



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LETÍCIA DO NASCIMENTO ANDRADE DE ALMEIDA REGO

**ANÁLISE CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DOS GÊNEROS  
*SOLANUM, LYCIANTHES E VASSOBIA***

---

Londrina  
2008

**LETÍCIA DO NASCIMENTO ANDRADE DE ALMEIDA REGO**

**ANÁLISE CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DOS GÊNEROS  
*SOLANUM, LYCIANTHES E VASSOBIA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela

Londrina  
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

R343a Rego, Letícia do Nascimento Andrade de Almeida.

Análise cariotípica em espécies dos gêneros *Solanum*, *Lycianthes* e *Vassobia* / Letícia do Nascimento Andrade de Almeida Rego. – Londrina, 2008.  
60f. : il.

Orientador: André Luis Laforga Vanzela.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2008.  
Inclui bibliografia.

1. Citogenética vegetal – Teses. 2. Genética vegetal – Teses. I. Vanzela, André Luis Laforga. II. Instituto Agronômico do Paraná. III. EMBRAPA. IV. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. V. Título.

CDU 631.52

**LETÍCIA DO NASCIMENTO ANDRADE DE ALMEIDA REGO**

**ANÁLISE CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DOS GÊNEROS  
*SOLANUM, LYCIANTHES E VASSOBIA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. **André Luis Laforga Vanzela**  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. **Ana Lúcia Dias**  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. **Maria Angélica Maciel Martinho  
Ferreira**  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Londrina, 27 de fevereiro de 2008.

Aos meus pais Bimbo e Lila e aos meus irmãos Felipe, Hugo, Mariana e Vitor, pelo carinho, confiança e apoio que sempre me dedicaram.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela por acolher, orientar, sugerir, confiar, informar, compreender, auxiliar, ter paciência e por me tratar com afeto, sempre me incentivando e tornando possível a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos pelo exemplo e por sempre terem me apoiado em todas as minhas decisões.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo suporte na realização desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) pela agradável convivência, paciência, disposição e companheirismo, em especial à Mari, Priscila, Carlão, Marquim, Thiaguim, Carol e Carolzinha por auxiliarem, serem prestativos e acima de tudo amigos.

Aos professores José Marcelo, Rogério, Ana Lúcia e à bióloga Alba Lúcia pela orientação, auxílio, sugestões e boas conversas.

Aos funcionários do LABRE pela colaboração nas coletas e pelos momentos de descontração.

À professora. Lilian Auler Mentz pela identificação das espécies utilizadas neste trabalho e pela disposição no esclarecimento de dúvidas.

À professora Ana Odete S. Vieira e à bióloga Natália S. Cervigne pelo auxílio na inclusão das espécies no herbário da UEL.

À secretária do programa Suely pela simpatia, paciência, ajuda e disposição.

Às queridas Stela, Renata, Letícia e Débora por participarem de alguma forma da realização deste trabalho, compartilhando bons e maus momentos e tornando minha vida mais interessante.

Ao CNPq pela bolsa de estudos, Fundação Araucária e CAPES pelo auxílio financeiro ao LABRE-Genética.

REGO, Letícia do Nascimento Andrade de Almeida. **Análise cariotípica em espécies dos gêneros *Solanum*, *Lycianthes* e *Vassobia***. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

O gênero *Solanum* possui cerca de 1.400 espécies arbóreo-arbustivas e trepadeiras, encontradas preferencialmente nas regiões tropicais, algumas com interesse econômico, como a batata. Em relação às características citogenéticas, este grupo é interessante devido ao fato dos cariótipos serem bastante conservados em número e forma dos cromossomos, com diversidade nos DNAs repetitivos. O objetivo deste estudo foi caracterizar espécies de *Solanum* e duas espécies de gêneros próximos, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora*, utilizando parâmetros citogenéticos (coloração convencional, bandamento C-CMA<sub>3</sub>/DAPI e FISH com sondas DNAr 45S e 5S). Foi observado que todas as espécies apresentaram  $2n = 24$ , confirmando a contagem para a maioria das espécies estudadas aqui. Para *Solanum scuticum*, *S. gemellum*, *S. amygdalifolium* e *Lycianthes australe* a contagem foi inédita. Todas as espécies apresentaram núcleos arreticulados com condensação profásica proximal e pouca variação na simetria cariotípica, sendo que *S. corymbiflorum* mostrou cromossomos aproximadamente três vezes maiores em relação às outras espécies. Regiões de heterocromatina ricas em GC (banda C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>) foram encontradas na região terminal de todos os cromossomos de algumas espécies de *Solanum*. Na maioria das espécies, incluindo as dos gêneros próximos, apenas um par foi marcado, enquanto em *S. corymbiflorum* 2 pares foram marcados. Regiões de heterocromatina ricas em AT (banda C-DAPI<sup>+</sup>) foram evidenciadas nas regiões centroméricas de todos os cromossomos em *L. australe* e região centromérica dos dois maiores pares em *S. amygdalifolium*. Sítios de DNAr 45S coincidentes com banda C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (satélites) foram vistos em apenas um par, havendo variação no par portador. No entanto, *S. corymbiflorum* apresentou dois pares cromossômicos com DNAr 45S. A FISH com DNAr 5S mostrou sinais na região pericentromérica de um par cromossômico, geralmente nos braços curtos dos menores cromossomos de cada complemento, com exceção de *S. trachytrichium* que apresentou dois pares marcados. Os resultados indicam que os mecanismos de diferenciação cariotípica envolvem mudanças nos pares portadores dos sítios de DNAr, posição e número de bandas ricas em GC e AT, bem como alterações na forma e no tamanho dos cromossomos e cariótipos. Os resultados em *S. corymbiflorum*, que já fora considerada *Cyphomandra corymbiflora*, podem sugerir que os gêneros *Cyphomandra* e *Solanum* representam dois grupos distintos, ao contrário do que sugerem alguns taxonomistas, quando consideram estes um único grupo taxonômico.

