

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA**

**LAMONIER CHAVES RAMOS**

**ANÁLISE CITOGÉNÉTICA COMPARADA EM SISAL  
(ENTRE O HÍBRIDO 11648 E *AGAVE SISALANA* PERRINE)**

**Recife  
2014**

**LAMONIER CHAVES RAMOS**

**ANÁLISE CITOGÉNÉTICA COMPARADA EM SISAL  
(ENTRE O HÍBRIDO 11648 E *AGAVE SISALANA* PERRINE)**

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

Comitê de orientação:

Professor Dr. Reginaldo de Carvalho - Orientador - UFRPE

Dr.<sup>a</sup> Lidiane de Lima Feitoza – Co-orientadora - UFPI

**Recife  
2014**

Ficha catalográfica

R175a Ramos, Lamonier Chaves  
Análise citogenética comparada em sisal (entre o híbrido 11648 e *Agave sisalana* Perrine) / Lamonier Chaves Ramos. – Recife, 2014.  
49 f.: il

Orientador: Reginaldo de Carvalho.  
Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2014.  
Referências.

1. Cariótipo 2. Pentaplóide 3. Fluorocromos 4. FISH 5. DNA Ribossômico I. Carvalho, Reginaldo de, orientador II. Título

CDD 581.15

**ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARADA EM DE SISAL  
(HÍBRIDO 11648 X AGAVE SISALANA PERRINE)**

**LAMONIER CHAVES RAMOS**

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 14 / 08 /14

---

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho  
Orientador – UFRPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Rita Cabral Sales de Melo  
UFRPE

---

Dr. José Jaime Vasconcelos Cavalcanti  
EMBRAPA ALGODÃO

**Recife  
2014**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais que proveram a base da minha educação e me ensinaram lições que servirão pra toda a vida; e a Williany que vem acompanhando meus passos, encorajando-me e me fortalecendo nos momentos mais difíceis,

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Edson e Rosângela, que, apesar de não estarem na plateia, assistindo o roteiro da minha vida, eles sempre estiveram nos bastidores, torcendo e fazendo o que puderam para que tudo ocorresse como manda o figurino.

A Williany pelas sábias palavras de incentivo e de conforto nos momentos mais precisos do mestrado.

À Dr.<sup>a</sup> Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega, minha orientadora durante a graduação, a quem sempre serei grato em cada conquista no campo da ciência e na vida acadêmica.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) juntamente com o Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas, por ter me recebido como aluno e ter acrescentado luz ao meu entendimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de mestrado, que assegurou minha estadia fora de minha terra natal para poder realizar meu curso e concluir minha pesquisa.

À Embrapa algodão pelos acessos cedidos do banco de germoplasma de sisal, com os quais desenvolvi este trabalho.

Ao meu professor e orientador Reginaldo de Carvalho que acreditou e viu que eu poderia ir além do que eu mesmo acreditava ser capaz.

À minha co-orientadora Lidiane de Lima Feitoza pela importante revisão do texto da dissertação.

Ao professor e coordenador José Luiz Sandes (Zezinho), pelos conselhos e por ter me escutado, sempre que recorri, atendendo minhas necessidades como aluno do programa.

Aos meus professores, em geral, pelas boas aulas, pelo exemplo de profissionalismo e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos Álvaro e Robinho pelo companheirismo e pelas horas de estudo em grupo que foram fundamentais para o êxito com as disciplinas.

Aos meus amigos do laboratório de citogenética Genialdo (Gênio), Angélica, Vanessa (Walk it out), Viviane, Emmanuely, Silmar, Polly, David e Horace por terem me ensinado as técnicas de citogenética e por terem mostrado boa vontade em ajudar sempre que precisei.

Aos meus amigos Paulo Ricardo e Kleyton Danilo (Celso), com os quais convivi e dividi moradia, por terem feito de nossa casa um ambiente alto astral de viver.

Em fim, a todos que de uma forma ou de outra, deram sua contribuição para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

O ponto final é mais um ponto de partida de uma reticência.

Lamonier Chaves Ramos



## SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT .....	09
CAPÍTULO I .....	10
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.1 Histórico do <i>Agave</i> .....	13
2.2 Características botânicas do gênero <i>Agave</i> .....	14
2.3 Importância socioeconômica do sisal.....	15
2.4 Características agronômicas do Híbrido 11648 e da <i>Agave sisalana</i> .....	16
2.5 Melhoramento genético do sisal.....	17
2.6 Citogenética do gênero <i>Agave</i> .....	18
2.7 Citogenética aplicada ao melhoramento de plantas.....	19
2.8 Técnicas citogenéticas .....	20
3 REFERÊNCIAS .....	23
CAPÍTULO II .....	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT .....	32
INTRODUÇÃO .....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Complemento cromossômico do híbrido 11648. **a, b, c** – Núcleos interfásicos, prófase e metáfase revelados por Giemsa. **d, e, f** - Coloração CMA/DAPI revelando quatro bandas ricas em GC. **h, i** – FISH evidenciando dois sítios de DNAr 5S. **k, l** - FISH evidenciando dois sítios de DNAr 45S. Barras = 10µm, objetiva de 100x .....40
- Figura 2** – Complemento cromossômico de *Agave sisalana*. **a, b, c, d** – Núcleos interfásicos, prófase e metáfase revelados por Giemsa. **f, g** - Coloração CMA/DAPI revelando oito bandas ricas em GC. Setas apontam bandas CMA+ em cromossomos pequenos; cabeças de seta apontam bandas CMA+ relacionadas a RONS em cromossomos grandes. **i, j** – FISH evidenciando cinco sítios 45S (setas) e cinco sítios 5S (cabeças de seta); **l** – inserto evidenciando número de RONS em núcleos interfásicos. Em **l**, as setas maiores apontam as constrições secundárias ativas e as setas menores apontam RONS inativas e nucléolos. Barra em **d, g, j, m** = 10µm, objetiva de 100x. Barra em **l** = 10µm, objetiva de 40x .....41
- Figura 3** – Comparação esquemática da configuração das bandas CMA+ e dos sítios de 45S e 5S entre *Agave sisalana* e o híbrido 11648 .....42

## RESUMO

### ANÁLISE CITOGÉNÉTICA COMPARADA EM SISAL (ENTRE O HÍBRIDO 11648 E *AGAVE SISALANA* PERRINE)

O gênero *Agave* L. representa uma cultura extensivamente cultivada em vários países por apresentar utilidades em diversos setores da economia. A espécie *Agave sisalana* Perrine e o híbrido 11648 são os genótipos de maior importância econômica para o Brasil, que é o maior produtor e exportador da fibra extraída de suas folhas, conhecida como sisal. Os estudos de seus cariótipos têm sido limitados, até então, as técnicas de coloração convencional, que têm se mostrado insuficientes devido ao pequeno tamanho e similaridade dos seus cromossomos, havendo assim a necessidade de análises mais detalhadas. O presente trabalho objetivou analisar os cariótipos da espécie *Agave sisalana* e do híbrido 11648, por meio das técnicas de coloração convencional, da dupla coloração CMA/DAPI e da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com a finalidade de fornecer informações que possam ser úteis em programas de melhoramento. A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Citogenética Vegetal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Departamento de Botânica, UFRPE). Os dados da coloração convencional revelaram que o híbrido 11648 é um diplóide com  $2n = 60$ , com um cariótipo bimodal, composto de cinco pares cromossômicos grandes e 25 pares pequenos. Já a espécie *A. sisalana* apresentou um cariótipo pentaplóide com  $5n = 147$  cromossomos, dos quais 25 foram grandes e 122 foram pequenos. O padrão de banda CMA<sup>+</sup> observado revelou que há presença de heterocromatina constitutiva rica em CG e que, provavelmente, esta se mantém conservada em ambos os genótipos, sendo observadas quatro bandas no híbrido e oito na *A. sisalana*. No sisal híbrido, a FISH revelou dois sítios de DNAr 5S em um par de cromossomos pequenos e dois sítios de DNAr 45S em um par de cromossomos grandes. Na espécie *A. sisalana*, as sondas de DNAr 45S revelaram cinco RONS, sendo que duas delas são completamente distendidas, formando constrições secundárias, e as outras três se mantêm condensadas e inativas ao longo do ciclo celular. O presente estudo traz novas contribuições sobre o cariótipo de sisal que podem ser úteis para fins de caracterização e conservação de acessos em bancos de germoplasma bem como para uso em programas de melhoramento genético.

**Palavras-chave:** Cariótipo bimodal, Poliploidia, Heterocromatina, CMA/DAPI, FISH

**ABSTRACT****CYTOGENETIC COMPARATIVE ANALYSIS ON SISAL  
(BETWEEN THE HYBRID 11648 AND AGAVE SISALANA PERRINE)**

The genus *Agave* L. is extensively cultivated in many countries for present utilities in various sectors of the economy. The species *Agave sisalana* Perrine and the hybrid 11648 are the most important economically genotypes for Brazil, which is the largest producer and exporter of the extracted fiber from its leaves, known as “sisal”. Studies of their karyotypes have been limited so far the conventional staining techniques, which have been presented as insufficient, which have proven insufficient due to the small size and similarity of their chromosomes, so there is a need for more detailed analysis. This study aimed to analyze the karyotypes of the species *Agave sisalana* and hybrid 11648, by means of conventional staining techniques, the double staining CMA / DAPI and fluorescent in situ hybridization (FISH), in order to provide information that might be useful in breeding programs. The research was conducted at the Laboratório de Citogenética Vegetal, on the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Botany Department, UFRPE). The data of the conventional staining revealed that the hybrid 11648 is a diploid with  $2n = 60$ , with a bimodal karyotype composed by five large chromosomes pairs and 25 small pairs. On the other hand, the species *A. sisalana* presented a pentaploid karyotype with  $5n = 147$  chromosomes, of which 25 were large and 122 were small. The pattern of CMA + band observed revealed that there is presence of constitutive heterochromatin rich in CG and that probably it remains conserved in both genotypes, with four bands observed in the hybrid and eight in the *A. sisalana*. In the hybrid sisal, FISH revealed two sites of 5S rDNA in a small chromosomes pair and two sites of 45S rDNA in a large chromosomes pair. In the species *A. sisalana*, 45S rDNA probes revealed five NOR, two of which are fully distended, forming secondary constrictions and the other three remain condensed and inactive throughout the cell cycle. This study provides new insights on the sisal karyotype, which can be useful for purposes of characterization and conservation of hits on germplasm banks as well as for use in breeding programs.

**KEY-WORDS:** Bimodal karyotype, Polyploidy, Heterochromatin, CMA/DAPI, FISH.

## **CAPÍTULO I**

---

### **INTRODUÇÃO GERAL REFERENCIAL TEÓRICO**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

---

O gênero *Agave* (*Agavaceae*) representa um vasto grupo de suculentas, abrangendo cerca de 300 espécies e tendo o México como o centro de origem. Das poucas espécies cultivadas para a produção de fibras, a *Agave sisalana* é a de maior importância comercial, e por isso, tanto a planta como a sua fibra são conhecidas universalmente pelo nome de sisal (MEDINA, 1954).

De acordo com estimativas da Food and Agriculture Organization of United Nations - FAO (2014), o Brasil produz 120 000 toneladas e exporta cerca de 100 000 toneladas de fibra bruta e de bens manufaturados, sendo, atualmente, o principal produtor e exportador de sisal no mundo.

