

CLÁUSIO ANTÔNIO FERREIRA DE MELO

**ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM NOVE
ESPÉCIES DO GÊNERO *Solanum* L. (SOLANACEAE A. Juss)**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia: Melhoramento
Genético de Plantas da Universidade
Federal Rural de Pernambuco,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre.**

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho (UFRPE) - Orientador

Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho (UFRPE) - Co-orientador

**RECIFE
2009**

Ficha catalográfica

M528e Melo, Cláudio Antônio Ferreira de
Estudo citogenético e molecular em nove espécies do
gênero *Solanum* L. (Solanaceae A. Juss) / Cláudio Antônio
Ferreira de Melo. – 2009.
88 f. : il.

Orientador: Reginaldo de Carvalho
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.
Bibliografia e anexo.

CDD 631.53

1. Genética molecular
 2. Citogenética
 3. Melhoramento genético vegetal
 4. ISSR
 5. FISH
- I. Carvalho, Reginaldo de
 - II. Título

**ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM NOVE ESPÉCIES DO
GÊNERO *SOLANUM* L. (SOLANACEAE A. JUSS.)**

**Parecer da comissão examinadora da dissertação de:
Cláudio Antônio Ferreira de Melo**

BANCA EXAMINADORA

**Examinadora: Profa. Dr^a. Maria Rita Cabral Sales de Melo
(Dept^o. de Biologia) Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Examinador: Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho
(Dept^o. de Agronomia) Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Examinadora: Profa. Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira
(Dept^o. de Bioquímica) Universidade Federal de Pernambuco**

**Suplente: Prof. Dr. Clodoaldo José de Anunciação Filho
(Dept^o. de Agronomia) Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Orientador: Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
(Dept^o. de Biologia) Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Co-orientador: Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho
(Dept^o. de Agronomia) Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**RECIFE
2009**

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Cláudio Melo e
Maria das Graças pelo carinho e
incentivo o que me permitiu
retomar a saúde e continuar...*

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal Rural de Pernambuco, Laboratório de Genética Bioquímica e Seqüenciamento de DNA – UFRPE**, aos **professores** e a **coordenação do Programa de Pós-graduação em Agrônômica: Melhoramento Genético de Plantas (UFRPE)**. E ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, por possibilitarem a realização deste trabalho e concessão da bolsa.

Ao **Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho** não só pela orientação científica, mas também pela grade amizade e grande confiança na conclusão deste trabalho. E ao **Prof. Dr. Péricles de Albuquerque** pela orientação e conselho científico.

As colegas de trabalho e companheiras de bancada **Maria Isabel (Bel)**, **Maria Lucília** e **Ieda** pela ajuda nos ensaios laboratoriais, pela logística e pelos ótimos debates científicos, especialmente pela paciência de buscarem soluções para perguntas pertinentes.

A todos os estagiários do laboratório LGBS-UFRPE: **Jaqueline, Carliane Rebeca, Kaline Veiga, Ivana, Luiza, Igor, Felipe, Sergio, Cláudia, José, Estela, Manoela Granja** e **Manoela Pequena** e outros que estão presentes atualmente e que já passaram por este grande laboratório, meus agradecimentos.

Aos meus colegas de mestrado, turma 2007, **Cláudio, Jose Machado, Winston, Gheysa, Lucas Luz** e outros um grande abraço.

Agradeço fielmente a **Fabiana Cavalcante (Fabi)** pelo companheirismo e pelo grande voto eterno de amizade.

As **Dr^a. Roseane Cavalcante, Profa. Dr^a. Vilma Loreto** e a **Profa. Dr^a. Maria de Mascena (Mana)** pela companhia no laboratório e conhecimento transmitido, tornando mais rico o nosso ambiente de trabalho.

E a meus pais pelo companheirismo, carinho e pelo cuidado, possibilitando um caminhar mais suave e menos tortuoso nesta estrada da vida.

Obrigado Por Tudo!!!

RESUMO

Cromossomos mitóticos de nove espécies do gênero *Solanum* L. (Solanaceae A. Juss.) foram analisados, pelas técnicas de coloração convencional, CMA₃/DAPI e FISH com sonda DNAr 45S. *S. atropurpureum* Schrank, *Solanum dulcamara* L., *S. gilo* L., *S. melongena* L. e *S. nitidibaccatum* Bitter., apresentaram 2n=24. *Solanum luteum* Mill., *S. nigrum* L., e *S. laciniatum* Ait., apresentaram 2n=48, 2n=72, 2n=92, respectivamente. O cariótipo das espécies foi bastante simétrico, com morfologia variando de metacêntrico a submetacêntrico e núcleo interfásico semi-reticulado. O padrão de condensação observado foi do tipo proximal. Em *S. luteum* foi observado um par cromossômico com heteropcnose negativa em células metafásicas. *S. dulcamara*, *S. atropurpureum* e *S. luteum* apresentaram dois blocos CMA₃⁺/DAPI terminais em um par cromossômico. Em *S. nitidibaccatum* dois satélites evidenciados pela técnica de CMA₃/DAPI apresentaram-se subdivididos, além dessa característica observaram-se blocos CMA₃⁺/DAPI na maioria dos telômeros em *S. nitidibaccatum*. Em *S. laciniatum* e *S. nigrum* foram observados quatro blocos CMA₃⁺/DAPI em dois pares cromossômicos, um em cada homólogo. A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda DNAr 45S revelou dois sítios de DNAr 45S em *S. luteum* e quatro sítios em *S. nigrum* e *S. laciniatum*. Constatou-se que a localização de marcadores espécie-específicos foi satisfatória, permitindo a identificação das espécies citadas. A análise da diversidade genética em espécies do gênero *Solanum* via marcadores ISSR também foi estimada, em que um total 27 oligonucleotídeos iniciadores foram testados fornecendo 299 bandas polimórficas, representando um polimorfismo total de 97,4%. Entretanto o polimorfismo intra-específico foi de apenas 16,7%. Observou-se que a aplicação de apenas um olii, UBC 841 ou 846 pode ser feita para a identificação dos genótipos de *S. melongena* com segurança. A análise da diversidade genética via ISSR foi satisfatória, resultando no agrupamento dos táxons em quatro clados principais.

Palavras-chave: genética molecular, citogenética, melhoramento genético vegetal, ISSR, FISH.

ABSTRACT

Mitotic chromosomes of nine *Solanum* L. (Solanaceae A. Juss.) species were cytogenetically analyzed using the conventional technique, CMA/DAPI and florescent *in situ* hybridization. *S. atropurpureum* Schrank, *Solanum dulcamara* L., *S. gilo* L., *S. melongena* L. and *S. nitidibaccatum* Bitter., showed a diploid chromosome number $2n=24$. While *Solanum luteum* Mill., *S. nigrum* L., and *S. laciniatum* Ait., showed $2n=48$, $2n=72$, $2n=92$, **respectively**. The species karyotype were symmetric, with morphology metacentric or submetacentric and the interphasic nucleus were semi-reticulated type. The condensation pattern was always from the telomere to the centromere. *S. luteum* showed heteropcnotic chromosomes pair in metaphases. *S. dulcamara*, *S. atropurpureum* and *S. luteum*, two CMA₃⁺/DAPI⁻ terminals blocks were observed in one chromosome pair. *Solanum nitidibaccatum* showed two subdivided satellites with the application of fluorochromes. We also observed in this species in several CMA₃⁺/DAPI⁻ blocks in telomeres. In *Solanum laciniatum* and *S. nigrum* were observed four CMA₃⁺/DAPI⁻ blocks in two chromosome pair. The application of DNAr 45S probes in the FISH technique was applied only in *S. luteum*, *S. nigrum*, and in *S. laciniatum*, and showed two hybridization sites of rDNA 45S in the fist one, and four sites in the others. We noticed that the localization of species-specific marker was successful, allowing the identification of the analyzed species. The estimation of the genetic diversity in *Solanum* species was also made using ISSR markers. A total of 27 primers were tested giving 299 polymorphic bands with a average of 97,4%. However the intra-specific average was lower 16,7%. We realized that the application of just one UBC 841 or 846 primer can be used to identify the genotypes of *S. melongena* safely. The dendrogram gendered by UPGMA method grouped the species analyzed in four groups.

Key-word: genetic molecular, cytogenetic, plant breeding, ISSR, FISH.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL	15
1. - REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1 - Aspectos morfológicos e reprodutivos.....	19
1.2 - Aspectos filogenéticos e taxonômicos.....	22
1.3 - Distribuição geográfica e diversidade.....	23
1.4 - Importância econômica da família Solanaceae.....	24
1.5 - Citogenética convencional e bandeamento cromossômico.....	25
1.6 - Citogenética da família Solanaceae.....	28
1.7 - Contribuição da citogenética ao melhoramento genético vegetal.....	30
1.8 - Marcadores moleculares.....	33
1.9 - Referências bibliográficas.....	37
2. - CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DIPLÓIDES E POLIPLÓIDES DO GÊNERO <i>Solanum</i> L. (SOLANACEAE A. Juss.)	48
2.1 – Resumo/Abstract.....	49
2.2 - Introdução.....	50
2.3 - Material e método.....	52
2.4 - Resultados.....	53
2.5 - Discussão.....	58
2.6 - Agradecimentos.....	61
2.7 - Referências bibliográficas.....	63
3. - CAPÍTULO II - DIVERSIDADE GENÉTICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Solanum</i> L. (SOLANACEAE A. Juss.) REVELADA POR MARCADORES ISSR	68

3.1 - Abstract.....	69
3.2 - Introdução.....	70
3.3 - Material e método.....	71
3.4 - Resultados	73
3.5 - Discussão.....	74
3.6 - Agradecimentos.....	76
3.7 - Referências bibliográficas.....	77
4. – CONCLUSÕES GERAIS	83
5. – ANEXOS	84
Normas aos autores: Revista Acta botânica.....	84
Normas aos autores: Revista Genetic and Molecular Biology.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados
μ l	Microlitro
μ m	Micrometro
8-HQ	8-Hidoxiquinileína
Cm	Centrimetro
CMA	Cromomicina A3
CTAB	Cety-trimethyl-amoniombromide
DAPI	2, 4-6 diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido Desoxiribonucleotídio
DNAcp/cpDNA	DNA de Cloroplasto
DNAmt/mtDNA	DNA Mitocondrial
DNAr/rDNA	DNA Ribossomal
dNTP	Dinucleotídio Trisfosfato
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
GISH	Genomic <i>in situ</i> Hybridization Hibridização Genômica <i>in situ</i>
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeats Sequência Simple Repetida Interna
Kb	Quilo base
mM	Milimolar
Olii	Oligonucleotídio Iniciador
Pb	Pares de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD	Random Amplified Polimorphic DNA Polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucleotídio

RONs	Região Organizadora do Nucléolo
SSR	Simple Sequence Repeats Sequência Simples Repetida
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tm	Temperaturas de Anelamento
UBC	University of British Columbia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean Agrupamento Aos Pares Pela Média Aritmética Não Ponderada
Var	Variedade

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Espécies dos gêneros *Solanum* L. e *Capsicum* L. com seus respectivos códigos de acesso ou nome da cultivar. 80
- Tabela 2.** Oligonucleotídeos iniciadores ISSR utilizados nas ampliações, incluindo suas temperaturas de anelamento (T_m), número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo. Letras significando olii degenerados: Y = (C, T); R = (A, G); H = (A, C, T); B = (C, G, T); V = (A, C, G); D = (A, G, T). 80
- Tabela 3.** Coeficiente de similaridade entre as espécies do gênero *Solanum* e *Capsicum* pelo método de Jaccard. 01 e 02 - *S. laciniatum*; 03 - *S. melongena* (selvagem); 04 - *S. melongena*; 05 - *S. atropurpureum*; 06 - *S. luteum*; 07 - *S. jilo*; 08 - *S. paniculatum*; 09 - *S. dulcamara*; 10 - *S. nigrum*; 11 - *S. nitidibaccatum*; 12 e 13 - *Capsicum* spp. 81

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Características morfológicas das Solanaceae. (A) ramo foliar, (B) frutos, (1) peças florais, (2) peças reprodutivas, (3) estames, (4) corte transversal do ovário, (5) semente (6) corte longitudinal da semente. Fonte: Adaptado de biologie.uni-hamburg.de 21
- Figura 2.** Clados da família Solanaceae filogeneticamente agrupados, seta indica o número básico $x=12$ como característica comum (A). (B) os 13 clados do gênero *Solanum* agrupados por variações na sequência do gene *ndhF* do DNA de cloroplasto, segundo Bohs (2005). Fonte: Adaptado de Solanaceae source. 23
- Figura 3.** Em negro os centros de diversidade da família Solanaceae (A) e do gênero *Solanum* (B). Fonte: Adaptado de Heywood, V. H. (1978). 24

CAPÍTULO I

- Figuras 1-9.** Análise convencional em metáfases, pró-metáfase e núcleos interfásicos em espécies do gênero *Solanum*. (1) *S. melongena* ($2n=24$), (2) *S. gilo* ($2n=24$), (3) *S. atropurpureum* ($2n=24$), (4) *S. nitidibaccatum* ($2n=24$), (5) *S. luteum* ($2n=24$), (6) *S. nigrum* ($2n=72$) e (7) *S. laciniatum* ($2n=92$). (8) núcleo interfásico em *S. dulcamara* e (9) cromossomos pró-metafásicos em *S. dulcamara*. Setas em (4) indicam satélites e (7) par cromossômico maior. Barras correspondem a 5 μ m. 56
- Figura 10-19.** Coloração com fulorocromos DAPI em (10) *Solanum atropurpureum* ($2n=24$) e (12) *S. nitidibaccatum* ($2n=24$). (11), (13), (14), (15) e (16), coloração com CMA em *S. atropurpureum*, *S. atropurpureum*, *S. nitidibaccatum*, *S. luteum* ($2n=48$), *S. nigrum* ($2n=72$) e *S. laciniatum* ($2n=92$), respectivamente. Observar setas vermelhas em (13) indicando blocos 57

CMA⁺/DAPI telômericos. Setas brancas indicam blocos CMA⁺/DAPI. (17) *S. luteum*, (18) *S. nigrum* e (19) *S. laciniatum* pela hibridização fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 45S. Setas brancas indicam sinais de hibridização e setas amarelas indicam cromossomos heteropicnóticos. Barras correspondem a 5 µm.

CAPÍTULO II

Figura 1. Produtos das amplificações ISSR-PCR em gel de agarose 1.5 %. 81
Oligonucleotídeos iniciadores UBC set 808, 842 e 846. M – Marcador Ladder Plus 1 Kb; 01 e 02 - *S. laciniatum*; 03 - *S. melongena* (selvagem); 04 - *S. melongena* (Var. Romanita); 05 - *S. atropurpureum*; 06 - *S. luteum*; 07 - *S. gilo*; 08 - *S. paniculatum*; 09 - *S. dulcamara*; 10 - *S. nigrum*; 11 - *S. nitidibaccatum*; 12 e 13 - *Capsicum* spp.

Figura 2. Dendrograma obtido pela análise das variações nas regiões ISSR das 82
espécies do gênero *Solanum* e do grupo externo *Capsicum* pelo coeficiente de Jaccard e método de agrupamento UPGMA.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Solanaceae A. Juss. possui distribuição cosmopolita, com representantes mais concentrados na região neotropical, e cerca de 4000 espécies distribuídas em 90 gêneros.

melongena L. (berinjela); *Nicotiana tabacum* L. (tabaco); *Petunia hybrida* L. (petúnia) são exemplos de espécies com grande importância econômica. Outras espécies, por outro lado, são consideradas pragas em vários países, como *Solanum nigrum* L. (erva moura) (ANDRADA et al., 2003). Dentre os gêneros que compõem a família Solanaceae, *Solanum* é o mais representativo, incluindo cerca de 2000 espécies. O mesmo é tradicionalmente reconhecido pela presença de anteras poricidas (SOUZA, 2005), e citado por diversos autores como gênero de grande diversidade de espécies (KNAPP et al., 2004; HERASIMENKO, 1965).

O gênero possui uma taxonomia paradoxal e confusa, exibindo contraditoriamente, uniformidade e diversidade morfológica (ROE, 1972; LESTER; HASAN, 1991). Atualmente o sistema taxonômico mais utilizado é o proposto por D'Arcy (1973), o qual divide o gênero *Solanum* em sete subgêneros. Entretanto Bohs (2005) propôs após estudar as variações na sequência *ndhF* do cpDNA, o agrupamento do gênero em 13 clados, incluindo no gênero *Solanum*, representantes do gênero *Lycopersicon*, anteriormente citado como gênero separado.

Estudos citogenéticos como o registro de números cromossômicos são bem documentados para o gênero *Solanum* (KARPECHENKO, 1925; SARBHOY, 1977; OKOLI, 1983; BAYLIS, 1954). Entretanto há carência em estudos relacionados aos diversos métodos de bandeamento, filogenia e mapeamento físico, principalmente nas espécies nativas (OKOLI, 1983; HARTWELL et al., 2000; KURATA et al., 2002). Devido a ocorrência de um grande número de espécies no gênero *Solanum*, os números cromossômicos registrados na literatura são muito variáveis incluindo altos níveis de ploidia para algumas espécies. Por outro lado, $x=12$ parece ser o número básico geral para *Solanum* assim como para a família Solanaceae (DARLINGTON; WYLIE, 1955).

Análises citogenéticas usando técnicas convencionais oferecem informações importantes sobre número, morfologia, tamanho cromossômico, tipo de núcleo interfásico e padrão de condensação profásico (STEBBINS, 1971). Ramanna e Prakken (1967)

identificaram os pares cromossômicos de *Solanum lycopersicum* com base no comprimento e na razão entre os braços cromossômicos. Em muitos os casos, a simples determinação do número cromossômico, fornece informações importantes para a compreensão da filogenia e evolução dos grupos, desde que associada a outras abordagens como morfologia, características geográfica, etc (STEBBINS, 1971).

fluorocromos, por exemplo, são corantes com propriedades fluorescentes específicos, que demonstram afinidade por DNA. Alguns fluorocromos como o DAPI (4',6 diamidino-2-fenilindol) e o CMA₃ (cromomicina A₃) apresentam afinidades por regiões do DNA ricas em AT e GC, respectivamente. Através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 45S pode-se localizar sítios ribossomais referentes a subunidade 45S do ribossomo. Várias outras sondas podem ser utilizadas, fornecendo mais informações a respeito do cariótipo das espécies.

Para um programa efetivo de melhoramento genético, as informações a respeito da diversidade genética dentro de uma cultivar é essencial (GEPST, 1993). Em *Solanum*, a diversidade genética tem sido descrita com o uso de Isoenzimas (WEIJUN, 1992; ISSHIKI et al. 1994; KARIHALOO; GOTTIEB, 1995a.), DNA de cloroplasto (cpDNA) e mitocondrial (mtDNA) (SAKATA et al., 1991; SAKATA; LESTER, 1994; ISSHIKI et al., 1998; 2003), marcadores AFLP (MACE et al., 1999) e RAPD (KARIHALOO; GOTTIEB, 1995b). Estes marcadores moleculares serviram em estudos anteriores para elucidarem questões filogenéticas e evolutivas deste gênero. Entretanto há discordâncias entre vários trabalhos, sendo necessária a realização de novos estudos utilizando outros marcadores genéticos, para elucidar as relações entre as espécies do gênero *Solanum* e as cultivares utilizadas comercialmente e nos programas de melhoramento (ISSHIKI et al., 2008). O marcador molecular do tipo ISSR (sequência simple repetida interna) tem se mostrado eficaz na caracterização da diversidade genética (ISSHIKI et al., 2008), relações filogenéticas e evolutivas (POCZAI et al., 2008), assim como na identificação de acessos e cultivares indicando parentais promissores para programas de melhoramento genético (ISSHIKI et al., 2008; CHARTERS; WILKINSON, 2000).

Pelo exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo, analisar os cromossomos mitóticos de nove espécies diplóides e poliplóides de *Solanum* através da coloração convencional, CMA₃/DAPI e hibridização *in situ* fluorescente, a fim de identificar marcadores citológicos que facilitem o reconhecimento das espécies. Além de analisar a diversidade

genética inter-específica e intra-específica utilizando marcadores ISSR em espécies selvagens e cultivadas do gênero *Solanum*. Em complemento, foi investigada a possibilidade de distinguir o genótipo selvagem do cultivado de *S. laciniatum* Ait. e *S. melongena* com a utilização de olii ISSR UBC (University of Brotish Columbia).

REVISÃO DE LITERATURA

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Aspectos morfológicos e reprodutivos

Revisando a família Solanaceae, Souza (2005) citou as principais características desta família como ervas anuais, bianuais ou perenes, variando de arbustos a pequenas árvores, raramente lianas, com folhas sem espículas e margem inteira. As inflorescências são cimosas, algumas vezes reduzidas a uma única flor. As flores são geralmente vistosas e bissexuadas, actinomorfas, menos freqüentemente zigomorfas, diclamídeas com cálice pentâmero, gamossépalo, prefloração valvar ou imbricada; a corola é geralmente pentâmera, gamopétala, geralmente plicada, convoluta ou imbricada; com cinco estames, menos freqüentemente quatro e didínamos (*Brufelsia* L., por exemplo) epipétalos, anteras rimosas ou poricidas (*Solanum*); disco nectarífero geralmente presente; ovário súpero, bicarpelar, bilocular, raramente tetrocular (*Dactura* L.), estilete terminal, carpelos orientados obliquamente em relação ao eixo da flor, geralmente pluriovulado. O fruto é em forma de baga ou cápsula. A figura 3 mostra as principais características morfológicas presentes em Solanaceae.

O gênero *Solanum* se distingue dos demais gêneros pela presença de anteras poricidas, uma característica presente em quase todas suas espécies e também no gênero aparentado *Lycianthes*. Embora alguns autores considerem *Lycianthes* como parte do gênero *Solanum*. Estudos moleculares têm confirmado com clareza a distinção entre os gêneros *Solanum* e *Lycianthes* (BOHS; OLMSTEAD, 1997; OLMSTEAD; PALMER, 1997; OLMSTEAD et al., 1999). Morfológicamente, *Lycianthes* difere do gênero *Solanum* apenas quanto a estrutura do cálice (D'ARCY, 1986).

Na biologia floral e reprodutiva das espécies do gênero *Solanum* ocorre em comum a polinização por abelhas, a deiscência poricida das anteras e a predominância de alogamia (ANDERSON; SYMON, 1989). A retirada de pólen de anteras poricidas requer comportamento especial das abelhas, sendo a polinização destas flores denominada de polinização vibrátil (BUCHMANN et al., 1977). Em geral, as espécies do gênero possuem aromas florais fortes e adocicados produzidos por substâncias voláteis que estão usualmente presentes em flores com síndrome de polinização vibrátil, como *Amourexia*, *Cassia* e *Solanum* (BUCHMANN, 1983). É possível que os osmóforos nas flores (corola, ápices de anteras, cálice e pedúnculo floral) emitam odores suaves. Em *Solanum*, as anteras e, presumivelmente, os pólenes exalam odores, que são tidos como atrativos florais (COLEMAN;

COLEMAN, 1982). O gênero *Solanum* exhibe várias formas florais, havendo espécies monóicas com flores monóclinas e outras com variações referentes a andromonoiccia, androdioiccia e até dioiccia. Nos indivíduos andromonóicos, androdioíicos ou dióicos, ocorrem muitas vezes flores morfologicamente semelhantes, porém funcionalmente distintas (ANDERSON, 1979; OLIVEIRA-FILHO et al., 1988). No gênero *Solanum* há espécies autógamas e alógamas (WHALEN; ANDERSON, 1981). As espécies alógamas possuem sistema de incompatibilidade gametofítica. A auto-incompatibilidade é a condição ancestral em *Solanum*, estando esta restrita ao subgênero *Potatoe* e a algumas espécies do Subgênero *Leptostemonum* (WHALEN; ANDERSON, 1981).