**Palavras-chave:** Bandamento cromossômico. *Cyphomandra*. DNAr 45S e 5S. *Lycianthes*. *Vassobia*.

REGO, Letícia do Nascimento Andrade de Almeida. **Análise cariotípica em espécies dos gêneros *Solanum*, *Lycianthes* e *Vassobia***. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

### ABSTRACT

The *Solanum* genus comprises about 1.400 species of shrubs, trees and vines, found preferentially in the tropical regions. Some of these with economic interests, as the potato. In relation to the cytogenetical features, this group is interesting by the fact of the karyotypes be sufficiently conserved in chromosome number and shape, with diversity in the repetitive DNA. The objective of this study was to characterize species of *Solanum* and two species of next genera, *Lycianthes australe* and *Vassobia breviflora*, using cytogenetic parameters (conventional staining, C-CMA<sub>3</sub>/DAPI banding and FISH with 45S and 5S rDNA. We have been seen that all the species had presented  $2n = 24$ , confirming the counting for the majority of the species study here. In *Solanum scuticum*, *S. gemellum*, *S. amygdalifolium* and *Lycianthes australe* the counting was new. All the species had presented arreticulated nuclei with early condensed proximal in prophase and little variation in the karyotype symmetry. However, *S. corymbiflorum* exhibited chromosomes approximately three bigger times in relation to the other species. GC-rich heterochromatin had been found in the terminal region of all the chromosomes in the majority of the species of *Solanum*. In the other species, including related genera, only the one pair was detected, while in *S. corymbiflorum* two pairs had been found. AT-rich regions had been evidenced in the centromeric regions of all the chromosomes in *L. australe* and centromeric regions of the two largest pairs in *S. amygdalifolium*. 45S rDNA sites were coincident with C/CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> regions (satellites) which were found in just one pair, but with variation in the carrier pair. *Solanum corymbiflorum* presented two chromosomal pairs with 45S rDNA. The FISH with 5S rDNA showed signals in the pericentromeric region of one chromosome pair, generally in the short arms of the smaller chromosomes of each complement, with exception of *S. trachytrichium* that it presented two marked pairs. The results indicates that the mechanisms of karyotype differentiation involve changes in the pairs carrier rDNA sites, location and number of GC- and AT-rich bands, as well as changes in the shape and size of chromosomes and karyotypes. The results in *S. corymbiflorum*, that already it was considered *Cyphomandra corymbiflora*, can suggests that the *Cyphomandra* and *Solanum* genera represent two distinct groups in contrast of that they suggest some taxonomical studies, when its consider a just one taxonomic group.

**Keywords:** Chromosome banding. *Cyphomandra*. 45S and 5S rDNA. *Lycianthes*. *Vassobia*.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

**Figura 1** – Representantes de Solanaceae..... 13

### Capítulo 1: Análise cariotípica em espécies dos gêneros *Solanum*, *Lycianthes* e *Vassobia*.

**Figura 1** – Coloração convencional (Giemsa) ..... 44

**Figura 2** – Bandamento C-CMA<sub>3</sub>/DAPI ..... 45

**Figura 3** – Bandamento C-CMA<sub>3</sub>/DAPI ..... 46

**Figura 4** – FISH com a sonda de DNAr 45S ..... 47

**Figura 5** – FISH com as sondas de DNAr 45S e 5S ..... 48

**Figura 6** – Idiogramas e mapeamento físico dos cromossomos de *Solanum*, *Lycianthes*  
e *Vassobia*..... 49

**Figura 7** – Gráfico de Simetria Cariotípica em *Solanum*, *Lycianthes* e *Vassobia*..... 50

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

**Tabela 1** – Classificação de cariótipos de acordo com Stebbins (1971)..... 16

### **Capítulo 1: Evolução cariotípica em espécies dos gêneros *Solanum*, *Lycianthes* e *Vassobia*.**

**Tabela 1** – Características cariotípicas de espécies de *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora* ..... 51

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 10 |
| 1.1 FAMÍLIA SOLANACEAE .....  | 10 |
| 1.2 GÊNERO <i>SOLANUM</i> L.....  | 10 |
| 1.3 GÊNERO <i>LYCIANTHES</i> (DUNAL) HASSLER .....                          | 12 |
| 1.4 GÊNERO <i>VASSOBIA</i> RUSBY .....                                      | 12 |
| 1.5 PROBLEMA TAXONÔMICO DE <i>CHYPHOMANDRA</i> MART. <i>EX</i> SENDTN ..... | 14 |
| 1.6 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE SOLANACEAE E DO GÊNERO <i>SOLANUM</i> .....   | 15 |
| 1.7 LOCALIZAÇÃO DE DNAs REPETITIVOS NA FAMÍLIA SOLANACEAE .....             | 17 |
| <br>  |    |
| <b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....  | 19 |
| <br>  |    |
| <b>3 OBJETIVOS</b> .....  | 20 |
| 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 20 |
| <br>  |    |
| <b>CAPÍTULO 1</b> .....   | 21 |
| INTRODUÇÃO .....  | 23 |
| MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 25 |
| RESULTADOS .....  | 28 |
| DISCUSSÃO .....   | 33 |
| REFERÊNCIAS .....   | 52 |
| <br>  |    |
| <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 58 |
| <br>  |    |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 60 |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 FAMÍLIA SOLANACEAE

A família Solanaceae é reconhecida dentro da ordem Solanales pela ocorrência de frutos com óvulos e sementes numerosos, dois carpelos obliquamente orientados, ausência de látex, estilete simples e estigma único, pouco ou nada lobado (CRONQUIST, 1988). Muitas espécies de Solanaceae são de grande importância econômica para o homem, como a batata (*Solanum tuberosum* L.), a berinjela (*Solanum melongena* L.), o tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e vários tipos de pimenta (gênero *Capsicum* L.).