Os genótipos mais cultivados e adaptados para os Estados produtores de sisal no Brasil são a espécie *Agave sisalana* Perrine e o híbrido 11648 (ALVES; SANTIAGO; LIMA, 2005; SANTOS; BRANDÃO, 2014). A primeira, originária do Sul do México, Península de Yucatan, é descrita como um clone estéril, pois, em geral, é incapaz de produzir sementes devido às perturbações ocorridas na meiose (BROWN 2002). O segundo é originário da África e foi introduzido no Brasil por embarcações advindas deste continente. Em comparação com *A. sisalana*, este último é superior na produção de folhas, na produtividade de fibras por hectare e no maior potencial de produção. No entanto, nos quesitos qualidade e resistência da fibra, ele é significativamente inferior (SALGADO; CIARAMELLO; AZZINI, 1979; SILVA *et al.*, 1999).

Citologicamente, pesquisas têm revelado que o gênero *Agave* possui um número cromossômico básico  $n = x = 30$ , ocorrendo espécies que variam de diplóide a hexaplóide, que são alterações numéricas que envolvem mais de dois conjuntos cromossômicos por citótipo (DOUGHTY, 1936; RUIZ e GARAY, 2002). O estudo do cariótipo de sisal tem atraído a atenção de pesquisadores por apresentar peculiaridades no comportamento reprodutivo e citogenético. A *Agave sisalana*, por exemplo, é descrita como um pentaplóide, contendo cinco conjuntos de cromossomos mais ou menos similares (QUEIROZ *et al.*, 2012). Provavelmente, este seja um dos motivos que justifique o pareamento meiótico irregular e a não germinação dos grãos de pólen em condições normais (EWUSIE; GHATAK, 1971). Entretanto, sabe-se que através de técnicas artificiais, é possível induzir a propagação de *A. sisalana* por via sexuada (MEDINA, 1954), embora essas tentativas gerem uma descendência muito variável, diferente das plantas matrizes,

apresentando grande quantidade de espinhos marginais nas folhas, o que inviabiliza seu cultivo econômico. Para Lock (1962), isto é indício de que a espécie não é pura geneticamente, no entanto, deve-se insistir na seleção individual a partir da descendência sexual, com vistas a explorar a diversidade encontrada no sisal. Entretanto, por se tratar de um pentaplóide, deve-se também levar em consideração que, na sua descendência, ocorram variados rearranjos cromossômicos tendentes a produzir tipos diferentes aos da planta matriz original (MOREIRA; VIEIRA, 1999; WENDEL, 2000).

Segundo Brammer (2008), quando genótipos instáveis, mas com elevado valor agrônomico, é detectado dentro de um programa de melhoramento, uma das alternativas é a seleção de linhas estáveis nos genótipos instáveis. Para tal, a seleção assistida via citogenética, uma das ferramentas que vem ganhando credibilidade dentro desses programas, torna-se crucial. Entretanto, as análises citogenéticas referentes à *A. sisalana* e ao híbrido 11648 têm sido limitadas às técnicas de coloração convencional, o que, até certo ponto, têm sido insuficientes devido ao pequeno tamanho e similaridade dos cromossomos de sisal e até mesmo à simplicidade de informação da própria técnica. Assim, há necessidade de análises mais detalhadas, com outras técnicas que possibilitem uma visualização mais informativa dos eventos ocorridos nos cromossomos deste gênero.

Diante do exposto, objetivou-se, neste trabalho, analisar o cariótipo da espécie *Agave sisalana* e do híbrido 11648, através do emprego das técnicas citogenéticas de coloração convencional (para revisar os dados prévios), bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI e hibridização *in situ* fluorescente (FISH), como passo inicial para a caracterização dos acessos do banco de germoplasma de Sisal da Embrapa Algodão, com o intuito de fornecer informações que possam ser úteis em pesquisas que visem à produção de variedades melhoradas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

---

### 2.1 Histórico do *Agave*

Historicamente, o uso do *Agave* para diversos fins já era conhecido pelo homem desde tempos remotos (BNB, 1959). Os Astecas demonstravam seu reconhecimento reverenciando o “metl” (*maguey/agave*) como uma planta sagrada que surgia diretamente do corpo de Mayahuel, deusa da fertilidade. Do “coração” (rebento central) se extraía o “aguamel”, que, depois de fermentado e destilado, se obtinha o “mescal” ou “tequila”, o leite da deusa (REYMUNDO, 2014). Os Maias, astecas e outros indígenas confeccionavam, com as fibras de *Agave*, diversos artigos de uso doméstico, tais como mantas, sacolas, cordas, redes e sandálias; dos escalpos florais, faziam cabos de lanças, vara para pescar e vigas ou estacas para a construção de suas habitações e de currais; as folhas e os talos eram usados como teto e combustível para aquecimento das casas; as cinzas juntamente com as raízes se transformavam em sabão, água sanitária ou detergente; os espinhos terminais das folhas serviam de agulhas ou pregos e a seiva era usada como medicamento (MEDINA, 1954; REYMUNDO, 2014).

Após o descobrimento da América, o Velho Mundo tomou conhecimento do uso do sisal para cordoaria e outros empregos domésticos e a *Agave americana* foi introduzida na Europa no ano de 1561. Em virtude da semelhança de suas folhas espinhosas com aquelas dos Aloés, foi considerada inicialmente, como sendo do mesmo gênero, porém, em 1748, Carl Linnaeus classificou-as com a designação comum às plantas do gênero *Agave* que, do grego, significa admirável, magnífica (MEDINA, 1954).

O interesse comercial pelo sisal foi estimulado pelo desenvolvimento da fibra de baixo custo, e as plantações foram logo estabelecidas no continente europeu e em outras partes do mundo; porém, o México, proibindo a saída de mudas do país, praticamente monopolizou o mercado têxtil do *Agave* até a primeira guerra mundial (BNB, 1959).

Trazido para o Brasil por volta de 1903, somente a partir do final da década de 1930 o sisal passou a ser visto como uma alternativa econômica no País, sendo cultivado nos estados da Paraíba, da Bahia e do Rio Grande do Norte, em virtude das condições edafoclimáticas favoráveis (ALVES; SANTIAGO, 2005). Em 1946, o



Brasil tornou-se exportador dessa fibra e, em 1951, já assumia a segunda posição com relação à produção mundial (BARROS; CARVALHO; SILVA, 1999).

## 2.2 Características botânicas do gênero *Agave*

O gênero *Agave* pertence à classe Monocotyledoneae, série *Liliflorea*, família *Agavaceae*, subfamília *Agavoideae* e, de acordo com as características do escapo floral, acha-se dividido nos subgêneros *Littaea* e *Euagave*. O primeiro apresenta escapo floral do tipo especiforme e abrange 80 espécies; o segundo tem o escapo floral do tipo paniculado e comporta 170 espécies (MOREIRA; BELTRÃO; SILVA, 1999). O centro natural de dispersão do gênero compreende a área desde o sudoeste dos Estados Unidos, o México, a América Central e as Antilhas (MEDINA, 1954).

As espécies de *Agave* possuem hábito herbáceo e escapo floral saliente que pode atingir 12 metros de altura ou mais. O sistema radicular é fibroso e fasciculado, sem a presença de uma raiz principal, possuindo dois tipos de raiz: as fixadoras e as alimentadoras. As primeiras são bem ramificadas e podem chegar a mais de três metros de comprimento, sendo responsáveis pela fixação da planta ao solo, enquanto que as últimas são mais finas e estão inseridas sobre as transportadoras, tendo a função de absorver água e nutrientes (MOREIRA; BELTRÃO; SILVA, 1999).

A planta não tem caule aéreo e, portanto, é acaulescente, mas em seu lugar há um tronco (pseudocaule) ou eixo principal, sobre o qual os trofófilos (folhas) se inserem e armazenam água e nutrientes. Tais folhas são lanceoladas, carnosas, rígidas, de cor cinza a verde escuro e destituídas de pecíolo (sésil), crescendo em roseta densa e medindo entre 120 e 160 cm de comprimento, com 10 a 15 cm de largura na sua parte média. Os bordos são retos e podem ser inermes ou apresentar alguns espinhos rudimentares ou muitos espinhos marginais. Os fios das fibras localizadas na camada média da folha se unem e se lignificam, formando um acúleo terminal de coloração castanho-escuro, com 4 a 5 mm de largura e 20 a 25 mm de comprimento (SILVA *et al.*, 2008).

A inflorescência contém entre 25 a 40 ramos principais com em média 40 flores que formam aglomerados densos nas extremidades dos ramos e crescem a partir do pedúnculo. As flores são amarelas, medem cerca de 6 cm de comprimento e possuem um odor desagradável. À medida que as flores começam a murchar, brotos que crescem no ângulo superior entre a haste e pedúnculo se desenvolvem

em pequenas plantas ou bulbilhos, que caem no chão e se enraízam gerando novas plantas. (SILVA; BELTRÃO, 1999).

O fruto é uma cápsula trilocular com cerca de 3 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, de forma oblonga, de cor verde e de consistência carnosa nos estágios iniciais; quando amadurecem, seis meses depois que a flor é polinizada, passam a ter coloração preta. As sementes são delgadas, de tonalidade preta, lustrosa, de forma redondo-triangular, bastante leves e se distribuem em duas colunas no interior do fruto (SILVA *et al.*, 1999; GONDIM; SOUZA, 2009).

### **2.3 Importância socioeconômica do sisal**

A real importância da cultura do sisal é sua capacidade de tornar produtivas regiões do semi-árido brasileiro sem alternativas econômicas e de baixo índice de IDH (índice de desenvolvimento humano), sendo fator de sobrevivência para a população rural e contribuindo para a fixação do homem no campo (BANDEIRA; SILVA, 2006). Esta atividade econômica gera empregos diretos e indiretos para 700 a 800 mil pessoas nos Estados da Bahia, da Paraíba do Rio Grande do Norte e do Ceará (SUINAGA *et al.*, 2006).

A fibra do sisal, na forma bruta, beneficiada ou industrializada, representa importante fonte de divisas para esses estados, por se tratar de um produto de exportação que gera valores em torno de 80 milhões de dólares (SILVA *et al.*, 2008). Segundo dados da CONAB (2014), a produção brasileira, em 2013, foi estimada em 82,3 mil toneladas e o Brasil exportou fibra beneficiada de sisal para 33 países, tendo a China como a maior compradora, com 49,4% do total exportado, seguida de Portugal com 10,3% (2,7 mil toneladas). Nas exportações de cabos, cordas e cordéis, que seguiram para 15 países, a maior demanda foi dos EUA com 77% (16,7 mil t), do total exportado (CONAB, 2014).

O sisal dá origem à principal fibra dura produzida no mundo, contribuindo com, aproximadamente, 70% da produção comercial de todas as fibras desse tipo (SILVA, 2008). Esta é usada para a fabricação artesanal ou industrial de produtos diversos, tais como vassouras, redes, sacos, bolsas, chapéus, barbantes, cordas, capachos, tapetes, redes de pesca, malha para engessamento de tetos, tecidos industriais, esteiras e sacarias. É usada na fabricação de celulose para a produção de papel Kraft e outros tipos de papel fino, para cigarro, filtro, papel dielétrico, absorvente higiênico, fralda, entre outros (SILVA; BELTRÃO, 1999).

Há também possibilidades de utilização da fibra na indústria automotiva, de móveis, de eletrodomésticos, de geotêxteis (proteção de encostas, na agricultura e revestimento de estradas), na mistura com polipropileno, em substituição à fibra de vidro (composição de objetos plásticos) e na construção civil (ALVES; SANTIAGO; LIMA, 2005). De outros extratos da planta são fornecidos gorduras, cera, glicosídeo, álcool e ácidos, além do emprego na produção de tequila e de açúcar (COSIBRA, 2014).