Figura 1. Características morfológicas das Solanaceae. (A) ramo foliar, (B) frutos, (1) peças florais, (2) peças reprodutivas, (3) estames, (4) corte transversal do ovário, (5) semente e (6) corte longitudinal da semente. Fonte: Adaptado de biologie.uni-hamburg.de

1.2 Aspectos filogenéticos e taxonômicos

Na classificação mais recente sobre as angiospermas, denominada de APG (Angiosperm Phylogeny Group), os estudos filogenéticos basearam-se em marcadores moleculares, como a análise dos genes ribossomais de cloroplasto, *rbcL* e *atpB*, e os genes *matR* e *atpI* das mitocôndrias, além da sequência do gene de DNAr 18S. Estas análises refletem mais nitidamente relações filogenéticas entre táxons, as quais eram mais difíceis pelos sistemas antigos que usavam somente caracteres morfológicos e bioquímicos (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP II, 2003).

No sistema de Cronquist (1988) e pela APG II, a família Solanaceae pertence à divisão Magnoliophyta (Angiosperma), classe Magnoliopsida (Dicotiledônea), subclasse Asteridae e a ordem Solanales. Os taxonomistas tradicionais reconhecem apenas três subfamílias: Solanoideae, Nolanoideae e Cestroidea (D'ARCY, 1973). Entretanto, análises moleculares mudaram a visão tradicional, mas o número preciso de grupos monofiléticos na família, seus nomes e propriedades ainda carecem de mais estudos. Dados da literatura revelaram que os membros da tribo Anthocercidae, *Physalis*, gênero *Nicotiana* e *Solanum* estão em um clado monofilético caracterizado pelo número cromossômico básico $x=12$ (Figura 2A) (OLMESTEAD; PALMER, 1997; OLMESTEAD; SWEERE, 1994; OLMESTEAD et al., 1999; ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP II, 2003). Nas espécies pertencentes ao subgênero *Archeosolanum* observa-se números cromossômicos básicos de $x=23$ ou $x=46$ (D'ARCY, 1991), estes subgênero não possui relação aparente com $x=12$. Entretanto na reconstrução evolutiva destas espécies são observados fatores que levam a estimar a ocorrência de modificações cromossômicas no ancestral comum, proporcionando o número básico distinto de $x=12$, comumente dividido entre as espécies do subgênero *Archeosolanum* (D'ARCY, 1991; ANDERSON; SYMON, 1989).

Estudos recentes de DNA de cloroplasto (cpDNA) baseados na sequência *ndhF* identificaram 13 cladogramas dentro do gênero *Solanum* (Figura 2B). Estes estudos filogenéticos moleculares estabeleceram o agrupamento dos antigos gêneros *Lycopersicon* L., *Cyphomandra* Mart., *Normania* L. e *Triguera* Cav. dentro do gênero *Solanum* (BOHS, 2005).

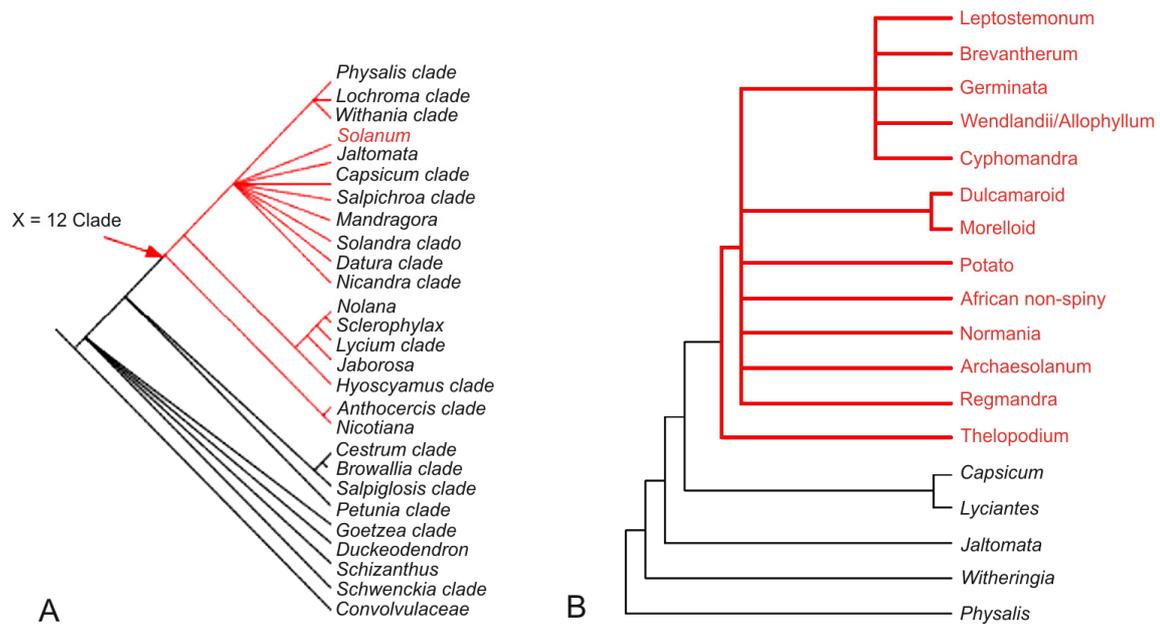


Figura 2. Clados da família Solanaceae filogeneticamente agrupados, seta indica o número básico $x=12$ como característica comum (A). (B) os 13 clados do gênero *Solanum* agrupados por variações na sequência do gene *ndhF* do DNA de cloroplasto, segundo Bohs (2005).

Fonte: Adaptado de Solanaceae source.

1.3 Distribuição geográfica e diversidade

Dentre as angiospermas importantes economicamente, a família Solanaceae A. Juss., destaca-se por apresentar distribuição cosmopolita e cerca de 4000 espécies. Os representantes desta família estão distribuídos em 90 gêneros, sendo quase 2000 espécies pertencentes ao gênero *Solanum* L., tornando-o de grande interesse para estudos botânicos, taxonômicos, filogenéticos, etc (KNAPP et al., 2004).

Segundo Souza (2005), Solanaceae possui como centro de origem e de diversidade primária, a região central da América do Sul. Por outro lado, outros centros de diversidade secundários, foram localizados também na América do Norte, México, América do Sul, Europa, Índia, Austrália, África e Madagascar (Figura 1A). Solanaceae são geralmente encontradas distribuídas em áreas de vegetação secundária, podendo ocupar os mais variados habitats desde desertos até florestas tropicais. O gênero *Solanum* por sua vez, possui centro de origem Sul Americano com centros secundários de diversidade e endemismo na Austrália, África do Sul, Nordeste do Brasil, região dos Andes e parte da América do Norte (Figura 1B) (HEYWOOD, 1978; EDMONDS; CHWEYA, 1997).

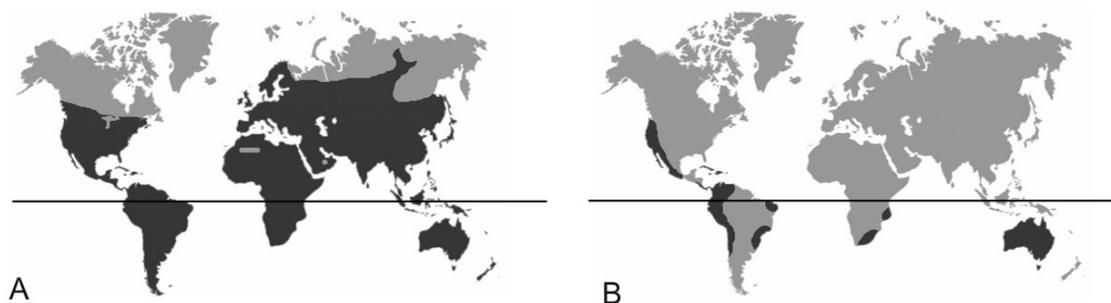


Figura 1. Em negro os centros de diversidade da família Solanaceae (A) e do gênero *Solanum* (B).

Fonte: Adaptado de Heywood, V. H. (1978).

1.4 Importância econômica da família Solanaceae

Muitas espécies de Solanaceae são utilizadas diretamente na alimentação como *Solanum tuberosum* L. (batata); *S. lycopersicum* L. (tomate); *S. melongena* L. (berinjela); *Capsicum spp.* L. (pimentas e pimentões), *S. gilo* L. (jiló), entre outras. Alcalóides são extraídos das raízes e folhas de algumas espécies para fins farmacêuticos e na indústria de cigarros (SIMMONDS; CHOUDHURY, 1976). *Nicotiana tabacum* L. (tabaco) e *N. rustica* L. sintetizam grande quantidade de nicotina, servindo como matéria prima na indústria do tabaco. *Solanum laciniatum* Ait. é utilizada na indústria farmacêutica, na extração de um alcalóide chamado de solasodine (MANN, 1978). A espécie *Petunia hybrida* Vilm. (petúnia), é muito utilizada como planta ornamental (ANDRADA et al., 2003; KNAPP et al., 2004).

A berinjela é muito cultivada e utilizada para o tratamento de doenças como diabetes, bronquite, asma, disenteria, etc. (DAUNAY et al., 2000). *Solanum paniculatum* L., vulgarmente conhecida como jurubeba, ocorre em toda a América tropical, sendo atribuídas a ela propriedades medicinais, a mesma é popularmente usada no tratamento da icterícia, hepatite crônica e febres intermitentes. Além do uso culinário a jurubeba também é considerada uma planta invasora, ocupando os mais variados tipos de solo (PIO CORRÊA, 1969; LEITÃO-FILHO et al., 1975). A erva moura, *S. nigrum* L., é considerada uma planta invasora em muitos países competindo com mais de 30 culturas, a mesma é considerada uma planta tóxica tanto para o homem quanto para animais. (ANDRADA et al., 2003; ZURLO; BRANDÃO, 1990).

Tendo em vista sua grande importância econômica, as Solanaceae contribuem consideravelmente para a economia do país. No Estado de São Paulo a produção de berinjela emprega cerca de 1.200 trabalhadores, com uma produção de 47.549 mil toneladas anuais. Neste mesmo estado, o *Solanum lycopersicum* (tomate) possui uma produção de 3,3 milhões

toneladas por ano, sendo dois milhões (77%) destinados ao consumo *in natura* (SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS, 2006).

1.5 Citogenética convencional e bandeamento cromossômico

A utilização de corantes acidófilos na citogenética clássica possibilitou a visualização nítida dos cromossomos revelando informações sobre diversos parâmetros citogenéticos. Nas últimas décadas, o uso de técnicas citogenéticas, tem fornecido informações importantes através da localização física de certos marcadores nos cromossomos. A análise citogenética clássica em geral é realizada em cromossomos metafásicos mitóticos corados com corante convencional como o Giemsa ou o carmim acético, por exemplo. Em uma análise de células mitóticas, aspectos como o número e comprimento dos cromossomos, razão entre braços cromossômicos, padrão de condensação e de coloração, além de características físicas adicionais, como presença e posição de constrição secundária e cromossomos satelitados, permitem a comparação de espécies e a identificação de variações cromossômicas inter- e intra-específicas (YOKOTA, 1990; GUERRA et al., 1997). Em muitos casos, a simples determinação do número cromossômico, fornece informações importantes para a compreensão da filogenia e evolução dos grupos, desde que associada a outras abordagens como morfologia e distribuição geográfica (STEBBINS, 1971).

Alguns exemplos serão dados a seguir sobre a análise cromossômica convencional: Battistin et al., (1996) analisaram, através da técnica convencional, nove populações de três espécies Sul americanas de *Lathyrus* L. além de seis populações da espécie cultivada *L. odoratus* L. e observaram que todas as populações possuíam $2n=14$ cromossomos, porém apresentavam diferenças estruturais significativas observadas entre as populações de cada espécie e entre espécies, em relação a morfologia cromossômica, número e localização das constrições secundárias, comprimento dos cromossomos e índice centromérico. Em Oxalidaceae, Azkue (2000) encontrou alterações morfológicas e numéricas entre seus representantes. A verificação de diferentes números básicos $x = 5, 6, 7, 8, 9$ e 11 em *Oxalis* L. foi muito importante para o estabelecimento de relações filogenéticas no gênero, visto que a subdivisão do mesmo em seções encontra-se baseada em dados morfológicos. No gênero *Erigeron* L. (Asteraceae) a ocorrência de $2n=2x=18$ e $2n=3x=27$ em *E. thunbergii* subespécie *grabratus* variedade *heterotricus* foi evidenciada (NISHIKAWA; SATO, 2003).

Muitas vezes, os padrões cromossômicos revelados convencionalmente são insuficientes para uma análise mais detalhada do cariótipo, especialmente quando os cromossomos forem pequenos e semelhantes. Contudo, técnicas de coloração diferencial cromossômica têm contribuído grandemente para o estudo mais refinado dos cariótipos (GILL et al., 1991; SUMNER, 2003). Dentre estas técnicas destacam-se o bandeamento C, a impregnação com nitrato de prata (AgNO_3), coloração com fluorocromos base-específicos e a hibridização *in situ* (BENNETT; LEITCH, 1995).

Muitas das técnicas têm como alvo o estudo da heterocromatina constitutiva, como o bandeamento C. Este tipo de heterocromatina é caracterizado como sendo a porção da cromatina que permanece fortemente condensada durante todo o ciclo celular, apresenta repetição tardia na fase S, além de ser pobre ou ausente de genes. A heterocromatina constitutiva pode ser caracterizada pela presença de DNA altamente repetitivo, denominadas DNA satélite, estando ainda possivelmente relacionada a mecanismos de silenciamento gênico (DILLON, 2004). A técnica de bandeamento C atua de forma corrosiva sobre os cromossomos promovendo remoção parcial de DNA e proteínas cromossomais, principalmente em regiões eucromáticas, porém a heterocromatina é mais resistente a este tipo de remoção, gerando um padrão de blocos heterocromáticos (SUMNER, 2003).

A heterocromatina pode ser qualificada em relação a composição de bases AT e GC usando-se corantes fluorescentes base-específicos. Os fluorocromos são corantes que apresentam especificidade a determinadas sequências de bases no DNA alvo. Dentre os que possuem afinidade pelas bases adenina e timina (AT) destacam-se o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Hoechst 33258 e a quinacrina. Já a cromomicina A_3 (CMA_3), o iodeto de propídeo (IP) e a mitramicina (MM) apresentam afinidade por regiões ricas em guanina e citosina (GC). Outros como distamicina A (DA) e a actinomicina D (AMD) podem ser empregados como contra-corantes aumentando o nível de contraste (SUMNER, 2003; KIM et al., 2002).

A caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva realizada a partir de colorações empregando-se fluorocromos pode auxiliar na caracterização de espécies e variedades. Analisando seis espécies de *Citrus* através do emprego dos fluorocromos DAPI e CMA_3 , Guerra (1993) verificou divergências quantitativas e heteromorfismo no padrão de bandas das espécies. Divergências no padrão de bandas DAPI também foram observadas na espécie *Dioclea virgata* Benth. quando comparadas a outras espécies da subfamília Papilionoidae (SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004). O uso da cromomicina A_3 pode ser empregado também na detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RON's) visto que

estas regiões são normalmente flanqueadas por regiões de heterocromatina constitutiva ricas em pares de bases GC. Em *Allium communtatum* Guss. (Aliaceae) a aplicação sequencial das técnicas CMA₃/DAPI e nitrato de prata (AgNO₃) revelaram que as marcações com CMA₃ encontravam-se adjacentes às RON's (BESENDORFER et al., 2002).

As RONs são segmentos específicos dos cromossomos que contêm cópias em tandem dos genes 5.8S, 18S, 26S do DNAr que codificam RNA ribossômico. Estas regiões são normalmente localizadas como constrições secundárias de cromossomos profásicos a metafásicos, sendo responsáveis pela formação dos nucléolos, estruturas presentes nas células eucarióticas responsáveis pela biogênese dos ribossomos. (SUMNER, 2003).

A técnica de nitrato de prata revela as RONs funcionalmente ativas, evidenciando o número e a posição dos DNA ribossomais (ZURITA et al., 1997). Tais informações podem ser utilizadas na diferenciação intra- e inter-específica, além de servirem como padrões para auxiliar em questões de posicionamento taxonômico de uma espécie em termos de evolução do cariótipo (KLINKHARDT, 1998). Entretanto, esta técnica limita-se apenas à detecção das RON's ativas e em muitos genomas coexistem genes transcricionalmente ativos e inativos para a síntese de RNAr (SUMNER, 2003). Com isso, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem possibilitado mapear fisicamente as sequências de DNA repetitivo, sejam eles ativos ou inativos, tornando-se possível, por exemplo, localizar todos os sítios de DNAr 45S, além do sítios de DNAr 5S, os quais encontram-se em regiões cromossômicas diferentes daqueles da RON (LÓPEZ-LEÓN et al., 1999).

A técnica de hibridização *in situ* é ideal para localizar sequências de ácidos nucléicos (DNA ou RNA) dentro da célula, em organelas, cromossomos ou no núcleo celular. Com a FISH pode-se: (i) construir mapas físicos em cromossomos; (ii) analisar estruturas e aberrações cromossômicas (iii) investigar a fusão, evolução cromossômica e de genomas, (iv) realizar a determinação da expressão gênica, (v) identificar sequências virais em genomas e (vi) realizar a determinação sexual. Várias questões podem ser investigadas com a utilização da hibridização *in situ* fluorescente, sendo a mesma largamente utilizada na citogenética médica, programas de melhoramento animal e vegetal, bem como no estudo filogenético e evolutivo (LEITCH et al., 1994).

Sondas de DNA ribossomal 45S e 5S foram usadas na investigação das relações filogenéticas e dos níveis de ploidia entre espécies do gênero *Passiflora* L. Em geral, o número e a localização dos sítios de DNAr 45S foram representativos para inferir que o número diplóide $2n=12$ representa o provável genoma ancestral com número básico $x=6$ para o gênero e que as demais espécies apresentariam os números diplóides secundários $2n=18$,

$2n=20$ e $2n=24$ com números básicos $x=9$, $x=10$ e $x=12$, respectivamente (MELO; GUERRA, 2003). A análise citogenética realizada em diversas espécies de *Citrus* L. empregando o bandeamento com corantes fluorescentes CMA₃ e DAPI e hibridização *in situ* com sondas de DNAr 5S e 45S, demonstrou que a maioria das espécies estudadas são híbridos interespecíficos com pelo menos um par cromossômico heteromórfico em seus cariótipos. Por outro lado, a espécie *C. medica* L., foi considerada uma das prováveis espécies ancestrais do gênero por apresentar homomorfismo cromossômico em todo seu cariótipo (CARVALHO et al., 2005). Os dados obtidos pelos autores auxiliaram também na discussão sobre questões filogenéticas do grupo. Ao contrário dos exemplos supracitados, uma forte estabilidade cariotípica foi evidenciada intra e inter-especificamente no gênero *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae). Carvalho e Guerra (2002) analisando 34 acessos de *Manihot*, constaram que todos os cariótipos apresentavam quatro cromossomos com uma única sequência rica em GC marcada (blocos CMA₃⁺) na região subterminal e seis sítios de DNAr 45S, revelados por FISH, dos quais quatro foram encontrados na mesma posição que os blocos CMA₃⁺, demonstrando uma grande semelhança cariotípica entre os acessos, inferindo em estabilidade cariotípica.

1.6 Citogenética da família Solanaceae

Em geral, espécies da família Solanaceae apresentam o número básico $x=12$ e número diplóide de $2n=24$ com cromossomos pequenos variando de 1,2 a 2,4 μm no gênero *Solanum* e 3,5 a 4,0 μm em *Capsicum*, com predominância de cromossomos com morfologia de metacêntricos a submetacêntricos (BERNADELLO et al., 1994; MOSCONE, 1993). No entanto em *Cestrum* pode-se observar $x=8$, com $2n=16$ e suas espécies possuem os maiores cromossomos dentro da família, podendo chegar até 14 μm e conter 1,36 pg de DNA por cromossomo (SYKOROVÁ et al., 2003).

Atualmente parece haver uma concordância entre a maioria dos autores em relação ao número básico $x=12$ para o gênero *Solanum*, ocorrendo a existência de indivíduos diplóides, hexaplóides e até decaplóides registrada na maioria dos continentes (DARLINGTON; WYLIE, 1955). Por outro lado, outros autores afirmam que o gênero *Solanum* é polifilético com números básicos $x=12$, $x=23$, $x=24$, $x=36$ e $x=46$ (BARLOW, 1971; HENDERSON, 1973; RANDELL, 1970). Estes autores levaram em consideração a observação de meioses regulares para descrever o número básico. Os mesmos descartaram o caráter poliplóide de

muitas espécies desconsiderando que o gênero *Solanum* possui plantas perenes e de grande valência ecológica, características que segundo Stebbins (1971) reforça o aparecimento de poliplóides com meioses regulares após a passagem pela seleção natural frente a aquisição de um índice de fertilidade suficiente para a perpetuação da espécie e para a manutenção da população no ecossistema. Andrada et al., (2003) relataram na América do Sul a ocorrência de *Solanum nigrum* com número cromossômico $2n=24$. Entretanto, Edmonds e Chweya (1997) encontraram indivíduos hexaplóides ($2n=6x=72$) para esta espécie em populações da flora européia. Este fato demonstra que a localização geográfica e fatores edafoclimáticos influenciam na evolução e provavelmente no surgimento de poliplóides dentro do gênero. Os representantes da família Solanaceae mostram grande diversidade em relação a heterocromatina constitutiva. Em *Capsicum* suas espécies exibem heterocromatina na forma de blocos pericentroméricos e também adjacentes a constrição secundária, além de outros blocos menores dispersos ao longo do cariótipo (MOSCONE et al., 1993).

A caracterização cariotípica em duas espécies do gênero *Cestrus* L. (Solanaceae) revelou divergências quanto ao número e posição dos sítios de DNAr. A espécie *Cestrum amictum* Schldtl. apresentou sinais terminais de DNAr 45S no braço curto do par 6 e 8, e próximo ao braço longo do par 8 um sinal de DNAr 5S. Em *Cestrum intermedium* Sendtn. observou-se com sonda DNAr 45S sinais na região terminal do braço curto do par 7 e sinais subterminais no par 8 (FREGONEZI et al., 2006).

Muitos dos representantes do gênero *Solanum* possuem similaridades morfológicas, levando a existência de vários sinônimos e a erros taxonômicos. *S. laciniatum* é citada em muitos trabalhos como *S. aviculare* Forst. ambas possuindo citotipos diferentes com $2n=96$ e $2n=46$, respectivamente (BAYLIS, 1954). Outra espécie alvo de complicações taxonômicas é *S. nigrum*. Esta espécie é encontrada com níveis de ploidia diferentes na natureza, $2n=24$, $2n=48$ ou $2n=72$, mas sua grande semelhança com *S. americanum* provocou erros em trabalhos citogenéticos e moleculares (SULTANA; ALAM, 2007; PIERRE, COMUNICAÇÃO PESSOAL).