A família Solanaceae possui 2.800 espécies organizadas em 92 gêneros e em 6 subfamílias: *Cestroideae*, *Juanulloideae*, *Solanoideae*, *Salpiglossoideae*, *Schizanthoideae* e *Anthocercidoideae* (HUNZIKER, 2001). Somente as três primeiras subfamílias têm representantes nativos na região sul do Brasil (MENTZ; OLIVEIRA, 2004).

De acordo com Hunziker (2001), a subfamília *Solanoideae* possui 9 tribos. Destas, a tribo *Solaneae* Miers é a maior delas em número de representantes (Figura 1). A subtribo *Solanineae* Hunz. caracteriza-se pela presença de anteras com deiscência poricida, anel entre os filetes e adjacente à porção basal da corola, e pela ausência de disco nectarífero. De acordo com D'Arcy (1991), os dois maiores gêneros da tribo *Solaneae* que possuem antera poricida terminal, *Solanum* L. e *Lycianthes* (Dunal) Hassler, têm distribuição ampla. O primeiro ocorre em quase todo o mundo e o segundo na América tropical e no leste da África. Os demais gêneros de *Solaneae* possuem deiscência longitudinal da antera e tendem a ter distribuição restrita em um único continente ou região.

### 1.2 GÊNERO *SOLANUM*

O gênero *Solanum* é um dos maiores e mais diversos das angiospermas, sendo economicamente o mais importante da família Solanaceae. Possui cerca de 1.400 espécies desde ervas a pequenas árvores, distribuídas por todo o mundo. No Novo Mundo ocorrem cerca de 850 espécies. O gênero ocorre predominantemente nas Américas Central e

do Sul, África, Austrália, mas também podem ocorrer espécies na América do Norte, Eurásia e Oceania (NEE, 1999; CHILD; LESTER, 2001; BOHS, 2005).

Hipóteses filogenéticas para a relação entre os grupos infragênicos de *Solanum* foram propostas (OLMSTEAD; PALMER, 1997; BOHS; OLMSTEAD, 1997, 1999; SPOONER et al., 2003; BOHS, 2004, 2005). Neste contexto, o gênero *Solanum* foi dividido por Nee (1999) em três subgêneros: *Leptostemonum* (Dunal) Bitter, *Solanum* L. e *Bassovia* (Aubl.) Bitter. O subgênero *Leptostemonum* constitui o maior subgênero de *Solanum*, com cerca de 450 espécies. Cerca de 180 destas ocorrem na América do Sul. Essas espécies se diferenciam dos outros dois gêneros principalmente pela presença de espinhos (BOHS, 2005; LEVIN et al., 2006), sendo um dos poucos grupos de Solanaceae com marcas adaptativas para calor e habitats secos e sazonais (D'ARCY, 1991; NEE, 1999). O subgênero *Solanum* possui cerca de 370 espécies encontradas principalmente na América do Sul. Elas se diferenciam dos outros subgêneros principalmente por possuírem anteras poricidas terminais, oblongas e sem conectivo (BOHS, 2005). O subgênero *Bassovia* está confinado às Américas, com maior diversidade na América do Sul. Possui espécies que se diferenciam das demais principalmente por possuírem anteras poricidas oblongas terminais e com conectivo (NEE, 1999; CHILD; LESTER, 2001; BOHS, 2005).

São reconhecidas cerca de 60 seções para o gênero *Solanum* (D'ARCY, 1991; NEE, 1999; BOHS, 2004). Dentro do subgênero *Leptostemonum*, a seção *Acanthophora* Dunal possui cerca de 40 espécies herbáceas e arbustivas, distribuídas do México à Argentina e com centro de diversidade no sudeste brasileiro (NEE, 1999; LEVIN et al., 2005). Além disso, essa seção exibe grande variação na morfologia de seus frutos, onde *S. palinacanthum* Dunal e *S. mammosum* L. produzem os maiores frutos dentro desse grupo de plantas com cerca de 5 cm de diâmetro. A seção *Torva* Nee possui 42 espécies arbustivas a pequenas árvores distribuídas do México à Argentina. (D'ARCY, 1991; LEVIN et al., 2006).

Dentro do subgênero *Solanum*, a seção *Solanum* possui cerca de 50 espécies de ervas a arbustos, enquanto a seção *Brevantherum* (Seithe) D'Arcy possui 83 espécies de distribuição neotropical. Já a seção *Extensum* D'Arcy possui de quatro a cinco espécies de arbustos ou trepadeiras, encontradas principalmente na América Central e Venezuela (D'ARCY, 1991; BOHS, 2005). A seção *Dulcamara* tem cerca de 40 espécies estando proximamente relacionada à seção *Petota* (BOHS, 2005). Para Nee (1991) e Bohs (2005) a seção *Geminata* G. Don. possui cerca de 140 espécies arbustivas ou pequenas árvores, tendo os dois maiores centros de diversidade no leste Andino e nas cordilheiras costeiras da Venezuela.

Conforme Nee (1999), a seção *Cyphomandropsis* e mais outras três seções, *Pachyphylla*, *Allophylla* e *Pterioidea* pertencem ao subgênero *Bassovia*. A seção *Pachyphylla* Dunal abriga as espécies anteriormente aceitas como pertencentes ao gênero *Cyphomandra*, como por exemplo, *Solanum corymbiflorum* (Sendtn.) Bohs (= *Cyphomandra corymbiflora* Sendtn.). As espécies de *Solanum* estudadas até o momento apresentaram  $2n = 2x = 24$ , embora séries poliplóides com  $2n = 4x = 48$ ,  $2n = 6x = 72$ ,  $2n = 8x = 96$  sejam frequentes (HUNZIKER, 2001).

