 5) solução de brometo de etídio a 20, 25 e 30

μM . O tipo e a concentração de cada substância, bem como o tempo de exposição a cada solução, foram alterados de modo a acumular o maior número de células em metáfase, apresentando cromossomos morfológicamente definidos e não-sobrepostos na placa celular.

As sementes foram pré-tratadas de três formas: 1) em placas de Petri contendo papel-filtro umedecido com a solução. As sementes foram colocadas sobre o papel-filtro e, em seguida, cobertas novamente com o mesmo papel, também umedecido com a mesma solução. O excesso de líquido foi retirado da placa, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur; 2) em placas de Petri com cerca de 5 mL de solução, onde as sementes ficaram submersas; e 3) em placas de Petri, contendo algodão umedecido em solução.

Em todas as formas de pré-tratamento, as placas de Petri foram devidamente identificadas com o nome da linhagem, o tipo e a concentração da solução para acúmulo de metáfases, o horário e o tempo de tratamento. Algumas placas foram colocadas em estufa de cultura a 28-30°C, por 3 a 6 horas. Outras foram colocadas em geladeira a 4°C, por 18 a 22 horas.

Após transcorrido cada tempo de tratamento, as sementes foram retiradas das placas de Petri e lavadas em água corrente, por 5 minutos, e em água destilada, por 3 minutos.

Cerca de 15 minutos antes da fixação, preparou-se a solução fixadora de metanol-ácido-acético (P.A.) na proporção de 3:1 (V/V) e colocada a -20°C. As raízes extraídas das sementes com o uso de bisturi foram secas em papel-filtro e colocadas em recipientes de acondicionamento, contendo solução fixadora. O fixador foi trocado três vezes, a cada 15 minutos, sendo que, após a última troca, os recipientes foram estocados a -20 °C por 24 horas (CARVALHO e SARAIVA, 1993a; CARVALHO, 1995).

3.2.2.2. Maceração enzimática

As raízes foram lavadas por 10 minutos em água corrente e 5 minutos em água destilada, em peneira, para a remoção da solução fixadora de metanol-ácido-acético 3:1 (V/V). Após a lavagem, o excesso de água foi retirado com papel-filtro.

A digestão do material foi realizada em tubos de Eppendorf™ de 1,0mL, contendo solução de composto enzimático Flaxzyme™ (NOVO FERMENT™) e água destilada 1:14 (V/V), durante 1h20min, à temperatura de 34°C. Decorrido o tempo de digestão, as raízes foram lavadas em dois banhos de água destilada, por 10 minutos. O armazenamento do material digerido foi feito em tubos de Eppendorf™ de 1,0mL, contendo solução fixadora de metanol-ácido-acético 3:1 (V/V). Após 15 minutos de armazenamento no *freezer*, foram efetuadas duas trocas da solução fixadora para assegurar a integridade do material. Os tubos de Eppendorf™ de 1,0 mL foram armazenados a -20 °C, por 24 horas.

3.2.2.3. Técnica de dissociação celular e secagem-ao-ar (CARVALHO, 1995)

As lâminas de vidro foram lavadas com detergente e água corrente, antes de serem armazenadas em recipiente com álcool 95% a -20°C.

Com o auxílio de um microscópio estereoscópio e um bisturi, cada raiz foi transferida para uma placa de vidro escavada, contendo 1mL de solução fixadora de metanol-ácido-acético 3:1 (V/V), onde o meristema apical de cada raiz foi extraído. Cada fragmento foi transportado, por meio de uma pipeta de Pasteur, para uma lâmina de vidro inclinada em ângulo aproximado de 30°, previamente limpa com algodão umedecido em álcool a

95%. As preparações cromossômicas foram realizadas por dissociação celular dos meristemas apicais, com o gotejamento de três a cinco gotas de fixador a -20°C. Em seguida, as lâminas foram submetidas à técnica de dissociação celular e de secagem-ao-ar, em movimentos rápidos e em placa aquecedora à temperatura de 50°C.

Algumas das lâminas preparadas dessa forma foram coradas imediatamente por coloração com Giemsa ou submetidas aos bandeamentos DAPI, Q e C; e outras foram armazenadas em estufa a 35°C, por cerca de quinze dias, para a realização do bandejamento NOR (Ag-NOR).

3.2.3. Técnicas de coloração e bandejamento cromossômico

As lâminas, previamente preparadas conforme o item 2.2.2, foram analisadas em microscópio adaptado com contraste de fase, para seleção de imagens cromossômicas, e identificação das respectivas posições nas lâminas (CAIXETA, 1998).

3.2.3.1. Coloração uniforme com Giemsa (AARESTRUP e CARVALHO, 1999)

As lâminas foram submetidas à coloração com solução de Giemsa, a 5%, em tampão fosfato pH 6,8, por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as preparações foram lavadas por 5 minutos, em recipiente contendo água destilada. Transcorrido o tempo determinado, foi feita uma troca da água destilada. A técnica de secagem-ao-ar foi realizada, e as lâminas foram colocadas em placa aquecedora, à temperatura de 50°C.

Em seguida, realizou-se o exame sob microscopia óptica. A identificação dos pares homólogos foi realizada por meio das características morfológicas específicas de cada cromossomo.

Para a montagem dos kariogramas, os cromossomos foram medidos, utilizando as ferramentas do programa NIH Image. Os valores absolutos das medidas de cada cromossomo foram obtidos pelas avaliações do comprimento total e dos braços curto (c) e longo (l), separadamente. Esses dados e a subsequente determinação da razão de braços cromossômicos (r) e do índice centromérico (ic) foram utilizados como ferramentas auxiliares para a representação do idiograma e do kariograma.

As equações utilizadas nos cálculos citados anteriormente foram:

$$r = \frac{l}{c}$$

$$ic = \frac{c \times 100}{c + l}$$

3.2.3.2. Bandeamento com DAPI (AARESTRUP e CARVALHO, 2000)

A solução de 4,6-diamidino-2-fenilindol-DAPI (Sigma™) foi preparada no momento do uso, nas concentrações de 0,5 a 2,0 µg/mL, em solução-tampão McIlvaine, pH 6,8, 7,0 ou 7,2. Foram utilizadas soluções de ácido cítrico a 0,1M e de Na₂HPO₄ a 0,2 M, para obtenção do referido tampão. As lâminas foram totalmente cobertas pelo líquido e colocadas em câmara úmida, à temperatura ambiente e no escuro. O tempo de incubação variou entre 5 e 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas por 2

minutos em água destilada e em dois banhos de tampão McIlvaine, pH igual ao utilizado na preparação da solução de DAPI. Após a secagem ao ar, foram depositadas duas gotas de solução de glicerol - tampão McIlvaine de mesmo pH, na proporção de 2:1 (V/V), sobre cada lâmina, que foi coberta com lamínula e vedada com esmalte incolor.

O material foi observado imediatamente após a confecção das lâminas, 1 hora depois ou no dia seguinte, em microscópio equipado com acessório para fluorescência. Foram utilizados filtros com comprimentos de onda de 360 e 390 nm. Os cromossomos tiveram seus comprimentos total e dos braços curto e longo medidos. Foram utilizadas as mesmas equações citadas no item 3.2.3.1., para o cálculo da razão entre os braços cromossômicos e do índice centromérico. A área e o perfil de densidade óptica média dos cromossomos foram calculados, o que auxiliou na classificação cariotípica da espécie.

3.2.3.3. Bandeamento Q

As lâminas foram dispostas, horizontalmente, em câmara úmida e cobertas com solução de quinacrina (Merck™) a 0,25, 0,10 ou 0,08%, em água destilada. Após decorrido o tempo de 5 a 15 minutos de coloração à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas e montadas em água destilada ou em água acidificada (adição de duas gotas de ácido acético 45%, em 60 mL de água destilada). Cada lâmina foi coberta por uma lamínula de vidro, previamente limpa com álcool. Para evitar a evaporação do líquido e a entrada de ar, a lamínula foi vedada com esmalte incolor.

3.2.3.4. Bandeamento C (CARVALHO, 1995)

As lâminas foram imersas em solução saturada (5%) de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), a 56 °C, por 50 segundos, com agitação contínua. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em solução de ácido acético a 5%, em metanol/ácido acético na proporção de 6:1 (V/V) e secas em placa aquecedora a 50 °C. A coloração foi realizada com Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH 6,8, por 8 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as preparações foram lavadas em dois banhos de água destilada e secas ao ar.

3.2.3.5. Bandeamento NOR (Ag-NOR) (AARESTRUP e CARVALHO, 2000)

A técnica de bandeamento NOR(Ag-NOR) foi procedida com o gotejamento da solução de nitrato de prata (AgNO_3) 50% sobre cada lâmina. Após terem sido cobertas com lamínula de vidro, as lâminas foram colocadas em câmara úmida a 34 °C, por 20 horas. Decorrido o tempo de incubação, as lamínulas foram removidas com jato de água, e as lâminas foram lavadas em água corrente por 2 minutos e em água destilada por 1 minuto. A observação das lâminas foi realizada com objetiva de imersão de 100 X, e as figuras cromossômicas foram capturadas por sistemas de análise de imagens.

3.2.4. Fotografia e análise de imagem

As lâminas que continham figuras cromossômicas adequadas foram observadas com objetiva de imersão de 100 X, em fotomicroscópio Olympus™, modelo BX60, equipado com acessórios de análise de imagem, iluminação de campo claro e de fluorescência.

As imagens foram capturadas diretamente, por uma vídeo-câmera, acoplada ao microscópio e a um computador Macintosh™ (mod.G3), equipado com placa digitalizadora. Tais imagens foram analisadas por meio dos seguintes programas: NIH Image, versão 1.60, de domínio público, escrito por Wayne Rasband, do U.S. National Institutes of Health, acessado via Internet, pelo código anonymous ftp from zippy.nihm.nih.gov; Image SXM, versão 1.61, de domínio público, derivado do NIH Image, cujas informações foram fornecidas por Steve Barret, do Surface Science Research Centre, University of Liverpool; e IPLab Spectrum™, versão 3.9, da Signal Analytics Corporation (1995).

As coleções de imagens representativas de cada cromossomo foram analisadas, utilizando a densidade da fluorescência calibrada em 256 tonalidades de cinza. As fotografias coloridas foram tiradas com filmes Fujicolor-100 (Fujifilm), e reveladas comercialmente. Algumas figuras foram documentadas, diretamente, por meio de impressora jato de tinta.

A calibragem das imagens, em micrômetros, foi realizada por meio da captura da escala de 1 mm, subdividida em micrometros de uma lâmina-padrão. Os valores de pixels foram convertidos em unidades de micrômetro, por meio do uso de *softwares* específicos.

Em algumas análises, foram utilizados os efeitos com os filtros disponíveis, e certas figuras foram pseudocolorizadas com o uso do programa de análise de imagem, para realçar as regiões de interesse (CARVALHO e SARAIVA, 1993; CARVALHO, 1995; CAIXETA, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparação do material citogenético

As células meristemáticas de raízes de pimentão submetidas aos diferentes agentes e formas de pré-tratamento, citados no item 2.2.2.1. possibilitaram a visualização de cromossomos mitóticos. A eficiência da solução fixadora, bem como da técnica de maceração enzimática, foram avaliadas no preparo das lâminas.

Foi verificado que o herbicida orizalina e o fluorocromo brometo de etídio, nas respectivas concentrações de 7,5 e 25 μM , mostraram os melhores desempenhos em relação aos outros agentes utilizados. Os períodos de tempo mais adequados foram de 4h15min a 29°C e de 22 horas a 4°C, em ambas as substâncias administradas. Os cromossomos das células pré-tratadas mostraram-se individualizados e com morfologia aparentemente normal. Os agentes utilizados, para acumular maior número de metáfase e que apresentaram melhor desempenho em determinado tempo e concentração, não obtiveram o mesmo comportamento, quando as raízes foram submetidas a outras variações de tempo e de concentração.

Nesses casos, houve redução do número de metáfases e as poucas figuras cromossômicas observadas não apresentaram morfologia adequada, prejudicando a análise dos cariótipos.

Dolezel et al. (1994), citados por CARVALHO (2000), relataram que, de modo geral, os herbicidas são bons bloqueadores mitóticos, pois apresentam maior afinidade pela tubulina do que outras substâncias, tal como a colchicina.

As placas de Petri, contendo algodão ou papel-filtro umedecido em solução de pré-tratamento, proporcionaram resultados favoráveis à obtenção de um número maior de metáfases. As lâminas preparadas a partir de raízes submersas no líquido não apresentaram resultados satisfatórios. Supõe-se que, como as sementes de *C. annuum* L. germinam em pouca quantidade de água, as condições de umidade na etapa de pré-tratamento das raízes devem ser mantidas.