Estudos citogenéticos como o registro do número cromossômico são bem documentados para o gênero *Solanum* (OKOLI; 1983; HOWARD; SWAMINATHAN, 1953; EDMONDS; CHWEYA, 1997). Por outro lado, há carência em trabalhos com bandeamento cromossômico, filogenia, citotaxonomia e mapeamento físico. Em táxons economicamente importantes como *S. lycopersicum* e *S. tuberosum* e nos gêneros *Capsicum* e *Nicotiana* L., muitos trabalhos refinados como o mapeamento físico e estudos relacionados a origem alopoliplóide (em *Nicotiana tabacum*) são comuns (BONNEMA et al., 1997; LIVINGSTONE

et al., 1999; EAST, 1928; KITAMURA et al., 2001). Desta forma observa-se a preferência de estudos citogenéticos em espécies cultivadas, deixando ao lado táxons filogeneticamente importante que podem solucionar questões a respeito da taxonomia e evolução do gênero *Solanum*.

1.7 Contribuição da citogenética ao melhoramento genético vegetal

O estudo citogenético em grupos vegetais de importância econômica pode proporcionar benefícios aplicáveis a curto, médio e longo prazo, solucionando questionamentos tanto antes quanto depois do melhoramento genético propriamente dito. A simples e direta análise cariotípica pode identificar alterações ou aberrações cromossômicas numéricas e/ou estruturais, além de possibilitar a descrição do comportamento meiótico provendo informações, como taxa de fertilidade, problemas em relação ao pareamento ou reconhecimento dos cromossomos homólogos nos parentais e na progênie híbrida, além dos casos de não disjunção, ou seja, não segregação das cromátides nas anáfases o que pode levar a formação de gametas aneuplóides. Por outro lado, a caracterização citogenética detalhada, como o mapeamento físico cromossômico, possibilita a descrição clara da homologia cariotípica de uma determinada cultivar ou variedade, permitindo a inclusão desses dados nos esquemas de cruzamentos e retro-cruzamentos contribuindo para minimizar possíveis erros de seleção de progênies ou ainda, determinando o percentual dos genomas parentais nos indivíduos híbridos. Desta forma a indicação de parentais favoráveis a hibridações pode ser facilitada através do uso de parâmetros citogenéticos (SINGH, 2002). Os estudos citogenéticos em espécies selvagens e cultivadas de *Solanum tuberosum* (batata) possibilitaram a observação de questões relevantes ao melhoramento genético desta cultura, como a produção de linhagens híbridas haplóides, a manutenção do status haplóide durante as gerações e a avaliação da instabilidade cromossômica, observada pela ocorrência de alterações estruturais (PELOQUIN et al., 1991; HERMSEN, 1994; WILKINSON, 1994; MATSUBAYASHI, 1991). Muitos dos problemas ocorrentes em híbridos de *Solanum lycopersicum* (tomate), foram esclarecidos pelo uso de técnicas citogenéticas desde a década de 40, por exemplo, Charles (1945) investigando as causa da não frutificação em cultivares híbridas de tomate observou aneuploidias e comportamento irregular da meiose, já MacArthur e Chiasson (1947) relataram a possibilidade da introgressão gênica entre espécies selvagens e cultivadas de tomate, para solucionar questões como resistência a pragas e doenças. Desta

forma observa-se que vários trabalhos inconclusivos de obtenção de híbridos intra-específicos poderiam ter o seu insucesso pré-suposto através da avaliação cariotípica, demonstrando a incompatibilidade cromossômica dos parentais (VREUGDENHIL et al., 2007). Análises citogenéticas também podem esclarecer problemas referentes ao mecanismo reprodutivo da cultivar híbrida, como a identificação do comportamento apomítico. Análises moleculares, estatísticas e bioquímicas podem indicar a ocorrência de apomixia, mas a análise citogenética pode reforçar a conclusão de apomixia, além de revelar a ocorrência de alterações e aberrações cromossômicas e a possível viabilidade da prole. O indicio citogenético do comportamento apomítico pode ser visto em espécies vegetais em que se observam altas taxas de fertilidade em indivíduos aneuplóides, triplóides e em cruzamentos com progênies inesperadamente férteis, uma vez que nestes casos a fertilidade seria baixa ou nula (STEBBINS, 1950; FRYXELL, 1957; RAMACHANDRAN; RAGHAVAN, 1992).

A poliploidia pode ser simplesmente explicada pela existência de mais de dois conjuntos cromossômicos em um organismo e é considerado um importante fenômeno genético para a evolução e domesticação de cultivares (COMAI, 2005). A possibilidade de se obter artificialmente poliplóides se deu graças a descoberta do antimitótico colchicina no final de 1930, o qual pode ser utilizado para induzir poliploidia em vegetais, com isto os benefícios da indução da poliploidia começou a ter espaço no melhoramento genético vegetal (VAN TUYL et al. 1992; TAYLOR et al. 1976). A poliploidia pode ser observada pela simples coloração convencional dos cromossomos mitóticos, com a utilização de corantes basófilos (Geimsa) ou acidófilos (Oceina acética), e sua observação meiótica revela características referentes a estabilidade, como a presença de monovalentes e outras anomalias meióticas, além de revelar um pouco da homologia cariotípica. Desta forma a análise cariotípica convencional, fornece informações importantes acerca do comportamento citológico/reprodutivo na espécie ou cultivar (VAN BOGAERT, 1975). Os benefícios da obtenção artificial de poliplóides, e a aplicação no melhoramento genético vegetal estão exemplificados abaixo:

A. Produção de cultivares estéreis.

Em culturas estéreis não existe fluxo gênico, desta forma não há o risco da cultivar invadir ecossistemas indesejáveis nem de modificar as características agrônomicas por cruzamento. Promover a esterilidade vegetal pela indução de poliploidia é a forma mais

segura e menos custosa para este fim, podendo ser aplicada em vários táxons (SANFORD, 1983).

B. Restaurar a fertilidade em híbridos.

È comum a esterilidade em híbridos, principalmente em híbridos originários de táxons distantes, este fato ocorre devido ao não pareamento dos cromossomos homólogos na meiose. Entretanto, com a formação artificial de poliplóides o caráter fértil surge, pelo ajuste do pareamento meiótico (SANFORD, 1983).

C. Aumentar a resistência e fatores bióticos e abióticos.

A indução de poliplóides pode ser provocada para aumentar a expressão gênica e consequentemente aumentar a concentração de metabolitos secundários, que em alguns casos são utilizados nos mecanismos de defesa a *stresses* bióticos e abióticos. Por exemplo, em autotetraplóides de *Lolium* L. (Gramineae) observa-se a maior resistência a doenças que seus semelhantes diplóides (VAN BOGAERT, 1975). Até o presente momento este fato foi observado em poucos grupos vegetais. Entretanto, sua aplicação no melhoramento genético vegetal poderia ser melhor investigada.

D. Aumento de partes vegetais de interesse agrônômico.

A formação artificial de poliplóides pode ser utilizada com a finalidade de aumentar o volume de partes vegetais de interesse agrônômico como frutos, partes verdes, úteis para a alimentação animal, e até o aumento deflores voltadas a comercialização ornamental (KEHR, 1996).

A hibridização *in situ* foi utilizada há mais de 30 anos atrás por Gall e Pardue (1969) para localizar seqüências de ácidos nucléicos diretamente nos cromossomos. A técnica consiste na utilização de uma sonda de DNA ou de RNA, marcada com fluorescência ou radioatividade, que pode ser utilizada na detecção de seqüências ou segmentos específicos, como telômeros, centrômeros, entre outros. Nos últimos anos, a hibridização *in situ* vem sendo empregada com sucesso para localizar regiões específicas nas mais variadas espécies e cultivares, além de possibilitar a construção de mapas para seqüências específicas, como o DNAr 45S ou 5S. Li et al., (2006) propôs a utilização de *Solanum pinnatisectum* Dunal como fonte de genes de resistência biótica para serem introgedidos em *Solanum tuberosum*, os

mesmos autores realizaram o estudo cariotípico detalhado nas duas espécies e ressaltaram a importância da análise cariotípica para futuras tentativas de introgressão. A investigação precisa da introgressão gênica, seja por via clássica, transgenia ou fusão de protoplasto, pode ser avaliada pela visualização *in situ* do gene introgedido (allied gene). Em *Vicia faba* L. foram localizadas as sequências de DNAr 5S, 45S, elementos FokI, DNA telomérico, genes para proteínas da semente, entre outros (FUCHS et al., 1998a). Igualmente Fuchs et al., (1998b) utilizaram a hibridização *in situ* para localizar genes de RNAr para proteínas de sementes e para a identificação de cada par cromossômico de *Pisum sativum* L. (ervilha).

Pelo exposto observa-se que varias técnicas citogenéticas podem ser aplicadas, seja em espécies selvagens, cultivares ou híbridos com o intuito de solucionar vários problemas encontrados durante o processo de domesticação e evolução de cultivares. Com tudo nota-se a importância da citogenética no melhoramento genético vegetal, indicando a aplicabilidade da mesma para a criação de novas cultivares e como ciência diagnóstica.

1.8 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares constituem-se numa ferramenta bastante utilizadas em estudos genéticos, uma vez que detectam o polimorfismo diretamente ao nível do DNA, não sofrendo qualquer tipo de influência ambiental, independentemente do estado de desenvolvimento do organismo, nem do tecido analisado. Com base nos polimorfismos revelados, tem sido possível fazer inferências sobre as correlações entre o genótipo e fenótipo dos indivíduos em diversas populações. Dentre as aplicações de curto prazo dos marcadores moleculares estão a identificação de origem parental, estudos de diversidade e distância genética, a identificação e proteção de variedades, certificação de pureza genética e monitoramento de cruzamentos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Com base no polimorfismo informado pode-se inferir sobre relações genotípicas e fenotípicas, taxonomia, filogenia e ecologia, através do uso dos diversos marcadores moleculares (JOSHI et al., 2000).

Dentre os marcadores moleculares amplamente utilizados para a avaliação da variabilidade genética estão os RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), isoenzimas, entre outros (ZÁRATE et al., 2005; CASAS et al., 2006; PERONI et al., 1999; SANCHEZ et al., 1996; JONES et al., 1997).

Os microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR) são pequenas sequências de DNA consistindo de uma até seis bases repetidas em tandem e baseiam-se em reações de PCR, em que são amplificadas as regiões entre os microssatélites (STAUB et al. 1996; GUPTA; VARSHNEY, 2000). Estas sequências são hipervariáveis e de grande abundância nos genomas, os locos SSR representam uma geração poderosa de marcadores moleculares co-dominante em eucariontes. Entretanto há limitações como a necessidade do conhecimento prévio da sequência que irá ser flanqueada pelo olii na reação de PCR. Por este fato a técnica é mais utilizada em culturas ou táxons de grande importância econômica (LIU; WENDEL, 2001)

Os marcadores ISSR são dominantes e sua utilização envolve a amplificação de segmentos de DNA presentes entre duas regiões repetidas e orientadas em posições opostas. Esta técnica utiliza em geral, olii com tamanhos entre 16 a 25pb desenhado a partir de regiões de microssatélite (GUPTA; VARSHNEY, 2000; MEYER et al., 1993; TSUMURA et al., 1996; WANG et al., 1998). Para a aplicação do marcador ISSR não se necessita o conhecimento prévio do genoma, pois o mesmo não é específico como o marcador SSR, desta forma pode-se utilizar o ISSR em qualquer táxon revelando padrões altamente polimórficos (ZIETKIEWICZ et al., 1994). A técnica combina muitos dos benefícios do AFLP e microssatélites com a plasticidade e baixo custo do RAPD. O tamanho dos olii, permitem o anelamento semi-específico, requerendo em geral altas temperaturas de anelamento, entre 40 a 65 °C, dependendo da quantidade de CG no olii utilizado. Estudos sobre a reprodutibilidade mostram que apenas bandas claras e finas não são reprodutíveis. Cerca de 92-95% dos fragmentos podem ser separados com o uso de poliacrilamida, este valor pode ser menor quando utilizado agarose (REDDY et al., 2002; WU et al., 1994)

A possibilidade do uso de uma ferramenta rápida e precisa para a identificação do polimorfismo entre genótipos é uma das vantagens dos marcadores ISSR para estudos filogenéticos, taxonômicos ou para fins de melhoramento genético vegetal (SALIMATH et al., 1995). Desta forma pode-se caracterizar germoplasmas estabelecendo a identificação de variedades, híbridos, parentais, entre outros. Por exemplo, Charters e Wilkinson (2000), utilizando olii ISSR di-nucleotídicos caracterizaram de forma eficiente uma coleção de germoplasma de cacau. A identificação, caracterização de genótipos e a estimativa da diversidade genética também foi realizada em diversas culturas como batata e batata doce, arroz, trigo, feijão de corda, entre outras (PROVOST; WILKINSON, 1991; LANHAN; BREMAN, 1998; JOSHI et al., 2000; NAGAOKA; OGIHARA, 1997; AJIBADE et al., 2000).

Marcadores ISSR também podem ser utilizados para saturar mapas de ligação, assim como em estudos populacionais (REDDY et al., 2002). Adicionalmente, pode-se utilizar outros marcadores associados ao como o ISSR para a análise mais refinada do polimorfismo (JOSHI et al., 2000; BECKER; HEUN, 1995; WU et al., 1994). O nível de polimorfismo observado varia em relação ao método de detecção utilizado. Eletroforese em gel de poliacrilamida combinado com radioatividade se mostra mais eficaz, seguido de eletroforese em poliacrilamida com prata e ultimamente em gel de agarose com brometo-etídio (JOSHI et al., 2000). Entretanto, altos níveis de polimorfismo podem ser detectados apenas com eletroforese em agarose sem radioatividade (HAMPL et al., 2001; MEYER et al., 1993; TSUMURA et al., 1996)

O advento das técnicas moleculares proporcionou uma revolução na sistemática botânica, trazendo novas idéias acerca das relações filogenéticas em todos os níveis taxonômicos (BOHS, 2005). Em *Solanum* diferentes marcadores foram utilizadas para explicar as relações filogenéticas fornecendo informações em nível de gêneros, subgênero e seções com o uso de marcadores moleculares (BOHS; OLMSTEAD, 2001; JACOBY et al., 2003; FURINI; WUNDER, 2004). Bohs (2005) identificou 13 clados dentro do gênero *Solanum*, baseado na seqüência *ndhF* do DNA de cloroplasto, corroborando, ao menos parcialmente, aos estudos morfológicos e bioquímicos proposto por D'Arcy (1971; 1991). O agrupamento proposto por Bohs (2005) também propôs a inclusão novos clados como o *Dulcamaroid* e *Morelloid* dentro do gênero *Solanum*. Outros estudos utilizando seqüências específicas do DNA nuclear como os de ITS, genes de cloroplastos como *trnT-trnF* e *trnS-trnG*, separadamente ou em conjunto, contribuíram para o agrupamento filogenético e estudo taxonômico do gênero *Solanum*. Segundo Neigel e Avire (1986) muitas destas informações baseadas no estudo de lócus únicos podem incorrer em erros, uma vez que variações em apenas uma ou poucas áreas do genoma, muitas vezes, mostram-se insuficientes para inferências taxonômicas e filogenéticas. Os erros podem ser evitados pelo uso de métodos multi-locus como RAPD, RFLP e ISSR, fornecendo informações filogenéticas relevantes contidas em grandes áreas do genoma (HAMPL et al., 2001). Muitos estudos multi-locus investigaram as relações filogenéticas em *Solanum*, incluindo técnicas como AFLP (JACOBY et al., 2003; FURINI; WUNDER, 2004) e RAPD (VAN DEN BERG et al., 2002). Poczai et al., (2008) através da análise filogenética utilizando o marcador randômico RAPD em 42 acessos do gênero *Solanum*, sugeriu a exclusão da seção *Dulcamara*, bem como de outros táxons do subgênero *Potatoe* e sua inclusão no subgênero *Solanum* devido a maior

proximidade genética, desta forma fornecendo dados úteis aos estudos filogenético do gênero *Solanum*.

A utilização dos marcadores ISSR no gênero *Solanum* não tem sido muito documentada, principalmente nas espécies silvestres, limitando o conhecimento a respeito deste marcador molecular no gênero *Solanum* (ISSHIKI et al., 2008; DOGANLAR et al., 2002; NUNOME et al., 2003a; 2003b). Isshiki et al., (2008) relataram a ausência de estudos com marcadores ISSR para detectar a variação genética em *S. melongena* (berinjela) e espécies relacionadas. Entretanto, alguns trabalhos com ISSR são observados em táxons cultivados como *S. tuberosum*, *S. melongena* e *S. lycopersicum*. Bornet et al., (2001) analisando a diversidade genética entre cultivares de *S. tuberosum* européia e argentinas, concluíram que a utilização de apenas três olii é suficiente para identificar os 28 acesso analisados. Isshiki et al., (2008) analisando oito cultivares de *S. melongena* mais 12 espécies relacionadas, estabeleceram que a aplicação de apenas dois olii podem identificar os oito acessos de *S. melongena*. Os mesmos autores estabeleceram comparações entre os outros marcadores moleculares, como Isoenzima e variações na sequência do cpDNA e mtDNA, e concluíram que os marcadores ISSR são eficazes nos estudos de relações filogenéticas e para a identificação de cultivares.

1.9 Referências bibliográficas

- AJIBADE, S. R.; WEDEN, N. F.; CHITE, S. M. Inter-simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. **Euphytica**, v. 111, n. 1, p. 47-55, 2000.
- ANDERSON, G. J. Dioecious *Solanum* species of hermaphroditic origin is an example of a broad convergence. **Nature**, v. 282, p. 836-838, 1979.
- ANDERSON, G. J.; SYMON, D. E. Functional dioecy and andromonoecy in *Solanum*. **Evolution**, v. 43, p. 204-219. 1989.
- ANDRADA, A. B.; MANSILA D. A.; NORA Y D. V. P.; ADRIANA. Caracterización citológica em *Solanum nigrum* L. **Agro sur**, v. 31, n.1 , 2003.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. **Classification for the orders and families of flowering plants: APG II** Botanical Journal of the Linnean Society v. 141, p. 399-436, 2003.
- AZKUE, D. Chromosome diversity of South America *Oxalis* (Oxalidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 132, p. 143-152, 2000.
- BARLOW, B. A. Cytogeography Of The Genus *Eremophilo*. **Australian Journal of Botanic**, v. 19, p. 295-310, 1971.
- BATTISTIN, A.; BIONDO, E.; AULER, N. M. F. Cariótipos em 16 populações de *Lathyrus* L., **Revista brasileira de genética**, caxambu v. 19, n. 3, p. 129, 1996.
- BAYLIS, G.T.S. Chromosome number and distribution of *Solanum aviculare* Frost. And *S. laciniatum* Ait. **Transaction and Proceeding Royal Society**, v. 82: p. 639-643. 1954.
- BECKER, J.; HEUN, M. Mapping of digested and undigested random amplified microsatellite polymorphisms in barley. **Genome**, v. 38, p. 991-998. 1995.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in Angiosperms. **Annals of Botany**, v. 76, p. 113-176, 1995.
- BERNARDELLO, L. M.; HEISER, C. B.; PIAZZANO, M. Karyotypic studies in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae). **Australian Journal of Botanic**, v. 77, p. 95-103, 1994.
- BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M. E.; PAPES, D. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 139, p. 99-108, 2002.
- BIOLOGIE.UNI-HAMBURG.DE. Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, Prof. Dr. Otto Wilhelm Thomé 1885, Germany. Disponível em: <<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/thome/index.html>>. Acesso em: 18 dez. 2008.
- BOHS L. Major clades in *Solanum* based on *ndhF* sequences. In: **Keating RC, Hollowell VC, Croat TB (eds) A Festschrift for William G. D'Arcy: the legacy of a taxonomist.**

Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden, vol 104. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, p. 27–49. 2005.

BOHS, L.; OLMSTEAD, R. G. A reassessment of *Normania* and *Triguera* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 228, p. 33–48, 2001.

BOHS, L.; OLMSTEAD, R. G. Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. **Systematic of Botanic.**, v. 22, p. 5-17, 1997.

BONNEMA G. ; SCHIPPER D. ; VAN HEUSDEN S. ; ZABEL P. ; LINDHOUT P. Tomato Chromosome 1 : High Resolution Genetic And Physical Mapping Of The Short Arm In An Interspecific *Lycopersicon Esculentum* L. **Peruvianum Cross**, 1997.

BUCHMANN, S. L. Buzz pollination in Angiosperms. In: C.E. Jones & R.J. Little (Eds.). **Handbook of experimental pollination biology.** Van Nostrand & Reinhold, New York, p.73-113. 1983.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Report**, v. 19, p. 209–215, 2002.

BUCHMANN, S. L.; JONES, C. E.; COLIN, L. J. Vibratile pollination of *Solanum douglasii* and *Solanum xantii* (Solanaceae) in Southern California. **The Wasman Journal Biology.**, v 35, p. 1-25. 1977.

CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, v. 136, n. 2, p. 159-168, 2002.

CARVALHO, R.; SOARES, W. S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetic and Genome Research.**, v. 109, n. 1-3, p. 276-282, 2005.

CASAS, A.; CRUSE-SANDERS, J.; MORALES, E.; OTERO-ARNAIZ, A.; VALIENTE-BANUET, A. Maintenance of phenotypic and genotypic diversity in managed populations of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) by indigenous peoples in Central Mexico. **Biodiversity and Conservation**. v.15, p. 879-898, 2006.

CHARLES M. R. A survey of cytogenetic causes of unfruitfulness in the tomato. **Genetics**, v. 30, p. 347, 1945.

CHARTERS, Y. M.; WILKINSON, M. J. The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p. 160-166, 2000.

COLEMAN, J. R.; COLEMAN, M. A. Reproductive biology of an andromonoecious *Solanum*. (*S. palinacanthum* Dunal). **Biotropica**, v. 14, p. 69-75, 1982.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants second edition.** The New York Botanical Garden, New York. 555p. 1988.

D'ARCY, W. G. Solanaceae in flora of Panama, Part 9. (Woodstone RE, Schery RW and Collaborators). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 60, n. 3, p. 573–780, 1973.

D'ARCY, W. G. **Solanaceae studies II: Typification of subdivisions of *Solanum***. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 59, p. 262-278, 1972.

D'ARCY, W. G. The calyx in *Lycianthes* and some other genera. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 73, p. 117-127, 1986.

D'ARCY, W. G. The Solanaceae since 1976, with review of its biogeography. in J. G. Hawkes, R. N. Lester, M. Nee & Estrada (editors), *Solanaceae Taxonomy, Chemistry, Evolution*. **Royal Botanic Gardens, Kew**, v. 75, 1991.

DARLINGTON, C.D.; WYLIE, A.P. Chromosom atlas of flowering plants. **George Allen & Unwin Ltd.**, London, p. 325-326. 1955.

DAUNAY, M. C.; LESTER, R. N.; HENNART, J. W.; DURANTON, C. Eggplants: present and future. **Capsicum Eggplant Newslett**, v. 19, p. 11–18, 2000.