### 1.3 GÊNERO *LYCIANTHES* (DUNAL) HASSLER

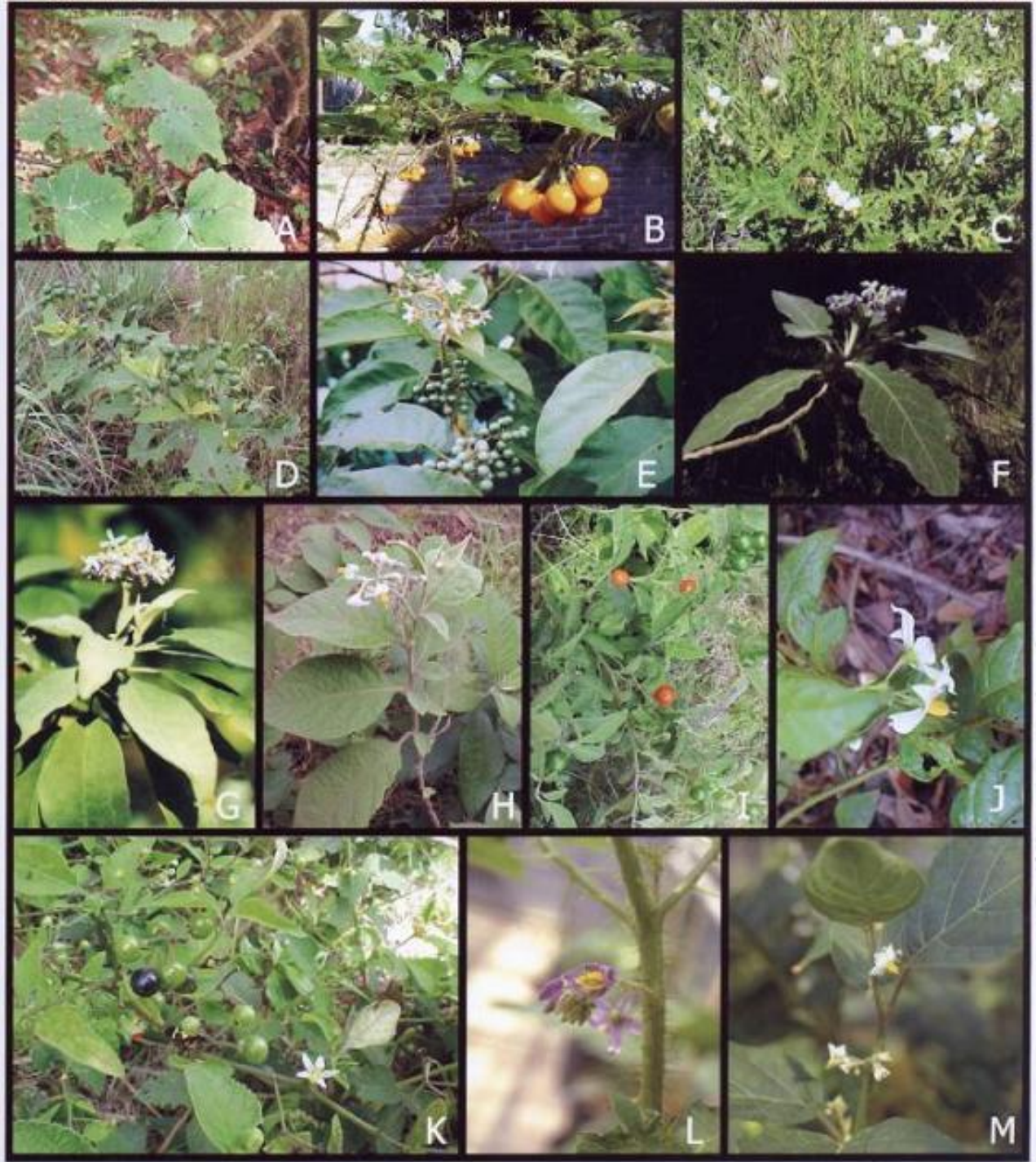
O gênero *Lycianthes* já foi considerado um subgênero de *Solanum*, mas é atualmente reconhecido como gênero independente por estudos com filogenia molecular (OLMSTEAD; PALMER, 1992, 1997; BOHS; OLMSTEAD, 1997, 1999; OLMSTEAD et al., 1999; NEE, 1999; BOHS, 2004, 2005). Compreende cerca de 150 espécies com distribuição américo-asiática, sendo que dez crescem no sudeste do Brasil. Todas possuem frutos do tipo baga e a maioria de cor brilhante. As poucas espécies de *Lycianthes* estudadas citogeneticamente (*L. lycioides* (L.) Hassler, *L. moziana* (Dunal) Bitter, *L. jalicensis* E. Dean e *L. rantonnei* (Carr.) Bitter) possuem 24 cromossomos (MOSCONE, 1992; HUNZIKER, 2001; ACOSTA et al., 2005).

### 1.4 GÊNERO *VASSOBIA* RUSBY

*Solaneae* é a maior tribo da subfamília Solanoideae com aproximadamente 1.500 espécies. Esta é subdividida em cinco subtribos de acordo com Hunziker (2001). A subtribo *Capscinae* possui nove gêneros, dentre eles, *Capsicum* e *Vassobia*. Este último é caracterizado por possuir espécies arbustivas ou pequenas árvores, com flores pequenas e inodoras. *Vassobia dichotoma* (Rusby) Bitter, por exemplo, cresce na Bolívia a 1.900 a 2.100 m de altitude, enquanto *V. breviflora* (Sendtn.) Hunz. possui ampla distribuição geográfica, entre 300m e 2.700m de altitude e é encontrada nas montanhas da Bolívia, no nordeste da Argentina, Leste do Paraguai, sudeste do Brasil e noroeste do Uruguai. Por conta de seu polimorfismo, essa planta já recebeu 30 nomes e foi incluída em sete gêneros diferentes

(HUNZIKER, 2001).