Os cromossomos fixados e armazenados em solução de metanol-ácido acético (P.A.), na proporção 3:1 (V/V), mantiveram a integridade morfológica. Segundo LEITCH et al. (1994), a etapa de fixação preserva a morfologia dos cromossomos pela minimização da perda de ácidos nucléicos. Os autores relataram, ainda, que a solução fixadora de metanol-ácido acético proporciona a precipitação de proteínas prejudiciais à manutenção da morfologia cromossômica.

As lâminas preparadas a partir de raízes submetidas à solução de composto enzimático Flaxzyme™ (NOVO FERMENT™) e água destilada 1:14 (V/V), por 1h20 min, à temperatura de 34°C, foram observadas, e verificou-se que os cromossomos obtidos se posicionaram bem espalhados. Os dados indicam que o produto enzimático proporcionou a obtenção de cromossomos individualizados sobre as lâminas.

As metodologias de dissociação celular e secagem-ao-ar, associadas às técnicas descritas, anteriormente, permitiram a observação de figuras cromossômicas em bom estado morfológico. Ainda, os cromossomos

dispostos, individualmente, sobre as lâminas permitiram a aplicação das técnicas de bandejamento.

4.2. Análise do cariótipo

4.2.1. Coloração uniforme com Giemsa

Para a caracterização cariotípica de *C. annuum* L., foi realizada a coloração dos cromossomos mitóticos com Giemsa. O cariograma e o idiograma da espécie (Figuras 1a e 1b) foram caracterizados.

Na montagem do idiograma, bem como do cariograma, os cromossomos homólogos foram numerados de 1 a 12, segundo a ordem decrescente de tamanho. A identificação cromossômica foi realizada com base no comprimento total, na razão entre os braços e no índice centromérico. Os resultados das análises cariotípicas estão apresentados no Quadro 1.

O complemento diplóide foi evidenciado por $2n=24$ cromossomos, sendo 11 pares metacêntricos (do par 1 ao 11) e um par acrocêntrico (par 12). O estudo citogenético revelou, ainda, a presença de três pares cromossômicos com constrição secundária (pares número 5, 8 e 12). Como o idiograma consiste na representação esquemática do cariograma, as constrições centroméricas e secundárias puderam ser facilmente visualizadas.

O mesmo número diplóide de cromossomos foi evidenciado por PANDA et al. (1984), TANKSLEY (1984), LAKSHMI et al. (1989), CONICELLA et al. (1990), BERTÃO (1993) e MOSCONE et al. (1995, 1996). DATTA (1968) relatou a ocorrência de alterações do número cromossômico somático em variedades cultivadas de *Capsicum annuum* oriundas da Índia. Foram encontradas células com 24, 36 e 48 cromossomos.

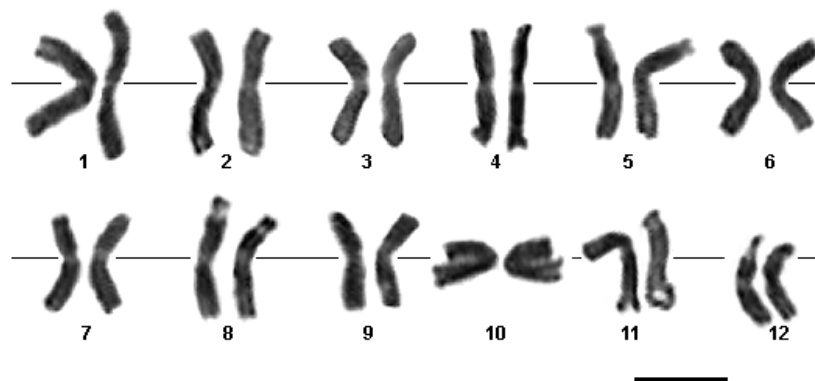


Figura 1a - Cariograma de *Capsicum annuum* L. Cromossomos prometafásicos pré-tratados com amiprofos-metila a 5 μ M, e corados com Giemsa a 5% (barra = 5 μ m).

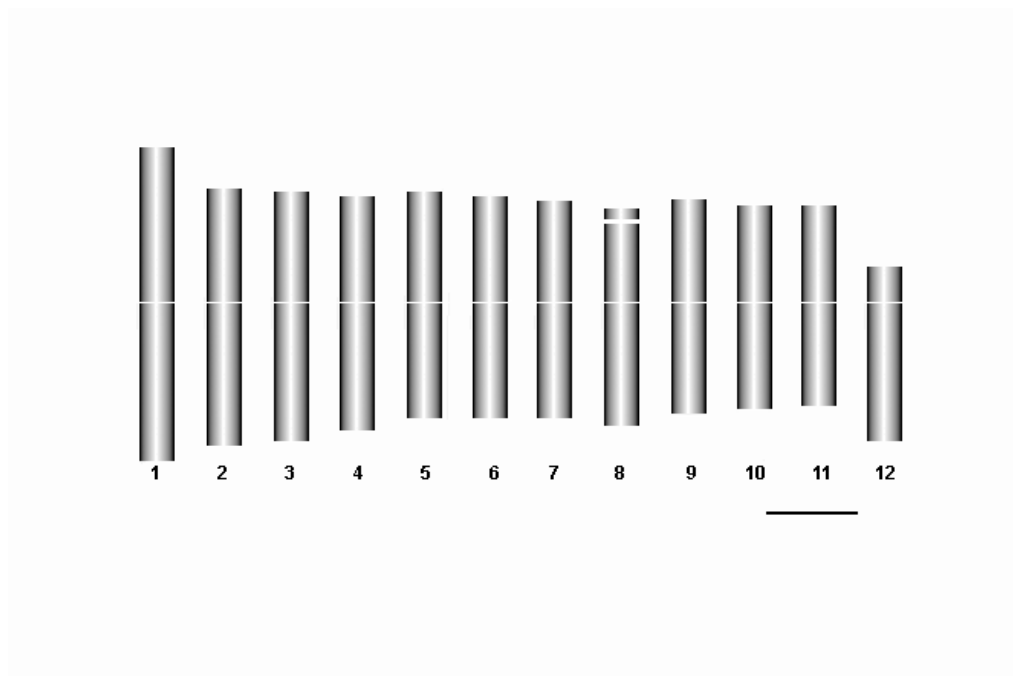


Figura 1b - Idiograma da espécie *Capsicum annuum* L. referente às medidas do Quadro 1 obtidas do kariograma da Figura 1a (barra = 10 μ m).

A poliploidia foi relatada como um evento importante na evolução de diferentes variedades e linhagens da espécie; e as peculiaridades na morfologia cromossômica foram designadas como características distintivas de cada variedade ou linhagem. MOSCONE et al. (1995), em suas análises mitóticas, também encontraram constrições secundárias no par cromossômico número 12.

Alguns autores tiveram dificuldade para classificar os cromossomos de *C. annuum* L., quanto à posição centromérica. PICKERSGILL (1971) verificou que a espécie apresenta 12 pares de cromossomos pequenos e similares em tamanho, sendo a maioria metacêntrica ou submetacêntrica. Por causa desses dados, a autora relatou que raramente é possível identificar os homólogos com facilidade.

Quadro 1- Caracterização cariotípica dos cromossomos metafásicos de *Capsicum annuum* L.

Cromossomo número	Comprimento (µm)		r	ic	Classe	Comprimento relativo (%)	
	Braço						
	Curto	Longo					
1	4,10	4,20	8,30	1,02	49,4	M	11,44
2	3,00	3,80	6,80	1,27	44,1	M	9,37
3	2,90	3,70	6,60	1,28	43,9	M	9,09
4	2,80	3,40	6,20	1,21	45,2	M	8,54
5	3,05	3,10	6,15	1,02	49,6	M	8,47
6	2,80	3,10	5,90	1,11	47,5	M	8,13
7	2,73	3,10	5,83	1,14	46,8	M	8,03
8	2,50	3,30	5,80	1,32	43,1	M	7,99
9	2,71	2,99	5,70	1,10	47,5	M	7,85
10	2,60	2,80	5,40	1,08	48,1	M	7,44
11	2,60	2,70	5,30	1,04	49,1	M	7,30
12	0,90	3,70	4,60	4,11	19,6	A	6,34
							100,0

r = razão entre os braços longo e curto;

ic = índice centromérico

M = metacêntrico;

A = acrocêntrico.

TANKSLEY (1984) encontrou células somáticas, contendo dez pares metacêntricos ou submetacêntricos e dois pares acrocêntricos. BERTÃO (1993) determinou o cariótipo-padrão com 11 pares cromossômicos metacêntricos ou submetacêntricos e um par subterminal (ou seja, acrocêntrico ou subtelocêntrico). Contudo, MOSCONE et al. (1996) caracterizaram o cariótipo como 11 pares metacêntricos e um par subtelocêntrico.

No presente estudo citogenético, observou-se que os cromossomos somáticos são relativamente homogêneos, morfologicamente. Entretanto, o cariótipo de *C. annuum* L. pôde ser caracterizado com uso da coloração uniforme dos cromossomos com solução de Giemsa.

4.2.2. Coloração com DAPI

Os cromossomos de *Capsicum annuum* L., corados com DAPI, foram observados em graus diferentes de compactação, para aumentar a resolução da análise da caracterização cariotípica da espécie quanto à posição centromérica. Foram construídos cariogramas com cromossomos metafásicos muito compactados (Figura 2a), menos compactados (Figura 2b) e profásicos (Figura 2c). Observou-se que os cromossomos em menor grau de compactação podem induzir a erros de interpretação. Como pode ser visto na figura 2c, os cromossomos profásicos dificultam a montagem do cariograma por causa da contorção morfológica.

A análise digital das imagens cromossômicas coradas com DAPI permitiu a construção do cariograma da espécie com os cromossomos bem compactados (Figura 3a). Esse cariograma foi montado com o auxílio da identificação individual dos cromossomos, principalmente daqueles com morfologia muito semelhante. A análise foi realizada, calculando-se o perfil

de densidade relativa óptica média e da área (μm^2) dos cromossomos de *C. annuum* L. (Quadro 2).

No Quadro 2, encontram-se os valores da área e densidade relativa óptica média (D.O.) por cromossomo, em que os cromossomos homólogos são designados pelas letras a e b.

A densidade média obtida e a determinação de coeficientes de variação permitiram plotar gráficos e simular cariótipos de fluxo. Essa simulação possibilitou a visualização e a representação estatística do cariótipo. Uma vez padronizada essa metodologia, os cromossomos puderam ser identificados, usando somente o seu perfil gráfico (Figura 3b).

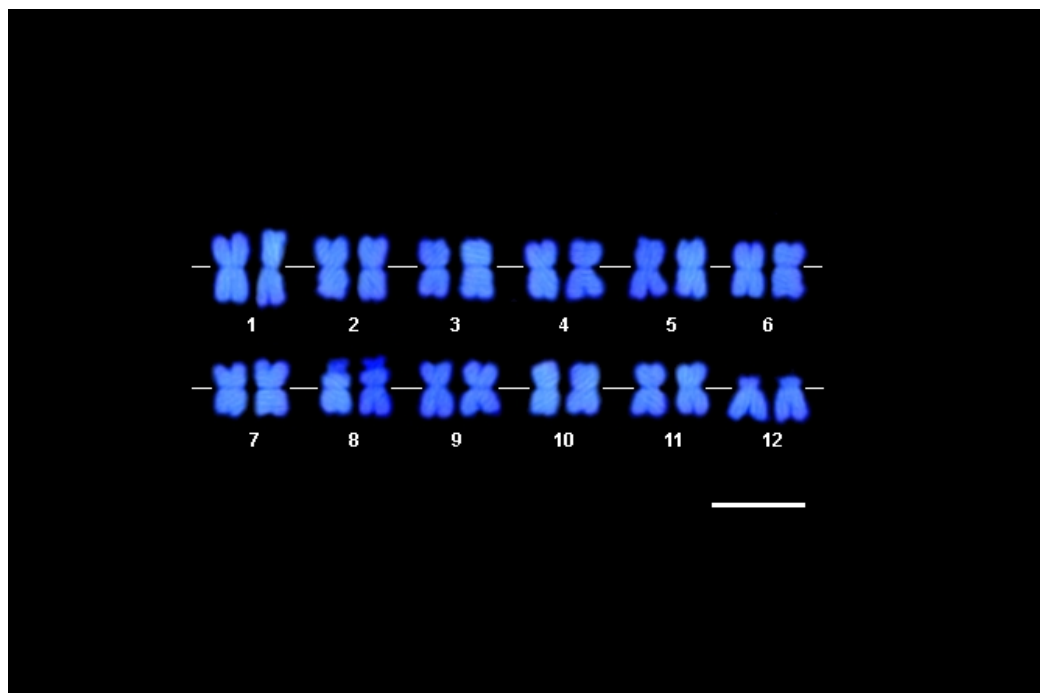


Figura 2a - Cariograma de *Capsicum annuum* L.. Cromossomos metafásicos pré-tratados com orizalina a $7,5 \mu\text{M}$, e corados com solução de DAPI a $2,0 \mu\text{g/mL}$ (barra = $5 \mu\text{m}$).