DILLON, N. Heterochromatin structure and function. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 631–637, 2004.

DOGANLAR, S.; FRAY, A.; DAUNAY, M.C.; LESTER, R.N.; TANKSLEY, S.D. A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae. **Genetics** 161, 1697–1711, 2002.

EAST E. M. The genetics of the genus *Nicotiana*. **Bibliographica Genetica**, v. 4, p. 243–318. 1928.

EDMONDS, J. M.; CHWEYA, J. A. Black nightshades. *Solanum nigrum* L. and related species. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 15. **Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute**, Rome, Italy. v. 115, 1997.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN. p. 220, 1998.

FREGONEZI, J. N.; FERNAMDES, T.; TOREZAN, J. M. D.; VIEIRA, A. O. S.; VANZELA, A. L. L. Karyotype differential of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. **Genetic and molecular biology**, v. 29, n. 1, p. 97-104, 2006.

FUCHS, J.; KÜHNE, M.; SCHUBERT, I. Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent in situ hybridisation. **Chromosoma**, v. 107, p. 272-276, 1998b.

FUCHS, J.; STREHL, S.; BRANDES, A.; SCHWEIZER, D.; SCHUBERT, I. Molecular-cytogenetic characterization of the *Vicia faba* genome – heterochromatin differentiation, replication patterns and sequence localization. **Chromosome Research**, v. 6, p. 219-230, 1998a.

FURINI, A.; WUNDER J. Analysis of eggplant (*Solanum melongena*) related germplasm: morphological and AFLP data contribute to phylogenetic interrelations and germplasm utilization. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 197–208. 2004.

GEPTS, P. The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies. **Evolution Biology**, v. 27, p. 51–94, 1993.

GILL, B. S.; FREIRE, B.; EWDO, T. R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberration in wheat (*Triticum aestivum*). **Genome**, v. 34, p. 830-839, 1991.

GOLDBLATT, P. Polyploidy in angiosperms: monocotyledons, In: **W.H. Lewis (ed.). Polyploidy**. Plenum Press, New York. p. 219-239, 1980.

GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, v. 71, p. 234–241. 1993.

GUERRA, M. Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas. Tópicos de citogenética e evolução de plantas. **Sociedade brasileira de genética**, p. 137-153, 1985.

GUERRA, M. Uso Do Giemsa Na Citogenética Vegetal: comparação entre bandeamento simples e o bandeamento. **Ciência e cultura**, v. 35, p. 190-193, 1983.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A. E. B.; CORNELIO, M. T. M.; SANTOS, K.; SOARES, W. D. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *Citrus* germplasm bank. **Revista brasileira de genética**, v. 20, n. 3, p. 489-496, 1997.

GUPTA, P.K.; VARSHNEY, R.K.. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**. v. 113, p. 163–185. 2000.

HAMPL V.; PAVLIEEK A.; FLEGR J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprintingbased phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 731–735. 2001

HARTWELL, L. H.; HOOD, L.; GOLDBERG, M. L.; REYNOLDS, A. E.; SILVER, L, M.; VERES, R. C. **Genetics: From genes to genomes**. McGraw-Hill Companies, USA, p. 820, 2000.

HENDERSON, R. J. F. I.O.P. Chromosome number report. **Taxonomy**, v. 22, p. 116, 1973.

HERASIMENKO, I. I. New forms of *Solanum* L. subgenus *Archaeosolanum*. **Byull. Gl. Bot. Sada** v. 59, p. 71-73, 1965.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. London: Oxford University Press. 1978.

HOWARD, H. W.; SWAMINATHAN, M. S. the cytology of haploid plant of *Solanum dimissum*. **genetica**, v. 26, p. 381-391, 1953.

ISSHIKI, S.; IWATA, N.; KHAN, M. R. ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.), **Scientia Horticulturae**, v. 117, p. 186–190, 2008.

ISSHIKI, S.; OKUBO, H.; FUJIEDA, K. Phylogeny of eggplant and related *Solanum* species constructed by allozyme variation. **Scientia Horticulturae**, v. 59, p. 171–176, 1994a.

ISSHIKI, S.; SUZUKI, S.; YAMASHITA, K. RFLP analysis of mitochondrial DNA in eggplant and related *Solanum* species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 133–137, 2003.

ISSHIKI, S.; UCHIYAMA, T.; TASHIRO, Y.; MIYAZAKI, S. RFLP analysis of a PCR amplified region of chloroplast DNA in eggplant and related *Solanum* species. **Euphytica**, v. 102, p. 295–299, 1998.

JACOBY, A.; LABUSCHAGNE, M. T.; VILJOEN, C. D. Genetic relationship between Southern African *Solanum retroflexum* Dun and other related species measured by morphological and DNA markers. **Euphytica**, v. 132, p. 109–113, 2003.

JONES, C. J.; EDWARDS, K. J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M. O.; SALE, F.; VAN DE WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSHI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.; KARP A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 381–390, 1997.

JOSHI, S. P.; GUPTA V. S.; AGGARWAL, R. K.; RANJEKAR P. K.; BRAR, D. S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 1311–1320, 2000.

KARIHALOO, J. L.; GOTTLIEB, L. D. Allozyme variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 578–583, 1995a.

KARIHALOO, J. L.; GOTTLIEB, L. D., Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 767–770. 1995b.

KARPECHENKO, G. D. Chromosomes of Phaseolinae. **Bull. Appl. Bot. Pl. Breed.** n. 14, p. 143–148, 1925.

KIM, E. S.; PUNINA, E.O; RODIONOV, A. V. Chromosome CPD (PI/DAPI)- and CMA/DAPI-banding patterns in *Allium cepa* L. **Russian Journal of Genetics**, v. 38, n. 4, p. 392–398, 2002

KITAMURA, S.; INOUE, M.; SHIKAZONO, N.; TANAKA, A. Relationships among *Nicotiana* species revealed by the 5S rDNA spacer sequence and fluorescence *in situ* hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 678–686, 2001.

KLINKHARDT, M. B. Some aspects of karyoevolution in fishes. **Animal Research Development**, v. 47, p. 7–36, 1998.

KNAPP, S.; BOHS, L.; NEE, M.; SPOONER, D. M. Solanaceae – a model for linking genomics with biodiversity. **Comparative and Functional Genomics**, v. 5, p. 285-291. 2004.

KURATA, N.; MONOMURA, K.; HARUSHIMA, Y. Rice Genome Organization: the Centromere and Genome Interactions. **Annals of Botany**. n. 90, p. 427-435, 2002.

LANHAM, P. G.; BRENNAN R. M. Characterization of the genetic resources of redcurrent (*Ribes rubrum*: subf. *Ribesia*) using anchored microsatellite markers. . **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 917–921, 1998.

LEITÃO FILHO, H. F.; ARANHA, C.; BACCHI, O. **Plantas invasoras de culturas no estado de São Paulo.**, v. 2. Hucitec & Agiplan, São Paulo, 1975.

LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON D.; LEITCH I. J. **In Situ Hybridization: a practical guide**, p. 1-3, 1994.

LESTER, R. N.; HASAN, S. M. Z. Origin and domestication of the brinjal eggplant *Solanum melongena* from *S. incanum* in Africa and Asia. **In Solanaceae III. Taxonomy, Chemistry, Evolution** (eds Hawakes, J. G., Lester, R. N., Nee, M. and Estrada, N.), The Royal Botanic Gardens, Kew, London, p. 369–388, 1991.

LI, H.Y.; CHEN, Q.; BEASLEY, D.; LYNCH, D.R.; AND GOETTEL, M. Karyotypic Evolution and Molecular Cytogenetic Analysis of *Solanum pinnatisectum*, a New Source of Resistance to Late Blight and Colorado Potato Beetle in Potato. **The Japan Mendel Society**, v. 71, n. 1. p. 25-23, 2006.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Retroelement activation followed by rapid repression in interspecific hybrid plants. **Genome**, v. 43. p. 874-880, 2001.

LIVINGSTONE, K. D.; LACKNEY, V. K.; BLAETH, J. R.; VAN WIJK, R. M.; JAHN, K. Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the Solanaceae. **Genetics**, n. 161. p. 1697–1711, 1999.

LOPEZ-LEON, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. Unusually high amount of inactive ribosomal DNA in the grasshopper *Stauroderus scalaris*. **Chromosome Research**, v. 7, p. 83-88, 1999.

MACARTHUR, J. W.; CHIASSON L. P. Cytogenetic notes on tomato species and hybrids. **Genetics**, n. 32, p. 165. 1947

MACE, E. S.; LESTER, R. N.; GEBHARDT, C. G. AFLP analysis of genetic relationships among the cultivated eggplant, *Solanum melongena* L., and wild relatives (Solanaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 626–633, 1999.

MANN, J. D. Production of Soladine for the pharmaceutical industry. **Advances in agronomy**, v. 30, p. 207–245, 1978.

MATSUBAYASHI M., In: T. Tsuchiya and P.K. Gupta (eds), **Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution**, Part B, p. 93. Elsevier, Amsterdam. 1991.

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

MEYER, W; MICHELL, T. G; FREEDMAN, E. Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in polymerase chain reaction to distinguish strain of *Cryptococcus neoformans*. **Journal Clinical Biology**, v. 31, p. 2274-2280, 1993.

MOSCONE, E. A. Estudios Cromosomicos en *Capsicum* (Solanaceae) II. Analisis cariotipico de *C. parvifolium* y *C. Annuum* Var. Annuum. **Kurtziana.**, v. 22: p. 9-18, 1993.

NAGAOKA, T.; OGIHARA. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD marker. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 597-602, 1997.

NEIGEL, J. E; AVISE, A. C. Phylogenetic relationship of mitochondrial DNA under various models of speciation. In: Karlin S, Nevo E (eds) Evolutionary processes and theory. **Academic Press.**, New York, p. 515-534, 1986.

NISHIKAWA, T.; SATO, K. **Chromosome numbers of *Erigeron miyabeanus* Tatew. & Kitam. (Asteraceae) and the alien taxa from Hokkaido, northern Japan.**, (Bulletin of the National Science Museum. Serie B. v. 29). p. 145-148, 2003.

NUNOME, T.; SUWABE, K.; IKETANI, H.; HIRAI, M. Identification and characterization of microsatellites in eggplant. **Plant Breeding** n. 122, p. 256-262, 2003a.

NUNOME, T.; SUWABE, K.; OHYAMA, A.; FUKUOKA, H. Characterization of trinucleotide microsatellites in eggplant. **Breeding Science**, n. 53, p. 77-83. 2003b.

OKOLI BE. 1983. Hybridisation, Polyploidy and Apomixis in *Andropogon tectorum* Schum and Thorn. (Graminae). **New Phytologist**. 93: 591-597.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; OLIVEIRA, L.C.A. Biologia floral de uma população de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) em Lavras, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 11, p. 23-32, 1988.

OLMSTEAD, R. G.; SWEERE, J. A. Combining data in phylogenetic systematics: an empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. **Systematic Biology**, v. 43, p. 467-481, 1994.

OLMSTEAD, R. G.; PALMER, J. D. Implications for the phylogeny, classification, and biogeography of *Solanum* from cpDNA restriction site variation. **Systematic of Botanic.**, v. 22, p. 19-29. 1997.

OLMSTEAD, R. G.; SWEERE, J. A.; SPANGLER, R. E.; BOHS, L. PALMER, J. D. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: Nee M, Symon DE, Lester RN, Jessop JP (eds) Solanaceae IV: advances in biology and utilization. **Royal Botanic Gardens, Kew**, p. 111-137, 1999.

PELOQUIN, S.J.; WERNER, E.J.; YERK, G.L. In: T. Tsuchiya and P.K. Gupta (eds), **Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution**, Part B, p. 79. Elsevier, Amsterdam. 1991.

PERONI, N.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Diversidade inter- e intra-específica e uso de análise multivariada para morfologia da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): um estudos de caso. **Scientia Agrícola**. v. 56, n. 3, p. 587-595, 1999.

PIERRE, P. M. O. Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill) NE. BR (Verbenaceae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Lavras. p. 99. 2008.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, IBDF. Rio de Janeiro, v. 4, 1969.

POCZAI, P.; TALLER, J.; SAZABÓ, I. Analysis of phylogenetic relationships in the genus *Solanum* (Solanaceae) as revealed by RAPD markers. **Plant Systematic and Evolution**, v. 275, p. 59-67, 2008.

PROVOST, A.; WILKINSON, M. J. A newsystem of comparinmg PCR primers applied to ISSR fringerprint of popotato cultivar. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 107-112. 1991.

RAMACHANDRAN, C. AND V. RAGHAVAN. 1992. Apomixis in distant hybridization, in Distant Hybridization of Crop Plants. G. Kalloo and J.B. Chowdhury, Eds. Monograph, **Theoretical and Applied Genetics**. n. 16, p. 106–121, 1992.

RAMANNA, M.S.; PRAKKEN, R. Structure of and homology between pachytene and somatic metaphase chromosomes of the tomato. **Genetica**, n. 38, p. 115–133, 1967.

RANDELL, B. R. **Adaptations in the genetic systems of the Australian arid zone Cassia species**. **Australian journal of botany**., v. 18, p. 77-97, 1970.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plat breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 2002.

ROE, K. E. A revision of *Solanum* section Brevantherum (Solanaceae). **Britonia**., v. 24, p. 239–278. 1972.

RUFAS, J. S.; ITURRA, P.; SOUZA, W.; ESPONDA P. Simple silver staining procedure for the localization of nucleolus and nucleolar organizers under light and electron microscopy. **Archives of Biology**, v. 93, p. 267-276, 1982.

SAKATA, Y.; NISHIO, T.; MATTHEWS, P.J. Chloroplast DNA analysis of eggplant (*Solanum melongena*) and related species for their taxonomic affinity. **Euphytica** 55, 21–26, 1991.

SAKATA, Y.; LESTER, R. N. Chloroplast DNA diversity in eggplant (*Solanum melongena*) and its related species *S. incanum* and *S. marginatum*. **Euphytica**, v. 80, p. 1–4, 1994.

SALIMATH, S. S.; OLIVEIRA, A. C.; GODWIN, I. D.; BENNETZEN, J.L. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome**, v. 38, p. 757–763, 1995

SANCHEZ DE LA HOZ, M. P.; D’VILA, J. A.; LOARCE, Y.; FERRER, E. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. **Genome**, v. 39, p. 112-117. 1996.

SANFORD, J.C. Ploidy manipulations, p. 100-123. In: J.N. Moore and J. Janick (eds.). *Methods in fruit breeding*. **Purdue University Press**, West Lafayette, Ind. 100-123, 1983.

SARBHOY, R. K. Cytogenetical studies in *Cyamopsis tetraglona* (L.) Taub. **Cytologia** 42: 147–156, 1977.

SIMMONDS, N. W.; CHOUDHURY, B. Egg Plant (*Solanum melongena* L.). **Evolution of Crop Plants**. Longman Inc., New York. 1976.

SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS. **Pesquisa Municipal Unificada**. São Paulo, SEADE, 2006, 43p.

SOLANACEAE SOURCE. Disponível Em <<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/solanaceaesource/solanum/phylogeny.jsp>>. Acesso em: 18 dez de 2008

SOUZA, M. G. C.; BENKO-ISEPPON, A. M. Cytogenetics and banding patterns on Caesalpinioideae and Papilionioideae native from Pará, Amazonas, Brasil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 144, n. 1, p. 181-191, 2004.

SOUZA; V. C. **Botânica sistemática. Guia ilustrado apara identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** / Vinicius castro Souza, Harri Lorenzi. – Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2005.

STAUB, J. E.; SERQUEN, F. C.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **Scientia Horticulturae**, v. 31, n. 5, p. 729–739. 1996.

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

SULTANA, S. S.; ALAM, S. S. Differential fluorescent chromosome banding of *Solanum nigrum* L. and *Solanum Villosum* L. from bangladesh. **The japan Mendel Society, Cytologia**, 72: 213-219, 2007.

SUMNER, A.T. **Chromosomes: Organization and Function**. Blackwell Publishing Limited, p .304, 2003.

SYKOROVÁ, E.; YOONG, L. I. M.; CHASE, M. W.; KNAPP, S.; LEITCH, I. J.; FAKJUS, J.; LEITCH, A. R. The absence of *Arabidopsis*-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (*Solanaceae*): First evidence from eudicots. **Plant Journal**, v. 34, p. 283-172, 2003.

TAYLOR, N. L.; ANDERSON, M. K.; WUESENBERRY, K.H.; WATSON, L. Doubling the chromosome number of *Trifolium* species using nitrous oxide. **Crop Science**, n. 16, p. 516-518, 1976.

TSUMURA, Y.; OHBA K.; STRAUSS, S. H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms. In: Douglasfir. (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92. p. 40–45. 1996.

VAN BOGAERT, G. A comparison between colchicine induced tetraploid and diploid cultivars of *Lolium* species. In: **Ploidy in Fodder Crops**, Neusch, B. (ed.), Eucarpia Report, Zurich. 1975.

VAN DEN BERG. R.; BRYAN, G.; DEL RIO, A.; SPOONER, D. M. Reduction of species in the wild potato *Solanum* section *Petota* series *Longipedicellata*: AFLP, RAPD and chloroplast SSR data. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, v. 8, p. 1109–1114, 2002.

VAN TUYL, J. M., MEIJER, B.; VAN DIËN, M. P. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in in-vitro chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. *Acta Horticulturae* n. 325, p. 625-629, 1992.

VREUGDENHIL, D.; BRADSHAW J.; GEBHARDT C.; GOVERS, F.; MACKERRON, D.K.L.; TAYLOR, M.A. AND ROSS, H.A. **Potato biology and biotechnology advanced and perspectives**. Elsevier. 822p. 2007.

WANG, G.; MAHALINGAN, R.; KNAP, H. T. (C-A) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96. p. 1086–1096, 1998.

WEIJUN, Z. Inheritance of isozymes and morphological characters in the brinjal eggplant. **Acta Genetica Sinica**, n. 19, p. 423–429, 1992.

WHALEN, M. D.; ANDERSON, G. J. Distribution of gametophytic self-incompatibility and infrageneric classification in *Solanum*. **Taxon.**, v. 30, p. 761-767, 1981.

WILKINSON M.J. In: J.E. Bradshaw and G.R. Mackay (eds) **Potato Genetics**, CAB International, Wallingford, UK. p. 43. 1994.

WU, K.; JONES, R.; DANNAEBERGER, L.; SCOLNIK, P. A. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 3257–3258, 1994.

YOKOTA, M.; Karyomorphological studies on *Habenaria*, Orchidaceae and allied genera from Japam. **Journal of Science of the Hiroshima University, Series B, Division**, v. 2, p. 53-161, 1990.

ZÁRATE, S.; PÉREZ-NASSER, N.; CASAS, A. Genetics of wild and managed populations of *Leucaena esculenta* subsp. *Esculenta* (Fabaceae; Mimosoideae) in La Montaña of Guerrero, Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 52, p. 941-957, 2005.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.*, v. 20, p. 176–183. 1994.

ZURITA, F.; SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M.; JIMÉNEZ, R.; DE LA GUARDIA, R. D. Interchromosomal, intercelular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and *in situ* hybridisation. ***Heredity.***, v. 78, p. 229–234, 1997.

ZURLO, C.; BRANDÃO, M. **As ervas comestíveis: descrição, ilustração e receitas.** Editora Globo, São Paulo, 1990.

Capítulo I

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DIPLÓIDES E POLIPLÓIDES DO GÊNERO *Solanum* L. (SOLANACEAE A. Juss.)

A ser submetido na revista Acta Botânica

(ISBN 0102-33-06)

Caracterização citogenética em espécies diplóides e poliplóides do gênero *Solanum* L. (Solanaceae A. Juss.)

Cláudio Antonio Ferreira de Melo¹, Maria Isabel Gomes Martins¹, Ana Maria Benko-Iseppon², Reginaldo de Carvalho³

RESUMO – (Caracterização citogenética em espécies diplóides e poliplóides do gênero *Solanum* L. (Solanaceae A. Juss.)). Nove espécies do gênero *Solanum* L. foram analisadas citogeneticamente para a localização de marcadores espécie-específicos. *Solanum atropurpureum* Schrank, *S. dulcamara* L., *S. gilo* L., *S. melongena* L., *S. nitidibaccatum* Bitter, e *S. paniculatum* L. apresentaram $2n=24$. Enquanto *S. luteum* Mill., *S. nigrum* L. e *S. laciniatum* Ait. apresentaram $2n=48$, $2n=72$ e $2n=92$, respectivamente. As espécies demonstraram kariótipos simétricos e núcleo interfásico semi-reticulado. O tamanho cromossômico médio variou entre as espécies diplóides (1, 95 μm) e poliplóides (1,31 μm). A aplicação da técnica CMA₃/DAPI mostrou em *S. dulcamara*, *S. atropurpureum* e em *S. luteum* dois blocos CMA₃⁺/DAPI terminais. Em *S. nitidibaccatum* foi observado dois segmentos grandes CMA₃⁺/DAPI terminais e vários blocos teloméricos. *S. nigrum* e *S. laciniatum* quatro segmentos CMA⁺/DAPI terminais foram observados. A FISH com sonda de DNAr 45S foi aplicada apenas nas espécies poliplóides e revelou os mesmos resultados que os blocos CMA₃⁺ teloméricos. *S. luteum* e *S. nigrum* foram consideradas tetraplóide e hexaplóide, respectivamente. A localização de marcadores espécie-específicos foi satisfatória, identificando características citológicas particulares nas espécies analisadas.

Palavras-chaves: neopoliplóide, marcadores espécie-específicos, CMA₃/DAPI, hibridização *in situ* fluorescente.

ABSTRACT – (Cytogenetic characterization in diploids and polyploids species of *Solanum* L. (Solanaceae A. Juss.)). *Solanum* species were cytogenetically analyzed for localize specie-specific markers. *Solanum atropurpureum* Schrank, *S. dulcamara* L., *S. gilo* L., *S. melongena* L., *S. nitidibaccatum* Bitter, and *S. paniculatum* showed $2n=24$. While *S. luteum* Mill., *S. nigrum* L., and *S. laciniatum* Ait. showed $2n=48$, $2n=72$ and $2n=92$, respectively. All species demonstrate symmetric karyotype. The average in chromosome size varied between species diploids (1, 95 μm) and polyploids (1,31 μm). The application of the technique CMA₃/DAPI showed in *S. dulcamara*, *S. atropurpureum* and in *S. luteum* two CMA₃⁺/DAPI terminal blocks, one per homologous. In *S. nitidibaccatum* were observed two large segments CMA₃⁺/DAPI apart from several terminal blocks almost in all chromosomes. The FISH with DNAr 45S probes made only in polyploidy indicate the same result as fluorochrome CMA₃⁺ telomeric blocks. *S. luteum* and *S. nigrum* were considered tetraploid and hexaploid, respectively. The localization of specie-specific markers was successful, recognizing cytological characteristic for all species analyzed.

Key-word: neopolyploidy, specie-specific markers, CMA₃/DAPI, fluorescent *in situ* hybridization.

¹ Mestrado em Agronomia, Melhoramento Genético de Plantas, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil. Rua: Dom Manoel de Medeiros, s/nº, CEP: 5217-1900, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: clausiomelo@gmail.com

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, PE, Brasil.

