



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MELHORAMENTO GENÉTICO DE  
PLANTAS

VIVIANE MOREIRA LIMA GALVÃO

**Distribuição da heterocromatina em acessos do gênero *Agave* L.**

Recife – PE

2017

VIVIANE MOREIRA LIMA GALVÃO

**Distribuição da heterocromatina em acessos do gênero *Agave* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, na área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas (PPGAMGP), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Reginaldo de Carvalho

Recife-PE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

G182d Galvão, Viviane Moreira Lima  
Distribuição da heterocromatina em acessos do gênero *Agave* L. /  
Viviane Moreira Lima Galvão. – 2017.  
47 f. : il.

Orientador: Reginaldo de Carvalho.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Melhoramento  
Genético de Plantas, Recife, BR-PE, 2017.  
Inclui referências e anexo(s).

1. Heterocromatina 2. Citogenética 3. Poliploidia 4. Cariótipo  
bimodal I. Carvalho, Reginaldo de, orient. II. Título

CDD 581.15

**DISTRIBUIÇÃO DA HETEROCROMATINA EM ACESSOS DO GÊNERO AGAVE L.**

**VIVIANE MOREIRA LIMA GALVÃO**

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 07 / 03 /17

---

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho  
Orientador – UFRPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Christina Brasileiro Vidal  
UFPE

---

Dr. José Jaime Vasconcelos Cavalcanti  
EMBRAPA ALGODÃO

**Recife  
2017**

## DEDICATÓRIA

Aos meu pais, que proveram a base para o  
meu crescimento pessoal e profissional,

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente aos meu pais que sempre me apoiaram e me incentivaram a dar o melhor de mim.

A Rafael Cavalcanti, pelas palavras de conforto e incentivo, e pelo companheirismo nas horas mais difíceis.

Ao meu colega de pós-graduação Ricardo Valadares, e por poder contar sempre com sua ajuda, tanto nos estudos quanto nas questões burocráticas e à minha colega Jacilene Santana, pela pessoa agradável e pelas horas de estudo necessária para o êxito com as disciplinas.

Aos meus colegas de trabalho David, Genialdo, Horace, Silmar, Lamonier, Angélica e Vanessa pela amizade e pela boa companhia que vocês sempre proporcionaram, fazendo com que os dias no laboratório fossem sempre divertidos e agradáveis.

A todos os meus professores, pelas boas aulas ministradas, e por sempre exemplos competência e profissionalismo.

Ao coordenador Edson Ferreira, que sempre me ajudou e me tirou do sufoco quando precisei.

Ao meu orientador Reginaldo de Carvalho por toda a sua ajuda e paciência.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

---

O gênero *Agave* L. pertence à família *Asparagaceae* e compreende cerca de 200 espécies. O principal interesse econômico é em relação a produção de fibra vegetal dura de baixo custo, utilizadas em vários setores da economia, e extraída, principalmente, das espécies *Agave sisalana*, conhecida como sisal e *A. fourcroydes*, conhecida como henequém. A maioria dos estudos citogenéticos em *Agave* tem sido realizados com base apenas em técnicas convencionais, sendo os trabalhos com bandeamento cromossômico consideravelmente reduzidos. Alguns estudos genômicos recentes mostram que a quantidade de DNA repetitivo em *Agave* correspondem a cerca de 70%. Contudo, a utilização de fluorocromos base-específicos e a hibridização *in situ* com sondas de DNA 5S e 45S, têm revelado uma quantidade de heterocromatina muito reduzida em relação ao tamanho do genoma. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o cariótipo de quatro acessos de *Agave* provenientes do banco de germoplasma da EMBRAPA buscando, principalmente, localizar regiões cromossômicas heterocromáticas. Para isso utilizou-se a técnica convencional, de bandeamento C e os fluorocromos cromomicina A<sub>3</sub> (CMA) e 4,6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). A coloração convencional revelou que o híbrido RN e o híbrido Tanzânia são diploides com ( $2n = 60$ ), *A. fourcroydes* é um tetraploide ( $2n = 120$ ) e o acesso Sisal ornamental é um pentaploide ( $2n = 150$ ). Os cromossomos apresentam condensação cromossômica irregular. A dupla coloração com CMA/DAPI revelou variação na quantidade e localização de bandas CMA<sup>+</sup>. Entre os acessos, foram quatro bandas CMA positivas em *A. fourcroydes* apenas em cromossomos grandes, quatro bandas nos híbrido RN e híbrido Tanzânia em cromossomos grandes e pequenos, e oito bandas em Sisal Ornamental em cromossomos grande e pequenos. O padrão de bandas C foi semelhante em número e localização, ao padrão de CMA<sup>+</sup>. Contudo, pequenos *dots* heterocromáticos foram visualizados pela técnica de banda C no híbrido Tanzânia. Essas pequenas marcas não foram evidenciadas pelos fluorocromos e nem citados na literatura em outros estudos. Tanto o bandeamento cromossômico com CMA/DAPI, quanto a técnica de bandeamento C contribuíram para a diferenciação dos acessos.

**Palavras-chave:** Bandeamento C, Citogenética, Poliploidia, Cariótipo bimodal

## ABSTRACT

---

The genus *Agave* L. belongs to the family *Asparagaceae* and comprises about 200 species. The main economic interest is in relation to the production of low cost hard fiber, used in various sectors of the economy, and extracted mainly from the species *Agave sisalana*, known as sisal and *A. fourcroydes*, known as henequen. The main economic interest is in relation to the production of low cost hard fiber, used in various sectors of the economy, and extracted mainly from the species *Agave sisalana*, known as sisal and *A. fourcroydes*, known as henequen. Most of the cytogenetic studies in *Agave* have been carried out based only on conventional techniques, with the work with chromosome banding considerably reduced. Some recent genomic studies show that the amount of repetitive DNA in *Agave* corresponds to about 70%. However, the use of base-specific fluorochromes and in situ hybridization with 5S and 45S DNA probes have revealed a much reduced amount of heterochromatin relative to the size of the genome. The objective of this work was to characterize the karyotype of the four accesses of *Agave* from the germplasm bank of EMBRAPA, mainly to locate heterochromatic chromosomal regions. For this the conventional technique of C-banding and the fluorochromes cromomycin A3 (CMA) and 4, 6 'diamidino-2-phenylindole (DAPI) were used. Conventional staining revealed that the RN hybrid and the Tanzania hybrid are diploids with ( $2n = 60$ ), *A. fourcroydes* is a tetraploid ( $2n = 120$ ) and the ornamental Sisal access is a pentaploid ( $2n = 150$ ). The chromosomes have irregular chromosome condensation. The double staining with CMA / DAPI revealed variation in the amount and location of CMA<sup>+</sup> bands. Among the accessions were four CMA positive bands on *A. fourcroydes* only on large chromosomes, four bands on RN and Tanzania hybrids on large and small chromosomes, and eight bands on Sisal Ornamental on large and small chromosomes. The C-band pattern was similar in number and location to the CMA<sup>+</sup> standard. However, small heterochromatic dots were visualized by the C-band technique in the Tanzania hybrid. These small marks were not evidenced by the fluorochromes and nor mentioned in the literature in other studies. Both the CMA/DAPI chromosomal banding and the C banding technique contributed to the differentiation of the accessions.

**Keywords:** C banding, Cytogenetics, Polyploidy, Bimodal karyotype



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II

<b>Tabela. 1.</b> Relação dos acessos estudados de <i>Agave</i> , proveniência, números cromossômicos observados e contagens prévias.....	37
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

**Figura 1.** Algumas características botânicas do gênero *Agave*. **A.** Folha tipo linear (*Agave augustifolia*); **B.** Folha tipo lanceolada (*Agave attenuata*); **C.** Inflorescência tipo paniculada (subgênero *Agave*), **D.** Inflorescência tipo espigada (subgênero *Litsea*), **E e F.** Fruto do *Agave* com forma capsular, oblonga e trilobular. **G e H.** Sementes férteis e estéreis de *Agave*, respectivamente.....17

### Capítulo II

**Figura 2.** Células mitóticas coloridas convencionalmente com Giemsa 2%. **A.** Metáfase - híbrido RN ( $2n=60$ ), **B.** Prometáfase - *Agave fourcroydes* ( $2n=120$ ), **C.** Metáfase - híbrido Tanzânia ( $2n=60$ ), **D.** Metáfase - Sisal Ornamental ( $2n=150$ ). Inseto em **B** mostra os tipos de condensação proximal, terminal e intercalar, respectivamente. Pontilhado em **B** indica a região organizadora de nucléolo (RON) distendida. Setas em **C** mostram as constrições secundárias. Inseto em **D** mostra núcleo interfásico semi-reticulado. Barra representa  $10\mu\text{m}$ .....38

**Figura 3.** Dupla coloração com fluorocromos CMA/DAPI em acessos de *Agave*. híbrido RN ( $a'-a''$ ), híbrido Tânzania ( $b'-b''$ ), *Agave fourcroydes* ( $c'-c''$ ), Sisal Ornamental ( $d'-d''$ ). Setas apontam bandas intersticiais de  $\text{CMA}^+$ . Cabeça de seta apontam bandas terminais de  $\text{CMA}^+$  Barra corresponde a  $10\mu\text{m}$ .....40

**Figura 4.** Bandeamento C em cromossomos mitóticos. **A.** híbrido RN, **B.** *Agave fourcroydes*, **C.** híbrido Tanzânia, **D.** Sisal ornamental. Cabeças de setas indicam os blocos heterocromáticos. Setas em **C** indicam pequenos dots heterocromáticos. Barra representa  $10\mu\text{m}$ .....41

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I .....	12
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1 Classificação e características botânicas do gênero <i>Agave</i> .....	15
2.2 Distribuição geográfica e centro de origem do gênero <i>Agave</i> .....	17
2.3 Importância econômica .....	18
2.4 Melhoramento genético .....	19
2.5 Citogenética do gênero <i>Agave</i> .....	20
2.6 Heterocromatina e bandeamento cromossômico .....	21
3. REFERENCIAS .....	23
CAPÍTULO II .....	27
RESUMO .....	28
INTRODUÇÃO .....	29
MATERIAL E MÉTODOS .....	30
RESULTADOS .....	32
DISCUSSÃO .....	33
CONCLUSÃO .....	36
REFERÊNCIAS.....	42

## CAPÍTULO I

---

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Agave* L. pertence a família *Asparagaceae* Juss. compreendendo cerca de 200 espécies (GARCIA-MENDONZA, 2007). Tem origem na Mesoamérica, sendo o México considerado o principal centro de diversidade. São plantas xerófitas com ciclo de vida perene, cujas propriedades são conhecidas desde épocas pré-hispanicas, exploradas como alimento, na fabricação de bebidas e na extração de fibra vegetal. Espécies de *Agave* têm sido extensivamente cultivadas nos trópicos e subtropicais em países como Indonésia, Filipinas e Brasil como planta ornamental e, principalmente como fonte de fibra vegetal dura extraída de suas folhas (GENTRY, 1982).

Dentre as espécies mais cultivadas para esse fim pode-se destacar a *Agave fourcroydes*, conhecida como henequem, e *Agave sisalana* Perrine, conhecida como sisal, sendo esta última a principal espécie cultivada no Brasil (SILVA et al., 2008). A fibra do sisal constitui a maior parte das fibras duras naturais destinadas para o comércio e tem sido utilizada, principalmente, para a fabricação de cordas, redes de pesca, malha para engessamento de tetos, redes, tapetes, sacos, tecidos industriais e esteiras, além de ser usada como preenchimento em carros e estofados (SILVA, 2008). A partir da década de 1930, o sisal passou a ser explorado como uma alternativa econômica no Brasil que, atualmente, é o maior produtor e exportador mundial da fibra bruta e de outros produtos manufaturados (CONAB, 2015).

O *Agave* é um gênero poliploide, com número cromossômico básico  $x = 30$ , (PALOMINO et al., 2003). Embora existam alguns trabalhos citogenéticos recentes, utilizando fluorocromos CMA/DAPI e hibridização *in situ* na caracterização cromossômica (GOMEZ-RORIGUEZ et al., 2013; RAMOS, 2014), a maioria desses tem sido realizados com base na coloração convencional, que permite identificar apenas variação no número de cromossomos o tamanho dos braços, posição dos centrômeros e localização das constrições secundárias, cujo nível de informação tende a ser limitado (MEDINA, 1954; PALOMINO et al., 2008; PALOMINO et al., 2012). A identificação de genomas a nível citogenético é de grande importância para os programas de melhoramento de plantas, visto que auxilia na distinção de espécies e variedades presentes nos bancos de germoplasmas.