Os subprodutos, resultantes do processamento do sisal, também podem ser aproveitados como complemento alimentar para rebanhos bovinos e caprinos, como adubo orgânico e como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis. O suco, que é rico em ecogenina, é também utilizado para a produção de fármacos, pasta cicatrizante, xarope, sabonete, e bioinseticida usado no controle de lagartas, de nematóides e de carrapatos (ALVES; SANTIAGO; LIMA, 2005).

Além de tudo, as fibras naturais vêm assumindo destaque como matéria prima, e, recentemente, o sisal tem sido uma cultura muito valorizada, ecologicamente, pois suas fibras são 100% biodegradáveis (FAO, 2014).

#### **2.4 Características agrônômicas do Híbrido 11648 e da *Agave sisalana***

No Nordeste, os produtores têm duas opções quanto ao tipo de sisal a ser plantado: o sisal comum ou *Agave sisalana*, que é o material amplamente cultivado na região, e o híbrido 11648, originário da África e introduzido no Brasil logo após a sua obtenção (SOUZA SOBRINHO *et al.*, 1985).

A geração F1, oriunda do cruzamento entre as espécies *Agave angustifolia* x *Agave amaniensis*, foi retrocruzada com a *A. amaniensis* e, dentre os numerosos descendentes gerados, foi selecionado e obtido o que veio a constituir o híbrido 11648 (MOREIRA; VIEIRA, 1999; ROBERT *et al.*, 2008).

Uma planta de *A. sisalana* produz entre 200 e 250 folhas durante o ciclo, com peso médio variando entre 400 e 700 gramas e cada folha contendo de 1000 a 1200 fios de fibra (SILVA *et al.*, 2008). Em comparação, o híbrido possui nítida vantagem com relação à produção de fibra, à percentagem de fibra na folha e ao rendimento de fibra por hectare (SILVA *et al.*, 1999b). Em ensaios realizados pela Companhia de Celulose da Bahia (CCB), a produção de folhas do híbrido 11648 foi 116,0% superior à do sisal comum, em média de cinco cortes. Com relação ao peso da folha, as folhas de *A. sisalana* foram 18% superiores em relação às do híbrido 11648.

Referente à percentagem de fibra na folha, o híbrido foi superior em 13% em relação à *A. sisalana*; já para rendimento de fibra por hectare, as plantas do material híbrido foram, em média, 196% superiores em relação ao sisal comum. Em um ensaio de competição realizado pela Embrapa Algodão, verificou-se que houve superioridade da *Agave sisalana* no comprimento de folha e resistência de fibra, porém, inferioridade em relação ao número de folhas/planta e produção de fibra seca na segunda colheita (SILVA *et al.*, 2008).

O sisal híbrido também tem mostrado menos susceptibilidade à podridão do tronco e maior resistência à seca do que a *A. sisalana*, o que permite colheita de suas folhas, praticamente, durante todo o ano. Porém, em ambientes úmidos, o híbrido tem se mostrado suscetível ao ataque de fungos e, quando plantado em locais sujeitos a baixas temperaturas, tem a desvantagem de pender prematuramente (MOREIRA; VIEIRA, 1999).

## 2.5 Melhoramento genético do sisal

O sisal porta flores hermafroditas, no entanto, segundo Moreira e Vieira (1999), esta fibrosa enquadra-se na categoria de plantas alógamas por apresentar dicogamia do tipo protandria, o que favorece a fertilização cruzada em detrimento da autofecundação. Todavia, quando os estigmas das flores dos ramos inferiores estão receptivos, os estames dos ramos imediatamente superiores abrem-se e vertem o pólen sobre elas e, desta forma, a planta também pode ser autofecundada (SILVA *et al.*, 2008).

O sisal floresce apenas uma vez e a polinização é, em geral, realizada por insetos, contudo, a descendência de polinização aberta tem a desvantagem de exibir espinhos marginais nas folhas, o que não é interessante à exploração comercial (SALGADO; CIARAMELLO; AZZTNI, 1979). O processo de propagação sexual só se consegue de maneira artificial, quando o pendão é decapitado antes da emissão dos ramos floríferos (MEDINA, 1954). A propagação assexuada é mais comum e se processa através de bulbilhos (propágulos) ou rebentões (filhotes). Os primeiros são pequenas plantas que se desenvolvem dos pendões florais, após a queda das flores. Os filhotes, como normalmente são chamados, são mudas originadas do rizoma da planta-mãe, ligadas a esta através de estolões (ABREU, 2010; SANTOS, 2011). Ambos são geneticamente iguais à planta matriz original, o que constitui em uma desvantagem, do ponto de vista do melhoramento, pois não produz

variabilidade de interesse e aumenta a probabilidade de uma doença dizimar uma população, em função da estreita base genética da cultura. Por esse motivo, os estudos em relação ao melhoramento das plantas de sisal pouco destacaram novas cultivares ou híbridos, (SALGADO *et al.*, 1979). Por outro lado, a propagação assexuada pode ser também de grande valia para o melhorista, pois, caso se consiga um híbrido com características comerciais desejáveis, será possível propagá-lo sem perigo de segregação (MOREIRA; VIEIRA, 1999).

Os objetivos que se pretende alcançar no melhoramento de sisal são: produção prolífica de folhas, ausência de espinhos marginais, folhas longas e pesadas, maior percentagem de fibra por folha, fibra de qualidade superior, resistência a doenças, a pragas e à seca, rápido crescimento e desenvolvimento inicial da planta e baixo número de filhotes (MEDINA, 1954; MOREIRA; VIEIRA, 1999). Este último pode baratear custos por diminuir a prática de sua erradicação, além de manter o arranjo do plantio da lavoura (GONDIM; SOUZA, 2009).

## 2.6 Citogenética do gênero *Agave*

O *Agave* é um gênero poliplóide e pode formar séries euplóides de 2x, 3x, 4x, 5x e 6x com número cromossômico básico  $n = x = 30$  (Palomino *et al.*, 2003). Estes, de acordo com Medina (1954), podem ser classificados em dois grupos, sendo cinco pares de cromossomos grandes e 25 pares de cromossomos pequenos em um conjunto diploide  $2n = 60$ . Palomino *et al.* (2008) estudaram seis cultivares de *Agave tequilana* Weber que também apresentaram 5 pares grandes e 25 pequenos. Já Lingling *et al.* (2009), estudando níveis de ploidia em espécies desse mesmo gênero, relataram a existência de cromossomos grandes, médios e pequenos. No entanto, não houve uma mensuração exata dos comprimentos encontrados em tais unidades, o que torna a classificação entre grandes, médios ou pequenos, altamente subjetiva.

Um estudo realizado com bulbilhos de sisal híbrido 11648 divulgou que o mesmo apresenta um número cromossômico diploide  $2n = 60$ , com a formulação cariotípica de 2 metacêntricos verdadeiros + 38 metacêntricos + 10 submetacêntricos + 8sub telocêntricos + 2 telocêntricos ou  $(2M^*+38M+10SM+8ST+2T)$  (QUEIROZ *et al.*, 2012). Os resultados dos estudos citogenéticos são unânimes ao apontar que a *A. sisalana* é um pentaplóide, embora haja uma grande divergência por parte dos pesquisadores quando se referem ao

número de cromossomos desta espécie. Satô (1935) observou metáfases com  $2n = 5x = 147$ , enquanto Doughty (1936) contou  $2n = 5x = 138$ , Granick (1944) por sua vez, mencionou  $2n = 5x = 149$ , Hazra *et al.* (2002) divulgaram  $2n = 5x = 147$  e Queiroz *et al.* (2012) relataram  $2n = 5x = 142$ .

À semelhança de outros gêneros vegetais, ocorre no *Agave* uma correlação entre morfologia e poliploidia. Em geral, o desenvolvimento vegetativo das espécies poliplóides é maior que o das espécies diplóides (MEDINA, 1954).

## 2.7 Citogenética aplicada ao melhoramento de plantas

As diferentes técnicas citogenéticas podem ser usadas estrategicamente na produção de dados para subsidiar decisões dos melhoristas e de pesquisadores durante a implantação do programa de melhoramento de plantas. Entre as informações geradas podem-se citar a caracterização da ploidia, a determinação da frequência de recombinação entre genomas homólogos e homeólogos, bem como a ocorrência de irregularidades espontâneas ou induzidas e as possíveis causas de irregularidades na segregação cromossômica que levam à produção de gametas inviáveis (DAVIDE, 2009).

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 cruzamento e retrocruzamento, contribuindo para minimizar possíveis erros de seleção de progênies, ou ainda, determinar o percentual dos genomas parentais nos indivíduos híbridos (MELO, 2009). Dessa forma, a citogenética é considerada uma ferramenta de suporte extremamente importante nas etapas de planejamento, coleta e seleção de genótipos, manipulação e monitoramento de qualquer programa de melhoramento genético e conservação do germoplasma (MELO, 2004).

A análise de cariótipos, envolvendo a avaliação de dados como número e tamanho dos cromossomos, relação entre braços cromossômicos e presença de constricção secundária ou satélites, pode trazer informações valiosas para comparar espécies ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie (GUERRA *et al.*, 1997). As técnicas citogenéticas introduzidas nas últimas décadas têm fornecido novos dados na caracterização de muitas espécies de interesse econômico. Dentre

estas, pode-se destacar, a coloração com fluorocromos e a hibridização *in situ* fluorescente, entre outras (APPELS *et al.*, 1998).

A utilização progressiva de todas estas técnicas servirá, sem dúvida para, melhorar a compreensão sobre a organização e a expressão dos genes em diferentes culturas, um dos objetivos fundamentais de qualquer programa de melhoramento genético (HERRERA, 2007).

## 2.8 Técnicas citogenéticas

A técnica com uso do corante Giemsa, um dos tipos mais utilizados de coloração convencional, marca os cromossomos uniformemente, permitindo a obtenção de vários dados cariológicos. Com o emprego desta técnica, é possível determinar o número cromossômico, as medidas dos cromossomos, o comprimento total da cromatina, o índice de assimetria, a visualização da região centromérica, da constrição secundária e do segmento satélite a ela associada, quando presente de forma distendida.

Essas medidas podem ser usadas para estabelecer a fórmula cariotípica dos cromossomos, classificada nas categorias: metacêntrico, submetacêntrico, telocêntrico ou acrocêntrico (GUERRA, 1988).

A despeito de sua extrema importância, sobretudo na análise inicial dos cariótipos, a coloração convencional é, muitas vezes, insuficiente para a diferenciação cromossômica intraespecífica e interespecífica, principalmente nas espécies que apresentam número e morfologia cromossômica semelhante. Por isso, são usadas adicionalmente técnicas de bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI que permitem maior detalhamento da estrutura e morfologia dos cromossomos individuais, além de sua principal utilidade que é a localização e distinção dos tipos de heterocromatina rica em GC e AT (ZANELA, 2009).

Os fluorocromos são corantes que apresentam propriedades fluorescentes base-específicos e que produzem padrões de bandeamento de acordo com a afinidade de bases do DNA (SCHWEIZER, 1976). Os mais utilizados atualmente são o 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que se liga às regiões cromossômicas ricas em bases nitrogenadas adenina e timina (AT), e a Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>), que se liga as regiões heterocromáticas ricas em bases nitrogenadas guanina e citosina (GC) (GUERRA; SOUZA, 2002).