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Depto. de Biologia/Genética, Recife, PE, Brasil.

Introdução

Dentre as angiospermas o gênero *Solanum* L. é um dos mais representativos em termos de diversidade de espécies. Abrangendo cerca de 2000 espécies e pertencente a família Solanaceae A. Juss., *Solanum* se destaca por agregar vários representantes de importância econômica. Espécies são largamente utilizadas para alimentação, *Solanum tuberosum* L. (batata), *S. melongena* L. (berinjela), *S. gilo* L. (jiló) e *S. lycopersicum* L. (tomate). Outros representantes deste gênero produzem substâncias tóxicas, como *S. dulcamara* L., *S. nigrum* L. (erva moura) e *S. paniculatum* L. *Solanum nigrum* é considerada uma espécie invasora em países, como a Argentina e Estados Unidos, competindo com culturas como a cana-de-açúcar (Andrada *et al.* 2003). Por outro lado, espécies como a selvagem *S. laciniatum* Ait. são utilizadas para a extração de solasodine, um esteróide alcalóide usado na indústria farmacêutica (Mann 1978). Com distribuição cosmopolita, o gênero *Solanum* possui centro de origem e diversidade genética Sul Americano. Entretanto há centros secundários de diversidade, com espécies endêmicas distribuídas nos continentes Asiático, Africano e Oceania (Knapp 2004).

O gênero possui taxonomia paradoxal e confusa, exibindo contraditoriamente, uniformidade e externa diversidade morfológica (Roe 1972; Lester & Hasan 1991). Atualmente o sistema taxonômico mais utilizado é o proposto por D'Arcy (1972), o qual divide o gênero *Solanum* em sete subgêneros. Entretanto Bohs (2005) propôs após estudar as variações na sequência *ndhF* do cpDNA (DNA de cloroplasto), o agrupamento do gênero em 13 clados, trazendo para *Solanum* gêneros anteriormente isolados como *Lycopersicon*. Outro fato bastante relevante no gênero *Solanum* é a existência de espécies com diversos sinônimos, dificultando o levante bibliográfico sobre espécies, principalmente em representantes selvagens e com poucas variações morfológicas (Sultana & Alam 2007; Pierre, comunicação pessoal).

Estudos citogenéticos como o registro do número cromossômico são bem documentados para o gênero *Solanum* (Okoli & Olorode 1983; Swaminathan 1953; Edmonds

& Chweya 1997). Entretanto há carência em estudos relacionados aos diversos métodos de bandeamento cromossômico, filogenia, citotaxonomia e mapeamento físico, principalmente nas espécies nativas. Para *Solanum* o número cromossômico básico mais aceito atualmente é $x=12$, mas devido a características como hiperdiversidade de espécies e ocorrência cosmopolita, variáveis números cromossômicos estão registrados na literatura, incluindo o relato de altos níveis de ploidia para algumas espécies (Darlington & Wylie 1955).

A análise citogenética realizada pela coloração convencional fornece informações importantes sobre número, morfologia, tamanho cromossômico, tipo de núcleo interfásico e padrão de condensação profásico. Em muitos casos, a simples determinação do número cromossômico, fornece informações importantes para a compreensão da filogenia e evolução dos grupos, desde que associada a outras abordagens como morfologia, características geográficas, etc (Stebbins 1971). O estudo citogenético detalhado, como o mapeamento físico dos cromossomos ou a análise meiótica, fornecem dados a respeito da homologia cromossômica e do comportamento meiótico. Estes dados citogenéticos são essenciais para programas de melhoramento genético vegetal, que visam a obtenção de híbridos férteis ou no desenvolvimento de cultivares poliplóides (Sanford 1983; Van Bogaert 1975; Vreugdenhil *et al.* 2007). Os bandeamentos cromossômicos ampliam grandemente o espectro de observação dos cariótipos, por possibilitarem a coloração diferencial dos cromossomos, desta forma pode-se inferir em estudos taxonômicos, filogenéticos e evolutivos (Leitch *et al.* 1998), principalmente em grupos taxonômicos com cariótipo simétrico e cromossomos pequenos como em *Citrus* (Guerra 1993) e *Manihot* (Carvalho e Guerra 2002).

Os fluorocromos são corantes fluorescentes que demonstram afinidade por DNA, como o DAPI (4',6 diamidino-2-fenilindol) e o CMA₃ (Cromomicina A₃), os mesmos apresentam afinidades por regiões ricas em AT (adeninas e timina) e GC (guanina e citosina), respectivamente. Através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 45S pode-se localizar sítios de DNAr referentes a subunidade 45S do ribossomo. Além da subunidade 45S do DNAr pode-se localizar outras regiões cromossômicas como DNAr 5S, telômeros e centrômero através de sondas específicas, fornecendo mais informações a respeito do cariótipo das espécies.

A grande diversidade de espécies encontrada no gênero *Solanum* torna-o favorável para estudos citotaxonômicos e evolutivos. Sendo assim, o presente trabalho objetivou caracterizar citogeneticamente nove espécies do gênero *Solanum* utilizando as técnicas de coloração convencional, fluorocromos CMA₃ e DAPI, além de FISH com sonda de DNAr 45S, a fim de localizar marcadores espécie-específicos para as espécies analisadas

acrescentando informações úteis para estudos citotaxonômicos e evolutivos para o gênero *Solanum*.

Material e método

A. Material vegetal, pré-tratamento e fixação

Sementes de *Solanum atropurpureum* Schrank (Cod. 2975), *S. dulcamara* (Cod. 2980), *S. gilo* (Cod. 2995), *S. laciniatum* (Cod. 2983), *S. luteum* Mill. (Cod. 2984), *S. melongena* (Cod. 2985), *S. nitidibaccatum* Bitter (Cod. 2979) e *S. nigrum* (Cod. 2969) foram cedidas pelo Alfa Botanischer Garten Georg-Universität - Alemanha. Exceto *S. paniculatum* a qual foi coletada no campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As sementes foram germinadas em placa de Petri e as radículas coletadas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (0,002 M) por uma hora à temperatura ambiente e em seguida, 23 horas a 8° C. As radículas pré-tratadas foram fixadas em Carnoy (etanol:ácido acético) (3:1, v/v) por 24 horas à temperatura ambiente e posteriormente estocadas no frizer -20° C até análise.

B. Análise convencional

A análise citogenética convencional seguiu o protocolo descrito por Guerra (1983). As radículas foram hidrolisadas com HCl 5N por 20 minutos e esmagadas em uma lâmina contendo uma gota de ácido acético 45% sendo sobreposta a esta uma lamínula. As preparações foram mergulhadas em nitrogênio líquido para a remoção da lamínula, seca ao ar, coradas em solução de Giemsa a 2% por 10 a 15 minutos e montadas com Entellan (Merck®).

C. Fluorocromos CMA₃ e DAPI

Para a localização de regiões base-específicas utilizando os fluorocromos CMA₃ e DAPI. As radículas foram digeridas em celulase-pectinase por uma hora a 37°C, segundo de envelhecimento das por três dias. A dupla coloração CMA₃/DAPI seguiu o protocolo descrito Schweizer e Ambros (1994), em que a coloração seguiu com a aplicação de 10 µl de CMA₃ sobre a lâmina durante uma hora, posterior lavagem com água destilada e secagem. Em seguida aplicou-se 10 µl de DAPI durante meia hora. Após este tempo, as lâminas foram

lavadas, secas e montadas com 5 µl de meio glicerol\Macllvaine, utilizando-se lamínula de 18x18mm.

D. Hibridização in situ fluorescente (FISH)

A hibridização *in situ* fluorescente foi realizada apenas nas espécies *S. laciniatum*, *S. luteum* e *S. nigrum*. O protocolo utilizado foi proposto por Moscone *et al.* (1996) com modificações. A técnica envolveu a preparação de sonda específica de DNAr 45S, a qual foi marcada pela incorporação de nucleotídeos modificados os quais puderam ser detectados através de luz UV após a marcação fluorescente. A sonda utilizada foi obtida de *Arabidopsis thaliana* e marcada com digoxigenina-11-dUTP. Os cromossomos foram desnaturados a 75 °C em solução salina de 2x SSC por 7 minutos. Em seguida a sonda foi adicionada nas lâminas, desnaturada novamente a 75°C por 10 minutos e transferidas para uma câmara úmida pré-aquecida a 37 °C por 16 horas, aproximadamente. A detecção da sonda foi feita utilizando dois conjuntos de anticorpos, sendo o segundo, utilizado para amplificar o sinal fluorescente. Posteriormente as lâminas foram montadas com DAPI (2 µg/mL) conjugado com meio Vectashield (Vector®).

E. Captura e análise das imagens

As imagens convencionais foram capturadas com o filme Fuji Superia Asa 100 em microscópio Bioval®. Para as imagens com fluorescência a película utilizada foi Fuji® Superia Asa 400 em um sistema analógico adaptado ao micróscopo Leica® DMLB, com o sistema de fotomicroscopia Leica® wild MPS 48. Os filtros utilizados apresentaram capacidade de detecção de comprimento de onda de 360-390 nm para DAPI e de 430-470 nm para CMA₃. A contagem cromossômica e a medição dos cromossomos foram feitas com o uso do software Image Tool V3.0®, enquanto para a confecção das pranchas foi utilizado o software Corel-Photo-Paint® X3 em plataforma Windows XP®.

Resultados

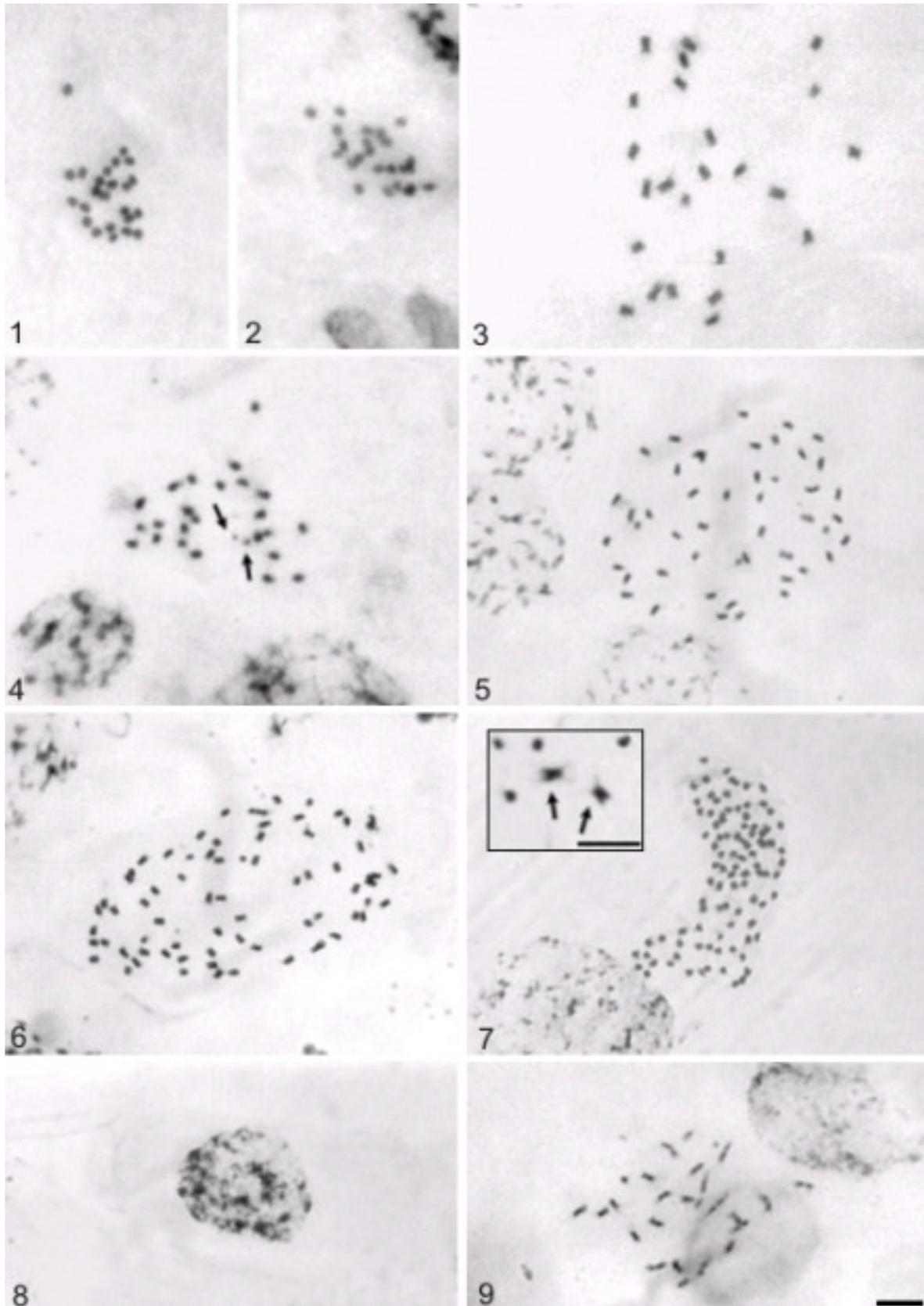
Todas as espécies foram analisadas primeiramente pela coloração convencional (Fig.1-9) para a descrição do número, morfologia, tipo de núcleo, padrão de condensação e

localização dos satélites. *Solanum melongena* (Fig.1), *S. gilo* (Fig.2), *S. atropurpureum* (Fig.3), *S. nitidibaccatum* (Fig.4), *S. dulcamara* (Fig.9) e *S. paniculatum* apresentaram números diplóides com $2n=24$. Enquanto as espécies *S. luteum* (Fig.5), *S. nigrum* (Fig.6) e *S. laciniatum* (Fig.7) apresentaram $2n=48$, $2n=72$ e $2n=92$, respectivamente. De modo geral, o cariótipo de todas as espécies mostrou-se simétrico, com morfologia variando de meta a submetacêntrica. Todas as espécies apresentaram núcleo interfásico semi-reticulado (Fig.4 e 8) e padrão de condensação proximal (Fig.9). O tamanho cromossômico médio variou grandemente entre as espécies diplóides (1.97 μm) e poliplóides (1.31 μm), sendo a média em *S. atropurpureum* (1.89 μm), *S. dulcamara* (1.87 μm), *S. gilo* (2.05 μm), *S. luteum* (1.46 μm), *S. nigrum* (1.40 μm), *S. nitidibaccatum* (2.11 μm), *S. melongena* (2.01 μm) e *S. paniculatum* (1.92 μm). Características cariotípicas peculiares foram observadas em *S. laciniatum*, na qual o tamanho cromossômico apresentou média de 1,1 μm , mas um par cromossômico com 2,1 μm (Fig.7) foi observado em várias metáfases. A coloração convencional revelou em *S. luteum* pelo menos um par cromossômico com picnose negativa em metáfase. O mesmo par cromossômico apresentou picnose positiva pela coloração de DAPI após a técnica de FISH (Fig.17).

A visualização de satélites pela coloração convencional foi possível apenas em metáfases de *S. atropurpureum* (Fig.4) e em pró-metáfases de *S. luteum*, em que um par de satélites em cada espécie foi observado. A mesma técnica também revelou a aparição desigual de satélites, na qual é visualizado satélite em apenas um homólogo. Por outro lado, a utilização do fluorocromo CMA₃ revelou a presença de um par de satélites nas espécies diplóides (Fig.11 e 13) e em *S. luteum* (Fig.14) e quatro em *S. luteum* e em *S. nigrum*. O uso de fluorocromos CMA₃ e DAPI revelou nas espécies *S. dulcamara*, *S. atropurpureum* (Fig.11) e em *S. luteum* (Fig. 14) dois blocos CMA₃⁺/DAPI terminais em um par cromossômico. *Solanum nitidibaccatum* apresentou dois satélites CMA₃⁺/DAPI subdivididos em dois blocos maiores e dois menores, revelando a distensão da constrição secundária (Fig.13). Além disso, foram observados vários blocos CMA₃⁺/DAPI nos telômeros na maioria dos cromossomos de *S. nitidibaccatum* (Fig.13), dado esse, confirmado pela visualização de diversos blocos positivos nos núcleos interfásicos corados com CMA₃. *S. nigrum* revelou quatro blocos CMA₃⁺/DAPI terminais em dois pares cromossômicos mostrando a constrição secundária sempre distendida em um dos pares cromossômicos (Fig.15). Quatro blocos CMA₃⁺/DAPI teloméricos de tamanhos distintos foram observados em *S. laciniatum* (Fig.16).

A aplicação da técnica de FISH com sonda de DNAr 45S revelou resultados similares aos obtidos com a coloração CMA₃ (Fig.17-19). *Solanum luteum* apresentou dois sinais de

hibridização DNAr 45S em um par cromossômico, assim como um par cromossômico heteropicnótico mais corados com DAPI em metáfases (Fig.17). Em *S. nigrum*, foram revelados quatro sinais de hibridização DNAr 45S, dois maiores e dois menores em dois pares cromossômicos, sendo os maiores referentes ao par com constrição distendida observado na coloração com CMA₃ (Fig.18). Quatro sítios de hibridização DNAr 45S de tamanhos distintos foi observado em *S. laciniatum*, coincidindo com os blocos CMA₃⁺ (Fig.19). Todos os dados obtidos com o bandeamento em cromossomos metafásicos foram confirmados em células, pró-metáfásicas e nos núcleos interfásicos.



Figuras 1-9. Análise convencional em metáfases, pró-metáfase e núcleos interfásicos em espécies do gênero *Solanum*. (1) *S. melogena* ($2n=24$), (2) *S. gilo* ($2n=24$), (3) *S. atropurpureum* ($2n=24$), (4) *S. nitidibaccatum* ($2n=24$), (5) *S. luteum* ($2n=24$), (6) *S. nigrum* ($2n=72$) e (7) *S. laciniatum* ($2n=92$). (8) núcleo interfásico em *S. dulcamara* e (9) cromossomos pró-metafásicos em *S. dulcamara*. Setas em (4) indicam satélites e (7) par cromossômico maior. Barras correspondem a 5 μm .

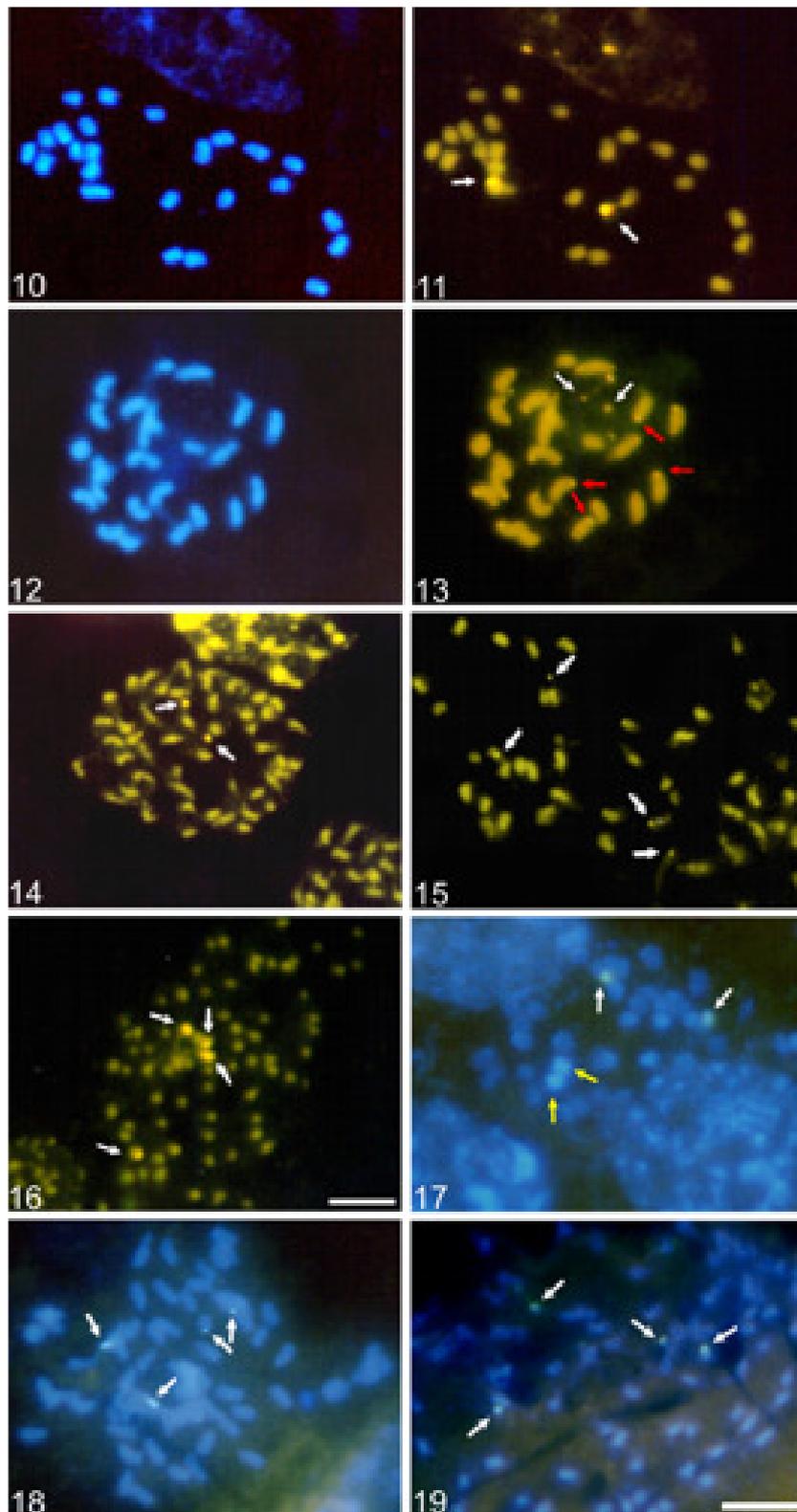


Figura 10-19. Coloração com fluorocromos DAPI em (10) *Solanum atropurpureum* ($2n=24$) e (12) *S. nitidibaccatum* ($2n=24$). (11), (13), (14), (15) e (16), coloração com CMA em *S. atropurpureum*, *S. atropurpureum*, *S. nitidibaccatum*, *S. luteum* ($2n=48$), *S. nigrum* ($2n=72$) e *S. laciniatum* ($2n=92$), respectivamente. Observar setas vermelhas em (13) indicando blocos CMA⁺/DAPI telômericos. Setas brancas indicam blocos CMA⁺/DAPI. (17) *S. luteum*, (18) *S. nigrum* e (19) *S. laciniatum* pela hibridização fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 45S. Setas brancas indicam sinais de hibridização e setas amarelas indicam cromossomos heteroplocêntricos. Barras correspondem a 5 µm.