Atualmente, técnicas de bandeamento cromossômico também podem ser usadas estrategicamente na produção de dados para subsidiar os programas de melhoramento de plantas (BRAMMER et al., 2007). A técnica de bandeamento-C é

normalmente empregada para evidenciar regiões de heterocromatina constitutiva, e constitui uma ferramenta citogenética importante para caracterização de espécies vegetais, proporcionando a identificação dos cromossomos homólogos e de genomas de diferentes espécie e variedades de plantas, bem como a identificação de algumas variações estruturais (GUERRA, 1988; MELO, 2009).

Bildanova et al. (2004), analisando banda C em híbridos de cevada x trigo obtidos por meio de retrocruzamentos sucessivos, observaram que estes possuíam regiões heterocromáticas de *Triticum aestivum*.

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar o cariótipo de quatro acessos do gênero *Agave* L. do banco de germoplasma da Embrapa Algodão, com a finalidade de investigar padrão de distribuição de heterocromatina através da técnica de bandeamento C e da dupla coloração com fluorocromos CMA/DAPI, a fim de identificar os diferentes genótipos dentro do banco de germoplasma e com isso fornecer informações que possam ser úteis aos programas de pré-melhoramento genético dessa espécie.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Classificação e características botânicas do gênero *Agave*

Filogeneticamente, o gênero *Agave* Linnaeus, 1753 é classificado como uma Monocotiledônia, pertencente ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Asparagales, família *Asparagaceae*, subfamília *Agavoidea*, e de acordo com o tipo de inflorescência, se divide em dois subgêneros: *Agave* e *Litsea*, apresentando aproximadamente 200 espécies (GARCÍA-MENDOZA, 2007; APG III, 2009).

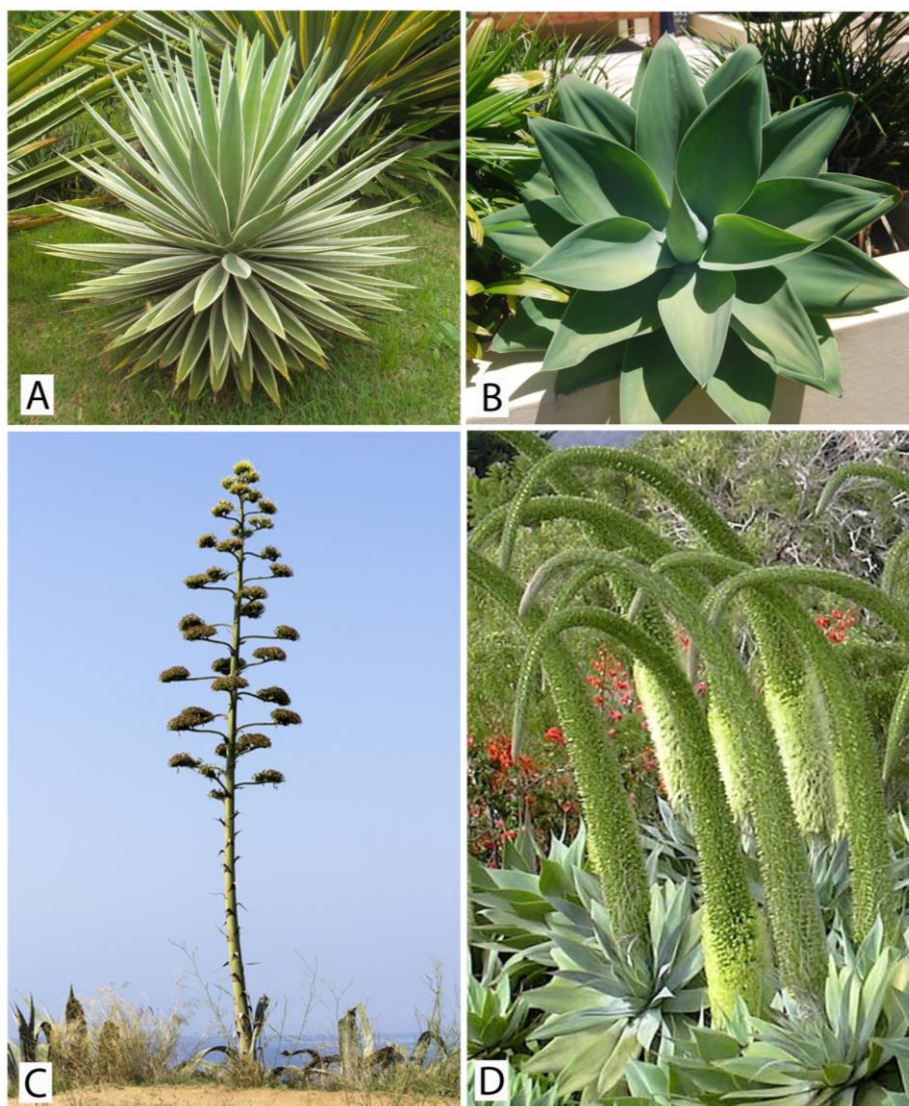
As espécies de *Agave* são plantas xerófitas, perenes, de hábito herbáceo e escapo floral saliente que pode atingir 12 metros de altura ou mais. As folhas, que variam de linear a lanceoladas são suculentas, fibrosas, com uma base dilatada e carnosa. Estas crescem dispostas em espiral, no ápice de um tronco, formando uma roseta, cuja a quantidade pode variar de 10 a 200 folhas. Quase sempre apresentam um espinho na ponta das folhas que podem medir desde milímetros até cinco centímetros de comprimento. A coloração das mesmas se apresentam em tons que variam do verde escuro ao violeta (GENTRY, 1982; GARCÍA-MENDOZA, 2007).

As raízes emergem da base do tronco e são compostas por dois tipos: as fixadoras e as alimentadoras. As fixadoras atingem entre 2 a 4 mm de diâmetro, crescem de 10 a 25 cm de profundidade, são de coloração amarronzada e possuem a função de fixação e sustentação da planta. Já as alimentadoras possuem menor diâmetro, de 1 a 2 mm, são mais superficiais, cuja função é a absorção da água da chuva e nutrientes do solo (GENTRY, 1982; SILVA et al., 2008)

A reprodução pode ser por via sexuada ou assexuada. Na reprodução sexuada, os morcegos nectívoros são os principais polinizadores, seguido pelos insetos. O pedúnculo floral pode atingir de 6 a 8 metros e emitem de 20 a 40 ramos dando origem à inflorescência que pode ser do tipo paniculada (subgênero *Agave*) ou espigada (subgênero *Litsea*). Cada ramo produz cerca de 40 flores hermafroditas, as quais possuem coloração branca ou ligeiramente amareladas. A planta é monocárpica, ou seja, florescem apenas uma vez durante o ciclo vegetativo, morrendo posteriormente. Quanto à reprodução assexuada, novos clones podem se originar tanto de perfilho que crescem da base do tronco, quanto de bulbilhos que se desenvolvem no pedúnculo floral. Quando as flores começam a murchar, esses bulbilhos caem no chão e se enraízam gerando novas plantas. Com

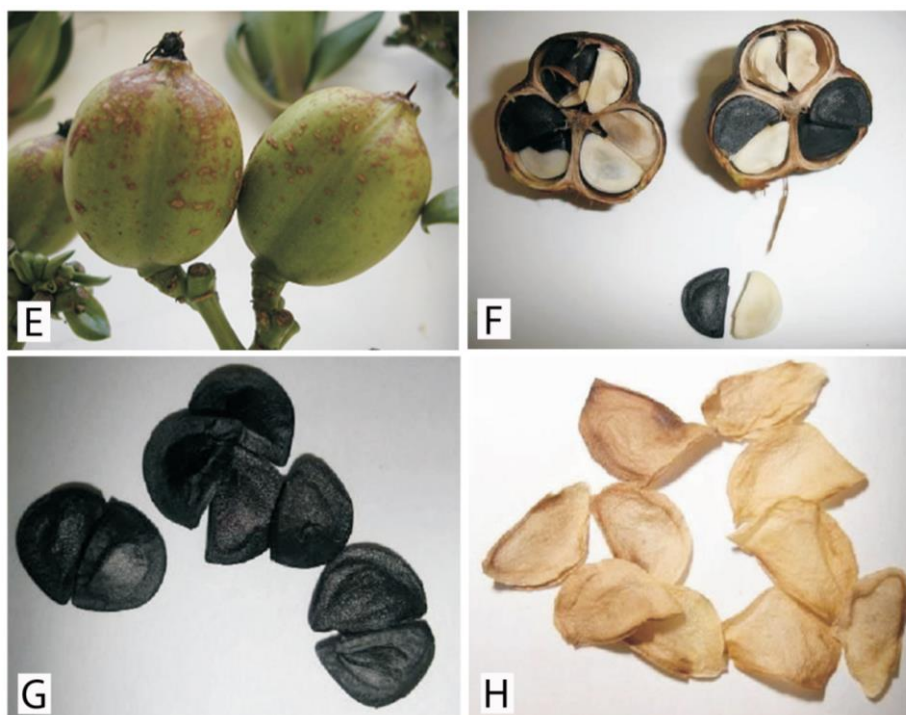
isso, apesar de ser frequente a reprodução sexuada, a reprodução assexuada ocorre em maior abundância, pois, a produção de clones permite uma maior capacidade de dispersão (GENTRY, 1982; GARCÍA-MENDONZA, 2007; SILVA et al., 2008).

Os frutos são de forma capsular, oblonga, trilocular, com pericarpo rígido, medindo 3 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, de cor verde e consistência carnosa nos estágios iniciais; quando amadurecem, seis meses depois que a flor é polinizada, passam a ter coloração preta. As sementes, localizadas no interior do fruto, são delgadas, de tonalidade preta, lustrosa e de forma triangular; as estéreis são de cor branca (GENTRY, 1982; GARCÍA-MENDONZA, 2007; SILVA et al., 2008).



Cont.





**Figura 1:** Algumas características botânicas do gênero *Agave*. **A.** Folha tipo linear (*Agave augustifolia*); **B.** Folha tipo lanceolada (*Agave attenuata*); **C.** Inflorescência tipo paniculada (subgênero *Agave*), **D.** Inflorescência tipo espigada (subgênero *Littaea*), **E e F.** Fruto do *Agave* com forma capsular, oblonga e trilocular. **G e H.** Sementes férteis e estéreis de *Agave*, respectivamente.

Fonte: **A.** (<http://terracotajardinagem.com.br>); **B.** (<http://www.plantsrescue.com/agave-attenuata/>); **C.** (<http://www.rgbstock.com.br/photo/oMH0y6c/Agave+flor+espiga>); **D.** ([www.floresefolhagens.com.br/agave-dragao-agave-attenuata](http://www.floresefolhagens.com.br/agave-dragao-agave-attenuata)), **E, F, G e H.** EMBRAPA (<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/17804/1/CIRTEC127.pdf>)

## 2.2. Distribuição geográfica e centro de origem do gênero *Agave*

O gênero *Agave* L. é originário da Mesoamérica, e sua distribuição vai desde o sul dos Estados Unidos até a Colômbia e Venezuela. Os países que apresentam um maior número de táxons são México, Estados Unidos, Cuba e Guatemala (GARCÍA-MENDOZA, 2002).

O México é considerado o centro de origem e diversidade do gênero *Agave*. Das aproximadamente 200 espécies, cerca de 150 espécies são encontradas no território mexicano, onde 111 das 150 espécies são endêmicas do país, cujo o alto grau de endemismo se deve a heterogeneidade do território e às propriedades intrínsecas de cada táxon, como, por exemplo, plasticidade genética, tolerância

ecológica, capacidade de germinação e dispersão, bem como interações bióticas com outros organismos (GARCÍA-MENDOZA, 2007).