As técnicas diferenciais permitem corar bandas de heterocromatina, caracterizando melhor alguns cromossomos, podendo ser utilizadas para identificar cromossomos homólogos ou auxiliar na análise da evolução cromossômica comparada (Guerra e Souza, 2002).

A técnica de hibridização *in situ* (HIS) foi descrita pela primeira vez por Gall e Pardue (1969) e consiste basicamente no pareamento de determinado segmento de ácido nucléico com uma sequência de nucleotídeos complementar situada dentro da célula, para verificar se a célula possui essa sequência e qual a sua exata localização. Para esta técnica, inicialmente, usavam-se moléculas radioativas, mas recentemente tem sido utilizado com muito mais frequência corantes fluorescentes para detectar os nucleotídeos marcados da sonda, sendo chamada de hibridização *in situ* fluorescente (Fluorescence in situ hybridization - FISH).

O princípio da técnica consiste no fato de que o DNA é formado por duas fitas complementares, as quais por meio de aquecimento podem ser facilmente separadas em fitas simples, ou desnaturadas, e em seguida renaturadas, voltando a ser fita dupla. Se no momento da renaturação do DNA houver uma sonda disponível em solução, as sondas competirão com as fitas de DNA cromossômico e poderão ser hibridizadas ao DNA alvo (GUERRA, 2004).

Os fluorocromos mais utilizados na coloração da sonda são o Cy3, o FITC (fluorescein isothiocyanate), o vermelho-Texas e a rodamina. Para corar o DNA cromossômico total, usa-se mais comumente o DAPI ou o iodeto de propídeo. Sequências únicas ou repetitivas (organizadas em tandem) ou o DNA genômico total de um organismo podem ser usadas como sonda. Entretanto, as sondas mais utilizadas são as de sequências repetitivas (DNAr 45S e 5S), devido ao fato de serem mais facilmente detectadas e proporcionarem sinais mais evidentes. Os sítios cromossômicos de DNAr 45S ativos constituem regiões organizadoras do nucléolo (RONs), observadas geralmente como constrições secundárias em células com coloração convencional.

Uma característica importante dos DNAr 5S e 45S é que estes genes são altamente conservados evolutivamente, o que significa que são muito similares em todos os eucariotas (Guerra, 2004), e por isso, eles têm sido utilizados como marcadores moleculares em um grande número de espécies de plantas de importância econômica, tais como *Triticum* Linnaeus, 1753 (JIANG; GILL 1994), *Gossypium hirsutum* Linnaeus, 1763 (JI *et al.*, 1999), *Hordeum vulgare* Linnaeus, 1753 'Plaisant' (CUADRADO; JOUVE, 2010).



O uso da FISH é de extrema importância na análise cariotípica comparada pelo fato de fornecer novas informações sobre a posição e o número de loci de DNA que ajudam na reconstituição da formação dos híbridos importantes em programas de melhoramento, bem como na elucidação dos eventos evolutivos que causam mudanças na dinâmica e estrutura dos genomas.

Além do mais, a hibridização *in situ* fluorescente permite estabelecer novos tipos de marcadores cromossômicos para localizar diversos genes e sequências repetitivas de DNA ao longo dos cromossomos, construir mapas físicos, acompanhar a quantidade de material genético introgridido em cruzamentos interespecíficos e a analisar pareamentos intergenômicos em plantas híbridas (GUERRA, 2004; BRAMMER, 2008).

### 3 REFERÊNCIAS

---

ABREU, Katia Cristina Leão de Magalhães. **EPIDEMIOLOGIA DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL NO ESTADO DA BAHIA**. 2010. 100 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, Cruz das Almas, 2010.

ALVES, Maria Odete; SANTIAGO, Eduardo Girão. TECNOLOGIA E RELAÇÕES SOCIAIS DE PRODUÇÃO NO SETOR SISALEIRO NORDESTINO. **XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural**, Ribeirão Preto, Sp, p.1-20, 27 jul. 2005

ALVES, Maria Odete; SANTIAGO, Eduardo Girão; LIMA., Antonio Renan Moreira. **Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro do Nordeste brasileiro**. Fortaleza, Ce: Bdn, 2005. 90 p. 2 v. (Documentos do ETENE, 04). Disponível em: <[http://www.bnb.gov.br/projwebren/exec/livroPDF.aspx?cd\\_livro=11](http://www.bnb.gov.br/projwebren/exec/livroPDF.aspx?cd_livro=11)>. Acesso em: 05 mar. 2014.

BANDEIRA, D.A.; SILVA, O.R.R.F. Aproveitamentode resíduos. In: ANDRADE, W. (org.). **O sisal no Brasil**. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília, DF. Apex,2006. cap.5, p.56-61.

BARROS, Maria Auxiliadora Lemos; CARVALHO, Orozimbo Silveira; SILVA, Odilon Reny Ribeiro Ferreira da. Importância econômica e situação da cultura do sisal. In. SILVA, Odilon Reny Ribeiro Ferreira da; BELTRÃO, Napoleão Esberard de Macêdo. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, Df: Embrapa, 1999. 205 p.

Banco do Nordeste do Brasil S/A. **Sisal: Problemas técnicos**. Fortaleza, Ce: BNB, 1959. 2 v. 295 p.

BRAMMER, Sandra Patussi. A citogenética e o melhoramento de plantas. **Jornal da Ciência: e-mail**, [s.l.],30 out. 2008. Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detailhe.jsp?id=59627>>. Acesso em: 12 abr. 2014.

BROWN, Karen. Agave sisalana Perrine. **Wildlands Weeks**, [s.l.], p.18-21, 2002. Disponível em: <<http://www.se-eppc.org/wildlandweeds/pdf/Summer2002-Brown-pp18-21.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2014

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTACIMENTO (Brasil). **SISAL: CONJUNTURA MENSAL**. 2014. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_02\\_12\\_11\\_46\\_10\\_sisaljanairo2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_02_12_11_46_10_sisaljanairo2014.pdf)>. Acesso em: 29 jun. 2014.

COSIBRA (Brasil). **Matéria Prima**. Disponível em: <[http://www.cosibra.com.br/materia\\_prima.php](http://www.cosibra.com.br/materia_prima.php)>. Acesso em: 22 maio 2014.

CUADRADO, A.; JOUVE, N. Chromosomal detection of simple sequence repeats (SSRs) using nondenaturing FISH (ND-FISH). **Chromosoma**, [S.l.], v. 5, n. 119, p. 495-503, 2010.

DAVIDE, Lisete Chamma *et al.* Citogenética e suas aplicações no melhoramento de plantas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p.53-63, nov./dez. 2009.

DOUGHTY, L. R. Chromosome behavior in relation to genetics of *Agave*: I. Seven species of fibre Agaves. **Journal Of Genetics**, [s.l.], v. 2, n. 33, p.197-205, 1936. Disponível em: <<http://www.ias.ac.in/jarch/jgenet/33/197.pdf>>. Acesso em: 13 abr. 2014.

EWUSIE, J.Y.; GHATAK, J. Studies on reproduction and cytology of sisal (*Agave sisalana* Perrine ex engelm.). **Ghana Journal Of Science**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.42-50, 20 jul. 1971. Disponível em: <[http://gains.org.gh/articles/gjs\\_v12\\_1\\_p42\\_50.pdf](http://gains.org.gh/articles/gjs_v12_1_p42_50.pdf)>. Acesso em: 14 jun. 2014.

FAO. **Future Fibres: Sisal**. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/futurefibres/fibres/sisal/en/>>. Acesso em: 01 jul. 2014.

GALL, Joseph G.; PARDUE, Mary Lou. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings Of The National Academy Of**

**Sciences**, [s.l.], v. 63, p.378-383, 27 mar. 1969. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/63/2/378.full.pdf+html>>. Acesso em: 15 maio 2.

GONDIM, Tarcísio Marcos de Souza; SOUZA, Leossávio César de. **Caracterização de Frutos e Sementes de Sisal**. Circular Técnica 127. Campina Grande - PB: Embrapa Algodão, 1999. 6 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/17804/1/CIRTEC127.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 14.

GRANICK, E.B.. A karyosystematic study of the genus *Agave*. **American Journal of Botany**, [S.I.], v. 31, n. 5, p.283-298, 1944.

GUERRA, Marcelo. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

GUERRA, M. *et al.* Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *citrus* germoplasm bank. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.20, p.489-496, 1997.

GUERRA, Marcelo; SOUZA, Maria Jose de. **Como observar cromossomos**. Ribeirão Preto: Funpec, 2002. 131 p.

GUERRA, M. **FISH, Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184 p.

HAZRA, S. K.; DAS, Sudripta; DAS, A. K. Sisal plant regeneration via organogenesis. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, [s.l.], v. 70, p.235-240, 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1016517617039>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

HERRERA, Juan Carlos. La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales: Molecular cytogenetics in plant genome analysis. **Agronomía Colombiana**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.26-35, 06 jun. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v25n1/v25n1a04>>. Acesso em: 19 maio 2014.

JI, Y. *et al.* New ribosomal RNA gene locations in *Gossypium hirsutum* mapped by meiotic FISH. **Chromosoma**, [S.l.], v. 3, n. 108, p. 200–207, 1999.

JIANG, J.; GILL B. S. Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support diphyletic origin of polyploid wheat. **Chromosoma**, [S.l.], v. 2, n.103, p. 59-64, 1994.

LINGLING, L. V.*et al.* Determination of chromosomal ploidy in *Agaves* ssp. **African Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 8, n. 20, p.5284-5252, 19 out. 2009. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/65956/53660>>. Acesso em: 11 jun. 2014.

MEDINA, Júlio César. **Sisal**. São Paulo, Sp: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1954. 286 p.

MELO, Cláudio Antônio Ferreira de. **ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM NOVE ESPÉCIES DO GÊNERO solanum L. (SOLANACEAE A. Juss)**. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Melhoramento Genético de Plantas, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009. Disponível em: <[http://200.17.137.108/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=510](http://200.17.137.108/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=510)>. Acesso em: 28 fev. 2014.

MOREIRA, José de Alencar Nunes; VIEIRA, Robson de Macêdo. Melhoramento genético do sisal. In: SILVA, Odilon Reny Ribeiro Ferreira da; BELTRÃO, Napoleão Esberard de Macêdo (Ed.). **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, Df: Embrapa, 1999. Cap. 6. p. 93-109.

MOREIRA, José de Alencar Nunes; BELTRÃO, Napoleão Esberard de Macêdo; SILVA, Odilon Reny Ribeiro Ferreira da. Botânica e morfologia do sisal. In. SILVA, Odilon Reny Ribeiro Ferreira da; BELTRÃO, Napoleão Esberard de Macêdo. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, Df: Embrapa, 1999. 205 p.

PALOMINO, Guadalupe *et al.* Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. **Caryologia**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.37-46, 2003. Disponível em: <[http://www.caryologia.unifi.it/past\\_volumes/56\\_1/Caryologia\\_Vol\\_56\\_037-046.pdf](http://www.caryologia.unifi.it/past_volumes/56_1/Caryologia_Vol_56_037-046.pdf)>. Acesso em: 25 maio 2014.

PALOMINO, Guadalupe; MARTÍNEZ, Javier; MÉNDEZ, Ignacio. Karyotype studies in cultivars of *Agave tequilana* Weber. **Caryologia**, [s.l.], v. 61, n. 2, p.144-153, 2008. Disponível em: <[http://www.caryologia.unifi.it/past\\_volumes/61\\_2/1470.pdf](http://www.caryologia.unifi.it/past_volumes/61_2/1470.pdf)>. Acesso em: 29 jun. 2014.