Discussão

A análise das seis espécies de *Solanum* pela coloração convencional permitiu a descrição dos parâmetros citogenéticos mais utilizados na caracterização como número, morfologia e tamanho cromossômico, tipo de núcleo interfásico e padrão de condensação cromossômica. Três espécies apresentaram-se diplóides com $2n=2x=24$. O caráter diplóide, em que o número básico $x=12$ para a o gênero *Solanum*, está descrito em mais da metade das espécies do gênero estudadas até o momento (Darlington & Wylie 1955, Hunziker 2001). Por outro lado a poliploidia se mostra um fenômeno comum em muitos subgêneros de *Solanum*, por exemplo, *Solanum* (sect. *Solanum*; Edmonds, 1997), *Potatoe* (sect. *Petota* Dumort.; Hawkes 1990) e *Archeosolanum* Marzell. (Randell & Symon 1976). Segundo diversos autores a espécie *Solanum luteum* é relatada com o sinônimo de *S. villosum*, e sua origem alopoliplóide ou autopoliplóide ainda não está clara (Sultana & Alam 2007; Schilling & Anderson 1990). Estudos meióticos revelam o comportamento alopoliplóide, uma vez que existe regularidade disjuncional (Sultana & Alam 2007; Venkateswarlu & Krishna Rao 1968). Por outro lado o comportamento meiótico regular não descarta o caráter poliplóide, uma vez que meioses regulares são comumente observadas em autopoliplóides primitivos (Stebbins 1971). No presente trabalho foi constatada forte simetria cromossômica em *S. luteum*, fato que atribui a esta espécie o caráter primitivo. O relato da ocorrência de populações com níveis diferentes de ploidia como diplóides, tetraplóides e hexaplóides em *S. nigrum* é bastante comum em estudos citogenéticos (Andrada *et al.* 2003; Anil & Palpu 2005). Andrada *et al.* (2003) constataram a existência de genótipos diplóides ($2n=2x=24$) na flora Argentina. Entretanto, observamos o nível hexaplóide ($2n=6x=72$) no acesso proveniente da flora européia. Atualmente é aceito que *S. nigrum* é hexaplóide com $2n=6x=72$ (Baylis 1958; Edmonds 1977; 1981; 1982; 1983; 1984; Henderson 1974; Randell & Symon 1976; Symon 1981; Bukenya 1996). Devido a forte similaridade morfológica muitos trabalhos afirmam que *S. nigrum* é comumente confundido com a espécie diplóide *S. americanum* ($2n=2x=24$), e que os erros taxonômicos são comuns, implicando em paradoxo (Sultana & Alam 2007; Pierre, comunicação pessoal). A análise cariotípica de *S. nigrum* juntamente com dados da literatura indicam que o acesso analisado é neopoliplóide, uma vez que o provável ancestral diplóides ainda pode ser encontrado em populações naturais. As variações no número básico são comuns em táxons como *S. mammosus* L. ($x=11$), *S. bullatum* Vell. ($x=15$) e em sete espécies do subgênero *Archeosolanum* ($x=23$) (Baylis 1963; Barlow 1971; Henderson 1973;

Herasimenko 1965; Randell 1970). Com inferência ao número cromossômico básico mais comum observado no gênero *Solanum* ($x=12$), *S. laciniatum* ($2n=92$) poderia ser considerada octaplóide após processos de disploidia descendente, como translocações e fusões cromossômicas. A indicação de disploidia descendente foi observada em *S. laciniatum* revelada pela visualização de um par cromossômico maior, provavelmente originário de fusão cromossômica. Esta característica poderia ter reduzido o número cromossômico da espécie após a poliploidização, já que a mesma não apresenta número cromossômico múltiplo de 12. Por outro lado a existência de espécies no mesmo subgênero (*Archeosolanum*) com características cariotípicas semelhantes, como número cromossômico haplóide de $n=23$ ou $n=46$, possibilitam estimar o caráter tetraplóide ou diplóide nesta espécie. Baylis (1954) e Herasimenko (1971) relataram o número haplóide $n=46$ para *S. laciniatum*, analisando células meióticas. Entretanto, estes autores não consideraram a espécie como sendo um autopoliplóide, devido à observação de meiose regular. Por outro lado, poliplóides comumente sofrem modificações estruturais no seu cariótipo como translocações principalmente nos casos de autopoliplóides com o objetivo de restaurar a fertilidade, aumentando, conseqüentemente, a regularidade na meiose (Stebbins 1971; Wolfe 2001). Não se destaca o caráter poliplóide em *S. laciniatum* assim como em algumas espécies do subgênero *Archeosolanum*, mas a inferência de ploidia exige a cuidadosa estipulação do tempo evolutivo da espécie, uma vez que existe naturalmente a tendência de diploidização, levando o genótipo a ter um comportamento diplóide, silenciando as características cariotípicas que possibilitam a indicação do caráter poliplóide (Wolfe 2001).

As espécies analisadas apresentaram cariótipo simétrico, corroborando com a classificação proposta por Stebbins (1971) como do tipo A1. Semelhante a este fato, a simetria em *Solanum* foi reportada por diversos autores, inferindo a característica primitiva aos cariótipos (Bernadello & Anderson 1990; Bernadello *et al.* 1994). Parâmetros como o tamanho cromossômico, núcleo semi-reticulado, padrão de condensação proximal e morfologia cromossômica corroboram com os dados da literatura, estas características são comumente compartilhadas aos representantes do gênero *Solanum*, e demonstram que todas as espécies analisadas possuem estabilidade cariotípica. Revisando trabalhos convencionais observa-se que no cariótipo de espécies do gênero *Solanum* existe a predominância de cromossomos metacêntricos e em menor proporção cromossomos submetacêntricos (Oinuma 1949; Swaminathan 1954; Magoon *et al.* 1962; Mitra 1967; Krishnappa & Chennaveeraiah 1975; Pijnacker & Ferwerda 1984; Wu & Li 1985; Okoli 1988; Bernadello & Anderson 1990). Constatou-se que o tamanho cromossômico médio é inversamente proporcional ao

nível de ploidia, uma vez que as espécies diplóides apresentaram medias cromossômicas consideravelmente maiores que as espécies poliplóides.

A dificuldade de observar satélites pela coloração convencional ocorreu devido a influências do pré-tratamento com 8-hidroxiquinoleína ou por influências do espalhamento no momento da preparação das lâminas. A presença de um par cromossômico satelitado em espécies diplóides de *Solanum* parece ser a regra do gênero, mas exceções são observadas nas diplóides *S. pseudolulo* Heiser e em *S. basendopongo* Bitter, com dois pares de satélites (Mitra 1967; Wu & Li 1985; Okoli 1988; Bernardello & Anderson 1990; Bernardello *et al.* 1994). A visualização de satélites em apenas um homólogo pela coloração convencional, pode estar relacionada a ativação de apenas uma RON. Este fato tem sido comumente relatado em Solanaceae (Moscone 1989; Bernadello *et al.* 1994). Em espécies como *S. lycopersicum*, o tamanho dos satélites pode levar a erros de contagem cromossômica, visto o tamanho similar aos cromossomos do complemento. Um reflexo de contagens errôneas pode ser visto em Banks (1984), o qual estudando *S. lycopersicum* encontrou números diplóides com $2n=24$ em apenas duas das 18 variedades estudadas, $2n=25$ em uma e $2n=26$ nas outras 15 variedades. Essa variação de números entre variedades pode ter ocorrido devido a contagem errônea dos cromossomos por influência dos satélites. As características referentes aos satélites não possibilita a utilização segura destes como marcadores espécie-específicos nas espécies analisadas pela coloração convencional. Para melhor visualização de satélites, RONs ativa e nucléolos recomenda-se a análise pela coloração diferencial com nitrato de prata (Rufas *et al.* 1987).

A qualificação das regiões heterocromáticas pelos fluorocromos CMA₃ e DAPI demonstrou a riqueza em GC, tipo comum de heterocromatina entre as angiospermas localizada em satélites e em RONs. A visualização de satélites subdivididos em *S. nitidibaccatum* pelo uso do fluorocromo CMA₃ é fato atribuído a associação de um bloco CMA₃⁺ ao satélite e outro bloco ao cromossomo, revelando a constrição secundária sempre distendida nesta espécie. *S. nigrum* além do número cromossômico hexaplóide, revelou polimorfismo entre constrição secundária, como um par cromossômico com constrições secundárias distendidas e outro par sem distensão. Estas particularidades podem ser empregadas para a distinção inicial da espécie. Constrições secundárias e satélites polimórficos entre espécies, células e em cromossomos homólogos foram observados em Solanaceae (Moscone *et al.* 1995), este fato é atribuído a prováveis processos mutacionais como rearranjos ocorrentes na heterocromatina associada ao satélite, constrição secundária ou RONs promovendo eventual polimorfismo nestas regiões heterocromáticas (Sato 1981). A

visualização dos blocos CMA₃⁺ referentes a satélites e de vários outros blocos teloméricos menores em *S. nitidibaccatum* indica a existência de dois tipos de heterocromatina rica em GC nesta espécie, uma associada ao satélite e outra restrita ao telômero. Esta característica pode ser utilizada como marcador espécie-específico, diferenciando *S. nitidibaccatum* das outras espécies diplóides.

A aplicação da técnica de hibridização *in situ* com sonda de DNAr 45S aplicada apenas nas espécies poliplóide, demonstrou resultados similares aos blocos CMA₃⁺ associados aos satélites. Por outro lado, o número de constrições secundárias, satélites, RONS e sítios de hibridização de DNAr 45S não se mostrou associado ao nível de ploidia. A semelhança entre a quantidade dos sítios de DNAr 45S ou 5S não precisa estar necessariamente associado com o nível de ploidia, uma vez que existe instabilidade nestas regiões em espécies com números cromossômicos semelhantes (Shi *et al.* 1996). Alguns gêneros demonstram correlações entre o número de sítios de DNAr 5S ou 45S com o nível de ploidia, como por exemplo, o gênero *Saccharum* (D'Hont *et al.* 1998). Após a hibridização *in situ* foi constatado a presença de um par cromossômico heteropicnótico positivamente corado com DAPI em *S. luteum*. O processo realizado na hibridização *in situ* fluorescente possibilita, em alguns casos, a visualização de regiões cromossômicas diferenciais, como áreas heterocromáticas, que não seriam reveladas por técnicas como o bandeamento C ou pela aplicação de fluorocromos CMA₃ e DAPI, este fato é atribuído ao desgaste cromossômico gerado pelas lavagens, desnaturações e digestões durante o procedimento da FISH.

A localização de marcadores espécie-específicos nas espécies analisadas foi satisfatória, permitindo a identificação de características citogenéticas particulares nos táxons analisados. O gênero *Solanum* abrange quase a metade da família Solanaceae e questões taxonômicas e evolutivas sempre são motivos de discussão. A análise citogenética refinada, como a construção de mapas físicos, possibilita o esclarecimento das relações genômicas, desta forma pode-se inferir com segurança em questões evolutivas, filogenéticas e taxonômicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao instituto Alfa Botanicher Garden Georg-Universidad-Alemanha pelo envio do material biológico, ao Laboratório de Citogenética Vegetal, na

mesma universidade por permitir a utilização do espaço físico e ao CNPq pelo apoio à pesquisa.

Referências bibliográficas

- Andrada, B.A.; Nora, M.D.A. & Adriana, V.P. 2003. Caracterización citológica em *Solanum nigrum* L. **Agro Sur 31 (1):** 77-81.
- Anil K. & Palpu, P. 2005. Molecular Systematic Study of Variants of *Solanum nigrum* L. India, **Cytologia 70:** 33-38.
- Banks, P.A. 1984. New diploid chromosome number for tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Genetic Cytologia 26:** 636-639.
- Barlow, B.A. 1971. Cyto geography of the genus *Eremophilo*. **Australian Journal of Botany 19:** 295-310.
- Baylis, G.T.S. 1954. Chromosome number and distribution of *Solanum aviculare* Frst. And *S. laciniatum* Ait. **Transaction and Proceeding Royal Society 82:** 639-643.
- Baylis, G.T.S. 1958. A cytogenetical study of New Zealand forms of *Solanum nigrum* L., *S. nodiflorum* Jacq. and *S. gracile* Otto. **Transaction and Proceeding Royal Society 85 (3):** 379-385.
- Baylis, G.T.S. 1963: A cytogenetical study of the *Solanum aviculare* species complex. **Australian Journal of Botany 11:** 168-77.
- Bernardello, L.M.; Heiser, C. B. & Piazzano, M. 1994. Karyotypic studies in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae). **American Journal of Botany 81:** 95–103.
- Bernardello, L.M. & Anderson, G.J. 1990. Karyotypic studies in *Solanum* section *Basarthrum* (Solanaceae). **American Journal of Botany 77:** 420–431.
- Bohs, L. 2005. Major clades in *Solanum* based on *ndhF* sequences. Pp. 27–49 In: Keating RC, Hollowell VC, Croat TB (eds) A Festschrift for William G. D'Arcy: **the legacy of a taxonomist. Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden**, 104. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Bukenya, Z.R. 1996. Uses, chromosome numbeti and distribution of *Solanum* ipecks in Uganda. Pp. 33-37 in: **The Biodiversity of African Plants** (L.J.G. Van der Maesen *et al.*, eds.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Carvalho, R. & Guerra, M. 2002. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (Cassava) and eigth related species. **Hereditas 136:** 159–168.
- D'Arcy, W.G. 1972. Solanaceae studies II: Typification of subdivisions of *Solanum*. **Annal Missouri Botanic Garden. 59:** 262–278.
- D'Hont, A.; Ison, D.; Alix, K.; Roux, C. & Glaszmann, J.C. 1998. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome 41:** 221–225.

- Darlington, C.D. & Wylie, A.P. 1955. **Chromosom atlas of flowering plants**. George allen & unwin ltd., London, 325-326.
- Edmonds, J.M. 1977. Taxonomic studies on *Solanum* L. Section *Solanum* (*Maurella*). **Botanical Journal of the Linnean Society** **75**:141-178.
- Edmonds, J.M. 1981. The artificial synthesis of *Solanum x procurrens* Leslie (*S. nigrum* L. x *S. sarrachoides* Sendtn). **Watsonia** **13**: 203-207.
- Edmonds, J.M. 1982. Epidermal hair morphology in *Solanum* L. section *Solanum*. **Botanical Journal of the Linnean Society** **85**: 153-167.
- Edmonds, J.M. 1983. Seed coat structure and development in *Solanum* L. section *Solanum* (Solanaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **87**: 229-246.
- Edmonds; J.M. 1984. Pollen morphology of *Solanum* L. section *Solanum*. **Botanical Journal of the Linnean Society** **88**: 237-251.
- Edmonds, J.M. & Chweya, J.A. 1997. **Black nightshades. *Solanum nigrum* L. and related species. Promoting the conservation and use ou underutilizer and neglected crop**. Institute of plat genetic and crop plant research, Gatersleben/ international plant genetc resource institute, Rome, Italy. 115.
- Guerra, M. 1983. Uso Do Giemsa Na Citogenética Vegetal: comparação entre bandeamento simples e o bandeamento. **Ciência e cultura** **35**: 190-193.
- Guerra, M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity** **71**: 234-241.
- Hawkes, J.G. 1990. **The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources**. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
- Henderson, R.J.F. 1973. I.O.P. Chromosome number report. **Taxon** **22**: 116.
- Henderson, R.J.F. 1974. *Solanum nigrum* L. (Solanaceae) and related species in Australia. **Contributions from the Queensland Herbarium** **16**: 1-78.
- Herasimenko, I.I. 1965. New forms of *Solanum* L. subgenus *Archaesolanum*. **Byull. Gl. Bot. Sada** **59**: 71-3.
- Herasimenko, I.I. 1971. Conspectus subgeneris *Archaesolanum* Bitt. Ex Marz. generis *Solanum* L. **Novosti Sist. V ýssh. Rast.** **7**: 270-276.
- Hunziker, A.T. 2001. **Genera Solanacearum: The Genera of Solanaceae Illustrated, Arranged According to a New System**. ARG Gantner Verlag K-G, Liechtenstein.
- Knapp, S.; Bohs, L.; Nee, M. & Spooner, D. M. 2004. Solanaceae – A model for linking genomics with biodiversity, comparative and functional genomics. **Comparative and Functional Genomics** **5**: 285-291.

- Krishnappa, D.G. & Chennaveeraiah, M.S. 1975. Cytotaxonomy of *Solanum indicum* complex. **Cytologia** **40**: 323–331.
- Leitch, A.R.; Lim, K.Y.; Leitch, I.J.; O'Neill, M. Chye, M.L. & Low, F.C. 1998. Molecular cytogenetic studies in rubber, *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (*Euphorbiaceae*). **Genome** **41**: 464–467.
- Lester, R.N. & Hasan, S.M.Z. 1991. Origin and domestication of the brinjal eggplant, *S. melongena*, from *S. incanum*, in Africa and Asia. Pp. 369–387. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M, Estrada NR (eds) **Solanaceae III: Taxonomy, chemistry, evolution**. Royal Botanic Gardens.
- Magoon, M.L.; Ramanujam, S. & Cooper, D. C. 1962. Cytogenetical studies in relation to the origin and differentiation of species in the genus *Solanum* L. **Caryologia** **15**: 151–252.
- Mann, J.D. 1978. Production of Soladine for the pharmaceutical industry. **Advances in agronomy** **30**: 207–245.
- Mitra, K. 1967. The significance of karyotype studies in relation to speciation in some solanaceous species. **Bulletin of the Botanic Society of Bengal** **21**: 75–80.
- Moscone, E. A. 1989. Karyotype analyses in three Patagonian and S. Andean endemic genera of Nicotianeae (Solanaceae). **Plant Systematic Evolution** **166**: 31–39.
- Moscone, E.A.; Loidl, J.; Ehrendorfer, F. & Hunziker, A.T. 1995. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. **American Journal Botany** **82**: 276–287.
- Moscone, E.A.; Matzke, M.A. & Matke, A.J.M. 1996. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). **Plant systematic evolution** **202**: 37–63.
- Oinuma, T. 1949. Cytological studies on the genus *Solanum* with special reference to the karyotypes. **The Japanese Journal of Genetics** **24**: 182–189.
- Okoli, B.E. 1988. Cytotaxonomic study of five West African species of *Solanum* L. (Solanaceae). **Feddes Rept** **99**: 183–187.
- Okoli, B.E. & Olorode, O. 1983. Cytogenetic studies in the *Andropogon gayanus*-*A. tectorum* complex (Graminae). **Botanical Journal Linnean Society**. **87**: 263 – 271.
- Pierre, P.M.O. 2008. Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill) NE. BR (Verbenaceae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Lavras. p. 99.
- Pijnacker, L.P. & Ferwerda, M.A. 1984. Giemsa C-banding of potato chromosomes. **Canadian Journal of Genetic and Cytology** **26**: 415–419.
- Randell B.R. & Symon D.E. 1976. Chromosome numbers in Australian *Solanum* Species. **Australian Journal of Botany** **24**: 369–379.

- Randell, B.R. 1970. Adaptation in the genetic systems of the Australian arid zone *Cassia* species. **Australian Journal of Botany** **18**: 77-97.
- Roe, K.E. 1972. A revision of *Solanum* section *Brevantherum* (Solanaceae), **Brittonia** **24**: 239-278.
- Rufas, J.S.; Giménez-Abián, J; Suja, J.A. & Garcia, De La Vega C. 1987. Chromosome organization in meiosis revealed by light microscope analysis of silver-staining cores. **Genome** **29**: 706-712.
- Sanford, J.C.1983. Ploidy manipulations, p. 100-123. In: J.N. Moore and J. Janick (eds.). *Methods in fruit breeding*. **Purdue University Press**, West Lafayette, Ind. 100-123.
- Sato, S. 1981. Cytological studies on the satellited chromosomes of *Allium cepa*. **Caryologia** **34**: 431-440.
- Schilling, E.E. & Anderson, R.N. 1990. The black nightshades (*Solanum* section *Solanum*) of the Indian subcontinent. **Journal of the Linnean Society** **102**: 257.
- Schweizer, D. & Ambros, P.F. Chromosome banding. 1994. In: **Methods in molecular biology chromosome analysis protocols** Totowa: Humana Press 29: 97-113.
- Shi, L.; Zhu, T. & Keim, P. 1996. Ribosomal RNA genes in soybean and common bean: chromosomal organization, expression, and evolution. **Theoretical and Applied Genetics** **93**: 136-141.
- Stebbins, G.L. 1971. **Chromosomal evolution in higher plant**. Edward Arnold, London, 216.
- Sultana, S.S. & Alam, S.S. 2007. Differential fluorescent chromosome banding of *Solanum nigrum* L. and *Solanum Villosum* L. from bangladesh. **The japan Mendel Society Cytologia** **72**: 213-219
- Swaminathan, M.S.1954. Nature of polyploidy in some 48-chromosome species of the genus *Solanum*, Section *Tuberarium*. **Genetics** **39**: 59-76.
- Symon, D.E. 1981. A revision of the genus *Solanum* in Australia. **Journal Adelaide Botany Gardens** **4**: 1-367.
- Van Bogaert, G. A. 1975.comparison between colchicine induced tetraploid and diploid cultivars of *Lolium* species. In: **Ploidy in Fodder Crops**, Neusch, B. (ed.), Eucarpia Report, Zurich.
- Venkateswarlu, J. & Krishna Rao, M. 1968. Chromosome numerical mosaicism in some hybrids of the *Solanum nigrum* complex. **Genetica** 400-406.
- Vreugdenhil, D.; BradshaW. J. Gebhardt C.; Govers, F.; Mackerron, D.K.L.; Taylor, M.A. & Ross, H.A. 2007. **Potato biology and biotechnology advanced and perspectives**. Elsevier. 822p.

Wolfe, K.H. 2001. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. **Nature Reviews Genetics** New York 2: 333-341.

Wu, S. & Li, Z. 1985. Preliminary studies of chromosome morphology of several wild and cultivated eggplants. **Acta Botany Systematic** 27: 361–369.

Capítulo II

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Solanum* L. (SOLANACEAE A. Juss.) REVELADA POR MARCADORES ISSR

A ser submetido na revista Genetic and Molecular Biology

(ISBN 1415-4757)

Diversidade genética em espécies do gênero *Solanum* L. (Solanaceae A. Juss.) revelada por marcadores ISSR

Cláudio Antonio Ferreira de Melo¹, Maria Lucília Costa², Péricles de Albuquerque Melo Filho³, Ana Maria Benko-Iseppon⁴, Reginaldo de Carvalho⁵

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Mestrando em Melhoramento Genético de Plantas, Departamento de Agronomia, Recife, PE, Brasil. E-mail: clausiomelo@gmail.com

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Recife, PE, Brasil

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia/Fitotecnia, Recife, PE, Brasil.

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, PE, Brasil.

⁵ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia/Genética, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

O marcador molecular do tipo seqüências simples repetidas internas (ISSR) tem sido aplicado para analisar a diversidade genética em varias espécies. A análise em dois acessos selvagens de *Solanum laciniatum* Ait., um genótipo selvagem e outro cultivado de *S. melongena* L. e outras espécies do gênero *Solanum* foram investigadas quanto a diversidade genética e a possibilidade de identificar os genótipos de *S. laciniatum* e *S. melongena*. Um total de 299 bandas polimórficas foram obtidas da amplificação de 20 dos 27 oligonucleotídeos iniciadores. O polimorfismo inter-específico total foi de 97.4% e o intra-específico foi de 16.7%. Não foi possível estabelecer um marcador ISSR aplicável na identificação dos dois genótipos de *S. laciniatum* mas os Olii UBC 841 ou 846 podem ser utilizados para a identificação segura dos acessos de *S. melongena* (berinjela). O agrupamento pelo estatístico pelo método UPGMA, organizou inicialmente os gêneros *Solanum* e *Capsicum* em dois grupos principais, dividindo o gênero *Solanum* em mais três subgrupos.