A única espécie estudada citogeneticamente até o momento é *Vassobia breviflora*, a qual apresentou  $2n = 24$  cromossomos (XIFREDA et al., 1985 apud HUNZIKER, 2001).



**Figura 1** – Representantes de Solanaceae. (A) *Solanum viarum*, (B) *S. artropurpureum*, (C) *S. sisymbriifolium*, (D) *S. guaraniticum*, (E) *S. paniculatum*, (F) *S. mauritianum*, (G) *S. granulosoleprosum*, (H) *S. gemellum*, (I) *S. pseudocapsicum*, (J) *S. trachytrichium*, (K) *S. americanum*, (L) *S. palinacanthum* e (M) *Vassobia breviflora*

### 1.5 PROBLEMA TAXONÔMICO DE *CHYPHOMANDRA* MART. EX SENDTN.

As espécies consideradas na circunscrição de *Cyphomandra* são neotropicais e ocorrem do México ao norte da Argentina, habitando clareiras e bordas de formações florestais ou ambientes antropizados (SOARES; MENTZ, 2006). A circunscrição de *Cyphomandra* e suas relações intergenéricas sempre foram discutidas, dada a estreita relação com os gêneros *Solanum* e *Lycopersicon* (OLMSTEAD; PALMER, 1992; SPOONER et al., 1993; BOHS, 1994, 1995; BOHS; OLMSTEAD, 1997, 1999; CHILD; LESTER, 2001; SOARES; MENTZ, 2006). Estas espécies são distinguidas das outras solanáceas pela presença de conectivo, formando uma protuberância no lado dorsal da antera e, geneticamente, por possuírem grande quantidade de DNA e grandes cromossomos, maiores que 12  $\mu\text{m}$  (BERNADELLO; ANDERSON, 1990; BOHS, 1989, 1994; PRINGLE; MURRAY, 1991, 1993). Embora esses caracteres possam definir *Cyphomandra* como um gênero independente, as relações filogenéticas entre *Cyphomandra*, *Solanum* e *Lycopersicon* foram recentemente reavaliadas em estudos de sistemática molecular utilizando genes conservados de cloroplasto (OLMSTEAD; PALMER, 1992; BOHS, 1995; OLMSTEAD; PALMER, 1997; BOHS; OLMSTEAD, 1997, 1999; OLMSTEAD et al., 1999; BOHS, 2004, 2005).

As transferências das espécies de *Lycopersicon* (SPOONER et al., 1993) e *Cyphomandra* (BOHS, 1995) para o gênero *Solanum* geraram impacto, uma vez que estas propostas não foram aceitas de imediato e muitos as contestaram, por discordarem dos princípios nas quais estavam fundamentadas (SOARES; MENTZ, 2006). Concordando parcialmente com as modificações propostas pela biologia molecular na taxonomia do gênero *Solanum*, Nee (1999) aderiu à transferência dos táxons de *Cyphomandra* para *Solanum*. No entanto, preferiu manter a autonomia do gênero *Lycopersicon*. Conforme Nee (1999), a seção *Pachyphylla* abriga as espécies anteriormente aceitas como pertencentes ao gênero *Cyphomandra*, como por exemplo, *Solanum corymbiflorum* (Sendtn.) Bohs (= *Cyphomandra corymbiflora* Sendtn. In *Flora* 28:174. 1845).

## 1.6 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE SOLANACEAE E DO GÊNERO *SOLANUM*

Dados citogenéticos são extremamente importantes na sistemática vegetal, por auxiliarem na determinação das relações entre diferentes táxons, bem como na compreensão de mecanismos genéticos envolvidos na diferenciação e especiação de grupos de plantas (GUERRA, 1986). A combinação de caracteres como fórmula cariotípica, presença de satélites, tamanho total do cariótipo ( $\mu\text{m}$ ), tamanho relativo dos pares cromossômicos (%) e índices de assimetria (TF %, por exemplo) também permitem que espécies sejam distinguidas umas das outras (STEBBINS, 1971; BERNARDELLO; ANDERSON, 1990; BERNARDELLO et al., 1994; ACOSTA et al., 2005; CHIARINI; BERNARDELLO, 2006).

Comparações entre assimetrias cariotípicas são mais fáceis de fazer se as categorias de assimetria são bem estabelecidas. De acordo com Stebbins (1971), um cariótipo simétrico é aquele cujos cromossomos são todos aproximadamente do mesmo tamanho, possuindo centrômero mediano ou submediano. Assim, o aumento da assimetria pode ocorrer tanto por meio de mudanças na posição do centrômero, como por variações nos tamanhos relativos dos cromossomos do complemento. A classificação de cariótipos de acordo com o grau de assimetria de Stebbins (1971) utiliza, além do resultado da divisão do par cromossômico maior pelo par cromossômico menor, a análise da proporção de cromossomos dos tipos subtelocêntricos e telocêntricos em relação aos outros tipos cromossômicos de cada lote haplóide (Tabela 1). As categorias de classificação são baseadas em dois aspectos: 1) frequência de cromossomos dos tipos subtelo e telocêntricos em relação ao restante do lote haplóide, sendo a categoria 1 considerada mais simétrica em relação à categoria 4 e 2) Relação de tamanho entre o cromossomo maior e o menor, isto é, quanto o cromossomo maior é maior que o cromossomo menor, sendo a categoria A considerada mais simétrica em relação à categoria C. Podemos assim assumir o cariótipo do tipo 1A como mais simétrico e o cariótipo do tipo 4C como mais assimétrico.