A alta diversidade ocorre, principalmente, nas províncias árida e semiáridas do centro e norte do país como Serranías Meridionales del centro de México, Sierra Madre Occidental, Altiplano mexicano, península de Baja California e Sierra Madre Orientale e pode desenvolver-se em um grande número de habitats desde o nível do mar até 3000 metros de altitude (GARCÍA-MENDOZA, 2007). A abundância de espécies ocorre desde vales e planícies até colinas e encostas pedregosas. São especialmente encontrado em convívio com diferentes tipos de vegetação, como a vegetação xerófita, pastagens, matagais, bosques, entre outras. (GARCÍA-MENDOZA, 2007; GARCÍA-HERRERA, 2010).

A difusão das espécies de *Agave* para países do Velho Mundo ocorreu por meio do Hispânicos e Portugueses, depois do descobrimento das América, e mais precisamente, depois da conquista do México (GENTRY, 1982). Espécies de *Agave* para fins ornamentais e utilização de suas fibras foram as primeiras a serem transportadas para o exterior. Como exemplo, podemos citar a *Agave americana* Linnaeus, levada para Açores e Ilhas Canárias; *A. augustifolia* Haworth e *A. cantala* (Haw.) Roxb. ex Salm-Dyck, levadas para Ásia e África. Na Europa, o gênero se tornou popular como planta ornamental em jardins públicos e privados, enquanto que na Indonésia e Filipinas, a principal utilização da *Agave* foi na indústria de fibras, extraídas principalmente da espécie *A. sisalana* Perrine (GENTRY, 1982).

### **2.3. Importância econômica do gênero *Agave***

Muitas espécies de *Agave* são consideradas de grande importância econômica. Suas propriedades são conhecidas desde épocas remotas pelos primitivos habitantes do México, quando povos indígenas encontraram nestas plantas uma fonte de matéria prima para a fabricação de diversos produtos, sendo também utilizados como fonte de alimento, na fabricação de forragem e bebidas alcoólicas, bem como planta ornamental pela sua beleza e rusticidade. Contudo, o principal interesse comercial do gênero é em relação a produção de fibra vegetal dura de baixo custo, extraída, principalmente, das espécies *A. sisalana*, conhecida como sisal e *Agave fourcroydes* Lamaire, conhecida como henequém (SILVA E BELTRÃO, 1999; SUINAGA et al, 2006; MONDIN; EGGERS; FERREIRA, 2010).

No Brasil, a *A. sisalana*, conhecida como sisal, é a principal espécie cultivada e foi introduzida no país por volta de 1903, pelo agrônomo Horáceo Urpia Júnior, trazida provavelmente da Flórida (OASHI, 1999; SILVA; BELTRÃO, 1999). No entanto, o sisal somente passou a ser visto como alternativa econômica no final de 1930, tendo sido introduzido nos estados da Paraíba, Bahia e Rio Grande do Norte, em virtude das condições climáticas propícias para o seu desenvolvimento (ALVES; SANTIAGO; LIMA, 2005). De acordo com os dados do Comitê Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015), o Brasil é o maior produtor e importador mundial de sisal no mundo, cujas exportações totalizaram 66,2 mil toneladas. A Tanzânia fica em segundo lugar, com produção de 40 mil toneladas em 2015, seguido do Quênia, que exportou 21 mil toneladas nesse mesmo ano (BURITE, 2016). O estado da Bahia é responsável pela quase totalidade (cerca de 90%) dessa produção no país, seguido pelos estados da Paraíba, Ceará e Rio Grande do Norte, sendo a maior parte da fibra destinada para o mercado externo tanto na forma bruta, quanto na forma manufaturada (CONAB, 2015).

A fibra do sisal possui coloração creme e mede entre 1 a 1,5 m de comprimento, tendo uma série de aplicações, como na fabricação de vassouras, sacos, bolsas, chapéus, barbantes, cordas, capachos e tapetes, bem como a 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, 2008). Além disso, as fibras podem ser utilizadas no artesanato; no enfardamento de forragens; cordas de várias utilidades inclusive navais. A fibra do sisal também é utilizado na produção de estofados; pasta para indústria de celulose; produção de tequila; tapetes decorativos; remédios; biofertilizantes; ração animal; adubo orgânico e sacarias (SILVA, 2008). As fibras podem ser utilizadas também na indústria automobilística, substituindo a fibra de vidro (ANDRADE et al, 2011).

#### **2.4. Melhoramento genético do Sisal**

Apesar de muitas espécies de *Agave* serem economicamente importantes, a *A. sisalana* é a espécie comercialmente mais importante. Suas características agrônômicas, como quantidade e qualidade de fibra, têm permanecido constantes devido à propagação por via assexuadas, através de bulbilhos e rebentos (AZZINI et al, 1989).

A técnica de induzir artificialmente a produção de sementes, utilizada por Medina (1954) e Kirby (1963), subsidiaram os trabalhos de melhoramento realizados posteriormente por Allen (1971), Ciaramello et al. (1975) e Salgado et al. (1979), resultando na obtenção de híbridos de sisal com características agrônômicas e tecnológicas diferenciadas e produção agrícola superiores ao sisal comum, como é o caso do híbrido 11.648, conhecido e cultivado mundialmente.

Nesse sentido, a reprodução sexuada favorece a variabilidade genética, e o aproveitamento da rara frutificação e produção de sementes de forma natural ou artificial constitui recurso essencial para desenvolvimento de genótipos promissores, que possam ser utilizados pelo melhoramento genético (GONDIM E SOUZA, 2009).

Num programa de melhoramento de sisal, os objetivos que se pretende alcançar são: produção prolífica de folhas com ausência de espinhos marginais, folhas longas e pesadas, com alta percentagem de fibras por folha e que seja de boa qualidade, resistência à seca, pragas e doenças (MOREIRA; VIEIRA, 1999).

## **2.5. Citogenética do gênero *Agave***

Estudos citogenético realizados em diferentes espécies do gênero *Agave* tem confirmado que o número cromossômico básico é  $x=30$  (PINKAVA; BACKER, 1985). A maioria das espécies são diploides, porém eventos de poliploidia são comumente observados, e os níveis de ploidia podem variar desde a diploidia ( $2x=60$ ) até a octaploidia ( $8x=240$ ) (PALOMINO et al., 2003, SIMPSON, 2011). O cariótipo é bimodal e tem sido considerado altamente conservado dentro do gênero. A conservação desse cariótipo tem sido relacionada a um tipo de processo evolutivo chamado “ortoseleção”, que resulta na uniformidade do número básico e da morfologia dos cromossomos (MORENO-SALAZAR et al., 2007).

Os cromossomos são divididos em dois grupos distintos frequentemente descritos como pequenos e grandes ( $n = P + G$ ), onde o conjunto diploide ( $2n = 60$ ) apresenta cinco pares de cromossomos grandes e 25 pares de cromossomos pequenos (PALOMINO et al., 2008). Lingling et al. (2009), em um estudo sobre níveis de ploidia, relataram a existência de cromossomos largos, médios e pequenos em dois dos 19 acessos analisados. Porém, o comprimento dos cromossomos não foi mensurado, comprometendo a veracidade da informação e tornando a classificação de largos, médios e pequenos, puramente subjetiva.

Embora existam alguns trabalhos citomoleculares recentes, utilizando bandeamento cromossômico com fluorocromos CMA/DAPI e hibridização *in situ* na caracterização cromossômica (ROBERT et al., 2008; GOMEZ-RORIGUEZ et al., 2013; RAMOS, 2014), a maioria desses tem sido realizados com base somente na coloração convencional, que permite identificar apenas variação no número de cromossomos, o tamanho dos braços, posição dos centrômeros e localização das constrições secundárias, cujo nível de informação tende a ser limitado (MEDINA, 1954; MUNIRA et al., 2010; PALOMINO et al., 2012).

A caracterização cromossômica por meio de técnicas mais refinadas pode possibilitar uma descrição clara da homologia cariotípica de uma determinada cultivar ou variedade, permitindo que esses dados sejam inclusos nos esquemas de cruzamento e retrocruzamento, contribuindo para maximizar seleção de progênes, ou ainda, determinar níveis percentuais dos genomas parentais nos indivíduos híbridos (MELO, 2009).

Duas técnicas bastante utilizadas na caracterização cromossômica é o bandeamento cromossômico com fluorocromos CMA/DAPI e o bandeamento C, ambos possibilitam uma análise mais detalhada das regiões de heterocromatina constitutiva (SUMNER, 1990), sendo utilizada no pareamento dos cromossomos homólogos e diferenciação de genomas de diferentes espécies e variedades de plantas, bem como a identificação de variações estruturais (GUERRA, 2000; MELO, 2009).

## **2.6. Heterocromatina e Bandeamento cromossômico**

A heterocromatina é uma das regiões do genoma que compõe a cromatina dos cromossomos eucarióticos, juntamente com a eucromatina (FEITOZA; GUERRA, 2011). De acordo com a revisão de Brown (1966), a heterocromatina pode ser classificada como heterocromatina facultativa e heterocromatina constitutiva.

A heterocromatina constitutiva está presente em todos os cromossomos do cariótipo, tanto de animais como de plantas, estando associada a ela uma série de características importantes como manter-se condensada durante todo o ciclo celular, apresentar replicação tardiamente na fase S, bem como uma quase ausência de atividade gênica e a presença de sequências repetitivas de DNA (FENG; MICHAELS, 2015).

Esse tipo de heterocromatina pode ser evidenciada em blocos ou bandas através de diversas técnicas de bandeamento que coram diferencialmente estas regiões em relação ao resto dos cromossomos, como, por exemplo, bandeamento Q, R, G, que produzem bandas ou faixas ao longo de toda a extensão do cromossomo, e por bandeamento C, NOR e fluorocromos CMA e DAPI, que marcam regiões específicas de alguns cromossomos ou de todos os cromossomos. (BRAMMER et al.,2007).

O bandeamento cromossômico tem favorecido a análise cariotípica de várias espécies, permitindo a comparação dos cromossomos dentro e entre espécies do mesmo gênero, sendo importante na identificação de híbridos interespecíficos e dos cromossomos de cada espécie, no pareamento de homólogos e na detecção de variações estruturais. Em estudos evolutivos, favorece a observação de transformações que ocorrem em grupos de espécies próximas que apresentam cariótipos semelhantes (BRAMMER et al.,2007).

A técnica de bandeamento-C e coloração com fluorocromos são as mais utilizadas na identificação e no estudo da distribuição de blocos de heterocromatina no cariótipo de espécies vegetais (BRAMMER et al., 2007). Moscone et al. (1993), utilizando a técnica de banda C, conseguiu diferenciar seis espécies de *Capsicum* com base no padrão de distribuição de blocos heterocromáticos, sendo esta técnica importante ferramenta na cariossistemática do gênero.

Bauchan e Hossain (1997) analisaram o cariótipo de duas subespécies de *Medicago* por meio de técnica de bandeamento C, revelando que *Medicago sativa falcata* apresenta bandas centroméricas, enquanto que *Medicago sativa caerulea*, além de bandas centroméricas, apresenta também bandas teloméricas, indicando que o bandeamento C pode identificar híbridos provenientes do cruzamento desses dois parentais. Bildanova et al (2004), analisando banda C em híbridos de cevada x trigo obtidos por meio de retrocruzamentos sucessivos, observaram que estes possuíam regiões heterocromáticas de *Triticum aestivum*.

O bandeamento C pode auxiliar também na identificação de polimorfismo. Buittenduk et al., (1998) analisaram 43 acessos de *Astroemeria aurea*, *A. ligtu* e *A. magnifica*, e identificaram polimorfismos intra e interespecífico, assim como Lauresen e Seberg (2001) verificaram que, por meio do bandeamento C, quatro acessos de *Elumus scabrifolius* apresentaram padrões de bandas muito divergentes.

As técnicas de bandeamento com fluorocromos tem sido bastante utilizada em cromossomos de plantas e são capazes de evidenciar regiões específicas dos

cromossomos, que podem ser determinantes na identificação de variações estruturais. Os fluorocromos mais utilizados em citogenética vegetal são a cromomicina A3 (CMA) usada na identificação de regiões ricas em guanina e citosina (GC), o 4', 6 diamidino-2-fenilindol (DAPI) e o Hoechst 33258, utilizados na identificação de regiões ricas em adenina e timina (AT).