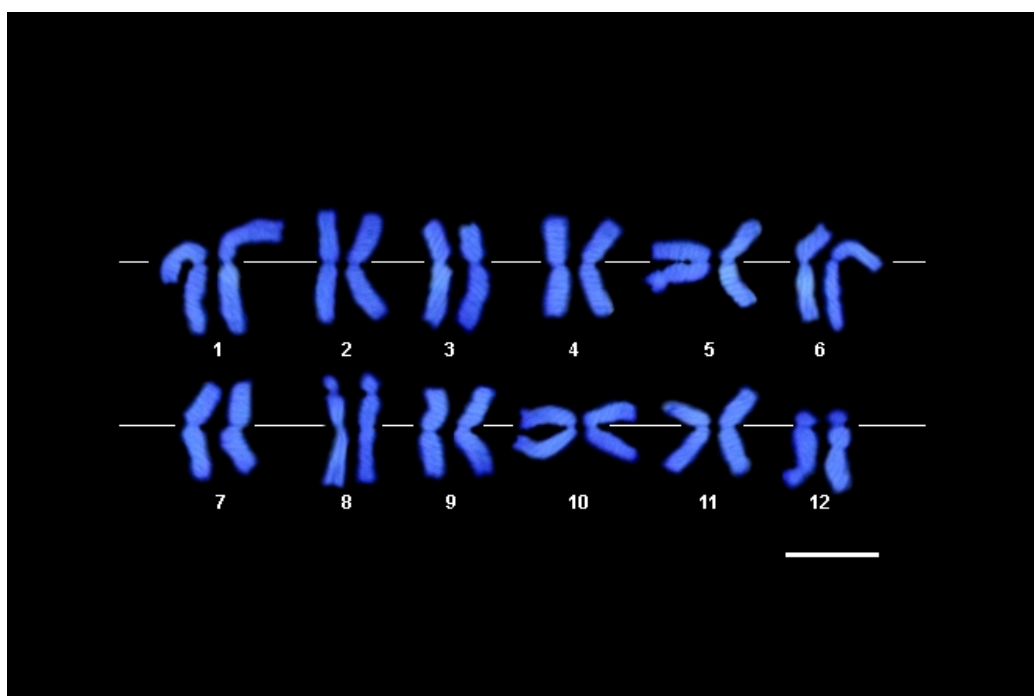


Figura 2b - Cariograma de *Capsicum annuum* L. Cromossomos metafásicos pré-tratados com brometo de etídio a 25 μ M, e corados com solução de DAPI a 2,0 μ g/mL (barra = 5 μ m).

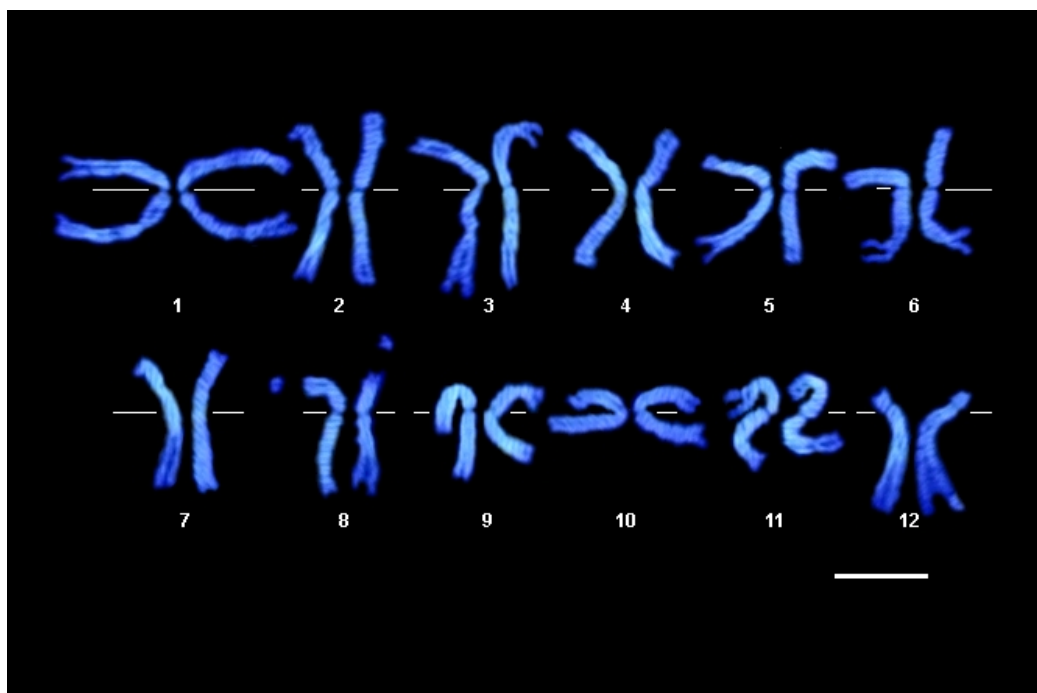


Figura 2c - Cariograma de *Capsicum annum* L. Cromossomos prometafásicos pré-tratados com brometo de etídio a 25 μ M, e corados com solução de DAPI a 1,0 μ g/mL (barra = 5 μ m).

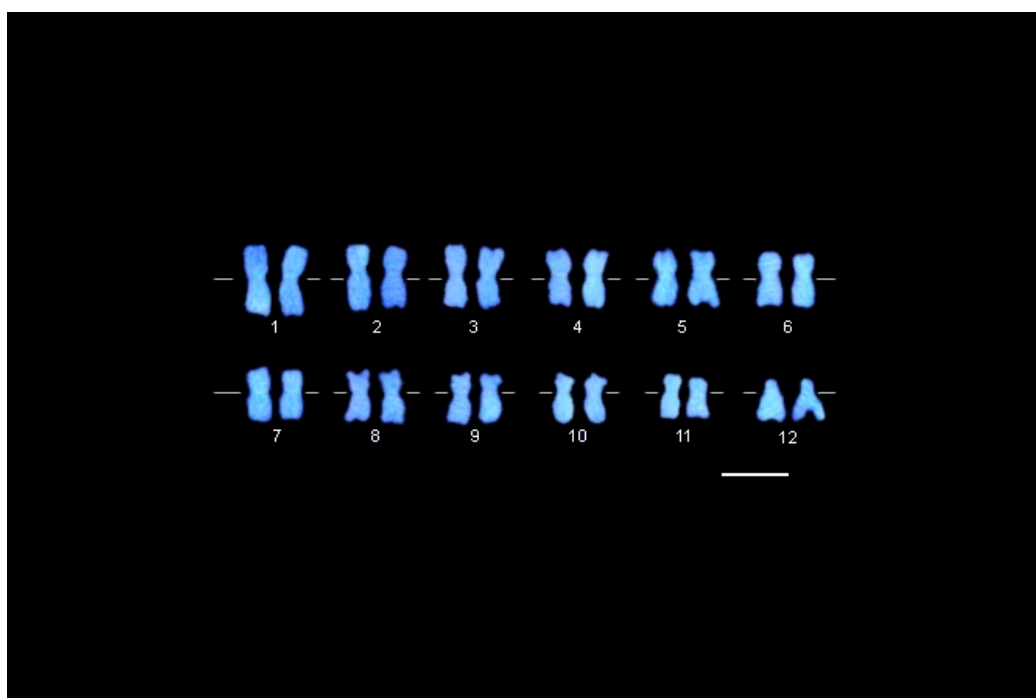


Figura 3a - Cariograma de *Capsicum annuum* L. Cromossomos metafásicos pré-tratados com orizalina a 7,5 μ M, e corados com solução de DAPI a 0,5 μ g/mL (barra = 5 μ m).

Quadro 2 - Descrição do cariótipo de *Capsicum annuum* L., pelo cálculo da área e do perfil de densidade dos cromossomos

Número cromossômico	Área (μm^2)	Densidade óptica média (D.O.)
1a	11,0	83,0
1b	10,3	83,0
2a	9,7	81,0
2b	9,0	98,0
3a	8,6	79,0
3b	8,7	83,0
4a	8,2	80,0
4b	8,5	65,0
5a	8,3	71,0
5b	9,2	75,0
6a	8,6	70,0
6b	7,7	63,0
7a	8,2	76,0
7b	7,1	77,0
8a	6,9	86,0
8b	7,0	86,0
9a	6,8	79,0
9b	6,3	74,0
10a	6,1	66,0
10b	6,2	73,0
11a	5,4	63,0
11b	5,4	67,0
12a	6,2	63,0
12b	5,6	77,0

a e b = cromossomos homólogos

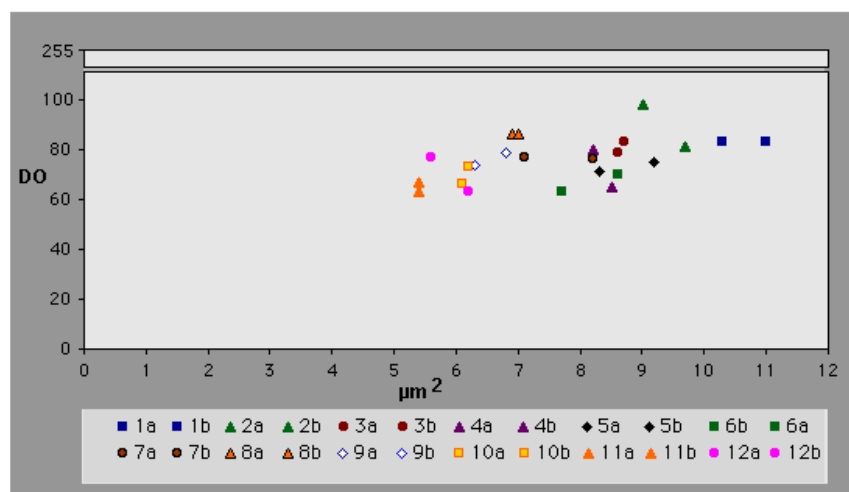


Figura 3b - Plotagem do perfil de densidade relativa óptica média (D.O.), em função da área (μm^2). Os dados foram obtidos do cariograma de *Capsicum annuum* L. (Figura 3a).

A análise citogenética, realizada neste trabalho, permitiu verificar que cromossomos em diferentes estádios de compactação podem promover erros na classificação cariotípica. Os cromossomos mais compactados não permitem que as constrições secundárias sejam facilmente localizadas, ao mesmo tempo que os menos compactados apresentam diversas constrições, o que pode dificultar a identificação das regiões centroméricas. Portanto, diferentes pré-tratamentos podem influenciar a caracterização morfológica dos cromossomos.

Os cálculos da área e da densidade relativa óptica média de cada cromossomo, obtidos pelo uso da técnica de análise de imagem, confirmaram a classificação cariotípica realizada no item 3.2.4.

Christensen e Bamford (1943) e Marks (1952), citados por LIMAYE e PATIL (1989) e MOSCONE (1990), relataram que a espécie *C. annuum* apresenta o cariótipo composto de cromossomos pequenos. Contrapondo, Sinha (1950), citado por LIMAYE e PATIL (1989) informou que os cromossomos da espécie são grandes em tamanho. PICKERSGILL et al. (1979), KUMAR et al. (1987) e BERTÃO (1993) também evidenciaram alterações significativas no comprimento cromossômico do complemento diplóide de *C. annuum* L. As variações do comprimento cromossômico observadas podem ser uma consequência de erros de observações, ou de análises de células com cromossomos em diferentes graus de compactação, ou, ainda, de eventos de múltiplas deleções.

4.3. Distribuição da heterocromatina

O fluorocromo DAPI foi utilizado no bandejamento com a finalidade de estudar a distribuição da heterocromatina nos cromossomos de *C. annuum* L. A concentração da solução de DAPI e o pH do tampão

Mcllvaine foram alterados, em virtude das dificuldades encontradas na obtenção de bandas cromossômicas. Contudo, não foram encontradas alterações no padrão de coloração.

Foram observadas imagens negativas dos nucléolos em células interfásicas (Figura 4a) e em células profásicas iniciais (Figura 4b), indicando a ausência de regiões mais densamente coradas, que normalmente correspondem aos blocos heterocromáticos encontrados na metáfase, quando presentes. Mesmo em estádios mais avançados de compactação, como na prófase final (Figura 4c) e na prometáfase (Figura 4d), não ocorreram bandas DAPI positivas. Já que a substância fluoresce, preferencialmente, na presença de regiões cromossômicas ricas em adenina e timina (GALBRAITH et al., 1995; FUKUI e NAKAYAMA, 1996), suspeita-se da distribuição homogênea dessas bases nitrogenadas, bem como da heterocromatina, por todo o complemento da espécie.

