

**ISANE VERA KARSBURG**

**MORFOLOGIA FLORAL, CITOMETRIA DE FLUXO E  
CITOGENÉTICA DE *Lycopersicon esculentum* Mill. ACESSO BGH**

**160**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

**ISANE VERA KARSBURG**

**MORFOLOGIA FLORAL, CITOMETRIA DE FLUXO E  
CITOGENÉTICA DE *Lycopersicon esculentum* Mill. ACESSO BGH**

**160**

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

APROVADA: 09 de junho de 2006.

---

Prof<sup>a</sup> Silvia das Graças Pompolo  
(Co-Orientadora)

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Co-Orientador)

---

Dra. Eveline Teixeira Caixeta

---

Prof. Edgard Augusto de Toledo Picoli

---

Prof. Carlos Roberto de Carvalho  
(Orientador)

*As dificuldades do ontem, a paciência e o respeito do hoje, a conquista do amanhã  
(Autor desconhecido).*

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Departamento de Biologia Geral, pela infra-estrutura oferecida.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Carlos Roberto de Carvalho, pela orientação, confiança, amizade, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

Aos Professores conselheiros Silvia das Graças Pompolo e Wagner Campos Otoni, pela colaboração, pelos conselhos e ensinamentos.

À Doutora Eveline Caixeta, pelos ensinamentos, pela colaboração e pelos conselhos.

Ao Professor Edgard Augusto de Toledo Picoli, pelas contribuições, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao Professor Derly José Henriques da Silva, pelos ensinamentos, conselhos e pela amizade.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pelos valiosos ensinamentos.

Aos meus colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela amizade e pelo coleguismo.

Aos funcionários Zé Chico, Americano e Pintinho, pelos auxílios técnicos.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal Milene, Fernanda, Wellington, Carolina, Isabela e Maria Andréia, pelas trocas de experiências, pela amizade, pelos momentos de brincadeiras e pela seriedade.

A todos os meus amigos pelo Brasil a fora, por, de uma ou de outra forma, terem contribuído para a minha formação, persistência, paciência e determinação.

Aos meus pais, pelo constante apoio, mesmo quando a dor e a saudade falavam mais alto.

Ao meu amigo, namorado e companheiro Jean, que soube entender todas as fases deste crescimento, com muita paciência, amor, conselhos e apoio

sempre, por tudo; e aos seus familiares, por sempre me ampararem com muito carinho e respeito.

## **BIOGRAFIA**

ISANE VERA KARSBURG, filha de Irio Nelson Karsburg e Elora Inalda Karsburg, nasceu em Restinga Seca, Rio Grande do Sul, no dia 15 de julho de 1976.

Em 1996, ingressou na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, RS, graduando-se, em fevereiro de 2000, como Licenciada em Ciências Biológicas.

Durante o período de graduação, foi bolsista do PIBIC/CNPq, FIP/UFSM e BIC/FAPERGS do Departamento de Biologia Vegetal, onde desenvolveu atividades de pesquisa em Citogenética Vegetal.

Em março de 2000, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de mestrado, em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal do Centro de Ciências Rurais da UFSM, submetendo-se à defesa da dissertação em março de 2002.

Em abril de 2002, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de doutorado, em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa de tese em junho de 2006.

# CONTEÚDO

	PÁGINA
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Aspectos gerais do gênero <i>Lycopersicon</i> .....	1
1.2. Caracterização do meristema floral.....	3
1.3. Quantificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo.....	5
1.4. Aspectos citogenéticos.....	7
2. OBJETIVOS GERAIS.....	10
CAPÍTULO I – Análise dos botões florais de <i>L. esculentum</i> Mill. acesso BGH 160.....	11
RESUMO.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1. Material vegetal.....	14
2.2. Métodos.....	14
2.2.1. Avaliação morfológica dos botões florais.....	14
2.2.2. Citometria de fluxo em verticilos florais.....	14
2.2.3. Microscopia nas suspensões nucleares das diferentes pétalas da planta anormal.....	15
2.2.4. Germinação dos grãos de pólen.....	15
2.2.5. Microscopia na avaliação da germinação do tubo polínico.....	15
3. RESULTADOS.....	16
4. DISCUSSÃO.....	22
CAPÍTULO II – Quantificação do conteúdo de DNA nuclear e avaliação da ploidia em diferentes estágios de desenvolvimento de verticilos florais em plantas de <i>L. esculentum</i> Mill. acesso BGH 160.....	25
RESUMO.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1. Material vegetal.....	28

2.2. Citometria de fluxo.....	28
2.2.1. Quantificação do conteúdo de DNA do nuclear.....	28
2.2.2. Avaliação dos níveis de ploidia em folíolos.....	29
2.2.3. Análise da área foliar.....	30
2.2.4. Avaliação dos níveis de ploidia em pétalas e sépalas.....	30
2.2.5. Processamento no citômetro de fluxo.....	32
2.2.6. Análise estatística.....	32
3. RESULTADOS.....	33
4. DISCUSSÃO.....	40
CAPÍTULO III – Caracterização morfológica dos cromossomos de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. acesso BGH 160.....	44
RESUMO.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1. Material vegetal.....	49
2.2. Obtenção, tratamento e fixação dos meristemas radiculares.....	49
2.3. Maceração enzimática.....	50
2.4. Preparação das lâminas.....	50
2.5. Bandeamento Ag-NOR.....	50
2.6. Análise do cariótipo.....	51
3. RESULTADOS.....	52
4. DISCUSSÃO.....	56
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	59
6. REFERÊNCIAS.....	60

## RESUMO

KARSBURG, Isane Vera, D. S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2006.  
**Morfologia floral, citometria de fluxo e citogenética em *Lycopersicon esculentum* Mill. acesso BGH 160.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.  
Co-Orientadores: Silvia das Graças Pompolo e Wagner Campos Otoni.

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é a segunda olerícola mais cultivada no mundo. Na América Latina, seu maior produtor é o Brasil, com atualmente uma área total de 58,5 mil hectares e produção de 3,3 mil toneladas. Parte do aumento da produção tem sido atribuída aos investimentos em programas de melhoramento e às inovações geradas pelos processos biotecnológicos. Nesse contexto, estudos citogenéticos e citométricos podem contribuir com dados citológicos e genéticos para os programas de melhoramento e ser estendidos às outras áreas de conhecimento. Atentando para as controvérsias existentes na literatura e a necessidade de ampliar os conhecimentos das características do genoma em questão, o trabalho teve três objetivos principais em *L. esculentum* acesso BGH 160: (i) Caracterização das diferenças morfológicas dos botões florais, (ii) Quantificação do conteúdo de DNA e avaliação da ploidia foliar e das peças florais em diferentes estágios de desenvolvimento e (iii) Reavaliação citogenética do cariótipo. No decorrer das avaliações e caracterizações morfológicas realizadas em *L. esculentum* acesso BGH 160, foram observadas plantas normais e anormais quanto à estruturação dos botões florais em que as anormais apresentaram modificações na morfologia e constituição floral, formação e estruturação dos frutos e ausência de sementes. Entretanto, apenas pelo comportamento fenotípico do acesso em questão não foi possível identificar a provável causa da alteração na planta anormal. Levantaram-se as hipóteses de que alterações cromossômicas estruturais ou numéricas poderiam explicar essa anormalidade. Pela quantificação do conteúdo de DNA nuclear foram verificadas diferenças, as plantas normais apresentaram  $2C = 1,96$  pg e as anormais,  $2C = 1,87$  pg de DNA. Na análise da ploidia em sete folíolos terminais das plantas normais, foi verificada a variação de  $2C$  e  $4C$  a  $8C$  dos núcleos, de maneira crescente em relação ao estágio de desenvolvimento fisiológico. Quando relacionada à variação da ploidia com a área foliar, foi observado correlação entre as duas variáveis nas plantas normais com relação

aos núcleos 4C. Porém, nas plantas anormais, a área foliar não correspondeu à variação da ploidia, tanto que a correlação entre a ploidia e a área foliar foi negativa nos núcleos 8C. Considerando-se que o comportamento diferencial das plantas anormais poderia estar relacionado com a diferença do conteúdo de DNA, este estudo enfatizou as avaliações citogenéticas entre esses dois tipos de plantas. O complemento da planta normal apresentou  $2n=24$  cromossomos, com um par de cromossomos (6) metacêntrico e os demais submetacêntricos. O bandejamento Ag-NOR em *L. esculentum* var. Stupnické evidenciou, na porção mediana do cromossomo 1, a NOR ativa, além da identificação de uma deleção em *L. esculentum* acesso BGH 160 anormal presente em um dos homólogos do par 1. Concluiu-se que a deleção provavelmente seja responsável pelas alterações morfológicas dos botões florais e dos frutos. Os resultados deste trabalho representam uma contribuição para um melhor entendimento do genoma e citogenética do tomateiro.

## ABSTRACT

KARSBURG, Isane Vera, D. S., Universidade Federal de Viçosa, June 2006.  
**Floral morphology, flow cytometry and cytogenetic in *Lycopersicon esculentum* Mill. access BGH 160.** Adviser: Carlos Roberto de Carvalho.  
Co-Advisers: Silvia das Graças Pompolo and Wagner Campos Otoni.

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is the second most cultivated vegetable in the world. In Latin America the largest producer is Brazil, with a total area of 58,5 thousand hectares and production of 3,3 thousand tons. Part of the increase in production has been attributed to investments in breeding programs and to innovations generated by biotechnical processes. In this context cytogenetical and cytometry studies can contribute to breeding programs. Considering the existent controversies in the literature and the need of expanding the knowledge about the characteristics of this genome, the present work had three main objectives in *L. esculentum* access BGH 160: (i) characterization of the morphological differences in floral buttons, (ii) quantification of the DNA content and ploidy evaluation in leaves and floral pieces at different stages of development and (iii) cytogenetic reevaluation of the karyotype. During the evaluation and morphological characterization accomplished in *L. esculentum* access BGH 160, plants were observed with normal and abnormal behavior concerning the structure of the floral buttons. The abnormal plants presented modifications in morphology and floral constitution, fruit formation and structure, and absence of seeds. However, the phenotypic behavior alone was not sufficient to identify the possible cause of alteration in the abnormal plants in this access. A hypothesis was postulated in that structural or numerical alterations in the chromosome could explain the abnormality. Differences were verified through quantification of the nuclear DNA content, with normal plants presenting  $2C = 1,96$  pg and abnormal plants presenting  $2C = 1,87$  pg of DNA. By the ploidy analysis in seven terminal leaf of the normal plants, at different developmental stages, ploidy variation of  $2C$ ,  $4C$  to  $8C$  was verified, increasing according to the stage of physiological development. When ploidy variation was related with the leaf area, correlation was observed between the two variables in the normal plants with nuclei  $4C$ . However, in the abnormal plants, the leaf area did not correspond to the ploidy variation, so much so that the correlation between the ploidy level and the leaf area was

negative for the nuclei 8C. Considering that the different behavior of the abnormal plants could be related with the difference on DNA content, this study concentrated on the cytogenetic evaluations between these two types of plants. The complement of the normal plant presented  $2n = 24$  chromosomes, with one pair (6) of chromosomes being metacentric, and all others submetacentric. The Ag-NOR banding in *L. esculentum* var. Stupnické evidenced the active NOR in the medium portion of chromosome 1, and identified a deletion in one of the homologues of pair 1, in the abnormal *L. esculentum* access BGH 160. It was concluded that a deletion is probably responsible for the morphologic alterations of the floral buttons and fruits.

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1. Aspectos gerais do gênero *Lycopersicon*

O tomateiro, *Lycopersicon esculentum* Mill., é a segunda hortaliça mais cultivada no mundo, superada apenas pela batata, *Solanum tuberosum* L. O gênero *Lycopersicon* é composto por nove espécies, originárias das regiões montanhosas dos Andes, no Peru, Equador e na Bolívia (MULLER, 1940; QUIROS, 1991; NUEZ et al., 2004).

Segundo Rick e Butler (1956), o gênero *Lycopersicon* é autógamo, eudicotiledôneo, possui espécies relacionadas quanto a sua morfologia, adaptação ambiental, aspectos anatômicos e relações de compatibilidade reprodutiva. O gênero *Lycopersicon* está subdividido em dois subgêneros:

- *Eulycopersicon*, correspondente às espécies *L. esculentum* Mill (tomate cultivado) e *L. pimpinelifolium* (Jusl.) Mill., que são anuais, com presença de brácteas, pseudoestípulas, flores em racemo e com frutos avermelhados quando maduros.

- *Eriopersicon*, na qual foram incluídas sete espécies: *L. cheesmanii* (Riley), *L. hirsutum* (Humb. & Bonpl.), *L. pennellii* (Corr.) D' Arcy, *L. chmielewskii* (Rick, Kes., Fob. & Halle), *L. parviflorum* (Rick, Kes., Fob. & Holle), *L. peruvianum* (L.) Mill. e *L. chilense* Dun, com muitas variedades. As espécies *L. cheesmanii* (Riley) e *L. peruvianum* (L.) Mill. exibem folhas e flores simples sem brácteas e pseudoestípulas. As demais possuem inflorescências bifurcadas com formas complexas, presença de brácteas, pseudoestípulas e frutos com solanina. Contudo, todas essas espécies apresentam os frutos quando maduros verde-arroxeados (MCARTHUR et al., 1947; JOLY, 1993).

As folhas do tomateiro (*L. esculentum*) são alternas, compostas de número ímpar de folíolos e cobertas com pêlos, e, em sua maioria, glandulares. As flores em cachos são pequenas e amarelas. As peças florais são dispostas de forma cíclica, heteroclamídeas. Quanto à posição relativa do gineceu, são hipóginas e bicarpelares. O cálice é dialisépalo, com cinco sépalas, e as pétalas são lanceoladas e largas. O androceu é isostêmone, isodínamo e epipétalo, com anteras coniventes com estilete terminal. O número de estames é 5, os quais são

soldados formando um cone. As anteras são curtas e largas. As flores são hermafroditas, e a reprodução ocorre por meio de autofecundação, sendo a frequência de alogamia muito baixa (RICK e BARTON, 1956).

O tomate é produzido e consumido ao natural ou industrializado em vários países (CHEN e ADACHI, 1995). Desde os anos de 1980, essa cultura tem se expandido, tanto em termos de área cultivada quanto em produtividade, em face das novas tecnologias e emprego de variedades melhoradas. Atualmente, apresenta uma área mundial plantada de 3 milhões de hectares e uma produtividade acima de 90 milhões de toneladas por ano. Na América Latina, o Brasil é o maior produtor de tomate, abrangendo, até o ano de 2004, uma área total de 58,5 mil hectares e produção de 3,3 mil toneladas (FAO, 2005). A maior parte da colheita (60%) destina-se ao consumo *in natura*, porém a produção do tomate para processamento vem crescendo, especialmente na região dos cerrados (FILGUEIRA, 2000). As principais regiões produtoras do tomate industrializado são o Centro-Oeste (Goiás), Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e Nordeste (Pernambuco e Bahia) (FNP CONSULTORIA e COMÉRCIO, 2005).

O melhoramento do tomateiro no Brasil teve grande avanços com a obtenção da cultivar Santa Cruz em meados da década de 1940. Esse híbrido possui várias características de interesse, elevada capacidade produtiva, versatilidade de adaptação a diferentes condições ambientais e resistência a alguns ataques parasitários, sendo esta última, em parte, consequência da casca dura do fruto (SILVA, 1993). Em decorrência disso, essa cultivar rapidamente adquiriu grande popularidade entre os agricultores, sendo difundida por todo o país (BRAZ, 1992). Desde então, a população original Santa Cruz vem passando por sucessivas seleções e hibridações (MELO, 1987).

Os conhecimentos citológicos e genéticos contribuem, nos mais variados aspectos, para os programas de melhoramento. Nesse âmbito, a citogenética vegetal tem contribuído por gerar informações acerca de aspectos cariológicos da espécie, possibilitando o estabelecimento de mapas físicos, auxiliando a produção e o estudo de organismos aneuplóides e poliplóides, identificando possíveis rearranjos cromossômicos estruturais e caracterizando os genomas em alopoliplóides (JAHIER et al., 1996; NASS et al., 2001).

## 1.2. Caracterização do meristema floral

Os meristemas vegetativos e reprodutivos podem ser distinguidos durante o ciclo de vida. Durante a fase inicial, a vegetativa, ocorre a formação dos meristemas apicais, folhas e brotos laterais. A transição do desenvolvimento vegetativo para o reprodutivo é marcada pelo aumento da frequência de divisões celulares dentro da zona central nos meristemas axilares do caule (COEN e MEYEROWITZ, 1991; JACK, 2004). As frequências das divisões são controladas pelos fatores ambientais e genéticos (ROSALES-MOLINERO et al., 1999).

No desenvolvimento floral estão envolvidos três tipos de genes, os genes de identidade de órgãos florais, que controlam diretamente a identidade floral (CAUSIER et al., 2005), os genes cadastrais, que atuam como reguladores espaciais dos genes de identidade de órgãos florais, definindo os limites da sua expressão e os genes de identidade de meristemas, que são necessários para a indução inicial dos genes de identificação de órgãos (BOWMAN e ESHED, 2000; CAUSIER et al., 2005).

Nas flores, os verticilos na camada mais externa do meristema dão origem às sépalas, na segunda camada originam as pétalas, na terceira as células tornam-se estames e na quarta originam os carpelos. Cada estrutura floral é determinada pela combinação de genes homeóticos funcionais (NAKAYAMA et al., 2005). Os genes homeóticos que controlam a identidade dos órgãos florais estão classificados em três classes principais, definindo diferentes atividades em *Arabidopsis*.

1. Atividade tipo A, codificada por *APETALA 1 (AP1)* e *APETALA 2 (AP2)*, controla a identidade dos órgãos no primeiro e segundo verticilos. A perda da atividade tipo A resulta na formação de carpelos, em vez de sépalas, no primeiro verticilo e nos estames, em vez de pétalas, no segundo.
2. A atividade tipo B, codificada por *APETALA 3 (AP3)* e *PISTILLATA1 (PI)*, controla a determinação dos órgãos no segundo e terceiro verticilos. A perda da atividade tipo B resulta na formação de sépalas, em vez de pétalas no segundo verticilo e de carpelos no lugar de estames no terceiro.
3. A atividade C, codificada pelo *AGAMOUS (AG)*, controla eventos no terceiro e quarto verticilos. A perda da atividade tipo C resulta na formação de pétalas e não

de estames no terceiro verticilo, bem como na formação de sépalas no quarto verticilo no lugar do carpelo (THEISSEN, 2001).

Os genes A e C interagem e podem influenciar a expressão do gene B (THEISSEN, 2001). Assim, as funções de A e C parecem ser antagonistas e estabelecem mutuamente domínios de ação exclusivos. O domínio de funcionamento de B é estabelecido independentemente das funções de A e C. O modelo ABC para especificação da identidade de órgãos prediz que há uma regulação espacial da atividade dos genes A, B e C em nível de RNA. Esse modelo tem sido atualizado, incluindo a classe D, que contém os genes específicos para a formação dos óvulos e a classe E, que é responsável pela expressão dos genes nas três camadas mais internas da flor e dos complexos de proteínas com os genes homeóticos, essenciais para a correta formação do órgão floral (JACK, 2001; THEISSEN, 2001; LOHMANN e WEIGEL, 2002).

Os genes de identidade de órgãos florais foram identificados por meio de mutações, as quais alteraram a identidade de órgãos florais de tal modo que alguns verticilos não são formados ou desenvolvem-se de forma epítipe (BOWMAN e ESHED, 2000). Muitos dos genes que determinam a identidade de órgãos florais são MADS Box, incluindo o *DEFICIENS*, *AG*, *PI* e *AP3* (JACK, 2001). Os genes MADS Box partilham uma seqüência de nucleotídeos conservada, que codificam fatores de transcrição contendo domínio MADS, o qual permite que esses transfatores se liguem ao DNA em seqüências específicas de nucleotídeos (SHEPARD e PURUGGANAN, 2002; DITTA et al., 2004).