**Tabela 1** – Classificação de cariótipos de acordo com o grau de assimetria, segundo Stebbins (1971).

| Par maior/par menor | Proporção de cromossomos com razão de braços < 2:1 |            |             |     |
|---------------------|--|------------|-------------|-----|
|                     | 0.0  | 0.02 – 0.5 | 0.51 – 0.99 | 1.0 |
| < 2:1               | 1A   | 2A         | 3A          | 4A  |
| 2 :1 – 4:1          | 1B   | 2B         | 3B          | 4B  |
| > 4:1               | 1C   | 2C         | 3C          | 4C  |

De uma maneira geral, espécies de Solanaceae têm exibido cariótipos simétricos, com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, independente do gênero e do tamanho dos cromossomos. Nos gêneros *Solanum* (STEBBINS, 1971; BERNARDELLO; ANDERSON, 1990; MOSCONE, 1992; BERNARDELLO et al., 1994; ACOSTA et al., 2005; OBUTE et al., 2006; CHIARINI; BERNARDELLO, 2006) e *Lycianthes* (ACOSTA et al., 2005) os cariótipos são compostos por cromossomos semelhantes em tamanho (menos de 4  $\mu$ m) e forma (meta e submetacêntricos). Os cariótipos de *Capsicum* (MOSCONE, 1993; MOSCONE et al., 1993), de *Cestrum* L. (FREGONEZI et al., 2006) e de *Nicotiana* L. (NAKAMURA et al., 2001; KITAMURA et al., 2001) também são simétricos com cromossomos meta e submetacêntricos.

Estudos citogenéticos na família Solanaceae mostram que esta exhibe números cromossômicos básicos variando de  $x = 7$  a  $x = 13$ , sendo  $x = 12$  o mais comum, embora essa amplitude cromossômica não seja encontrada em todas as subfamílias (MOSCONE, 1992). Estudos feitos em *Capsicum* (MOSCONE, 1993; MOSCONE et al., 1993) e em *Nicotiana* L. (NAKAMURA et al., 2001; KITAMURA et al., 2001) mostraram que a maioria das espécies possui  $2n = 2x = 24$ . A maioria das espécies de *Solanum* estudadas até o momento também apresentou  $2n = 2x = 24$ , embora séries poliplóides com  $2n = 4x = 48$ ,  $2n = 6x = 72$ ,  $2n = 8x = 96$  sejam frequentes (STEBBINS, 1971; BERNARDELLO; ANDERSON, 1990; MOSCONE, 1992; BERNARDELLO et al., 1994; ACOSTA et al., 2005; OBUTE et al., 2006; CHIARINI; BERNARDELLO, 2006).

## 1.7 LOCALIZAÇÃO DE DNAs REPETITIVOS NA FAMÍLIA SOLANACEAE

Seqüências repetitivas de DNA representam uma fração substancial do genoma nuclear das plantas superiores (FLAVELL, 1986; HESLOP-HARRISON, 2000). Contudo, os cariótipos de angiospermas exibem grande variação tanto na quantidade quanto na localização de bandas heterocromáticas, sendo comuns polimorfismos no tamanho e posição das bandas. A quantidade de heterocromatina em uma espécie pode variar independentemente da quantidade de eucromatina e do conteúdo de DNA. De acordo com Guerra (2000), a heterocromatina é formada de seqüências repetitivas que variam em natureza, tamanho e distribuição e as diferentes seqüências parecem não ter o mesmo significado funcional e evolutivo para todas as espécies de angiospermas.

Dentre as técnicas mais empregadas, o bandamento C-Giemsa (SCHWARZACHER et al., 1980) e o bandamento com fluorocromos DAPI (4'-6 diamidino - 2 fenilindol) e CMA<sub>3</sub> (cromomicina A<sub>3</sub>) são usados para localizar regiões heterocromáticas ricas em AT ou GC, respectivamente (SCHWEIZER, 1980). Estas técnicas são extremamente úteis em estudos de caracterização cromossômica e evolução cariotípica, bem como para o entendimento da evolução das seqüências de DNA repetitivo dentro de um grupo e entre diferentes espécies (SHARMA; SEM, 2002).

Em *Nicotiana kawakamii* estudada por Nakamura et al. (2001) a coloração com DAPI revelou bandas positivas em todos os grandes cromossomos do complemento, permitindo a divisão destes em grupos quanto à posição: (i) terminal do braço longo; (ii) terminal do braço curto e na região subterminal do braço longo e (iii) terminal e intercalar do braço longo. Moscone et al. (1993) observaram que em *Capsicum*, todos os cromossomos dos complementos das espécies estudadas exibiam bandas C centroméricas e uma grande variação em relação às bandas terminais. Em algumas espécies de *Solanum* da seção *Petota*, a heterocromatina foi localizada bem adjacente ao centrômero (PIJNAKER; FERWERDA, 1984), diferentemente das espécies do gênero *Cyphomandra* (agora circunscritas dentro de *Solanum*). Estas não apresentaram bandas C proximais, mas bandas terminais e intersticiais em alguns cromossomos de cada complemento. Segundo Pringle e Murray (1993), isto mostra que diferenças nas proporções de heterocromatina podem refletir diferenças na dispersão ou agregação de elementos repetitivos dentro desse grupo de plantas.

O grande número de cópias e a tendência à formação de blocos fazem dos DNAs repetitivos alvos ideais para experimentos de hibridação *in situ*, pois são mais fáceis de

serem localizados tanto por bandamento quanto por FISH. As principais sequências de DNA repetitivo utilizadas na citogenética molecular são as que codificam os genes ribossômicos, os segmentos de telômeros e microssatélites, além de alguns grupos de DNAs satélites (SNOWDON et al., 2001; SUMNER, 2003). Genes que codificam os RNAs ribossômicos 18S-5,8S-26S (também chamado de DNAr 45S) representam uma das maiores e mais bem estudadas famílias de sequências repetitivas em eucariotos, assim como os que codificam o RNAr 5S (DNAr 5S). Ambos ocorrem em repetições em *tandem* em um ou mais sítios cromossômicos, porém ocorrem separados fisicamente nos cromossomos (LAPITAN, 1992).