O emprego dos fluorocromos CMA e DAPI no bandeamento cromossômico de *Citrus* tem contribuído para a compreensão das relações evolutivas do gênero (MORAES et al., 2007). Os cromossomos das espécies de *Citrus* apresentam grandes blocos de heterocromatina ricas em CG, e sua localização permitiu classificar os cromossomos em grupos bem definidos. Com isso, foi possível compreender aspectos históricos e origem de vários cultivares de *Citrus* (CORNÉLIO et al., 2003; MORAES et al., 2007), bem como diferenciar o cariótipo de vários acessos, incluindo diversos gêneros relacionados a *Citrus* (GUERRA et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2007).

No gênero *Manihot*, a utilização do bandeamento com CMA/DAPI conseguiu diferenciar o cariótipo de *M. reniformis* e *M. reflexifolia*, pois essa última apresenta uma par de cromossomos corados com CMA<sup>+</sup> nas duas regiões telomérica. Isso permitiu o reconhecimento de híbridos interespecíficos proveniente do cruzamento da duas espécies (SANTOS, 2016).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, D. J. Control of zebra-disease of *Agave* hybrids by breeding for resistance to *Phytophthora* spp. **PANS**, 17 v.1, p. 42-46, 1971.
- ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. G.; LIMA, A. R. M. **Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro do nordeste brasileiro**. Banco do Nordeste – FO, 2005, 90p.
- ANDRADE, R.; ORNELAS, J.; BRANDÃO, W. A situação atual do sisal na Bahia e suas novas possibilidades de utilização e aproveitamento. **Revista Bahia Agrícola**, v. 9, n. 1, 2011.
- APG III. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 161, p. 105–121, 2009.
- AZZINI, A. et al. Caracterização tecnológica de híbridos de sisal. **Bragantia**, 48, v. 1, p. 113-124, 1989.
- BAUCHAN, G. R.; HOUSSAIN, M. A. Karyotypic analysis of C-Banded chromosomes of diploid alfafa. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 88, n. 6, p. 533-537, 1997.

- BILDANOVA, L. L. et al. Molecular study and C-banding of chromosomes in common wheat alloplasmic lines obtained from the backcross progeny of barley-wheat hybrids *Hordeum vulgare* L. ( $2n=14$ ) x *Triticum aestivum* L. ( $2n=42$ ) and differing in fertility. **Russian Journal of Genetics**, v. 40, n. 12, p. 1383-1391, 2004.
- BRAMMER, S. P et al. Citogenética vegetal: da era clássica à molecular. **Documentos online**, n. 85, 2007.
- BROWN, S. W. Heterochromatin. **Science**, v. 151, n. 3709, p. 417-425, 1966.
- BURITE, J. Tanzânia quer ultrapassar Brasil como maior produtora de sisal. <https://economia.uol.com.br/noticias/bloomberg/2016/04/07/tanzania-quer-ultrapassar-brasil-como-maior-produtora-de-sisal.htm>
- CIARAMELLO, D.; CASTRO, G.A.P. & PETINELLI, A. *Agave*. **Bragantia**, 34, p. 195-203, 1975.
- CONJUNTURA ESPECIAL. Sisal 2015: retrospectiva, **Conab**, 2015.
- CORNÉLIO M T M N, FIGUEIRÔA A R S, SANTOSK G B, CARVALHO R, SOARES FILHO W S and GUERRA M Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata*, Blanco, its hybrids and related species. **Plant Syst Evol** 240:149-61, 2003
- FENG, W., MICHAELS, S. D. Accessing the Inaccessible: The organization, Transcription, replication, and repair of heterochromatin in plants. *Annu. Rev. Genet.* v. 49, p. 439-59. 2015.
- GARCÍA-HERRERA, E. J. et al El genero *Agave* spp. En México: principales usos de importanciasocioeconómica y agroecológica. **VIII Simposium-Taller Nacional y 1er Internacional “Producción y Aprovechamiento del Nopal**, 2010
- GARCÍA-MENDOZA, A.. “Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and its endemic species in Mexico”, en **Cactus and Succulent Journal (US)**, núm. 74, pp. 177-187, 2002.
- GARCÍA-MENDOZA, A. Los Agaves del Mexico. **Ciencias**, v. 87, 2007.
- GENTRY, H, S. **Agaves of continental North America**. The University of Arizona Press, 1982
- GOMEZ-RODRIGUEZ, V. M et al. Physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in three species of *Agave* (Asparagales, Asparagaceae). *Comparative Cytogenetics*, v. 7, n. 3, p. 191–203, 2013.
- GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1988, 142p.
- GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.
- GUERRA, M.; SOUSA, M. J. de **Como observar cromossomos** – Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002, 191p.
- HIZUME M, OHGIKU A AND TANAKA A (1989) Chromosome banding in the genus *Pinus* II. Interspecific variation offluorescent banding patterns in *P. densiflora* and *P. thunbergii*. *Bot Mag Tokyo* 102:25-36.



- KIRBY, R.H. *Agave* family. In: **Vegetable fibres**. New York, Interscience, p.217-265, 1963.
- LAURESEN, I. B. L; SEBERG, O. L. E. Karyotypes of *Elymus scabrifolius* (Poaceae: Triticeae) from South America studied by banding techniques and *in situ* hybridization. **Hereditas**, v. 135, p. 41-51, 2001.
- LINGLING, L. V. et al. Determination of chromosomal ploidy in *Agave* ssp. African Journal of Biotechnology, v. 8 (20), p. 5248-5252, 2009
- MEDINA, J. C. **Sisal**. São Paulo, Sp: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1954. 286 p.
- MELO, C. A. F. **Estudo citogenético e molecular em nove espécies do gênero *Solanum* L. (Solanaceae A. Juss)**. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado).
- MORAES A P, SOARES-FILHO W S and GUERRA M Karyotype diversity and origin of grapefruit. **Chrom Res** 15:115-121, 2007.
- MOREIRA, J. A. N; VIEIRA, R. M. Melhoramento genético do sisal. In. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Campina Grande, EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa do Algodão, 1999, 205p.
- MOSCONE E A, LAMBROU M, HUNZIKER A T and EHRENDORFER GiemsaC-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Syst Evol** 186:213-229, 1993.
- MORENO-SALAZAR, S. F. et al. Tamaño del genoma y cariotipo en *Agave angustifoliay A. Rhodacantha* de sonora, México. **Rev. Fitotec. Mex.** v. 30 (1), p. 13 – 23, 2007
- MUNIRA, S.; UD-DEEN, M.; KABIR, G. Quantitative karyotype analysis of *Agave americana* L. and *A. striata* Zucc. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 39, n. 2, p. 229-235, 2010.
- OASHI, M. C. G. Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisas e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba, 1999. Dissertação (Mestrado)
- PALOMINO, G. et al. Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. **Caryologia**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.37-46, 2003.
- PALOMINO, G; MARTÍNEZ, J.; MÉNDEZ, I. Karyotype studies in cultivars of *Agave tequilana* Weber. **Caryologia**, v. 61, n. 2, p. 44-153, 2008
- PALOMINO, G. et al. Nuclear genome size and cytotype analysis in *Agave cupreata* Trel. & Berger (Agavaceae). **Caryologia**, v. 65, n. 4, p. 281–294, 2012.
- PINKAVA, D. J. AND. BAKER, M. A. Chromosome and Hybridization Studies of Agaves. 1985.
- ROBERT, M. 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, v. 158, p. 215–222, 2008.
- RAMOS, L. C. Análise citogenética comparada em sisal (entre o híbrido 11648 e *Agave sisalana* Perrine) 2014, 49 f. Dissertação (Mestrado).

- SALGADO, A.L.B.; CIARAMELLO, D. & AZZINI, A. Melhoramento de *Agave* por hibridação. *Bragantia*, Campinas, 38, p. 1-6, 1979.
- SANTOS, A. S. Identificação de híbridos naturais do gênero *Manihot* a partir de técnicas de anatomia foliar, biologia molecular e citogenética. 2016. Dissertação (Mestrado).
- SIMPSON, J. Genomic resources and transcriptome mining in *Agave tequilana*. *GCB Bioenergy* , v. 3, p. 25–36. 2011.
- SILVA, O. R. R. F. et al. **Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro**. Circular Técnica123. Embrapa Agodão. Campina Grande, Paraíba, 2008.
- SILVA, O. R. R. F.; BELTRÃO, N. E. M. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, Df: Embrapa, 1999. 205 p.
- SUINAGA, F. A.; et al. **Cultivo de sisal na região semi-árida do Nordeste brasileiro**.Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006, 42 p.
- SUMNER A T **Chromosomes: organization and function**. Blackwell Publishing Company, Berlin, 2003, 287 p.
- YAMAMOTO M, ABEKENAR A A, MATSUMOTO M, NESUMI H, YOSHIDA T, KUNIGA T, KUBO T and TOMINAGA. CMA banding patterns of chromosomes in major citrus species. *J Jpn Soc Hortic Sci* 76, p. 36-40, 2007.

## CAPÍTULO II

---

**Distribuição da heterocromatina em quatro acessos de *Agave* pela técnica de bandeamento C e coloração com CMA/DAPI**

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

## Distribuição da heterocromatina em acessos de *Agave* L. pela técnica de bandeamento C e coloração com CMA/DAPI

Viviane Moreira Lima Galvão<sup>1</sup>, José Jaime Vasconcelos Cavalcanti<sup>2</sup>, Reginaldo de Carvalho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Laboratório de Citogenética Vegetal. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, Brasil.

### Resumo

O gênero *Agave* L. apresenta grande importância econômica, sendo fonte de fibra vegetal dura utilizada na fabricação de cordas, tapetes entre outros. Citogeneticamente, apresentam número básico  $x=30$  e cariótipo bimodal, cujos estudos com base em badeamento cromossômico constituem uma ferramenta importante na identificação do conjunto cromossômico de cada espécie e de seus híbridos interespecíficos, no pareamento de homólogos e na detecção de variações estruturais. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi analisar quatro acessos do gênero *Agave* L. por meio de caracterização cariotípica das regiões de heterocromatina. Com base nas técnicas de coloração convencional, bandeamento C e dupla coloração com os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI. Os híbridos RN e Tanzânia foram diploides, com  $2n = 60$  cromossomos, *A. fourcroydes* é tetraploide, com  $2n = 120$  cromossomos enquanto que o Sisal ornamental é um pentaploide  $2n = 150$  cromossomos. Em relação ao padrão de CMA<sup>+</sup>, na espécie *A. fourcroydes* foram observadas quatro bandas intersticiais nos cromossomos grandes. Nos híbridos RN e Tanzânia, foram visualizadas quatro bandas, sendo duas intersticiais em cromossomos grandes e duas terminais em cromossomos pequenos. No acesso Sisal Ornamental, foram observadas oito bandas, sendo cinco bandas intersticiais em cromossomos grandes, e três terminais em cromossomos pequenos. O padrão de banda C corresponde ao padrão observado pela coloração com CMA<sub>3</sub>. No entanto, foram identificadas pequenas bandas (dots) no híbrido Tanzânia. Bandas heterocromáticas, localizadas nos cromossomos grandes correspondem as constrições secundárias. A caracterização citogenética por bandeamento cromossômico foi útil na diferenciação dos quatro acessos de *Agave*.

**Palavras-Chave:** Sisal, Bandeamento C, Poliploidia

## Introdução

O gênero *Agave* L. inclui aproximadamente 200 espécies e é endêmico do continente americano (Garcia-Mendoza, 2002; 2007). O centro de diversidade e domesticação da espécie encontra-se no México, porém, sua distribuição ocorre desde o sul dos Estados Unidos até a Colômbia e Venezuela (GARCÍA-MENDOZA, 2002). As espécies do gênero *Agave* são plantas suculentas, que apresentam uma grande diversidade de formas, cores e tamanhos. Os agaves possuem relevante importância no setor econômico, em decorrência do aproveitamento de todas as partes da planta. Desde tempos pré-hispânicos, essa planta tem sido utilizada como fonte de alimento, bebida, ornamentação, fibra vegetal, etc (García-Herrera, 2010). A extração de fibra vegetal dura das folhas, como matéria prima para a indústria e artesanato, é uma das muitas formas de uso dos agaves e é a que tem gerado as maiores receitas no cenário econômico mundial.

