

MARIA BETÂNIA SANTOS DE MELO

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE CULTIVARES DE
Lycopersicon esculentum MILL. E ESPÉCIES AFINS**

**RECIFE
2002**

MARIA BETÂNIA SANTOS DE MELO

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
PPGBV Mestrado em Biologia Vegetal

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE CULTIVARES DE
Lycopersicon esculentum MILL. E ESPÉCIES AFINS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Guerra

RECIFE
2002

Melo, Maria Betânia Santos de
Caracterização citogenética de cultivares de
Lycopersicon esculentum Mill. e espécies afins /
Maria Betânia Santos de Melo. – Recife : O Autor,
2002.

iii, 65 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2002.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Biologia vegetal – Citogenética. 2.
Lycopersicon esculentum Mill. – Técnicas
citogenéticas – Espécies afins – Análise comparativa.
3. Banco de germoplasma - Análise. I. Título.

576.316	CDU (2.ed.)	UFPE
576.5	CDD (22.ed.)	BC2005-548

MARIA BETÂNIA SANTOS DE MELO

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE CULTIVARES DE
Lycopersicon esculentum MILL. E ESPÉCIES AFINS**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Guerra
UFPE (Orientador)

Profa. Dra. Maria José Lopes
UFPE (Examinadora)

Profa. Dra. Gianna Carnevalheira
(Examinadora)

Profa. Dra. Anna Maria Benko-Issepon
(Suplente)

Dr. Leonardo Félix
(Suplente)

**RECIFE
2002**

ATA DA DEFESA

ATA DA PROVA PÚBLICA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA MARIA BETÂNIA SANTOS DE MELO, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

As nove horas e trinta minutos, do dia vinte e sete de fevereiro de dois mil e dois, na sala de aula 2004, do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a prova pública de dissertação da Mestranda MARIA BETÂNIA SANTOS DE MELO, intitulada: "CARACTERIZAÇÃO CITOGÊNÉTICA DE CULTIVARES DE *Lycopersicon esculentum* MILL. E ESPÉCIES AFINS". Presenças: Professores, alunos e convidados. A Banca Examinadora, teve como membros titulares os Professores Drs. ANA MARIA BENCKO ISEPPON, Professora do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Doutor em Ciências Naturais, pela Universidade de Viena, que presidiu a Banca Titular, em substituição ao Dr. MARCELO GUERRA, orientador da aluna, que encontrava-se afastado do País, Drs. MARIA JOSÉ DE SOUZA LOPES, Professora do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Biologia, pela Universidade de São Paulo, e a Dra. GIANNA MARIA GRIZ CARVALHEIRA, Professora do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco. Como Membro Suplente o Dr. LEONARDO PESSOA FELIX, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraíba. A Doutora RÁTIA CAVALCANTI FÓRTO iniciou a sessão, apresentando os Membros da Banca, e em seguida passou a palavra para a Dra. ANA MARIA BENCKO ISEPPON que, presidindo a sessão, convidou a aluna para fazer a exposição do seu trabalho. Após a apresentação da aluna, convidou a Dra. GIANNA MARIA GRIZ CARVALHEIRA, para fazer a sua arguição em forma de diálogo. Em seguida, a mestranda foi arguida, também em forma de diálogo, pela Dra. MARIA JOSÉ DE SOUZA LOPES. Após o término das arguições, a Dra. ANA MARIA BENCKO ISEPPON, arguiu a aluna, agradeceu aos membros da banca pelas sugestões, e em seguida solicitou aos presentes que se retirassem por alguns instantes para que se procedesse a avaliação. Após reuni-se, a Banca Examinadora atribuiu a Mestranda MARIA BETÂNIA SANTOS DE MELO, a seguinte menção: "APROVADA", e fez o este resultado a mesma está apta a receber o grau de Mestre em Biologia Vegetal pela Universidade Federal de Pernambuco, nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada, e para constar como Secretária, EU, GIOVANNA LIMA, levi, dei e assinei esta ATA, que também assinam os demais presentes.

Ratifica, 27 de fevereiro de 2002

[Handwritten signatures of the examiners and the student]

[Handwritten signature: Eliângela Pereira Santos Melo]

[Handwritten signature: Fabiana Santos de Almeida]

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL
FOLHA Nº 005/02
DE 02/02/02 - 2002 em Recife

CONFERE COM O ORIGINAL
Em *[Handwritten signature]*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

Hildebrando Manoel da Silva
Assistente em Administração
Do Pós-Graduação em Biologia Vegetal
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

*Ao meu esposo, **Marcílio**, que
surgiu em minha vida como um
simples colega e hoje é a principal
razão do meu viver.
Dedico*

*À minha família, em gratidão a
todo amor, apoio e incentivo
recebido ao longo de toda vida.
Ofereço.*

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos vão para as pessoas que me acompanharam e me incentivaram, estando ou não diretamente ligadas ao meu trabalho. Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. Marcelo Guerra, pela oportunidade oferecida ao longo desse trabalho e, sobretudo, pela amizade conquistada nesses últimos anos que contribuíram significativamente para o meu crescimento profissional e pessoal. À minha querida e eterna orientadora, Gianna Carvalheira, que me introduziu nesse maravilhoso mundo dos cromossomos e que sempre acreditou em mim, incentivando-me e orientando-me em todos os momentos. Agradeço também, aos colegas do laboratório de citogenética vegetal, Adriana, Aguaracy (Ane), Ana Christina, Ana Emília, George, Ivan, Ivanildo, Juliano, Kyria, Leonardo, Luzia, Maria José (Lia), Nataniel, Paulo e Reginaldo, sem os quais certamente não seria possível a realização deste trabalho. Gostaria de agradecer, ainda, à Maria, que possibilitou um vínculo com o laboratório de sementes do Centro de Pesquisa em Hortaliças-CNPq e à amiga Andréa Peñaloza, que mesmo distante, sempre me ajudou, enviando referências bibliográficas. Meus agradecimentos vão também para o Curso de Mestrado em Biologia Vegetal, ao apoio financeiro da CAPES, referente à minha bolsa de estudo e à FACEPE pelo financiamento de parte do material utilizado nesse trabalho, ajudas fundamentais para realização desta pesquisa. Por fim, agradeço a minha família (pais, irmãos, sobrinha e avó), pelo amor e incentivo que recebi durante todos os dias de minha vida, os quais me ajudaram a finalizar mais uma etapa de minha vida acadêmica. Agradeço ainda, aos meus sogros, que indiretamente contribuíram para finalização desse trabalho. Em especial, gostaria de agradecer ao meu esposo, Marcílio, pelo amor, carinho e compreensão dedicado dia após dia, além de me conceder tempo em frente ao computador para a realização desse trabalho, meu muito obrigada. E finalmente, ao meu Deus, que sempre vem me dando forças para escalar essa infinita montanha que é a vida.

Lista de figuras e de tabelas

Manuscrito I

Tabela I	Tamanho dos cromossomos e do complemento haplóide das espécies do gênero <i>Lycopersicon</i>	37
Figura 1	Complemento cromossômico de seis espécies do gênero <i>Lycopersicon</i> coradas com Giemsa 2%. a) <i>L. cheesmani</i> , b) <i>L. chilense</i> , c) <i>L. chmielewskii</i> , d) <i>L. pennellii</i> e-g) <i>L. peruvianum</i> e h) <i>L. pimpinellifolium</i> . Letras s indicam satélites. Barra corresponde a 5 μ m.....	39
Figura 2	Complemento cromossômico de cinco espécies do gênero <i>Lycopersicon</i> hibridizadas com as sondas de DNAr 5S (verde) e 45S (vermelho). a,b) <i>L. esculentum</i> cv. Caraíba, c,d) <i>L. esculentum</i> cv. Ht-16, e,f) <i>L. hirsutum</i> , g,h) <i>L. parviflorum</i> , i,j) <i>L. peruvianum</i> k,l) <i>L. pimpinellifolium</i> . Setas destacam os sítios de DNAr 5S. Barra corresponde a 5 μ m.....	40

Manuscrito II

Figura 1	Complemento cromossômico de quatro espécies do gênero <i>Lycopersicon</i> coradas com CMA e DAPI. A-C) <i>L. hirsutum</i> , D) <i>L. chmielewskii</i> , E-G) <i>L. pimpinellifolium</i> e H-J) <i>L. parviflorum</i> . Setas mostram as principais bandas CMA+ e letras s indicam satélites. Barra corresponde a 5 μ m.....	55
Figura 2	Complemento cromossômico de quatro espécies do gênero <i>Lycopersicon</i> coradas com CMA. A,B) <i>L. chilense</i> , C) <i>L. pennellii</i> , D,E) <i>L. peruvianum</i> e F) <i>L. cheesmani</i> . Setas mostram as principais bandas CMA+ e letras s indicam satélites. Barra corresponde a 5 μ m.....	56
Figura 3	Complemento cromossômico de oito cultivares de <i>L. esculentum</i> coradas com CMA. A) Caraíba, B) Hawaii 7997, C) Hawaii 7998, D) Ht-16, E) IPA-5, F) IPA-6, G) IPA-8 e H) Jumbo AG592. Setas mostram as principais bandas CMA+ e letras s indicam satélites. Barra corresponde a 5 μ m.....	57
Figura 4	Bandeamento C em três cultivares de <i>L. esculentum</i> . A) IPA-5, B) Hawaii 7997 e C) IPA-6. Setas mostram algumas bandas C, letras s indicam satélites. Núcleos interfásicos com grandes blocos fortemente marcados em A. Barra corresponde a 5 μ m.....	58

Sumário

Sumário.....	i
Lista de figuras e de tabela.....	ii
Resumo.....	iii
1. Introdução.....	8
2. Revisão de literatura.....	9
2.1. Considerações gerais sobre o gênero <i>Lycopersicon</i>	9
2.2. Importância dos estudos citogenéticos em vegetais	10
2.3. Importância dos estudos genéticos em tomate.....	14
2.4. Citogenética de <i>Lycopersicon</i>	15
3. Referências Bibliográficas.....	19
4. Manuscritos.....	26
Manuscrito 1: Localização dos satélites e dos sítios de DNAr 5S e 45S em algumas espécies do gênero <i>Lycopersicon</i> Mill.....	27
Abstract.....	27
Introdução.....	28
Material e métodos	29
Resultados.....	31
Discussão.....	32
Agradecimentos.....	34
Referências.....	34
Manuscrito 2: Distribuição da heterocromatina em espécies do gênero <i>Lycopersicon</i> Mill.....	42
Abstract.....	42
Introdução.....	43
Material e métodos	44
Resultados.....	45
Discussão.....	47
Agradecimentos.....	50
Referências.....	50
5. Conclusões.....	59
6. Resumo.....	60
7. Abstract.....	61
8. Anexos.....	62

1. INTRODUÇÃO

A família Solanaceae é constituída por 85 gêneros distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do novo mundo. Segundo Cronquist (1981), essa família está classificada como pertencente à classe Magnoliopsida, sub-classe Asteridae, Ordem Solanales. Entre os gêneros pertencentes as Solanaceae, *Lycopersicon* Mill. destaca-se como um dos mais importantes economicamente. Constituído por nove espécies, oito silvestres e uma cultivada; esse gênero vem sendo muito utilizados em programas de melhoramento genéticos para obtenção de novas cultivares. O Brasil, é considerado o oitavo maior produtor de tomate no mundo, sendo as regiões Nordeste e Sudeste as maiores áreas de produção dessa cultura.

Entre as plantas superiores, o genoma do tomate é um dos mais bem caracterizados. Nos últimos anos, diversos trabalhos genéticos vêm sendo realizados para entender o material genético do tomate, através da obtenção de vários mapas, incluindo mapas clássicos, mapas citológicos, mapas físicos e moleculares. A maioria desses trabalhos são realizados devido à importância econômica e a fácil manipulação genética desta espécie.

Do ponto de vista citogenético, existem poucas informações a respeito dos cromossomos metafásicos de tomate. De uma forma geral, os trabalhos relatam unicamente o número cromossômico ($2n=24$) e a presença de um par de satélites, com poucas informações adicionais sobre a morfologia e a identificação dos pares cromossômicos. Acredita-se, que a escassez desses trabalhos seja relacionada a falta de diferenças morfológicas desses pequenos cromossomos. Por outro lado, análises meióticas em cromossomos paquitênicos, são mais exploradas. Independente do tipo cromossômico utilizado sabe-se que a análise citogenética é importante para o reconhecimento de alterações cromossômicas estruturais e numéricas, cromossomos marcadores e irregularidades meióticas. Essas informações são muitas vezes necessárias para realização dos trabalhos de melhoramento, uma vez que várias características do genoma são reveladas pelo cariótipo. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo principal, analisar os cromossomos mitóticos de diversas cultivares de *L. esculentum* e das oito espécies silvestres do gênero *Lycopersicon*, através da coloração convencional e diferencial, com as técnicas de coloração com CMA/DAPI, bandeamento C e hibridização *in situ*, numa tentativa de encontrar marcadores citológicos que facilitem o reconhecimento das espécies. Os resultados obtidos no presente trabalho foram divididos em dois manuscritos enfocando diferentes aspectos da citogenética do grupo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais sobre o gênero *Lycopersicon*

O gênero *Lycopersicon* foi inicialmente classificado como pertencente a *Solanum*, o mesmo gênero da batata, espécie *S. tuberosum* (Humphrey, 1937; Rick e Butler, 1956). Porém, Bentham e Hooker (1876, *apud* Humphrey, 1937), baseados em diferenças na deiscência da antera, separaram as espécies de *Solanum* em dois gêneros, *Solanum* e *Lycopersicon*. Do ponto de vista genético, os cariótipos das espécies de ambos os gêneros são muito semelhantes indicando uma elevada conservação durante a evolução (Ramanna, 1979).

Atualmente, *Lycopersicon* é constituído por nove espécies e subdividido em dois subgêneros, *Eulycopersicon* Mill. e *Eriopersicon* Mill., baseado na coloração do fruto e na posição do estigma (Rick e Butler, 1956). O subgênero *Eulycopersicon* inclui as espécies de frutos vermelhos, *L. cheesmanii* Riley, *L. esculentum* Mill. e *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill.; enquanto o subgênero *Eriopersicon* engloba as espécies de frutos verdes, *L. chilense* Dun., *L. chmielewskii* Fobes & Holle, *L. hirsutum* Humb. & Bompl., *L. parviflorum* Fobes & Holle, *L. pennellii* (Corr.) Darcy e *L. peruvianum* (L.) Mill. (Rick e Butler, 1956; Chmielewski, 1968; Esquinas-Alcazar e Nuez Viñals, 1995). Todas as espécies do gênero são silvestres, exceto *L. esculentum* Mill. (Rick e Lamm, 1955; Rick e Holle, 1990). É comumente aceito, que o ancestral das formas cultivadas tenha sido o *L. esculentum* var. *cerasiforme* (Rick e Butler, 1956), devido as similaridades no padrão aloenzimático verificado entre *cerasiforme* e as demais cultivares de tomate (Rick e Holle, 1990).

O gênero *Lycopersicon*, tem como provável centro de origem as áreas montanhosas do Peru, Bolívia e parte do Equador (Rick e Butler, 1956; Esquinas-Alcazar e Nuez Viñals, 1995). Para a espécie *L. esculentum* a maioria dos trabalhos citam o Peru e o México, como os prováveis centros de origem (Rick e Butler, 1956; Chmielewski, 1968; Joly, 1979). Entretanto, Jenkins (1948, *apud* McCue, 1952) considerou que o centro de origem dessa espécie seria o continente Europeu e que o Peru e o México seriam apenas os centros de domesticação do tomateiro. Qualquer que seja a história inicial do cultivo do tomate, sabe-se

que hoje essa cultura é amplamente cultivada em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. No entanto, as maiores áreas de distribuição estendem-se pelo Norte do Chile, Sul da Colômbia, Costa do Pacífico e regiões dos Andes (Esquinas-Alcazar e Nuez Vinãls, 1995). Na região andina, crescem espontaneamente todas as espécies do gênero e é neste local que *L. esculentum* mostra sua maior variação. No Brasil, o tomateiro é amplamente cultivado em todas as regiões do país, entretanto, a produção por estado é bem desigual. O Sudeste, nos estados de São Paulo e Minas Gerais, e o Nordeste, na região do submédio São Francisco, são as maiores áreas de produção dessa cultura no país (IBGE, 1996).

Com relação às características morfológicas, as espécies desse gênero apresentam folhas compostas, flores hermafroditas e autógamas. Os frutos são bagas carnosas e suculentas, apresentando número de lóculos variando de dois a 10. As sementes são pequenas de formato irregular e enrugado apresentando número variável por fruto (Esquinas-Alcazar e Nuez Vinãls, 1995). O tomate (*L. esculentum*) tem sido estudado principalmente por sua importância econômica. Entre as hortaliças cultivadas, essa espécie destaca-se economicamente como uma das mais importantes (IBGE, 1996). Nos últimos anos, essa cultura vem se expandindo mundialmente em termos de área de produção, graças às novas tecnologias e ao emprego de variedades melhoradas. Segundo estatísticas da FAO (2000), o tomate ocupa o 2º lugar entre as hortaliças mais cultivadas no mundo, com uma demanda de 3.042.603 Mt no ano 2000, cujo índice só é superado pela batata inglesa e pela batata-doce. No Brasil, o cultivo dessa cultura constitui-se em atividade agrícola de grande relevância sócio-econômica. Por possuir uma alta concentração de vitamina A, B₁, B₂, PP, C, P e K o tomate é destinado à alimentação humana, tanto sob condição *in natura* quanto industrializada na forma de extratos, molhos e ketchup (Esquinas-Alcazar e Nuez Viñales, 1995), sendo considerado, portanto, um alimento altamente nutritivo e sadio.