Em *L. esculentum*, o gene MADS Box *TM5* quando não expresso altera a estruturação das peças florais, com a presença de formas ectópicas (PNUELI et al., 1994a). Outro exemplo de gene não expresso envolvido na alteração das peças florais é o gene *TAG1*, cuja expressão é necessária para o desenvolvimento de estames, carpelos e crescimento determinado do meristema floral (PNUELI et al., 1994b). Variações nas diferentes partes do tomateiro podem ser verificadas também na ausência da expressão do gene *LeT6/TKn2*. Esse gene influencia o desenvolvimento dos estames, folhas e órgãos reprodutivos carregando a mutação *CLAUSA: SHOOTYLEAF* no alelo recessivo. As plantas com essa mutação apresentam fusão do carpelo e formação de frutos com forma imbricada (AVIVI et al., 2000).

As anormalidades decorrentes nas flores de *Lycopersicon*, associadas às trocas de expressões dos genes, podem ser influenciadas, ainda, pela variação de temperatura. Isso foi observado nos genes MADS Box *TM4*, *TM5*, *TM6* e *TAG1* em presença de variações de temperatura de 25 a 7 °C. As plantas que não expressavam o gene *TM4* em combinação com a temperatura apresentaram botões florais menores em relação aos outros genes não expressos (LOZANO et al., 1998).

Características semelhantes na morfologia floral de *Lycopersicon* apresentadas anteriormente também foram observadas na mutação expressa no *locus cactiflora* obtida pela indução química, na qual os genes responsáveis pela alteração são o *ccf* (RICK, 1981). As variações morfológicas, além de serem causadas por variações dos genes homeóticos, podem também ser causados por perdas de segmentos dos cromossomos (SYBENGA, 1992). Além da morfologia das peças florais, a forma dos frutos também pode ser alterada pela quantidade de DNA do genoma da planta.

A deleção de segmentos no genoma em plantas tem sido descrita em vários híbridos de trigo e milho. Essas seqüências de genes perdidas por deleções, de acordo Gregory (2004), podem ser detectadas não somente pela hibridização *in situ*, mas ainda com outras técnicas, por exemplo a citometria de fluxo, que possibilita a quantificação do conteúdo de DNA. Mas também podem ser caracterizadas pela citogenética clássica que permite a diferenciação morfométrica dos cromossomos (NEAFSEY e PALUMBI, 2003).

### **1.3. Quantificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é uma ferramenta que analisa parâmetros ópticos de partículas coradas em suspensão (DOLEŽEL, 1997). É um método utilizado para estimar o conteúdo de DNA, mensurar níveis de ploidia, caracterizar híbridos somáticos e analisar o ciclo celular, que são de grande utilidade em diversas áreas da biotecnologia vegetal (YANPAISAN et al., 1999; DOLEŽEL e BARTOS, 2005).

Inicialmente, a citometria de fluxo foi empregada em estudos do genoma de mamíferos, principalmente na classificação quantitativa dos cromossomos mitóticos, detecção de anormalidades numéricas e estruturais associada a

aberrações e doenças humanas (DOLEŽEL et al., 1992; YANPAISAN et al., 1999; SHIBA e MII, 2005). As técnicas desenvolvidas para animais e humanos foram adaptadas para a aplicação em células vegetais, permitindo rápida análise do conteúdo de DNA, cariotipagem de fluxo, avaliação da atividade mitótica, dimensão do acúmulo de metabólitos secundários e seleção de cromossomos ou organelas de interesse (YAPAIAN et al., 1999; NOIROT et al., 2000).

Segundo Johnston et al. (1999), para estimar o conteúdo de DNA de uma espécie é necessário o uso de núcleos de animais ou de plantas como padrões internos ou externos. O uso do padrão interno minimiza o erro de análise, pelo fato de amostras serem processadas em conjunto com o padrão. Conseqüentemente, os picos entre as posições do padrão e da espécie são constantes, reduzindo o erro nas médias comparativas entre os picos da amplificação linear na quantificação do DNA em uma única amostra entre o padrão e a espécie em questão (DICKSON et al., 1992; DIAMOND e DE MAGGIO, 2000). Com o emprego do padrão externo, as análises são realizadas separadamente, e os estudos comparativos entre eles são conduzidos após avaliações. Com isso, podem ocorrer erros na quantificação do conteúdo de DNA, pelo fato de terem sido preparados isoladamente, levando-se em consideração a forma e o tempo de preparo do material (DICKSON et al., 1992; BENNETT e LEITCH, 2005).

Segundo Doležel (1997), os principais fluorocromos usados na estimativa do conteúdo de DNA são: iodeto de propídio (IP) ou brometo de etídio, que se intercalam na dupla fita de DNA, Hoechst 33258 e DAPI, que coram preferencialmente regiões ricas em AT do DNA, em contraste com mitramicina e cromomicina A3, que coram preferencialmente porções cromossômicas ricas em GC. A escolha do melhor fluorocromo depende do tipo de análise (DOLEŽEL, 1991). A preferência pela utilização do DAPI está relacionada com a obtenção de histogramas com adequada resolução dos picos. A diferenciação entre as bases com o uso do DAPI é importante por diferenciar os genótipos, principalmente em nível de ploidia e quantificação do genoma (DOLEŽEL et al., 1992; DIAMOND e DE MAGGIO, 2000). Os intercalantes entre os pares de bases como o IP têm sido utilizados para a obtenção de dados mais concisos, com menores erros na determinação do conteúdo de DNA de um genoma (DOLEŽEL et al., 1998; DIAMOND e DE MAGGIO, 2000).

Além dos fluorocromos, outra questão importante na citometria de fluxo é o tipo de padrão a ser utilizado. As plantas que têm sido empregadas como padrões, com valor 2C, determinados em picograma (pg) são: *Raphanus sativus* (2C = 1,11 pg), *Lycopersicon esculentum* (2C = 1,96 pg), *Zea mays* (2C = 5,72 pg), *Pisum sativum* (2C = 9,07 pg), *Vicia faba* (2C = 26,90 pg) e *Allium cepa* (2C = 34,76 pg) (DOLEŽEL et al., 1992). Uma vantagem do uso de padrões de DNA de núcleos de células vegetais é a sua fácil obtenção a baixo custo e o amplo espectro de valores já determinados, que variam de 2C = 1,01 pg *Oryza sativa* cv. IR36 a 34,76 pg *Allium cepa* (DIAMOND e DE MAGGIO, 2000).

As diferenças de conteúdo de DNA dentro de uma mesma espécie podem ser constatadas pela citometria de fluxo, assim como foi verificado em várias espécies, entre elas *Alstroemeria* de diferentes regiões geográficas, que apresentaram variações distintas (BUITENDIJK et al., 1997). Embora o conteúdo de DNA por genoma da espécie seja constante, podem ocorrer exceções. Em muitos casos, a variação intra-específica se dá pela variação dos cromossomos, aneuploidias, presença de cromossomos supranumerários, perdas ou duplicações de segmentos dos cromossomos. Isso pode ter grande efeito no conteúdo de DNA do genoma da espécie (BENNETT e SMITH, 1976; OHRI, 1998).

Mesmo que a citometria de fluxo seja capaz de detectar variações intra-específicas no conteúdo de DNA de uma espécie, quando, por exemplo, a variação for proveniente de duplicação ou perda de segmento do cromossomo (BENNETT e SMITH, 1976; DOLEŽEL, 1997). Porém, essa metodologia não permite identificar qual dos cromossomos apresenta tal variação. Para tanto, outras metodologias se fazem necessárias. A citogenética clássica permite, pela caracterização do cariótipo, observar irregularidades nos cromossomos quanto a alterações numéricas e estruturais (SYBENGA, 1992).

#### **1.4. Aspectos citogenéticos**

A citogenética inclui o estudo de cromossomos nos aspectos funcionais, estruturais e numéricos, com o uso de diferentes metodologias (SINGH, 1993). As informações citogenéticas retratam o comportamento, a evolução física e molecular dos cromossomos de um gênero ou espécie (SUMNER, 2003). Tais conhecimentos têm sido utilizados, principalmente, em estudos de evolução,

sistemática de plantas silvestres e cultivadas e em programas de melhoramento (CARVALHO e SARAIVA, 1993).

Em *Lycopersicon*, os estudos citogenéticos realizados têm relatado o número cromossômico ( $2n = 2x = 24$ ), a localização do centrômero, a caracterização do nível de ploidia e a identificação de híbridos, tanto em células mitóticas quanto meióticas. Esses trabalhos apresentam dados importantes para o entendimento da organização e funcionalidade da espécie dentro do processo evolutivo e citológico (WINKLER, 1909; QUIROS, 1991).

O tomateiro é uma planta diplóide, embora existam relatos de híbridos poliplóides que ocorrem naturalmente e indivíduos com variação de ploidia obtidos por cultura de calos tratados com substâncias anti-tubulínicas, como a colchicina (QUIROS, 1991). Alterações no nível de ploidia podem resultar em frutos com cor, sabor e quantidade de sementes diferenciados. Esses aspectos são de amplo interesse para a agricultura, por possibilitarem a modificação de uma característica de interesse (GUERRA, 1988; TAMARIN, 1996).

Análises estruturais, morfológicas e funcionais dos cromossomos, utilizando técnicas de bandeamento, têm sido realizadas com o objetivo de ampliar os conhecimentos cariotípicos e evolutivos em espécies de plantas e animais (SUMNER, 1990). Regiões cromossômicas, funcionalmente diferenciadas como regiões nucleolares, possuem padrões específicos de bandeamento após a coloração (SHARMA e SHARMA, 1999).

O bandeamento cromossômico Ag-NOR evidencia as regiões organizadoras nucleolares ativas (NORs), pois a impregnação da prata é utilizada para identificar as regiões em que ocorrem os processos de síntese dos RNAs ribossomais, necessários para a composição das proteínas das células (SUMNER, 2003). Esses segmentos são formados por multicópias de genes de rDNA, estudados na citogenética, por causa de suas peculiaridades de função e estrutura. Pelo menos um dos cromossomos do conjunto haplóide nas espécies de angiospermas (LAY, 1978; PEDROSA et al., 1997) apresenta a NOR ativa.

A NOR ativa pode ser detectada não só pela impregnação da prata pelo bandeamento Ag-NOR (HOWELL e BLACK, 1980), como também pela demonstração de heterocromatinas flanqueadoras (SATO et al., 1980) ou por métodos de hibridização *in situ* (DOLEŽEL et al., 2004). Em *L. esculentum*, a

NOR ativa foi localizada no braço curto do cromossomo par 2 pelo bandeamento Ag-NOR (QUIROS, 1991; PETERSON et al., 1996; EMMANUEL e LEVY, 2002).

Diante das dificuldades para a identificação das variações cromossômicas numéricas e estruturais no tomateiro, em decorrência do alto grau de compactação dos cromossomos, novas técnicas são necessárias para as análises citogenéticas (ALVAREZ, 1997). O estudo dos cromossomos vem sendo aperfeiçoado com os avanços técnicos de preparações, que permitem o aprimoramento das metodologias clássicas (SYBENGA, 1992; VICCINI e CARVALHO, 2000).

O uso de agentes antimitóticos ou inibidores, como os herbicidas aminoprofos-metil (APM), 8-hidroxiqeloneína, trifluralina e orizalina, bloqueia os ciclos celulares, em fases específicas da mitose (SUMNER, 1990; SINGH, 1993). Os agentes bloqueadores são essenciais para o estudo dos cromossomos, por impedirem a formação do fuso e acumularem o número de metáfases (SINGH, 1993). A utilização do APM no bloqueio das células meristemáticas também proporciona cromossomos alongados, com compactação adequada para análise citogenética (PLANCHAIS et al., 2000). Isso representa um avanço metodológico para o estudo de espécies com cromossomos pequenos, abrindo perspectivas de estudos mais aprofundados, como identificação de contrações primárias e secundárias por meio de bandeamentos, auxiliando a classificação dos cromossomos (GUERRA, 1988).

Além da utilização de anti-tubulínicos, a aplicação de soluções fixadoras, como metanol:ácido-acético (SINGH, 1993), permite obter preparações de boa qualidade (GHOSH e PAWELETZ, 1993), caracterizadas por cromossomos distendidos, retilíneos e morfológicamente preservados. Os fixadores geralmente empregados em estudos citogenéticos evitam o ataque de endonucleases, o que permite a caracterização detalhada do cariótipo da espécie em estudo (SUMNER, 1990; SYBENGA, 1992). Além disso, as técnicas de maceração enzimática, dissociação celular e secagem ao ar possibilitam obter lâminas com cromossomos prometáfásicos e metafásicos espalhados sem sobreposições e no mesmo plano de foco (CARVALHO, 1995).

## 2. OBJETIVOS GERAIS

O tomateiro é uma olerícola com amplos estudos nas mais diversas áreas do conhecimento científico. No entanto, apresenta controvérsias na literatura quanto à classificação e identificação de regiões específicas nos cromossomos dessa espécie. Assim, os objetivos principais deste trabalho foram:

- 1- Relacionar as principais diferenças morfológicas dos botões florais entre as plantas de *L. esculentum* acesso BGH 160.
- 2- Verificar se essas diferenças encontradas foram identificadas em outras espécies de tomate descritas na literatura.
- 3- Analisar a suspensão da citometria de fluxo das pétalas das diferentes plantas do acesso em questão.
- 4- Estimar o conteúdo de DNA desse acesso.
- 5- Avaliar a ploidia nos folíolos terminais de diferentes folhas dos indivíduos normais e anormais e verificar a correlação com a área foliar.
- 6- Determinar a ploidia das peças florais nos diferentes estágios de maturidade.
- 7- Obter os cromossomos de *L. esculentum* com morfologia adequada para reavaliar a caracterização das constrições primárias e secundárias e a posição da região organizadora nucleolar.
- 8- Montar os kariogramas de *L. esculentum* var. Stupnické e *L. esculentum* acesso BGH 160.
- 9- Comparar os kariogramas de *L. esculentum* var. Stupnické com *L. esculentum* acesso BGH 160.

### **Análise dos botões florais de *L. esculentum* Mill. acesso BGH 160**

#### **RESUMO**

As variações morfológicas de uma planta podem ocorrer de forma espontânea ou induzida por agentes químicos ou físicos, alterando a expressão de um gene ou a morfologia dos cromossomos, resultando na modificação do padrão morfogênico de um órgão durante seu desenvolvimento. Os objetivos deste trabalho foram: I) Relacionar as principais alterações morfológicas dos botões florais entre as plantas de *L. esculentum* acesso BGH 160, II) Verificar se essas diferenças encontradas foram identificadas em outras espécies de tomate descritas na literatura e III) Analisar a suspensão da citometria de fluxo das pétalas das diferentes plantas do acesso em questão. Para tanto, foram cultivadas 100 plantas de *L. esculentum* BGH 160, nas quais, durante o período da floração, foi observada em algumas plantas a presença de 6-8 pétalas, além de uma camada formada por estruturas petalóides, pseudocarpelos e frutos com forma imbricada e sem sementes. Pela análise da suspensão das pétalas utilizadas na citometria de fluxo, identificaram-se grãos de pólen em uma das camadas das peças florais. Nos estudos da morfologia e viabilidade dos grãos de pólen observaram-se formas e tamanhos variados, além de reduzida viabilidade polínica. As características verificadas em algumas plantas desse acesso foram semelhantes a mutações descritas na literatura, mas não foi possível classificá-las apenas pela análise morfológica.

Palavras-chave: *L. esculentum* acesso BGH 160, alteração floral, grão de pólen e citometria de fluxo.

# 1. INTRODUÇÃO

Na fase vegetativa da planta o meristema apical produz folhas e meristemas laterais. Os ápices vegetativos são convertidos em meristemas florais que se diferem dos demais meristemas por produzirem órgãos florais, e toda a atividade meristemática cessa após os últimos órgãos florais serem produzidos (COEN e MEYEROWITZ, 1991; HAREVEN et al., 1994; KATO et al., 2005). O desenvolvimento dos órgãos reprodutivos é marcado pelo aumento do número de divisões celulares, sendo que a morfogênese é controlada por genes (JACK, 2004; KATO et al., 2005).

A morfogênese (GRANT e OWENS, 2002) e a morfologia da planta (BROADHVEST et al., 1992) podem sofrer alterações espontâneas ou induzidas por agentes físicos ou químicos. Essas alterações podem ser o resultado de modificações das seqüências do DNA, afetando a expressão de determinados genes. Além das variações em nível de seqüências de DNA e morfologia, podem ocorrer anormalidades citológicas, bem como possibilitar essas anormalidades com cromossomos acêntricos, univalentes, perda de fragmentos, distúrbios no fuso acromático, anáfases multipolares e presença de micronúcleos (SANDERS et al., 1999).

As variações morfológicas dentro de uma mesma espécie são possíveis de serem distinguidas, em muitos casos por caracterizações fenotípicas. Pelo acompanhamento do desenvolvimento com outras espécies que possuam características similares. Estas permitem a classificação da alteração pelas variações das formas e número de peças florais, por exemplo (HAREVEN et al., 1994).

Avaliações de estruturas que apresentam diferenciações morfológicas podem também ser analisadas pela citometria de fluxo, técnica que propicia a identificação de tamanhos celulares, agrupando-os na forma de histogramas. Com isso, pode ser verificada a existência de variações na organização celular ou mesmo presença de células diferenciadas (DOLEŽEL et al., 1998; DIAMOND e DE MAGGIO, 2000).

O presente estudo, realizado com plantas de *L. esculentum* BHG 160 que apresentaram botões florais normais e outras que exibiram meristemas florais

com alterações na organização das pétalas, carpelo com a presença de frutos com forma imbricada, o que é considerada anormal, teve como objetivos: I) Relacionar as principais diferenças morfológicas dos botões florais entre as plantas de *L. esculentum* acesso BGH 160, II) Verificar se essas diferenças encontradas foram identificadas em outras espécies de tomate descritas na literatura e III) Analisar a suspensão da citometria de fluxo das pétalas das diferentes plantas do acesso em questão.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal**

Os estudos morfológicos dos botões florais foram realizados em plantas normais e anormais de *Lycopersicon esculentum* acesso BGH 160. As sementes foram cedidas pelo Prof. Derly José Henriques da Silva, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), curador do Banco de Germoplasma da UFV, em Viçosa, MG. As análises foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, do Departamento de Biologia Geral (DBG) da UFV.

As sementes de *L. esculentum* acesso BGH 160 foram plantadas em vasos de polietileno com capacidade para 2 L contendo a mistura de solo e esterco na proporção 3:1, com 50 g de adubo, mantidos na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da UFV, onde receberam irrigação periódica e controle fitossanitário.

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Avaliação morfológica dos botões florais**

Foram cultivadas 100 plantas do acesso BGH 160. No período da floração, selecionaram-se as plantas com morfologia floral normal e as que apresentavam alterações nas peças florais. No desenvolvimento, as plantas foram observadas e fotografadas, tendo suas estruturas florais sido analisadas.

#### **2.2.2. Citometria de fluxo em verticilos florais**

Durante o estudo da ploidia realizado nas pétalas das plantas anormais foi observada, nos histogramas obtidos via citometria de fluxo, a formação de um pico com *background* à direita em relação aos demais picos e quando comparado com os resultados da planta normal. A partir dessa observação, os verticilos e as pétalas da flor da planta anormal foram isolados e processados no citômetro de fluxo. As pétalas da planta anormal foram isoladas e fragmentadas com lâmina de

barbear em uma placa de Petri com 0,5 mL do tampão extrator (CyStain UV precise T – Partec), incubando-as durante 3 min à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi filtrado em telas de 30 µm, adicionando-se 0,5 mL do tampão extrator, com 1,5 mL do tampão de coloração (CyStain UV precise T – DAPI – Partec). O material ficou incubado por 10 min para, então, ser filtrado em telas de 20 µm, sendo a leitura realizada no citômetro de fluxo.

### **2.2.3. Microscopia nas suspensões nucleares das diferentes pétalas da planta anormal**

Das suspensões nucleares utilizadas na citometria de fluxo foram preparadas lâminas, observadas ao microscópio Olympus<sup>TM</sup>, modelo BX60, com objetiva de 40X.

### **2.2.4. Germinação dos grãos de pólen**

Para a avaliação da germinação do tubo polínico nos grãos de pólen foram utilizadas anteras bem maduras das plantas normais e petalóides das plantas anormais. O pólen foi retirado das anteras e das estruturas petalóides e transferido para três placas de Petri para cada população, contendo meio líquido preparado segundo Trabelsi (1985) e solução de sacarose 10% com 100 mg/L de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>). As placas foram expostas à temperatura de 32 °C, sob luz fluorescente de 40 W, a 40 cm de distância da placa de Petri.