A técnica de bandeamento Q foi utilizada como método adicional, para evidenciar um padrão de bandas cromossômicas no material genético de *C. annuum* L. Entretanto, os cromossomos coraram-se uniformemente, não tendo sido evidenciadas regiões de fluorescência correspondentes às bandas Q positivas (Figura 5). Mesmo com alterações no pH e na concentração da solução quinacrina, o padrão de coloração permaneceu o mesmo.

Como os cromossomos fixados em solução de metanol/ácido acético favorecem a ligação exclusiva da quinacrina ao DNA (SUMNER e EVANS, 1973) e a substância fluoresce, diferencialmente, em regiões ricas em adenina e timina (SUMNER e EVANS, 1973; SELANDER e DE LA CHAPELLE, 1977; CAIXEIRO, 1999), acredita-se que isso pode ser devido ao baixo conteúdo dessas bases nitrogenadas ou a sua dispersão pelo material genético da espécie. BERTÃO (1993) também não evidenciou regiões heterocromáticas interfásicas e metafásicas em amostras da espécie.

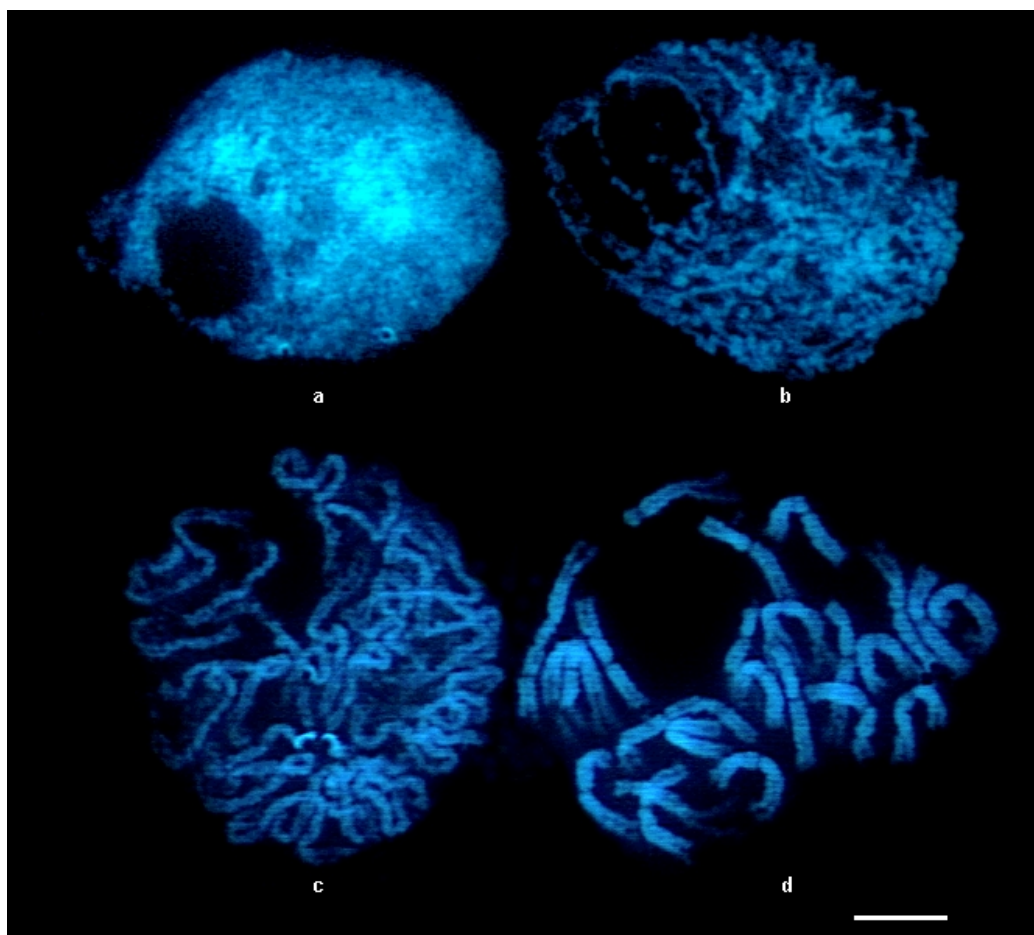


Figura 4 - Diferentes estádios de células meristemáticas de *Capsicum annuum* L. submetidas à técnica de bandeamento DAPI (a-d). Observar o padrão de coloração da fluorescência, não sendo evidenciadas regiões mais densamente coradas no núcleo interfásico (a), nos cromossomos profásicos (b e c), bem como a ausência de bandas DAPI positivas nos cromossomos prometafásicos (d) (barra = 5 μ m).

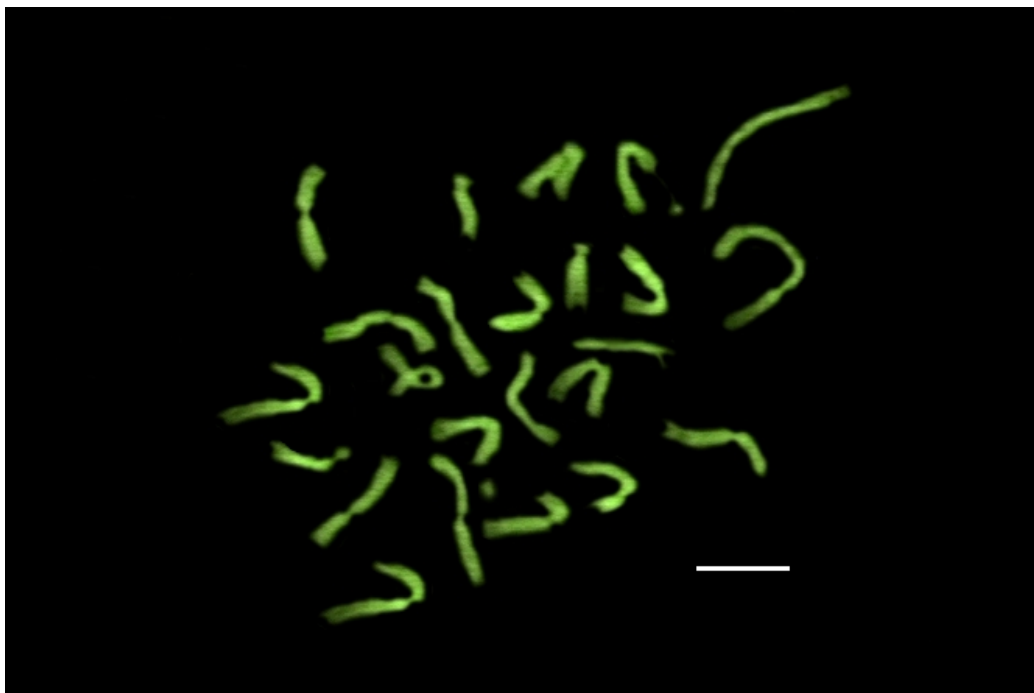


Figura 5 - Cromossomos prometafásicos de *Capsicum annuum* L., pré-tratados com brometo de etídio a 25 μ M, e submetidos à técnica de bandeamento Q. Observar a ausência de regiões banda Q positivas (barra = 5 μ m).

Os cromossomos de *C. annuum* L. também foram submetidos à técnica de bandeamento C. Evidenciou-se um padrão homogêneo de coloração (Figura 6), conforme os resultados obtidos pelo uso das técnicas de bandeamento DAPI e Q. A ausência de regiões densamente coradas ou bandas C positivas não proporcionou a diferenciação e a caracterização dos cromossomos por padrões de bandas heterocromáticas, presumindo-se, assim, a pouca quantidade de heterocromatina ou a sua distribuição homogênea pelo genoma da espécie.

Geralmente, as plantas apresentam grande quantidade de heterocromatina (FUKUI e NAKAYAMA, 1996), e a técnica de bandeamento C permite a visualização de regiões heterocromáticas, facilitando a identificação e a comparação cromossômicas quanto ao número e à posição das bandas positivas (GUERRA, 1988; BERTÃO, 1993). Mesmo em cromossomos pequenos e com morfologias semelhantes, como é o caso de *Solanum* sp., a técnica permite a construção do cariótipo mitótico.

Segundo BERTÃO (1993), muitas espécies apresentam as regiões heterocromáticas dispersas pelo genoma ou em quantidade reduzida, o que dificulta a diferenciação linear dos cromossomos. MOSCONE (1996) relatou que a espécie em questão apresenta somente de 2 a 3% de heterocromatina em todo o genoma. Esse autor utilizou as técnicas de banda C e DAPI, para evidenciar essas eventuais regiões heterocromáticas. Entretanto, não foram obtidos padrões de bandeamento. Pickersgill (1991), citada por BERTÃO (1993), também relatou que a técnica de bandeamento C não tem sido aplicada com sucesso em *Capsicum*.

Os resultados encontrados, no presente trabalho, evidenciaram que a quantidade de heterocromatina no genoma de *C. annuum* L. deve ser relativamente pequena. Esse material deve estar disperso de maneira que não seja possível a visualização de regiões coradas com mais intensidade. As dificuldades de obtenção de bandas também podem ser atribuídas às limitações técnicas.

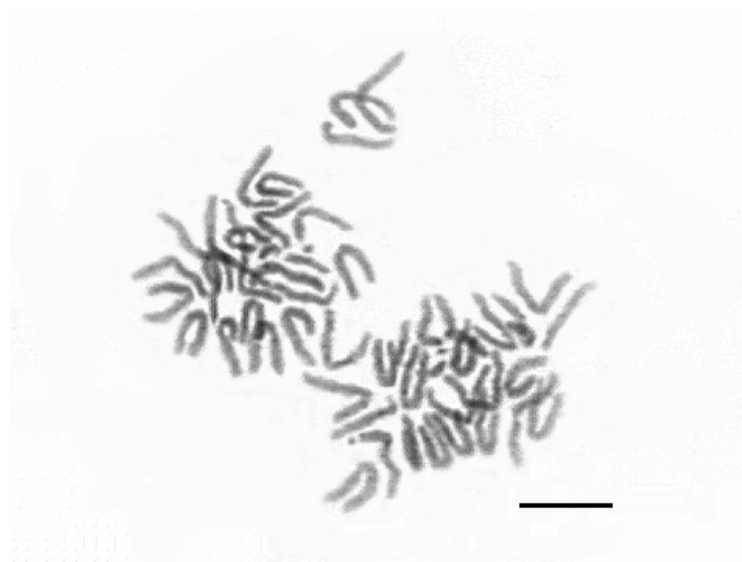


Figura 6 - Cromossomos anafásicos de *Capsicum annuum* L., submetidos à técnica de bandeamento C. Observar a ausência de regiões banda C positivas (barra = 5 μ m).

4.4. Bandeamento NOR (Ag-NOR)

A análise dos cromossomos, submetidos à técnica de bandeamento NOR (Ag-NOR), possibilitou identificar a presença da região organizadora do nucléolo, localizada distalmente no braço curto do cromossomo de número 8 no estágio metafásico (Figura 7). Foi verificada também a presença de dois nucléolos corados, positivamente, pela mesma técnica (Figura 8). Os resultados indicam que essas regiões diferenciadas pelo nitrato de prata podem ser locais ativos de produção de RNA ribossômico, e que há uma correlação entre o número de NORs encontrado na metáfase e o número de nucléolos presentes na intérfase. Porém, MOSCONE, em 1999, afirmou que existe diferença entre o número de bandas metafásicas e de nucléolos na intérfase.

LIMAYE e PATIL (1988) observaram que o número de NORs em cromossomos metafásicos pode variar dentro da mesma espécie, e que essas regiões aparecem em cromossomos metafásicos. Esses autores encontraram um par de NORs em *C. annuum* L., exceto na variedade Devnally, que apresentou ausência dessas regiões. Esses autores relataram que houve perda das NORs na referida variedade, no decorrer da evolução/especiação.

BERTÃO (1993) utilizou a técnica de bandeamento NOR (Ag-NOR) em amostras de *C. annuum*. Embora não tenha comprovado seus resultados por meio de fotografias, essa autora relatou a ausência de regiões organizadoras nucleolares (NOR) na espécie, e concluiu que a não-visualização dessas regiões pode ter ocorrido em razão de problemas no procedimento da técnica.