2.2. Importância dos estudos citogenéticos em vegetais

A caracterização cariotípica é um dos instrumentos mais importantes para a compreensão das relações de parentesco na sistemática vegetal. Essa característica possibilita esclarecer os possíveis mecanismos cromossômicos envolvidos na evolução,

tanto dentro de pequenos táxons quanto em níveis superiores (Stebbins, 1971). Vários trabalhos de sistemática utilizaram técnicas citogenéticas para auxiliar em seus estudos. Porém, é nas plantas cultivadas que se encontra a maior parte das informações citogenéticas detalhadas, especialmente com relação àquelas de interesse econômico, como o trigo e o milho, além de algumas outras espécies, menos estudadas, como as laranjas, as tangerinas, a mandioca, o café, o feijão, etc.

Entre os vários parâmetros utilizados na descrição cariotípica, o número cromossômico, através da análise convencional, constitui-se na característica mais referida na citogenética vegetal e sobre a qual se dispõe de um maior número de dados. Nas angiospermas, algumas famílias como Orchidaceae (Félix e Guerra, 2000) e Commelinaceae (Pitrez *et al.*, 2001) apresentam maior variação no número cromossômico enquanto em outras, como as Solanaceae (Moscone, 1992) e as Velloziaceae (Melo *et al.*, 1997) este dado tende a ser uniforme na maioria dos gêneros. A contribuição dessas análises, por outro lado, tem sido eficaz em espécies com cromossomos de tamanho relativamente grande, como os de cebola e de trigo, porém, espécies com cromossomos pequenos, apresentam dificuldades na visualização de características diferenciais baseadas apenas no tamanho e morfologia cromossômica. Na maioria dos casos, a análise cariotípica convencional é insuficiente e o uso de técnicas de coloração diferencial é recomendável por possibilitar uma caracterização mais detalhada.

A utilização dessas técnicas vem contribuindo de diferentes formas, inovando os estudos de evolução cariotípica realizados nas diversas espécies vegetais. Através da identificação das regiões cromossômicas constituídas por segmentos de DNA repetido milhares de vezes no genoma, formando os chamados *blocos heterocromáticos*, diferenças genômicas entre táxons afins se tornam mais visíveis (Schubert e Rieger, 1990). A visualização desses blocos é possível através da utilização de técnicas, como o bandeamento C, que revela toda a heterocromatina do genoma, a coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e o 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e a hibridização *in situ*, através da localização de determinadas sequências gênicas distribuídas ao longo dos cromossomos (Sharma e Sharma, 1999).

A técnica de bandeamento C permite distinguir as regiões heterocromáticas formadas por sequências altamente repetitivas de DNA, normalmente sem atividade gênica. Essa

técnica evidencia blocos heterocromáticos, através de uma coloração diferenciada dessa região em relação ao restante do cromossomo, auxiliando dessa forma, a identificação dos pares cromossômicos (Vosa, 1985). Moscone *et al.* (1993), por exemplo, estudando seis espécies diplóides do gênero *Capsicum* (Solanaceae), conseguiram distinguir cada espécie pela distribuição de bandas observadas. Em *Sesbania* (Leguminosae), o emprego dessa técnica forneceu diferentes padrões de bandas, permitindo diferenciar os cariótipos de todas as cinco espécies analisadas (Forni-Martins e Guerra, 1999). Guerra (2000) revisando a distribuição de bandas C em 105 espécies de angiospermas, verificou que a heterocromatina apresenta localização preferencial em determinadas regiões cromossômicas.

Outra técnica utilizada na identificação de regiões heterocromáticas é a coloração diferencial com corantes fluorescentes que se ligam às regiões específicas da heterocromatina. Os corantes fluorescentes, ou fluorocromos, mais utilizados em vegetais são a cromomicina A₃ (CMA), que se liga preferencialmente às regiões dos cromossomos ricas nos nucleotídeos guanina e citosina (GC) e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que se liga às regiões ricas em adenina e timina (AT), respectivamente (Schweizer e Ambros, 1994). Esta técnica fornece um pouco mais de detalhe da heterocromatina que o bandeamento C, em virtude da especificidade de cada fluorocromo. Dentre os trabalhos realizados, destaca-se o de Guerra (1993) que descreveu seis tipos cromossômicos para as espécies de *Citrus*, baseado no padrão de bandas CMA⁺. Posteriormente, esses mesmos tipos cromossômicos foram observados em outras espécies da subfamília Auriantoideae (Miranda *et al.*, 1997a,b; Guerra *et al.*, 2000). No gênero *Capsicum*, foi verificada uma grande variabilidade no padrão de bandas CMA/DAPI entre as espécies estudadas (Moscone *et al.*, 1996). A utilização dessas técnicas possibilita evidenciar bandas heterocromáticas utilizadas como marcadores citológicos na identificação dos cromossomos e na caracterização das espécies.

A presença de constrições secundárias também constitui-se em importante marcador citogenético. A RON, ou região organizadora do nucléolo, é constituída basicamente pelos genes de DNAr 18S, 5,8S e 25S juntamente com suas sequências espaçadoras (Rogers e Bendich, 1987). Frequentemente essa região é subterminal com heteromorfismo entre os cromossomos homólogos (Sato *et al.*, 1980; Garrido *et al.*, 1994). Dentro de um indivíduo, o padrão de ativação das RONs pode ser variável, dependendo da necessidade de síntese

protéica. Em uma população de *Allium schoenoprasum*, por exemplo, observou-se freqüentemente variação no número de satélites expressos entre indivíduos (Garrido *et al.*, 1994). Uma das metodologias de coloração diferencial dessa região é através da coloração com nitrato de prata, desenvolvida por Goodpasture e Bloom (1975). O nitrato de prata possui afinidade com as proteínas ácidas nucleolares presentes nas RONS e por isso impregna mais fortemente essa região que o restante do cromossomo (Moscone *et al.*, 1995). Além da utilização dessa técnica, corantes fluorescentes como a mitramicina e cromomicina A₃ (CMA) auxiliam na identificação dos cromossomos portadores da região organizadora do nucléolo (Schweizer e Ambros, 1994; Andras *et al.*, 2000).

A técnica de hibridização *in situ* desenvolvida por Gall e Pardue (1969) e John *et al.* (1969) vem ocupando posição de destaque na caracterização das espécies cultivadas através da análise da organização molecular dos cromossomos (Heslop-Harrison, 1991). Em vegetais, essa técnica tem permitido diferentes aplicações desde a detecção de sequências repetitivas de DNA nos cromossomos (Schwarzacher *et al.*, 1992; Mukai *et al.*, 1993) até a identificação de cromossomos parentais em híbridos somáticos assimétricos (Leitch *et al.*, 1991).

No primeiro caso, a utilização de um determinado fragmento cromossômico contendo alguns nucleotídeos marcados torna possível sua visualização nos cromossomos quando hibridizados com sequências homólogas. As duas sequências mais frequentemente utilizadas como sondas são as de DNAr 5S e 45S. Esses genes formam unidades básicas repetidas em tandem e em diferentes espécies tem-se observado que, embora as unidades repetidas variem no comprimento, a região codificante é altamente conservada (Harihan *et al.*, 1987). No estudo realizado por Moscone *et al.* (1999), quatro espécies de *Phaseolus* foram identificadas baseadas no número, tamanho e posição dos sítios DNAr 5S e 45S, demonstrando existir uma variação interespecífica no grupo estudado. No gênero *Brassica*, por exemplo, o uso dessas sondas possibilitou caracterizar 10 dos 19 pares cromossômicos de difícil distinção com a coloração convencional (Snowdon *et al.*, 2000). A aplicação dessa técnica vem auxiliando na identificação dos pares cromossômicos, principalmente nas espécies que apresentam poucas diferenças morfológicas entre os cromossomos, melhorando significadamente a resolução e confiabilidade na caracterização desses cariótipos. Na

maioria dos casos, os sítios de DNAr 45S correspondem a regiões cromossômicas que são CMA⁺ (Pedrosa *et al.*, 2000; Guerra e Felix, 2000).

Além desse tipo de sonda, o conjunto cromossômico total pode ser marcado e utilizado também como sonda para identificar as espécies parentais de híbridos (hibridização genômica *in situ* – GISH). Exemplos de sua aplicação podem ser observados em trabalhos realizados com híbridos entre centeio e trigo (Schwarzacher *et al.*, 1989), ou entre *L. esculentum* e *Solanum lycopersicoides* (Escalante *et al.*, 1998) e no reconhecimento dos genomas parentais em híbridos de *Clivia* (Ran *et al.*, 2001). Apesar da GISH ser igualmente aplicável em cromossomos meióticos, poucos estudos têm sido realizados até o momento (Stace, 2000).

2.3. Importância dos estudos genéticos em tomate

A extensão dos trabalhos genéticos em tomate deve-se sobretudo às suas características genéticas favoráveis e à sua importância econômica. Essa cultura apresenta genoma relativamente pequeno ($1C = 0,70$), com número cromossômico estável no gênero ($2n=24$) bem como todas as espécies autógamas. Essas características favorecem os estudos genéticos e conseqüentemente a uma melhor compreensão do grupo.

O melhoramento genético do tomateiro tem seguido os processos comumente usados em espécies autógamas, que são a hibridação e a seleção a partir de populações segregantes obtidas. Todos esses métodos são baseados no fato de que a cada autofecundação a percentagem de indivíduos heterozigotos para um caráter monogênico diminui em 50% e, conseqüentemente, a percentagem de indivíduos homozigotos aumenta na mesma proporção. Para se ter um genótipo com a maioria dos locos em homozigose, é necessário que as plantas sejam submetidas a autofecundações sucessivas por seis a oito gerações, formando um processo muito demorado (Costa, 1996)

Devido a isso, os métodos de melhoramento convencional estão sendo incrementados com técnicas moleculares que possibilitem uma melhor obtenção de dados genéticos visando o reconhecimento de novas cultivares e/ou espécies em um intervalo de tempo bem menor. Entretanto, para isso é necessária a caracterização de acessos mantidos em bancos de germoplasmas. A identificação desses materiais pode ser feita de diferentes formas, desde a caracterização morfológica até a caracterização molecular. Do ponto de

vista morfológico, a caracterização visa basicamente a diferenciação fenotípica entre os acessos, evitando a introdução e/ou manutenção de materiais duplicados nas coleções. Infelizmente, nem sempre isso é possível. Muitas vezes, as diferenças fenotípicas são tão sutis que sua observação não é percebida. Nesses casos, faz-se necessário a utilização dos marcadores citológicos ou moleculares em virtude de fornecerem uma melhor segurança na identificação do material estudado.

Em tomate, a maioria dos trabalhos genéticos realizados está direcionada para identificação dos genes de resistência a pragas e doenças. Boa parte desses genes, já foram mapeados ou localizados nos cromossomos, baseados populações segregantes, como por exemplo, o gene de resistência a Tospovirus -Sw-5 (Stevens *et al.*, 1995), ao Vírus do Mosaico do Tabaco -*Tm-2a* (Ohmori *et al.*, 1995) e a nematóides - *Mi* (Zhong *et al.*, 1999), entre outros. Porém, o mapeamento físico de alguns desses genes ainda não foi possível. A identificação desses genes têm contribuído para a obtenção de cultivares resistentes, sendo que as espécies silvestres destacam-se por serem fontes valiosas desses genes.

Diferentes estudos genéticos vêm sendo conduzidos no genoma do tomate, tanto com o DNA nuclear quanto com o DNA extra- nuclear, o que vem proporcionando uma vasta quantidade de informações necessárias para compreensão evolutiva do grupo. MacClear e Hanson (1986), por exemplo, verificaram que as seqüências do DNA mitocondrial, são menos conservadas que as seqüências dos cloroplastos em espécies de *Lycopersicon* e *Solanum*. Palmer e Zamir (1982) utilizando seqüências do DNA de cloroplasto verificaram as relações evolutivas e de parentesco entre as espécies dos gêneros *Lycopersicon* e *Solanum*.

Posteriormente, os estudos sistemáticos conduzidos nessa espécie são relacionados à proporção e distribuição das seqüências de cópia simples e às várias classes de seqüências repetitivas (Schweizer *et al.*, 1988; Zamir e Tanksley, 1988). Diferente dos genomas de várias monocotiledôneas, tais como trigo, arroz e milho e outras dicotiledôneas como ervilha, nas quais as seqüências repetitivas representam 60-80% do genoma, o genoma de tomate é composto principalmente por seqüências simples ou com baixo número de cópias (Zamir e Tanksley, 1988; Peterson *et al.*, 1999). Ganai *et al* (1988) identificaram através da hibridização *in situ* as quatro maiores classes de *repeats* em *L. esculentum*, caracterizadas principalmente pelo número de cópias, localização cromossomal e evolução na família

Solanaceae. Posteriormente, esses *repeats* foram utilizados como sonda na hibridização *in situ* possibilitando o reconhecimento dos pares cromossômicos.

2.4. Citogenética de *Lycopersicon*

O número cromossômico diplóide $2n=24$ foi inicialmente determinado para as espécies de tomate por Wilker em 1909, sendo posteriormente confirmado por diversos outros autores. Porém, haplóides, triplóides e tetraplóides também foram relatados para essas espécies com uma frequência mais baixa (Lindstrom e Humphrey, 1932; Upcott, 1935; Rick e Butler, 1956; Rick e Khush, 1969; Quiros, 1991; Rick, 1991; Esquinas-Alcazar e Nuez Viñals, 1995). As espécies diplóides são constituídas por cromossomos metacêntricos a submetacêntricos (Lindstrom e Humphrey, 1932; Afify, 1933; Upcott, 1935; Govindarajan e Vijayakumar, 1986), apesar de Upadhy e Majid (1964) descreverem cromossomos acrocêntricos para *L. hirsutum*. O tamanho cromossômico médio observado em *L. esculentum* foi aproximadamente 1,75 μm variando de 1,56 μm a 1,95 μm (Upadhy e Majid, 1964). Entretanto, Govindarajan e Vijayakuma (1986) observaram uma variação menor de 2,4 μm a 2,5 μm .

Os cromossomos de tomate foram descritos morfologicamente pela primeira vez por Ramanna e Prakken em 1967. Esses autores mostraram que com uma análise cariotípica cuidadosa, é possível identificar os cromossomos somáticos de tomate, com base no comprimento e na razão entre os braços. Porém, as diferenças entre os cromossomos mitóticos de tomate baseados nesses critérios, isolados ou até mesmo em conjunto, nem sempre são suficientes para identificá-los. Exemplos disso são as dificuldades no reconhecimento dos cromossomos satelitados de tomate. Os satélites em tomate possuem tamanhos semelhantes aos seus menores cromossomos, podendo gerar erros nas contagens cromossômicas.

Banks (1984), por exemplo, analisando 18 variedades de tomate relatou equivocadamente uma variação no número cromossômico de $2n=24$ a $2n=26$. O autor encontrou $2n=24$ em apenas duas variedades analisadas, $2n=25$ em uma outra e $2n=26$ nas vinte demais variedades. Provavelmente, essa variação foi devida à presença de satélites grandes às vezes separados do restante do cromossomo pela distensão das constrições

secundárias (Carvalho *et al.*, 1991). Variações no tamanho dos satélites também têm sido relatadas. Lesley e Lesley (1935) foram os primeiros a observar essa variação nos satélites de tomate. Posteriormente, Gottschalk (1954, *apud* Rick e Butler, 1956) confirmou essa variação em 19 diferentes variedades de *L. esculentum*. Da mesma forma, Upadhy e Majid (1964), baseados no tamanho dos satélites, classificaram cinco espécies de *Lycopersicon* em três diferentes grupos: o primeiro apresentava satélites de tamanho grandes, o segundo satélites de tamanho médio e o terceiro satélites de tamanho pequenos.

Os grandes marcos da citogenética do tomate foram a descoberta dos triploídes espontâneos e a análise dos cromossomos paquitênicos. Os triploídes se destacaram por serem os poliploídes mais frequentes, sendo utilizados em cruzamentos com plantas diplóides para o mapeamento de genes (Frary *et al.*, 1996). Apesar da grande importância dos triploídes para a citogenética do tomate, foi com o estudo dos cromossomos paquitênicos que obteve-se o maior número de dados na identificação de cada um dos doze pares cromossômicos (Quiros, 1991; Peterson *et al.*, 1996) identificados, principalmente, pelo comprimento da cromátide e pela posição do centrômero (Barton, 1950; Rick e Butler, 1956). Essas análises ocorreram no final da década de 40 e início dos anos 50 e vem sendo continuamente utilizadas até os dias atuais, devido sobretudo, às dificuldades na descrição cariotípica dos cromossomos somáticos de tomate (Barton, 1950; Upadhy e Majid, 1964; Rick e Khush, 1969; Quiros, 1991; Peterson *et al.*, 1996).

A aplicação de técnicas de coloração diferencial, como o bandeamento C, em tomate, mostrou a ocorrência da heteocromatina apenas na região organizadora dos nucléolo (RON) do cromossomo 2 (Ramachandran e Ramanna, 1985 *apud* Hille *et al.*, 1989). Outras técnicas de coloração diferencial, incluindo o uso de corante fluorescente como o Hoechst 33258, também foram insuficientes para distinguir os cromossomos individuais. Porém, com o advento da técnica de hibridização *in situ*, a citogenética do tomate teve grande impulso (Lapitan *et al.*, 1991; Xu e Earle, 1994). Como essa espécie encontra-se dentre as espécies mais intensamente mapeadas com o uso de marcadores de RFLP (.....), RAPD (.....), SCARs (....), etc (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991; Ohmori *et al.*, 1995; Zhong *et al.*, 1999), genes específicos podem ser localizados *in situ*, comparando-se assim os mapas físicos com os mapas genéticos. Zhong *et al.* (1999), por exemplo, localizaram fisicamente o

gene *Mi-1* associado intimamente aos marcadores *Aps-1* e *yv* na região pericentromérica do braço longo do cromossomo 6, através da hibridização *in situ* com BACs e YACs.