### **2.2.5. Microscopia na avaliação da germinação do tubo polínico**

Foram analisados, em média, 350 grãos de pólen por placa, com três repetições. As observações foram realizadas no microscópio óptico invertido com aumento de 40X e os dados de viabilidade, determinados pela porcentagem de germinação dos grãos de pólen.

### 3. RESULTADOS

Na condução da primeira geração dos indivíduos de *L. esculentum* acesso BGH 160, entre as 100 plantas cultivadas, seis apresentaram variações morfológicas na formação das pétalas e do carpelo das flores, das quais foi utilizada uma planta para análises. Durante a segunda geração de indivíduos, provenientes das sementes da primeira geração, foram observadas três plantas anormais, enquanto na terceira e quarta gerações não se verificaram plantas anormais quanto à formação dos botões florais e frutos. Nas plantas normais, as flores apresentaram entre 5-6 sépalas e pétalas (Figura 1A), cinco pares de anteras e com gineceu bicarpelar (estigma, estilete e ovário) (Figura 1B). Em algumas plantas da primeira geração foram observadas flores com 5-7 sépalas e 6-9 pétalas, sendo essas plantas normais. As plantas que apresentaram número acima de seis pétalas e sépalas na geração posterior exibiram alterações morfológicas nas flores, com a formação de 5-6 sépalas, uma camada de 6-8 pétalas seguida de 10 estruturas petalóides (Figura 1C) e a presença de uma estrutura pseudocarpelar (Figura 1D) (Quadro 1). Todas as flores das plantas anormais apresentaram variações morfológicas semelhantes, o que pode ser indício de uma alteração em nível de DNA, eliminando-se a hipótese da malformação de estruturas do vegetal por outro motivo.

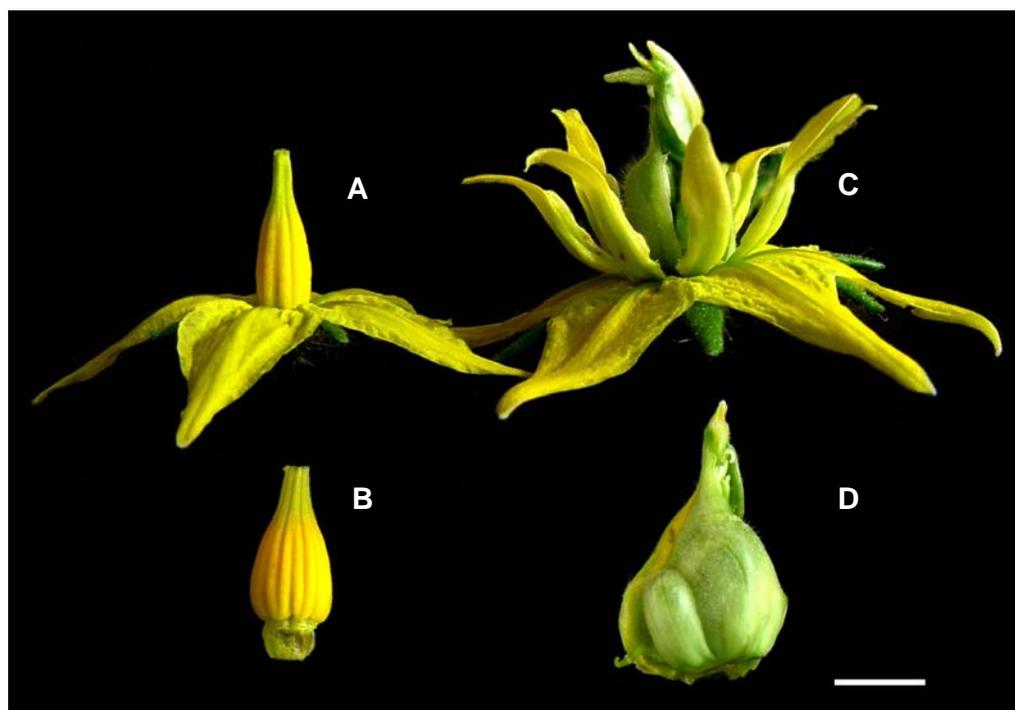


Figura 1 – Morfologia das flores de *L. esculentum* acesso BGH 160. Observar a organização das pétalas e a estruturação do carpelo nas flores: A) Flor da planta normal com a formação de uma camada de pétalas. B) Diferenciação das anteras e carpelo na planta normal. C) Flor da planta anormal com presença de uma camada de pétalas, seguida por uma camada de estruturas petalóides. D) Formação de pseudocarpelo na planta anormal. Barra = 3 mm.

Pelas análises citométricas da ploidia nas diferentes camadas da flor anormal foi observada, no histograma, a formação de um pico satélite em relação aos demais. Quando se avaliou a estrutura petalóide nesse pico, o histograma da suspensão nuclear foi visto à direita de 2C (dado não apresentado), evidenciando a existência de células com conteúdo relativo de DNA maior que 16C. Com a avaliação microscópica da suspensão celular desse material, foi identificada a presença de grãos de pólen.

A partir da constatação dos grãos de pólen nas estruturas petalóides das plantas anormais foram realizadas avaliações morfológicas desses grãos nas plantas normais e anormais. As plantas normais apresentaram similaridade nas

formas e tamanhos dos grãos de pólen (Figura 2A), porém os indivíduos anormais mostraram formas e tamanhos diferenciados (Figura 2B).

Além da alteração na morfologia floral, ocorreu variação no tamanho, forma e viabilidade dos grãos de pólen (Quadro 1). A germinação do tubo polínico foi observada após um período de 90 min, quando ocorreu com a mesma frequência nas plantas normais (Figura 2C) e anormais (Figura 2D). Porém, o índice de germinação na população normal foi de 83,33%, enquanto na população anormal, de 4,76% (Figura 3).

Os frutos das plantas normais apresentaram forma oval (Figura 4A), com formação de sementes (Figura 4B), enquanto na planta anormal raras vezes foi observada a formação de frutos, e, quando isso ocorria, estes tinham a forma imbricada (Figura 4C) e não apresentavam sementes (Figura 4D).

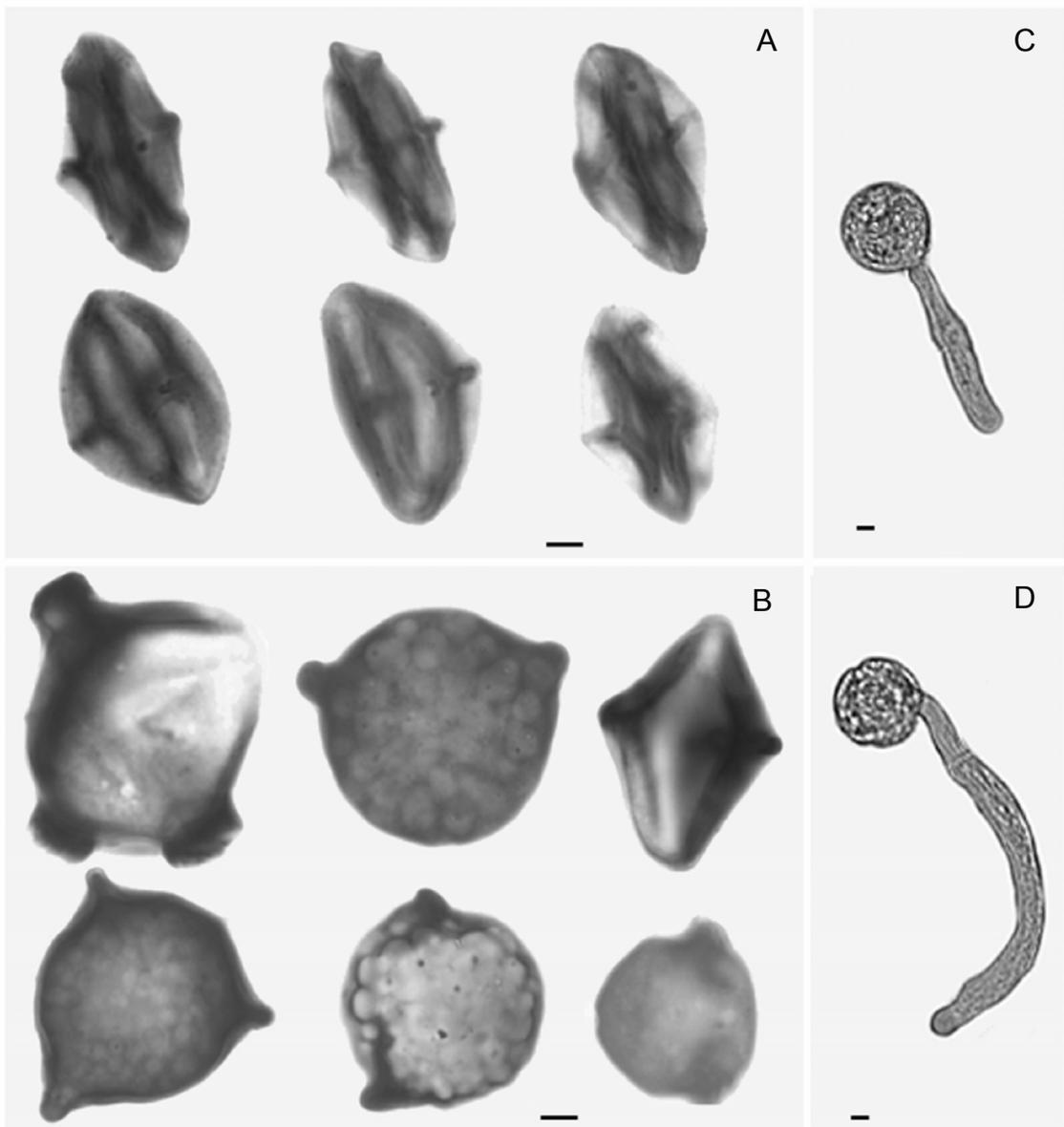


Figura 2 – Grãos de pólen e germinação dos tubos polínicos de *L. esculentum* acesso BGH 160. Observar a morfologia diferenciada dos grãos de pólen entre as plantas normais e anormais dentro do mesmo acesso: A) Grãos de pólen da planta normal com morfologias similares. B) Diversidade nas formas dos grãos de pólen da planta anormal. C) Germinação do tubo polínico no grão de pólen da planta normal. D) Grão de pólen germinado na planta anormal. Barra = 5  $\mu\text{m}$ .

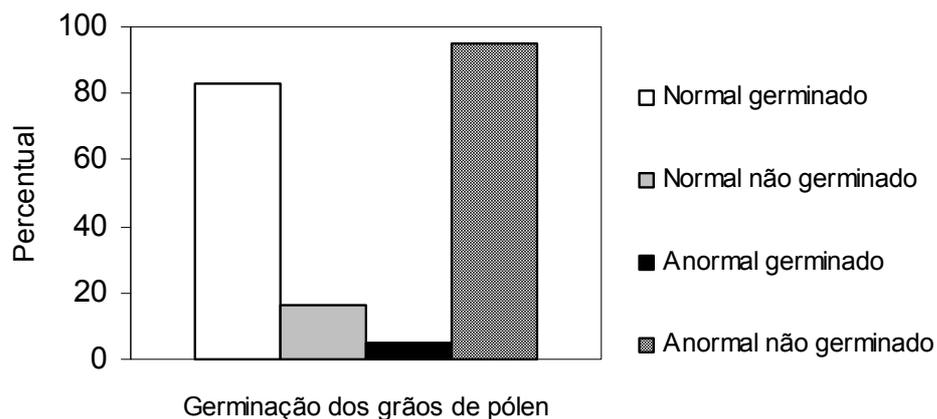


Figura 3 - Percentual da germinação do tubo polínico em *L. esculentum* acesso BGH 160 das plantas normais e anormais.

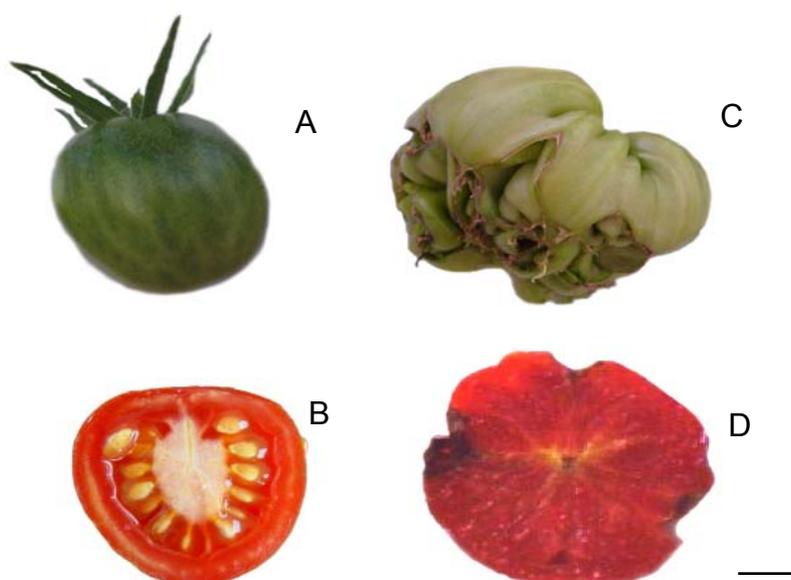


Figura 4 - Frutos de *L. esculentum* acesso BGH 160 normal e anormal. Observar a morfologia e a estruturação externa e interna dos frutos: A) Fruto da planta normal. B) Morfologia interna do fruto da planta normal com formação de sementes. C) Fruto da planta anormal, com forma imbricada. D) Estrutura interna do fruto da planta anormal sem sementes. Barra = 1 cm.

Quadro 1 – Características diferenciais entre as plantas normais e anormais de *L. esculentum* acesso BGH 160

<b>Características</b>	<b>Planta Normal</b>	<b>Planta Anormal</b>
Proporção fenotípica	94/100	6/100
Composição da flor	Sépalas, pétalas, carpelo	Sépalas, pétalas petalóides, pseudocarpelo
Número de sépalas	5 a 6	7 a 9
Número de pétalas	5 a 6	8 a 12
Local de formação do pólen	Anteras	Petalóides
Número de anteras	5 pares	0
Número de estruturas petalóides	0	10
Percentual de germinação do pólen	83,33	4,76
Morfologia do pólen	Uniforme	Variada
Forma do fruto	Oval	Imbricada
Formação de sementes	Presente	Ausente

## 4. DISCUSSÃO

Em *L. esculentum* acesso BGH 160 nas plantas normais e anormais, foram observadas alterações na organização das peças florais nos indivíduos anormais, com variação no número de pétalas, presença de estruturas petalóides e formação de pseudocarpelo (Figura 1CD). Gómez et al. (1999), estudando a morfologia das estruturas florais de *L. esculentum*, identificaram plantas com pétalas sepalóides e a conversão dos estames em pseudocarpelo. Nesse caso, as alterações nos verticilos florais foram resultantes da alteração da expressão do gene *STAMENLESS*. Em *Antirrhinum majus*, a formação de pétalas sepalóides, alteração na formação das camadas do carpelo, foi resultante da expressão do gene *PLENA* ocasionando a mutação (KECK et al., 2003).

Normalmente são descritos cinco pares de anteras para o gênero *Lycopersicon* (RICK, 1981). Porém, nas plantas anormais de *L. esculentum* acesso BGH 160 observaram-se 10 estruturas petalóides no local das anteras, em que, pela citometria de fluxo na avaliação da ploidia das pétalas, foram identificados grãos de pólen na suspensão celular, presentes nas estruturas petalóides. Situação semelhante foi verificada em *Arabidopsis*, onde estruturas petalóides se formaram em detrimento de estames, em virtude da mutação do gene homeótico *AGAMOUS* (VIJAYRAGHAVAN, 2001; KECK et al., 2003). Segundo esses autores, ocorreu a produção de grãos de pólen com variação morfológica no tamanho e na forma.

Diferentemente do ocorrido nas plantas normais, que apresentaram grãos de pólen uniformes quanto à morfologia e ao tamanho (Figura 2A), nos indivíduos anormais foram observadas formas variadas em relação à morfologia e ao tamanho dos grãos de pólen (Figura 2B). Comportamento semelhante foi verificado pela mutação *polycotyledon* ocasionada pelo aumento na concentração de auxina em tomateiro, em que, além de resultar na ausência de anteras e, ou, quase adesão às pétalas, foram produzidos grãos de pólen com formas diferenciadas e com viabilidade que não chegava a 75% (AL-HAMMADI et al., 2003).

A baixa taxa de germinação dos grãos de pólen nas plantas anormais, assim como também a alteração na morfologia polínica (Figura 3), pode ser

resultante das alterações morfológicas dos botões florais. Chen & McCormick (1996), analisando plantas normais e mutantes em *Arabidopsis* que expressavam o gene *sidecar pólen*, observaram que, além da formação de grãos de pólen com formas e tamanhos heterogêneos, a germinação foi de 7%, nas plantas que apresentavam mutação.

A baixa taxa de germinação dos grãos de pólen e a presença de formas diferenciadas podem comprometer a fecundação do óvulo, promovendo a formação de frutos partenocárpicos (MASCARENHAS, 1993). De acordo com Trabelsi (1985), são considerados satisfatórios para a fixação de frutos índices de germinação acima de 70%. Os frutos de *L. esculentum* acesso BGH 160 anormal raras vezes eram formados, sendo que eles não apresentavam sementes (Figura 4CD). A escassez da formação de frutos nos indivíduos anormais é justificada pelo local onde são encontrados o pólen, formas diferenciadas dos gametas masculinos e a desorganização do carpelo.

A formação de frutos partenocárpicos nos tomates anormais pode estar ainda associada com alterações nos estames ou, mesmo, nas anteras (MAZZUCATO et al., 2003), podendo a causa ser a perda de uma seqüência de genes ou a não expressão destes. A variação da expressão do gene homeobox *LeT6/TKn2* em *Lycopersicon*, além de ocasionar perturbações na formação das flores, produz frutos com forma imbricada sem sementes (AVIVI et al., 2000). Características similares foram descritas por Rick (1981), em tomate com a mutação decorrente da indução por raios X, em que o gene *ccf* (cactiflora) foi alterado, produzindo plantas com alteração na organização dos verticilos florais, com formação de pseudofrutos estéreis.

As anormalidades encontradas em algumas plantas do acesso BGH 160 podem ser decorrentes de diversos fatores, como alteração da expressão dos genes homeóticos, influências do meio ou, ainda, perda ou adição de seqüências gênicas em nível de cromossomo. A expressão da variação pode ser até mesmo o conjunto de todos esses fatores citados (RICK, 1981; SCHWARZ-SOMMER et al., 1990; MAZZUCATO et al., 2003).

Alterações na organização das peças florais podem ser ocasionadas ainda pelas altas temperaturas. Por exemplo, o gene *TAG1* encontrado em *Lycopersicon*, homólogo ao gene *agamous* expresso em *Arabidopsis*, quando estiver se expressando sob condições de alta temperatura não só o

desenvolvimento das flores fica comprometido, como também a produção dos frutos (LOZANO et al., 1998). Isso também foi constatado em plantas de pimentas (POLOWICK e SAWHNEY, 1985; BARTEN et al., 1992).

## CAPÍTULO II

---

### **Quantificação do conteúdo de DNA nuclear e avaliação da ploidia em diferentes estágios de desenvolvimento de verticilos florais em plantas de *L. esculentum* Mill. acesso BGH 160**

#### **RESUMO**

A citometria de fluxo em plantas é uma ferramenta empregada para estimar o conteúdo nuclear e mensurar níveis de ploidia a partir de estruturas celulares em suspensão, obtidas de células ou tecidos vegetais. Com o propósito de obter dados citométricos acerca do genoma das plantas anormais (com 5-7 sépalas e 6-8 pétalas seguida de 10 estruturas petalóides e presença de uma estrutura pseudocarpelar) e normais (5-6 sépalas e pétalas, 5 pares de anteras, gineceu bicarpelar) de *L. esculentum* acesso BGH 160, os objetivos foram: I) Estimar o conteúdo relativo de DNA e averiguar se há diferença entre as plantas normais e anormais, II) Verificar se há diferença na ploidia nos folíolos terminais ao longo das plantas normais e anormais e correlacionar a ploidia com a área foliar e III) Determinar a ploidia das peças florais em três diferentes estágios de maturidade. A análise citométrica mensurou um conteúdo absoluto de DNA equivalente a  $2C = 1,96$  pg para as plantas normais e  $2C = 1,87$  pg para as anormais, uma diferença equivalente a 0,09 pg. Na análise da ploidia, em sete folíolos terminais ao longo do desenvolvimento das plantas normais foi verificada a variação da ploidia de  $2C$  e  $4C$  a  $8C$ . Quando a variação da ploidia foi relacionada com a área foliar, observou-se correlação negativa nas plantas anormais dos núcleos  $8C$ , em que a variação da ploidia não correspondia à área foliar. Os diferentes conteúdos de DNA encontrados nas plantas normais e anormais podem ser responsáveis pelo desenvolvimento diferencial das flores e dos frutos.