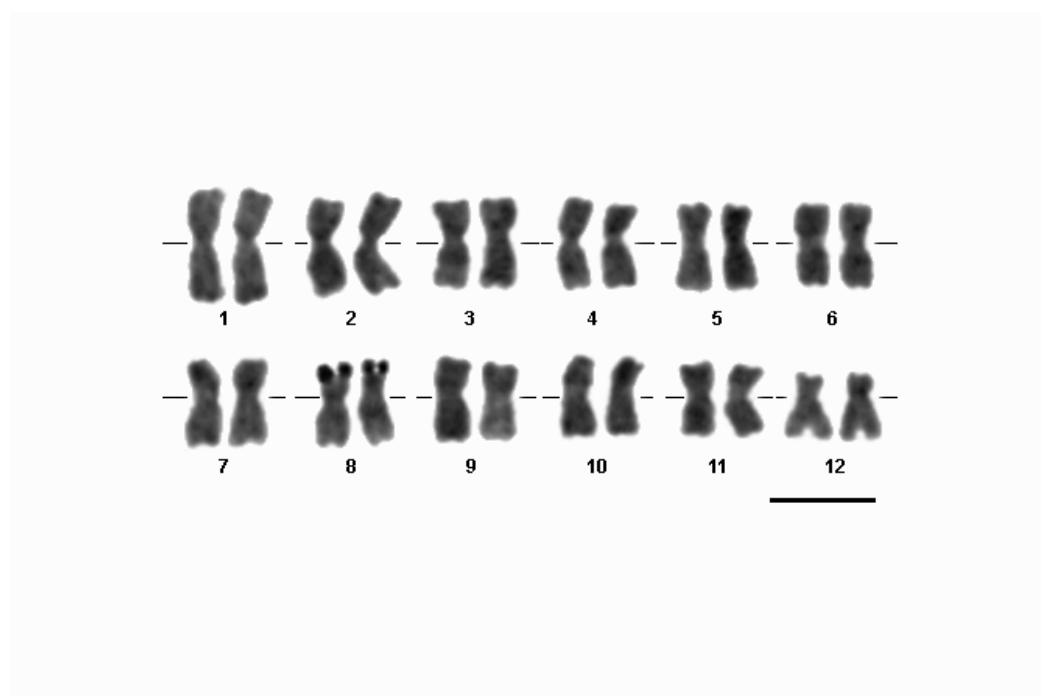


Figura 7 - Cariograma dos cromossomos de *Capsicum annuum* L. pré-tratados com orizalina a 7,5 μ M, e corados pela técnica de NOR (Ag-NOR). Observar a posição distal da NOR no braço curto do par de homólogos número 8 (barra = 5 μ m).

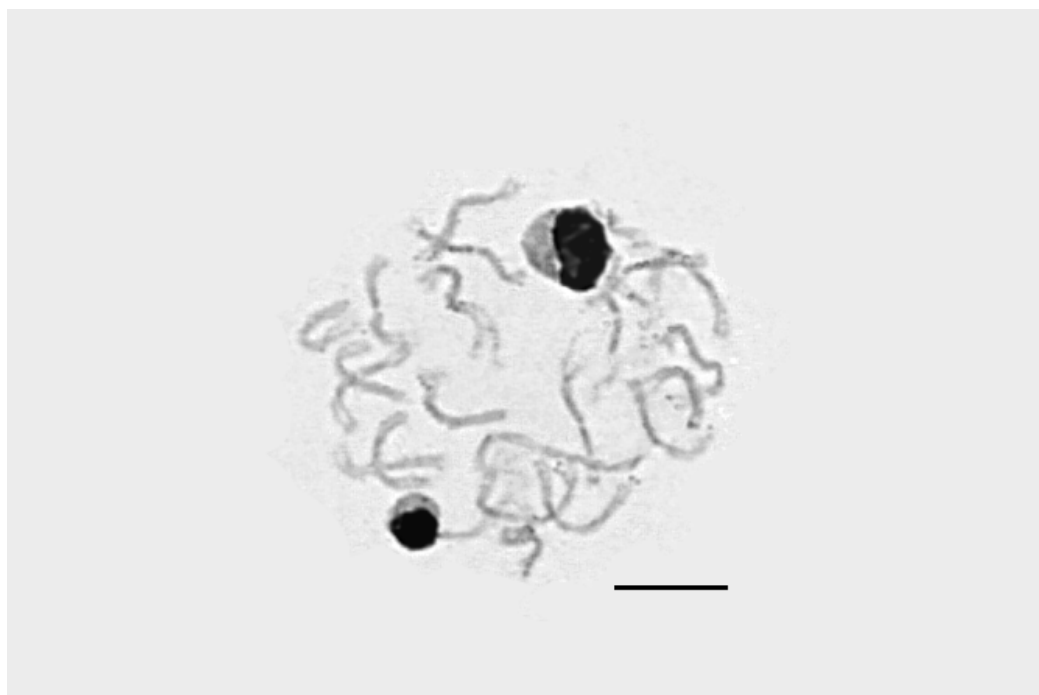


Figura 8 - Célula meristemática de *Capsicum annuum* L., em prófase. Observar os dois nucléolos Ag-NOR positivos referentes ao par de homólogos número 8 (barra = 5 μ m).

MOSCONE et al. (1995) relataram alguns dados sobre a atividade nucleolar em cromossomos metafásicos e interfásicos. Segundo esses autores, *C. annuum* pode apresentar de um a dois pares de NORs na metáfase, e até quatro nucléolos por núcleo interfásico. As NORs foram localizadas nos pares cromossômicos número 11 e, ou, 12. Foram encontradas NORs repetidas em *tandem*. O número de nucléolos por núcleo interfásico foi menor do que o número de bandas NOR (Ag-NOR). Esses autores sugerem a fusão ou a competição entre NORs na espécie. O mesmo dado foi encontrado por PICKERSGILL (1971).

Schubert (1984) e Schubert e Wobus (1985), citados por MOSCONE et al. (1995), encontraram variações de número e de posição das NORs, o que pode ser o resultado de alterações cromossômicas, como translocações e deleções, e que as NORs repetidas em *tandem* podem ter surgido de eventos de duplicação gênica. Com base nos dados apresentados, esses autores propuseram que a presença de NORs nos pares cromossômicos 1 e 12 constitui uma característica ancestral. As posições variadas das NORs, com relação ao que foi mencionado anteriormente, podem ser designadas como características derivadas, sendo proposto que *C. annuum* é uma espécie que surgiu ao longo da evolução de espécies do gênero.

As diferentes observações na variação do número e da posição das regiões organizadoras nucleolares, encontradas na literatura, sugerem as dificuldades encontradas para padronizar a técnica de NOR (Ag-NOR) para *Capsicum annuum* L., o que pode ter promovido erros na classificação do cariótipo da espécie.

4.5. Evidências de rearranjos cromossômicos

A análise dos cromossomos, em diferentes graus de compactação, evidenciou a presença de rearranjos cromossômicos

estruturais no genoma de *Capsicum annuum* L. Foram observadas constrictões que evidenciaram alterações no par de homólogo número 1. Conforme pode ser observado na Figura 9a, sete cromossomos número 1, corados com DAPI (da esquerda para a direita), foram selecionados, obtendo o comprimento total, a razão entre os braços e o índice centromérico calculados. As medidas obtidas por recursos de análise de imagem permitiram localizar a posição mediana do centrômero nas amostras do cromossomo número 1, sendo classificado como metacêntrico (Quadro 3a).

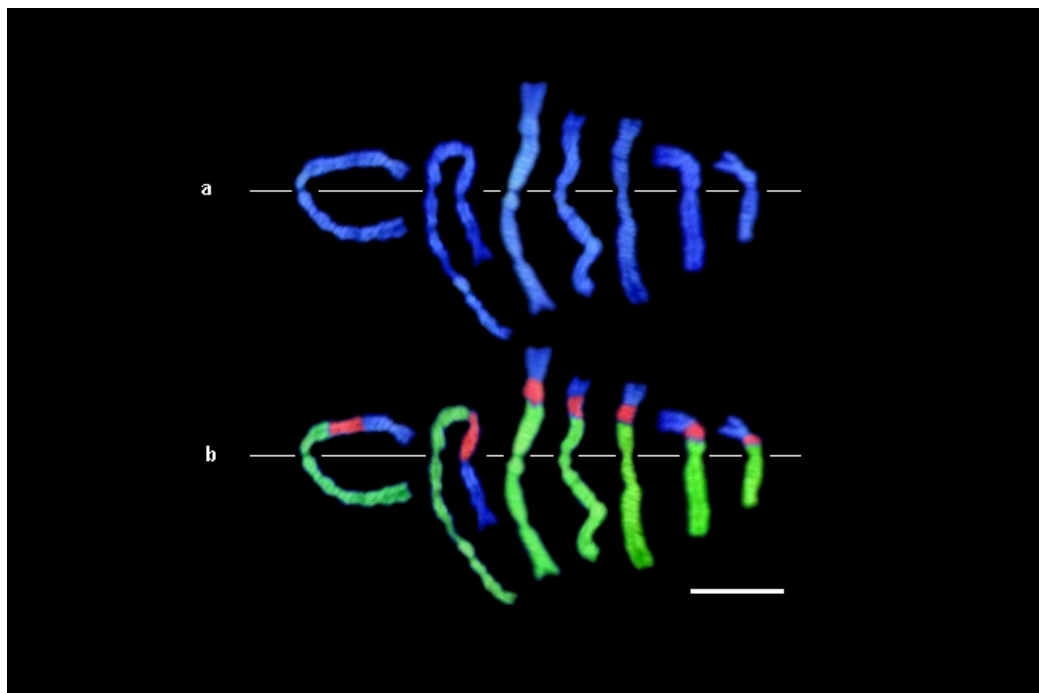


Figura 9 -Descrição de sete cromossomos número 1 metacêntricos (da esquerda para a direita - I, II, III, IV, V, VI e VII), em diferentes graus de compactação; a) Coloração com DAPI a 1,5 µg/mL; b) Pseudocolorização das regiões cromossômicas e dos cromossomos participantes da hipótese de fusão dos cromossomos maior (em verde) e menor (em vermelho-azul) (barra = 5µm).

Quadro 3a - Descrição do cromossomo número 1 em diferentes graus de compactação

Cromossomo número	Comprimento (µm)			r	ic	Classe
	Braço		Total			
	Curto	Longo				
I	6,70	7,20	13,90	1,07	48,2	M
II	9,60	9,80	19,40	1,02	49,5	M
III	6,10	6,90	13,00	1,13	46,9	M
IV	5,20	5,50	10,70	1,06	48,6	M
V	4,70	5,60	10,30	1,19	45,6	M
VI	3,60	4,20	7,80	1,17	46,2	M
VII	2,60	2,80	5,40	1,08	48,1	M

r = razão entre os braços longo e curto.

ic = índice centromérico; e

M = metacêntrico.

Foram encontradas constrições secundárias no braço curto do cromossomo número 1. Essas constrições sugerem rearranjos cromossômicos estruturais, e para auxiliar as suas interpretações foram utilizados recursos de análise de imagem com pseudocolorização das regiões cromossômicas (Figura 9b). A primeira constrição proximal evidencia o ponto de fusão de dois cromossomos.

Foi possível identificar a provável região centromérica de cada cromossomo pertencente à fusão, e observar três constrições secundárias nos cromossomos I e II, e duas constrições secundárias nos cromossomos III, IV, V, VI e VII. A região pseudocolorizada em vermelho corresponderia ao braço curto e a região azul, ao braço longo do cromossomo menor. As medidas do comprimento total, da razão entre os braços e do índice centromérico foram realizadas, e esse cromossomo foi classificado como submetacêntrico (Quadro 3b). A região pseudocolorizada de verde equivaleria ao comprimento total do cromossomo maior. O comprimento cromossômico total, a razão entre os braços e o índice centromérico foram calculados, e esse cromossomo foi classificado como acrocêntrico (Quadro

3c). Desta forma, os dados permitiram elaborar a hipótese de fusão entre um cromossomo acrocêntrico e outro submetacêntrico, dando origem ao par de homólogos número 1 ao longo da evolução cariotípica da espécie.

Quadro 3b - Hipótese fusão – descrição do cromossomo menor

Cromossomo número	Comprimento (μm)		r	ic	Classe	
	Braço					Total
	Curto	Longo				
I	1,70	2,90	4,60	1,71	24,2	SM
II	2,70	4,10	6,80	1,52	25,0	SM
III	1,20	2,10	3,30	1,75	24,9	SM
IV	0,90	1,35	2,25	1,50	23,8	SM
V	0,90	1,60	2,50	1,78	22,2	SM
VI	1,00	1,80	2,80	1,80	15,4	SM
VII	0,70	1,20	1,90	1,71	14,7	SM

r = razão entre os braços longo e curto;

ic = índice centromérico; e

SM = submetacêntrico.