O uso de sequências teloméricas, subteloméricas e de DNAr 5S e 45S vem sendo realizado com sucesso em cromossomos mitóticos e meióticos de tomate. Ganai *et al.* (1988) e Schweizer *et al.* (1988) isolaram sequências repetidas em tandem do genoma de tomate, chamadas de *TGR1*, as quais foram hibridizadas nas regiões teloméricas e em alguns sítios centroméricos e intersticiais. Lapitan *et al.* (1989), utilizando os mesmos *repeats* de DNA em linhas trissômicas de tomate, identificaram cada um dos doze pares cromossômicos, através do padrão de hibridização obtido. A maioria dos cromossomos apresenta padrão de hibridização distinto, variando na distribuição e na quantidade de *clusters* presentes. Os poucos cromossomos que apresentaram padrão similar foram distinguidos um do outro com base no comprimento e proporção do comprimento dos braços. Da mesma forma, Lapitan *et al.* (1991) e Zhong *et al.* (1998), utilizando *repeats* teloméricos e subteloméricos, conseguiram identificar cada um dos doze cromossomos, os quais apresentaram alta variação nos comprimentos e diferentes combinações de *repeats*, nos terminais cromossômicos. O padrão de hibridização observado entre os cromossomos sugere ser a sequência *TGR1* uma boa ferramenta para identificar os cromossomos individuais de tomate (Lapitan *et al.*, 1991).

Vallejos *et al.* (1986) encontraram um único locus do DNAr 45S na posição terminal do braço curto do cromossomo 2. Entretanto, Xu e Earle (1994) observaram três sítios para o DNAr 45S em cromossomos metafásicos. Em análise posterior com cromossomos meióticos, Xu e Earle, (1996a) visualizaram a presença de cinco sítios para o DNAr 45S: um maior localizado no cromossomo 2, correspondente aos satélites, e quatro menores, localizados no braço longo do cromossomo 2, e no braço curto dos cromossomos 6, 9 e 11.

Com o gene RNAr 5S, a localização cromossomal em tomate foi observada pela primeira vez por Lapitan *et al.* em 1991, através do mapeamento por RFLP e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), determinaram o tamanho físico do gene RNAr 5S e identificaram pela primeira vez sua localização no cromossomo 1 de *L. esculentum* através da hibridização *in situ*. Nesse trabalho, foi verificado que essa sequência está representada por cerca de 1000 cópias localizadas no braço curto no cromossomo 1, próximo ao centrômero. A especificidade do RNA 5S no cromossomo 1 fez desse um excelente

marcador citológico para esse cromossomo. Da mesma forma, Xu e Earle (1996b), identificaram o gene RNAr 5S próximo ao centrômero no cromossomo 1 de tomate. Devido à sua localização na região heterocromática, próximo ao centrômero, várias especulações foram feitas como resultado de possíveis recombinações meióticas; translocações da região eucromática e deleções ocorridas, uma vez que, aproximadamente todos os genes expressos são localizados nas regiões eucromáticas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afify, A.** (1933). The cytology of the hibrid between *Lycopersicon esculentum* and *L. racemigerum* in relation to its parents. *Genetica* 15: 225-240.
- Andras, S.C., Hartman, T.P.V., Alexander, J., McBride, R., Marshall, J.A., Power, J.B., Cocking, E.C. and Davey, M.R.** (2000). Combined PI-DAPI staining (CPD) reveals NOR asymmetry and facilitates karyotyping of plant chromosomes. *Chrom. Res.* 8: 387-391.
- Banks, P.** (1984). A new diploid chromosome number for tomato (*Lycopersicon esculentum*)? *Can. J. Genet. Cytol.* 26: 636-639.
- Barton, D.W.** (1950). Pachytene morphology of the tomato chromosome complement. *Am. J. Bot.* 37: 639-643.
- Carvalho, G.M.G., Guerra, M., Santos, G.A. dos, Andrade, V.C. and Farias, M.C.A.** (1991). Citogenética de angiospermas coletada em Pernambuco - IV. *Acta Bot. Bras.* 5: 37-51.
- Chmielewski, T.** (1968). Cytogenetical and taxonomical studies on a new tomato form. Part II. *Gen. Pol.* 9: 97-124.
- Costa, J.S.** (1996). *Avaliação do impacto do sistema de irrigação pivô-central na dinâmica populacional da traça-do-tomateiro* (*Scrobipalpus absoluta*). 26p. Dissertação de mestrado. Universidade de Viçosa, M.G.
- Cronquist, A.** (1981). Integrated sistem of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Escalante, A., Imanishi, S., Hossain, M., Ohmido, N. and Fukui, K.** (1998). RFLP analysis and genomic in situ hybridization (GISH) in somatic hybrids and their progeny between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum lycopersicoides*. *Theor. Appl. Genet.* 96: 719-726.
- Esquinas-Alcazar, J. and Nuez Viñals, F.** (1995). Situacion taxonomica, domestication y difusion del tomate. In: NUEZ, F (ed). El cultivo del tomate. pp. 13-42.
- FAO.** (2000). FAOSTAT Database Results. (<http://fao.org>).
- Felix, L.P., Guerra, M.** (2000). Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid Orchids. *Genet. Mol. Biol.* 23: 957-978.

- Forni-Martins, E.R. and Guerra, M.** (1999). Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. species (Fabaceae). *Caryologia* 52: 97-103.
- Frary, A., Presting, G.G. and Tanksley, S.D.** (1996). Molecular mapping of the centromeres of tomato chromosomes 7 and 9. *Mol. Gen. Genet.* 205: 295-304.
- Gall, J.G. and Pardue, M.L.** (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natn. Acad. Sci.* 63: 378-383.
- Ganal, M.W., Lapitan, N.L.V. and Tanksley, S.D.** (1988). A molecular and cytogenetic survey of major repeated DNA sequences in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Mol. Gen. Genet.* 213: 262-268.
- Garrido, M.A., Jamilena, M., Lozano, R., Ruiz Rejon, C., Ruiz Rejon, M. and Parker, J.S.** (1994). rDNA site number polymorphism and NOR inactivation in natural populations of *Allium schoenoprasum*. *Genetica* 94: 67-71.
- Goodpasture, C. and Bloom, S.E.** (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver satining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- Govindarajan, T. and Vijayakumar, N.** (1986). Cytotaxonomical studies of South Indian *Solanum* e *Lycopersicon*. *J. Indian Bot. Soc.* 66: 373-376.
- Guerra, M.** (1993). Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* 71: 234-241.
- Guerra, M.** (2000). Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Mol. Biol.* 23: 1029-1041.
- Guerra, M. and Felix, L.** (2000). O cariótipo de *Nothoscordum pulchellum* (Alliaceae), com ênfase na heterocromatina e nos sítios de DNAr. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 35: 283-289.
- Guerra, M., Dos Santos, K.G.B., Barros e Silva, A.E. and Ehrendorfer, F.** (2000). Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - A case of parallel chromosomal evolution. *Am. J. Bot.* 87: 735-747.
- Harihan, N., Reddy, P.S. and Padayatty, J.D.** (1987). 5S rRNA genes in rice embryos. *Pl. Mol. Biol.* 9: 443-451.
- Heslop-Harrison, J.S.** (1991). The molecular cytogenetics of plants. *J. cell. Sci* 100: 15-21.
- Hille, J., Koornneef, M., Ramanna, M.S. and Zabel, P.** (1989). Tomato: a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. *Euphytica* 42: 1-23.

- Humphrey, L.M.** (1937). A cytological and morphological analysis of tomato species. *Cytologia* 8: 306-318.
- IBGE** – (1996). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Levantamento sistemático da produção agrícola* 8: 3-6.
- Joly, B.A.** (1979). Introdução à Taxonomia Vegetal. Companhia Editora Nacional, São Paulo. 377pp.
- Jonh, H.A., Birnstiel, M.L. and Jones, K.W.** (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223: 582-587.
- Klein-Lankhorst, R., Rietveld, P., Machiels, B., Verkerk, R., Weide, R., Gebhardt, C., Koornneef, M. and Zabel, P.** (1991). RFLP markers linked to the root knot nematode resistance gene *Mi* in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 81: 661-667.
- Lapitan, N.L.V., Ganai, M.W. and Tanksley, S.D.** (1989). Somatic chromosome karyotype of tomato based on *in situ* hybridization of the TGRI satellite repeat. *Genome* 32: 992-998.
- Lapitan, N.L.V., Ganai, M.W. and Tanksley, S.D.** (1991). Organization of the 5S ribosomal RNA genes in the genome of tomato. *Genome* 34: 509-514.
- Leitch, I.J., Leitch, A.R. and Heslop-Harrison, J.S.** (1991). Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneous *in situ* hybridization of two differently labelled fluorescent probes. *Genome* 34: 329-333.
- Lesley, M.M. and Lesley, J.M.** (1935). Heteromorphic A chromosomes of the tomato differing in satellite size. *Genetics* 20: 568-580.
- Lindstrom, E.W. and Humphrey, L.M.** (1932). Comparative cytogenetic studies of tetraploid tomatoes from different origins. *Genetics* 18: 193-209.
- McClean, P.E. and Hanson, M.R.** (1986). Mitochondrial DNA sequence divergence among *Lycopersicon* and related *Solanum* species. *Genetics* 112: 649-667.
- McCue, G.A.** (1952). The history of the use of the tomato: an annotated bibliography. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 39: 289-348.
- Melo, N.F., Guerra, M., Benko-Iseppon, A.M. and Menezes, N.L.** (1997). Cytogenetics and cytotaxonomy of *Velloziaceae*. *Pl. Syst. Evol.* 204: 257-273.

- Miranda, M., Ikeda, F., Endo, T., Moriguchi, T. and Omura, M.** (1997a). Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. *Chrom. Res.* 5: 86-92.
- Miranda, M., Ikeda, F., Endo, T., Moriguchi, T. and Omura, M.** (1997b). DNA sites and heterochromatin in Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swing.) chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI staining. *Chrom. Res.* 50: 333-340.
- Moscone, E.A.** (1992). Estudios de cromossomas meióticos em Solanaceae de Argentina. *Darwiniana* 31: 197-261.
- Moscone, E.A., Lambrou, M., Hunziker, A.T. and Ehrendorfer, F.** (1993). Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Pl. Syst.Evol.* 186: 213-229.
- Moscone, E.A., Loidl, J., Ehrendorfer, F. and Hunziker, A.T.** (1995). Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *Amer. J. Bot.* 82: 276-287.
- Moscone, E.A., Matzke, M.A. and Matzke, A.J.M.** (1996). Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae) *Pl. Syst. Evol.* 202: 37-63.
- Moscone, E.A., Klein, F., Lambrou, M., Fuchs, J. and Schweizer, D.** (1999). Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* 42: 1224-1233.
- Mukai, Y., Friebe, B., Hatchett, J.H., Yamamoto, M. and Gill, B.S.** (1993). Molecular cytogenetic analysis of radiation-induced wheat-rye terminal and intercalary chromosomal translocations and the detection of rye chromatin specifying resistance to Hessian fly. *Chromosoma* 102: 88-95.
- Ohmori, T., Murata, M. and Motoyoshi, F.** (1995). Identification of RAPD markers linked to the *Tm-2* locus in tomato. *Treor. Appl. Genet.* 90: 307-311.
- Palmer, J.D. and Zamir, D.** (1982). Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 5006-5010.
- Pedrosa, A., Schweizer, M. and Guerra, M.** (2000). Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Treor. Appl. Genet* 100: 361-367.

- Pedrosa, A., Vallejos, C.E., Bachmair, A. and Schweizer, D.** (2001). Integration common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. *Ann. Rep.Bean Impr Coop.* 44: 11-12.
- Peterson, D.G., James Price, H. and Spencer Johnston, J.** (1996). DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lycopersicon esculentum*) pachytene chromosomes. *Genomes* 39: 77-82.
- Peterson, D.G., Lapitan, N.L.V. and Stack, S.M.** (1999). Localization of single and low-copy sequences on tomato synaptonemal complex spreads using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetics* 152: 427-439.
- Pitrez, S.R., Felix, L.P., Barreto, R. and Guerra, M.** (2001). Números cromossômicos de espécies de commelinaceae R. BR. Ocorrentes no nordeste do Brasil. *Bol. Bot. Univ.* 19: 7-14.
- Quiros, C.F.** (1991). *Lycopersicon cytogenetics*. In: Tsuchiya, T. & Gupta, P.K. Genetics, Breeding, Evolution. pp. 119-139.
- Ramanna, M.S. and Prakken, R.** (1967). Structure of and homology between pachytene and somatic metaphase chromosomes of the tomato. *Genetica* 38: 115-133.
- Ramanna, M.S.** (1979). Patterns of variation of chromosomal types in *Lycopersicon* and *Solanum*. *Proc. Conf. Broadening Genet. Base Crops*, Wageningen, Pudoc.
- Ran, Y., Hammett, K.R.W. and Murray, B.G.** (2001). Hybrid identification in *Clivia* (Amaryllidaceae) using chromosome banding and genomic *in situ* hybridization. *Ann. Bot.* 87: 457-462.
- Rick, C.M. and Lamm, R.** (1955). Biosystematic studies on the status of *Lycopersicon chilense*. *Am. J. Bot.* 42: 663-675.
- Rick, C.M. and Butler, L.** (1956). Cytogenetics of the tomato. *Adv.Genet.* 8: 267-402
- Rick, C.M. and Khush, G.S.** (1969). Cytogenetic explorations in the tomato genome. In: Genetics Lectures. Genetics institute of oregon state university. pp: 45-65.
- Rick, C.M. and Holle, M.** (1990). Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: genetic variation and its evolutionary significance. *Economic Botany* 44: 69-78.
- Rick, C.M.** (1991). Tomato paste: a concentrated review of genetic highlights from the beginnings to the advent of molecular genetics. *Genetics* 128: 1-5.

- Rogers, S.O. and Bendich, A.J.** (1987). Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* 9: 509-520.
- Sato, S.; Ohta, S. and Kuroki, Y.** (1980). Heteromorphic appearance of acrocentric nucleolus organizer regions in *Nothoscordum fragrans*. *Cytologia* 45: 87-96.
- Schubert, I. and Rieger, R.** (1990). Characterization of plant chromosomes by means of banding techniques, differential incorporation of base analogues, and *in situ* hybridization. In: R.C. Sobti and G. Obe, eds., The Eukaryotic Chromosome-Structural and Functional Aspects, Springer-Verlag and Narosa Publishing House, Berlin, pp. 32-46.
- Schweizer, D., Ganai, M., Ninneman, H. and Hemleben, V.** (1988). Species-specific DNA sequence for identification of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum acaule*. *Theor. Appl. Genet.* 75: 679-684.
- Schweizer, D. and Ambros, P.F.** (1994). Chromosome Banding. In: J.R. Gosden, ed., Methods in Molecular Biology, v. 29, Humana Press, pp 97-112.
- Schwarzacher, T.; Leitch, A.R. and Bennett, M.D.** 1989. Localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann. Bot.* 64: 315-324.
- Schwarzacher, T., Ananthawat-Jonsson, K. and Harrison, G.E.** (1992). Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat *Treor. Appl. Genet.* 84: 778-786.
- Seal, A.G. and Bennett, M.D.** (1982). Preferential C-banding of wheat or rye chromosomes. *Treor. Appl. Genet.* 63: 227-233.
- Sharma, K.A. and Sharma, A.** (1999). Plant chromosomes. Analysis, Manipulation and Engineering. Harwood Academic Publishers, India.
- Snowdon, R.J., Friedt, W., Kohler, A. and Kohler, W.** (2000). Molecular cytogenetic localization and characterization of 5S and 25S rDNA loci for chromosome identification in Oilseed Rapi (*Brassica napus* L.). *Ann. Bot.* 86: 201-204.
- Stace, C.A.** (2000). Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon* 49: 451-477.
- Stebbins, G.L.** (1971). Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley. Publishing Company, California.

- Stevens, M.R., Lamb, E.M. and Rhoads, D.D.** (1995). Mapping the Sw-5 locus for tomato spotted wilt virus resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses *Treor. Appl. Genet.* 90: 451-456.
- Upadhy, M.D. and Majid, R.** (1964). Somatic chromosome morphology in some *Lycopersicon* species. *Botany Division* 24: 244-251.
- Upcott, M.** (1935). The cytology of triploid and tetraploid *Lycopersicon esculentum*. *Jorn. of Genetics* 31: 1-19.
- Vallejos, C.E., Tanksley, S.D. and Bernatzky, R.** (1986). Localization in tomato genome of DNA restriction fragments containing sequences homologous to the rRNA (45S), the major chlorophyll a/b binding polypeptide and the ribulose biphosphate carboxylase genes. *Genetics* 112: 93-105.
- Vosa, C.G.** (1985). Chromosome banding in plants. In A.K. Sharma and Sharma, eds., *Chromosome and Cell Genetics*, Gordon and Breach Science Publishers, New York, pp. 79-99.
- Xu, J. and Earle, E.D.** (1994). Direct and sensitive fluorescence in situ hybridization of 45S rDNA on tomato chromosomes. *Genome* 37: 1062-1065.
- Xu, J. and Earle, E.D.** (1996a). High resolution physical mapping of 45S (5.8S, 18S e 25S) rDNA gene loci in the tomato genome using a combination of karyotyping and FISH of pachytene chromosomes. *Chromosoma* 104: 545-550.
- Xu, J. and Earle, E.D.** (1996b). Direct FISH of 5S rDNA on tomato pachytene chromosomes places the gene at the heterochromatinc knob immediately adjacent to the centromere of chromosome 1. *Genome* 39: 216-221.
- Zamir, D. and Tanksley, S.D.** (1988). Tomato genome is comprised largely of fast-evolving, low copy-number sequences. *Mol. Gen. Genet.* 213: 254-261.
- Zhong, X., Fransz, P.F., Eden, J.W., Ramanna, M.S., Kammen, A., Zabel, P. and Hans de Jong, J.** (1998). FISH studies reveal the molecular and chromosomal organization of individual telomere domains in tomato. *The Plant Journal* 13: 507-517.
- Zhong, X.B., Bodeau, J., Fransz, P.F., Williamson, V.M., Van Kammen, A., Jong, J.H. and Zabel, P.** (1999). FISH to meiotic pachytene chromosomes of tomato localtes the root-knot nematode resistance gene *Mi-1* and the acid phosphatase gene *Aps-1* near the

junction of euchromatin and pericentromeric heterochromatin of chromosome arms 6S and 6L, respectively. *Theor. Appl. Genet.* 98: 365-370.