As espécies *Agave sisalana* Perrine e *A. fourcroydes* Lamaire, bem como o híbrido 11648 são as principais fontes fornecedoras de fibra de boa qualidade, a qual é utilizada na confecção artesanal de cordas, redes e tapetes, possuindo também aplicações na indústria automobilística e na construção civil, até na fabricação de subprodutos como a produção de açúcar, papel, bebidas e bioinseticidas (Silva, 2008). No entanto, programas de melhoramento genético tem investido tanto na avaliação de genótipos, como na produção de novos híbridos que atendam às necessidades como aumentar a produção de folhas, fibras de boa qualidade, resistência a doenças e facilidade de colheita e industrialização (Silva e Beltrão, 1999; Suinaga et al, 2007).

Citogeneticamente, o gênero *Agave* se caracteriza por apresentar cariótipo bimodal com um grupo de cromossomos grandes e outro de cromossomos pequenos. No geral, as espécies são diploides, porém, o número de ploidia pode variar de diploide à octaploide (Palomino et al., 2003; Simpson, 2011). O conhecimento do nível de ploidia em um programa de melhoramento é essencial, pois em determinados níveis de ploidia como triploides e pentaploides, há geração de multivalentes na meiose I, provocando separação irregular dos cromossomos e, conseqüentemente, infertilidade (Tamayo-Ordóñez, 2015).

Estudos sobre a distribuição de blocos heterocromáticos por meio do bandamento cromossômico tem favorecido a análise cariotípica de várias espécies, permitindo a comparação dos cromossomos dentro e entre espécies do mesmo

gênero, sendo uma ferramenta importante na identificação de híbridos interespecíficos e dos cromossomos de cada espécie, no pareamento de homólogos e na detecção de variações estruturais. Em estudos evolutivos, favorece a observação de transformações que ocorrem em genomas de espécies próximas que apresentam cariótipos semelhantes (Ortolani, 2007).

As técnicas de bandeamento C e coloração com fluorocromos cromomicina A3 (CMA) (indica região rica em GC) e 4', 6 diamidino-2-fenilindol (DAPI) (indica região rica em AT), são amplamente utilizadas em citogenética vegetal para estudo de heterocromatina. No gênero *Capsicum*, por exemplo, pelo bandeamento C foi possível diferenciar seis espécies, sendo uma ferramenta importante na cariosistemática do gênero (Moscone et al, 1993). Também com base no padrão de distribuição de blocos heterocromáticos e por meio da utilização de fluorocromos CMA e DAPI foi possível compreender relações evolutivas do gênero *Citrus* (Moraes et al, 2007), bem como identificar híbridos interespecíficos entre *Pinus densiflora* e *P. thunbergii* (Hizume et al.,1989).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar citogeneticamente quatro acessos do gênero *Agave*, provenientes da EMBRAPA Algodão, por meio do bandeamento cromossômico com fluorocromos CMA/DAPI e padrão de bandas C, a fim de avaliar possíveis divergências cariotípicas que possam identificar os acessos.

## **Material e Métodos**

- Material vegetal

Exemplares de quatro acessos do gênero *Agave* foram coletados do banco de germoplasma da Embrapa Algodão no Município de Monteiro, PB, e mantidos em vaso no Laboratório de Citogenética Vegetal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Departamento de Genética, UFRPE) para periódicas coletas de raízes.

## **Procedimentos citológicos**

- Pré-tratamento e fixação do material

As pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8HQ) na concentração de 0,002 M, por 4 h à 18°C e fixadas em solução de

metanol-ácido acético glacial (3:1; v/v), por 24 h em temperatura ambiente, e posteriormente foram armazenados a -20 °C num freezer nesta mesma solução, até posterior análise.

- Preparação das lâminas

Para coloração convencional, as pontas de raízes foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em HCl 1N a temperatura ambiente durante 30 min. O meristema foi macerado em solução de metanol-ácido acético glacial (3:1; v/v) e espalhado com uma bomba de ar. A lâmina foi seca em estufa a 60° e coradas com Giemsa 2%.

Para as técnicas de bandeamento C e coloração com fluorocromos CMA e DAPI, as pontas das raízes foram lavadas em água destilada e digeridas em solução de 2% celulase (Onozuka)- 20% pectinase (Sigma) a 37 °C por 3 h. O meristema foi macerado em solução de metanol-ácido acético glacial (3:1; v/v), espalhado com uma bomba de ar, e a lâmina foi seca em estufa a 60°.

- Técnica de bandeamento C

A técnica de bandeamento C foi realizada baseado na metodologia descrita por Schwarzacher et al. (1980). As lâminas, após o envelhecimento de dois dias, foram hidrolisadas em solução de ácido acético a 45% a 60 °C por 10 min, desnaturadas em solução saturada de hidróxido de bário à temperatura ambiente, durante 10 min, renaturada em solução de 2xSSC a 60 °C durante 80 min. Para finalizar as lâminas foram coradas com Giemsa a 3% por 15-30 min e montadas com Entellan ou similar.

- Coloração com fluorocromos: Cromomicina A3 (CMA) e 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

A técnica de coloração com fluorocromos foi baseada na metodologia de Schweizer e Ambros (1994). Após envelhecimento por três dias à temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com 10 µL de CMA (0,5 mg/mL), por 60 min e, em seguida, corada com 10 µL de DAPI (2 g/ml) por 30 min. As lâminas foram montadas em tampão glicerol McIlvaine-glicerol pH 7,0 (1:1) e novamente envelhecidas antes da análise no microscópio de fluorescência.

- Fotodocumentação

A captura das imagens foi feita com câmera digital DC 345FX acoplada a um microscópio Leica DM2500. As imagens foram posteriormente editadas utilizando o programa Adobe Photoshop CS5.

## Resultados

A lista das espécies estudadas, seus respectivos locais de coleta, número cromossômico estão presentes na Tabela 1, e a distribuição da heterocromatina pela técnicas de bandeamento C e dupla coloração com CMA/DAPI está descrita na Tabela 2.

Dos quatro acessos analisados, o híbrido RN e o híbrido Tanzânia são diploides, com número cromossômico  $2n = 60$ , *Agave fourcroydes* é um tetraploide, com  $2n = 120$ , e Sisal Ornamental é um pentaploide,  $2n = 150$ , considerando que o número cromossômico básico para o gênero é  $x = 30$  (Figura 1).

Contrições secundárias foram, principalmente observadas no braço longo de cromossomos grandes (Figura 1B). Quando analisado em prometáfase, os cromossomos apresentaram um padrão de condensação desuniforme, onde foi possível observar condensação do tipo proximal, intercalar (onde se vê mais de um ponto de condensação ao longo no cromossomo) e terminal (Figura 1C). O núcleo interfásico é do tipo semi-reticulado, com a eucromatina parcialmente dispersa e formação de pequenos cromocentros (Figura 1D).

A técnica de bandeamento cromossômico com os fluorocromos cromomicina A3 (CMA3) e 4',6-diamidino-2-phenilindol (DAPI) assim como o bandeamento C foram úteis para diferenciar o cariótipo dos quatro acessos.

A dupla coloração com os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI revelou bandas CMA<sup>+</sup> bem definidas, enquanto que não foram observadas bandas DAPI (Figura 2). Foram observadas algumas diferenças na quantidade e localização da heterocromatina constitutiva entre as espécies analisadas.

Nos híbridos RN e Tanzânia observou-se quatro bandas CMA<sup>+</sup>, sendo duas intersticiais, localizadas no braço longo de um par de cromossomos grandes e duas terminais, localizadas em um par de cromossomos pequenos (Figura 2a-a' e 2b-b').



*Agave fourcroydes* apresentou um padrão de bandas diferente dos demais acessos, com quatro bandas CMA<sup>+</sup> visualizadas, porém, apenas na região intersticial dos cromossomos grandes, diferindo dos outros três acessos por não apresentar bandas em cromossomos pequenos (Figura 2c-c'). Já no acesso Sisal Ornamental, foram observadas oito bandas CMA<sup>+</sup>, sendo cinco nas regiões intersticiais dos braços longo de cromossomos grandes e três bandas terminais nos cromossomos pequenos (Figura 2d-d'). As bandas CMA<sup>+</sup> localizadas nos cromossomos grandes corresponderam, em todos os acessos, às contrações secundárias.

O padrão de bandeamento C revelou uma pequena quantidade de bandas em todos os acessos. Essas bandas corresponderam, em número e localização, às aquelas observadas pela coloração com CMA<sub>3</sub>. Nos híbridos RN e Tanzânia, quatro bandas foram observadas, sendo duas bandas intersticiais, localizadas na região no braço longo de cromossomos grandes e duas terminais, localizadas no braço curto de cromossomos pequenos. O híbrido Tanzânia apresentou uma diferença em relação aos demais acessos. Nele foi possível visualizar pequenos pontos (dots), os quais não foram CMA<sup>+</sup>, em regiões proximais em cromossomos pequenos e terminais em cromossomos grandes que parecem corresponder às regiões pericentroméricas.

Em *Agave fourcroydes*, bandas C foram observadas apenas em regiões intersticiais do braço longo de cromossomos grandes. O Sisal Ornamental apresentou 5 bandas intersticiais no braço longo de cromossomos grandes e 3 bandas terminais no braço curto de cromossomos pequenos.

## **Discussão**

Trabalhos prévios têm relatado acessos de *A. fourcroydes* com cariótipos tanto diploides, com  $2n = 2x = 60$  (Banerjee, 1988), quanto poliploides, com a ocorrência de triploidia ( $2n = 3x = 90$ ) e pentaploidia ( $2n = 5x = 150$ ) (Robert, 2008; Tamayo-Ordonez et al, 2015), porém a tetraploidia foi relatada primeiramente nesse trabalho, bem como o cariótipo dos outros três acessos. Na prometáfase, a região da contração secundária foi semelhante a observada em *Allium*, apresentada por uma clara distensão e formação de uma região satélite que pode ser erroneamente identificada como um cromossomo pequeno (Ünal e Dumam, 2002).

Para o gênero *Agave*, de maneira geral, os estudos citogenéticos têm sido limitados à utilização da coloração convencional (Cave, 1964; Palomino et al, 2010,

Queiroz et al, 2012). Estudos utilizando técnicas citomoleculares foram primeiramente iniciados com os trabalhos de Robert (2008) e Gomez-Rodriguez (2013) empregando a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) no mapeamento de sítios de DNA ribossomal 5S e 45S em algumas espécies de *Agave*. Posteriormente, Ramos (2014), além da FISH, empregou pela primeira vez a técnica bandeamento cromossômico com os fluorocromos base-específica CMA<sub>3</sub> e DAPI na espécie *A. sisalana* e no híbrido 11648, os quais apresentaram 8 e 4 bandas CMA<sup>+</sup>, respectivamente. Estudos empregando a técnica de bandeamento C são inexistentes para o gênero, tendo sido realizado pela primeira vez nesse trabalho.

No presente trabalho, o emprego das técnicas de bandeamento com fluorocromos CMA/DAPI e bandeamento C, permitiu a caracterização qualitativa das bandas heterocromáticas para esses acessos. Nos quatro acessos analisados, a heterocromatina está principalmente concentrada em blocos nas regiões terminais e intersticiais nos cromossomos. Uma característica observada foi que apenas heterocromatina constitutiva, localizada no braço longo dos cromossomos grandes corresponde às constrições secundárias, as quais também são marcadas com sinais de CMA<sup>+</sup>. Esse dado pôde ser confirmado através da análise de localização de sítios de DNA ribossomal 45S (18S, 5.8S e 28S), observados em trabalhos realizados por Robert et al (2008) e Gomez-Rodriguez (2013). Esse sítio constitui a chamada região organizadora de nucléolo (RON), a qual geralmente está presente na constrição secundária.

Os sítios de DNAr 5S observados pelo autor, encontram-se localizados na região terminal de cromossomos pequenos. No entanto, quando comparadas com as bandas CMA<sup>+</sup> situadas nos cromossomos pequenos, pareceu não existir nenhum tipo de relação entre essas duas marcações. Sítios de DNAr 5S co-localizados com a heterocromatina não é comumente observada e pode depender do tamanho do sítio e das características estruturais da cromatina desse sítio (Cabral et al., 2006). Por outro lado, a colocalização de bandas C e/ou CMA<sup>+</sup> com os sítios de DNAr 45S é um fenômeno comumente observado em praticamente todas as plantas (Carvalho et al., 2005; Cabral et al., 2006).