Quadro 3c - Hipótese fusão – descrição do cromossomo maior

Cromossomo número	Comprimento (μm)		r	ic	Classe	
	Braço					Total
	Curto	Longo				
I	2,20	6,90	9,10	3,14	24,2	A
II	3,40	10,20	13,60	3,00	25,0	A
III	2,65	8,00	10,65	3,02	24,9	A
IV	2,10	6,70	8,80	3,19	23,8	A
V	1,80	6,30	8,10	3,50	22,2	A
VI	0,80	4,40	5,20	5,50	15,4	A
VII	0.50	2.90	3.40	5.80	14.7	A

r = razão entre os braços longo e curto.

ic = índice centromérico; e

A = acrocêntrico.

JONES (1998) citou que os mecanismos de fusão e fissão resultam em alterações na morfologia e, ou, no número dos cromossomos. Esses eventos podem ser facilmente detectados quando os cromossomos são suficientemente longos, já que as mudanças ocorridas são claramente observadas.

No presente trabalho, os cromossomos de *C. annuum* L. foram analisados em diferentes graus de compactação, e com isso constrições secundárias sugestivas de fusão puderam ser verificadas.

Segundo LEFEBVRE et al. (1995), o número cromossômico $2n=24$ é muito conservado, evolutivamente, na família Solanaceae. Por esse motivo, tem sido questionado se o número e a ordem dos genes também permaneceram os mesmos. Em estudos evolutivos realizados com pimentão e tomate, verificou-se a ocorrência de quebras cromossômicas como eventos comuns nas duas plantas. Os dois genomas foram comparados, e foi observada a existência de um mesmo conjunto básico de genes. Ocorreu apenas um número maior de cópias e de locos gênicos em pimentão. Esses autores relataram a ocorrência de 32 quebras cromossômicas no genoma de tomate, conseqüentemente os rearranjos cromossômicos alteraram a ordem e a posição dos genes, formando o complemento do pimentão. Portanto, a análise de ligação de marcadores moleculares sugere que alterações cromossômicas estruturais no material genético de tomate podem ter originado o cariótipo atual do pimentão.

PRINCE (1992) sugeriu a existência de eventos de quebra-fusão cêntrica em regiões pericentroméricas de diferentes cromossomos de pimentão. Nesses mapas moleculares de *Capsicum*, os autores encontraram um sítio de ponto de quebra, provavelmente translocação recíproca, entre os mapas de dois tipos de pimentão. Foram encontradas, também, alterações do tipo inversão cromossômica, quando se comparou os genomas de pimentão com os de tomate. A análise comparativa entre o pimentão e o tomate demonstrou que a ocorrência de 15 eventos de quebra cromossômica promoveu a divergência evolutiva das duas plantas. Desta

forma, os autores concluíram que a evolução genômica dentro da família Solanaceae ocorreu por rearranjos cromossômicos.

Segundo CONICELLA et al. (1990), as alterações cromossômicas estruturais são importantes eventos evolutivos e ocorrem, freqüentemente, em espécies de *Capsicum*, principalmente na espécie *C. annuum* L. LIMAYE e PATIL (1989) indicaram que translocações recíprocas desiguais ocorreram entre os cromossomos do genoma de *C. annuum* L.

PICKERSGILL (1971) relatou que as linhagens cultivadas de *C. annuum* L. por ela estudadas apresentaram pontos de translocação e de inversão cromossômicas, convertendo um par de cromossomos acrocêntricos em um par metacêntrico. Essa autora evidenciou que a evolução da espécie ocorreu por fusão cêntrica, já que espécies de *C. annuum* L. selvagens apresentam dois pares de cromossomos acrocêntricos.

TANKSLEY (1984) mapeou os pontos de quebra cromossômica, distinguindo as espécies *C. annuum*, *C. baccatum* e *C. chinense* entre si. Foram encontradas diferenças cariotípicas entre as variedades de *C. annuum* L., que se diferenciaram por uma translocação simétrica ou por duplicações cromossômicas. O autor sugere a importância desses eventos na evolução do genoma da espécie.

MOSCONE (1990) encontrou translocações espontâneas em *C. annuum* L. e relatou a ocorrência de variação cariotípica intra-específica, especialmente entre as espécies selvagens. TANKSLEY (1984) e LEFEBVRE et al. (1995) indicaram a aparente presença de duplicação gênica em *C. annuum* L.

No presente estudo, o uso associado das técnicas de dissociação celular, secagem-ao-ar e coloração dos cromossomos com DAPI proporcionou observar figuras cromossômicas individualizadas, favorecendo a análise digital do cromossomo número 1. O posicionamento do centrômero foi observado em cromossomos em diferentes graus de compactação. Foram verificados aumentos do número de constrições cromossômicas, não

somente no par cromossômico número 1. Porém, a similaridade morfológica e o grau de compactação cromossômicos dificultaram a identificação e a classificação dos outros cromossomos que possam ter sido originados por fusão.

Segundo BORISJUK e BORISJUK (1993) e HIRAI et al.(1994), a fissão cêntrica é um evento efetivo na exclusão de regiões de heterocromatina. Conforme os dados relatados no item 4.3. do presente trabalho, a espécie *C. annuum* L. não apresentou regiões heterocromáticas facilmente identificáveis, o que sugere a possível evolução da espécie por fusão.

5. CONCLUSÕES

As substâncias de pré-tratamento amiprofos-metila (APM), orizalina, trifluralina, 8-hidroxiquinoleína e brometo de etídio foram utilizadas em *C. annuum* L. para verificar a eficiência desses agentes de acumular maior células em metáfase. O herbicida orizalina e o fluorocromo brometo de etídio, nas respectivas concentrações de 7,5 e 25 μM , revelaram os melhores desempenhos, em relação aos outros agentes despolimerizantes de microtúbulos, nos períodos de 4h15min a 29°C, e de 20 horas a 4°C.

Todas as amostras mostraram um cariótipo-padrão diplóide de $2n=24$ cromossomos, sendo 11 pares cromossômicos metacêntricos (do par 1 ao 11) e apenas um par acrocêntrico (par 12). O cariograma e o idiograma da espécie foram montados com base em cromossomos corados uniformemente com Giemsa. Os cálculos do comprimento total dos cromossomos, da razão entre os braços longo e curto e do índice centromérico foram utilizados na caracterização do cariótipo.

Análise de cromossomos em diferentes estádios de compactação permitiu verificar que podem ocorrer erros na classificação cariotípica, quando os cromossomos se encontram menos compactados, pois a

ocorrência de um número maior de constrições dificulta a identificação do centrômero. Cromossomos muito compactados não permitem que as constrições secundárias sejam facilmente localizadas.

O fluorocromo DAPI, juntamente com os sistemas de análises de imagens digitais, permitiu calcular a área e o perfil de densidade relativa óptica média dos cromossomos, mostrando ser uma ferramenta auxiliar na construção de cariótipos de espécies que contêm cromossomos morfológicamente semelhantes.

As técnicas de bandeamento DAPI, Q, C e NOR (Ag-NOR) foram realizadas, permitindo a análise morfológica dos cromossomos da espécie. A inexistência de regiões densamente coradas, pelas técnicas de bandeamento DAPI, Q e C, permitiu concluir que *C. annuum* L. apresenta, relativamente, pouca ou nenhuma quantidade de heterocromatina em todo o seu genoma. As imagens negativas de nucléolos submetidos à técnica de bandeamento DAPI confirmaram os dados citados anteriormente.

As NORs se localizaram no par cromossômico número 8, apesar de ter sido observada a existência de mais duas constrições secundárias no genoma da espécie (pares cromossômicos número 5 e 12). Foi observada a presença de dois nucléolos na intérfase, o que permite constatar que o número de bandas metafásicas corresponde ao número de nucléolos na intérfase.

As observações de células profásicas e metafásicas permitiram verificar rearranjos cromossômicos estruturais. O cromossomo número 1 foi observado em diferentes graus de compactação. Os resultados indicam que o par de homólogos número 1 originou-se da fusão entre um cromossomo acrocêntrico e outro cromossomo submetacêntrico.

A pseudocolorização dos cromossomos número 1 permitiu a identificação dos prováveis cromossomos envolvidos na fusão. Foram observadas três constrições secundárias no cromossomo número 1, quando menos compactado. A primeira constrição proximal indica o local de fusão entre os dois cromossomos. As medidas do comprimento total, da razão

entre os braços e do índice centromérico foram realizadas, e o cromossomo menor foi classificado como submetacêntrico. O comprimento cromossômico total, a razão entre os braços e o índice centromérico foram calculados, e o cromossomo maior foi classificado como acrocêntrico.

A verificação de rearranjos cromossômicos estruturais possibilitou avaliar a importância desses eventos na evolução de *C. annuum* L., o que poderá esclarecer alguns aspectos evolutivos do cariótipo da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, J.R., CARVALHO, C. R. Análise de imagem de cromossomos mitóticos de pimentão. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n. 3, p. 118 - 119, 1999.
- AARESTRUP, J.R., CARVALHO, C. R. Determinação da área e do perfil de densidade na análise de cromossomos de pimentão. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 3, p. 363, 2000.
- AARESTRUP, J.R., CARVALHO, C. R. Bandeamento Ag-NOR em *Capsicum annuum* L. **Genetics and molecular biology**, v. 23, n. 3, p. 362-363 , 2000.
- ABIDA, K., KURIACHAN, P.I., KURIACHAN, P. A spontaneous interchange heterozygote in *Capsicum chinense* Jacq. **Caryologia**, v. 36, n. 2, p. 183-187, 1983.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. **Molecular Biology of the cell**. 3.ed. Garland Publishing, New York, 1994. 1294p.
- ALONSO-BLANCO, C., PENDÁS, A.M., GARCIA-SUAREZ, R., ROCA, A., GOICOECHEA, P.G., GIRALDEZ, R. Physical mapping of 5S rDNA reveals a new locus on 3R and unexpected complexity in a rye translocation used in chromosome mapping. **Chromosome**, v. 103, p. 331-337, 1994.

- ALONSO-BLANCO, C., GOIOCOECHEA, P.G., ROCA, A., GIRALDEZ, R. A cytogenetic map on the entire length of rye chromosome 1R, including one translocation breakpoint, three isozyme loci and four C-bands. **Theor. Appl. Genet.**, v. 85, p. 735-744, 1993.
- AMBROS, P.F., SUMNER, A.T. Correlation of pachytene chromomeres and metaphase bands of human chromosomes, and distinctive properties of telomeric regions. **Cytog. Cell genet.**, v. 44, p. 223-228, 1987.
- BADAEVA, N.S., BADAEVA, E.D., BOLSHEVA, N.L., MAXIMOV, N.G., ZELENIN, A.V. Cytogenetic analysis of forms produced by crossing hexaploid triticale with common wheat. **Theor. Appl. Genet.**, v. 70, p. 536-541, 1985.
- BADAEVA, E.D., JING, J., GILL, B.S. Detection of intergenomic translocations with centromeric and noncentromeric breakpoints in *Triticum araraticum*: mechanism of origin and adaptive significance. **Genome**, v. 38, p. 976-981, 1995.
- BEIGUELMAN, B. **Genética médica: citogenética humana**. EDART, São Paulo, 1974. 304p.
- BENNETT, M.D., LEITCH, I.J. Nuclear DNA amount and genome size in angiosperms. **Ann. Bot.**, v.82, p. 1, 1998.
- BERTÃO, M.R. **Evolução cariotípica no gênero *Capsicum* (Solanaceae)**. Piracicaba, S.P: ESALQ, 1993. 148p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- BORISJUK, N., BORISJUK, L. Comparison of nuclear ribosomal RNA genes among *Solanum* species and other Solanaceae. **Genome**, 1: 271-270. 1993.
- BOSLAND, P.W. Breeding for quality in *Capsicum*. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v. 12, p. 25-30, 1993.
- BRITO, R.M. **Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* Schwartz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Viçosa, M.G: UFV, 1998. 97p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento).
- BURKHOLDER, G.D., DUCZEK, L. The effect of the chromosome banding techniques on the histone and nonhistone proteins of isolated chromatin. **Can. J. Biochem.**, v. 60, p. 328-337, 1982.