4. MANUSCRITOS

Localização dos satélites e dos sítios de DNAr 5S e 45S em algumas espécies do gênero *Lycopersicon* Mill.

Maria Betânia Santos de Melo¹, Gianna Maria Griz Carnevali² e Marcelo Guerra¹

Abstract

In order to evaluate the cytological characteristics of the species belonging to the *Lycopersicon* genus, cytogenetic analysis was carried out by means of conventional staining and *in situ* hybridization in certain species of this genus. All accessions showed $2n=24$ chromosomes, with exception of tetraploids, which presented $2n=48$. The karyotypes were symmetrical and were made up of one pair of satellite chromosomes in the diploid varieties. The number and the position of the ribosomal sites (5S and 45S rDNA) observed with the *in situ* hybridization were exactly similar in the five analyzed species, with apparently no difference in size. The karyotype stability in relation to chromosome number, as well as the 5S and 45S rDNA sites amongst the species, are discussed.

Com o intuito de avaliar as características citológicas das espécies pertencentes ao gênero *Lycopersicon* foram realizadas análises citogenéticas com coloração convencional e hibridização *in situ* em algumas espécies desse gênero. Todos os materiais apresentaram $2n=24$ cromossomos, exceto os tetraplóides, com $2n=48$. Os cariótipos foram simétricos constituídos de um par de cromossomos satelitados nas espécies diplóides. O número e a posição dos sítios ribossômicos (DNAr 5S e 45S) observados com a hibridização *in situ* foi igualmente semelhante nas cinco espécies analisadas, não havendo, aparentemente, nenhuma diferença no tamanho. São discutidas a estabilidade cariotípica quanto ao número cromossômico e aos sítios de DNAr 5S e 45S entre as espécies.

¹Departamento de Botânica (CCB), Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-420, Brasil. ²Departamento de Morfologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 04023-900, Brasil

Enviar correspondência para M.B.S.M. E-mail: mbsmelo@bol.com.br

INTRODUÇÃO

O gênero *Lycopersicon* está constituído por oito espécies silvestres e uma cultivada, o tomateiro *L. esculentum* Mill. Para obtenção de cultivares melhoradas, as espécies silvestres são frequentemente cruzadas com *L. esculentum* para transferência de genes de resistência. Entre essas espécies, *L. peruvianum* (L.) Mill. destaca-se como uma das mais importantes por possuir, entre outros, os genes de resistência ao vírus causador da moléstia “vira cabeça”, à traça (*Scrobipalpula absoluta* Meyrick) e ao nematóide *Meloidogyne* sp., pragas que atacam normalmente a cultura do tomate (Alexander *et al.*, 1942).

Citologicamente, as espécies de *Lycopersicon* são estáveis quanto ao número e à morfologia cromossômica, apesar de existirem linhagens tetraplóides de *L. peruvianum* (L.) Mill. e *L. pimpinellifolium* Dun., oriundas de cultura de calos. Em alguns outros gêneros de plantas cultivadas, com número cromossômico estável e morfologia cromossômica muito semelhante, tem sido possível obter uma diferenciação cariotípica entre as espécies através de padrões de bandas heterocromáticas (Guerra, 1993; Moscone *et al.*, 1996a) ou através de regiões cromossômicas específicas detectadas por hibridização *in situ* (Adams *et al.*, 2000). Entre as regiões cromossômicas que mais frequentemente apresentam variações entre espécies destacam-se os sítios dos genes ribossomais. Esses genes se encontram repetidos centenas a milhares de vezes em cada genoma, formando blocos de sequências em tandem que podem ser visualizados com diferentes técnicas.

A região da constrição secundária, e frequentemente a cromatina adjacente a essa constrição (incluindo parte do satélite), é constituída pelos genes para RNAr 18S, 5.8S e 25S (também referidos como DNAr 45S) repetidos centenas a milhares de vezes no genoma (Rogers e Bendich, 1987). Essa região pode ser visualizada com técnicas específicas, como a coloração com nitrato de prata ou a hibridização *in situ* com sondas de DNAr 45S. A coloração com nitrato de prata identifica bem os sítios de DNAr ativados na intérfase anterior, denominados de região organizadora do nucléolo, ou RONS, mas não permite visualizar aqueles sítios que não foram ativados recentemente (Moscone *et al.*, 1995). Por outro lado, a hibridização *in situ* permite localizar sítios de DNAr 5S ou 45S, ativos ou inativos, incluindo alguns relativamente muito pequenos (Xu e Earle, 1996b). Por essa razão, essa técnica vem sendo frequentemente utilizada para auxiliar na caracterização

cariotípica de espécies e cultivares, devido principalmente às variações em número, tamanho e distribuição desses sítios (Moscone *et al.*, 1999; Snowden *et al.*, 2000). Além disso, em muitos casos, o número de sítios de DNAr 45S reconhecidos por hibridização *in situ* é muito maior que o descrito por outras técnicas. Em *Vigna unguiculata*, por exemplo, por coloração convencional foi observado apenas uma ou duas constrições secundárias, enquanto por hibridização *in situ* foram observados cinco pares de sítios de DNAr 45S (Guerra *et al.*, 1996).

Em *L. esculentum*, diversos autores têm relatado um intenso polimorfismo de tamanho de satélite (Lesley e Lesley, 1935; Gottschalk, 1954; *apud* Rick e Butler, 1956; Upadhye e Majid, 1964). Andras *et al.* (2000) observaram também variação no tamanho dos satélites entre acessos de *L. peruvianum*. Dados relacionados aos sítios de DNAr 5S e 45S têm sido relatados apenas para *L. esculentum* (Ganal *et al.*, 1988; Xu e Earle, 1994, 1996a,b), enquanto que para as espécies silvestres não há registros quanto ao número e à distribuição desses sítios.

O objetivo deste trabalho foi comparar o número e a posição dos satélites nas nove espécies do gênero *Lycopersicon* e entre algumas cultivares do tomateiro, visando identificar diferenças citológicas entre elas. Além disso, foram investigados a localização dos sítios de DNAr 5S e 45S em quatro espécies silvestres e duas cultivares de *L. esculentum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as oito espécies silvestres analisadas foram diplóides ($2n=24$), procedentes do Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (CNPQ), Brasília, BR. Os tetraplóides *L. peruvianum* cv. *humifusum* (LA1292) e a cultivar LA2582 de *L. pimpinellifolium* foram procedentes do Tomato Genetics Resource Center, Califórnia, E.U.A. As espécies diplóides silvestres foram fornecidas com os seguintes códigos de referência: *L. cheesmani* Riley, CNPH 432; *L. chilense* Dun., CNPH 410; *L. chmielewskii* Fobes & Holle, CNPH 944; *L. hirsutum* Humb. & Bonpl., CNPH 943; *L. parviflorum* Fobes & Holle, CNPH 416; *L. pennellii* (Corr.) Darcy, CNPH 409; *L. peruvianum* (L.) Mill., CNPH 201 e *L. pimpinellifolium* Dun., CNPH 382. As cultivares de *L. esculentum* (Caraíba, cerasiforme, Hawaii 7997, Hawaii 7998, Ht-16, IPA-5, IPA-6, IPA-8, Jumbo Ag592, Olho Roxo) foram

fornecidas pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, exceto a cultivar cerasiforme, fornecida pelo centro supracitado da Califórnia.

Pontas de raízes obtidas a partir de sementes germinadas em placas de Petri foram coletadas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 10-20 horas a 6 °C. Posteriormente, foram fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1) por 24 horas à temperatura ambiente e estocadas em *freezer*.

Coloração convencional

A preparação das lâminas para a análise convencional seguiu a metodologia descrita por Guerra (1983). Pontas de raízes foram hidrolisadas em HCl 5 N por 20 minutos à temperatura ambiente e esmagadas em uma gota de ácido acético 45%. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Giemsa a 2% por 10 a 20 minutos. A determinação do tamanho máximo e mínimo dos cromossomos foi realizada em duas ou três metáfases representativas de cada acesso e a medição de cada cromossomo foi feita diretamente através da ampliação dos negativos fotográficos dessas células, comparando a uma escala micrométrica na mesma ampliação.

Hibridização *in situ*

Foi feita uma análise da localização dos sítios de DNAr 5S e 45S em *L. hirsutum*, *L. parviflorum*, *L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium* e em 2 cultivares de *L. esculentum* (Caraíba e Ht-16). As raízes foram tratadas em uma solução de celulase (Sigma) 2% e pectinase (Sigma) 20% a 37 °C por uma hora. A sonda de DNAr 45S, obtida de *Arabidopsis thaliana*, foi cedida gentilmente pelo Prof. D. Schweizer, da Universidade de Viena, clonada nos plasmídeos SK 18S e SK 25S e marcada por *nick translation* com biotina-11-dUTP (Sigma). A sonda de DNAr 5S foi obtida por PCR a partir do DNA genômico de *Passiflora edulis* Sims., utilizando os *primers* 5'-GTGCGATCATACCAGC(AG)(CT)TAATGCACCGG-3' e 5'-GAGGTGCAACACGAGGAC TTCCCAGGAGG-3' e marcada com digoxigenina-11-dUTP. A técnica de hibridização *in situ* utilizada foi a descrita por Moscone *et al.* (1996b), com algumas modificações. A mistura de hibridização continha: 60% de formamida, 5% de dextran sulfato, 2xSSC e 0,1 µg/µl de DNA de esperma de salmão. As misturas de hibridização e as preparações

citológicas foram desnaturadas a 75 °C por 10 min. e hibridizadas durante 18-20 h a 37 °C em câmara úmida. A detecção da sonda de DNAr 45S foi feita com anti-biotina monoclonal produzida em camundongo (Dakopatts nº M743). Para visualizar a sonda foi utilizado anticorpo anti-camundongo produzido em coelho conjugados com TRITC (tetrametil rodamina isotiocianato) (Dakopatts nº R270). A detecção do DNAr 5S foi feita com anti-digoxigenina produzida em carneiro e conjugada com FITC (fluoresceína isotiocianato) (Boehringer Mannheim nº 1207741). As lâminas foram coradas com DAPI (2 µg/ml), lavadas em 2xSSC e montadas em meio Vectashield H-1000 (Vector Laboratories).

Microscopia e fotografia

As melhores células foram fotografadas com o sistema da Leica MPS 60 ou capturadas com câmera de vídeo CCD Cohn no microscópio Leica DMLB. Para análise das células marcadas com DNAr 5S e 45S foram utilizados os filtros N 2.1 e I3, respectivamente. As fotografias foram feitas com filme Kodak Imagelink HQ ASA 25 para campo claro e T-MAX Kodak ASA 400 para fluorescência. Os filmes foram copiados em papel Kodak Kodabromide F3 ou Kodak Royal.

RESULTADOS

Todo o material foi inicialmente analisado com a coloração convencional para identificação das características básicas do cariótipo e localização dos satélites. As espécies diplóides apresentaram $2n=24$ (Figura 1a-f), enquanto os acessos tetraplóides de *L. peruvianum* var. *humifusum* e *L. pimpinellifolium* apresentaram $2n=48$ (Figura 1g, h). Quanto ao tamanho, os cariótipos foram sempre visivelmente simétricos, constituídos por cromossomos cujo tamanho médio variou de 1,60 µm a 2,19 µm entre os acessos diplóides (Tabela I). A maior variação de tamanho cromossômico dentro de um cariótipo foi encontrada em *L. cheesmani* e *L. peruvianum*, onde a diferença entre o maior e o menor cromossomo foi de cerca 1 µm. Em *L. chmielewskii* essa diferença foi de 0,70 µm e nas demais espécies foi de cerca de 0,5 µm ou menos (Tabela I). Em todas as espécies, os cromossomos profásicos mostraram um padrão de condensação proximal (Figura 1c, d, g, h) e os núcleos interfásicos foram do tipo semireticulado.

Nos acessos diplóides foram observados sempre 1 par de satélites, havendo variação de tamanho entre os diferentes acessos. Essa diferença é difícil de quantificar porque o tamanho do satélite pode variar dentro de cada acesso, aparentemente dependendo do grau de ativação da RON. Baseado simplesmente em uma avaliação visual, a espécie *L. chilense* foi a que apresentou os menores satélites, enquanto *L. esculentum* cv. Ht-16 e a cv. IPA-5 mostraram os maiores satélites. Entre as silvestres os maiores satélites foram observados em *L. chmielewskii*. Nas demais, o tamanho foi similar e intermediário entre essas espécies. Entre as cultivares de *L. esculentum*, os menores satélites foram encontrados em Olho Roxo e Hawaii 7998 e os maiores em Ht-16 e IPA-5.

A identificação dos cromossomos satelitados foi dificultada pela distensão da constrição secundária e pela separação do satélite do restante do cromossomo. Além disso, em alguns acessos, os satélites foram de tamanho similar ao dos menores cromossomos (Figura 1f), parecendo de fato haver 26 cromossomos, como reportado por Banks (1984). Nos acessos tetraplóides, foram observados dois pares de cromossomos satelitados, sempre relativamente pequenos, mas de fácil distinção (Figura 1g). Em todas as espécies, ambas as constrições secundárias apareceram distendidas, embora em algumas células apenas uma delas era visível.

Foi sempre observado um único par de sítios de DNAr 45S ocupando a região da constrição secundária, do satélite e, as vezes, parte da região proximal adjacente à constrição secundária (Figura 2a). Na maioria das células a constrição secundária não foi visível, ficando o satélite e a porção terminal do braço curto marcado de forma descontínua, como se fossem quatro sítios (compare Figura 2c e 2e). A figura 2a mostra uma célula onde a constrição secundária foi marcada, permitindo observar que os satélites não estavam soltos e sim ligados por uma região de cromatina muito descondensada. Contudo, nas células mais condensadas se via apenas 2 cromossomos marcados (Figura 2e, i). Nos núcleos interfásicos foram observados dois a quatro blocos marcados com a sonda para DNAr 45S, correspondentes aos satélites e a porção terminal do braço curto desses cromossomos. Em alguns núcleos foram encontrados também seis a oito pequenos sítios, algumas vezes localizados próximos dos blocos maiores (Figura 2e, i).

Com relação ao DNAr 5S, também não foi observada diferença entre as espécies e cultivares estudadas. Em todos os casos, o sítio 5S apresentou-se como um par de pontos

pequenos localizados na região proximal do braço curto do maior par cromossômico (Figura 2b, d, f, h, j, l). Com esta sonda, nem sempre foi possível visualizar os sítios nos núcleos interfásicos.

DISCUSSÃO

Os cariótipos das espécies do gênero *Lycopersicon* têm sido descritos como simétricos, apresentando apenas pequenas variações no tamanho e morfologia cromossômica, destacando-se um único par de satélites grandes nos acessos diplóides (Upcott, 1935; Rick e Butler, 1956; Quiros, 1991). Apenas Upadhy e Majid (1964) relataram a existência de cromossomos acrocêntricos nas cultivares de *L. esculentum*. Esse tipo cromossômico não foi encontrado em nenhum dos acessos investigados aqui, embora, em células prometafásicas, alguns cromossomos apresentem um dos braços descondensados, dando a impressão de serem acrocêntricos. Com relação à simetria de tamanho cromossômico, os cariótipos de *L. peruvianum*, *L. cheesmani* e *L. chmielewskii* apresentaram uma variação de mais de 50% entre o maior e o menor cromossomo. Na prática, entretanto, essa variação é muito pequena, representando no máximo 1 µm de diferença entre os 12 pares.

Apesar dessa aparente estabilidade, no presente trabalho foram observadas variações no tamanho dos satélites semelhantes às descritas entre cultivares de *L. esculentum* por outros autores (Lesley e Lesley, 1935; Upadhy e Majid, 1964; Xu e Earle, 1994). Embora não tenham sido quantificados, a cultivar Ht-16 apresentou satélites sempre maiores que as demais, enquanto entre as espécies, *L. chilense* apresentou os menores satélites. Essas variações podem estar relacionadas ao número de sequências repetitivas presentes na RON (Rogers e Bendich, 1987) mas podem também ser devidas a mudanças de posição da RON no braço cromossômico (Guerra, 1988; Moscone *et al.*, 1999).

A hibridização *in situ* com sondas de DNAr 45S permitiu a detecção de apenas um par desses sítios no braço curto do segundo par cromossômico das cinco espécies e das duas cultivares estudadas. Resultados semelhantes, com estabilidade do número e posição de sítios ribossomais em todas as espécies de um gênero são raros, mas foram também encontrados em alguns gêneros, como *Quercus* (Zoldos *et al.*, 1999) e *Manihot* (Carvalho e Guerra, *no prelo*). Ganai *et al.* (1988, 1989) haviam reportado previamente a ocorrência de um único sítio de DNAr 45S no braço curto do cromossomo 2 de *L. esculentum* cv. VF 36.

Xu e Earle (1994), no entanto, reexaminaram essa cultivar e mais as cultivares Rio Grande e Motelle e encontraram três pares de sítios de DNAr 45S menores além daqueles do par 2. Esses mesmos autores reexaminaram esses sítios em cromossomos paquitênicos e encontraram quatro pares menores e um maior e observaram que podem ocorrer até 10 nucléolos por núcleo, indicando que todos esses sítios são ativos. No presente trabalho não foi possível detectar os sítios menores em cromossomos mitóticos mas em vários núcleos interfásicos foram encontrados seis a oito pequenos cromômeros marcados com a sonda nas cinco espécies investigadas. Portanto, além do sítio maior do par 2 parece existir sítios menores de DNAr 45S tanto em *L. esculentum* quanto nas outras espécies analisadas.