Os híbridos RN e Tânzânia apresentaram padrão de bandas CMA<sup>+</sup> semelhante ao relatado no Híbrido 11648 por Ramos (2014). No entanto, uma pequena diferença foi observada no padrão de banda C do híbrido Tanzânia, que, além dos blocos heterocromáticos, apresentou pequenos pontos (dots) de heterocromatina na região centromérica de alguns cromossomos. Essa

heterocromatina centromérica não apresenta nenhum tipo de marcação pelos CMA/DAPI, sendo possível perceber que a heterocromatina pericêntrica e as bandas C são diferentes tipos de heterocromatina. De acordo com registros da Embrapa (2007), os híbridos RN e Tanzânia são de genealogia desconhecida, e, devido à semelhança, esses resultados podem sugerir que esses híbridos possam provir de cruzamento semelhante ao do híbrido 11.648, ou de cruzamento entre espécies que apresentem um padrão de bandas semelhante aos dos parentais do híbrido 11648, sendo necessário uma investigação mais detalhada.

Quando comparado o padrão de bandas dos quatro acessos, percebeu-se que o número de bandas CMA<sup>+</sup> nos cromossomos grandes variam de acordo com o nível de ploidia. Contudo, quando analisamos o acesso Sisal Ornamental, que é pentaploide, o mesmo não acontece com o número de bandas nos cromossomos pequenos. Esse mesmo resultado, ocorre também para a espécie *A. sisalana*. A escassez de dados na literatura relacionados a padrões de bandas CMA<sup>+</sup> em diferentes espécies e acessos do gênero tem dificultado a interpretação da ausência de bandas em indivíduos pentaploides. Segundo Lock (1962), a espécie *A. sisalana* não é pura geneticamente. No entanto, uma hipótese a ser considerada é de que tanto *A. sisalana*, quanto o Sisal ornamental, tenham surgido de um cruzamento entre um indivíduo hexaploide ( $2n = 180$ ), que apresenta bandas CMA<sup>+</sup> em cromossomos pequenos no seu cariótipo, com um indivíduo tetraploide ( $2n = 120$ ), que só apresentam bandas CMA<sup>+</sup> nos cromossomos grandes. Essa hipótese pode ser suportada pelo fato de que variações do tipo poliploidia são comumente observadas em diferentes espécies como *Agave americana*, *A. sisalana*, *A. augustifolia* e *A. tequilana*, cujo nível de ploidia varia de triploide a octaploide (Banerjee; Sharma, 1989; Lingling et al, 2009; Simpson, 2011). Adicionalmente, essa variação nos níveis de ploidia provavelmente deve estar relacionada às anormalidades de segregação cromossômica relatadas em diferentes estágios de divisão da meiose, ocasionando a formação de micrósporos e megásporos não reduzidos ( $2n$ ) (Doughty 1936; Cave, 1964; Gómez-Rodríguez et al, 2012).

Os quatro acessos apresentaram uma pequena quantidade de blocos heterocromáticos. Esses blocos encontram-se em número e posição semelhantes às marcações de bandas CMA<sup>+</sup>. O núcleo interfásico, após o bandeamento, também revelou uma baixa quantidade de heterocromatina distribuída em pequenos cromocentros. No entanto, dados de análise genômica tem revelado que cerca de 70% do genoma de *Agave* é composto por heterocromatina (Ramos, dados não

publicados). Segundo o autor, uma ampla fração dessa heterocromatina é composta por elementos de transposição da classe dos LTR retrotransposons, que são membros da família de elementos baixos a moderadamente repetitivos, enquanto uma pequena parte está representado por sequências moderadamente e altamente repetitivas, como as bandas C, bandas CMA<sup>+</sup>, bem como o DNA ribossomal 45S e 5S e bandas teloméricas. Em *Agave tequilana*, por exemplo, três dos mais abundantes elementos transponíveis: Ty1-copia, Gypsy and CACTA, são relatados compondo esse genoma, onde Ty1-copia pode chegar a representar um quarto do genoma (Diaz-Martinez, 2012; Khaliq, 2012). Isso explicaria a pequena quantidade heterocromatina visualizada, estando, provavelmente, a maior parte da heterocromatina localizadas em pequenos sítios ao longo dos cromossomos, o quais não foram capazes de ser detectado nem pelo bandeamento C, nem pelo CMA<sub>3</sub>.

## **Conclusão**

A técnica de bandeamento cromossômico com CMA/DAPI, bem como o bandeamento C, foram úteis na caracterização e diferenciação do cariótipo dos quatro acessos analisados. A presença de pequenos dots observados pelo bandeamento no híbrido Tanzânia foi fundamental para diferenciá-la do híbrido RN.

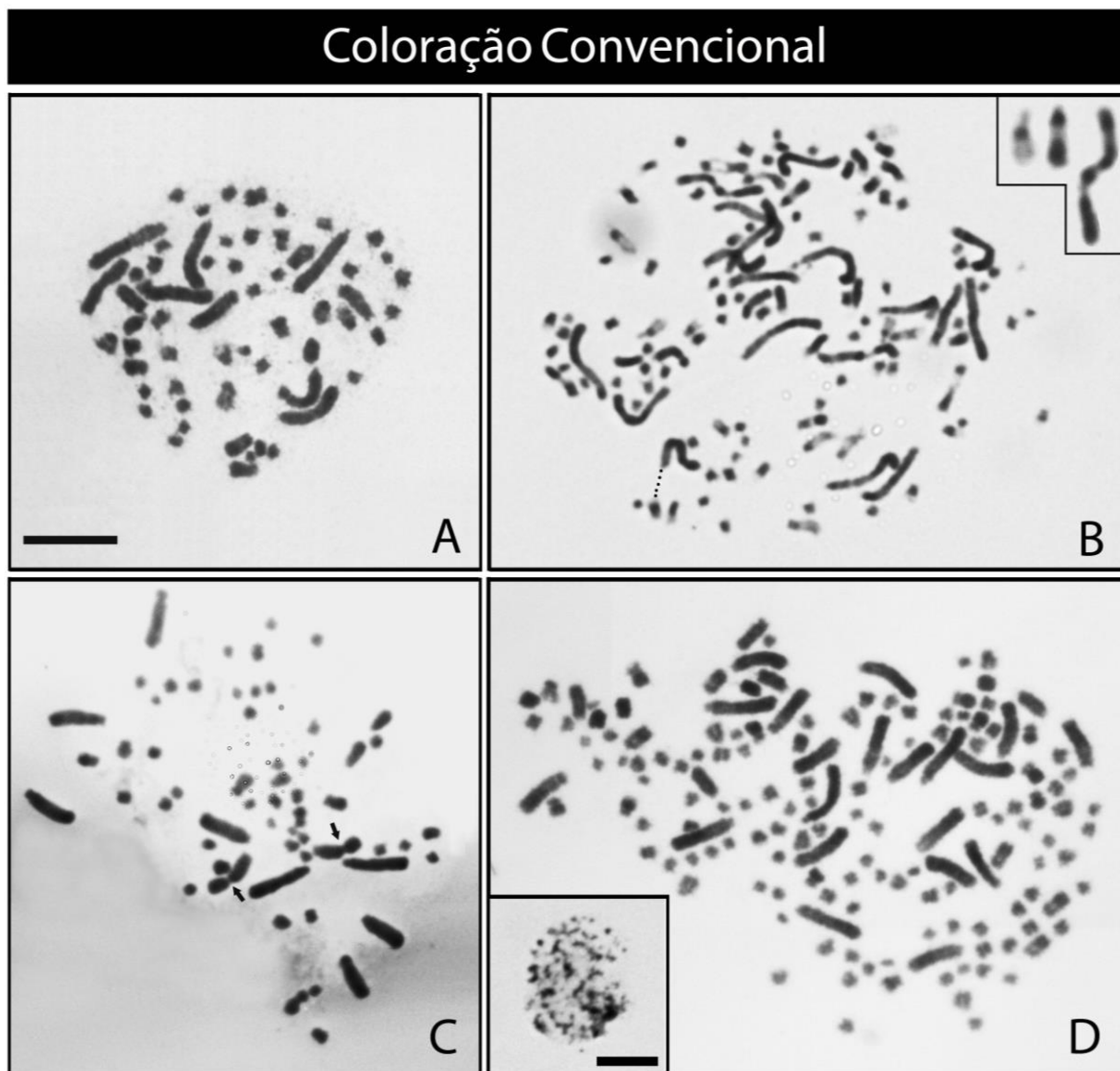
Através dessas, foi possível verificar que espécies do gênero *Agave* apresentaram duas formas distintas de organização da heterocromatina. Em uma das formas, a heterocromatina está localizada exclusivamente no grupo de cromossomos grades (*A. fourcroydes*), enquanto que na outra forma, a heterocromatina está localizada tanto no grupo de cromossomos grandes como no dos pequenos (híbrido RN e Tanzânia e Sisal ornamental) .

Por meio das marcações de bandas CMA, sugerimos tanto em Sisal ornamental, como a espécie *A. sisalana* sejam indivíduos híbridos, e que a pentaploidia observada esteja relacionada a um evento de alopoliploidia.

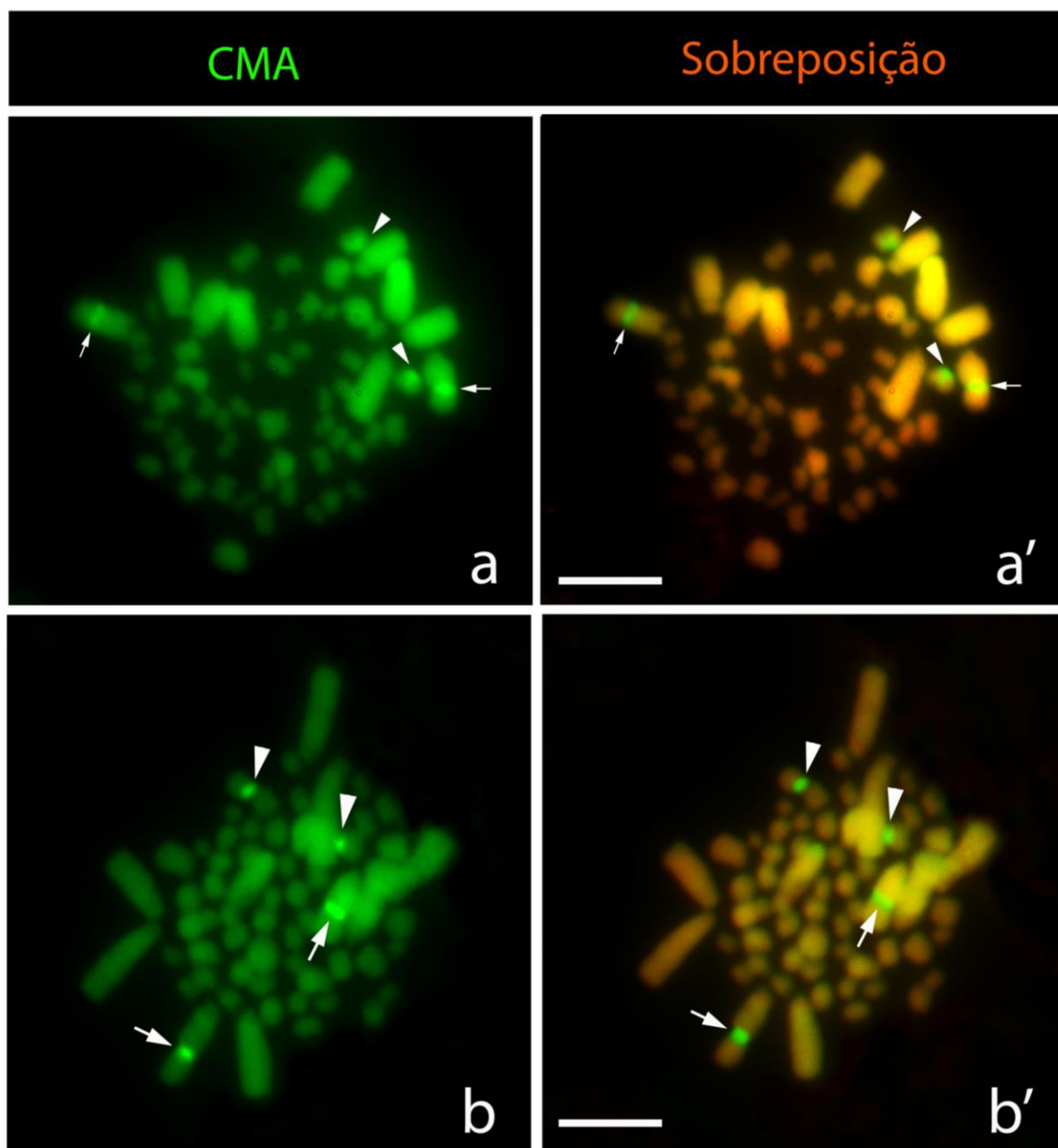
**Tab. 1.** Relação dos acessos estudados de *Agave*, números cromossômicos observados e contagens prévias e distribuição da heterocromatina.