- CAIXETA, E.T. **Estudo citogenético dos cromômeros de cromossomos meióticos de milho (*Zea mays*)**. Viçosa, M.G: UFV, 1998. 96p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento).
- CAIXEIRO, A.P.A. **Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo de espécies do gênero *Plebeia* (HYMENOPTERA: APINAE: MELIPONINI)**. Viçosa, M.G: UFV, 1999. 68p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento).
- CARVALHO, C.R., SARAIVA, L.S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. **Heredity**, v. 70, p. 515-519, 1993.
- CARVALHO, C.R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Viçosa, M.G: UFV, 1995. 127p. (Dissertação – Doutorado em Genética e Melhoramento).
- CARVALHO, J.F.R.P. **Análise cariotípica e indução *in vitro* de poliploidia em urucum (*Bixa orellana* L.)**. Viçosa, M.G: UFV, 2000. 124p. (Dissertação – Doutorado em Genética e Melhoramento).
- CASALI, V.W.D., COUTO, F.A.A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 113, p. 8-10, 1984.
- CASALI, V.W.D., PÁDUA, J.G., BRAZ, L.T. Melhoramento de pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 113, p. 19-22, 1984.
- CASALI, V.W.D., STRINGHETA, P.C. Melhoramento de pimentão e pimenta para fins industriais. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 113, p. 23-25, 1984.
- CERMEÑO, M.C., ORELLANA, J., SANTOS, J.L., LACADENA, J.R. Nucleolar organizer activity in wheat, rye and derivatives analyzed by a silver-staining procedure. **Chromosoma**, v. 89, p. 370-376, 1984.
- CHOO, K.H.A. **The centromere**. Oxford United Press, U.S.A., 1997. 304p.
- CLARK, M.S., WALL, W.J. **Chromosomes: the complex code**. Chapman e Hall, England, 1992. 345p.
- COMINGS, D.E., DRETS, M.E. Mechanisms of chromosome banding. VIII. Hoechst 33258-DNA interaction. **Chromosoma**, v. 52, p. 229-243, 1975.
- CONICELLA, C., ERRICO, A., SACCARDO, F. Cytogenetic and isozyme studies of wild and cultivated *Capsicum annum*. **Genome**, v. 33, p. 279-282, 1990.

- CONTRERAS-PADILLA, M., YAHIA, E.M. Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chilli peppers and relation with peroxidase activity. **J. Agric. Food Chem.**, 46: 2075-2079. 1998.
- COPENHAVER, G.P., PIKAARD, C.S. RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of *Arabidopsis thaliana* the telomeres on chromosomes 2 and 4. **Plant Journal**, v. 9, n. 2, p. 259-272, 1996.
- CREMONINI, R. The chromosomes of *Vicia faba*: Banding patterns and *in situ* hybridizations. **Biol. Zent. bl.** v. 111, p. 188-203, 1992.
- CUÑADO, N., CERMEÑO, M.C., ORELLANA, J. Nucleolar organizer activity at meiosis in wheat-rye hybrids plants. **Can. J. Genet. Cytol.**, v. 28, p. 227-234, 1985.
- DATTA, P.C. Karyology of indian varieties of *Capsicum annuum* Linn. (Solanaceae). **Caryologia**, v. 21, n. 2, p. 121-126, 1968.
- DEUMLING, B., GREILHUBER, J. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by *in situ* hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. **Chromosoma**, v. 84, p. 535-555, 1982.
- ESTANISLAU, M.L.L. Aspectos estatísticos sobre pimentão e pimenta em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 113, p. 3-7, 1984.
- FUKUI, K., NAKAYAMA, S. **Plant chromosomes: laboratory methods**. CRC Press, U.S.A., 1996. 274p.
- GALBRAITH, D.W., BOURQUE, D.P., BOHNERT, H.J. **Methods in plant cell biology part B**. Academic Press, U.S.A., 1995.
- GANAL, M.W., LAPITAN, N.L.V., TANKSLEY, S.D. Macrostructure of the tomato telomeres. **The Plant Cell**, v. 3, p. 87-94, 1991.
- GECHEFF, K., HVARLEVA, T. Cytological and molecular evidence of deletion of ribosomal RNA genes in chromosome 6 of barley (*Hordeum vulgare*). **Genome**, v. 37, p. 419-425, 1994.
- GIANNONI, M.L., LUI, J.F. **Citogenética e sua aplicação na seleção de reprodutores equinos**. UNESP, Jaboticabal, 1988. 31p.
- GILL, B.S., FRIEBE, B., ENDO, T.R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome band and structural aberration in wheat (*Triticum aestivum*). **Genome**, v. 34, p. 830-839, 1991.

- GOSDEN, J.R., HANRATTY, D. PCR *in situ*: a rapid alternative to *in situ* hybridization for mapping short, low copy number sequences without isotopes. **Bio Techniques**, v. 15, n. 1, p. 78-80, 1993.
- GOSDEN, J.R. **Chromosome analysis protocols**. Humana Press, U.S.A., 1994. V.29. 508p.
- GUERRA, M.S. **Introdução à Citogenética Geral**. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1988. 142p.
- GUERRA, M.S. The chromosomes of *Azima tetraacantha* (Salvadoraceae). **Pl. Syst. Evol.**, v. 168, p. 83-86, 1989.
- GUERRA, M.S. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, v. 71, p. 234-241, 1993.
- GUEVARA, R.G.L., PARDO-GONZÁLVES, J.E. Evolution of color during the ripening of selected varieties of paprika pepper (*Capsicum annuum* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 2049-2052, 1996.
- GUPTA, P.K., TSUCHIYA, T. Chromosome manipulations in higher plants-an overview. In: **Chromosome engineering in plants: genetic, breeding, evolution**. Elsevier Science Publishers, U.S.A., 1991. 149p.
- GUSTAFSON, J.P., STEBBINS, G.L., AYALA, F.J. **Genetics, development and evolution**. Plenum Press, New York, 1986. 361p.
- GUSTASHAW, K.M. Chromosome stains. In: **The ACT cytogenetics laboratory manual**, Second Edition, M.J.Barch. The association of cytogenetic technologists, Raven Press, Ltd., New York, 1991. 191p.
- HABERER, G., FISCHER, T.C., TORRES-RUIZ, R.A. Mapping of the nucleolus organizer region on chromosome 4 in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 250, p. 123-128, 1996.
- HANSEN, F.L., ANDERSEN, S.B., DUE, I.K., OLESEN, A. Nitrous oxide as a possible alternative agent for chromosome doubling of wheat haploids. **Plant Sci.**, v. 54, p. 219-222, 1988.
- HARINI, I., LAKASHMI, N., PRAKASH, N.S. A new report of a chromosomal chimaera in *Capsicum annuum* L. **Cytologia**, v. 55, p. 649-654, 1990.
- HESLOP-HARRISON, J.S., SCHWARZACHER, T. Molecular cytogenetics - biology and applications in plant breeding. **Chromosome**, v. 11, p. 191-196, 1993.

- HIRAI, H., YAMAMOTO, M.T., OGURA, K., SATTA, K., YAMADA, M., TAYLOR, R.W., IMAI, H.T. Multiplication of 28S rDNA and NOR activity in chromosome evolution among ants of the *Myrmecia pilosula* species complex. **Chromosoma**, v. 103, p. 171-178, 1994.
- HIZUME, M., ISHIDA, F., MURATA, M. Multiple locations of the rDNA genes in chromosomes of pines, *Pinus densiflora* and *P. thunbergii*. **Jpn. J. Genet.**, v. 67, p. 389-396, 1989.
- IMAI, H. Centric fission in man and others mammals. In: **The Cytogenetics of Mammalian autosomal rearrangements**. National Institute of Genetics, Mishima, 1988. 198p.
- JIANG, J., GILL, B.S. Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis. **Genome**, v. 36, n. 4, p. 792-795, 1993.
- JIANG, J., GILL, B.S. New 18S, 26S ribosomal RNA gene loci: chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. **Chromosome**, v. 103, p. 179-185, 1994.
- JIANG, J., GILL, B.S. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. **Genome**, v. 37, p. 717-725, 1994.
- JIANG, J., FRIEBE, B., GILL, B.S. Chromosome painting of Amigo wheat. **Theor. Appl. Genet.**, v. 89, p. 811-813, 1994.
- JOHN, A.T., ABRAHAM, S. Cytological changes produced by red pepper in mitotic cells of *Vicia faba* L. **Caryologia**, v. 44, n. 3-4, p. 325-331, 1991.
- JOHN, A.T., ABRAHAM, S. Cytological abnormalities induced by red pepper in mouse bone marrow cells *in vivo*. **Caryologia**, v. 47, n. 1, p. 53-58, 1994.
- JONES, K. Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. **The Botanical Review**, v. 64, n. 3, p. 273-289, 1998.
- KAMSTRA, S.A., KUIPERS, A.G.J., DE JEU, M.J., RAMANNA, M.S., JACOBSEN, E. Physical localisation of repetitive DNA sequences in *Alstroemeria*: karyotyping of two species with species-specific and ribosomalDNA. **Genome**, v. 40, p. 652-658, 1997.
- KARP, A., WU, Q.S., STEELE, S.H., JONES, G.K. Chromosome variation in dividing protoplasts and cell suspensions of wheat. **Theor. Appl. Genet.**, v. 74, p. 140-146, 1987.

- KATO, A. Nitrous oxide (N₂O) is effective in chromosome doubling of maize seedlings. **Maize Genet. Coop. Newsletter**, v. 71, p. 36-37, 1997.
- KENTON, A., DRAKEFORD, A. Genome size and Karyotype evolution in *Tradescantia* section *Cymbispatha* (Commelinaceae). **Genome**, v. 33, p. 604-610, 1989.
- KENTON, A., PAROKONNY, A.S., GLEBA, Y.Y., BENNETT, M.D. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. **Mol. Gen. Genet.**, v. 240, p. 159-169, 1993.
- KIHARA, H., TSUNEWAKI, K. Production of polyploid wheat by nitrous oxide. **Proc. Jap. Acad.**, v. 36, p. 658-663, 1960.
- KING, I.P., READER, S.M., PURDIE, K.A., ORFORD, S.E., MILLER, T.E. A study of the effect of a homoeologous pairing promoter on chromosome pairing in wheat/rye hybrids using genomic *in situ* hybridization. **Heredity**, v. 72, p. 318-321, 1993.
- KING, R.C., STANSFIELD, W.D. **A dictionary of genetics**. Oxford University Press, U.S.A., 1997. 439p.
- KIPLING, D. **The telomere**. Oxford University Press, U.S.A., 1995. 208p.
- KNOX, E.B., KOWAL, R.R. Chromosome numbers of the east african giant senecios and giant lobelias and their evolutionary significance. **Am. J. Bot.**, v. 80, n. 7, p. 847-853, 1993.
- KUMAR, O.A., RAO, G.R. Desynapsis in *Capsicum frutescens* L. **Cytologia**, v. 50, p. 69-73, 1985.
- KUMAR, O.A., PANDA, R.C., RAO, G.R. Cytogenetic studies of the F₁ hybrids of *Capsicum annuum* with *C. chinense* and *C. baccatum*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 74, p. 242- 246, 1987.
- LAKSHMI, N., PRAKASH, N.S., HARINI, I., RAO, R . A case of spontaneous cytomixis coupled with desynapsis in *Capsicum annuum* L. **Cytologia**, v. 54, p. 287-291, 1989.
- LAKSHMI, N., NALINI, P. Tertiary trisomic in *Capsicum Annuum* L. **Cytologia**, v. 54, p. 395-399, 1989.
- LAY, Y.F., PFEIFFER, R.A., ARRIGHI, F.E., HSA, T.C. Combination of silver and fluorescent staining for metaphase chromosomes. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 30, p. 76-79, 1978.

- LEFEBVRE, V., PALLOIX, A., CARANTA, C., POCHARD, E. Construction of an intraespecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. **Genome**, v. 38, p. 112-121, 1995.
- LEITCH, A.R., HESLOP-HARRISON, J.S. Ribosomal RNA gene expression and localization in cereals. **Chromosomes**, v. 11, p. 91-100, 1993.
- LEITCH, A.R., SCHWARZACHER, T., JACKSON, D., LEITCH, I.J. *In situ* hybridization: a practical guide. **Bios Scientific Publishers**, 1994.
- LEITE, R.S.V. **Identificação de regiões genômicas associadas com a resistência do pimentão (*Capsicum annuum* L.) a *Phytophthora capsici* Leonian**. Viçosa, M.G: UFV. 1999. 112p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento).
- LEWIN, B. **Genes VI**. Oxford University Press, Cambridge, Massachusetts, U.S.A. 1997. 1260p.
- LIMAYE, V.A., PATIL, V.P. Karyomorphological studies in the genus *Capsicum* Linn. **Cytologia**, v. 54, p. 455-463, 1989.
- LIN, C., VAN DE SANDE, H., SMINK, W.K., NEWTON, D.R. Quinacrine fluorescence and q-banding patterns of human chromosomes. **Can. J. Genet. Cytol.**, v. 17, p. 81-92, 1975.
- LOIDL, J., GREILHUBER, J. Structural changes of Ag-stained nucleolus organizing regions and nucleoli during meiosis in *Allium flavum*. **Can. J. Genet. Cytol.**, v. 25, p. 524-529, 1983.
- LOPÉZ-LEÓN, M.D., CABRERO, J., CAMACHO, J.P.M. Changes in NOR activity pattern in the presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Genome**, v. 38, p. 68-74, 1995.
- LUKASZEWSKI, A.J. Translocation and modifications of chromosomes in Triticale X wheat hybrids. **Theor. Appl. Genet.**, v. 64, p. 239-248, 1983.
- LUKASZEWSKI, A.J. Chromatid and chromosome type breakage-fusion-bridge cycles in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genetics**, v. 140, p. 1069-1085, 1995.
- MANDRIOLI, M., MANICARDI, G.C., BIZZARO, D., BIANCHI, U. NOR heteromorphism within a parthenogenetic lineage of the aphid *Megoura viciae*. **Chromosome Research**, v. 7, p. 157-162, 1999.
- MANNHEIM, B. **Nonradioactive *in situ* hybridization application manual**. Biochemica, Alemanha, 1992. 98p.