QUEIROZ, Sandra Regina de Oliveira Domingos *et al.* Análise cromossômica em bulbilhos de sisal (*Agave* spp.) cultivados em diferentes municípios baianos, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana - Ba, v. 26, n. 4, p.842-848, out./dez. 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-33062012000400013&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-33062012000400013&script=sci_arttext)>. Acesso em: 07 mar. 2014.

REYMUNDO, Ana Cristina. Tequila: Regalo de la diosa. **Nexos**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.22-30, abr./maio 2014. Disponível em: <<http://hub.aa.com/es/nx/tequila-historia-mayahuel>>. Acesso em: 11 jun. 2014.

ROBERT, Manuel L. *et al.* Wild and agronomically important *Agave* species (Asparagaceae) show proportional increases in chromosome number, genome size, and genetic markers with increasing ploidy. **Botanical Journal Of The Linnean Society**, [s.l.], v. 158, n. 2, p.215-222, 25 set. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8339.2008.00831.x/abstract>>. Acesso em: 30 maio 2014.

RUVALCABA-RUIZ, Domingo; RODRÍGUEZ-GARAY, Benjamin. Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. azul. **BMC Plant Biology**, Guadalajara, v. 2, n. 1, p.1-4, 23 out. 2002. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/2/10>>. Acesso em: 29 jun. 2014.

SALGADO, Antônio Luiz de Barros; CIARAMELLO, Dirceu; AZZTNI, Anísio. MELHORAMENTO DE AGAVE POR HIBRIDAÇÃO. **Bragantia: Revista científica**

**do instituto agrônomo**, Campinas, v. 38, n. 1, p.1-6, jan. 1979. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v38n1/01.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2014.

SANTOS, Robson de Andrade; BRANDÃO, Welinton. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica: Sisal**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio\\_sisal/arvore/CONT000ghou0b0002wx5ok05vadr1fx7pyzy.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000ghou0b0002wx5ok05vadr1fx7pyzy.html)>. Acesso em: 13 maio 2014.

SANTOS, Sílvia Leticia Bispo dos. **Variabilidade genética em populações de *Agave sisalana* Perrine (*Agavaceae*) detectada pela técnica Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana - Uefs, Feira de Santana - Ba, 2011. Disponível em: <<http://rgv.web697.uni5.net/dissertacoes/13.pdf>>. Acesso em: 18 maio 2014.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, New York, v. 58, p.307-324, 1976.

SATÔ, Dyûhei. Analysis of the karyotypes in *Yucca*, *Agave* and the related genera with special references to the phylogenetics significance. **The Japanese Journal Of Genetics**, Tokyo, v. 11, n. 5, p.272-278, nov. 1935. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs1921/11/5/11\\_5\\_272/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs1921/11/5/11_5_272/_pdf)>. Acesso em: 12 abr. 2014.

SILVA, Odilon Reny Ribeiro Ferreira da; BELTRÃO, Napoleão Esberard de Macêdo. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, Df: Embrapa, 1999. 205 p.

SILVA, Odilon Reny Ribeiro Ferreira da *et al.* **Cultivo do sisal no nordeste**. Campina Grande - PB: Embrapa-cnpa, 1999a. 71 p.

SILVA, Odilon Reny Ribeiro Ferreira da *et al.* Estudo comparativo de algumas características de *Agave sisalana* Perrine e do híbrido 11648, na primeira colheita. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande - PB, v. 3, n. 2, p.65-70, maio/ago. 1999b. Disponível em:

<<http://www.cnpa.embrapa.br/ojs/index.php/RBOF/article/view/210/218>>. Acesso em: 08 maio 2014.

SILVA, Odilon Reny Ribeiro Ferreira da *et al.* **Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro**. Campina Grande - PB: Embrapa, 2008. 24 p.

SOUZA SOBRINHO, J. de; SILVA, D.D. da; SILVA, F. de A.S. **Estudo sobre competição das variedades híbrido 11.648 e *Agave sisalana* na zona fisiográfica tabuleiro**. Salvador: Companhia de Celulose da Bahia, 1985. p. irr.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. R. F. da; COUTINHO, W. M.; COSTA, L. B.; CARTAXO, W. V. **Cultivo de sisal na região semi-árida do Nordeste brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 42 p. 2006.

WENDEL, Jonathan F.. Genome evolution in polyploids. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, p.225-249, 2000. Disponível em: <[http://download.bion.com.cn/upload/month\\_0908/20090803\\_eeccf86c6bf09251cd92Sz6FhyJuyqjj.attach.pdf](http://download.bion.com.cn/upload/month_0908/20090803_eeccf86c6bf09251cd92Sz6FhyJuyqjj.attach.pdf)>. Acesso em: 05 jun. 2014.

ZANELA, Liamar. **Caracterização cariotípica de quatro espécies brasileiras de alstroemeria (alstroemeriaceae) com as técnicas de FISH, CMA, DAPI E AgNOR**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Melhoramento Vegetal e Biotecnologia, Instituto Agronômico, Campinas - SP, 2009. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstitutoposgraduacao/dissertacoes/LiamarZanela.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2014.



## CAPÍTULO II

---

### **Distribuição da heterocromatina em sisal através da técnica de CMA/DAPI e de FISH com DNA ribossômico**

Este trabalho será submetido ao periódico  
**Comparative Cytogenetics** – ISSN 1993-078X

## **Distribuição da heterocromatina em sisal através da técnica de CMA/DAPI e de FISH com DNA ribossômico**

Lamonier Ramos<sup>1</sup>, Lidiane de Lima Feitoza<sup>1</sup>, Reginaldo de Carvalho<sup>1</sup> e José Jaime Vasconcelos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Biologia, Programa de pós-graduação em Botânica - UFRPE, Recife, Brasil;

<sup>2</sup>Embrapa Algodão – Campina Grande, Paraíba, Brasil

### **Resumo**

O objetivo do presente trabalho foi analisar os cariótipos da espécie *Agave sisalana* Perrine e do híbrido 11648 e identificar as posições e número de regiões de heterocromatina. A análise citogenética foi conduzida utilizando técnicas de coloração convencional com Giemsa, de dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI e de hibridização fluorescente *in situ* – FISH. Os dados revelaram que o híbrido 11648 é um diplóide  $2n = 60$  cromossomos, dos quais cinco pares são pequenos e 25 pares são grandes. Quatro destes cromossomos apresentaram bandas CMA<sup>+</sup>, sendo duas na região terminal de um par de cromossomos pequenos e duas associadas com a constrição secundária em um par de cromossomos grandes. Com a FISH foi possível observar dois sítios de DNAr 5S em um par de cromossomos pequenos e dois sítios de DNAr 45S correspondentes às mesmas regiões de CMA<sup>+</sup> do par de cromossomos grandes. A *Agave sisalana* apresentou um cariótipo pentaplóide  $5n = 147$  cromossomos, composto de 25 grandes e 122 pequenos. Os fluorocromos revelaram oito bandas CMA<sup>+</sup> distribuídas em três cromossomos pequenos e em cinco cromossomos grandes. A FISH evidenciou cinco sítios de DNAr 5S e cinco de DNAr 45S, sendo que duas destas últimas aparecem sempre distendidas, correspondendo às regiões organizadoras de nucléolos – RONS, e três mostram-se sempre condensadas nas metáfases observadas. O presente estudo traz novas contribuições sobre o cariótipo de sisal que podem ser úteis para fins de caracterização e conservação de acessos em bancos de germoplasma bem como para uso em programas de melhoramento genético.

**Palavras-Chave:** Cariótipo bimodal, poliplóide, fluorocromos, *Agave sisalana*, híbrido 11648

## Heterochromatin distribution in Sisal through the technique of CMA / DAPI and FISH with ribosomal DNA

### Abstract

The aim of this study was to analyze the karyotypes of the species *Agave sisalana* Perrine and the hybrid 11648 and identify the positions and number of heterochromatin regions. Cytogenetic analysis was conducted using conventional staining with Giemsa, double staining with the fluorochromes CMA/DAPI and of fluorescent *in situ* hybridization– FISH. The data revealed that the hybrid 11648 is a diploid  $2n = 60$  chromosomes, which five pairs are small and 25 pairs are large. Four of these chromosomes showed CMA<sup>+</sup> sides, two of them in the terminal region of a small chromosomes pair and two associated with the secondary constriction of large chromosomes pair. With FISH we observed two sites of 5S rDNA in a small chromosomes pair and two 45S rDNA sites corresponding to the same regions of the CMA<sup>+</sup> from the large chromosomes pair. The *Agave sisalana* showed a pentaploid karyotype  $5n = 147$  chromosomes, consisting of 25 large and 122 small. Fluorochromes revealed eight CMA<sup>+</sup> bands distributed in three small chromosomes and in five large chromosomes. FISH showed five sites of 5S rDNA and five sites of 45S rDNA, and two of them always appear distended, corresponding to the nucleolar organizer regions – NORs, and three showed always condensed on the observed metaphases. This study provides new insights on the sisal karyotype, which can be useful for characterization purposes and conservation of accessions on germplasm banks as well for use in breeding programs.

**Key-words:** Bimodal karyotype, polyploid, fluorochromes, *Agave sisalana*, hybrid 11648

## Introdução

O gênero *Agave* L. é conhecido mundialmente por apresentar utilidades em vários setores da economia, indo desde a fabricação artesanal de produtos diversos como cordas, redes e tapetes, até a produção de fármacos e bioinseticidas, passando pelas indústrias de açúcar, de papel, de bebidas e de automóveis (SILVA; BELTRÃO, 1999). Dentre as espécies do gênero, a *Agave sisalana* Perrine é a de maior importância econômica para o mercado têxtil pela qualidade de sua fibra. Daí, tanto a planta como a sua fibra são conhecidas, universalmente, pelo nome de sisal (MEDINA, 1954; BNB, 1959).

Segundo dados da FAO (2014) o Brasil é o principal produtor e exportador de sisal no mundo e os genótipos mais cultivados e adaptados para os estados produtores no País são a espécie *Agave sisalana* e o híbrido 11648 (ALVES; SANTIAGO; LIMA, 2005; SANTOS; BRANDÃO, 2011). A primeira é de origem do Sul do México, Península de Yucatan, enquanto o híbrido 11648 foi selecionado e obtido do retrocruzamento entre o F1 de (*Agave angustifolia* Haw x *Agave amaniensis* Trel. et Now.) e o parental *Agave amaniensis* (MOREIRA; VIEIRA, 1999; ROBERT *et al.*, 2008). Em estudos comparativos para características agrônômicas, o híbrido mostrou-se superior na produção de folhas, na produtividade de fibras por hectare e no maior potencial de produção; no entanto, nos quesitos qualidade e resistência da fibra, foi significativamente inferior (SALGADO; CIARAMELLO; AZZINI, 1979; SILVA *et al.*, 1999).

Citologicamente, estudos do cariótipo revelaram que o gênero é poliploide e pode formar séries euplóides de 2x, 3x, 4x, 5x e 6x com número cromossômico básico  $n = x = 30$  (PALOMINO *et al.*, 2003; LINGLING *et al.*, 2009). Segundo Queiroz *et al.*, (2012), o híbrido 11648 apresenta um número cromossômico diploide  $2n = 60$ . Com relação à *A. sisalana*, os pesquisadores são unânimes ao descreverem a espécie como um pentaploide, embora haja grande divergência quando se referem ao número de cromossomos, variando de  $2n = 5x = 138$  a  $2n = 5x = 147$  (SATÔ, 1935; DOUGHTY, 1936; GRANICK, 1944; HAZRA *et al.*, 2002; QUEIROZ *et al.*, 2012).