Com a sonda DNAr 5S, foi localizado um sítio próximo ao centrômero em todas as espécies analisadas. Lapitan *et al.* (1991), através do mapeamento por RFLP e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), determinaram o tamanho físico do gene RNAr 5S e identificaram pela primeira vez sua localização no cromossomo 1 de *L. esculentum* através da hibridização *in situ*. Esse resultado foi posteriormente confirmado por Xu e Earle (1996b) por FISH. No presente trabalho, o sítio de DNAr 5S foi localizado na região proximal de um dos maiores pares cromossômicos de todas as espécies estudadas, embora, devido à pequenas diferenças de tamanho entre esses cromossomos, nem sempre foi claro que se tratava do par 1, o maior do cariótipo. Na maioria dos outros gêneros investigados esse sítio tende a ser conservado entre as espécies (Adams *et al.*, 2000), sugerindo que em um grupo com cariótipo muito estável como *Lycopersicon*, essa característica tinha uma chance muito pequena de apresentar variações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Nataniel F. de Melo, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA, pela ajuda na parte prática de hibridização *in situ*, ao Prof. Dimas da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, Recife, BR. ao Dr. Leonardo Giordano do Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças, Embrapa, Brasília, BR. e ao Dr. Charles Rick do *Tomato Genetics Resource Center* (TGRC) Califórnia, E.U.A., pelo fornecimento das sementes das espécies e cultivares utilizadas nessa pesquisa. Esse trabalho foi realizado com o apoio financeiro da FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERÊNCIAS

- Adams, S.P., Leitch, I.J. and Bennett, M.D.** (2000). Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *Am. J. Bot.* 87:1578-1583.
- Alexander, L.J., Lincoln, R.E. and Wright, V.** (1942). A survey of the genus *Lycopersicon* for resistance to the important tomato diseases occurring in Ohio and Indiana. *Plant Disease Reprtr. Suppl.* 136: 49-85.
- Andras, S.C., Hartman, T.P.V., Alexander, J., McBride, R., Marshall, J.A., Power, J.B., Cocking, E.C. and Davey, M.R.** (2000). Combined PI-DAPI staining (CPD) reveals NOR asymmetry and facilitates karyotyping of plant chromosomes. *Chrom. Res.* 8: 387-391.
- Banks, P.** (1984). A new diploid chromosome number for tomato (*Lycopersicon esculentum*)? *Can. J. Genet. Cytol.* 26: 636-639.
- Carvalho, R. and Guerra, M.** Cytogenetics of *Manihot esculenta* CRANTZ (Cassava) and eight related species. *Hereditas* **no prelo**.
- Ganal, M.W., Lapitan, N.L.V. and Tanksley, S.D.** (1988). A molecular and cytogenetic survey of major repeated DNA sequences in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Mol. Gen. Genet.* 213: 262-268.
- Ganal, M.W., Young, N.D. and Tanksley, S.D.** (1989). Pulsed field gel electrophoresis and physical mapping of large DNA fragments in the *Tm-2a* region of chromosome 9 in tomato. *Mol. Gen. Gen.* 215:395-400.
- Guerra, M.** (1983). O uso do Giemsa na citogenética vegetal: comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciênc. e Cult.* 35: 190-193.
- Guerra, M.** (1988). Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). *Pl. Syst. Evol.* 158: 107-115.
- Guerra, M.** (1993). Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* 71: 234-241.

- Guerra, M., Kenton, A. and Bennett, M.D.** (1996). rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. And *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hibridization. *Ann. Bot.* 78: 157-161.
- Lapitan, N.L.V., Ganai, M.W. and Tanksley, S.D.** (1991). Organization of the 5S ribosomal RNA genes in the genome of tomato. *Genome* 34: 509-514.
- Lesley, M.M. and Lesley, J.M.** (1935). Heteromorphic A chromosomes of the tomato differing in satellite size. *Genetics* 20: 568-580.
- Moscone, E.A., Loidl, J., Ehrendorfer, F. and Hunziker, A.T.** (1995). Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *Amer. J. Bot.* 82: 276-287.
- Moscone, E.A., Matzke, M.A. and Matzke, A.J.M.** (1996a). Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae) *Pl. Syst. Evol.* 202: 37-63.
- Moscone, E.A., Matzke, M.A. and Matzke, A.J.M.** (1996b). The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tabacco. *Chromosoma* 105: 231-236.
- Moscone, E.A., Klein, F., Lambrou, M., Fuchs, J. and Schweizer, D.** (1999). Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* 42: 1224-1233.
- Quiros, C.F.** (1991). *Lycopersicon* cytogenetics. In: Tsuchiya, T. & Gupta, P.K. *Genetics, Breeding, Evolution*, 2B: 119-139.
- Rick, C.M. and Butler, L.** (1956). Citogenetics of the tomato. *Advances in Genetics* 8: 267-402.
- Rick, C.M.** (1991). Tomato paste: a concentrated review of genetic highlights from the beginnings to the advent of molecular genetics. *Genetics* 128: 1-5.
- Rogers, S.O. and Bendich, A.J.** (1987). Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* 9: 509-520.
- Snowdon, R.J., Friedt, W., Kohler, A. and Kohler, W.** (2000). Molecular cytogenetic localization and characterization of 5S and 25S rDNA loci for chromosome identification in Oilseed Rapi (*Brassica napus* L.). *Ann. Bot.* 86: 201-204.
- Upadhy, M.D. and Majid, R.** (1964). Somatic chromosome morphology in some *Lycopersicon* species. *Bot. Div.* 24: 244-251.

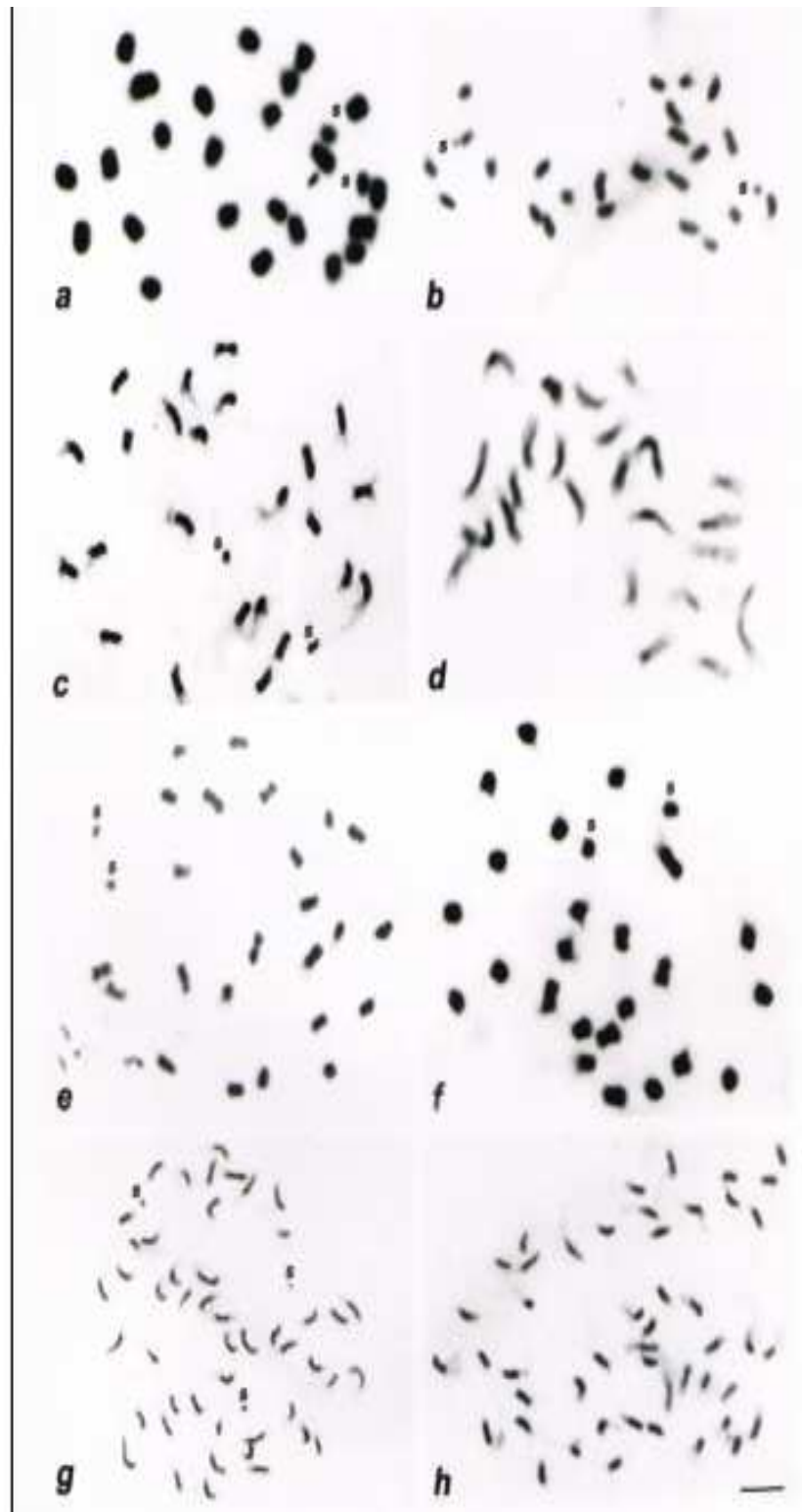
- Upcott, M.** (1935). The cytology of triploid and tetraploid *Lycopersicon esculentum*. *Jorn. of Genetics* 31: 1-19.
- Xu, J. and Earle, E.D.** (1994). Direct and sensitive fluorescence in situ hybridization of 45S rDNA on tomato chromosomes. *Genome* 37: 1062-1065.
- Xu, J. and Earle, E.D.** (1996a). High resolution physical mapping of 45S (5.8S, 18S e 25S) rDNA gene loci in the tomato genome using a combination of karyotyping and FISH of pachytene chromosomes. *Chromosoma* 104: 545-550.
- Xu, J. and Earle, E.D.** (1996b). Direct FISH of 5S rDNA on tomato pachytene chromosomes places the gene at the heterochromatic knob immediately adjacent to the centromere of chromosome 1. *Genome* 39: 216-221.
- Zoldos, V., Papes, D., Cerbah, M., Panaud, O., Besendorfer, V. and Siljak-Yakovlev, S.** (1999). Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theor. Appl. Genet.* 99: 969- 977.

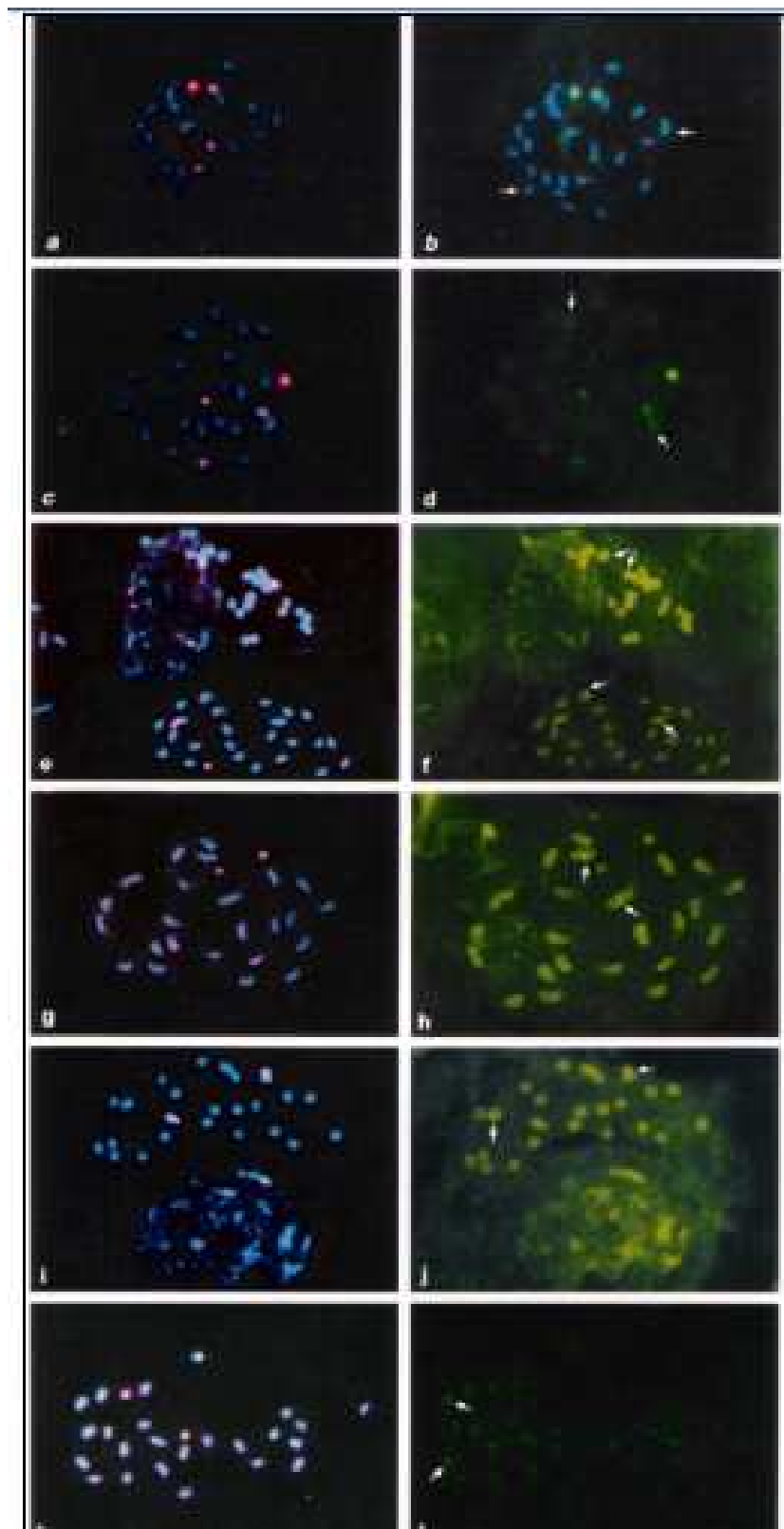
Tabela I - Tamanho dos cromossomos e do complemento haplóide das espécies do gênero *Lycopersicon*

Espécies analisadas	Tamanho dos cromossomos		
	mínimo	máximo	médio
<i>L. cheesmani</i>	1,66	2,66	2,19
<i>L. chilense</i>	1,80	2,33	2,00
<i>L. chmielewskii</i>	1,35	2,05	1,80
<i>L. esculentum</i> cv. IPA-5	1,80	2,07	1,60
<i>L. hirsutum</i>	1,50	2,02	1,80
<i>L. parviflorum</i>	1,80	2,26	2,10
<i>L. pennellii</i>	1,70	2,20	2,00
<i>L. peruvianum</i> (2x)	1,30	2,35	1,75
<i>L. pimpinellifolium</i> (2x)	1,70	2,18	1,90
Tamanho médio	1,62	2,23	1,90

Figura 1 – Complemento cromossômico de seis espécies do gênero *Lycopersicon* coradas com Giemsa 2%. a) *L. cheesmani*, b) *L. chilense*, c) *L. chmielewskii*, d) *L. pennellii* e-g) *L. peruvianum* e h) *L. pimpinellifolium*. Letras s indicam satélites. Barra corresponde a 5 µm.

Figura 2 – Complemento cromossômico de cinco espécies do gênero *Lycopersicon* hibridizadas com as sondas de DNAr 5S (verde) e 45S (vermelho). a,b) *L. esculentum* cv. Caraíba, c,d) *L. esculentum* cv. Ht-16, e,f) *L. hirsutum*, g,h) *L. parviflorum*, i,j) *L. peruvianum* k,l) *L. pimpinellifolium*. Setas destacam os sítios de DNAr 5S. Barra corresponde a 5 µm.





MANUSCRITO II

Distribuição da heterocromatina em espécies do gênero *Lycopersicon* Mill.

MARIA BETÂNIA SANTOS DE MELO^{1,*} E MARCELO GUERRA¹

¹Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50.670-420, Brasil.

Abstract - *Lycopersicon* is one of the economically most important genus of the Solanaceae family, and has been the focus of many cytogenetic studies. However, in spite of numerous approaches related to the genetic organization of the group, little is known about the structural characteristics of the chromatin. Throughout this work, two approaches were adopted: staining with CMA/DAPI and C-banding. The staining with CMA/DAPI was used in the eight wild species of the genus and in eight wild species of the genus and in eight cultivars of *L. esculentum*. The C-banding technique was used in three cultivars of *L. esculentum*. In all the analyzed material with the fluorochromes CMA/DAPI, three chromosome pairs were identified, pair 1 containing a proximal band, pair 2 that showed the nucleolus organizing regions and pair 12, with a large band localized in the terminal or sub-terminal region of the short arm. The species were grouped according to the number of bands that were most visible. Generally, these species presented a preferential distribution of the heterochromatin in the terminal regions of the chromosomes, with exception for *L. chmielewskii*, which showed CMA⁺ bands in the proximal and interstitial/sub-terminal regions. The obtained results with the C-banding technique seemed similar to those obtained with CMA stain. In both techniques the satellites were strongly stained and presented varying sizes. The size of the satellites seems to be the most variable chromosome characteristic in the *L. esculentum* cultivated and possibly in the other species of the genus. This data suggests that the *Lycopersicon* genus is karyologically very stable, and tolerates few chromosome rearrangements and little chromosome number variation.

Key Words: banding, fluorochrome, heterochromatic, satellites, tomato.

-
- Correspondência: fax +81-32718348; e-mail: mbsmelo@bol.com.br

INTRODUÇÃO

Para a caracterização do cariótipo de plantas diversos parâmetros cariológicos distintos têm sido utilizados. Um dos parâmetros mais variáveis, e por isso frequentemente utilizado é o padrão de distribuição da heterocromatina (Greilhuber, 1995). As diferenças observadas na quantidade e na organização da heterocromatina são utilizadas para identificar espécies ou cultivares mantidas em bancos de germoplasmas e para reconhecer mecanismos envolvidos na evolução cariotípica de diferentes grupos vegetais (Vosa, 1985). Em *Capsicum*, por exemplo, foi verificada uma grande variabilidade no padrão de bandas entre as espécies estudadas, tanto com bandejamento C quanto com os fluorocromos CMA/DAPI (Moscone *et al.*, 1993, 1996).