Palavras-chave: Citometria de fluxo, quantificação do conteúdo de DNA, ploidia e *Lycopersicon*.

# 1. INTRODUÇÃO

*Lycopersicon esculentum* Mill. é uma olerícola consumida em maior parte *in natura* ou também na forma industrializada, sendo considerada a segunda hortaliça mais cultivada no mundo, superada apenas pela batata, *Solanum tuberosum* L. O gênero *Lycopersicon* é composto por nove espécies, originárias das regiões montanhosas dos Andes, no Peru, Equador e Bolívia (MULLER, 1940; QUIROS, 1991; NUEZ et al., 2004).

A citometria de fluxo é um processo de quantificação de DNA de partículas celulares em suspensão (DOLEŽEL, 1997; YANPAISAN et al., 1999). Entre as diversas estruturas celulares que podem ser analisadas com essa técnica, destacam-se, em plantas, os núcleos que possibilitam a averiguação do conteúdo relativo e absoluto de DNA em praticamente todos os órgãos e tecidos durante o desenvolvimento da planta (GALBRAITH et al., 1991; SMULDERS et al., 1995; KNIGHT e ACKERLY, 2002; MORGAN e WESTOBY, 2005).

O conteúdo relativo e absoluto de DNA de um genoma (valor C) pode apresentar diferenças dentro de uma mesma espécie (OHRI, 1998). As distinções provavelmente ocorrem por influência dos fatores climáticos como mecanismo adaptativo da espécie (TURPEINEIN et al., 1999). Isso foi observado em populações *Hordeum spontaneum* de diferentes regiões geográficas, com diferença de  $2C = 9,35$  a  $2C = 9,81$  pg. Contudo, a variabilidade do conteúdo de DNA pode também ser provocada pela variação cromossômica, presença de cromossomos B (TEOH e REES, 1976) ou alteração da heterocromatina (LAURIE e BENNETT, 1985), como constatado em *Zea mays*.

Também em milho, Lee et al. (2002) relataram que a perda de segmento do cromossomo 1 ocasionou variação no conteúdo absoluto de DNA entre as diferentes plantas, estimado pela citometria de fluxo. A alteração do conteúdo de DNA pode, ainda, estar relacionada à ocorrência de aneuploidia, como constatado em *Musa* (ROUX et al., 2003), ou à poliploidia (SEAL, 1983; KOUTOULIS et al., 2005). A poliploidização pode ter origem de endoreduplicações ou endomitoses, eventos que podem ser provocados, especialmente, por alterações nas proteínas que controlam o ciclo celular ou pela expressão diferencial de genes regulados epigeneticamente (MIZUKAMI, 2001).

A citometria de fluxo tem sido utilizada também na avaliação da ploidia em diferentes partes das plantas de *Mesembryanthemum crystallinum* (DE ROCHER et al., 1990), *Arabidopsis thaliana* (GALBRAITH et al., 1991) e *Cucumis* (GILISSEN et al., 1993). Além disso, diferentes estágios de desenvolvimento de embriões e frutos vêm sendo empregados nas análises de *Lycopersicon esculentum* (SMULDERS et al., 1995; BERGERVOET et al., 1996) e em sementes de *Brassica* (KUDO e KIMURA, 2001). As variações da ploidia em diferentes órgãos e tecidos podem estar associadas à posição taxonômica da espécie, ciclo de vida, tamanho do genoma e tipo de órgão (BAROW e MEISTER, 2003; YANG e LOH, 2004; BERTIN, 2005).

Com a finalidade de ampliar os conhecimentos genéticos das plantas anormais e normais de *L. esculentum* acesso BGH 160 pela citometria de fluxo, os objetivos deste trabalho foram: I) Estimar o conteúdo relativo de DNA e averiguar se há diferença entre as plantas normais e anormais; II) Verificar se há diferença da ploidia nos folíolos terminais ao longo das plantas normais e anormais, bem como correlacionar a ploidia com a área foliar; e III) Determinar a ploidia das peças florais em três diferentes estágios de maturidade.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal**

Foram utilizadas sementes de *Lycopersicon esculentum* acesso BGH 160, cedidas pelo Prof. Derly José Henriques da Silva, curador do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Viçosa (UFV); e de *Lycopersicon esculentum* var. Stupnické, fornecidas pelo Dr. Jaroslav Doležel, do Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria do Instituto Experimental Botânico de Sokolovska, República Tcheca.

As sementes de *L. esculentum* acesso BGH 160 foram cultivadas em vasos de polietileno com capacidade para 2 L contendo a mistura de solo e esterco na proporção 3:1 e mantidas na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da UFV, onde receberam irrigação periódica e controle fitossanitário.

### **2.2. Citometria de fluxo**

As análises citométricas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, localizado no Departamento de Biologia Geral (DBG) da UFV.

#### **2.2.1. Quantificação do conteúdo de DNA nuclear**

O método utilizado foi o descrito por Otto (1990) com algumas modificações. Folhas jovens e vigorosas foram identificadas e lavadas com água destilada. O material foi secado com papel-toalha, recortando 2 cm<sup>2</sup> da folha. O material foi fragmentado em placa de Petri com lâmina de barbear, em 0,5 mL do tampão de extração nuclear, Otto I (0,1 M de ácido cítrico; 0,5% de Tween 20<sup>®</sup>; 2,0 mM de Ditiotreitól<sup>®</sup>) gelado e incubado, por 3 min, à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi filtrada em telas de 30 µm, em eppendorfs de 2,0 mL, adicionando-se 0,5 mL de Otto I na placa de Petri, para lavagem e filtragem. Após a centrifugação por 5 min a 1.100 rpm, o sobrenadante foi removido, deixando-se 100 µL. O pellet foi ressuspenso, adicionando-se 100 µL de Otto I, e incubado no congelador por 5 min. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de tampão de coloração Otto II (0,4 M de

Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O; 2 mM de Ditioneitol<sup>®</sup>; 50 µL/mL de RNase; e 50 µL/mL iodeto de propídio-IP). O material foi submetido à incubação no escuro por 30 min, filtrado através de telas de 20 µm em tubos de leitura e analisado no citômetro.

Todos os histogramas de intensidade de fluorescência relativa foram avaliados no programa FlowMax Partec<sup>®</sup>. A razão entre as médias dos picos G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> dos padrões de referência e das amostras foi calculada e convertida em picogramas (pg) de DNA.

O tamanho do genoma nuclear foi calculado a partir das leituras dos núcleos em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, de acordo com a fórmula:

$$V = \frac{L_1}{L_2}$$

em que:

V = valor do conteúdo de DNA nuclear 2C (pg) de *Lycopersicon*;

L<sub>1</sub> = leitura média do pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de *Lycopersicon*; e

L<sub>2</sub> = leitura média do pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> do padrão.

### 2.2.2. Avaliação dos níveis de ploidia em folíolos

A determinação da ploidia foi realizada em diferentes estágios de tamanhos dos folíolos pela citometria de fluxo nas plantas normais e anormais de *L. esculentum* acesso BGH 160, após o período de desenvolvimento de 70 dias, quando as plantas atingiram 23 folhas (Figura 1) com a presença de flores.

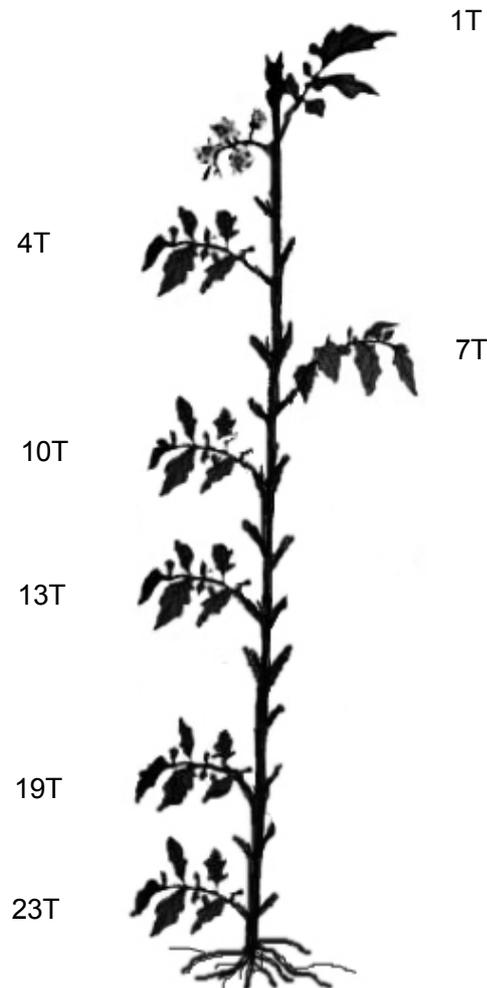


Figura 1 - Esquema de *L. esculentum* acesso BGH 160 com a distribuição de 23 nós de crescimento das folhas.

### 2.2.3. Análise da área foliar

Os folíolos analisados foram scanados e a área foliar, determinada pelo programa Imagem Pro-Plus 4.5.

### 2.2.4. Avaliação dos níveis de ploidia em pétalas e sépalas

A determinação da ploidia foi realizada em três diferentes estágios de tamanhos das sépalas e pétalas pela citometria de fluxo nas plantas normais e anormais de *L. esculentum* acesso BGH 160. Após o período de desenvolvimento

de 70 dias, com a presença de flores, as pétalas e sépalas foram avaliadas em três estágios de crescimento (Figura 2).



Figura 2 – Botões florais de *L. esculentum* acesso BGH 160 da planta normal em três diferentes tamanhos. Barra = 1 cm.

Em cada folha das plantas normais e anormais foi utilizado o folíolo terminal para análises. Os folíolos foram identificados, lavados e mantidos em água destilada até o momento de uso. O material foi secado com papel-toalha, sendo retirados fragmentos de 2 cm<sup>2</sup>. Em seguida, o material foi fragmentado em placa de Petri com lâmina de barbear em 0,5 mL do tampão de extração (CyStain UV precise T – Partec), incubado durante 3 min a 28 C° e filtrado em telas de 30 µm. Acrescentou-se 0,5 mL do tampão de extração de núcleos. Subseqüentemente, adicionou-se 1,5 mL do tampão de coloração (CyStain UV precise T- DAPI - Partec), o qual foi incubando por 10 min. A suspensão foi filtrada em telas de 20 µm e a leitura, realizada no citômetro de fluxo. Para a análise das sépalas e pétalas, os procedimentos foram os mesmos utilizados no caso dos folíolos.

### **2.2.5. Processamento no citômetro de fluxo**

As amostras foram mensuradas por um citômetro de fluxo Partec PAS (PARTEC GmbH, Munster, Germany), equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão (HBO – 100 W). Para avaliação da ploidia foi empregado DAPI com filtros KG 1, BG 38 e GG 435 e para análise do conteúdo de DNA, iodeto de propídeo, utilizando-se como fonte de luz o *laser* de íons de argônio (20 mw), com os filtros RG 610 e TK 560. A partir dos histogramas obtidos, os coeficientes de variação (CV) foram calculados, usando-se o programa FlowMax Partec. Foram analisados pelo menos 5 mil núcleos de cada teste.

### **2.2.6. Análise estatística**

Os dados coletados das áreas foliares dos folíolos utilizados no estudo da ploidia foram submetidos à análise de correlação de Pearson, a fim de estabelecer uma relação da variação da ploidia com a área foliar. As análises foram realizadas no programa computacional GENES (CRUZ, 2001), considerando-se os níveis de significância 1 e 5%.

### 3. RESULTADOS

A quantificação do conteúdo de DNA pela citometria de fluxo dos núcleos em suspensão corados com iodeto de propídeo gerou histogramas com picos correspondendo à média do conteúdo de DNA dos núcleos de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. O *L. esculentum* var. Stupnick foi calibrado para o canal 50 (padrão interno com C = 1,96 pg DNA). O resultado de *L. esculentum* acesso BHG 160 normal identificou os picos de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> sobrepostos no canal 50, correspondendo ao mesmo valor de DNA que o padrão, 2C = 1,96 pg. O coeficiente de variação (CV) foi de 1,55%, sem distinção entre as duas populações (Figura 3) (Tabela 1).

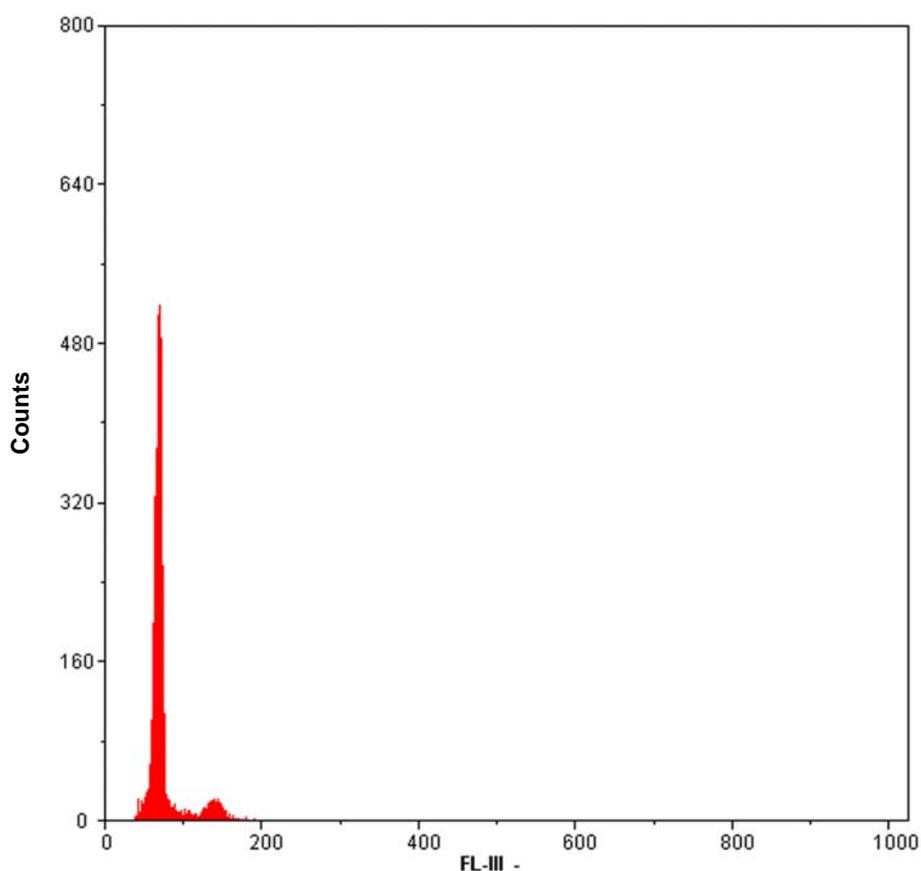


Figura 3 - Histograma representando os núcleos corados com iodeto de propídeo das espécies *L. esculentum* acesso BGH 160 normal (amostra) e *L. esculentum* var. Stupnick (padrão). Observar a presença de um único pico de núcleos na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, indicando que *L. esculentum* acesso BGH 160 possui o mesmo conteúdo absoluto de DNA da espécie utilizada como padrão, 2C = 1,96 pg.

Na avaliação do conteúdo de DNA dos núcleos em suspensão das plantas anormais foi utilizada a planta normal de *L. esculentum* acesso BGH 160 como padrão interno, calibrado para o canal 50 (com 2C = 1,96 pg DNA). No resultado, verificou-se que a planta anormal apresentou os picos G1/G0 no canal 45, correspondendo ao valor médio de 2C = 1,87 pg (Figura 4) (Tabela 1).

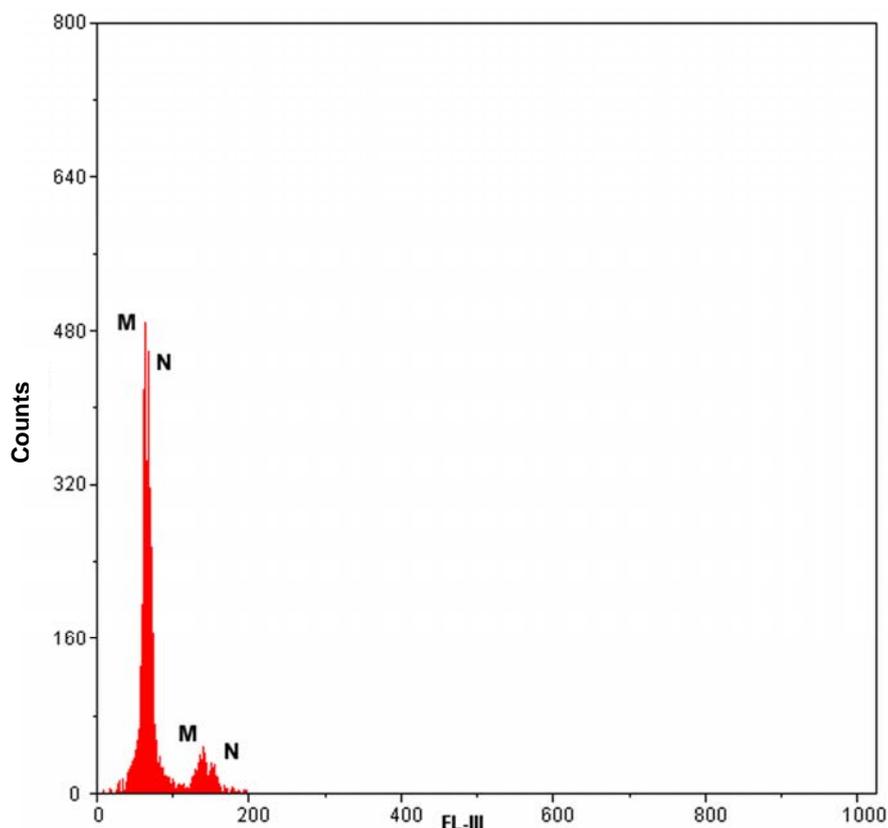


Figura 4 – Histograma representando os núcleos corados com iodeto de propídeo de *L. esculentum* acesso BGH 160. Observar os picos representando os núcleos da planta normal (N) (2C = 1,96 pg) e planta anormal (M) (2C = 1,87) em canais diferentes, indicando que o conteúdo de DNA absoluto é diferente nas plantas desse acesso.

Os resultados de *L. esculentum* acesso BGH 160 normal com os núcleos corados com DAPI mostraram G1/G0 com o pico no canal 107, com quantidade de DNA de 2C = 1,96 pg, e a planta anormal apresentou G1/G0 com o pico no canal 105, com 2C = 1,86 pg de DNA nos núcleos, uma diferença de 0,10 pg, com um CV de 1,27% (Figura 5) (Tabela 1).