As sequências de DNAr 45S e 5S são altamente conservadas, permitindo que sondas originalmente isoladas de diferentes espécies, como trigo, por exemplo (GERLACH; BEDBROOK, 1979; GERLACH; DYER, 1980), possam ser utilizadas na localização desses segmentos em diferentes espécies de eucariontes. Um bom exemplo para Solanaceae foi publicado por Fregonezi et al. (2006), os quais utilizaram hibridação *in situ* com fluorocromos (FISH) com as sondas de DNAr 45S e 5S em espécies de *Cestrum* e encontraram que o DNAr 45S variou em número e localização, aparecendo mais comumente nas regiões terminais dos braços curtos dos cromossomos, enquanto que o DNAr 5S apareceu sempre na região proximal do braço longo do menor par cromossômico. Dessa forma, por serem sequências evolutivamente conservadas e por estarem presentes em um ou mais sítios cromossômicos, os DNAr 45S e 5S se tornaram importantes marcas cromossômicas para estudos citogenéticos e evolutivos (HESLOP- HARRISON, 2000).

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar das metodologias convencionais de análise cariotípica fornecerem informações valiosas para comparar populações e espécies, estas são limitadas para a definição da organização dos cromossomos em cada cariótipo em determinados grupos de plantas. Isto acontece principalmente para espécies tropicais onde a biodiversidade é grande, os estudos citogenéticos são escassos e os cariótipos são similares. Assim sendo, nem sempre o número cromossômico é suficientemente útil como característica diagnóstica micromorfológica. A aplicação de técnicas citogenéticas mais apuradas, tais como bandamento C-CMA<sub>3</sub>/DAPI e FISH com sondas de DNAs repetitivos são muito úteis para estudar grupos com cariótipos tão constantes, como os de *Solanum* e grupos próximos. Neste contexto, estas técnicas citogenéticas podem ser aplicadas à resolução de problemas taxonômicos e biosistemáticos, bem como para a compreensão dos mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação cariotípica dentro da família Solanaceae e do gênero *Solanum*.

A escolha desse grupo de plantas justifica-se pelo fato dos cariótipos de *Solanum*, *Lycianthes* e *Vassobia* serem similares, numericamente estáveis e com algumas famílias de DNA repetitivos já identificadas. Além deste grupo possuir espécies com interesse econômico indiscutível, há um elevado número de espécies em nossa região com reconhecida importância para a restauração ambiental.

### 3 OBJETIVOS

Análises de filogenia molecular têm alterado substancialmente a organização taxonômica de grupos acerca de *Solanum*, como por exemplo, a inclusão de *Cyphomandra* como uma seção de *Solanum*, ao mesmo tempo em que grupos morfológicamente mais próximos como *Lycianthes* encontram-se fora da circunscrição em *Solanum*. Contudo, a análise citogenética parece ir à contramão dos trabalhos filogenéticos que empregam poucos genes extra-genômicos. Para entender e contribuir melhor com estas relações taxonômicas, este trabalho teve como objetivo geral a caracterização cariotípica de espécies de *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora*, utilizando metodologias de coloração convencional, técnicas de bandamento cromossômico (bandamento C-CMA<sub>3</sub>/DAPI), bem como a localização de segmentos repetidos de DNA (DNAr 45S e 5S) pela técnica de hibridação *in situ* com fluorocromos.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir e confirmar o número, a forma e o tamanho dos cromossomos de 18 espécies, sendo 16 de *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora*.
2. Comparar a organização estrutural dos cariótipos das espécies utilizando a técnica de bandamento cromossômico C-CMA<sub>3</sub>/DAPI.
3. Comparar a organização estrutural dos cariótipos utilizando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 45S e 5S.
4. Utilizar os resultados obtidos pela caracterização cariotípica das espécies para gerar mapas físicos. Estes, por sua vez, serão empregados em uma análise comparativa entre espécies, a fim de entender os processos evolutivos envolvidos na diferenciação cromossômica destas espécies e de gêneros proximamente relacionados.

**Capítulo 1**

---

**Análise cariotípica em espécies dos gêneros *Solanum*,  
*Lycianthes* e *Vassobia***

Este capítulo será enviado para publicação na revista *Plant Systematics and Evolution*

Fator de Impacto: **1,239** (JCR-2006), Springer, ISSN: **0378-2697** e ISSN: **1615-6110**

## **Análise cariotípica em espécies dos gêneros *Solanum*, *Lycianthes* e *Vassobia***

Letícia do Nascimento Andrade de Almeida Rego<sup>1,2</sup>, Carlos Roberto Maximiano da Silva<sup>1</sup> e André Luís Laforga Vanzela<sup>1,2</sup>

1. Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil, CEP: 86051-990, Caixa Postal 6001.