Sabe-se que uma das limitações de perpetuação via sexual de algumas espécies com determinados níveis de ploidia é a formação de multivalentes na prófase I da meiose (GUERRA, 1988). Por se tratar de um pentaploide, o pareamento meiótico dos cromossomos da *A. sisalana* é irregular e o crescimento do

tubo polínico em condições normais não é observada (EWUSIE; GHATAK, 1971). No entanto, em *A. sisalana*, essa limitação foi parcialmente superada pelo uso de técnicas artificiais, desenvolvidas por Medina (1954), possibilitando a partir de então sua propagação sexuada, porém, é de se esperar que, na sua descendência, ocorram variados rearranjos cromossômicos tendendo a produzir tipos diferentes aos da planta matriz original (MOREIRA; VIEIRA, 1999; WENDEL, 2000).

Segundo Brammer (2008), quando é detectado dentro de um programa de melhoramento genótipos instáveis, mas com elevado valor agrônomo, a seleção de linhas estáveis assistida via técnicas em citogenética clássica e molecular torna-se crucial. Entretanto, as análises citogenéticas referentes à *A. sisalana* e ao híbrido 11648 têm sido limitadas às técnicas de coloração convencional, o que, até certo ponto, têm se mostrado insuficientes devido ao pequeno tamanho e similaridade dos cromossomos de sisal. Assim, há necessidade de análises mais detalhadas, com outras técnicas que possibilitem uma visualização mais informativa dos eventos ocorridos nos cromossomos deste gênero.

O uso de técnicas de bandeamento com fluorocromos fornece uma visualização de blocos de coloração diferencial, permitindo que a caracterização cromossômica seja significativamente melhorada (GUERRA, 2004). Estes corantes apresentam propriedades fluorescentes base-específicas e os mais utilizados são a Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e o DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) que se ligam preferencialmente em regiões ricas em guanina e citosina (GC) e adenina e timina (AT), respectivamente (SUMNER, 2003).

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utiliza fragmentos amplificados de DNA ou RNA como sondas que hibridizam com DNA-alvo e marcam regiões específicas no cromossomo. Dentre as sondas mais utilizadas estão as sequência que codifica o RNA ribossômico 5S e a que codifica o precursor 45S dos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5,8S, conhecidos como DNAr 5S e 45S, respectivamente (SUMNER, 2003). Esta técnica tem sido usada para mapear sequências repetitivas, localizar genes de multicópias, investigar estrutura, função, correlação e evolução dos cromossomos e para comparar distâncias físicas e genéticas (SCHWARZACHER, 1994; GILL, 1995).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi iniciar uma caracterização cariotípica através da confirmação do número cromossômico e da identificação do padrão e da localização de bandas CMA/DAPI e de sítios de DNAr 5S e 45S na espécie *Agave sisalana* e no híbrido 11648, com o intuito de fornecer informações

que possam ser úteis em pesquisas que visem a produção de variedades melhoradas.

## Material e Métodos

### *Material vegetal*

Mudas de *Agave sisalana* Perrine e do Híbrido 11648 foram obtidas do banco de germoplasma da Embrapa Algodão no Município de Monteiro – PB e mantidas em vasos no Laboratório de Citogenética Vegetal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Departamento de Botânica, UFRPE) para periódicas coletas de raízes.

### *Coloração convencional, fluorocromos CMA/DAPI e FISH*

Para a coloração convencional foram utilizadas raízes jovens pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína por quatro horas a temperatura ambiente, fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial) por um período de 24 horas, e estocadas no freezer até posterior análise. Para coloração convencional, as lâminas foram preparadas pela técnica do esmagamento em uma gota de ácido acético 45%, congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula e coradas com Giemsa 2% (GUERRA; SOUZA 2002).

Para a coloração com fluorocromos foi adotada a metodologia de Schweizer e Ambros (1994). As raízes foram digeridas por 2 horas em uma solução de celulase (2%) e pectinase (20%) a 37°C e, posteriormente, esmagadas em ácido acético a 45%. As lâminas foram envelhecidas por três dias à temperatura ambiente e, posteriormente, coradas com CMA a 0,5 mg/mL, por 60 minutos e novamente coradas com DAPI 2 g/ml por 30 minutos e, finalmente, montadas em tampão McIlvaine-glicerol 1:1 (v/v).

O procedimento para FISH foi realizado como descrito por Pedrosa *et al.* (2002) com pequenas modificações. Para localizar os sítios de DNAr por FISH, o DNA recombinante D2 contendo o segmento DNAr 5S de 500 pb de *Lotus japonicus* (Pedrosa *et al.* 2002), foi marcado com Cy3-dUTP (Amersham), e o DNA recombinante R2, contendo o segmento de um fragmento de 6,5 kb correspondente ao DNAr 45S de *Arabidopsis thaliana* (WANZENBÖCK *et al.*, 1997), foi marcado com digoxigenina-11-dUTP. A sonda de DNAr 45S foi detectada com ovelha anti-digoxigenina conjugado ao FITC (Roche) e amplificado com coelho anti-ovelha

conjugado com FITC (Dako). As lâminas foram pré-tratadas com pepsina a 37°C durante 40 minutos e desnaturadas previamente por 10 minutos a 75°C antes da adição da mistura de hibridização. Lâminas e sondas foram desnaturadas a 75°C durante 10 minutos e depois hibridizadas a 37°C durante 2 dias. Depois de realizadas as lavagens para remoção do excesso de sonda, as preparações foram montadas em DAPI (2µg/mL):Vectashield (1:1, v/v). As melhores células foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Leica DM 2500 equipado com câmera digital DFC 345FX utilizando-se para processamento das imagens o software CW 4000. As imagens foram editadas e montadas no software Adobe Photoshop CS3. A montagem do ideograma foi feita para uma melhor visualização das marcas aqui investigadas.

## Resultados e discussão

Considerando o número básico de cromossomos do gênero, que é de  $n = x = 30$ , a contagem de cromossomos metafásicos via coloração convencional com o corante Giemsa confirmou que o híbrido 11648 é um diplóide com  $2n = 2x = 60$ , revelando ainda seu cariótipo bimodal, composto de cinco pares cromossômicos grandes e 25 pares pequenos (Fig. 1b-c), comuns em *Agave*. Já a espécie *A. sisalana* apresentou um cariótipo pentaplóide com  $2n = 5x = 147$  cromossomos, dos quais 25 foram grandes e 122 foram pequenos (Fig. 2b-d).

Os números cromossômicos observados e o nível de ploidia foram similares com os resultados publicados previamente por Palomino *et al.* (2008) e Gomes-Rodriguez (2013). Quanto à morfologia dos cromossomos e fórmula cariotípica, houve divergência com relação aos resultados apresentados por Queiroz *et al.* (2012), que representaram o cariótipo do híbrido 11648 com cromossomos metacêntricos, metacêntricos verdadeiros, submetacêntricos, subteloentríco e telocêntrico.

O presente trabalho, no entanto, revelou apenas a presença de cromossomos acrocêntricos e telocêntricos. A ausência de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, especialmente nos cromossomos grandes, se baseou na imunocoloração realizada com anticopos para a serina fosforilada na histona H3 (H3S10f) cujas marcas se correlacionaram com as regiões centroméricas e foram evidenciadas exclusivamente nos terminais de todos os cromossomos (dados não mostrados). É possível que a imprecisão quanto a localização dos centrômeros no

trabalho de Queiroz *et al.* (2012), tenha sido devido a má qualidade das células, as quais apresentaram cromossomos profásicos a prometáfásicos e com bastante aderência entre eles, e também pela não utilização de técnicas de bandeamento necessárias para a correta localização dos centrômeros.

A observação cromossômica enquanto ferramenta é imprescindível para elucidar a estrutura, função, comportamento e organização do genoma das mais diferentes espécies. Apenas com o uso de técnicas mais avançadas em citogenética, é possível aos pesquisadores entender melhor a estruturação genômica de *Agave ssp.* não só pelo fato dos cromossomos serem numerosos e apresentarem diferentes tamanhos, mas especialmente, devido aos seus diferentes níveis de ploidia e possíveis combinações.

Em relação à espécie *A. sisalana*, o número cromossômico observado ( $2n = 5x = 147$ ), característico de um pentaplóide para o gênero, assim como os subgrupos de cromossomos grandes (25) e pequenos (122) corresponderam aos mesmos relatados por Satô (1935) e Hazra *et al.* (2002). Provavelmente, a não observação de um número múltiplo exato para o pentaplóide completo ( $2n = 5x = 150$ ) em *A. sisalana* pode estar relacionada com a origem aloploplóide de Agavoideae (MCKAIN *et al.* 2012) e pela ocorrência de eventos evolutivos como translocações, fusões ou perda de unidades cromossômicas.

De acordo com Granick (1944), a família Agavaceae apresenta uma tendência para diminuição da quantidade de cromossomos grandes na direção de um aumento no número de cromossomos pequenos. Outra hipótese que pode explicar essa variação na cariomorfologia é a presença de transposons que se deslocam de uma região do cromossomo para qualquer outra parte do conjunto cromossômico ou, ainda, segmentos cromossômicos que estejam relacionados com os transposons e que mudam frequentemente de posição no cariótipo como as RONS ou alguns blocos heterocromáticos (GUERRA, 1988).

O bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI evidenciou no sisal híbrido a presença de quatro bandas CMA<sup>+</sup>, sendo que duas delas foram situadas na região intersticial do braço longo de um par de cromossomos grandes e correspondem às regiões organizadoras de nucléolo (RONS), enquanto os outros blocos de CMA<sup>+</sup> foram localizados na região terminal de um par de cromossomos pequenos (Fig. 1g-i). Nos núcleos interfásicos foram observados quatro blocos de CMA<sup>+</sup> de tamanhos mais similares, sendo dois deles envolvidos na formação nucleolar (Fig. 1d-f). Na espécie *A. sisalana*, os fluorocromos revelaram oito bandas CMA<sup>+</sup>, sendo que cinco



delas corresponderam às RONS evidenciadas pela FISH e ocorreram no braço longo de cinco cromossomos grandes. As outras três bandas CMA<sup>+</sup> foram posicionadas na região terminal de três cromossomos pequenos (Fig. 2e-j).

O padrão de banda CMA<sup>+</sup> observado revelou que há presença de heterocromatina constitutiva rica em CG e que, provavelmente, esta se mantém conservada em ambos os genótipos. No híbrido diploide, foram observadas apenas duas bandas relacionadas às RONS, enquanto que na *A. sisalana* foram verificadas cinco bandas correspondentes aos mesmos cromossomos, confirmando a pentaploidia nesta última. No entanto, no híbrido, observaram-se bandas CMA<sup>+</sup> em um par de cromossomos pequenos, enquanto que, na *A. sisalana*, apenas três cromossomos apresentaram estas bandas (Fig. 3). Uma hipótese para este dado é que, provavelmente, possa ter ocorrido quebra e perda de segmentos cromossômicos, ou ainda perda completa dos cromossomos portadores desses blocos, o que reforçaria a ausência de alguns cromossomos no cariótipo total da *A. sisalana*. Infelizmente não há, na literatura, estudos com o sisal que possam ser confrontados com estes dados de coloração CMA/DAPI.