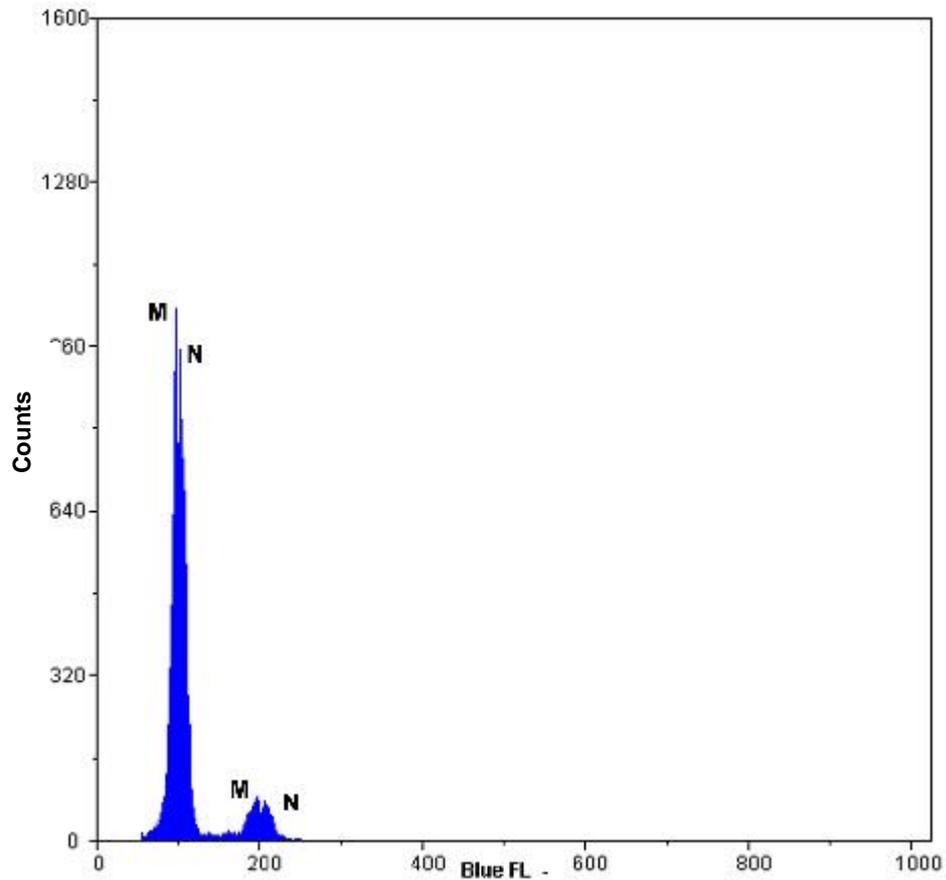


Figura 5 - Histograma de núcleos das plantas anormais e normais de *L. esculentum* acesso BGH 160 corados com o fluorocromo DAPI. Observar os picos da planta anormal (M) (2C = 1,86 pg) e da planta normal (N) (2C = 1,96 pg).

A citometria de fluxo com uso de IP e DAPI revelou que as plantas normais e anormais de *L. esculentum* acesso BGH 160 possuem diferentes quantidades de DNA por núcleo com CV < 3% (Tabela 1), sendo o conteúdo de DNA nuclear do padrão *L. esculentum* var. Stupnické (1,96 pg) determinado por Doležel et al. (1992). O corante DAPI foi utilizado por gerar histogramas com maior resolução, em comparação com o IP, porque o DAPI emite luz num comprimento de onda menor do que o IP.

Tabela 1 – Quantificação do conteúdo de DNA nuclear, em picogramas, das plantas normais (I) e anormais (II) de *Lycopersicon esculentum* acesso BGH 160, utilizando-se IP e DAPI como fluorocromos e *Lycopersicon esculentum* var. Stupnické (III) como padrão interno

Espécie	DNA (pg)		CV (%)
	IP	DAPI	
I	1,96	-	1,38
II	1,87	-	
III	1,96	-	1,55
I	1,96	-	
I	-	1,96	1,27
II	-	1,86	

IP = iodeto de propídeo, DAPI = 4'6-diamidino-2-phenylindol, pg = picogramas e CV = coeficiente de variação.

Nas avaliações citométricas do nível de ploidia das suspensões nucleares, coradas com DAPI, extraídas dos folíolos terminais de sete folhas com diferentes idades cronológicas e fisiológicas (Figura 1) das plantas normais e anormais de tomate, foram obtidos histogramas evidenciando diferentes populações celulares com relação ao conteúdo relativo de DNA. Nos histogramas foram observados três picos diferentes, com 2C correspondente ao estágio diplóide (G1), 4C relativo aos estágios G2 e G1' e o 8C referente aos núcleos G2' e G1'' entre as células somáticas dos acessos normais e anormais (Figura 6AC).

Os resultados citométricos foram estaticamente analisados com os valores de área foliar. A área foliar nas plantas normais (Figura 6B) foi crescente ao longo do desenvolvimento, diminuindo à medida que a folha era mais jovem. Nos folíolos das plantas anormais (Figura 6D) o crescimento também foi proporcional à idade fisiológica, porém apresentava menor diferença de área entre os estágios de desenvolvimento.

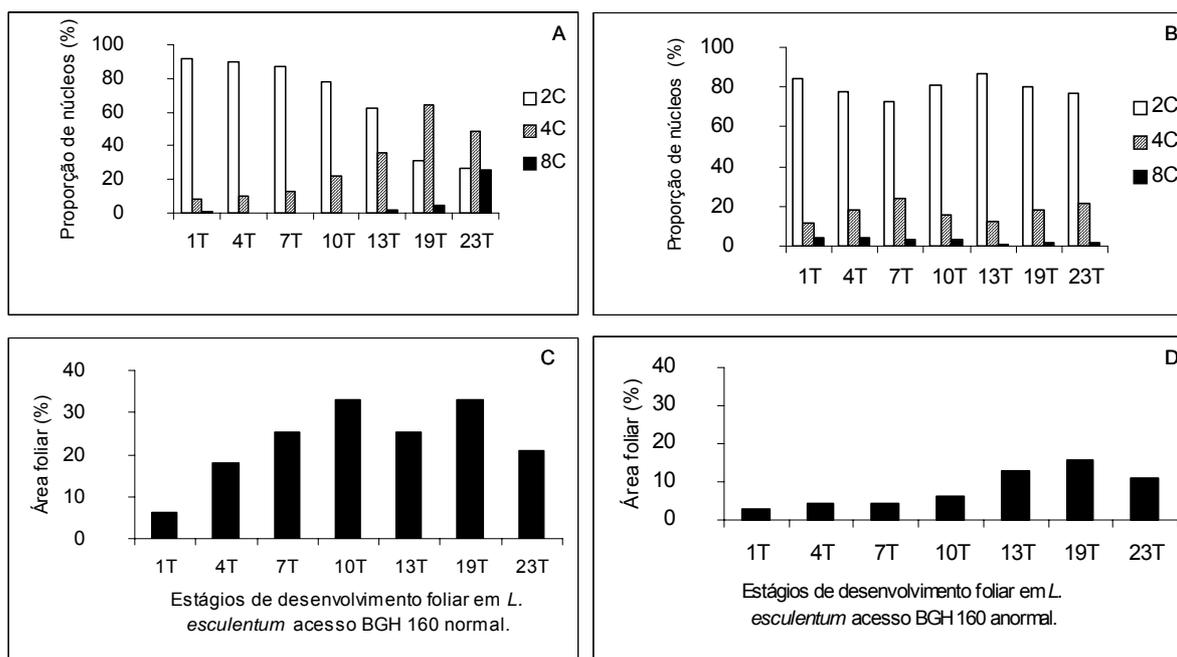


Figura 6 - Avaliação da ploidia dos folíolos de diferentes folhas de plantas normais e anormais de *L. esculentum* acesso BGH 160 pelas médias dos histogramas obtidos pela citometria de fluxo. Observar a variação da ploidia entre os folíolos se associando com a área foliar das plantas normais e anormais: A) Níveis de ploidia dos folíolos terminais nos diferentes estágios de crescimento da planta normal. B) Área foliar dos diferentes estágios de desenvolvimento dos folíolos nos indivíduos normais. C) Ploidia nos diferentes estágios de crescimento dos folíolos nas plantas anormais. D) Área foliar dos diferentes estágios de desenvolvimento da planta anormal.

A análise estatística evidenciou correlação positiva somente entre os núcleos com nível de ploidia equivalente a 4C e a área foliar nas plantas normais. Já nas plantas anormais foi encontrada uma correlação negativa entre os núcleos 8C e a área foliar (Tabela 2).

Tabela 2 - Correlação da área foliar com os diferentes níveis de ploidia em folíolos terminais de sete folhas de estágios de desenvolvimento diferentes das plantas normais e anormais de *L. esculentum* acesso BGH 160

	Ploidia			Percentual de Ploidia		
	2C	4C	8C	2Cp	4Cp	8Cp
Planta normal						
Área foliar	-0,3302 <sup>NS</sup>	0,4981 <sup>*</sup>	0,1175 <sup>NS</sup>	-0,3981 <sup>NS</sup>	0,4661 <sup>*</sup>	0,1006 <sup>NS</sup>
Planta anormal						
Área foliar	-0,1023 <sup>NS</sup>	-0,0887 <sup>NS</sup>	-0,5118 <sup>*</sup>	0,1525 <sup>NS</sup>	-0,0101 <sup>NS</sup>	-0,5092 <sup>*</sup>

Percentual (p), não significativa (NS) e significativa (\*) a 5% de probabilidade, pelo teste t.

Análises nas pétalas e sépalas das plantas normais e anormais de *L. esculentum* acesso BGH 160 foram realizadas para verificar a relação da morfologia floral com a ploidia. Os tecidos florais foram preparados para examinar os níveis de ploidia de flores frescas em três diferentes estágios de abertura da flor. As amostras revelaram núcleos 2C, 4C e 8C, com distribuição constante nas pétalas da planta normal (Figura 7A).

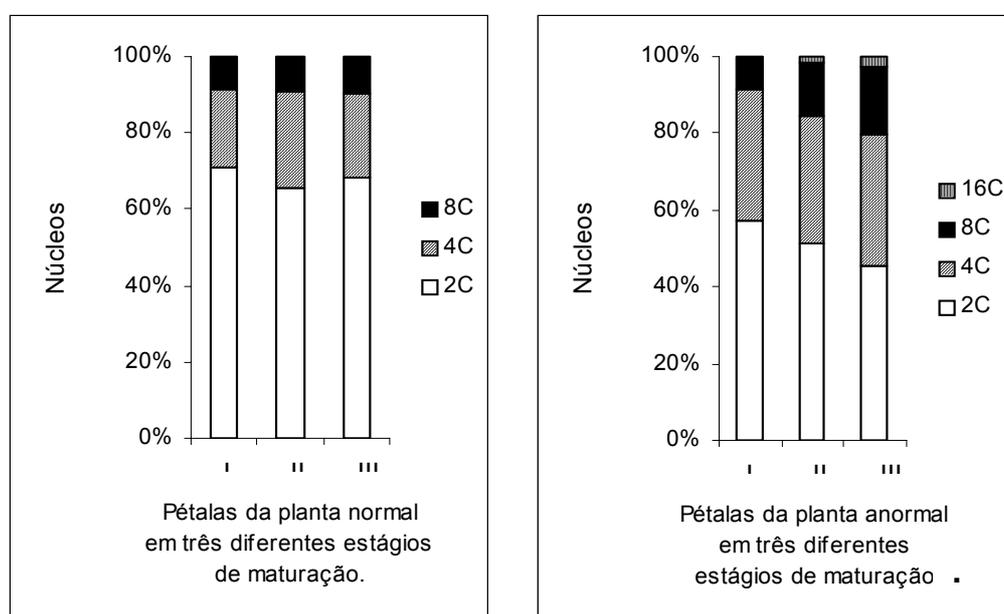


Figura 7 - Avaliação da ploidia pela citometria de fluxo com DAPI em *L. esculentum* acesso BGH 160 em três diferentes estágios de maturidade das pétalas: A) Núcleos das pétalas nas plantas normais. B) Núcleos das pétalas nas plantas anormais.

No estudo dos núcleos das sépalas dos indivíduos normais foram visualizados núcleos 2C, 4C e 8C com pouca variação entre os diferentes estágios (Figura 8A). Já nas pétalas da planta anormal observaram-se núcleos 2C, 4C, 8C e 16C de DNA, com aumento na variação da ploidia em relação à maturidade (Figura 7B). Nas sépalas das plantas anormais foram encontrados núcleos 2C, 4C e 8C, com aumento na variabilidade da ploidia quando no estágio de maior maturidade (Figura 8B).

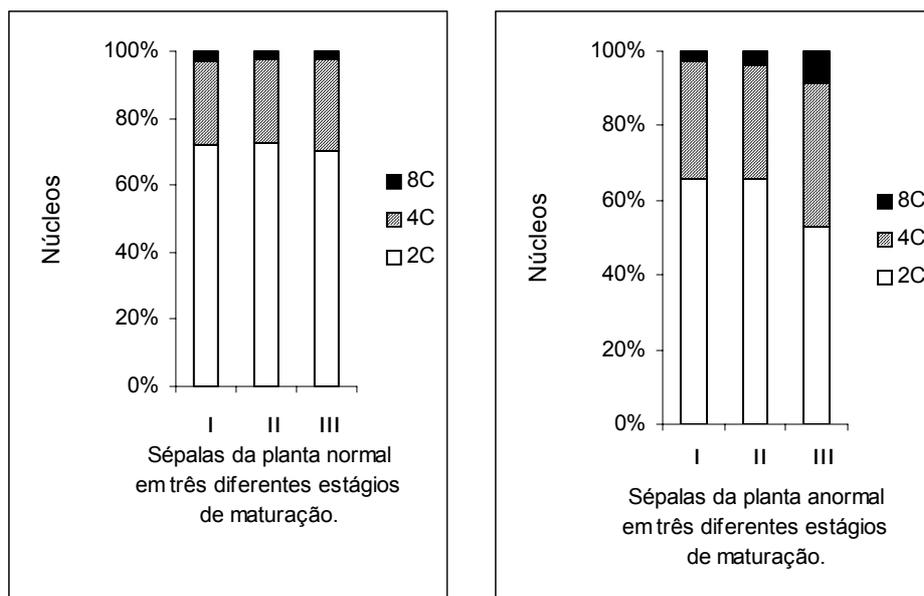


Figura 8 – Análise da ploidia pela citometria de fluxo com DAPI em núcleos de *L. esculentum* acesso BGH 160 em três diferentes estágios de maturidade das sépalas: A) Núcleos das sépalas nas plantas normais. B) Núcleos das sépalas em planta anormal.

## 4. DISCUSSÃO

Na quantificação do conteúdo de DNA nuclear da planta normal de *L. esculentum* acesso BGH 160, o valor 2C foi o mesmo do padrão interno, *L. esculentum* var. Stupnické, com DNA nuclear de 2C = 1,96 (Figura 3). Entretanto, ocorreu variação na quantidade de DNA nas plantas anormais deste acesso, com 2C = 1,87 pg utilizando IP (Figura 4) e 2C = 1,86 pg com o uso de DAPI (Figura 5). Embora o conteúdo de DNA se apresentasse similar, o valor obtido com IP é mais representativo, por não corar parcialmente as seqüências ricas em AT ou GC do genoma (DOLEŽEL, 1991; DOLEŽEL et al., 1998).

No presente estudo, os CVs obtidos, tanto nas amostras coradas com os fluorocromos IP quanto DAPI, foram inferiores a 3% (Tabela 1). CV menores que 3% são considerados de alto nível de resolução (DOLEŽEL, 1997) e indicam que os procedimentos de extração e coloração das suspensões nucleares possibilitaram a obtenção de núcleos intactos e uniformemente corados (DOLEŽEL, 1991; YAPAIAN et al., 1999).

A diferença de 4,65% na quantidade de DNA entre as plantas normais e as anormais pode estar associada com a alteração morfológica do desenvolvimento da flor e, conseqüentemente, com a ausência da produção de frutos com semente. Geralmente alterações nas quantidades de DNA nuclear são observadas entre espécies com variações cromossômicas (GREILHUBER, 1998; OHRI, 1998; BENNETT et al., 2000), presença de cromossomos extranumerários ou também a ocorrência de deleções de elementos transponíveis (BENNETT e SMITH, 1976; KALENDAR et al., 2000; GREGORY, 2005).

As alterações intra-específicas do conteúdo nuclear do DNA podem ainda ser resultantes da permuta desigual, amplificação diferencial, formação de megacromossomos, divergência de pares de bases, translocações e deleções (REES, 1972; POGGIO e HUNZIKER, 1986; GREGORY, 2005). Esses fatores, além de modificarem o conteúdo de DNA, podem causar alterações no processo morfogênico de um tecido, órgão ou até mesmo da planta.

As variações no conteúdo de DNA podem implicar níveis de ploidia da espécie ou das populações (GALBRAITH et al., 1991; YANG e LOH, 2004). O comportamento da ploidia nas plantas anormais de tomate, ao longo do

desenvolvimento foliar, pode estar relacionado com o conteúdo de DNA, pela perda de genes que poderiam ser os responsáveis pela regulação da divisão celular. Análises realizadas em *Arabidopsis thaliana* por Galbraith et al. (1991) e Melaragno et al. (1993) revelaram variabilidade do conteúdo DNA em algumas espécies, refletindo o comportamento da ploidia em algumas partes da planta.

As plantas normais de tomateiro apresentaram núcleos em 2C, 4C e 8C na avaliação de sete estágios diferentes de desenvolvimento das folhas obtidas de 23 nós da planta. O maior percentual de núcleos 2C foi observado até o folíolo 13T (terminal) (Figura 6A), pois nas regiões subseqüentes das folhas, 19T e 23T, ocorreu maior número de núcleos 4C, verificando-se que nesses estágios os folíolos começaram a apresentar redução no crescimento (Figura 6B).

Kudo e Kimura (2002), avaliando a ploidia no desenvolvimento de *Raphanus sativus*, averiguaram que tecidos mais jovens, como o de embriões, possuíam grande quantidade de núcleos 2C. Porém, as células provenientes das folhas mais velhas, além de apresentarem núcleos 2C e 4C, possuíam pequena quantidade dos núcleos 8C. Esse comportamento da ploidia é considerado normal, tanto em *Raphanus* quanto em outras plantas (KUDO e KIMURA, 2001).

Nos folíolos das plantas anormais de tomate foi constatada a presença de núcleos 2C, 4C e 8C (Figura 6) em todos os folíolos, independentemente do estágio de desenvolvimento. A maior quantidade de núcleos 2C foi identificada nos folíolos 1T a 13T. Os núcleos 4C foram observados em maior número nos folíolos 7T, 19T e 23T. Galbraith et al. (1991), em estudos de diferentes estágios de desenvolvimento de folíolos em *Arabidopsis*, detectaram maior quantidade de núcleos 2C ocorrida em folíolos mais jovens. Os núcleos 8C foram observados em maior quantidade nos folíolos mais jovens, como na folha 4T, mostrando um comportamento semelhante nas mais desenvolvidas. Segundo Kudo e Kimura (2002), esse desenvolvimento diferencial poderia estar relacionado com a alteração do conteúdo de DNA resultante da atividade celular irregular.

Na correlação da variação de ploidia das plantas normais com a área dos folíolos foi constatado que os folíolos com maior área foliar apresentavam maior número de células com núcleos 4C e 8C, sendo maior a correlação entre área foliar e ploidia com os núcleos 4C (Tabela 2). Os resultados indicam que a presença de células com diferentes níveis de ploidia afeta o desenvolvimento fisiológico e morfológico da folha. Segundo Yang e Loh (2004), em folhas de

*Spathoglottis plicata* células com distintos níveis de ploidia foram encontradas nos órgãos com maior área, nas plantas de mesmo conteúdo de DNA nuclear.

Nas plantas anormais, a correlação entre a área foliar e a variação de ploidia foi negativa nos núcleos 8C. Foram encontradas em folíolos jovens e de estágio completo de desenvolvimento células com núcleos 8C e os 2C e 4C, sem variação em relação aos diferentes estágios dos folíolos. A área foliar não correspondeu ao desenvolvimento fisiológico e nem à variação da ploidia, como foi constatado nos folíolos das plantas normais. Essas alterações poderiam ser justificadas pela diferença da quantidade do conteúdo de DNA encontrado nos indivíduos anormais, pois em folhas de *Glycine max*, com diferentes conteúdos de DNA, os níveis de ploidia variaram desde os primórdios foliares até os estágios mais avançados do desenvolvimento das folhas (CHUNG et al., 1998).

Nas pétalas dos indivíduos normais de tomate (Figura 2), o nível de ploidia variou entre 2C, 4C e 8C (Figura 7A). Os tecidos mais jovens apresentaram maior número de núcleos 2C e 4C, característica encontrada quando ocorre o crescimento normal das estruturas. Kudo e Kimura (2002), estudando diferentes estágios de desenvolvimento de pétalas em *Brassica olerace*, também encontraram células com diferentes ploidias. A maior variação de ploidia foi constatada na parte distal da pétala e considerada normal ao longo do desenvolvimento das estruturas, pois é resultante da proliferação e ontogênese das células.