A heterocromatina de uma espécie pode ser formada por diferentes tipos de sequências de DNA. O tipo de heterocromatina comum a praticamente todas as angiospermas é a que se observa nas constrições secundárias e nos satélites. Essas duas regiões são formadas por sequências repetitivas, como todas as outras regiões heterocromáticas, mas diferem das demais por possuírem os genes para DNAr 45S repetidos centenas de vezes – o que as tornam particularmente importantes. Schubert e Wobus (1985) observaram que essas sequências são capazes de “saltar” de uma região cromossômica para outra, o que certamente contribui para aumentar o seu polimorfismo. Para reconhecer o satélite e outras regiões heterocromáticas localizadas ao longo dos cromossomos, são utilizadas diversas técnicas de coloração diferencial, principalmente a coloração com os fluorocromos CMA/DAPI e o bandejamento C (Guerra, 2000).

Lycopersicon é um dos gêneros economicamente mais importantes da família Solanaceae, tendo sido foco de muitos estudos citogenéticos. Referências anteriores à heterocromatina de tomate foram feitas por diversos autores, mas nenhum deles utilizou técnicas de coloração específicas para heterocromatina. Stack (1984), baseado em Ramanna e Prakken (1967), estimou que 75,3% dos cromossomos mitóticos de tomate seriam formados por heterocromatina, enquanto Peterson *et al.* (1996) coraram cromossomos paquitênicos de tomate com DAPI e com base nas observações afirmaram encontrar 77% de heterocromatina. Como esses autores não utilizaram técnicas apropriadas para revelar a heterocromatina, mais provavelmente o que eles mediram foi a fração da cromatina que

condensa precocemente (ver Guerra, 1988) e que em tomate corresponde à maior parte de cada cromossomo. Alguns outros autores têm examinado os cromossomos de tomate com a técnica de hibridização *in situ* localizando determinadas sequências específicas de DNA (Ganal *et al.*, 1988, 1989, Peterson *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 1998, 1999). Essas hibridizações indicaram que, ao menos em tomate, devem existir numerosos blocos de heterocromatina, principalmente nas regiões cromossômicas terminais. Apesar disso, se conhece ainda pouco sobre a distribuição da heterocromatina neste grupo.

O gênero *Lycopersicon* é dividido em nove espécies, a maioria das quais produz híbridos viáveis e férteis quando cruzados (revisado por Quiros, 1991). Os cariótipos dessas espécies são constituídos por 24 cromossomos pequenos e de tamanho similar, com poucas diferenças morfológicas. Entretanto, diversos autores relataram diferenças cariotípicas entre cultivares de *L. esculentum*, baseados no tamanho dos satélites. Lesley e Lesley (1935) foram os primeiros a observar diferenças entre as cultivares de *L. esculentum* de acordo com esse critério. Posteriormente, essa variação foi confirmada por outros autores (Gottschalk, 1954 *apud* Rick e Butler, 1956; Upadhyia e Majid, 1964). Mais recentemente, Andras *et al.* (2000) encontraram variação no tamanho dos satélites entre um acesso diplóide e um tetraplóide de *L. peruvianum*.

O presente trabalho teve como objetivo verificar o padrão de distribuição da heterocromatina nas nove espécies do gênero *Lycopersicon*, incluindo oito cultivares de *L. esculentum*, com o uso dos fluorocromos CMA e DAPI. Além disso, foi comparado o padrão de bandas CMA/DAPI de *L. esculentum* com o padrão de bandas C obtido em três cultivares da mesma espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram analisadas, com a coloração com CMA e DAPI, as oito espécies silvestres do gênero *Lycopersicon* (*L. cheesmani* Riley, *L. chilense* Dun., *L. chmielewskii* Fobes & Holle, *L. hirsutum* Humb. & Bonpl., *L. parviflorum* Fobes & Holle, *L. peruvianum* (L.) Mill., *L. pennellii* (Corr.) Darcy, e *L. pimpinellifolium* Dun.) e oito cultivares de *L. esculentum* Mill. (Caraíba, Hawaii 7997, Hawaii 7998, Ht-16, IPA-5, IPA-6, IPA-8 e Jumbo AG592), com a coloração com CMA e DAPI. As cultivares IPA-5, IPA-6 e Hawaii 7997 foram analisados também com bandeamento C. Todo o material foi

proveniente do Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças, Brasília, BR, do Tomato Genetics Resource Center, Califórnia, E.U.A., ou da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, BR. Indicação específica da procedência desses materiais se encontra descrita em Melo *et al* (em preparação).

Para a análise mitótica, pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 10 a 20 horas a 6 °C. Posteriormente, foram fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético 3:1, v/v) por 24 horas à temperatura ambiente e estocadas em *freezer*.

Na preparação das lâminas para o bandejamento C e para a coloração com CMA e DAPI, as raízes foram inicialmente tratadas com solução de celulase 2% e pectinase 20% a 37 °C por uma hora. A técnica de bandejamento C, baseada em Schwarzacher *et al.* (1980), consistiu no esmagamento das raízes em uma gota de ácido acético 45%, envelhecimento das lâminas por dois dias à temperatura ambiente, imersão das lâminas em ácido acético 45% a 60 °C por 10 minutos, tratamento com uma solução saturada de hidróxido de bário 5% à temperatura ambiente por 10 minutos, tratamento em solução salina saturada (2xSSC) a 60 °C por 80 minutos, coloração com Giemsa a 3% e montagem em Entellan (Merck).

Para a coloração com CMA/DAPI foi utilizado o procedimento descrito por Schweizer e Ambros (1994). Essa técnica consistiu no esmagamento das raízes em ácido acético 45%, envelhecimento das lâminas por três dias, coloração com CMA a 0,5 mg/ml por uma hora, seguida da coloração com DAPI 2 µg/ml por 30 minutos, montagem das lâminas em tampão McIlvaine-glicerol (1:1) e estocagem das lâminas por mais três dias.

RESULTADOS

A coloração com os fluorocromos permitiu observar a presença de bandas CMA⁺ maiores em algumas regiões terminais dos cromossomos e, menos frequentemente, nas regiões proximais e intersticiais. Além disso, diversas bandas CMA⁺ menores ocorreram, mas nem sempre foram visualizadas. A maior fração de heterocromatina apareceu associada à região organizadora do nucléolo. Todas as espécies apresentaram um par de cromossomos satelitados, com os satélites fortemente marcados com o CMA, os quais corresponderam nos núcleos interfásicos a dois grandes blocos CMA⁺⁺. As constrições secundárias algumas vezes também coraram positivamente com o CMA, principalmente quando não se

encontravam muito distendidas. Na coloração com DAPI não foram observadas bandas positivas em nenhum dos materiais. O DAPI sempre corou os cromossomos uniformemente, exceto algumas regiões CMA⁺ maiores que apareceram negativamente coradas com o DAPI (Fig. 1B, F, J). Em várias células foi possível observar uma divisão do satélite em dois blocos de heterocromatina nucleolar, resultando no aparecimento de três ou quatro blocos de tamanho menor. Curiosamente, em alguns núcleos interfásicos, ou mesmo profásicos-metáfásicos, esses blocos não foram claramente identificados (veja, por exemplo, Fig. 3B). Isso provavelmente ocorreu porque os satélites encontravam-se descondensados ou, mais provavelmente, porque foram acidentalmente retirados da célula durante o esmagamento.

A heterocromatina não nucleolar foi reconhecida em três grupos de blocos distintos: como um bloco terminal maior que os demais, em três pares cromossômicos de tamanho médio a pequeno; intersticial ou proximalmente em um a três pares cromossômicos; e como blocos bem pequenos nos telômeros de quase todos os cromossomos. A intensidade desses blocos variou de célula para célula de uma mesma espécie, mas, no geral, observou-se uma maior quantidade de heterocromatina em *L. chmielewskii*, *L. hirsutum*, *L. parviflorum* e *L. pimpinellifolium* (Fig. 1A, C, D, E, G, H, I), uma quantidade um pouco menor em *L. chilense*, *L. esculentum* e *L. pennelli* (Fig. 2A, B, C) e uma quantidade ainda menor em *L. peruvianum* e *L. cheesmani* (Fig. 2D, E, F). Em *L. cheesmani* que apresentou a mais baixa quantidade de heterocromatina, mesmo os três pares de blocos terminais maiores apareceram fracamente corados (Fig. 2F). Os blocos intersticiais ou proximais (geralmente foi difícil identificar a posição do centrômero) foram mais brilhantes em *L. chmielewskii*. *Lycopersicon pennelli* destacou-se das outras espécies por apresentar um bloco relativamente grande de heterocromatina no braço curto de um par cromossômico (Fig. 2C). Por outro lado, *L. chmielewskii* diferiu das demais pela distribuição preferencial das bandas CMA⁺ nas regiões proximais e intersticiais dos cromossomos, com poucas bandas localizadas nas regiões terminais (Fig. 1D).

Nas oito cultivares de *L. esculentum* analisadas, foram observadas pequenas variações no número e localização de bandas CMA⁺, principalmente relacionadas às bandas menores e mais instáveis. Esta variação pode ter sido devida às limitações da técnica utilizada ou ao grau variável de condensação cromossômica. Todas as cultivares apresentaram bandas CMA⁺ pequenas em um ou ambos os telômeros de todos os

cromossomos e um par de satélites grandes, intensamente brilhantes com CMA, frequentemente encontrados separados do restante do cromossomo (Figs. 3A, C, F, G, H). Em todas as cultivares foram reconhecidos três pares cromossômicos de tamanho médio a pequeno com bandas terminais ou subterminais mais fortes e o maior par de cromossomos (par 1) com uma banda terminal e uma outra intersticial próxima a terminal. Esse último par não foi reconhecido em todas as células, aparentemente porque quando o espaço entre as duas bandas estava encurtado elas apareceram como uma só banda (Fig. 3E). Além do par 1, foram facilmente reconhecidos o par cromossômico 2, que contém a região organizadora do nucléolo, e o par 12, o menor do complemento, com uma banda grande localizada na região terminal ou subterminal do braço curto.

A técnica de bandeamento C utilizada foi muito eficaz na coloração diferencial da heterocromatina do satélite mas nem sempre produziu bons resultados em relação às demais frações da heterocromatina. Nas três cultivares analisadas, IPA-5, IPA-6 e Hawaii 7997 (Fig. 4A,B,C), os resultados pareceram similares aos obtidos com a coloração CMA. Foi observado uma maior frequência de bandas C nas regiões terminais dos cromossomos e, em menor quantidade, nas regiões proximais e intersticiais. Os satélites foram fortemente marcados, tanto nas metáfases quanto nas prófases, e nas intérfases foram vistos como grandes blocos corados, frequentemente associados à região do nucléolo.

DISCUSSÃO

A análise das oito cultivares de *L. esculentum* com os fluorocromos CMA/DAPI revelou um padrão de heterocromatina constituído por dois tipos distintos: a heterocromatina nucleolar, restrita a um bloco grande e muito brilhante com o CMA e que corresponde ao satélite, e a heterocromatina não nucleolar, formada por blocos CMA⁺ menores, localizados principalmente nos telômeros. A heterocromatina nucleolar ocupou todo o satélite o qual reagiu uniformemente brilhante com o CMA e negativo com o DAPI, indicando que ele é inteiramente heterocromático. Em várias outras espécies com satélites grandes, como o de tomate, a parte distal do satélite é eucromática (veja por exemplo, Moscone *et al.*, 1996). Em *Lycopersicon*, o satélite foi observado sempre no braço curto do cromossomo 2, em acordo com o reportado por alguns outros autores (Rick e Butler, 1956; Ramanna e Prakken, 1967; Andras *et al.*, 2000). A posição do DNAr 45S foi também

mapeada por polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) na posição terminal do cromossomo 2 (Vallejos *et al.*, 1986). Lapitan *et al.* (1989) não conseguiram definir se após a hibridização *in situ* com o DNAr 45S todo o braço curto do cromossomo 2 era marcado ou apenas a maior parte dele, uma vez que na marcação com a hibridização *in situ* a região marcada tende a parecer maior do que ela realmente é. Um efeito semelhante de hiperdimensionamento da região marcada ocorre também com o bandeamento C e o CMA. Contudo, na análise de células duplamente coradas com CMA/DAPI foi possível visualizar com o filtro para DAPI uma região eucromática imediatamente adjacente ao bloco CMA⁺.

Lesley e Lesley (1935) haviam observado que os satélites de duas cultivares de *L. esculentum* eram maiores que os *L. pimpinellifolium* e dois outros acessos silvestres. Esses autores reportaram também que essa diferença de tamanho se conserva em híbridos e que não afeta o fenótipo das plantas. Contudo, no presente trabalho foram observadas variações no tamanho dos satélites tanto dentro de *L. esculentum* quanto entre as espécies silvestres (ver também, Melo *et al.*, em preparação). Banks (1984) contou $2n=26$ em 18 cultivares de tomate e apenas na cultivar híbrida “Sunny” encontrou $2n=25$. Esses resultados se devem certamente à dificuldade de distinguir os satélites dos demais cromossomos e indicam também que a maioria das cultivares tem satélites grandes.

O bandeamento C de cultivares de tomate mostrou resultados semelhantes aos das bandas CMA, sugerindo que ao menos a maior parte da heterocromatina dessa espécie seja rica em GC. O fato de que a heterocromatina nucleolar foi mais facilmente revelada com a técnica de bandeamento C utilizada do que a heterocromatina não nucleolar se deve provavelmente a que se tratem de tipos diferentes de heterocromatina ricas em GC (ver Guerra, 2000). Esse padrão de bandas, formado principalmente por pequenos blocos teloméricos, contraria a observação de alguns autores de que a heterocromatina em tomate estaria concentrada na região centromérica e constituiria mais de 75% da extensão cromossômica total (Ramanna e Prakken, 1967; Stack, 1984; Peterson *et al.*, 1996). Provavelmente o que esses autores referiram como heterocromatina foi na realidade a região proximal precocemente condensada que pode ser vista com coloração convencional em cromossomos de tomate (Melo *et al.*, em preparação). Guerra (1988) observou em espécies de *Costus* que apenas uma pequena fração da região heteropicnótica proximal correspondia a bandas heterocromáticas positivas para bandeamento C ou coloração CMA/DAPI.

Portanto, é mais prudente considerar os dados anteriores que relacionam a heterocromatina de *Lycopersicon* com outros parâmetros citológicos, como a espessura do complexo sinaptonêmico ou a distribuição dos quiasmas (ver Quiros, 1991; Stack, 1984; Peterson *et al.*, 1996), como sendo associadas às regiões heteropicnóticas.

Ganal *et al.* (1988) encontraram quatro classes principais de DNA satélite em tomate. A mais abundante delas, a *TGRI*, está formada por uma sequência de 162 pb repetidas 77.000 vezes e correspondendo a 1,75% do genoma. Essa sequência tem uma distribuição muito semelhante à da heterocromatina reportada neste trabalho e, segundo Schweizer *et al.* (1988), um conteúdo de GC de 46-48%. Como a cromomicina A cora preferencialmente o DNA rico em GC (Schweizer, 1976) é de se esperar que o padrão de bandas com *TGRI* seja semelhante ao de bandas CMA. A segunda maior classe de DNA repetitivo foi o DNAr 45S que correspondeu a 4,5% do genoma de tomate, portanto quase três vezes o conteúdo de *TGRI*. Essa disparidade entre esses percentuais parece incompatível com as quantidades de heterocromatina nucleolar e não nucleolar encontradas, que foi aparentemente maior na região não-nucleolar. Essa diferença pode ser devida em parte, à existência de sítios menores de DNAr, não localizados por Ganal *et al.* (1988, 1989) mas reportado por Xu e Earle (1994; 1996), e em parte ao pequeno tamanho das bandas *TGRI*. Ganal *et al.* (1989) concluíram que o tamanho das bandas *TGRI* variou de 650 kb a 25 kb, o que atingiria o limite inferior de detecção com hibridização *in situ*. Certamente, algumas dessas bandas menores devem estar abaixo do tamanho mínimo para reconhecimento com CMA. Além disso, Chilton (1975), utilizando gradiente de densidade com cloreto de cério, encontrou uma menor diferença entre esses satélites (2,6% para o DNAr e 2,0% para o restante). As duas outras frações (*TGRII* e *TGRIII*) parecem ter uma distribuição dispersa no genoma, embora *TGRIII* forme bandas proximais em alguns cromossomos (Ganal *et al.*, 1988, 1989).

Embora os padrões de bandas CMA e *TGRI* sejam muito semelhantes, há algumas diferenças importantes. A primeira delas é com relação ao cromossomo 1 que apresenta uma banda CMA⁺ intersticial ou proximal não localizada com *TGRI*. O cariograma apresentado por Ganal *et al.* (1988) mostra um sítio intersticial no braço curto do par 1 que hibridizou com *TGRIII* mas os autores não comentam sobre esse sítio. O único outro cromossomo do cariograma desses autores que apresenta uma banda com uma posição similar a esta é o par 3, situado anteriormente como o par 4 (Ganal *et al.*, 1988). Essa banda não foi

identificada com o CMA e, portanto, poderia ser o mesmo par, embora a diferença de tamanho entre o par 1 e o 3 ou 4 seja bem clara. A segunda discrepância é quanto aos três pares de bandas CMA⁺ maiores, que são observados facilmente em quase todas as células. Pelo menos dois desses pares estão entre os menores e ao menos o menor deles não possui banda no telômero oposto. Nos kariogramas de Ganai *et al.* (1988, 1989) os cinco pares menores apresentam bandas nos dois telômeros de tamanhos aparentemente idênticos. A razão para essa diferença não está clara, uma vez que a sequência é a mesma em todos os cromossomos e apenas os cromossomos 1, 2 e 7 não apresentam bandas em ambos os telômeros.