- MATSUOKA, K. Melhoramento de pimentão e pimenta visando à resistência a doenças fúngicas. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 113, p. 49-51, 1984.
- Mc LEOD, M.J., GUTTMAN, S.I., ESBAUGH, W.H., RAYLE, R.E. An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). **Evolution**, v. 37, n. 3, p. 562-574, 1983.
- Mc LEOD, M.J., GUTTMAN, S.I., ESBAUGH, W.H. Genetics of GOT in *Capsicum*. **J. Hered.**, v. 77, p. 469-470, 1986.
- MEYER, B., HOULNÉ, G., POZUETA-ROMERO, J., SCHANTZ M.L., SCHANTZ, R. Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. **Plant Physiol.**, v. 112, p. 615-622, 1996.
- MIURA, I., NISHIOKA, M., BORKIN, L.J., WU, Z. The origin of the brown frogs with 2n=24 chromosomes. **Experientia**, v. 51, p. 179-188, 1995.
- MOERS, M.H.P., RUITER, A.G.T., HULST, N.F. Fluorescence *in situ* hybridization on human metaphase chromosomes detected by near-field microscopy. **Zoological studies**, v. 34, p. 21-22, 1992.
- MOLA, L.M., PAPESCHI, A.G. Karyotype evolution in *Aeshna* (Aeshnidae, Odonata). **Hereditas**, v. 121, p. 185-189, 1984.
- MONTEZUMA-DE-CARVALHO, J. The effect of N₂O on pollen tube mitosis in styles and its potencial significance for inducing haploidy in potato. **Euphytica**, v. 16, p. 190-198, 1967.
- MOSCONE, E.A. Chromosome studies on *Capsicum* (Solanaceae) I. Karyotype analysis in *C. chacoense*. **Brittonia**, v. 42, n. 2, p. 147-154, 1990.
- MOSCONE, E.A. Estudios cromosomicos en *Capsicum* (Solanaceae) II. Analisis cariotipico de *C. parvifolium* y *C. annum* Var. *annuum*. **Kurtziana**, v. 22, p. 9-18, 1993.
- MOSCONE, E.A., LAMBROU, M., HUNZIKER, A.T., EHRENDORFER, F. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). **Pl. Syst. Evol.**, v. 186, p. 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. **Am. J. Bot.**, v. 82, n. 2, p. 276-287, 1995.

- MOSCONE, E.A., LAMBROU, M., EHRENDORFER, F. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). **Pl. Syst. Evol.**, v. 202, p. 37-63, 1996.
- MOSCONE, E.A. Análisis cariotípico en *Capsicum baccatum* var. *umbilicatum* (Solanaceae) mediante bandeos AgNOR y de fluorescencia. **Tomo**, v. 27, n. 1, p. 225-232, 1999.
- MURPHY, J.F., BLAUTH, J.R., LIVINGSTONE, K.D., LACKNEY, V.K., JAHN, M.K. Genetic mapping of the *pvr1* locus in *Capsicum* spp. and evidence that distinct potyvirus resistance loci control responses that differ at the whole plant and cellular levels. **Mol. Plant. Interact.**, v. 11, n. 10, p. 943-951, 1998.
- MURRAY, B.G. Heterochromatin and silver banding of rye (*Secale cereale*, gramineae) chromosomes. **Pl. Syst. Evol.**, v. 193, p. 243-248, 1994.
- NARAYAN, R.K. The role of genomic constraints upon evolutionary changes in genome size and chromosome organization. **Ann. Bot.**, v. 82, p. 57-66, 1998.
- OHMIDO, N., FUKUI, K. Cytological studies of African cultivated rice, *Oryza glaberrima*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 91, p. 212-217, 1995.
- OHRI, D. Genome size variation and plant systematics. **Ann. Bot.**, v. 82, p. 75-83, 1998.
- OKADA, H. Correspondence of Giemsa C-band with DAPI/CMA fluorochrome staining pattern in *Aconitum sanyoense* (Ranunculaceae). **Cytologia**, v. 56, p. 135-141, 1991.
- ØRGAARD, M., HESLOP-HARRISON, J.S. Investigations of genome relationships between *Leymus*, *Psathyrostachys* and *Hordeum* inferred by genomic DNA:DNA *in situ* hybridization. **Ann. Bot.**, v. 73, p. 195-203, 1994.
- PÁDUA, J.G., CASALI, V.W.D., PINTO, C.M.F. Efeitos climáticos sobre pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 113, p. 11, 1984.
- PANAYOTOV, I., TSUJIMOTO, H. Fertility restoration suppression caused by *Aegilops mutica* chromosomes in alloplasmic hybrids and lines. **Euphytica**, v. 94, p. 145-149, 1997.
- PANDA, R.C., KUMAR, O.A., RAO K.G.R. Cytomorphology of induced octoploid Chili pepper (*Capsicum annuum* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 68, p. 567-570, 1984.

- PAPESCHI, A.G. Chromosome rearrangements in *Belostoma plebejum* (Stål) (Belostomatidae, Heteroptera). **Caryologia**, v. 47, n. 3-4, p. 223-231, 1994.
- PEDROSA, A., GUERRA, M., FILHO, W.S.S. An hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Cytobios**, v. 92, p. 43-51, 1997.
- PENDÁS, A.M., MORÁN, P., GARCÍA-VÁZQUEZ, E. Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. **Chromosome Research**, v. 1, p. 63-67, 1993.
- PICKERSGILL, B. The archeological record of chilli peppers (*Capsicum* spp.) and the sequence of plant domestication in Peru. **Am. Antiquity**, v. 34, p. 53-61, 1969a.
- PICKERSGILL, B. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). **Evolution**, v. 25, p. 683-691, 1971.
- PICKERSGILL, B., HEISER, C.B., McNEILL, J. Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. **Linn. Soc. Symp. Series**, v. 7, p. 679-700, 1979.
- PICKERSGILL, R.A., HILL, A.M., KYNAST, R.G. Characterization by RFLP analysis and genomic *in situ* hybridization of a recombinant and a monosomic substitution plant derived from *Hordeum vulgare* L. X *Hordeum bulbosum* L. crosses. **Genome**, v. 40, p. 195-200, 1997.
- PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, v. 96, p. 129-133, 1997.
- PRAKASH, N.S., HARINI, I., LAKSHMI, N. Interchange heterozygosity in an yellow leaf mutant of *Capsicum annuum* L. **Cytologia**, v. 57, p. 81-83, 1992.
- PRINCE, J.P. Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. **Genome**, v. 36, p. 404-417, 1992.
- QUMSIYEH, M.B. Evolution of number and morphology of mammalian chromosomes. **J. Hered.**, v. 85, n. 6, p. 455-465, 1994.
- RICHER, C.L., DROUIN. **Advances in mutagenesis research 2**. In: RICHER, C.L., DOUIN, R. Dynamic banding for high-resolution analysis of chromosomes and assignment of DNAs replication times. Germany. Springer-verlag. 1990. p.55-71.

- RIEGER, R., MICHAELIS, A., GREEN, M.M. **Glossary of genetics: classical and molecular**. Springer-verlag, Germany, 1991. 553p.
- SCHUBERT, I., SCHRIEVER-SCHWEMMER, G., WERNER, T., ADLER, I.-D. Telomeric signals in robertsonian fusion and fission chromosomes: implications for the origin of pseudoaneuploidy. **Cytogenet Cell Genet**, v. 59, p. 6-9, 1992.
- SCHWARZACHER, T., ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K., HARRISON, G.E., ISLAM, A.K.M.R., JIA, J.Z., KING, I.P., LEITCH, A.R., MILLE, T.E., READER, S.M., SHI, M., HESLOP-HARRISON, J.S. Genomic *in situ* hybridization to identify chromosomes and chromosome segments in wheat. **Theor. Appl. Genet.**, v. 84, p. 778- 786, 1992.
- SELANDER, R.K., DE LA CHAPELLE, A. The fluorescence of quinacrine mustard with nucleic acids. **Nat. New Biol.**, v. 245, p. 240-244, 1977.
- SHARMA, A.K., SHARMA, A. Localization of chromosome segments through banding patterns of chromosomes and sister chromatid exchange. In: **Plant Chromosomes**. HAP, Amsterdam, Holanda, 1999. 371p.
- SHARMA, A.K., SHARMA, A. Preparation of material for analysis of chromosome at structural fluorochromes. In: **Plant Chromosomes**. HAP, Amsterdam, Holanda, 1999. 371p.
- SHEN, D.L., WANG, Z.F. e WU, M. Gene mapping on maize pachytene chromosome by *in situ* hybridization. **Chromosoma**, v. 95, p. 311-314, 1987.
- SHI, L., MORGANTE, M., RAFALSKI, J.A., KEIM, P. Soybean chromosome painting: a strategy for somatic cytogenetics. **J. Hered.**, v. 87, p. 308-313, 1996.
- SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. CRC Press, Flrorida, 1993. 391p.
- SOUZA, R. J., CASALI, V. W . D . Cultivares de pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 113, p. 14-18, 1984.
- STEBBINS, G.L. **Variation and evolution in plants**. Columbia University, New York, 1950. 643 p.
- STRATAGENE, **Prime-IT fluor fluorescence labeling kit: instruction manual**. 1994. 78p.
- SUBRAHMANYAM, N.C., KASHA, K.J. Chromosome doubling of barley haploids by nitrous oxide and colchicine treatment. **Can. J. Genet. Cytol.**, v. 17, p. 573-583, 1975.

- SUMNER, A.T., EVANS, H.J. Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. **Exptl. Cell Res**, v. 81, p. 223-236, 1973.
- SUMNER, A.T. **Chromosome banding**. Unwin Hyman, London, 1990. 434p.
- SYBENGA, J. **Cytogenetic in plant breeding**. Springer-Verlag, Berlin, 1992. 469p.
- TANKSLEY, S.D. Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. **Chromosoma**, v. 89, p. 352-360, 1984.
- TANKSLEY, S.D. Conservation of gene repertoire but gene order in pepper and tomato. **Evolution**, v. 85, p. 6419-6423, 1988.
- TAVARES, M., MALUF, W.R. Vigor de híbrido na geração F1 de pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Ciênc. e práct.**, v. 18, n. 2, p. 171-177, 1994.
- THERMA, E., SUSMAN, M. **Human chromosomes. Structure, behavior and effects**. Springer-Verlag, Germany. 1992. 376p.
- THOMPSON, M.W., McINNES, R.R., WILLARD, H.F. **Genética médica**. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1991. 339p.
- VANZELA, A. L. L., GUERRA, M., LUCEÑO, M. *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes. **Cytobios**, v. 88, p. 219-228, 1996.
- VAUGHAN, H.E., JAMILENA, M., REJÓN, C.R., PARKER, J.S., GARRIDO-RAMOS, M.A. Loss of nucleolar-organizer regions during polyploid evolution in *Scilla autumnalis*. **Heredity**, v. 71, p. 574-580, 1993.
- VERMA, R.S., BABU, A. Banding techniques. In: **Human chromosomes Principles and techniques**. International ed., U.S.A., 1995. 419p.
- VON KALM, L., SMYTH, D.R. Ribosomal RNA genes and the substructure of nucleolar organizing regions in *Lilium*. **Can. J. Genet. Cytol.**, v. 26, p. 158-166, 1983.
- WAGENVOORT, M., ROUWENDAL, G.J.A., KUIPER-GROENWOLD, G., DE VRIES VAN HULTEN, H.P.J. Chromosome identification in potato trisomics ($2n=2x+1=25$) by conventional staining, Giemsa c-banding and non-radioactive *in situ* hybridization. **Cytologia**, v. 59, p. 405-417, 1994.