Em *L. esculentum* acesso BGH 160 anormal, as pétalas apresentaram variação de ploidia nos núcleos de 2C a 16C de DNA (Figura 7B). Nos estágios iniciais de desenvolvimento, os núcleos prevaletentes foram os de 2C e 4C, e nas pétalas mais desenvolvidas ocorreu aumento da quantidade de núcleos 8C e 16C. Segundo Mizukami (2001) e Sugimoto-Shirasu e Roberts (2003), a variação do conteúdo de DNA nuclear estaria relacionada com a expressão dos genes alterando o comportamento da ploidia nas plantas anormais e, com isso, apresentando alterações na morfologia floral.

Nas avaliações dos níveis de ploidia das sépalas de *L. esculentum* acesso BGH 160 planta normal (Figura 8A) e anormal (Figura 8B), os núcleos apresentaram ploidia de 2C a 8C. A variação de ploidia foi maior no estágio III da planta anormal. Nas sépalas das plantas normais, foi observado constância entre as variações da ploidia. Yang e Loh (2004), analisando a ploidia das pétalas de

*Spathoglottis plicata* em diferentes regiões, observaram que as partes com maior maturidade fisiológica apresentaram variações crescentes no nível de ploidia, enquanto as regiões mais jovens exibiram pouca variação na quantidade de núcleos 2C, 4C e 8C. A variação do nível de ploidia nos núcleos durante o desenvolvimento das plantas pode estar associada com ciclo de vida, tamanho do genoma, tipo de órgão, estágio de desenvolvimento e maturidade (ALTAMURA et al., 1987).

### **Caracterização morfológica dos cromossomos de *Lycopersicon esculentum* Mill acesso BGH 160**

#### **RESUMO**

*Lycopersicon esculentum* Mill, pertencente ao gênero *Lycopersicon* da família Solanaceae, é composto por nove espécies originárias das regiões montanhosas dos Andes. Consumida em todos os continentes, é a segunda olerícola mais cultivada do mundo. Parte do aumento da produção do tomate tem sido atribuída aos trabalhos conduzidos pelos programas de melhoramento e as inovações geradas, pelos processos biotecnológicos. Estudos citogenéticos do tomateiro revelaram um número cromossômico equivalente a  $2n = 2x = 24$ . Os objetivos deste trabalho foram: (I) Obter cromossomos de *L. esculentum* com morfologia adequada para reavaliar a caracterização morfológica em termos de classificação e posição das constrições; (II) Montar os kariogramas de *L. esculentum* var. Stupnické e *L. esculentum* acesso BGH 160 normal e anormal; (III) Comparar os kariogramas de *L. esculentum* var. Stupnické com *L. esculentum* acesso BGH 160 normal e anormal. Com as metodologias utilizadas, obteve-se acúmulo de metáfases suficientes para as análises citogenéticas em *L. esculentum*. A fixação e maceração enzimática, além das técnicas aplicadas de dissociação celular e secagem ao ar, proporcionaram cromossomos morfológicamente preservados, sem sobreposições, pouco condensados e com constrições bem definidas, permitindo a montagem do kariograma e a geração de informações acerca da organização dos cromossomos dessa espécie. No complemento de *L. esculentum*  $2n = 2x = 24$  cromossomos, foi observada a presença de um par cromossômico metacêntrico (6) e no dos demais, submetacêntricos. Pela impregnação da prata do bandeamento Ag-NOR em *L. esculentum* var. Stupnické foi evidenciada a NOR ativa na porção mediana do cromossomo 1. As observações do kariótipo de *L. esculentum* acesso BGH 160 anormal permitiram a identificação de uma deleção em um dos homólogos do par 1. Essa deleção provavelmente é responsável pelas alterações morfológicas nos botões florais e na formação dos frutos, além de justificar a variação do conteúdo

de DNA e as alterações da ploidia ao longo do desenvolvimento das plantas anormais.

Palavras-chave: *L. esculentum*, cromossomos, deleção e NOR.

# 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Lycopersicon* é composto por nove espécies relacionadas quanto a morfologia, adaptação ambiental, aspectos anatômicos e semelhanças de compatibilidade reprodutiva. O gênero é originário das regiões montanhosas dos Andes, Peru, Equador e Bolívia e pertence à família Solanaceae, com reprodução tipicamente autógama (MULLER, 1940; QUIROS, 1991; GIORDANO e SILVA, 1999).

Os estudos citogenéticos em tomateiro se iniciaram com Winkler (1909), que propôs, pela primeira vez, o número cromossômico diplóide, a partir de meristemas radiculares desse gênero, como sendo  $2n = 2x = 24$ . Os cromossomos 5, 11 e 12 foram classificados como metacêntricos e os demais, submetacêntricos (QUIROS, 1991; SHERMAN e STACK, 1992).

Segundo Banks (1984), algumas cultivares de *L. esculentum* podem apresentar variabilidade no número cromossômico. Isso foi observado em Flora, Florida, Tropi Red, Burgis, Hayslip, Duke, Mountain Pride, NC 50-7, Calypso e Redlands Summertaste, com  $2n = 26$  e com  $2n = 25$  na cultivar Sunny. O estágio de diacinese dessas plantas apresentaram cromossomos associados em 13 bivalentes e 12 bivalentes mais um univalente.

As alterações cromossômicas podem levar a anormalidades durante o processo morfogênico de tecidos, órgãos ou até mesmo do indivíduo (SYBENGA, 1992). Porém, se a alteração envolver quebra, isso pode ocorrer dentro de um gene, com interrupção de sua função (ZANETTINI e LAUXEN, 2003). Se o distúrbio incidir numa célula somática, pode haver efeito fenotípico em uma célula ou num setor de tecidos. No entanto, distúrbios que ocorrem em tecidos germinais podem gerar meiócitos heterozigotos (SYBENGA, 1992).

A análise dos cromossomos permite a detecção de variações estruturais relacionadas com anormalidades decorrentes do desenvolvimento. Nesses estudos podem ser utilizadas técnicas de bandeamento, possibilitando avaliações detalhadas das transformações no nível de tecido que ocorreram em grupos de espécies, além da compreensão de alterações morfológicas em nível de órgãos (SATO et al., 1980; SUMNER, 1990).

Com o bandeamento Ag-NOR, é possível identificar as regiões organizadoras nucleolares ativas (NOR ativa), que é constituída em um ou mais pares cromossômicos, os quais possuem os genes rDNA responsáveis pela formação dos diferentes tipos de rRNA que formam o nucléolo e os ribossomos (MILLER et al., 1976; HOWELL e BLACK, 1980; SUMNER, 1990; GUERRA, 1988; SUMNER, 2003). O rRNA codificado pelo genes rDNA associa-se a proteínas específicas no nucléolo para formar as subunidades ribossomais (LACADENA et al., 1984; HASTEROK e MALUSZYNSKA, 2000).

Nos cromossomos paquitênicos de *L. esculentum*, com o bandeamento Ag-NOR, foi constatada a presença da NOR ativa no braço curto do par cromossômico 2 (QUIROS, 1991). A dificuldade na identificação da NOR ativa em *Lycopersicon* está relacionada com o tamanho dos cromossomos e com o grau de compactação (MOENS, 1965; SHERMAN e STARCK, 1992), sendo que a identificação e localização corretas da NOR ativa no tomateiro ainda têm gerado controvérsias (SHERMAN e STARCK, 1992; SYBENGA, 1992).

O grau de compactação da cromatina também dificulta a identificação de variações cromossômicas numéricas ou estruturais no tomateiro, sendo necessárias técnicas adequadas para as análises citogenéticas (ALVAREZ, 1997). Segundo Kato e Fukui (1998), o uso de agentes antimitóticos como APM com controle da concentração, temperatura e tempo proporcionam cromossomos bloqueados com compactação desejável sem alterar a morfologia. O APM, por apresentar resultados satisfatórios no acúmulo de metáfases, tem sido utilizado em diversas plantas, como nos cereais (DOLEŽEL et al., 1999).

Técnicas como a fixação do material, maceração enzimática, dissociação celular e secagem ao ar possibilitam a obtenção de um material cromossômico adequado para a realização de bandeamentos. Além disso, as metodologias de dissociação celular e secagem ao ar permitem preparações sem resíduos de parede celular, com cromossomos no mesmo plano da lâmina, individualizados e com constrições primárias e secundárias bem preservadas (CARVALHO e SARAIVA, 1993; ANDRAS et al., 2000).

Com o auxílio de programas de análise de imagens, é possível a captura da figura dos cromossomos com melhor qualificação visual (FUKUI, 1986). Além de proporcionar um atributo considerável para a resolução e caracterização citogenética de cromossomos de tamanho reduzido, com as ferramentas

disponíveis é possível intensificar os contrastes e eliminar *backgrounds* sem alteração das características (FUKUI, 1986; GUTTENBERGER, 1994).

Considerando a necessidade de aprimoramento de estratégias citogenéticas para melhor caracterização cariotípica das plantas normais e anormais de *L. esculentum* acesso BGH 160 e esclarecimento de algumas controvérsias que a literatura vem apresentando a respeito da classificação dos cromossomos e posição da NOR neste gênero, foram propostos os seguintes objetivos: (I) Obter os cromossomos de *L. esculentum* para caracterização morfológica, quanto à classificação e posição das constrições; (II) Montar os kariogramas de *L. esculentum* var. *Stupnické* e *L. esculentum* acesso BGH 160 normal e anormal; e (III) Comparar os kariogramas de *L. esculentum* var. *Stupnické* com *L. esculentum* acesso BGH 160 normal e anormal.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal**

Nas análises citogenéticas foram utilizadas 50 sementes das plantas normais e anormais de *Lycopersicon esculentum* acesso BGH 160 (provenientes da cidade de Muribeca – Sergipe), cedidas pelo Prof. Derly José Henriques da Silva, curador do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. As sementes de *Lycopersicon esculentum* var. Stupnické, utilizadas como padrão de cariótipo do acesso em questão, foram fornecidas pelo Dr. Jaroslav Doležel, do Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria do Instituto Experimental Botânico, Sokolovska – República Tcheca.

### **2.2. Obtenção, tratamento e fixação dos meristemas radiculares**

As análises mitóticas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal do Departamento de Biologia Geral (DBG) da UFV. As sementes das plantas normais de *L. esculentum* acesso BGH 160 e de *L. esculentum* var. Stupnické foram germinadas em placas de Petri, contendo papel-filtro e água destilada. Essas placas foram mantidas em BOD, no escuro, à temperatura de 28 °C.

Os meristemas radiculares das plantas anormais de *L. esculentum* acesso BGH 160 foram obtidos por estacas a partir de três plantas-matriz. As estacas com aproximadamente 15 cm de comprimento foram colocadas em frascos contendo água, à temperatura de 30 °C, até o enraizamento.

Após atingirem o tamanho de 1,0 a 1,5 cm de comprimento, as raízes, obtidas de semente ou de estaca, foram submetidas aos procedimentos de bloqueio. Com a finalidade de acumular células em metáfases foi utilizado APM na concentração 3 µM, por um período de 14 h, a uma temperatura de 4 °C. Posteriormente, as raízes foram lavadas em água destilada para remover o excesso da solução antimitótica e fixadas em solução de metanol : ácido acético (PA) na proporção 3:1, a -20 °C.

### **2.3. Maceração enzimática**

Para maceração enzimática, as raízes foram retiradas da solução fixadora e lavadas em água destilada. Em seguida, foram transferidas para tubos de microcentrífuga Eppendorf™ de 1,5 mL, contendo um complexo enzimático (tampão citrato 0,01 M + 1% macerozime Yakult R10® +1% celulase SIGMA® +1% hemicelulase SIGMA® + 20% de pectinase SIGMA®) por 2 h a 34 °C. Após a digestão enzimática, as raízes foram lavadas por um período de 15 min em água destilada, com três trocas e fixadas em solução de metanol : ácido acético (3:1) a -20 °C.

### **2.4. Preparação das lâminas**

As lâminas foram preparadas, segundo Carvalho e Saraiva (1993, 1997), pela dissociação do meristema radicular e secadas ao ar em movimentos rápidos, e em placa aquecedora a 50 °C. Algumas lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5% (tampão fosfato pH 6,8), por 3 min, à temperatura ambiente, lavadas duas vezes em água destilada e secadas ao ar e em placa aquecedora à temperatura de 50 °C.

### **2.5. Bandeamento Ag-NOR**

Algumas lâminas de *L. esculentum* var. Stupnické foram submetidas ao bandeamento Ag-NOR, segundo Funaki et al. (1975). A solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) 50% foi gotejada sobre cada lâmina. Depois de cobertas com lamínula de vidro, as lâminas foram colocadas em câmara úmida a 34 °C, por 19 h. Decorrido o tempo de incubação, as lamínulas foram removidas com jato de água e as lâminas, lavadas em água corrente por 2 min e em água destilada por 1 min.

## 2.6. Análise do cariótipo

A observação e análise das lâminas foram realizadas com o uso de microscópio Olympus<sup>TM</sup>, modelo BX 60, iluminação de campo claro, usando-se a objetiva de 100 x (imersão em óleo). As imagens de interesse foram capturadas diretamente, por meio de vídeo-câmera acoplada ao microscópio e a um microcomputador Macintosh<sup>TM</sup> (modelo G4), equipado com placa digitalizadora. Tais imagens foram analisadas por meio do programa *Image SXM* (BARRETT, 2002) de domínio público, o qual pode ser obtido via internet (<http://reg.ssci.liv.ac.uk>). Os braços de cada cromossomo foram medidos em pixels e convertidos em escala de micrômetros. A razão entre os braços ( $r$ ) foi determinada segundo o critério de classificação morfológico dos cromossomos descritos por Guerra (1986).

### 3. RESULTADOS

Os procedimentos adotados no pré-tratamento resultaram em metáfases morfológicamente definidas, individualizadas e no mesmo plano da lâmina. Com o uso do antitubulínico APM na concentração de 3  $\mu\text{M}$  pelo período de 14 h a 4 °C, foram obtidas metáfases em quantidade suficiente para análise.

As metodologias utilizadas auxiliaram a contagem do número e a caracterização dos cromossomos de *L. esculentum* var. Stupnické (Figura 1). Esse genótipo foi empregado como referência em relação à classificação e número de cromossomos e também na identificação da NOR ativa. O complemento diplóide das espécies analisadas foi evidenciado como sendo  $2n = 24$  cromossomos (Figura 2), sendo um metacêntrico (6) e os demais, submetacêntricos. O comprimento dos cromossomos variou, em média, de 2,07 a 4,08  $\mu\text{m}$  (Tabela 1).

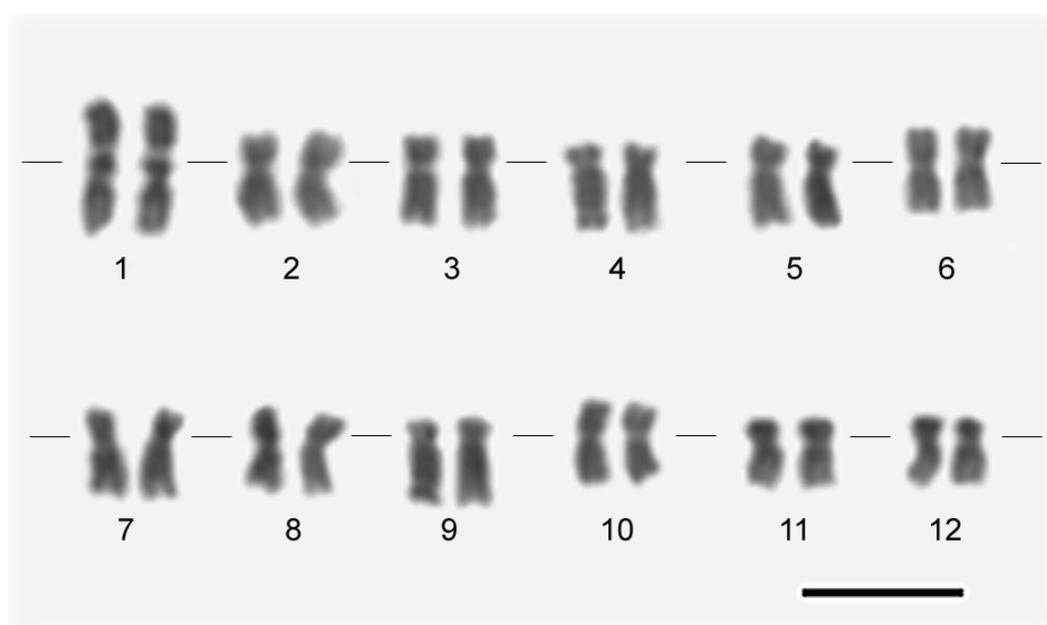


Figura 1 - Cromossomos metafásicos de *L. esculentum* var. Stupnické pré-tratados com APM 3  $\mu\text{M}$  durante 14 h a 4 °C e corados com a solução Giemsa por 3 min. Observar a presença de constrição secundária adjacente à primária no par de cromossomo 1 e a morfologia bem preservada dos cromossomos. Barra = 5  $\mu\text{m}$ .

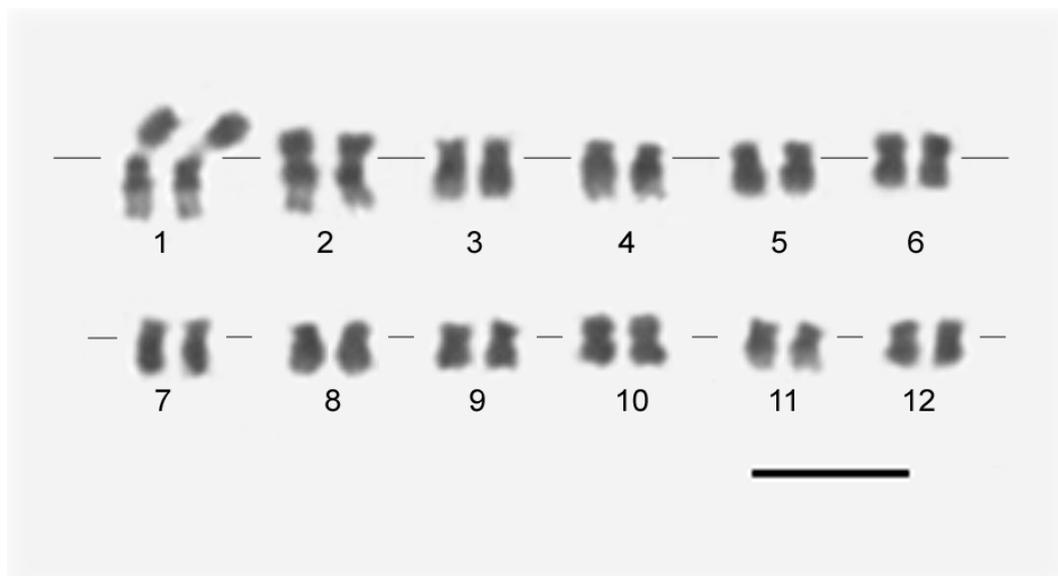


Figura 2 - Cromossomos metafásicos da planta normal de *L. esculentum* acesso BGH 160, pré-tratados com APM 3  $\mu$ M por 14 h e corados com a solução Giemsa por 3 min. Observar o cariograma ( $2n = 24$ ) com um cromossomo metacêntrico (6), os demais submetacêntricos e a presença de constrição secundária no par 1. Barra = 5  $\mu$ m.

Tabela 1 – Morfometria dos cromossomos metafásicos de *L. esculentum* acesso BGH 160 (normal)

<i>L. esculentum</i> Acesso BGH 160 Normal					
Cromossomo	Total ( $\mu$ m)	Braço ( $\mu$ m)		r	Classe
		Curto	Longo		
1	4,08	1,49	2,58	1,73	SM
2	2,88	0,95	1,93	2,03	SM
3	2,77	0,95	1,82	1,91	SM
4	2,64	0,84	2,07	2,46	SM
5	2,64	0,76	1,88	2,46	SM
6	2,61	1,06	1,55	1,46	M
7	2,58	0,98	1,60	1,64	SM
8	2,53	0,73	1,79	2,44	SM
9	2,50	0,84	1,66	1,97	SM
10	2,45	0,87	1,58	1,81	SM
11	2,17	0,73	1,44	1,96	SM
12	2,07	0,71	1,36	1,92	SM
Total	31,92				

r = razão entre os braços longo e curto, M = metacêntricos e SM = submetacêntrico.

Já a análise citogenética da planta anormal de *L. esculentum* acesso BGH 160 revelou a presença de uma deleção no braço curto em um dos cromossomos homólogos do par 1 (Figuras 3 e 4).