A sequência TGRI foi também encontrada em outras espécies de *Lycopersicon* e ao menos em uma espécie de *Solanum*, *S. lycopersicoides*. Em outras espécies de *Solanum*, bem como em *Datura*, *Capsicum*, *Petunia* e *Nicotiana* ela parece estar ausente (Ganai *et al.*, 1988; Schweizer *et al.*, 1988). As sequências TGR II e III estão também presentes em outras espécies de *Lycopersicon*, embora muito menos representadas (4.200 e 2.100 repetições por genoma, respectivamente) e distribuídas principalmente de forma dispersa. Nos outros gêneros estudados elas são ausentes, exceto em algumas espécies de *Solanum* (Ganai *et al.*, 1988).

Portanto, como os padrões de bandas CMA das espécies de *Lycopersicon* são muito semelhantes, é possível que o padrão de bandas TGRI nas demais espécies seja semelhante ao de *L. esculentum*. Um estudo comparativo da distribuição do DNAr 5S e 45S em duas cultivares de tomate e quatro espécies silvestres de *Lycopersicon* mostrou que esses sítios são altamente conservados. Essa similaridade cariotípica, incluindo tamanho e morfologia cromossômica, padrão de bandas, distribuição dos sítios de DNAr e conservação das sequências satélites principais sugere que o genoma dessas espécies sofreram uma diversificação muito pequena, o que facilita a formação de híbridos interespecíficos entre elas (Quiros, 1991). Por outro lado, os padrões de bandas C conhecidos em alguns dos gêneros próximos a *Lycopersicon* são muito diferentes dos observados neste trabalho (Pijnacker e Ferwerda, 1984; Pringle e Murray, 1993; Moscone *et al.*, 1993), indicando que as mudanças na sequência satélite principal foram também acompanhadas pelo surgimento de novos padrões de distribuição da heterocromatina.

Agradecimentos — Os autores agradecem ao Prof. Dimas da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, Recife, BR, ao Dr. Leonardo Giordano do Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças, CNPH, Brasília, BR. e ao Dr. Charles Rick do *Tomato Genetics Resource Center* (TGRC), Califórnia, E.U.A., pelo fornecimento das sementes das espécies e cultivares utilizadas nessa pesquisa. Esse trabalho foi realizado com o apoio financeiro da FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERÊNCIAS

- Andras, S.C., Hartman, T.P.V., Alexander, J., McBride, R., Marshall, J.A., Power, J.B., Cocking, E.C. and Davey, M.R., 2000. — *Combined PI-DAPI staining (CPD) reveals NOR asymmetry and facilitates karyotyping of plant chromosomes*. *Chrom. Res.* 8: 387-391
- Banks, P. 1984. — *A new diploid chromosome number for tomato (*Lycopersicon esculentum*)?* *Can. J. Genet. Cytol.* 26: 636-639.
- Chilton, M.D. (1975). — *Ribosomal DNA in a nuclear satellite of tomato*. *Genetics* 81:469-483.
- Ganal, M.W., Lapitan, N.L.V. and Tanksley, S.D., 1988. — *A molecular and cytogenetic survey of major repeated DNA sequences in tomato (*Lycopersicon esculentum*)*. *Mol. Gen. Genet.* 213: 262-268.
- Ganal, M.W., Young, N.D. and Tanksley, S.D. 1989. — *Pulsed field gel electrophoresis and physical mapping of large DNA fragments in the Tm-2a region of chromosome 9 in tomato*. *Mol. Gen. Gen.* 215:395-400.
- Greilhuber, J., (1995). — *Chromosomes of the monocotyledons (General Aspects)*. In: P.J. Rudall, P.J. Cribb, D.F. Cutler & C.J. Humphries (Editors). *Monocotyledons: systematics and evolution*, pp. 379-414. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Guerra, M., 1988. — *Characterization of different types of condensed chromatin in Costus (*Zingiberaceae*)*. *Pl. Syst. Evol.* 158: 107-115.
- Guerra, M., Santos, K.G.B., Barros e Silva, A.E. and Ehrendorfer, F., 2000. — *Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - A case of parallel chromosomal evolution*. *Am. J. Bot.* 87: 735-747.

- Lapitan, N.L.V., Ganai, M.W. and Tanksley, S. D., 1989. — *Somatic chromosome karyotype of tomato based on in situ hybridization of the TGRI satellite repeat*. *Genome* 32: 992-998.
- Lesley, M.M. and Lesley, J.M., 1935. — *Heteromorphic A chromosomes of the tomato differing in satellite size*. *Genetics* 20: 568-580.
- Melo, M.B.S., Carvalheira, M.G.G. and Guerra, M. *Localização dos satélites e dos sítios de DNAr 5S e 45S em algumas espécies do gênero Lycopersicon* Mill. (em preparação).
- Moscone, E.A.; Lambrou, M.; Hunziker, A.T. and Ehrendorfer, F., 1993. — *Giemsa C-banded karyotypes in Capsicum (Solanaceae)*. *Pl. Syst. Evol.* 186: 213-229.
- Moscone, E.A., Lambrou, M. and Ehrendorfer, F., 1996. — *Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of Capsicum (Solanaceae)*. *Pl. Syst. Evol.* 202: 37-63.
- Moscone, E.A., Klein, F., Lambrou, M., Fuchs, J. and Schweizer, D., 1999. — *Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated Phaseolus species (Leguminosae)*. *Genome* 42: 1224-1233.
- Peterson, D.G., James Price, H. and Spencer Johnston, J., 1996. — *DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (Lycopersicon esculentum) pachytene chromosomes*. *Genomes* 39: 77-82.
- Peterson, D.G., Lapitan, N.L.V. and Stack, S. M., 1999. — *Localization of single and low-copy sequences on tomato synaptonemal complex spreads using fluorescence in situ hybridization (FISH)*. *Genetics* 152: 427-439.
- Pijnacker, L.P. and Ferwerda, M.A., 1984. — *Giemsa C-banding of potato chromosomes*. *Can. J. Genet Cytol* 26: 415-419.
- Pringle, G.J. and Murray, B.G., 1993. — *Karyotypes and C-banding patterns in species of Cyphomandra Mart. ex Sendtner (Solanaceae)*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 111: 331-342.
- Quiros, C.F., 1991. — *Lycopersicon cytogenetics*. In: Tsuchiya, T. & Gupta, P.K. *Genetics, Breeding, Evolution*, 2B: 119-139.
- Ramanna, M.S. and Prakken, R. 1967. — *Structure of and homology between pachytene and somatic metaphase chromosomes of the tomato*. *Genetica* 38: 115-133.
- Rick, C.M. and Butler, L., 1956. — *Cytogenetics of the tomato*. *Advances in Genetics* 8: 267-402.

- Rick, C.M., 1983. — *Tomato (Lycopersicon)*. pp. 147-165. In: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, Part B, Edited by S.D. Tanksley and T.J. Orton. Elsevier Nederland, Amsterdam.
- Schubert e Wobus 1985
- Schweizer, D. and Ambros, P.F., 1994. — *Chromosome Banding*. In: J.R. Gosden, ed., *Methods in Molecular Biology*, 29, Humana Press, p.p 97-112.
- Schweizer, D., 1976. — *Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI*. *Chromosoma* 58: 307-324.
- Schweizer, D., Ganai, M., Ninneman, H. and Hemleben, V. 1988. — *Species-specific DNA sequence for identification of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum acaule**. *Theor. Appl. Genet.* 75: 679-684.
- Schwarzacher, T., Ambros, P. and Schweizer, D., 1980. — *Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis*. *Pl. Syst. Evol.* 126: 107-148.
- Stack, S.M. and 1984. *Heterochromatin, the synaptonemal complex and crossing over*. *J. Cell. Sci.* 71: 159-176.
- Upadhyaya, M.D. and Majid, R., 1964. — *Somatic chromosome morphology in some *Lycopersicon* species*. *Indian Journal Genetics and Plant Breeding* 24: 244-251.
- Vallejos, C.E., Tanksley, S.D. and Bernatzky, R. 1986. Localization in tomato genome of DNA restriction fragments containing sequences homologous to the rRNA (45S), the major chlorophyll a/b binding polypeptide and the ribulose biphosphate carboxylase genes. *Genetics* 112: 93-105.
- Vosa, C.G., 1985. — *Chromosome banding in plants*. In: *Chromosome and Cell Genetics* (Sharma e Sharma, A., eds.). Gordon and Breach Science Publishers, London, pp.79-104.
- Xu, J. and Earle, E.D., 1994. — *Direct and sensitive fluorescence in situ hybridization of 45S rDNA on tomato chromosomes*. *Genome* 37: 1062-1065.
- Xu, J. and Earle, E.D., 1996. — *Direct FISH of 5S rDNA on tomato pachytene chromosomes places the gene at the heterochromatic knob immediately adjacent to the centromere of chromosome 1*. *Genome* 39: 216-221.
- Zhong, X., Fransz, P. F., Eden, J. W., Ramanna, M. S., Kammen, A., Zabel, P. and Hans de Jong, J., 1998. — *FISH studies reveal the molecular and chromosomal organization of individual telomere domains in tomato*. *The Plant Journal* 13: 507-517.

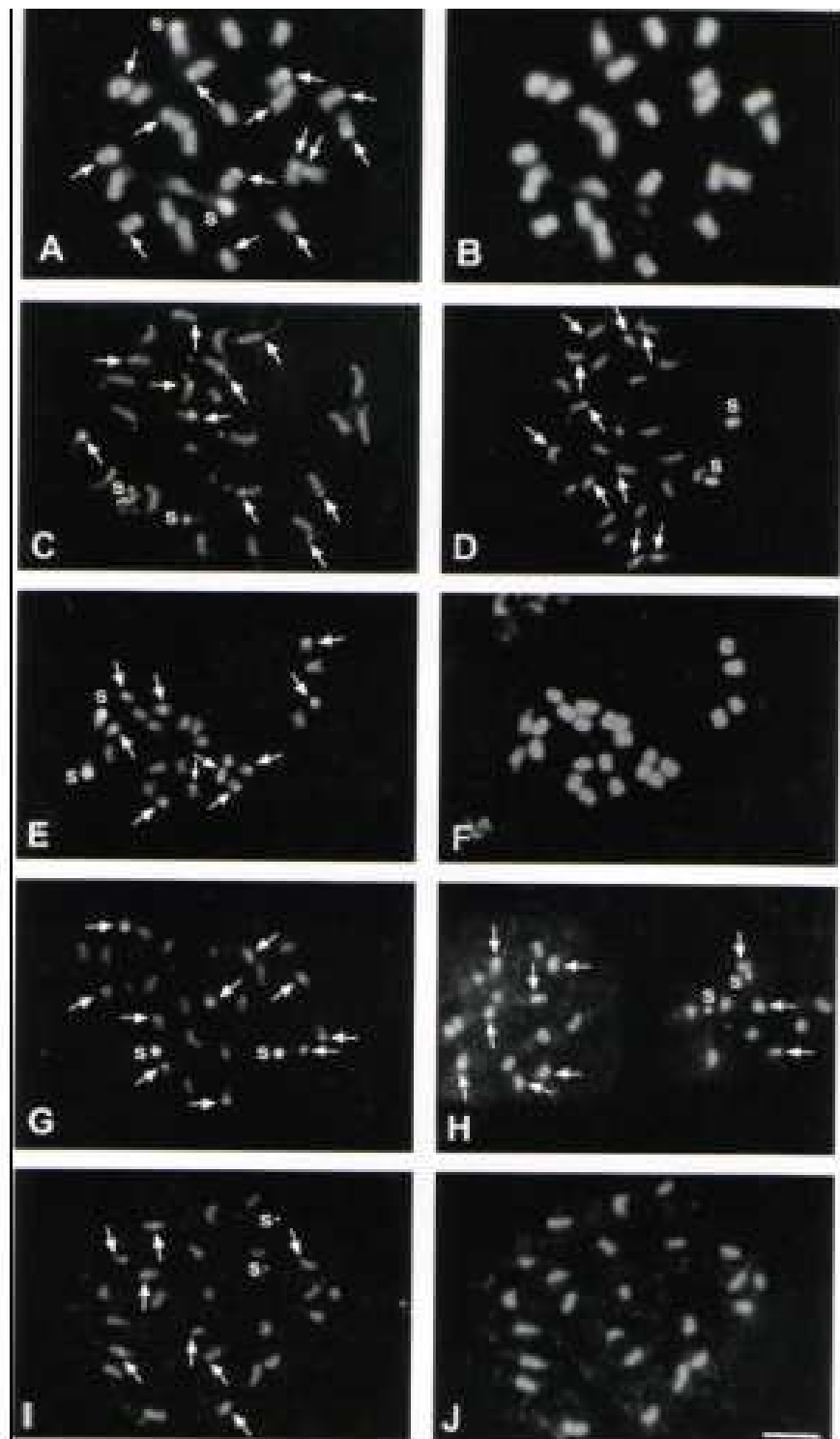
Zhong, X.B., Bodeau, J., Fransz, P.F., Williamson, V. M., van Kammen, A., Jong, J. H. and Zabel, P., 1999. — *FISH to meiotic pachytene chromosomes of tomato localtes the root-knot nematode resistance gene Mi-1 and the acid phosphatase gene Aps-1 near the junction of euchromatin and pericentromeric heterochromatin of chromosome arms 6S and 6L, respectively.* Theor. Appl. Genet. 98: 365-370.

Fig. 1 — Complemento cromossômico de quatro espécies do gênero *Lycopersicon* coradas com CMA e DAPI. A-C) *L. hirsutum*, D) *L. chmielewskii*, E-G) *L. pimpinellifolium* e H-J) *L. parviflorum*. Setas mostram as principais bandas CMA⁺ e letras s indicam satélites. Barra corresponde a 5 µm.

Fig. 2 — Complemento cromossômico de quatro espécies do gênero *Lycopersicon* coradas com CMA. A,B) *L. chilense*, C) *L. pennellii*, D,E) *L. peruvianum* e F) *L. cheesmani*. Setas mostram as principais bandas CMA⁺ e letras s indicam satélites. Barra corresponde a 5 µm.

Fig. 3 — Complemento cromossômico de oito cultivares de *L. esculentum* coradas com CMA. A) Caraíba, B) Hawaii 7997, C) Hawaii 7998, D) Ht-16, E) IPA-5, F) IPA-6, G) IPA-8 e H) Jumbo AG592. Setas mostram as principais bandas CMA⁺ e letras s indicam satélites. Barra corresponde a 5 µm.

Fig. 4 — Bandeamento C em três cultivares de *L. esculentum*. A) IPA-5, B) Hawaii 7997 e C) IPA-6. Setas mostram algumas bandas c, letras s indicam satélites. Núcleos interfásicos com grandes blocos fortemente marcados em A. Barra corresponde a 5 µm.



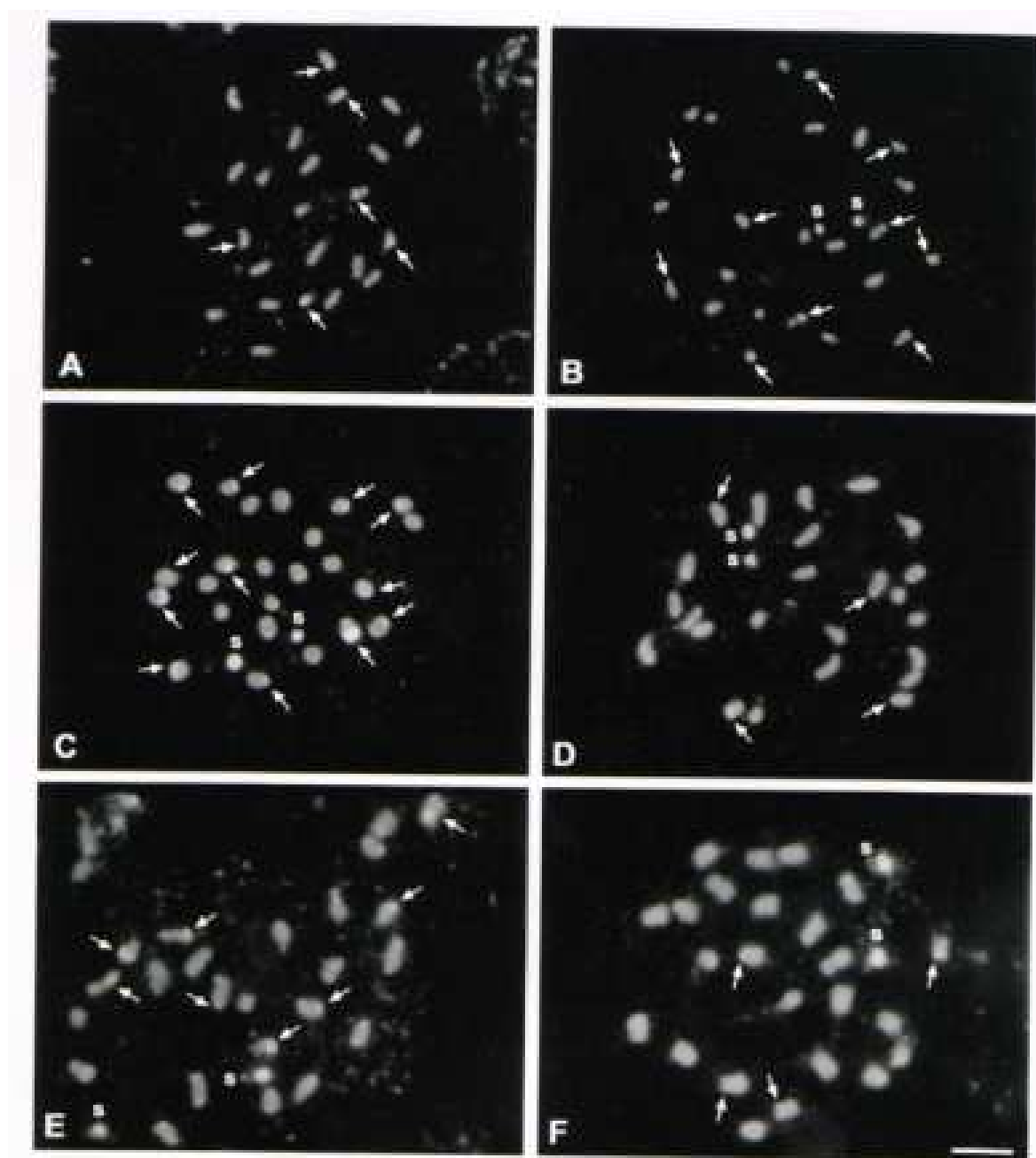


Figura 2. Complemento cromossômico de quatro espécies do gênero *Lycopersicon* coradas com CMA. A, B) *L. chilense*; C) *L. pennellii*; D, E) *L. peruvianum* e F) *L. cheesmanii*. Setas mostram as principais bandas CMA+ e letras s mostram satélites. Barra corresponde a 5 μ m.