Palavra-chave: marcador molecular, melhoramento genético vegetal, *fingerprint*.

ABSTRACT

Inter-simple sequence repeat or ISSR molecular marker have been used to evaluate the genetic diversity of several species. Analysis were performed in two wild accessions of *Solanum laciniatum* Ait., a wild genotype and a cultivar of *S. melongena* L. and related *Solanum* species to evaluate the genetic diversity and identifying the accessions of *S. laciniatum* and *S. melongena*. A total of 299 polymorphic amplified bands were obtained from 20 of the 27 primers tested. The total inter-specific polymorphism was 97.4% and the intra-specific was lower 16.7%. No ISSR marker obtained showed polymorphic for the two accessions of *S. laciniatum*, but for both genotypes *S. melongena* (eggplant) a few primer were polymorphic, UBC 841 or 846 can be used for identify safely both eggplants genotype. Cluster analysis using UPGMA method grouped in two initial branches one for the genus *Solanum* and other for the *Capsicum* L. and divided *Solanum* in three groups.

Key-word: molecular makers, plant breeding, fingerprint.

Introdução

O gênero *Solanum* L. apresenta distribuição cosmopolita e suas espécies representam cerca de 1% de todas as angiospermas (Whalen e Caruso, 1983). A grande diversidade de espécies é atribuída a sua origem antiga além de uma diversificada rota de especiação (Whalen, 1979). É atribuída ao gênero *Solanum* uma origem Sul Americana, especialmente na região dos Andes, contudo espécies endêmicas podem ser encontradas na Ásia, África, América do Norte e Austrália (Bukanya e Carasco, 1995; Edmonds, 1977). Por outro lado, o gênero possui uma taxonomia um tanto complexa. Atualmente o sistema de classificação mais utilizado é o citado por D'Arcy (1972), o qual dividiu o gênero em sete subgêneros: *Archeosolanum* Marzell, *Bassovian* (aubl.) Bitter, *Leptostemonum* (Dunal) Bitter, *Lyciosolanum* Bitter, *Minon* Raf. *Brevantherum* (Seithe) D'Arcy, *Potatoe* (G. Don) D'Arcy e *Solanum* Seithe, além de mais de 70 seções. O gênero possui várias espécies cultivadas e comercialmente importantes para a alimentação humana como batata (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*S. melongena* L.), jiló (*S. gilo* L.) entre outras. Alguns representantes são utilizados no tratamento de diversas doenças, como asma, bronquite, disenteria e diabetes (Bohs, 1999). Algumas espécies são utilizadas na indústria farmacêutica como *S. laciniatum*, da qual se extrai a substância Solasodine, um esteróide alcalóide utilizado no controle do colesterol (Mann, 1978).

Informações a respeito da diversidade genética intra e interespecífica é essencial para os programas de melhoramento genético, uma vez que a ausência da variabilidade genética inviabiliza sua execução (Gepst, 1993). Em *Solanum*, molecularmente, a diversidade genética tem sido descrita através do uso de isoenzimas (Weijun, 1992; Isshiki *et al.* 1994; Karihaloo e Gottlieb, 1995a), DNA de cloroplasto (cpDNA) e mitocondrial (mtDNA) (Sakata e Lester, 1994; Isshiki *et al.*, 2003), marcadores AFLP (Mace *et al.*, 1999) e marcadores RAPD (Karihaloo e Gottlieb, 1995b). Estes marcadores moleculares foram utilizados para elucidar questões filogenéticas e evolutivas dentro do gênero, entretanto, discordâncias entre vários trabalhos indicam que a adição de novos estudos, utilizando outros marcadores moleculares, pode auxiliar na elucidação das relações entre as espécies do gênero *Solanum* (Isshiki *et al.*, 2008).

O marcador molecular ISSR (sequência simple repetida interna) tem se mostrado bastante informativo no estudo da diversidade genética (Isshiki *et al.*, 2008) e das relações

filogenéticas e evolutivas (Reddy *et al.*, 2002), bem como na caracterização de acessos e cultivares possibilitando, a indicação de parentais promissores em programas de melhoramento genético (Isshiki *et al.*, 2008; Charters & Wilkinson, 2000; Vijayan e Chatterjee, 2003). ISSR é um marcador co-dominante e, diferente dos marcadores de microssatélite (SSR), não necessita de um conhecimento prévio do DNA em estudo (Gupta *et al.*, 1994). A técnica de ISSR apresenta grande reprodutibilidade, fácil uso e baixo custo em comparação com diversos outros tipos de marcadores moleculares (Matthews, 1999). A utilização da técnica ISSR no gênero *Solanum* não tem sido muito documentada, principalmente nas espécies silvestres, limitando o conhecimento a respeito deste marcador molecular nas espécies pertencentes ao gênero (Isshiki *et al.*, 2008; Doganlar *et al.*, 2002; Nunome *et al.*, 2003a,b). Pelo exposto acima, o presente estudo realizou a análise de ISSR em nove espécies do gênero *Solanum* e duas do gênero *Capsicum* objetivando ampliar o conhecimento a respeito da diversidade genética neste gênero, o qual, poderá ser utilizado tanto em estudos taxonômicos como em programas de melhoramento genético.

Material e método

A. Material vegetal

No presente trabalho, foi utilizado o DNA genômico de 11 acessos do gênero *Solanum* e dois do gênero *Capsicum* L. conforme a tabela 1.

B. Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico total foi extraído de folhas frescas obtidas de plântulas germinadas em placa de Petri, exceto em *S. paniculatum* L. e nas espécies do gênero *Capsicum* L., que foram coletadas no campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Nas espécies que forneceram pouco tecido foliar (0,1 mg), o DNA foi obtido com a utilização do Kit de extração Plant DNAzol[®] (Invitrogen[®]), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Já nas espécies com abundância de tecido vegetal, a extração foi seguida pelo método CTAB 2% [cetyltrimethylammonium bromide] (Murray & Thompson, 1980), que consistiu na maceração em nitrogênio líquido de 100 mg de tecido foliar fresco, colocado em 1000 µl de tampão de extração CTAB 2% (100 mM triz [pH 8.0], 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA [pH 8.0], 0.2% (p/v)

B-mercaptoetanol, 2% [p/v] CTAB) aquecido em banho-maria a 60°C por 30 minutos. O DNA foi extraído com um volume de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 e precipitado com presença de isopropanol 40% (v/v). O DNA foi lavado com etanol 70%, seco e dissolvido em 100 µl de TE (10 mM triz-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0]). A concentração do DNA foi estimada eletroforeticamente em gel de agarose (0,8%), utilizando como padrão de peso molecular 1,0 µl de marcador λ. O DNA, solução de trabalho, foi diluído para uma concentração de 5ng/µl para ser utilizado nas ampliações de PCR.

C. Reação de amplificação ISSR

Para as ampliações via PCR foram utilizados 27 oligonucleotídeos iniciadores (olii) ISSR UBC [University of British Columbia] (Tabela 2). Utilizou-se em cada reação de ISSR-PCR, 15 ng/µl de DNA genômico, 10 mM de tampão 10X (Fermentas[®]), 10 mM MgCl₂ (Fermentas[®]), 5µM de olii, 10 mM dNTP (LGC[®]), 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas[®]), com volume final de 17µl. As reações foram realizadas em termociclador PTC 200 (MJ research[®]), sendo submetidas a uma desnaturação inicial de 95°C por 4 minutos, seguida de 31 ciclos compostos de: desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 45 segundos variando de 50.4°C a 58°C (a depender do olii) e extensão por 2 minutos a 72 °C. Após esta etapa, foi feita uma extensão final por 7 minutos a 72°C. Aos produtos de amplificação foi adicionada uma mistura de 10X Loading Dye (LGC[®]) mais o corante Syber Green 5X (Invitrogen[®]), os produtos amplificados foram separados em géis de agarose 1,5% a 80V por 120 minutos, com tampão TBE 0,5X (Tris base, EDTA [pH:8,0] e ácido bórico), e observados sob luz ultravioleta.

D. Análise estatística dos produtos amplificados por ISSR

A partir dos produtos de amplificação (bandas claras e evidentes), foi construída uma matriz binária de dados com informações referentes à presença (1) e ausência de bandas (0); características de cada iniciador para cada uma das espécies e acessos. Para a análise de similaridade entre as espécies e acessos, foi empregado o coeficiente de Jaccard, através do programa NTSYS-pc 2.1 software (Rohlf, 2000). O dendrograma foi construído baseado no agrupamento estatístico UPGMA. A presença de bandas polimórficas e a influência da natureza dos olii também foram investigadas.

Resultados

Dos 27 olii testados, 20 foram selecionados por serem polimórficos e apresentarem um bom perfil de amplificação. O número total de bandas amplificadas foi de 307. Deste total, 299 ou 97,4% (Tabela 2) foram polimórficas sendo 77,4% variando entre 500 a 2000pb. Entretanto, o polimorfismo intra-específico foi de apenas 16,7%. O número de bandas polimórficas por olii variou de oito (UBC 861) a 19 (UBC 888 e 841), com média geral de aproximadamente 15 bandas. Dos 20 olii utilizados, 15 apresentaram todas as bandas polimórficas. A figura 1 mostra os perfis eletroforéticos dos fragmentos gerados por alguns dos olii ISSR utilizados no presente trabalho.

A similaridade genética inter-específica variou de 0.1952 entre as espécies *S. paniculatum* e *S. nitidibaccatum* Bitter a 0.3546 entre *S. laciniatum* Ait. e *S. melongena* e a similaridade média entre as espécies/aceessos de *Solanum* foi de 0.2892 (Tabela 3). O dendrograma construído através do método de agrupamento estatístico UPGMA (Figura 2), separou os gêneros *Solanum* e *Capsicum* em dois ramos principais I e II. O ramo I inclui os grupos A, B e C e no ramo II apenas o grupo D (Figura 2). No grupo A os acessos selvagens de *S. laciniatum* foram agrupados com o coeficiente de similaridade de 0.9261, indicando a mais alta similaridade obtida pelo método de Jaccard (Tabela 3).

O acesso selvagem e o cultivado de *S. melongena* foram agrupados no mesmo grupo dos acessos de *S. laciniatum*, porém com menor coeficiente de similaridade (0.7972). Com isso, sugere-se que os primers UBC 842 e 846 podem ser indicados para a identificação segura de acessos selvagens e cultivados de *S. melongena* (Figura 1). Os grupos B e C foram arrançados separadamente no dendrograma revelando um baixo índice de similaridade. No grupo B, *S. luteum* Mill. apresentou coeficiente de similaridade de 0.3173 com *S. nigrum* L. e, este último apresentou 0.2802 de similaridade com *S. nitidibaccatum*. O grupo C foi composto por três subgrupos representados pelas espécies *S. gilo*, *S. paniculatum* e *S. dulcamara*. O menor coeficiente de similaridade encontrado entre as espécies do gênero *Solanum* foi de 0.1952 entre *S. paniculatum* do grupo C e *S. nitidibaccatum* do grupo B. O grupo D, composto pelos dois representantes do gênero *Capsicum* apresentou coeficiente de similaridade de 0.7941 entre seus acessos, sendo que o menor coeficiente de similaridade entre *Solanum* e *Capsicum*, 0.1705 foi observado entre as espécies *Capsicum* spp. e *S. dulcamara*.

Discussão

Modificações na composição de bases em regiões simples ou repetitivas ao longo dos genomas de procariotos e eucariotos são consideradas comuns. Essas modificações podem incluir inserções, deleções e erros no pareamento de bases e possuem grande importância para estudos de mutação, caracterização e filogenia. Quando as modificações ou variações alteram o local de anelamento ou ligação dos olii, elas podem gerar os polimorfismos de produtos amplificados. Deste modo, inserção e/ou deleção num determinado ponto, pode resultar na presença ou ausência de polimorfismo entre indivíduos de um determinado grupo analisado (Wolfe *et al.*, 1998; Culley & Wolfe, 2001).

A estimativa da diversidade genética através da análise do polimorfismo inter- e intra-específico com o uso de olii ISSR forneceram resultados importantes em diversas culturas como o arroz (Joshi *et al.*, 2000); trigo (Nagaoka & Ogihara, 1997); feijão (Ajibade *et al.*, 2000); batata doce (Huang & Sun, 2000). Utilizando estes marcadores, Charteis e Wilkinson (2000) distinguiram com bastante clareza, acessos e híbridos de um banco de germoplasma de cacau, inferindo sobre a diversidade genética da coleção. Igualmente, Prevost e Wilkinson (1999) distinguiram 34 cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) com marcadores do tipo ISSR.

No presente trabalho, ao menos em *S. laciniatum* não foi observado polimorfismo suficientemente discriminatório, uma vez que o coeficiente de similaridade foi de 0.9261 entre os dois acessos estudados, demonstrando pouco polimorfismo entre os dois acessos. Segundo Symon (1994), este fato pode ser explicado pela por vários motivos: (i) pequena amostra de olii utilizado, (ii) pela pouca quantidade de acessos analisados, (iii) pela ocorrência de baixa variabilidade entre os acessos selvagens desta espécie gerada por um possível isolamento geográfico, ou mais provavelmente, pela junção de alguns destes fatores. Por outro lado, o polimorfismo entre o acesso selvagem e cultivado de *S. melongena* (berinjela) foi observado com segurança, uma vez que tanto o olii 842 quanto o 846, revelaram um alto polimorfismo entre estes genótipos. De acordo com o exposto acima, torna-se necessário o uso de uma grande quantidade de olii na detecção do polimorfismo em genótipos com baixa variabilidade genética como no dos acessos de *S. laciniatum*, uma vez que dos 27 olii testados nesta espécie, não se verificou a amplificação de uma região genômica polimórfica o bastante para assegurar a identificação dos genótipos com segurança. Um reflexo da utilização de muito olii para seleção de poucos polimórficos para a

identificação de genótipos, pode ser visto no trabalho de Isshiki *et al.* (2008). Os autores utilizaram cerca de 100 oligonucleotídeos iniciadores para a discriminação de oito cultivares de *S. melongena* e concluíram que a utilização de apenas dois é suficiente para a identificação de todos os genótipos.

O polimorfismo encontrado entre os acessos de *S. melongena* pode ser atribuído ao processo de domesticação sofrido pelo genótipo cultivado. Vijayan e Chatterjee (2003) sugeriram que na espécie *Morus* spp., o polimorfismo observado entre os acessos selvagens e cultivados é reflexo do processo de seleção durante a domesticação das cultivares, principalmente nos genótipos envolvidos nos programas de melhoramento genético.

O agrupamento pelo método UPGMA para geração do dendrograma, corroborou com os dados da literatura. No grupo A, os genótipos de *S. laciniatum* apresentaram-se isolados, comportamento este, fortemente sustentado por ser o único representante do subgênero *Arqueosolanum*, o que distingue esta espécie das outras espécies de *Solanum*. *S. laciniatum* é reconhecida como uma espécie poliplóide, com número cromossômico básico distinto dos demais representantes do gênero *Solanum* $x=23$ (Symon, 1981), a mesma também se distingue dos demais subgêneros devido a ocorrência de aneuploidia (D'Arcy, 1991; Symon, 1994). Segundo Bohs (2005), o clado *Archeosolanum* representa um grupo isolado e ainda com muitas indefinições taxonômicas entre seus representantes. De forma inesperada, *S. laciniatum* compartilhou com *S. melongena* e *S. atropurpureum* Schrank o mesmo grupo A no exposto dendrograma. Por outro lado, *S. melongena* e *S. atropurpureum* pertencem ao subgênero *Leptostemoum*, fato que corrobora com o agrupamento no mesmo grupo. Conclusão semelhante foi encontrada no trabalho de Poczai *et al.* (2008) com marcadores do tipo RAPD, os autores observaram o agrupamento de *S. melongena* no mesmo grupo que *S. atropurpureum*, concluindo que taxonomiamente as duas espécies estão classificadas de forma correta, compartilhando o mesmo subgênero, mas são distintas por pertencerem a seções botânicas diferentes.

O alto polimorfismo total de 97,4% foi reflexo do grupo amostral analisado, uma vez que nove espécies representando subgêneros distintos do gênero *Solanum* foram utilizadas. Outro fato que atribui o alto polimorfismo total encontrado, foi a existência de duas espécies como grupo externo pertencentes ao gênero *Capsicum*. Desta forma observa-se que, quanto maior a divergência entre os genótipos no grupo amostral, maior o polimorfismo total. Em trabalhos com marcadores RAPD, o polimorfismo gerado entre espécies do gênero *Solanum* também tem tido alto valor. A análise da diversidade genética de espécies do gênero *Solanum* com marcadores RAPD revelou maior polimorfismo que marcadores isoenzimáticos e AFLP

(Furini, 2004, Karihaloo *et al.*, 1995b; Mace *et al.*, 1999). Kochieva (2002) estimando o polimorfismo genético além das relações filogenéticas em representantes do antigo gênero *Lycopersicon* observou a ocorrência de polimorfismo inter-específico de 98,8% e intra-específico variando de 8,7% a 65,6%. Este alto polimorfismo detectado pelos marcadores ISSR, associado a parâmetros taxonômicos, ecológicos e evolutivos das amostras analisadas.

Entender as relações filogenéticas dentro do gênero *Solanum*, dito muitas vezes como gênero paradoxo pela sua uniformidade e hipediversidade, pode promover benefícios aplicáveis em outros gêneros. Desta forma os marcadores ISSR se mostram um método multi-locus eficaz para analisar a diversidade genética dentro do gênero *Solanum*, fornecendo dados aplicáveis nas diversas áreas, como a taxonomia, filogenia e melhoramento genético, além de se mostram uma ferramenta rápida e simples para a identificação e caracterização de germoplasma.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao instituto Alfa Botanicher Garden Georg-Universidad-Alemanha pelo envio do material biológico e ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa.

Referências bibliográficas

- Ajibade SR, Weden NF and Chite SM (2000) Inter-simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica*, 111,1: 47-55.
- Bohs I (1999) *Cyphomandra* (Solanaceae). *Flora Neotropica Monograph*, New York Botanical Garden, 63.
- Bohs L (2005) Major clades in *Solanum* based on *ndhF* sequences. In: Keating RC, Hollowell VC, Croat TB (eds) *A Festschrift for William G. D'Arcy: the legacy of a taxonomist. Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden*, vol 104. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 27-49.
- Bukenya ZR and Carasco JF (1995) *Solanum* (Solanaceae) in Uganda *Bothalia*, 25, 1:43-59
- Charters YM and Wilkinson MJ (2000) The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 160-166.
- Culley T and Wolfe A (2001) Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Genealogical Society of Great Britain*, 86: 545-556.
- D'Arcy WG (1972) Solanaceae studies II: typification of subdivisions of *Solanum*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*., 59:262-278
- D'Arcy WG (1991) The Solanaceae since 1976, with review of its biogeography. *in* J. G. Hawkes, R. N. Lester, M. Nee & Estrada (editors), *Solanaceae Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanic Gardens., Kew, 75.
- Doganlar S, Fray A, Daunay MC, Lester RN and Tanksley SD (2002). A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae. *Genetics*, 161: 1697-1711.
- Edmonds JM (1977) Taxonomic studies of *Solanum* sect. *Solanum* (Maurella). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 75: 141-178
- Furini A and Wunder J (2004) Analysis of eggplant (*Solanum melongena*) related germplasm: morphological and AFLP data contribute to phylogenetic interpretations and germplasm utilization. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 197-208.
- Gepts P (1993) The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies. *Evolution Biology*., 27: 51-94.
- Gupta M, Chyi Y-S, Romero-Severson J and Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 998-1006.

Huang J and Sun SM (2000) Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 1050–1060.

Isshiki S, Okubo H and Fujieda K (1994) Phylogeny of eggplant and related *Solanum* species constructed by allozyme variation. *Scientia Horticulturae*. 59: 171–176.

Isshiki S, Suzuki S and Yamashita K (2003) RFLP analysis of mitochondrial DNA in eggplant and related *Solanum* species. *Genet. Res. Crop Evol.*, 50: 133–137.

Isshiki S, Iwata N and Khan MR (2008) ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.), *Scientia Horticulturae*, 117: 186–190

Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc.Vaud. Sci. Nat.*, 44: 23–270.

Joshi SP, Gupta VS, Aggarwal RK, Ranjekar PK and Brar DS (2000) Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 1311–1320.

Karihaloo JL and Gottlieb LD (1995a) Allozyme variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 578–583.

Karihaloo JL and Gottlieb LD (1995b) Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 767–770.

Kochieva EZ, Ryzhova NN, Khrapalova IA & Pukhalskyi VA (2002) Using RAPD for estimating genetic polymorphism in and phylogenetic relationships among species of the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. *Russian Journal of Genetic*, 38 (9):1104-1108.

Mace ES, Lester RN and Gebhardt CG (1999) AFLP analysis of genetic relationships among the cultivated eggplant, *Solanum melongena* L., and wild relatives (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics*. 99: 626–633.

Mann JD (1978) Production of Soladine for the pharmaceutical industry. *Advances in Agronomy*. 30: 207–245.

Matthews D, McNicoll J, Harding K and Millam S (1999) 50-anchored simple sequence repeat primers are useful for analysing potato somatic hybrids. *Plant Cell Report*, 19: 210–212.

Murray MG and Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research.*, 8: 4321–4325.

Nagaoka T and Ogihara (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 597-602.

- Nunome T, Suwabe K, Iketani H and Hirai M (2003a). Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breeding*. 122: 256–262.
- Nunome T, Suwabe K, Ohyama A and Fukuoka H (2003b). Characterization of trinucleotide microsatellites in eggplant. *Breed. Science.*, 53,77–83.
- Prevost A and Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 98: 107–112.
- Poczai P, Teller J, Sazabó I. (2008). Analysis of phylogenetic relationships in the genus *Solanum* (Solanaceae) as revealed by RAPD markers. *Plant Systematic and Evolution* 275: 59-67.
- Reddy PM, Sarla N and Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128: 9–17.
- Rohlf, fJ (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York, Exeter Software.
- Sakata Y and Lester RN (1994) Chloroplast DNA diversity in eggplant (*Solanum melongena*) and its related species *S. incanum* and *S. marginatum*. *Euphytica*, 80: 1–4.
- Symon DE (1981) A revision of *Solanum* in Australia *Journal of the Adelaide Botanic Gardens.*, 4:1–367
- Symon DE (1994) Kangaroo apples: *Solanum* sect. *Archaeosolanum*. Published by the author, Keswick, South Australia.
- Vijayan K and Chatterjee SN (2003) ISSR profiling of indian cultivar of mulberry (*Morus* spp.) and its relevance to breeding programs. *Euphytica*, 131: 53-63.
- Weijun Z (1992) Inheritance of isozymes and morphological characters in the brinjal eggplant. *Acta Genet. Sin.*, 19: 423–429.
- Whalen MD (1979) Taxonomy of *Solanum* section *Androceras*. *Gentes Herb.*, 11: 359–426
- Whalen MD and Caruso E (1983) Phylogeny in *Solanum* sect. *Lasiocarpa* (Solanaceae). Congruence of morphological and molecular data. *Systematic Botanic*, 8: 369–380.
- Wolfe A, Xiang Q-Y and Kephart SR (1998) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter-simple sequence repeat markers. *Molecular Ecology*, 7: 1107-1125.