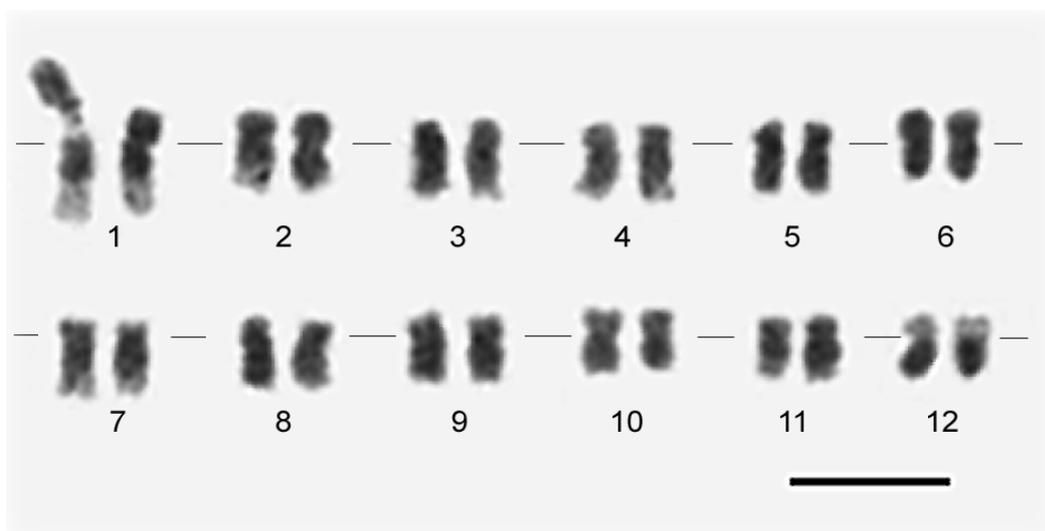


Figura 3 - Cromossomos metafásicos da planta anormal de *L. esculentum* acesso BGH 160 pré-tratados com APM 3 µM por 14 h e corados com a solução Giemsa por 3 min. Barra = 5 µm.

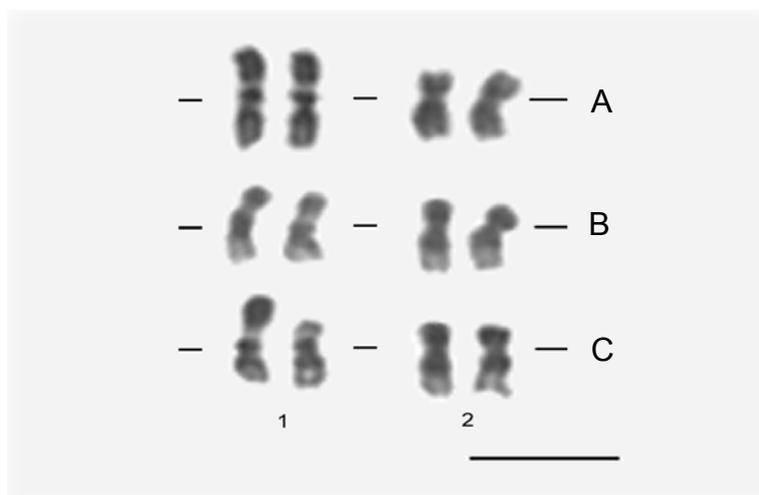


Figura 4 – Coleção de pares de cromossomos homólogos em metáfase (1 e 2) de *L. esculentum* var. Stupnické (A), *L. esculentum* acesso BGH 160 (normal) (B) e *L. esculentum* acesso BGH 160 (anormal) (C). Observar a deleção em um dos homólogos do par cromossômico 1 da planta anormal de *L. esculentum* acesso BGH 160. Os pares de cromossomos 2 foram utilizados como referência. Barra = 5 µm.

O bandeamento Ag-NOR em *L. esculentum* var. Stupnické evidenciou, pela impregnação da prata em proteínas relacionadas à transcrição dos genes rDNA, a NOR ativa na porção mediana do braço curto do cromossomo 1 (Figura 5). Um dos cromossomos homólogos do par 1 permaneceu ligado ao nucléolo, e isso ocorreu com o uso das metodologias, retardando o afastamento do cromossomo da NOR ativa do nucléolo.

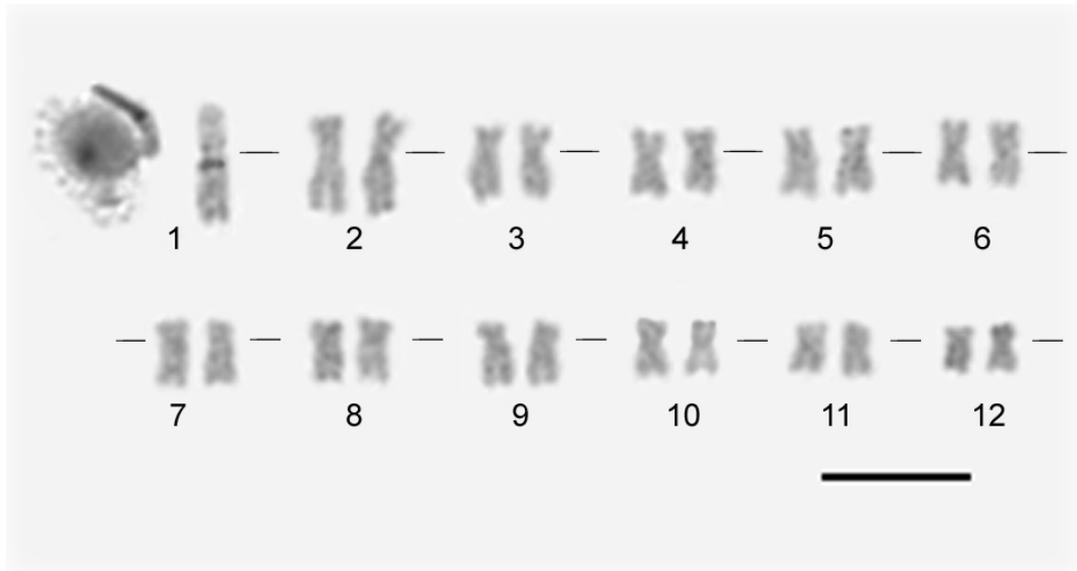


Figura 5 - Cromossomos metafásicos de *L. esculentum* var. Stupnické, pré-tratados com APM 3  $\mu$ M durante 14 h a 4 °C e submetidos ao bandeamento Ag-NOR. Observar a banda NOR positiva na porção mediana no par de cromossomo 1 e um desses cromossomos homólogos associado ao nucléolo. Barra = 5  $\mu$ m.

## 4. DISCUSSÃO

O número cromossômico observado de *L. esculentum* foi  $2x = 24$ , o mesmo descrito por Winkler (1909). Em razão da qualidade dos cromossomos metafásicos obtidos, foi possível identificar e caracterizar morfometricamente cada par de homólogos com constrições primárias e secundárias definidas (Figuras 1, 2 e 3 e Tabela 1). Winkler (1909) obteve o número cromossômico de *Lycopersicon* por preparações incluídas em parafina, caracterizando estes como pequenos e arredondados. Já Banks (1984) em *L. esculentum*, utilizando a técnica de esmagamento, constatou diferentes números de cromossomos,  $2x = 25$  ou  $2x = 26$ . As preparações em parafina e corte histológico, assim como as técnicas de esmagamento, segundo Sumner (1990) e Andras et al. (1999), geralmente resultam em cromossomos sobrepostos, dificultando análises citogenéticas confiáveis.

Em relação à posição do centrômero, observou-se um cromossomo metacêntrico (6) (Figuras 1, 2 e 3) e os demais, submetacêntricos. Contudo, outra classificação foi relatada por Lapitan et al. (1989), Quiros (1991), Sherman e Stack (1992) como três metacêntricos (5, 11, 12) e os demais, submetacêntricos. Esses autores utilizaram a técnica de esmagamento e analisaram cromossomos meióticos em paquíteno. Winkler (1909), empregando preparações incluídas em parafina de *Lycopersicon*, obteve cromossomos com morfologia que não possibilitou a identificação das constrições primárias e secundárias.

Neste estudo, o uso do bloqueador mitótico APM e da solução fixadora metanol:ácido acético proporcionou a obtenção de cromossomos metafásicos com integridade morfológica, que possibilitaram a classificação e identificação dos pares de homólogos. Segundo Doležel et al. (1999) e Planchais et al. (2000), o APM é um antitubulínico que proporciona o acúmulo de células metafásicas por possuir alta afinidade pelas tubulinas vegetais. Já a solução fixadora evita a perda de ácidos nucleicos e proteínas, preservando a morfologia dos cromossomos e provocando a precipitação de nucleases que podem danificá-los (DIETRICH, 1986). A técnica de dissociação celular e secagem ao ar (CARVALHO e SARAIVA, 1997) possibilitou a obtenção de cromossomos distendidos sobre a lâmina sem sobreposições e adequados para análises.

Em *L. esculentum* acesso BGH 160 anormal foi observada uma deleção no braço curto em um dos homólogos do par 1 de aproximadamente 25,2% (Figuras 3 e 4). Na análise do conteúdo de DNA pela citometria de fluxo foi verificada a perda do genoma de 0,09 picograma, porém não foi identificado o tipo de variação cromossômica (KARSBURG e CARVALHO, no prelo). A identificação dos tipos de alterações cromossômicas e das regiões específicas da ocorrência de deleção possibilita o entendimento das modificações que podem ser ocasionadas pela perda de determinado segmento do cromossomo (SYBENGA, 1992; WORDRAGEN et al., 1996).

A deleção em um dos homólogos do par 1 em *L. esculentum* acesso BGH 160 anormal provavelmente foi responsável pela variação na morfologia floral, com número irregular de pétalas e presença de petalóides, no qual se formam os grãos de pólen com formas e tamanhos variados, formação de pseudocarpelo e presença de frutos com forma imbricada sem sementes. Belliard et al. (1978), estudando híbridos de *Nicotiana tabacum* com o uso de nucleases de restrição de EcoRI, constataram a perda de um fragmento de DNA desse genoma. Esse híbrido apresentou flores com o número de peças florais variado.

A formação dos grãos de pólen nas estruturas petalóides e a ornamentação variada destes com reduzida germinação polínica nas plantas anormais de *L. esculentum* acesso BGH 160 provavelmente foi decorrente da deleção de parte do genoma (KARSBURG e CARVALHO, no prelo). Kakani et al. (1999), estudando grãos de pólen de *Gossypium*, observaram ornamentações atípicas e redução na germinação do tubo polínico, características ocasionadas pela deleção de um dos homólogos do par 12.

Os gametas portadores da deficiência perdem em competitividade com os gametas normais, ocasionando redução na formação de frutos com ou sem sementes (SYBENGA, 1992; PAGLIARINI, 2001). Em *Triticum aestivum*, com o uso de agentes físicos, raios X, ocorreu a deleção em um dos homólogos do cromossomo 2, produzindo plantas com sementes estéreis (ENDO e GILL, 1996).

As deleções de segmentos do genoma podem ainda ocasionar variações na cor dos frutos, como ocorrência de *L. esculentum*, com eliminação de parte do braço longo de um dos homólogos do cromossomo 6 (WORDRAGEN et al., 1996). Em *Zea mays*, a eliminação de parte do braço curto em um dos homólogos

do cromossomo 9 causou a formação de sementes albinas (ROBERTSON et al., 1993).

A reavaliação da localização da NOR ativa em *L. esculentum* var. Stupnické pelo bandeamento Ag-NOR possibilitou a identificação dessa região na porção mediana do braço curto do cromossomo 1 (Figura 4). Segundo Kush e Rick (1954), Quiros (1991), Peterson et al. (1996) e Emmanuel e Levy (2002), nos cromossomos paquitênicos de *L. esculentum* a NOR ativa estaria localizada no par 2. Porém, esses autores alegaram que tiveram dificuldades na identificação das regiões ativas pela impregnação e grau de compactação dos cromossomos.

*L. esculentum* var. Stupnické foi utilizado para a identificação da NOR por não apresentar alterações morfogênicas durante o desenvolvimento. Além da caracterização da NOR ativa no cromossomo 1, foi observada a associação de um dos homólogos ao nucléolo durante a metáfase (Figura 4). Segundo Guerra (1988) e Sumner (2003), os cromossomos que contêm a constrição secundária são freqüentemente vistos na prófase associados com o nucléolo. Essa associação se deve ao fato de que nas constrições secundárias se situam os genes que produzem determinados tipos de RNA ribossomais, que constituem grande parte do nucléolo. Com a utilização de agentes antimitóticos APM e orizalina, é freqüente a visualização do nucléolo associado com os cromossomos que possuem a NOR ativa, pois o uso de bloqueadores em curto espaço de tempo pode favorecer a preservação do nucléolo na metáfase sem alterar a estruturação dos cromossomos (CONTIM et al., 2005).

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Com as avaliações e caracterizações morfológicas realizadas em *L. esculentum* acesso BGH 160, foram observadas plantas com comportamentos normal e anormal quanto à estruturação dos botões florais. Pelo comportamento fenotípico do acesso em questão, e em virtude das variações morfológicas nas plantas anormais, em comparação com as descrições de outros tomateiros de variações similares, não foi possível classificar as alterações pelas descrições da literatura.

Pela quantificação do conteúdo de DNA, foi observada uma diferença de 0,09 pg entre as plantas de *L. esculentum* acesso BGH 160 normais e anormais. As diferenças do conteúdo de DNA absoluto nas plantas do acesso podem ter ocorrido pela variação cromossômica.

Na análise da variação da ploidia com a área foliar, verificou-se correlação entre as duas variáveis nas plantas normais para os núcleos 4C. Porém, nas plantas anormais, a área foliar não correspondeu à variação da ploidia, tanto que a correlação entre a ploidia e a área foliar foi negativa para os núcleos 8C. Considerando-se que o comportamento diferencial das plantas anormais poderia estar relacionado com a diferença do conteúdo de DNA, este estudo enfatizou as avaliações citogenéticas entre esses dois tipos de plantas.

Com as metodologias utilizadas em *L. esculentum*, de bloqueio, fixação, maceração enzimática, dissociação celular e secagem ao ar, obteve-se acúmulo de metáfases, com cromossomos morfológicamente preservados, sem sobreposições, pouco condensados e com constrições bem definidas suficientes para as análises citogenéticas.

O material possibilitou a montagem do cariograma e o fornecimento de informações acerca da organização dos cromossomos dessa espécie. Além da identificação de uma deleção em *L. esculentum* acesso BGH 160 anormal presente em um dos homólogos do par 1. A deleção possivelmente tenha se originado de distúrbios meióticos, sendo ela provavelmente responsável pelas alterações morfológicas nos botões florais.

## 6. REFERÊNCIAS

- AL-HAMMADI, A. S. A.; SREELAKSHMI, Y.; NEGI, S.; SIDDIQI, I.; SHARMA, R. The *polycotyledon* mutant of tomato shows enhanced polar auxin transport. **Plant Physiology**, v.133, p.113-125, 2003.
- ALTAMURA, M. M.; BASSI, P.; CAVALLINI, A.; GIONINI, G.; CREMONINI, R. MONACELLI, B.; PASQUA, G.; SASSOLI, O.; TRAN, T. V. K.; CIONINI, P. G. Nuclear DNA changes during plant development and morphogenetic response *in vitro* of *Nicotiana tabacum* tissues. **Plant Science**, v.53, p. 73-79, 1987.
- ALVAREZ, E. The strategy goes detecting chromosome –specific rearrangents in rye. **Genome**, v.40, p. 451-457, 1997.
- ANDRAS, S. C.; HARTMAN, T. P. V.; ALEXANDER, J.; McBRIDE, R.; MARSHALL, J. A.; POWER, J. B.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R. Combined PI-DAPI staining (CPD) reveals NOR asymmetry and facilitates karyotyping of plant chromosomes. **Chromosome Research**, v.8, p. 387-391, 2000.
- ANDRAS, S. C.; HARTMAN, T. P. V.; MARSHALL, J. A.; MARCHANT, R.; POWER, J. B.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R. A drop-spreading technique to produce cytoplasm-free mitotic preparations from plants with small chromosomes. **Chromosome Research**, v.7, p. 641-647, 1999.
- AVIVI, Y.; LEV-YADUN, S.; MOROZOVA, N.; LIBS, L.; WILLIAMS, L.; ZHAO, J.; VARGHESE, G.; GRAFI, G. *Clausa*, a tomato mutant with a wide range of phenotypic perturbations, displays a cell type-dependent expression of the homeobox gene LeT6/TKn2. **Plant Physiology**, v. 124, p. 541-551, 2000.
- BANKS, P. A new diploid chromosome number for tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Canada Journal Genetics Cytology**, v.26, p.636-639, 1984.

- BAROW, M.; MEISTER, A. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. **Plant Cell and Environment**, v.26, p. 571-584, 2003.
- BARRETT, S. D. Software for scanning microscopy. **Proceedings of the Royal Microscopy Society**, v.37, p. 7-14, 2002.
- BARTEN, J. H. M.; SCOTT, J. W.; KEDAR, N. Low temperatures induce rough blossom – end scarring of tomato fruit during early flower development. **Journal American Societal Horticulture Science**, v.117, p. 298-303, 1992.
- BELLIARD, G.; PELLETIER, G.; VEDEL, F.; QUETIER, F. Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of *Nicotiana tabacum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v.165, n.3, p.231-237, 1978.
- BENNETT, M. D.; JONSTON, S.; HODNETT, G. L.; PRINCE, H. J. *Allium cepa* L. cultivars from four continents compared by flow cytometry show nuclear DNA constancy. **Annals of Botany**, v.85, p. 351-357, 2000.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: Progress, problems and prospects. **Annals of Botany**, v.95, p. 45-90, 2005.
- BENNETT, M.D.; SMITH, J. B. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, v.274, p. 228-271, 1976.
- BERGERVOET, J. H. W.; VERHOEVEN, H. A.; GILISSEN, L. J. W.; BINO, R. J. High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pericarp. **Plant Science**, v.116, p. 141-145, 1996.
- BERTIN, N. Analysis of the tomato fruit growth response to temperature and plant fruit load in relation to cell division, cell expansion and DNA endoreduplication. **Annals of Botany**, v.95, p. 439-447, 2005.

- BOWMAN, J. L.; ESHED, Y. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. **Trends in Plant Science**, v.5, n.3, p. 110-115, 2000.
- BRAZ, L. T. **Estudos da heterose e da capacidade combinatória visando produção de frutos e sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. Jaboticabal, SP: UEPCAV, 1992. 123f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
- BROADHVEST, J.; DAIGLE, N.; MARTIN, M.; HAUGHN, G. W.; BERNIER, F. Appendix: a novel type of homeotic mutation affecting floral morphology. **The Plant Journal**, v.2, n.6, p.991-997, 1992.
- BUITENDIJK, J. H.; BOON, E.J.; RAMANNA, M. S. Nuclear DNA content in twelve species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. **Annals of Botany**, v.79, p.343-353, 1997.
- CARVALHO, C. R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 127f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic & Histochemistry**, v.68, p.142-145, 1993.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. **Journal of Plant Reserch**, v.110, p. 417-420, 1997.
- CAUSIER, B; CASTILLO, R.; ZHOU, R. I.; XUE, Y.; SCHWARZ-SOMMER, Z.; DAVIES, B. Evolution in actinon: following function in duplicated floral homeotic genes. **Current Biology**, v.15, p. 1508-1512, 2005.
- CHEN, L. Z.; ADACHI, T. Mechanism of abortion of postfertilization hybrid embryo in interspecific backcross, *Lycopersicon esculentum* X (*L. esculentum* X *L. peruvianum*). **Cytologia**, v.60, p.123-131, 1995.