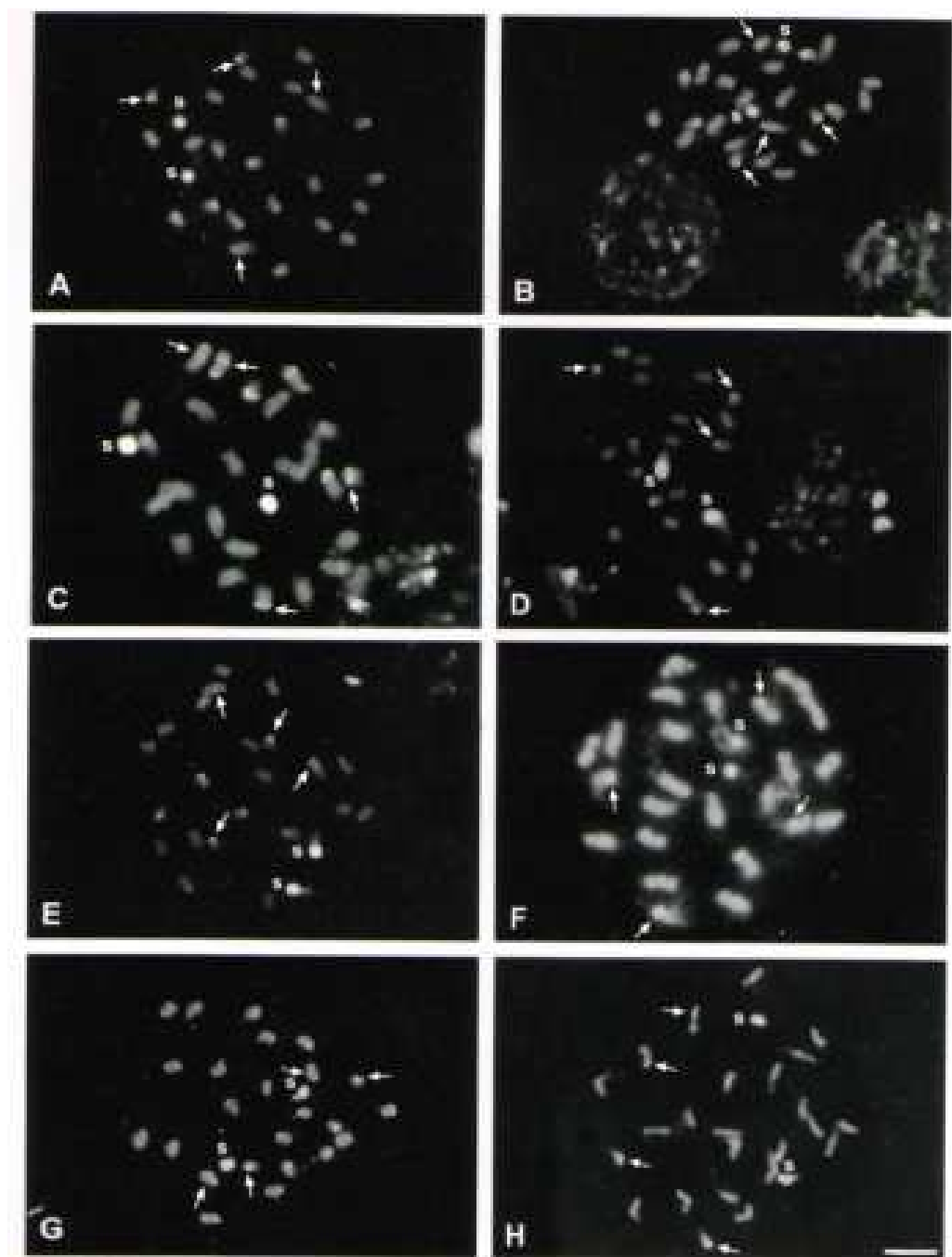
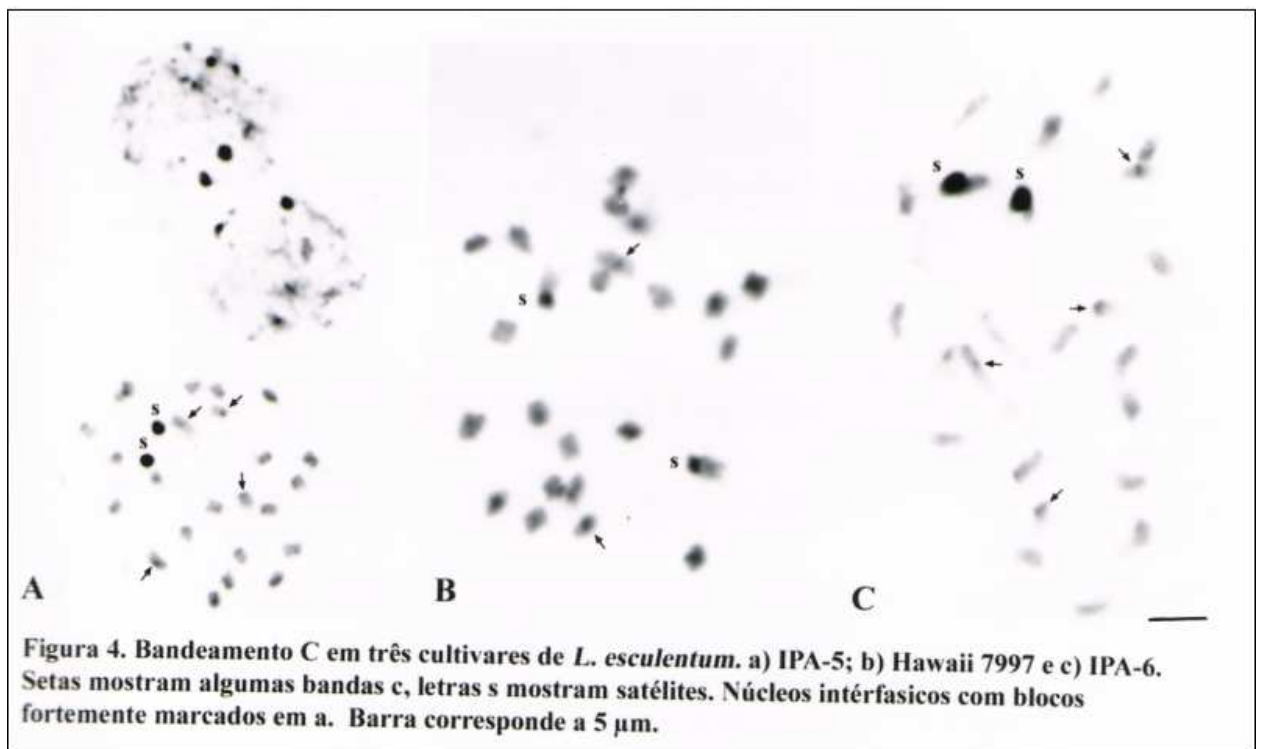


Figura 3. Complemento cromossômico de oito cultivares de *L. esculentum* coradas com CMA. A) Caraliba; B) Hawaii 7997; C) Hawaii 7998; D) H1-16; E) IPA-5; F) IPA-6; G) IPA-8 e H) Jumbo AG592. Setas mostram as principais bandas CMA+ e letras a mostram satélites. Barra corresponde a 5 μm.



5. CONCLUSÕES

- 1) A similaridade no número, tamanho e morfologia cromossômica indica que as espécies do gênero *Lycopersicon* são cariotipicamente muito estáveis.

- 2) O tamanho dos satélites parece ser a característica cariomorfológica mais variável nas cultivares de *L. esculentum* e possivelmente nas demais espécies do gênero. *Lycopersicon chilense* teve os menores satélites do gênero e *L. esculentum* cultivar Ht-16 teve os maiores. A maioria das cultivares de *L. esculentum* apresentaram satélites grandes.
- 3) A análise do padrão de bandas CMA⁺/DAPI⁻ revelou um padrão similar para todas as espécies e cultivares com poucos blocos grandes e muitos pequenos e de difícil visualização.
- 4) O uso da coloração diferencial com o CMA/DAPI e o bandejamento C foi altamente eficiente no reconhecimento dos satélites, tanto nas células metafásicas quanto nos núcleos interfásicos como grandes blocos positivamente corados. Os demais blocos apareceram fracamente corados com o bandejamento C.
- 5) A hibridização *in situ* com o DNAr 45S coincidiu com as regiões organizadoras do nucléolo coradas com o CMA nas espécies estudadas. Sítios extras e muito pequenos foram encontrados nos núcleos interfásicos, sugerindo que além do sítio maior que forma o satélite podem existir sítios menores não localizados em cromossomos profásicos ou metafásicos.
- 6) O DNAr 5S foi restrito a um único sítio em todos os acessos investigados, parecendo portanto ser muito estável.
- 7) De todos os parâmetros investigados o padrão de bandas CMA foi o mais promissor para diferenciar cariologicamente essas espécies.

6. RESUMO

Foram analisadas citogeneticamente 10 cultivares de *L. esculentum* e as oito espécies do gênero *Lycopersicon*. Todas as espécies apresentaram $2n=24$ cromossomos, exceto os acessos tetraplóides que apresentaram $2n=48$. Os cariótipos foram sempre visivelmente simétricos constituídos por cromossomos que variaram de 1,60 a 2,19 μm . O padrão de condensação profásico observado foi do tipo proximal e a estrutura do núcleo interfásico arreticulada a semi-reticulada. Todos os acessos diplóides apresentaram 1 par de cromossomos satelitados. A coloração com o fluorocromo CMA revelou que a maior fração da heterocromatina nessas espécies encontra-se associada com a região organizadora do nucléolo. Em todas as espécies foi possível reconhecer três tipos cromossômicos característicos, sendo agrupadas de acordo com o número de bandas CMA^+ mais evidentes. O DAPI sempre corou os cromossomos uniformemente, exceto algumas regiões CMA^+ que foram DAPI negativo. Com o bandejamento C foi possível observar resultados similares aos obtidos com a coloração com os fluorocromos CMA/DAPI, onde as cultivares analisadas apresentaram bandas heterocromáticas localizadas mais preferencialmente nas regiões terminais e subterminais dos cromossomos. Foram observadas variações no tamanho dos satélites entre as espécies. Entretanto, apenas em seis cultivares de *L. esculentum* esse dado foi quantificado. As cultivares Caraíba, Ht-16 e IPA-5 foram as que apresentaram os maiores satélites, enquanto os menores satélites foram observados nas cultivares Olho Roxo, Hawaii 7997 e 7998. Com a hibridização *in situ*, o número e a posição dos sítios ribossomais 5S e 45S foi similar entre as cinco espécies analisadas. O sítio de DNAr 5S foi sempre localizado na região proximal do maior cromossomo do complemento. Enquanto, o sítio de DNAr 45S foi localizado na região da constrição secundária e do satélite. Esses dados sugerem que apesar das pequenas diferenças existentes entre as espécies e cultivares o gênero *Lycopersicon* parece ser bem estável cariotipicamente.

7. ABSTRACT

Ten cultures of *L. esculentum* and the eight species of the *Lycopersicon* genus were cytogenetically analyzed. All species showed $2n=24$ chromosomes, except the tetraploid accesses, which exhibited $2n=48$. The karyotypes were always visibly symmetrical and constituted of chromosomes that varied from 1,60 to 2,19 μm . The prophase condensation standard observed was of the proximal type and the structure of the interphase nucleus, reticulated to semi-reticulated. All the diploid accesses had one pair of satellite chromosomes. The flurochrome CMA staining revealed that the largest fraction of the heterochromatin in these species is found to be associated with the nucleolus organizing regions. In all species it was possible to recognize three types of chromosome characteristics. However, these species were grouped according to the number of the most evident CMA⁺ bands. DAPI always stained the chromosomes in a uniformed manner, except in certain CMA⁺ regions that were DAPI. With the C-banding it was possible to observe similar results to those obtained with flurochrome CMA/DAPI staining, where the analyzed cultivated showed heterochromatic bands preferentially localized in the terminal and sub-terminal regions of the chromosomes. Variations were observed in the size of the satellites amongst all the species. With the *in situ* hybridization, the number and the position of the 5S and 45S ribosomal sites were similar within the five analyzed species. The 5S rDNA site was always localized in the proximal region of the largest chromosome of the complement. At the same time, 45S rDNA site was localized in the secondary constriction region and in the satellite. This data suggests that in spite of small existing differences between the species and the cultivated, the genus *Lycopersicon* appears to be karyotypically stable.

8. ANEXOS

CARYOLOGIA

International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics

PUBLISHED IN ITALY BY THE UNIVERSITY OF FLORENCE

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

MANUSCRIPTS

Papers, as short and concise as possible, should be written in English. Correct language is the responsibility of the authors. Manuscripts must be typewritten, with wide margins, and double-spaced throughout; they should be submitted in duplicate (original and one photostatic copy). Literature Citations in the text should be preferably by author(s) and year. Where there are more than two authors, only the first should be named, followed by "et al.". The list of references should include only publications cited in the text. They should be arranged alphabetically and according to the following order: author's surname, name initials, year of publication, original title of the work, journal name, volume number, inclusive pages. A Summary, not exceeding 250 words, will be published at the beginning of each paper; it should contain no discursive matter or references. Manuscripts shall be submitted by the Editor, for acceptance, to two members of the Editorial Advisory Board.

TITLE PAGE

This should contain (a) the full title of the paper, (b) authors listed in the order in which they are to appear at the head of the printed article, (c) affiliation and address for each author, (d)

telephone number, fax number and electronic mail address of the author responsible for correspondence and (d) a short running title.

ABSTRACT

The abstract is of great importance as it may be reproduced elsewhere and is all that many may see of your work. The summary, not exceeding 250 words, will be published at the beginning of each paper; it should contain no discursive matter or references. The abstract should be followed by 5 (max 7) key words, identifying the subject matter for retrieval systems.

REFERENCE

Literature citations in the text should be in chronological order. Where there are more than two authors, only the first should be named, followed by "et al." The list of references should include only publications cited in the text. In the list of references, titles of periodicals must be given in full, not abbreviated. The references should be arranged alphabetically and according to the following order: author's surname, name initials, year of publication, original title of the work, journal name, volume number, inclusive pages. References should conform as exactly as possible to one of these styles: LEVAN A., FREDGA K. and SANDBERG A.A., 1964 - Nomenclature for centromeric position on chromosomes *Hereditas*, 52: 201-220. STUESSY T.F., 1990 - Plant taxonomy. Columbia University Press, New York, Oxford. GREILHUBER J., 1984 - Chromosomal evidence in taxonomy. In: V.H. Heywood and D.M. Moore (Eds), "Current concepts in plant taxonomy", *Systematic Association* n. 25, p. 157-180. Academic Press, London. Other citations such as papers 'in press' may appear on the list but not papers 'submitted' or 'in preparation'. A personal communication may be cited in the text but not in the reference list. Tables - Keep Tables as simple as possible and avoid vertical rules. Data matrices and complex tables should be submitted on high quality paper in a form suitable for photographic reproduction.

TABLE

Keep Tables as simple as possible and avoid vertical rules. Data matrices and complex tables should be submitted on high quality paper in a form suitable for photographic reproduction.

ILLUSTRATIONS

Two sets of figures mounted on white illustration board must be submitted as sharp, glossy, high-quality photographic prints. Each figure or group of figures should be planned to fit, after appropriate reduction, into the area of either one or two columns of text. The dimension of the printed page (160 x 222 mm) should be kept in mind when preparing the figures for publication. The maximum finished size of a one-column illustration is 76 x 222 mm and that of a two-column illustration, corresponding to the whole printed page, is 160 x 222 mm. The figures must be numbered consecutively, and each one must be referred to in the text and the combined figure and legend must be self-explanatory. Only essential labelling should be used, with detailed information given in the caption. Each illustration must be identified by the figure number and the authors' names on the back of the page or in the left-hand corner, well away from the illustration area. The reviewers are invited, in confidence, to recommend on the suitability of the submission and provide comments for the authors. They are asked to make one of four recommendations: accept, accept after minor revision, accept after major revision, do not accept. The decision to accept a paper is made primarily on scientific content. The decision to ask for revisions is made in light of the reviewers' comments and recommendations, and after evaluation by the Associate Editor. The final decision on acceptance or rejection is made by the Editor on the advice of the Associate Editor. This decision, together with any relevant reasons, will be communicated by e-mail, fax or letter from the Editor to the corresponding author. One copy of the original submission is retained by the Editor. Do not send disks with the original submission. On acceptance, authors must return their manuscript with a 3.5" high density PC-compatible diskettes containing only the text. Documents should preferably be in Word for Windows format.

GALLERY PROOFS

One set of galley proofs and a reprint order form are sent to corresponding author. Galley proofs must be checked very carefully and must be returned within one week from receipt. The proof stage is not the time to make extensive corrections, additions, or deletions.

REPRINTS

To order reprints, the completed order form must be returned with payment together with the corrected proofs. The Journal does not provide free reprints and they may be obtained at cost specified in the order form.

SUBSCRIPTIONS

The subscription price of volume 54, 2001, is Lit. 280,000 in Italy and abroad (by air mail Lit. 300,000), inclusive of postage and packing.

Papers, subscriptions, correspondence with reference to editorial matters should be addressed to: Dr Massimo Bigazzi, "Caryologia ", c/o Dipartimento di Biologia vegetale, Via La Pira, 450121 Firenze, Italia - Tel.: +39 55 2756215; Fax: +39 55 2757373; e-mail: caryo@unifi.it