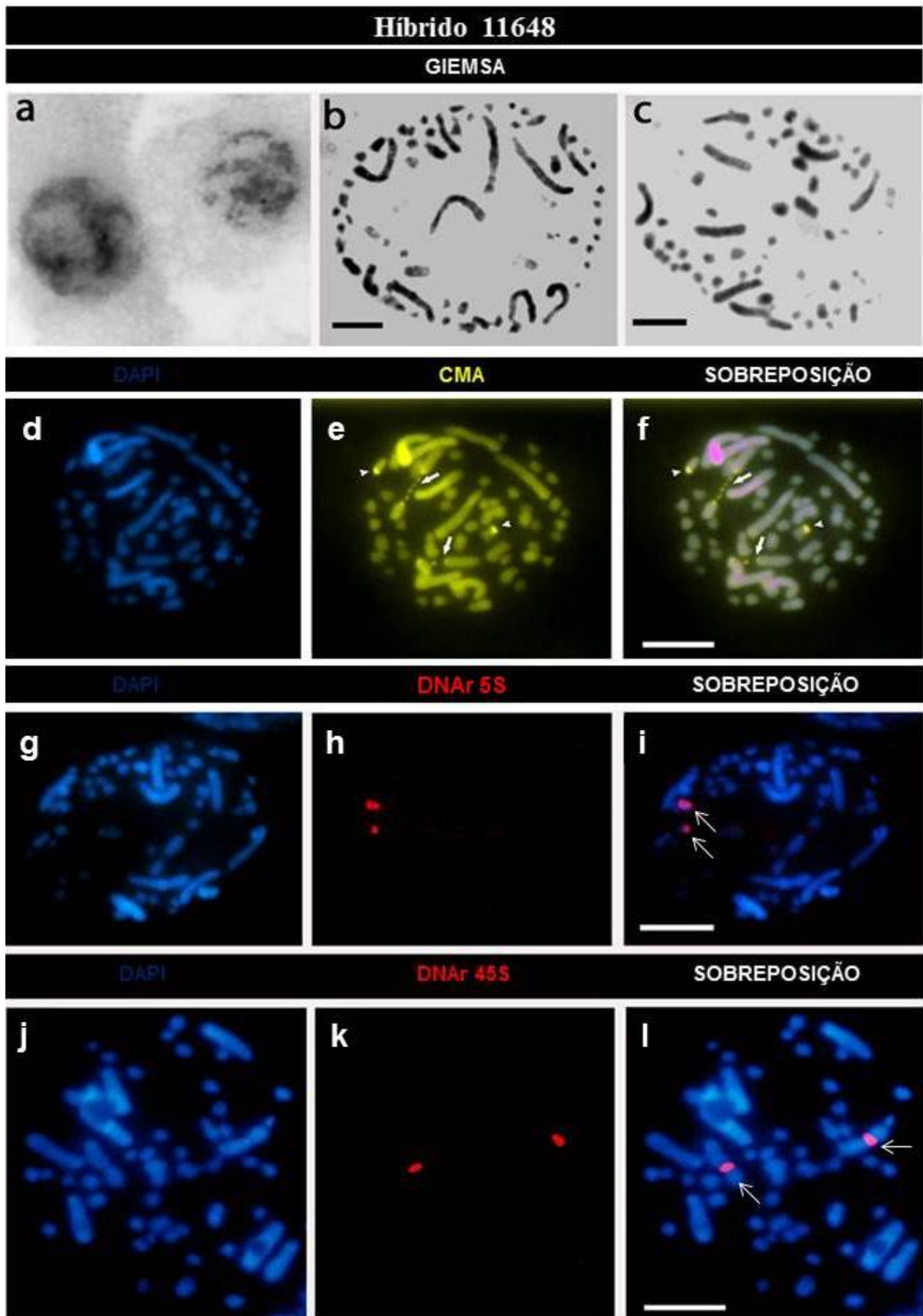
O uso da FISH é de extrema importância na análise de cariótipos pelo fato de fornecer novas informações sobre a posição e o número de loci de DNAr que ajudam na reconstituição da formação dos híbridos importantes em programas de melhoramento, bem como na elucidação dos eventos evolutivos que causam mudanças na dinâmica e estrutura dos genomas.

A FISH revelou que o híbrido 11648 e a espécie *A. sisalana* compartilham posições similares para os sítios de DNAr 5S e 45S, havendo variação apenas no número de sítios entre os dois genótipos, o que está relacionada apenas à diferença na quantidade do número básico de cromossomos do genoma do gênero que cada um possui. Enquanto o híbrido possui dois sítios de DNAr 5S, localizados na região terminal do braço curto de um par de cromossomos acrocêntricos pequenos, a espécie *A. sisalana* apresenta cinco sítios em região análoga em cinco cromossomos homeólogos. Uma análise com essa mesma técnica realizada em três espécies diplóides de *Agave* com  $2n = 60$ ; *A. tequilana* Weber, 1902 'Azul', *A. cupreata* Trelease et Berger, 1915 e *A. angustifolia* Haworth, 1812, mostrou que o DNAr 5S foi localizado em ambos os braços de um par de cromossomos (GOMEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

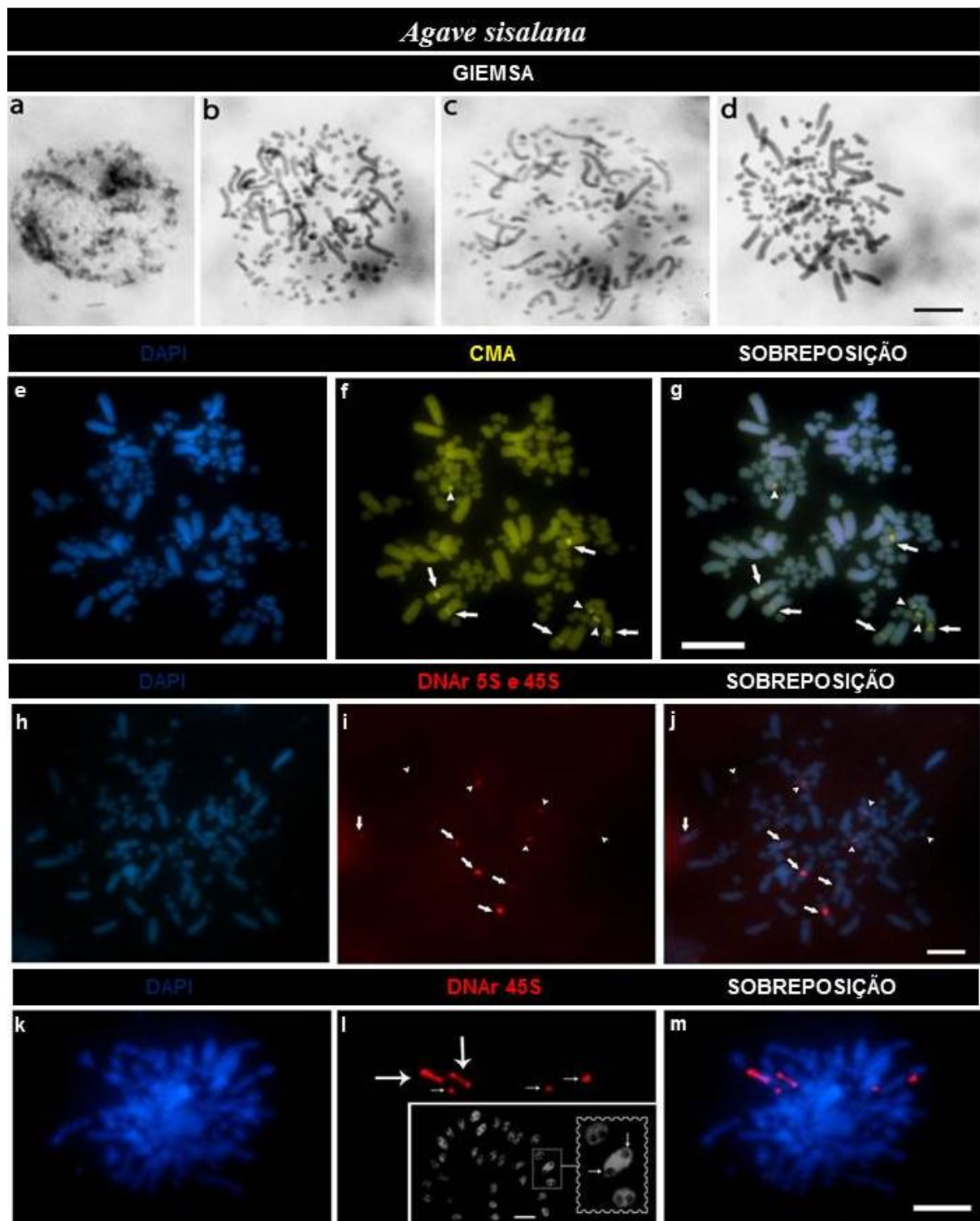
A sonda de DNAr 45S, revelou, no híbrido, dois sítios localizados na região intersticial dos braços longos de dois cromossomos acrocêntricos grandes, já na

espécie *A. sisalana*, foi revelado cinco sítios, porém, três destes parecem apresentar inativação por apresentarem-se sempre condensados nos estágios de prófase a prometáfase (Fig. 2m, 2p). Os outros dois sítios de DNAr 45S apresentaram-se sempre como regiões descondensadas, possivelmente relacionadas às RONS ativas e correlacionadas ao número de nucléolos gerados durante a intérfase, não havendo, portanto diferença no número de nucléolos entre os dois genótipos (Fig. 2o).

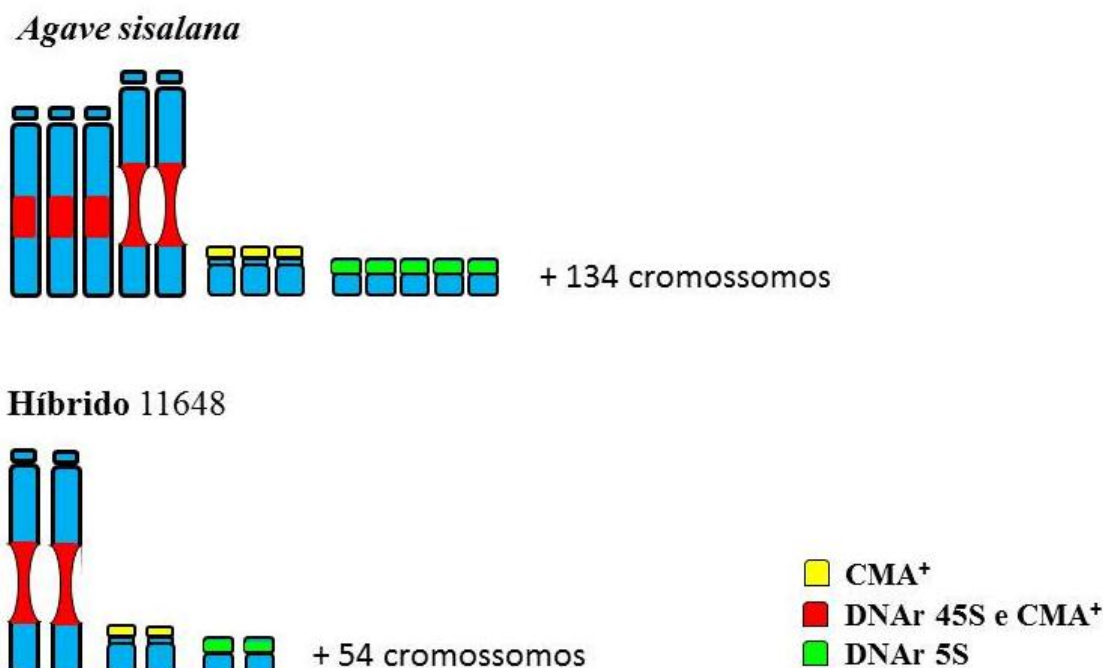
Este fenômeno parece ser uma estratégia de rearranjo cromossômico para compensar a quantidade de sítios extras no pentaplóide e manter a mesma proporção de produção de RNAr, sendo comumente chamado de dominância nucleolar nos híbridos interespecíficos. Entretanto, no híbrido estudado no presente trabalho não houve, aparentemente, silenciamento de quaisquer umas das RONS pelo fato de dois nucléolos serem observados na intérfase. Estudos futuros, utilizando anticorpos contra histonas modificadas típicas de silenciamento e ativação das RONS, deverão ser úteis para o esclarecimento dos principais eventos envolvidos na formação e manutenção das RONS no sisal.