Acessos	2n	CP	Referência	DH	
				Bandas CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>0</sup>	Banda C
Híbrido RN	60	--	--	4 (2 bicg + 2 btcp)	4 (2 bicg + 2 btcp)
Híbrido Tanzânia	60	--	--	4 (2 bicg + 2 btcp)	4 (2 bicg + 2 btcp) + pequenos dots
<i>Agave fourcroydes</i>	120	2n = 60	Banerjee (1988)	4 bicg	4 bicg
		2n = 90	Robert et al. (2008) Tamayo-Ordóñez et al. (2015)		
		2n = 150	Robert et al. (2008) Tamayo-Ordóñez et al. (2015)		
Sisal Ornamental	150	--	--	8 (5 bicg + 3 btcp)	8 (5 bicg + 3 btcp)

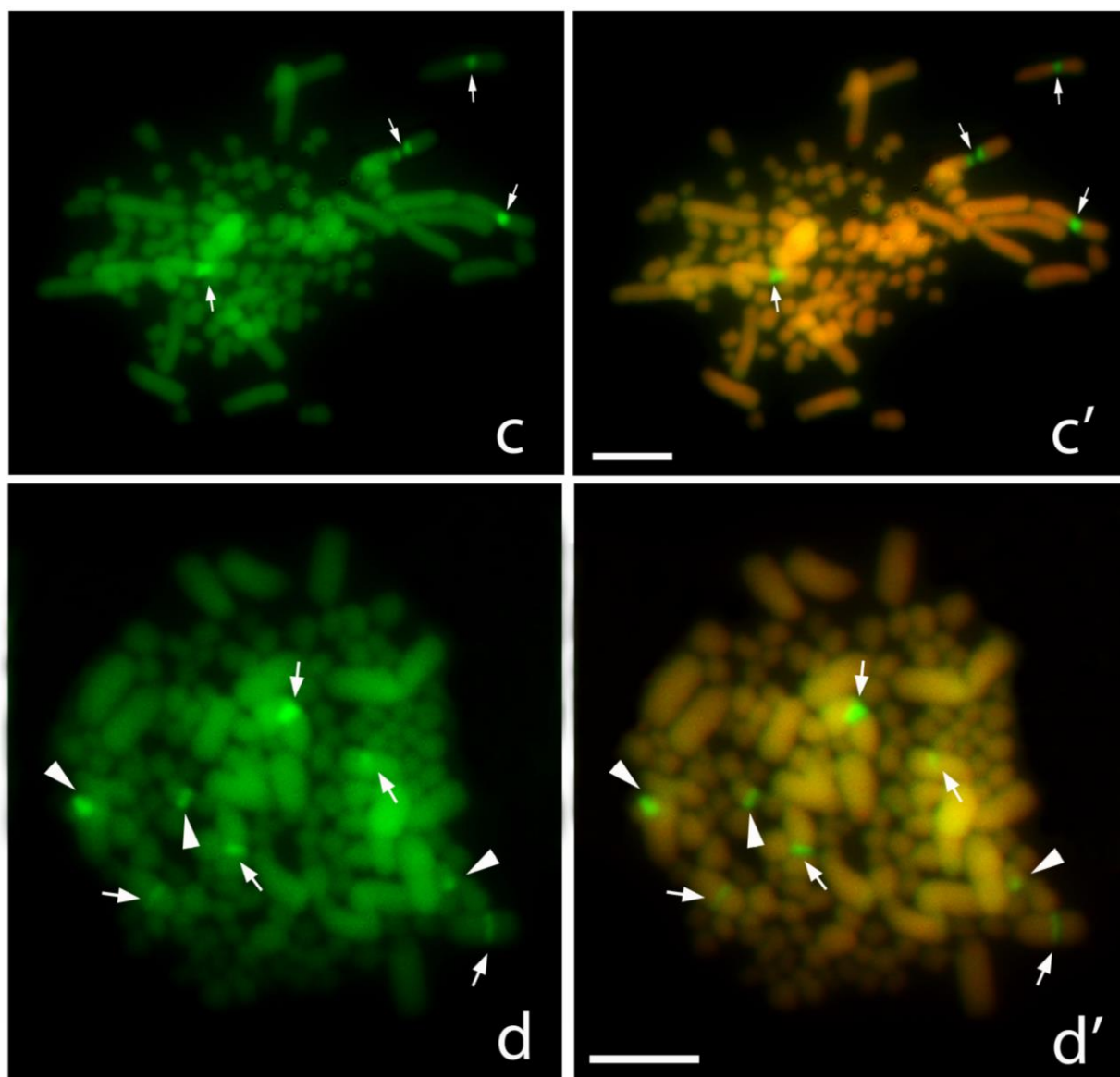
**2n:** Número cromossômico somático; **CP:** Contagens prévias. **DH:** Distribuição da Heterocromatina (**bicg:** bloco intersticial em cromossomo grande; **btcp:** bloco terminal em cromossomo pequeno)



**Figura 2.** Células mitóticas coloridas convencionalmente com Giemsa 2%. **A.** Metáfase - híbrido RN ( $2n=60$ ), **B.** Prometáfase - *Agave fourcroydes* ( $2n=120$ ), **C.** Metáfase - híbrido Tanzânia ( $2n=60$ ), **D.** Metáfase - Sisal Ornamental ( $2n=150$ ). Inseto em **B** mostra os tipos de condensação proximal, terminal e intercalar, respectivamente. Pontilhado em **B** indica a região organizadora de nucléolo (RON) distendida. Setas em **C** mostram as constrições secundárias. Inseto em **D** mostra núcleo interfásico semi-reticulado. Barra representa  $10\mu\text{m}$ .

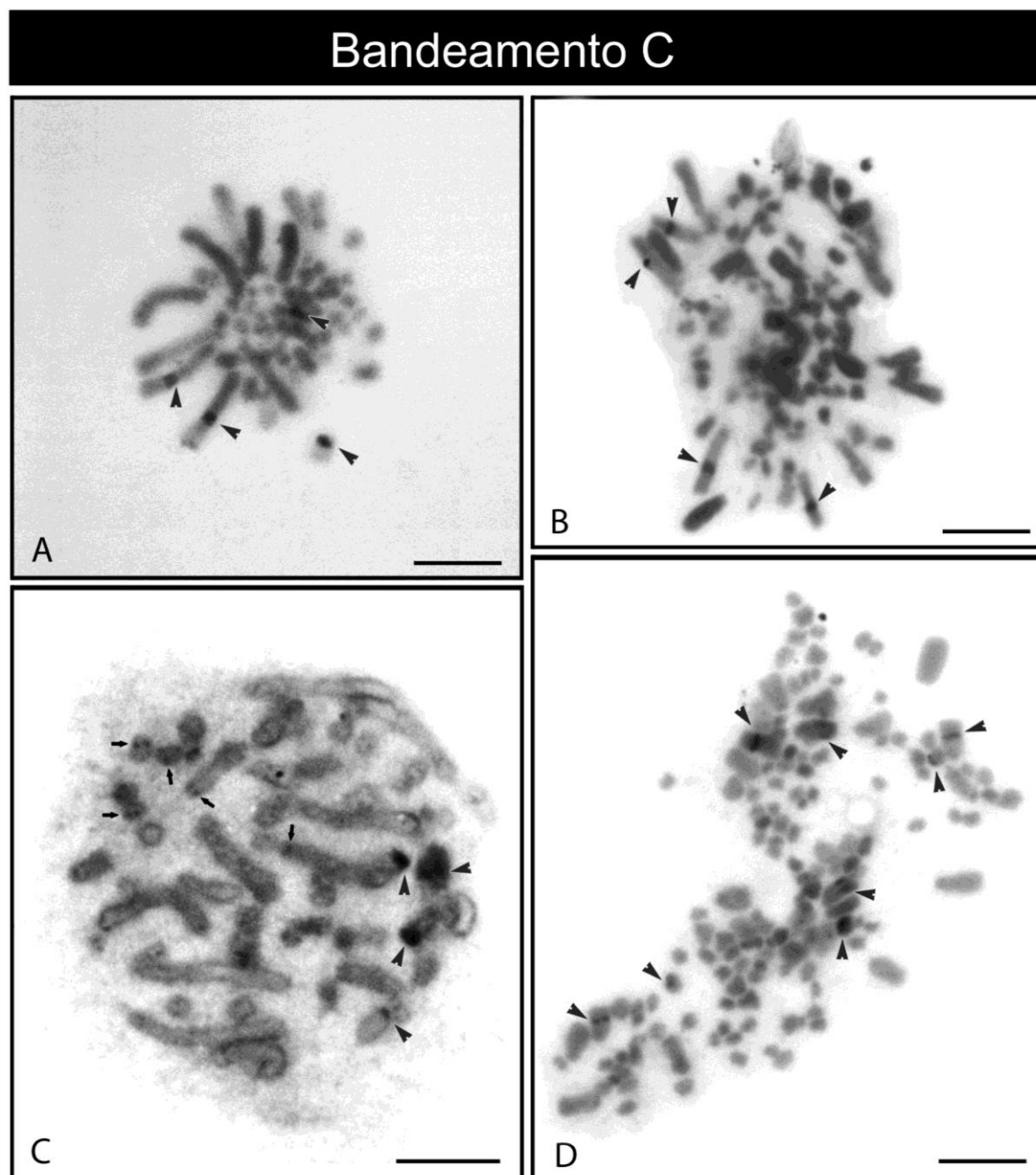


Cont.



**Figura 3.** Dupla coloração com fluorocromos CMA/DAPI em acessos de *Agave*. híbrido RN (a'-a''), híbrido Tânzania (b'-b''), *Agave fourcroydes* (c'-c''), Sisal Ornamental (d'-d''). Setas apontam bandas intersticiais de CMA<sup>+</sup>. Cabeça de seta apontam bandas terminais de CMA<sup>+</sup> Barra corresponde a 10µm.






**Figura 4.** Bandeamento C em cromossomos mitóticos. **A.** híbrido RN, **B.** *Agave fourcroydes*, **C.** híbrido Tanzânia, **D.** *Sisal ornamental*. Cabeças de setas indicam os blocos heterocromáticos. Setas em **C** indicam pequenos dots heterocromáticos. Barra representa 10  $\mu\text{m}$ .


## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarenga Júnior, ER (2012) Cultivo e aproveitamento do Sisal - Dossiê Técnico. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC.
- Banerjee S, Sharma AK (1988) Structural differences of chromosomes in diploid agave. *Cytologia* 53: 415-420.
- Banerjee S, Sharma AK (1989) Structure and behaviour of chromosomes in four different species of agave. *Cytologia* 54: 667-672.
- Cabral JS, Felix LP and Guerra M (2006) Heterochromatin diversity and its colocalization with 5S and 45S sites in chromosomes of four *Maxillarias* species (Orchidaceae). *Genet Mol Bio* 29: 659-664.
- Carvalho R, Soares Filho WS, Brasileiro-Vidal AC and Guerra M (2005) The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet Genome Res* 109:276-282.
- Cave MS (1964) Cytological observations on some genera of the *Agavaceae*. *Madroño* 17 (5): 163-170.
- Conjuntura especial. Sisal 2015: retrospectiva, Conab. 2015
- Díaz-Martínez M et al. (2012) Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* weber var. 'azul' plants propagated asexually by three different methods. *Plant Science* 185–186 321–330. doi:10.1016/j.plantsci.2012.01.004
- Doughty IR (1936) Chromosome behaviour, in relation to genetics of *Agave*. *Journ. of Genetics* (1936) 33: 198. doi: 10.1007/BF02982532
- García-Herrera EJ et al. (2010) El genero *Agave* spp. en México: principales usos de importância socioeconómica y agroecológica. VIII Simposium-Taller Nacional Y 1<sup>er</sup> Internacional "Producción y Aprovechamiento Del Nopal. *Revista Salud Pública y Nutrición*, Edición Especial No. 5. ISSN 1870-0160
- Gomez-Rodriguez VM et al (2013) Physical mapping of 5s and 18s ribosomal dna in three species of *agave* (asparagales, asparagaceae). *Comparative Cytogenetics* 7(3): 191–203. doi: 10.3897/CompCytogen.v7i3.5337

- Hizume M et al (1989) Chromosome banding in the genus *Pinus* ii. Inter-specific variation of fluorescent banding patterns in *p. Densiflora* and *p. Thunbergii*. Botanical Magazine Tokyo 102:25-36.
- Khaliq I et al. (2012) Ty1-copia retrotransposons are heterogeneous, extremely high copy number and are major players in the genome organization and evolution of *Agave tequilana*. Genet. Resour. Crop Evol. 59: 575–587. doi: 10.1007/s10722-011-9705-6
- Lingling IV et al. (2009) Determination of chromosomal ploidy in *agave* ssp. African Journal of Biotechnology 8 (20): 5248-5252. doi: 10.5897/AJB09.1126
- Moraes, AP (2007) Et al karyotype diversity and the origin of grapefruit. Chromosome research 15:115–12.
- Moscone, EA et al (1993) Giemsa c-banded karyotypes in *capsicum* (*Solanaceae*)\*. P1. Syst. Evol. 186: 213-229.
- Ortolani, FA et al (2007) Caracterização citogenética em *schlumbergera truncata* (haworth) moran e *schlumbergera x buckleyi* (t. Moore) tjaden (cactaceae). Acta Bot. Bras. 21 (2): 361-367.
- Palomino, G et al (2003) Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. Caryologia 53 (1): 37-46.
- Palomino, G et al (2010). Análisis del tamaño del genoma y cariotipo de *Agave akites* Gentry (*Agavaceae*) de sonora, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 81: 655 – 662.
- Queiroz, SROD et al (2012) Análise cromossômica em bulbilhos de sisal (*agave* spp.) Cultivados em diferentes municípios baianos, Brasil. Acta Botanica Brasilica 26 (4): 842-848.
- Ramos, IC (2014) Análise citogenética comparada em sisal (entre o híbrido 11648 e *Agave sisalana* perrine), 49 f. Dissertação (mestrado).
- Robert, ML et al (2008) 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 158: 215–222.

- Silva, ORRF et al (2008) Cultivo do sisal no nordeste brasileiro. Circular técnica123. Embrapa Algodão. Campina grande, Paraíba.
- Silva, OR R F; Beltrão, NEM. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, Df: Embrapa, 1999. 205 p.
- Simpson, J (2011) Genomic resources and transcriptome mining in *Agave tequilana*. *Gcb Bioenergy* 3: 25–36.
- Schwarzacher T, Ambros P and Schweizer D (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst Evol* 134: 293-297.
- Suinaga, FA et al (2007) Avaliação Agronômica de Oito Genótipos de Sisal (*Agave* spp.). Comunicado Técnico 340. Embrapa Algodão, Campina Grande, Paraíba.
- Tamayo-Ordóñez, YJ et al (2015) Comparative characterization of ribosomal dna regions in different agave accessions with economical importance. *Plant Mol Biol Rep*. doi: 10.1007/s11105-015-0895-5
- Ünal, F, Duman, H (2002) Cytotaxonomic studies on four *Allium* L. (Alliaceae) species endemic to Turkey. *Caryologia*, 55 (2): 175-180.

 [Sobre](#) [Pensoft](#) [Livros](#) [E-Books](#) [Revistas](#) [Notícias](#) e [Blog](#) [Contato](#)  
[Registre-se](#) | [Entrar](#)

 **COMPARATIVE** A peer-reviewed open-access journal  
**Cytogenetics**  
International Journal of Plant & Animal Cytogenetics,  
 Karyosystematics, and Molecular Systematics

Search...

Texto completo  Autor  Letra

[Artigos](#)  
[Sobre](#)

**Links da Web (HTML):** Os autores são incentivados a incluir links para outros recursos da Internet em seu artigo. Isto é especialmente encorajado na secção de referência. Ao inserir uma referência a uma página da Web, inclua a parte **http: //** do endereço da Web.

**Arquivos suplementares: conjuntos de dados maiores** podem ser carregados separadamente como arquivos suplementares. Os dados tabulares fornecidos como arquivos suplementares podem ser carregados como uma folha de cálculo do Excel (.xls), como um ficheiro de valores separados por vírgula (.csv) ou como folhas de cálculo do OpenOffice (.ods). Como com todos os arquivos enviados, use as extensões de arquivo padrão.

**Cabeçalhos e subposições:** Cabeçalhos principais: O texto do corpo deve ser subdividido em secções diferentes com títulos apropriados. Sempre que possível, devem ser utilizados os seguintes títulos-padrão: **Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências**. Esses títulos devem estar em negrito em uma linha separada e começar com uma primeira letra maiúscula. Por favor, não numerar cabeçalhos ou subtítulos.

- **Introdução** - A motivação ou o propósito de sua pesquisa deve aparecer na Introdução, onde você coloca as perguntas que você procurou responder e, em seguida, fornecer algumas das bases históricas para essas perguntas.
- **Métodos** - Fornecer informações suficientes para permitir que alguém repita seu trabalho. Uma descrição clara do seu desenho experimental, procedimentos de amostragem e procedimentos estatísticos é especialmente importante em artigos que descrevem estudos de campo, simulações ou experiências. Se você listar um produto (por exemplo, alimentos para animais, dispositivo analítico), forneça o nome e a localização do fabricante. Indique o número do modelo do equipamento utilizado. Forneça citações completas, incluindo autor (ou editor), título, ano, editor e número de versão, para o software de computador mencionado em seu artigo.
- **Resultados** - Os resultados devem ser indicados de forma concisa e sem interpretação.

- **Discussão** - Concentre-se nos aspectos rigorosamente apoiados do seu estudo. Cuidadosamente diferenciar os resultados de seu estudo de dados obtidos de outras fontes. Interprete seus resultados, relacioná-los com os resultados de pesquisas anteriores e discuta as implicações de seus resultados ou interpretações. Apontar resultados que não suportam especulações ou os resultados de pesquisas anteriores, ou que são contra-intuitivo. Você pode optar por incluir uma subseção de Especulação em que você persegue novas idéias sugeridas por sua pesquisa, compare e contraste sua pesquisa com achados de outros sistemas ou outras disciplinas, faça novas perguntas que são sugeridas pelos resultados de seu estudo e sugira formas de Responder a essas novas perguntas.
- **Conclusão** - Isto deve indicar claramente as principais conclusões da pesquisa e dar uma explicação clara da sua importância e relevância. Ilustrações resumidas podem ser incluídas.

//compcytogen.pensoft.net/about#Author-Guidelines

7/32

09/02/2017

Sobre

- **Referências** - A lista de referências deve ser incluída após a seção final do corpo do artigo principal. Uma linha em branco deve ser inserida entre entradas de espaço simples na lista. Os autores são solicitados a incluir links para fontes on-line de artigos, sempre que possível!

Sempre que possível, os títulos normalizados devem ser utilizados na ordem acima indicada. Títulos e modificações adicionais são permitidos.

**Cabeçalhos subordinados:** Cabeçalhos subordinados (por exemplo, Estudo de Campo e Modelo de Simulação ou Contagens, Medições e Análises Moleculares), devem ser justificados à esquerda, em itálico e em um caso de sentença regular. Todos os cabeçalhos subordinados devem estar em uma linha separada.

## Citações e Referências

**Citações dentro do texto:** Antes de submeter o manuscrito, por favor verifique cada citação no texto contra as referências e vice-versa para garantir que eles **correspondem exatamente**. As citações no texto devem ser formatadas da seguinte forma: Smith (1990) ou (Smith 1990), Smith et al. (1998) ou (Smith et al., 1998) e (Smith et al., 1998, 2000, Brock e Gunderson 2001, Felt 2006). No entanto, ao citar uma autoridade de um taxon, por favor separe o nome eo ano por vírgula, por exemplo: *Tipula* Linnaeus, 1758.

Conclusões taxonômicas devem ser consistentes com os códigos internacionais de zoologia / botânica Nomenclatura. Todos os nomes científicos da classificação genérica e específica devem ser indicados em itálico. Se mencionados pela primeira vez, devem ser seguidos pelo nome do autor (nomes dos autores) eo ano de publicação separadamente no resumo e no texto principal. Por exemplo, *Coccus hesperidum* Linnaeus, 1758. Os nomes botânicos devem ser fornecidos pelo menos com o nome do autor original, por exemplo, *Plectranthusamboinicus* (Lourreiro, 1790) ou (opcionalmente) com o nome do autor da actual combinação binominal: *Plectranthusamboinicus* (Lourreiro, 1790) Sprengel, 1825. Os grupos de espécies irmãs devem ser nomeados de acordo com a nomenclatura binominal, por exemplo, *Chironomus plumosus* group ou *Ch. Plumosus* grupo, não "*plumosus*" grupo.

**Referências:** É importante formatar as referências corretamente, porque todas as referências serão ligadas eletronicamente o mais completamente possível aos artigos citados. É desejável adicionar um número DOI (identificador de objeto digital) para o texto completo ou título e resumo do artigo como uma adição ao volume tradicional e números de página. Se um DOI estiver faltando, recomenda-se adicionar um link para

qualquer fonte on-line de um artigo. Use o estilo a seguir para a lista de referências (ou faça o download do estilo Pensoft End Note): [aqui](#)

**Moussel**

B (1966) Contribuição para o estudo caryotaxonomique des tiliacées. Boletim do Museu Nacional de História Natural 38 (3): 311-317.

**Documentos Aceitos:**

O mesmo que acima, mas " na imprensa " aparece em vez do ano entre parênteses.

**Artigos de Revista Eletrônica:**

Mallet J, Willmott K (2002) Taxonomia: renascimento ou Torre de Babel? Tendências em Ecologia e Evolução 18 (2): 57-59. Doi: [10.1016/S0169-5347\(02\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00061-7).

**Documento no âmbito dos procedimentos da conferência:**

Moharana S (1990) Cytotaxonomy of coccids (Homoptera: Coccoidea). Actas do VI Simpósio Internacional de Estudos de Insetos em Escala. Krakow, 6-12 de Agosto de 1990, 2. Krakow, 47-54.

Capítulos de **livros:** Patterson CM, Burch JB (1978) Cromossomas de moluscos pulmonares. Em: Fretter V, Peake J (Eds) Pulmonates. 2a. Sistemática, evolução e ecologia. London, Nova Iorque, San Francisco, 171-217.

**Livros:**

White MJD (1973) Citologia animal e evolução. Cambridge, 961 pp.

**Livro com autor institucional:**

Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (1999) Código internacional de nomenclatura zoológica. Quarta edição. Londres: O International Trust for Zoological Nomenclature, 306 pp.

**Tese de**

doutorado : Gavrilov IA (2005) Sistemática e citogenética de insetos de escala (Homoptera: Coccinea) da Rússia europeia. Ph.D. Dissertação, São Petersburgo, Federação Russa: Instituto Zoológico, Academia Russa de Ciências, 269 pp. [Em Russo].

**Link / URL:**

Notícia da BBC: leopardo da ilha [considerou a](#) espécie nova <http://news.bbc.co.uk/> [ [alcançado](#) 10. janeiro 2009]

**Citações de bancos de dados de recursos públicos:** É altamente recomendado que todos os conjuntos de dados, imagens e informações apropriados sejam depositados em recursos públicos. Forneça os números de acesso relevantes (e os números de versão, se apropriado). Os números de acesso devem ser fornecidos entre parênteses após a entidade na primeira utilização. Exemplos de tais bases de dados incluem, mas não estão limitados a:

- ZooBank ( [www.zoobank.org](http://www.zoobank.org) )
- Morphbank ( [www.morphbank.net](http://www.morphbank.net) )
- Genbank ( [www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) )
- BOLD ( [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org) )