- CHEN, Y-C. S.; McCORMICK, S. *Sidecar* pollen, an *Arabidopsis thaliana* male gametophytic mutant with aberrant cell divisions during pollen development. **Development**, v.122, p. 3243-3253, 1996.
- CHUNG, J.; LEE, J. H.; ARUMUGANATHAN, K.; GRAEF, G. F.; SPECHT, J. E. Relationships between nuclear DNA content and seed and leaf size in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.1064-1068, 1998.
- COEN, E. S.; MEYROWITZ, E. M. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. **Nature**, v.353, p.31-37, 1991.
- CONTIM, L. A. S.; CARVALHO, C. R.; MARTINS, F. A.; FREITAS, D. V. Nuclear DNA content and karyotype of Rosewood (*Aniba rosaeodora*). **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.4, p.754-757, 2005.
- CRUZ, C. D. **Programa genes**. Versão Windows - Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. 648 p.
- DE ROCHER, E. J.; HARKINS, K. R.; GALBRAITH, D. W.; BOHNERT, H. J. Developmentally regulated systemic endopolyploidy in succulents with small genomes. **Science**, v.250, p.99-101, 1990.
- DIAMOND, R. A.; DEMAGGIO, S. In living color – Protocols in flow cytometry and cell sorting. 'D-flowering' – **The flow cytometry of plant DNA**, v.6, p.390-419, 2000.
- DICKSON, E. E.; ARUMUGANATHAN, K.; KRESOVICH, S. Nuclear DNA content variation within the Rosaceae. **American Journal of Botany**, v.79, p.1081-1086, 1992.
- DIETRICH, A. J. J. The influence of fixation on the morphology of mitotic chromosomes. **Canada Journal Genetics Cytology**, v.28, p.536-539, 1986.

- DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v.95, p.99-100, 2005.
- DOLEŽEL, J.; CIHALIKOVA, J.; WEISEROVA, J.; LUCRETTI, S. Cell cycle synchronization in plant root meristems. **Methods in Cell Science**, v.21, p.95-107, 1999.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSAK, M.; NADIR, L.; OBERMAYER, R. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, v.82 (sup A), p.17-26, 1998.
- DOLEŽEL, J.; KUBALAKOVA, M.; BARTOS, J.; MACAS, J. Flow cytogenetics and plant genome mapping. **Chromosome Research**, v.12, p.77-91, 2004.
- DOLEŽEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Plant Physiology**, v.85, p.625-631, 1992.
- DOLEŽEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal Applied Genetics**, v.38, n.3, p.285-302, 1997.
- DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, v.2, p.143-154, 1991.
- EMMANUEL E.; LEVY, A. A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Genome Studies and Molecular Genetics**, v.5, p.112-117, 2002.
- ENDO, T. R.; GILL, B. S. The deletion stocks of common wheat. **Journal of Heredity**, v.87, p.295-307, 1996.
- FAO. **Agricultural production data collection**. 2005. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 04 maio 2006.

- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa, MG: Editora UFV, 2000 402 p.
- FNP-Consultoria e Comércio (São Paulo, SP). Tomate para mesa, a prioritária exigência de qualidade. **Agrianual 2005**: anuário da agricultura brasileira, São Paulo, p.545, 2005.
- FUKUI, K. Standardization of karyotyping plant chromosomes by a newly developed chromosome image analyzing system (CHIAS). **Theoretical and Applied Genetics**, v.72, p.27-32, 1986.
- FUNAKI, K.; MATSUI, S.; SASAKI, M. Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. **Chromosoma**, v.49, p.357-370, 1975.
- GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; KNAPP, S. Systematic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v.96, p.985-989, 1991.
- GHOSH, S.; PAWELETZ, N. Mitosis: dissociability of its events. **International Review of Cytology**, v.144, p.217-257, 1993.
- GILISSEN, L. J. W.; van STAVEREM, M. J.; CREMERS-MOLENAAR, J. VERHOEVEN, H. A. Development of polysomaty in seedlings and plants of *Cucumis sativus* L. **Planta Science**, v.91, p.171-179, 1993.
- GIORDANO, L. B.; SILVA, C. Hibridação em tomate. In: BORÉM, A. (Ed.). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999 p.463-480.
- GÓMEZ, P.; JAMILENA, M.; CAPEL, J.; ZURITA, S.; ANGOSTO, T.; LOZANO, R. *Stamenless*, a tomato mutant with homeotic conversions in petals and stamens. **Planta**, v.209, p.172-179, 1999.

- GRANT, W. F.; OWENS, E. T. *Lycopersicon* assays of chemical/radiation genotoxicity for the study of environmental mutagens. **Mutation Research**, v.511, p.207-237, 2002.
- GREGORY, R. T. Insertion-deletion biases and the evolution of genome size. **Gene**, v.324, p.15-34, 2004.
- GREGORY, R. T. The C-value enigma in plants and animals: A review of parallels and an appeal for partnership. **Annals of Botany**, v.95, p.133-146, 2005.
- GREILHUBER, J. Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. **Annals of Botany**, v.82 (supplement A), p.27-35, 1998.
- GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. São Paulo: Ed. Guanabara, 1988 135 p.
- GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**, v.9, p.741-743, 1986.
- GUTTENBERGER, H. Use of computer image analysis in cytogenetic studies. In: BORZAN, Z.; SCHLARBAUM, S. E. **Cytogenetic studies of forest trees and shrub species**. [S.l.:s.n.], 1994. p.75-82.
- HAREVEN, D.; GUTFINGER, T.; PNUELI, L.; BAUCH, L.; COHEN, O.; LIFSCHITZ, E. The floral system of tomato. **Euphytica**, v.79, p.235-243, 1994.
- HASTEROK, R.; MALUSZYNSKA, J. Nuclear dominance does not occur in root tip cells of allotetraploid *Brassica* species. **Genome**, v.43, p.574-579, 2000.
- HOWELL, W. M.; BLACK, B. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developed: a 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014, 1980.

- JACK, T. Molecular and genetic mechanisms of floral control. **The Plant Cell**, v.16, p.1-17, 2004.
- JACK, T. Relearning our ABCs: New twists on an old model. **Trends Plant Science**, v.6, p.310-316, 2001.
- JAHIER, J.; CHEVRE, A. M.; EBER, F.; DELOURME, R.; TANGUY, A. M. **Techniques of Plant Cytogenetics**. New Delhi: Oxfordland IBH Publishing, 1996 180 p.
- JOHNSTON, J. S.; BENNETT, M. D.; RAYBURN, A. L.; GALBRAITH, D. W.; PRINCE, H. J. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **American Journal of Botany**, v.86, n.5, p.609-613, 1999.
- JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 11. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1993 777 p.
- KAKANI, A.; SAHA, S.; SAPARA, V. T.; ZIPF, A.; STELLY, D. M. Genetic mechanism and chromosomal location of pollen-specific gene (s) in *Gossypium*. **Crop Science**, v.39, p.668-673, 1999.
- KALENDAR, R.; TANSKANEN, J.; IMMONEN, S.; NEVO, E.; SCHULMAN, A. H. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-I retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, p.6603-6607, 2000.
- KATO, K.; OHTA, K.; KOMATA, Y.; ARAKI, T.; KANAHAMA, K.; KANAYAMA, Y. Morphological and molecular analyses of the tomato floral mutant *leafy* inflorescence, a new allele of *falsiflora*. **Plant Science**, v.169, p.131-138, 2005.
- KATO, S.; FUKUI, K. Condensatio pattern (CP) analysis of plant chromosomes by a improved chromosome image analysing system, CHIAS III. **Chromosome Research**, v.6, p.473-479, 1998.

- KECK, E.; McSTEEN, P.; CARPENTER, R.; COEN, E. Separation of genetic functions controlling organ identity in flowers. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v.22, n.5, p.1058-1066, 2003.
- KNIGHT, C. A.; ACKERLY, D. D. Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. **Ecology Letters**, v.5, p.66-76, 2002.
- KOUTOULIS, A.; ROY, A. T.; PRINCE, A.; SHERRIFF, L.; LEGGETT, G. DNA ploidy level of colchicine-treated hops (*Humulus lupulus* L.). **Scientia Horticulturae**, v.105, p.263-268, 2005.
- KUDO, N.; KIMURA, Y. Flow cytometric evidence for endopolyploidy in seedlings of some *Brassica* species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.104-110, 2001.
- KUDO, N.; KIMURA, Y. Nuclear DNA endoreduplication during petal development in cabbage: relationship between ploidy levels and cell size. **Journal of Botany**, v.53, p.1017-1023, 2002.
- KUSH, G. S.; RICK, C. M. Meiosis of hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennellii*. **Genetica**, v.33, p.167-183, 1963.
- LACADENA, J. R.; CERMENO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J. L. Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty) in triticale by silver-staining procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, v.67, p.207-213, 1984.
- LAPITAN, N. L.V.; GANAL, M. W.; TANKSLEY, S. D. Somatic chromosome karyotype of tomato based on in situ hybridisation of the TGRI satellite repeat. **Genome**, v.32, p.992-998, 1989.
- LAURIE, D. A.; BENNETT, M. D. Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*. Intergeneric, interespecific and intraespecific variation. **Heredity**, v.55, p.307-313, 1985.

- LAY, Y. F.; PFEIFFER, R. A.; ARRIGHI, F. E.; HSA, T. C. Combination of silver and fluorescent staining for metaphase chromosomes. **American Journal the Human Genetics**, v.30, p.76-79, 1978.
- LEE, J. H.; ARUMUGANATHAN, K.; KAEPLER, S.M.; PARK, S. W.; KIM, K. Y.; CHUNG, Y. S.; KIM, D. H.; FUKUI, K. Variability of chromosomal DNA contents in maize (*Zea mays* L.) inbred and hybrid lines. **Planta**, v.215, n.4, p.666-671, 2002.
- LOHMANN, J.U.; WEIGEL, D. Building beauty: The genetic control of floral patterning. **Development Cell**, v.2, p.135-142, 2002.
- LOZANO, R.; ANGOSTO, T.; GÓMEZ, P.; PAYÁN, C.; CARPEL, J.; HUIJSER, P.; SALINAS, J.; MARTINÉZ-ZAPATER, J. M. Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expression of MADS- Box Genes. **Plant Physiology**, v.117, p.91-100, 1998.
- MASCARENHAS, J. P. Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. **The Plant Cell**, v.5, p.1303-1314, 1993.
- MAZZUCATO, A.; OLIMPIERI, I.; CIAMPOLINI, F.; CRESTI, M.; SORESSI, G. P. A defective pollen-pistil interaction contributes to hamper seed set in the parthenocarpic fruit tomato mutant. **Sex Plant Reprod**, v.16, p.157-164, 2003.
- McARTHUR, J.; CHIASSON, L.P. Cytogenetic notes on tomato species and hybrids. **Genetics**, v.32, p.165-177, 1947.
- MELARAGNO, J. E.; MEHROTRA, B.; COLEMAN, A. W. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissues of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.5, p.1661-1668, 1993.
- MELO, P. C. T. **Heterose e capacidade combinatória em um cruzamento dialético parcial entre seis cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).** Piracicaba, SP: ESALQ, 1987. 108f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

- MILLER, D. A.; DEV, V. G.; TANTRAVAHU, R.; MILLER, O. J. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. **Exp. Cell Res.**, v.101, p.235-243, 1976.
- MIZUKAMI, Y. A matter of size: developmental control of organ size in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.533-539, 2001.
- MOENS, P. B. The transmission of a heterochromatic isochromosome in *Lycopersicon esculentum*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.7, p.296-303, 1965.
- MORGAN, H. D.; WESTOBY, M. The relationship between nuclear DNA content and leaf strategy in seed plants. **Annals of Botany**, v.96, p.1321-1330, 2005.
- MULLER, C. H. A revision of the genus *Lycopersicon*. **Miscellaneous publication**. [S.l.:s.n.], 1940. 382 p.
- NAKAYAMA, N.; ARROYO, J. M.; SIMOROWSKI, J.; MAY, B.; MARTIENSSEN, R.; IRISH, V. F. **The Plant Cell**, v.17, p.1-21, 2005.
- NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis, MT: Ed. Pallotti, 2001. 1183 p.
- NEAFSEY, D. E.; PALUMBI, S. R. Genome size evolution in pufferfish: a comparative analysis of diodontid and tetraodontid pufferfish genomes. **Genome Research**, v.13, p.821-830, 2003.
- NOIROT, M.; BARRE, P.; LOUARN, J.; DUPERRAY, C.; HAMON, S. Nucleus – cytosol interactions – A source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Annals of Botany**, v.86, p.309-316, 2000.
- NUEZ, F.; PROHENS, J.; BLANCA, J. M. Relations, origin, and diversity of Galápagos tomatoes: Implications for the conservation of natural populations. **American Journal of Botany**, v.91, n.1, p.86-99, 2004.

- OHRI, D. Genome size variation and plant systematics. **Annals of Botany**, v.82, p.75-83, 1998.
- OTTO, F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: **Methods to cell biology**. New York: Academic Press, Inc., 1990. p.105-110, 1990.
- PAGLIARINI, M. S. Citogenética aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos Genéticos Melhoramento Plantas**. [S.l.:s.n.], 2001, p.872-910.
- PEDROSA, A.; GUERRA, M.; FILHO, W. S. S. Na hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Cytobios**, v.92, p.43-51, 1997.
- PETERSON, D. G.; PRICE, J. H.; JOHNSTON, J. S.; STACK, S. M. DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lycopersicon esculentum*) pachytene chromosomes. **Genome**, v.39, p.77-82, 1996.
- PLANCHAIS, S.; GLAB, N.; INZÉ, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. **FEBBS Letters**, v.476, p.78-83, 2000.
- PNUELI, L.; HAREVEN, D.; BRODAY, L.; HURWITZ, C. The TM5 MADS box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers. **The Plant Cell**, v.6, p.175-186, 1994b.
- PNUELI, L.; HAREVEN, D.; ROUNSLEY, S. D.; YANOFSKY, M. F. Isolation of the tomato *AGAMOUS* gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. **The Plant Cell**, v.6, p.163-173, 1994a.
- POGGIO, L.; HUNZIKER, J. H. Nuclear DNA content variation in *Bulnesia*. **Journal of Heredity**, v.77, p.43-48, 1986.

- POLOWICK, P. L.; SAWHNEY, V. K. Temperature effects on male fertility and flower and fruit development in *Capsicum annuum*. **Letters Science Horticulture**, v.25, p.117-127, 1985.
- QUIROS, C. F. *Lycopersicon* cytogenetics. In: TSCHUCHIYA, T. **Chromosome engineering in plants genetics, breeding and evolution**. Part B. Developments in plant genetics and breeding. Florida: CRC Press, 1991. p.119-137.
- REES, H.; JONES, R. N. The origin of the wide species variation in nuclear DNA content. **International Review of Cytology**, v.32, p.53-92, 1972.
- RICK, C. M.; BUTLER, L. Cytogenetics of the tomato. **Advances Genetics**, v.8, p.267-402, 1956.
- RICK, C. M. **Granulosa (grn) a new epidermal trichome marker**. 1981. Disponível em: <http://tgc.ifas.ufl.edu/vol49/vol49/html/> Acessado em: 21 nov. 2005.
- RICK, C.M.; BARTON. D.W. Cytological and genetical identification of the primary tomato trisomics. **Genetics**, v.39, p.640-665, 1954.
- ROBERTSON, D. S.; STINARD, P. S.; MAGUIRE, M. P. Genetic evidence of mutator-induced deletion in the short arm of chromosome 9 of maize . II. Wd deletions. **Genetics**, v.136, p.1143-1149, 1994.
- ROSALES-MOLINERO, N.; JAMILENA, M.; ZURITA, S.; GOMEZ, P.; CAPEL, J.; LOZANO, R. FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. **The plant Journal**, v.20, n.6, p.685-693, 1999.
- ROUX, N.; TOLOZA, A.; RADECKI, Z.; ZAPATA-ARIAS, F. J.; DOLEŽEL, J. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Report**, v.21, p.483-490, 2003.

- SANDERS, P. M.; BUI, A. Q.; WETERINGS, K.; McINTIRE, K. N.; HSU, Y-C.; LEE, P. Y.; TRUONG, M. T.; BEALS, T. P.; GOLBERG, R. B. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. **Sex Plant Reproduce**, v.11, p.297-322, 1999.
- SATO, S.; HIZUME, M.; KAWAMURA, S. Relationship between secondary constrictions and nucleolus organizing regions in *Allium sativum* chromosomes. **Protoplasma**, v.105, p.77-85, 1980.
- SCHWARZ-SOMMER, Z.; HUIJER, P.; NACKEN, W.; SAEDLER, H.; SOMMER, H. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. **Science**, v.29, p.931-936, 1990.
- SEAL, A. G. DNA variation in *Festuca*. **Heredity**, v.50, p.225-236, 1983.
- SHARMA, A. K.; SHARMA, A. Preparation of material for analysis of chromosome at structural fluorochromes. In: **Plant Chromosomes**. Amsterdam, Holanda: HAP, 1999. 371 p.
- SHERMAN, J. D.; STACK, S. M. Two-dimensional spreads of synaptonemal complexes from solanaceous plants. V. tomato (*Lycopersicon esculentum*) karyotype and idiogram. **Genome**, v.35, p.354-359, 1992.
- SHIBA, T.; MII, M. Visual selection and maintenance of the cell lines with high plant regeneration ability and low ploidy level in *Dianthus acicularis* by monitoring with flow cytometry analysis. **Plant Cell Report**, v.24, p.572-580, 2005.
- SILVA, D. J. H. **Hibridação de *Lycopersicon esculentum* com *L. hirsutum* e *L. peruvianum*, por meio de técnicas *in vitro* e em casa de vegetação**. Viçosa, MG: UFV, 1993. 110f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Urbana, Illinois: University of Illinois, 1993. 391 p.

- SMULDERS, M. J. M.; KORTEKAAS, W.; GILISSEN, L. J. W. Natural variation in patterns of polysomaty among individual tomato plants and their regenerated progeny. **Plant Science**, v.106, p.129-139, 1995.
- SUGIMOTO-SHIRASU, K.; ROBERTS, K. "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.544-553, 2003.
- SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. London: Unwin Hyman, 1990. 434 p.
- SUMNER, A. T. **Chromosomes** – Organization and function. Blackwell, [s.l.], 2003. 286 p.
- SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding** – Monographs on theoretical and applied genetics. 17. ed. [S.l.:s.n.], 1992. 469 p.
- TAMARIN, R. H. **Principles of genetics**. 5. ed. [s.l.]: WCB, 1996. 683 p.
- TEOH, S. B.; REES, H. Nuclear DNA amounts in populations of *Picea* and *Pinus* species. **Heredity**, v.36, p.123-127, 1976.
- THEISSEN, G. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. **Current Opinion Plant Biology**, v.4, p.75-85, 2001.
- TRABELSI, M. A. A reliable method for testing fruit setting ability in tomato using "*in vitro*" pollen germination. **Meded. Fac. Lanbouwwet. Rijksuniv**, v.50, n.4, p.1343-1356, 1985.
- TURPEINEIN, T. KULMALA, J.; NEVO, E. Genome size variation in *Hordeum spontaneum* populations. **Genome**, v.42, p.1049-1099, 1999.
- VICCINI, L.F.; CARVALHO, C.R. Maize chromosome 6 deficiency identified by image analysis. **Cytologia**, v.65, p.71-73, 2000.

- VIJAYRAGHAVAN, U. How plants pattern flowers: lessons from molecular genetic studies of flowering in *Arabidopsis thaliana* a model plant. **Current Science**, v.80, n.2, p.233-243, 2001.
- VILHAR, B.; VIDIC, T.; JOGAN, N.; DERMASTIA, M. Genome size and the nucleolar number as estimators of ploidy level in *Dactylis glomerata* in the Slovenian Alps. **Plant Systematics and Evolution**, v.234, p.1-13, 2002.
- WINKLER, H. Über die nachkommenschaft der Solanum pfropfbastarde und die chromosomenzahelen ihrer keimzellen. **Zurecht in Botanic**, v.2, p.1-38, 1909.
- WORDRAGEN, M. F.; WEIDE, R. L.; COPPOOLSE, E.; ZABEL, P.; KOORNNEEF, M. Tomato chromosome 6: a high resolution map of the long arm and construction of a composite integrated marker-order map. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, n.8, p.1065-1072, 1996.
- YANG, M.; LOH, C. S. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. **BioMed Central- Cell Biology**, v.5, n.33, p.1-8, 2004.
- YANPAISAN, W.; NICHOLAS, J.; KING, G.; DORAN, P.M.; Flow cytometry of plant cells with applications in large escale bioprocessing. **Biotechnology Advances**, v.17, p.3-27, 1999.
- ZANETTINI, M. H. B.; LAUXEN, M. S. Alterações cromossômicas estruturais e numéricas: Conseqüências e aplicações. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética & Evolução Vegetal**, v.13, p.217-240, 2003.