**Figura 1** – Complemento cromossômico do híbrido 11648. **a, b, c** – Núcleos interfásicos, prófase e metáfase revelados por Giemsa. **d, e, f** - Coloração CMA/DAPI revelando quatro bandas ricas em GC. **h, i** – FISH evidenciando dois sítios de DNAr 5S. **k, l** - FISH evidenciando dois sítios de DNAr 45S. Barras = 10μm, objetiva de 100x.



**Figura 2** – Complemento cromossômico de *Agave sisalana*. **a, b, c, d** – Núcleos interfásicos, prófase e metáfase revelados por Giemsa. **f, g** - Coloração CMA/DAPI revelando oito bandas ricas em GC. Setas apontam bandas CMA+ em cromossomos pequenos; cabeças de seta apontam bandas CMA+ relacionadas a RONS em cromossomos grandes. **i, j** – FISH evidenciando cinco sítios 45S (setas) e cinco sítios 5S (cabeças de seta); **l** – inserto evidenciando número de RONS em núcleos interfásicos. Em **l**, as setas maiores apontam as constrições secundárias ativas e as setas menores apontam RONS inativas e nucléolos. Barra em **d, g, j, m** = 10µm, objetiva de 100x. Barra em **l** = 10µm, objetiva de 40x.



**Figura 3.** Comparação esquemática da configuração das bandas CMA<sup>+</sup> e dos sítios de 45S e 5S entre *Agave sisalana* e o híbrido 11648.

## Conclusão

Tanto o híbrido 11648 como a espécie *A. sisalana* compartilham de marcadores similares em cromossomos homeólogos para as bandas de CMA<sup>+</sup> e para os sítios de DNAr 5S e 45S, havendo variação apenas no número total de cromossomos e no número de marcas entre os dois genótipos devido ao nível de ploidia.

Com base no uso de anticorpos contra histonas modificadas para H3S10f, foi possível concluir que não existem cromossomos metafásicos no grupo de cromossomos grandes, como citado por outros autores.

Os resultados apresentados fornecem informações importantes para a construção de um mapa físico para o gênero *Agave*, utilizando bandas de CMA<sup>+</sup> e a localização dos sítios de DNAr 5S e 45S, além de outros marcadores citogenéticos o qual poderá ser útil em programas de melhoramento genético do sisal.

**REFERÊNCIAS**

ALVES, Maria Odete; SANTIAGO, Eduardo Girão; LIMA., Antonio Renan Moreira. **Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro do Nordeste brasileiro**. Fortaleza, CE: BDN, 2005. 90 p. 2 v. (Documentos do ETENE, 04). Disponível em: <[http://www.bnb.gov.br/projwebren/exec/livroPDF.aspx?cd\\_livro=11](http://www.bnb.gov.br/projwebren/exec/livroPDF.aspx?cd_livro=11)>. Acesso em: 05 mar. 2014.

BNB, Banco do Nordeste do Brasil S/A. **Sisal: Problemas técnicos**. Fortaleza, Ce: BNB, 1959. 2 v. 295 p.

BRAMMER, Sandra Patussi. A citogenética e o melhoramento de plantas. **Jornal da Ciência: e-mail**, [s.l.], 30 out. 2008. Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detailhe.jsp?id=59627>>. Acesso em: 12 abr. 2014.

DOUGHTY, L. R. Chromosome behavior in relation to genetics of *Agave*: I. Seven species of fibre Agaves. **Journal Of Genetics**, [s.l.], v. 2, n. 33, p.197-205, 1936. Disponível em: <<http://www.ias.ac.in/jarch/jgenet/33/197.pdf>>. Acesso em: 13 abr. 2014.

EWUSIE, J.Y.; GHATAK, J. Studies on reproduction and cytology of sisal (*Agave sisalana* Perrine ex engelm.). **Ghana Journal Of Science**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.42-50, 20 jul. 1971. Disponível em: <[http://gains.org.gh/articles/gjs\\_v12\\_1\\_p42\\_50.pdf](http://gains.org.gh/articles/gjs_v12_1_p42_50.pdf)>. Acesso em: 14 jun. 2014.

FAO. **Future Fibres: Sisal**. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/futurefibres/fibres/sisal/en/>>. Acesso em: 01 jul. 2014.

GILL, B. S. The molecular cytogenetics analysis of economically important traits in plants, In: BRANDHAM, P. E.; BENNETT, M. D. **Kew Chromosome Conference IV**, Royal Botanic Gardens, London, 1995. p. 47–53

GOMEZ-RODRIGUEZ, V. M. *et al.* Physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in three species of *Agave* (*Asparagales*, *Asparagaceae*). **Comparative Cytogenetics**, [s.l.], v. 3, n. 7, p.191-203, 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3833743/pdf/CompCytogen-007-191.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2014.

GRANICK, E. B. A karyosystematic study of the genus *Agave*. **American Journal of Botany**, [S.l.], v. 31, n. 5, p.283-298, 1944.

GUERRA, Marcelo. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

GUERRA, Marcelo; SOUZA, Maria Jose de. **Como observar cromossomos**. Ribeirão Preto: Funpec, 2002. 131 p.

GUERRA, M. **FISH, Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184 p.

HAZRA, S. K.; DAS, Sudripta; DAS, A. K. Sisal plant regeneration via organogenesis. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, [s.l.], v. 70, p.235-240, 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1016517617039>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

LINGLING, L. V. *et al.* Determination of chromosomal ploidy in *Agaves* ssp. **African Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 8, n. 20, p.5284-5252, 19 out. 2009. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/65956/53660>>. Acesso em: 11 jun. 2014.

MCKAIN, Michael R. *et al.* Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in agavoideae (asparagaceae). **American Journal Of Botany**, [s.l.], v. 2, n. 99, p.397-406, 2012. Disponível em: <<http://www.amjbot.org/content/99/2/397.full.pdf+html>>. Acesso em: 08 abr. 2014.

MEDINA, Júlio César. **Sisal**. São Paulo, Sp: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1954. 286 p.

MOREIRA, José de Alencar Nunes; VIEIRA, Robson de Macêdo. Melhoramento genético do sisal. In: SILVA, Odilon Reny Ribeiro Ferreira da; BELTRÃO, Napoleão Esberard de Macêdo (Ed.). **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, Df: Embrapa, 1999. Cap. 6. p. 93-109.

PEDROSA, A. et al. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. **Genetics Society of America**, Bethesda, v. 161, p.1661–1672, 2002.

PALOMINO, Guadalupe *et al.* Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. **Caryologia**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.37-46, 2003. Disponível em: <[http://www.caryologia.unifi.it/past\\_volumes/56\\_1/Caryologia\\_Vol\\_56\\_037-046.pdf](http://www.caryologia.unifi.it/past_volumes/56_1/Caryologia_Vol_56_037-046.pdf)>. Acesso em: 25 maio 2014.

PALOMINO, Guadalupe; MARTÍNEZ, Javier; MÉNDEZ, Ignacio. Karyotype studies in cultivars of *Agave tequilana* Weber. **Caryologia**, [s.l.], v. 61, n. 2, p.144-153, 2008. Disponível em: <[http://www.caryologia.unifi.it/past\\_volumes/61\\_2/1470.pdf](http://www.caryologia.unifi.it/past_volumes/61_2/1470.pdf)>. Acesso em: 29 jun. 2014.

QUEIROZ, Sandra Regina de Oliveira Domingos *et al.* Análise cromossômica em bulbilhos de sisal (*Agave* spp.) cultivados em diferentes municípios baianos, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana - Ba, v. 26, n. 4, p.842-848, out./dez. 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-33062012000400013&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-33062012000400013&script=sci_arttext)>. Acesso em: 07 mar. 2014.

ROBERT, Manuel L. *et al.* Wild and agronomically important *Agave* species (Asparagaceae) show proportional increases in chromosome number, genome size, and genetic markers with increasing ploidy. **Botanical Journal Of The Linnean Society**, [s.l.], v. 158, n. 2, p.215-222, 25 set. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8339.2008.00831.x/abstract>>. Acesso em: 30 maio 2014.

SALGADO, Antônio Luiz de Barros; CIARAMELLO, Dirceu; AZZTNI, Anísio. MELHORAMENTO DE AGAVE POR HIBRIDAÇÃO. **Bragantina: Revista científica do instituto agrônomo**, Campinas, v. 38, n. 1, p.1-6, jan. 1979. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v38n1/01.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2014.



SANTOS, Robson de Andrade; BRANDÃO, Welinton. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica: Sisal.** Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio\\_sisal/arvore/CONT000ghou0b0002wx5ok05vadr1fx7pyzy.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000ghou0b0002wx5ok05vadr1fx7pyzy.html)>. Acesso em: 13 maio 2014.

SATÔ, Dyûhei. Analysis of the karyotypes in *Yucca*, *Agave* and the related genera with special references to the phylogenetics significance. **The Japanese Journal Of Genetics**, Tokyo, v. 11, n. 5, p.272-278, nov. 1935. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs1921/11/5/11\\_5\\_272/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs1921/11/5/11_5_272/_pdf)>. Acesso em: 12 abr. 2014.

SCHWARZACHER, T. Mapping in plants: progress and prospects. **Curr. Opin. Genet. Dev**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.868-874, dez. 1994.

SCHWEIZER, D. E.; AMBROS, P. F. Chromosome banding: stain combinations for specific regions. In: GOSDEN, J. R. (Ed.). **Methods in molecular biology: Chromosome analysis protocols**. Humana Press, v. 29, 1994. p. 97-112.

SILVA, Odilon Reny Ribeiro Ferreira da; BELTRÃO, Napoleão Esberard de Macêdo. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, Df: Embrapa, 1999. 205 p.

SILVA, Odilon Reny Ribeiro Ferreira da *et al.* Estudo comparativo de algumas características de *Agave sisalana* Perrine e do híbrido 11648, na primeira colheita. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande - PB, v. 3, n. 2, p.65-70, maio/ago. 1999. Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br/ojs/index.php/RBOF/article/view/210/218>>. Acesso em: 08 maio 2014.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: Organization and Function**. [S.L]: Blackwell Science, 2003.

WANZENBÖCK, E. M.; SCHÖFER, C.; SCHWEIZER, D.; BACHMAIR, A. Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require up-stream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*.

**Plant J**, [S.l.]. v. 5, n. 11, p.1007-1016, may 1997.

WENDEL, Jonathan F. Genome evolution in polyploids. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, p.225-249, 2000. Disponível em: <[http://download.bion.com.cn/upload/month\\_0908/20090803\\_eeccf86c6bf09251cd92Sz6FhyJuyqjj.attach.pdf](http://download.bion.com.cn/upload/month_0908/20090803_eeccf86c6bf09251cd92Sz6FhyJuyqjj.attach.pdf)>. Acesso em: 05 jun. 2014.