Tabela 1. Espécies dos gêneros *Solanum* L. e *Capsicum* L. com seus respectivos códigos de acesso ou nome da cultivar.

Espécies <i>Solanum</i> \ <i>Capsicum</i>	Código
<i>S. laciniatum</i>	1119
<i>S. laciniatum</i>	1393
<i>S. melongena</i>	1157
<i>S. melongena</i>	'Var. Romanita'
<i>S. atropurpureum</i>	1178
<i>S. luteum</i>	1184
<i>S. gilo</i>	'Var. Mouro redondo'
<i>S. paniculatum</i>	UFRPE
<i>S. dulcamara</i>	1181
<i>S. nigrum</i>	1187
<i>S. nitidibaccatum</i>	1118
<i>Capsicum</i> spp.	UFRPE
<i>Capsicum</i> spp.	UFRPE

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores ISSR utilizados nas ampliações, incluindo suas temperaturas de anelamento (T_m), número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo. Letras significando olii degenerados: Y = (C, T); R = (A, G); H = (A, C, T); B = (C, G, T); V = (A, C, G); D = (A, G, T).

Olii	Sequência (5'→3')	T _m (°C)	Nº Total de bandas	Polimórficas	% Poli
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50.4	18	18	100%
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52.8	18	16	87,50%
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52.8	10	10	100%
826	ACACACACACACACACC	52.8	16	16	100%
834	AGAGAGAGAGAGAGACYT	52.6	13	13	100%
835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	52.6	12	12	100%
836	AGAGAGAGAGAGAGACYA	54.8	11	11	100%
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	52.0	19	18	94,50%
842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	54.0	12	11	91%
844	CTCTCTCTCTCTCTRA	52.0	14	14	100%
846	GAGAGAGAGAGAGAGAA	52.0	16	16	100%
855	ACACACACACACACACYT	52.6	17	15	86,7
857	ACACACACACACACACYG	54.0	16	15	93,4
861	ACCACCACCACCACCACC	58.0	8	8	100%
873	GACAGACAGACAGACA	50.0	18	18	100%
880	GGAGAGGAGAGGAGA	52.8	18	18	100%
884	HBHAGAGAGAGAGAGAG	52.8	17	16	100%
887	DVDTCTCTCTCTCTCTC	52.8	18	18	100%
888	BDBCACACACACACACA	52.8	19	19	100%
K1	ATA TAT ATA TAT ATA TT	51.1	17	17	100%
Total			307	299	97,40%

Tabela 3. Coeficiente de similaridade entre as espécies do gênero *Solanum* e *Capsicum* pelo método de Jaccard. 01 e 02 - *S. laciniatum*; 03 - *S. melongena* (selvagem); 04 - *S. melongena*; 05 - *S. atropurpureum*; 06 - *S. luteum*; 07 - *S. gilo*; 08 - *S. paniculatum*; 09 - *S. dulcamara*; 10 - *S. nigrum*; 11 - *S. nitidibaccatum*; 12 e 13 - *Capsicum* spp.

*Nota	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13
01	1.0000												
02	0.9261	1.0000											
03	0.3333	0.3546	1.0000										
04	0.3450	0.3535	0.7972	1.0000									
05	0.2722	0.2538	0.3275	0.3254	1.0000								
06	0.3045	0.3128	0.3031	0.2795	0.2544	1.0000							
07	0.2019	0.2146	0.3522	0.3200	0.2654	0.2958	1.0000						
08	0.2413	0.2487	0.2435	0.2663	0.2621	0.2277	0.2969	1.0000					
09	0.2660	0.2549	0.2436	0.2331	0.2619	0.2282	0.2732	0.2923	1.0000				
10	0.2676	0.2755	0.2989	0.2888	0.2189	0.3173	0.2529	0.2500	0.2941	1.0000			
11	0.2268	0.2216	0.2768	0.2586	0.2532	0.2937	0.2195	0.1952	0.2777	0.2802	1.0000		
12	0.2295	0.2244	0.2116	0.2402	0.2327	0.2209	0.1734	0.2058	0.2068	0.2439	0.2733	1.0000	
13	0.2169	0.2116	0.1978	0.2126	0.2091	0.2209	0.1779	0.2049	0.1705	0.1913	0.2500	0.7941	1.0000

Figura 1. Produtos das ampliações ISSR-PCR em gel de agarose 1.5 %. Oligonucleotídeos iniciadores UBC set 808, 842 e 846. M – Marcador Ladder Plus 1 Kb; 01 e 02 - *S. laciniatum*; 03 - *S. melongena* (selvagem); 04 - *S. melongena* (Var. Romanita); 05 - *S. atropurpureum*; 06 - *S. luteum*; 07 - *S. gilo*; 08 - *S. paniculatum*; 09 - *S. dulcamara*; 10 - *S. nigrum*; 11 - *S. nitidibaccatum*; 12 e 13 - *Capsicum* spp.

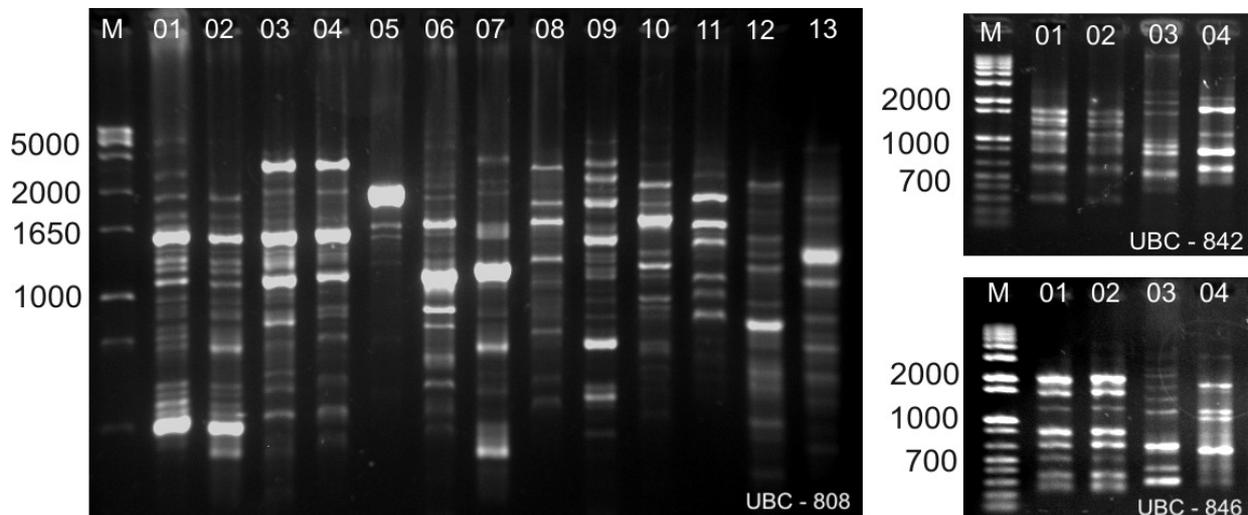
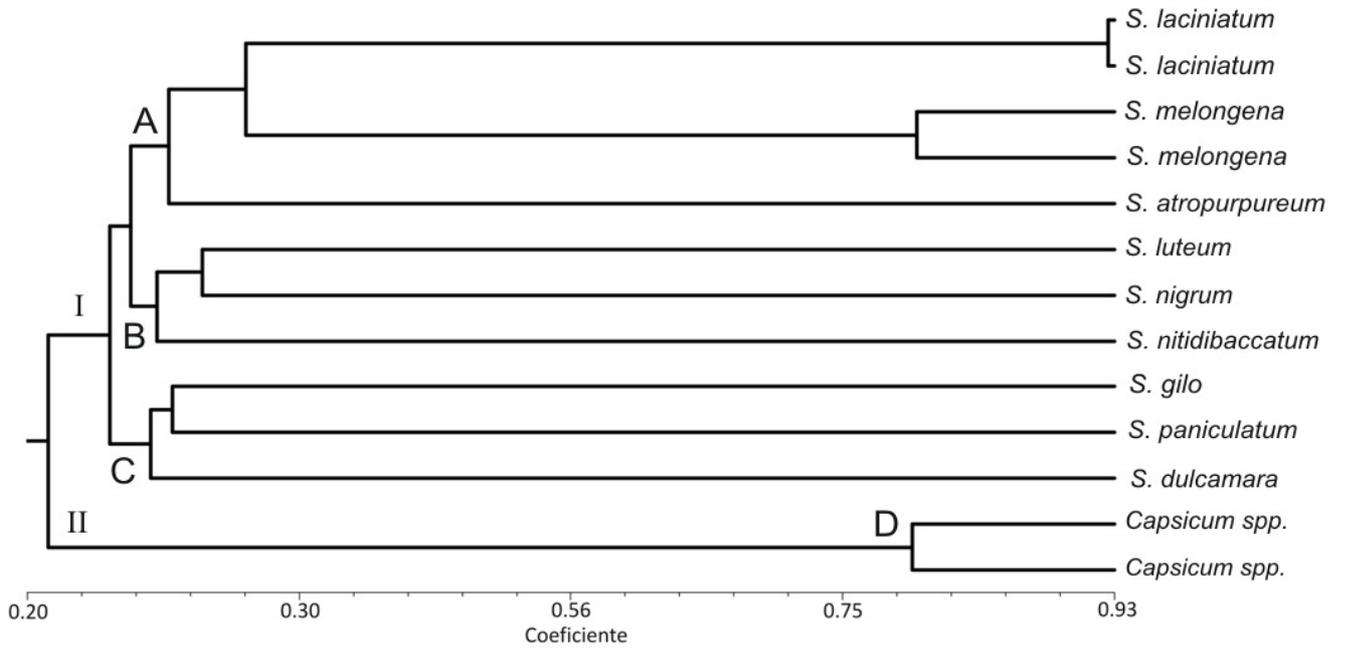


Figura 2. Dendrograma obtido pela análise das variações nas regiões ISSR das espécies do gênero *Solanum* e do grupo externo *Capsicum* pelo coeficiente de Jaccard e método de agrupamento UPGMA.



4. CONCLUSÕES GERAIS

- Conclui-se que a localização de marcadores espécie-específicos com o uso das técnicas de coloração convencional, fluorocromos CMA₃ e DAPI e FISH com sonda de DNAR 45S foi satisfatória, possibilitando a identificação de todas as espécies.
- É provável que o cariótipo de *Solanum laciniatum* tenha sofrido processos como fusão cromossômica e displóidia, fato que proporcionou a espécie o número cromossômico de 2n=92.
- Foi constatado que o tamanho cromossômico é inversamente proporcional ao nível de ploidia, ou seja, o tamanho cromossômico médio em espécies diplóides é maior que em espécies poliplóides.
- A visualização de satélites é difícil pela coloração convencional com o uso de Giemsa. A técnica de coloração com fluorocromos CMA₃ e DAPI é a mais indicada para este fim.
- A localização de marcadores citológicos espécie-específicos com a aplicação dos fluorocromos CMA₃ e DAPI foi satisfatória para a distinção das maiorias das espécies. Fluorocromos CMA₃ e DAPI possibilitam a localização de marcadores espécie-específicos, permitindo a identificação mais confiável do genótipo analisado.
- O uso de marcadores ISSR foi satisfatório estimar a diversidade genética no gênero *Solanum*, apresentando resultados satisfatórios com polimorfismo médio maior que os observados na literatura com outros marcadores como o RAPD.
- Pode-se concluir que o polimorfismo médio é reflexo do grupo amostra utilizado. Quando o grupo amostral é mais diversificado em termos taxonômicos maior é o polimorfismo médio.

NORMAS GERAIS PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS NA ACTA BOTANICA BRASILICA

1. A *Acta Botanica Brasilica* publica artigos originais em todas as áreas da Botânica, básica ou aplicada, em Português, Espanhol ou Inglês. Os trabalhos deverão ser motivados por uma pergunta central que denote a originalidade e o potencial interesse da pesquisa, de acordo com o amplo espectro de leitores nacionais e internacionais da Revista, inserindo-se no debate teórico de sua área. 2. Os artigos devem ser concisos, em **quatro vias, com até 25 laudas**, seqüencialmente numeradas, incluindo ilustrações e tabelas (usar fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço entre linhas 1,5; imprimir em papel tamanho A4, margens ajustadas em 1,5 cm). A critério da Comissão Editorial, mediante entendimentos prévios, artigos mais extensos poderão ser aceitos, sendo o excedente custeado pelo(s) autor(es). 3. Palavras em latim no título ou no texto, como por exemplo: *in vivo*, *in vitro*, *in loco*, *et al.* devem estar em itálico. 4. O título deve ser escrito em caixa alta e baixa, centralizado, e deve ser citado da mesma maneira no Resumo e Abstract da mesma maneira que o título do trabalho. Se no título houver nome específico, este deve vir acompanhado dos nomes dos autores do táxon, assim como do grupo taxonômico do material tratado (ex.: Gesneriaceae, Hepaticae, etc.). 5. O(s) nome(s) do(s) autor(es) deve(m) ser escrito(s) em caixa alta e baixa, todos em seguida, com números sobrescritos que indicarão, em rodapé, a filiação Institucional e/ou fonte financiadora do trabalho (bolsas, auxílios etc.). créditos de financiamentos devem vir em **Agradecimentos**, assim como vinculações do artigo a programas de pesquisa mais amplos, e não no rodapé. Autores devem fornecer os endereços completos, evitando abreviações, elegendo apenas um deles como Autor para correspondência. Se desejarem, todos os autores poderão fornecer e-mail. 6. A estrutura do trabalho deve, sempre que possível, obedecer à seguinte seqüência: - **RESUMO** e **ABSTRACT** (em caixa alta e negrito) – texto corrido, sem referências bibliográficas, em um único parágrafo e com cerca de 200 palavras. Deve ser precedido pelo título do artigo em Português, entre parênteses. Ao final do resumo, citar até cinco palavras-chave à escolha do autor, em ordem de importância. A mesma regra se aplica ao Abstract em Inglês ou Resúmen em Espanhol.

- **Introdução** (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): deve conter uma visão clara e concisa de: a) conhecimentos atuais no campo específico do assunto tratado; b) problemas científicos que levou(aram) o(s) autor(es) a desenvolver o trabalho; c) objetivos. - **Material e métodos** (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): deve conter descrições breves, suficientes à repetição do trabalho; técnicas já publicadas devem ser apenas citadas e não descritas. Indicar o nome da(s) espécie(s) completo, inclusive com o autor. Mapas - podem ser incluídos se forem de extrema relevância e devem apresentar qualidade adequada para impressão. Todo e qualquer comentário de um procedimento utilizado para a análise de dados em **Resultados** deve, obrigatoriamente, estar descrito no item **Material e métodos**. - **Resultados e discussão** (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): podem conter tabelas e figuras gráficas, fotografias, desenhos, mapas e pranchas) estritamente necessárias à compreensão do texto. Dependendo da estrutura do trabalho, resultados e discussão poderão ser apresentados em um mesmo item ou em itens separados. As figuras devem ser todas numeradas seqüencialmente, com algarismos arábicos, colocados no lado inferior direito; as escalas, sempre que possível, devem se situar à esquerda da figura. As tabelas devem ser seqüencialmente numeradas, em arábico com numeração independente das figuras. Tanto as figuras como as tabelas devem ser apresentadas em folhas separadas (uma para cada figura e/ou tabela) ao final do texto (originais e 3 cópias). Para garantir a boa qualidade de impressão, as figuras não devem ultrapassar duas vezes a área útil da revista que é de 17,5x23,5 cm. Tabelas - Nomes das

espécies dos táxons devem ser mencionados acompanhados dos respectivos autores. Devem constar na legenda informações da área de estudo ou do grupo taxonômico. Itens da tabela, que estejam abreviados, devem ter suas explicações na legenda. As ilustrações devem respeitar a área útil da revista, devendo ser inseridas em coluna simples ou dupla, sem prejuízo da qualidade gráfica. Devem ser apresentadas em tinta nanquim, sobre papel vegetal ou cartolina ou em versão eletrônica, gravadas em .TIF, com resolução de pelo menos 300 dpi (ideal em 600 dpi). Para pranchas ou fotografias - usar números arábicos, do lado direito das figuras ou fotos. Para gráficos - usar letras maiúsculas do lado direito. As fotografias devem estar em papel brilhante e em branco e preto. **Fotografias coloridas poderão ser aceitas a critério da Comissão Editorial, que deverá ser previamente consultada, e se o(s) autor(es) arcar(em) com os custos de impressão.**

As figuras e as tabelas devem ser referidas no texto em caixa alta e baixa, de forma abreviada e sem plural (Fig. e Tab.). Todas as figuras e tabelas apresentadas devem, obrigatoriamente, ter chamada no texto. Legendas de pranchas necessitam conter nomes dos táxons com respectivos autores. Todos os nomes dos gêneros precisam estar por extenso nas figuras e tabelas. Gráficos - enviar os arquivos em Excel. Se não estiverem em Excel, enviar cópia em papel, com boa qualidade, para reprodução. As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, devem ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Usar unidades de medida de modo abreviado (Ex.: 11 cm; 2,4 µm), o número separado da unidade, com exceção de porcentagem (Ex.: 90%). Escrever por extenso os números de um a dez (não os maiores), a menos que seja medida. Ex.: quatro árvores; 6,0 mm; 1,0-4,0 mm; 125

exsicatas. Em trabalhos taxonômicos o material botânico examinado deve ser selecionado de maneira a citarem-se apenas aqueles representativos do táxon em questão e na seguinte ordem:

PAÍS. Estado: Município, data, fenologia, *coletor(es) n úmero do(s) coletor(es)* (sigla do Herbário).

Ex.: **BRASIL. São Paulo:** Santo André, 3/XI/1997, fl. fr., *Milanez 435* (SP). No caso de mais de três coletores, citar o primeiro seguido de *et al.* Ex.: Silva *et al.* (atentar para o que deve ser grafado em CAIXA ALTA, Caixa Alta e Baixa, caixa baixa, **negrito, itálico**). Chaves de identificação devem ser, preferencialmente, indentadas. Nomes de autores de táxons não devem aparecer. Os táxons da chave, se tratados no texto, devem ser numerados seguindo a ordem alfabética. Ex.:

1. Plantas terrestres
2. Folhas orbiculares, mais de 10 cm diâm..... 2. *S. orbicularis*
2. Folhas sagitadas, menos de 8 cm compr..... 4. *S. sagittalis*
1. Plantas aquáticas
3. Flores brancas1. *S. albicans*
3. Flores vermelhas 3. *S. purpurea*

O tratamento taxonômico no texto deve reservar o itálico e o negrito simultâneos apenas para os nomes de táxons válidos. Basiônimo e sinonímia aparecem apenas em itálico. Autores de nomes científicos devem ser citados de forma abreviada, de acordo com índice taxonômico do grupo em pauta (Brummit & Powell 1992 para Fanerógamas). Ex.: 1. *Sepulveda albicans* L., Sp. pl. 2: 25. 1753. *Pertencia albicans* Sw., Fl. bras. 4: 37, t. 23, f. 5. 1870. Fig. 1-12 Subdivisões dentro de Material e métodos ou de Resultados e/ou discussão devem ser escritas em caixa alta e baixa, seguida de um traço e o texto segue a mesma linha. Ex.:

Área de estudo - localiza-se ... Resultados e discussão devem estar incluídos em conclusões. - **Agradecimentos** (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): devem ser sucintos; nomes de pessoas e Instituições devem ser por extenso, explicitando o porquê dos agradecimentos. - **Referências bibliográficas** - Ao longo do texto: seguir esquema autor, data. Ex.: Silva (1997), Silva & Santos (1997), Silva *et al.* (1997) ou Silva (1993; 1995), Santos (1995; 1997) ou (Silva 1975; Santos 1996; Oliveira 1997). - Ao final do artigo: em caixa alta e baixa, deslocado para a esquerda; seguir ordem alfabética e cronológica de autor(es); **nomes dos periódicos e títulos de livros devem ser grafados por extenso e em negrito**. Exemplos: Santos, J. 1995. Estudos anatômicos em Juncaceae. Pp. 5-22. In: **Anais do XXVIII Congresso Nacional de Botânica**. Aracaju 1992. São Paulo, HUCITEC Ed. v.I. Santos, J.; Silva, A. & Oliveira, B. 1995. Notas palinológicas. Amaranthaceae. **Hoehnea** 33(2): 38-45. Silva, A. & Santos, J. 1997. Rubiaceae. Pp. 27-55. In: F.C. Hoehne (ed.). **Flora Brasílica**. São Paulo, Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. **Para maiores detalhes consulte os últimos fascículos rescentes da Revista, ou os links da mesma na internet: www.botanica.org.br**. ou ainda artigos on line por intermédio de www.scielo.br/abb. **Não serão aceitas** Referências bibliográficas de monografias de conclusão de curso de graduação, de citações resumos **simples** de Congressos, Simpósios, Workshops e assemelhados. Citações de Dissertações e Teses **devem ser evitadas ao máximo; se necessário, citar no corpo do texto**. Ex.: J. Santos, dados não publicados ou J. Santos, comunicação pessoal.

GENETIC AND MOLECULAR BIOLOGY – NOTICE TO CONTRIBUTORS

Scope and policy

Genetics and Molecular Biology (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics). The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines. Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society. It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries. Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal as judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board are reviewed by the Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

Submission of papers

1. Manuscripts should be submitted to: Angela M. Vianna-Morgante, Editor-in-Chief
Genetics and Molecular Biology
Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 Ribeirão Preto, SP – Brazil

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain: **a)** A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere. **b)** A hard copy of the manuscript, including original figures. **c)** A copy of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission. **d)** An electronic copy of the text, tables and figures. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h). Mailed disks must be labeled with the first author's last name, platform and software (see detailed instructions below). Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed. **3. Categories of Contribution. 3.1. Research Articles.** Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below: **a) The title page.** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges. **b) The Abstract.** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references. **c) The text.** must be as succinct as possible. *Text citations:* articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers:* In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. *Binomial Names:* Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the reference section. The text includes the following elements: *Introduction* - Description of the background that led to the study. *Material (or Subjects) and Methods* - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section. *Results* - Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section. *Discussion* - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation. Some manuscripts may require different formats

appropriate to their content. **d) The Acknowledgments.** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support. **e) The References Section:** references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. Use standard abbreviations for journal titles. Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted to a publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted. *Sample journal article citation:* Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386. Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709. *Sample book citation:* Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp. *Sample chapter-in-book citation:* Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513. *Sample electronic article citation:* Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD and Van Dyke T (2004) pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. *Plos Biol* 2:194-205. <http://www.plosbiology.org>. **f) Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. When databases are cited, date of consultation must be stated. *Sample Internet resource citation:* Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005) LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm **g) Tables:** each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers. **h) Figures.** must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. A set of original illustrations of the highest quality must be provided in glossy paper. If you have created figures electronically submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office. **i) Nomenclature.** should adhere to current international standards. **j) Sequences.** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published. **k) Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies. **l) Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript. **3.2 Short Communications.** Present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article. **3.3 Letters to the Editor.** Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form. **3.4 Review Articles.** Review Articles are welcome. **3.5 Book Reviews.** Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review. **3.6 History, Story and Memories.** Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil. **4. Proofs.** Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's

errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval. **5. Reprints.** Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.