2. E-mail para correspondência: [avanzela@uel.br](mailto:avanzela@uel.br), [letbio@gmail.com](mailto:letbio@gmail.com)

O gênero *Solanum* possui cerca de 1.400 espécies arbóreo-arbustivas e trepadeiras, encontradas preferencialmente nas regiões tropicais, algumas com interesse econômico, como a batata. Em relação às características citogenéticas, este grupo é interessante devido ao fato dos cariótipos serem bastante conservados em número e forma dos cromossomos, com diversidade nos DNAs repetitivos. O objetivo deste estudo foi caracterizar 16 espécies de *Solanum* e duas espécies de gêneros próximos, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora*, utilizando parâmetros citogenéticos (coloração convencional, bandamento C-CMA<sub>3</sub>/DAPI e FISH com sondas DNAr 45S e 5S). Foi observado que todas as espécies apresentaram  $2n = 24$ , confirmando a contagem para as espécies estudadas aqui. Em *Solanum scuticum*, *S. gemellum*, *S. amygdalifolium* e *Lycianthes australe* a contagem foi inédita. Todas as espécies apresentaram núcleos arreticulados com condensação profásica proximal e pouca variação na simetria cariotípica, sendo que *S. corymbiflorum* mostrou cromossomos aproximadamente três vezes maiores em relação às outras espécies. Regiões de heterocromatina ricas em GC (banda C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>) foram encontradas na região terminal de todos os cromossomos de algumas espécies de *Solanum*. Na maioria das espécies, incluindo as dos gêneros próximos, apenas um par foi marcado, enquanto em *S. corymbiflorum* 2 pares foram marcados. Regiões de heterocromatina ricas em AT (banda C-DAPI<sup>+</sup>) foram evidenciadas nas regiões centroméricas de todos os cromossomos em *L. australe* e região centromérica dos dois maiores pares em *S. amygdalifolium*. Sítios de DNAr 45S coincidentes com banda C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (satélites) foram vistas em apenas um par, havendo variação no par portador. No entanto, *S. corymbiflorum* apresentou dois pares cromossômicos com DNAr 45S. A FISH com DNAr 5S mostrou sinais na região pericentromérica de um par cromossômico, geralmente nos braços curtos dos menores cromossomos de cada complemento, com exceção de *S. trachytrichium* que apresentou dois pares marcados. Os resultados indicam que os mecanismos de diferenciação cariotípica envolvem mudanças nos pares portadores dos sítios de DNAr, posição e número de bandas ricas em GC e AT, bem como alterações na forma e no tamanho dos cromossomos e cariótipos. Os resultados em *S. corymbiflorum*, que já fora considerada *Cyphomandra corymbiflora*, podem sugerir que os gêneros *Cyphomandra* e *Solanum* representam dois grupos distintos ao contrário do que sugerem alguns taxonomistas, quando consideram estes um único grupo taxonômico.

**Palavras-chave:** bandamento cromossômico, *Cyphomandra*, DNAr 45S e 5S, *Lycianthes*, *Vassobia*.

## Introdução

O gênero *Solanum* é um dos maiores e mais diversos das angiospermas, sendo economicamente o mais importante da família Solanaceae. Possui cerca de 1.400 espécies desde ervas a pequenas árvores, distribuídas por todo o mundo, sendo que no Novo Mundo ocorrem cerca de 850 espécies (NEE, 1999; CHILD; LESTER, 2001; BOHS, 2005). Estudos citogenéticos em Solanaceae mostram que esta família exhibe números cromossômicos básicos variando de  $x = 7$  a  $x = 13$ , sendo  $x = 12$  o mais comum. Contudo, essa amplitude em número cromossômico parece não ser encontrada em todas as subfamílias de Solanaceae (MOSCONI, 1992).

De uma maneira geral, espécies de Solanaceae têm exibido cariótipos simétricos, com cromossomos metacêntricos a submetacêntricos, independente do gênero e do tamanho dos cromossomos. Estudos feitos em *Capsicum* (MOSCONI, 1993; MOSCONI et al., 1993) e em *Nicotiana* L. (NAKAMURA et al., 2001; KITAMURA et al., 2001) mostraram que a maioria das espécies possui  $2n = 2x = 24$  e que os cariótipos são simétricos com cromossomos meta a submetacêntricos. As espécies de *Solanum* estudadas até o momento também apresentam  $2n = 2x = 24$ , embora séries poliplóides com  $2n = 4x = 48$ ,  $2n = 6x = 72$ ,  $2n = 8x = 96$  sejam frequentes (HUNZIKER, 2001). Além disso, possuem cariótipos compostos por cromossomos semelhantes em tamanho (menores que  $4 \mu\text{m}$ ) e forma (STEBBINS, 1971; BERNARDELLO; ANDERSON, 1990; MOSCONI, 1992; BERNARDELLO et al., 1994; ACOSTA et al., 2005; OBUTE et al., 2006; CHIARINI; BERNARDELLO, 2006).

Estudos com sequências repetitivas de DNA em Solanaceae têm mostrado diferentes padrões de comportamento em diferentes grupos. Nakamura et al. (2001), mostraram que em *Nicotiana kawakamii* ocorrem blocos ricos em AT nos maiores cromossomos submetacêntricos do complemento, permitindo a divisão destes em grupos quanto à posição: (i) terminal do braço longo; (ii) terminal do braço curto e na região subterminal do braço

longo e (iii) terminal e intercalar do braço longo. Moscone et al. (1993) observaram que em *Capsicum*, todos os cromossomos dos complementos exibiam bandas C centroméricas e uma grande variação em relação às bandas terminais. Sequências repetitivas de DNA são reconhecidamente uma fração substancial do genoma nuclear das plantas superiores, o que explicaria a maioria da variação do conteúdo de DNA entre as espécies (FLAVELL, 1986; HESLOP-HARRISON, 2000).

Um fato interessante é que as sequências de DNAr 45S e 5S, umas das maiores e mais bem estudadas famílias de sequências repetitivas em eucariotos e amplamente localizadas nos cromossomos de diferentes grupos de plantas (Lapitan 1992), não foram mapeadas em espécies nativas de *Solanum*, sendo utilizadas apenas espécies cultivadas como *Solanum lycopersicon* (VALLEJOS et al., 1986; LAPITAN et al., 1991; KOMAROVA et al., 2004), *S. bulbocastanum* (DONG et al. 2000) e *S. tuberosum* (VOLKOV et al., 2001; SREBNIK et al., 2002; KOMAROVA et al., 2004). Fregonezi et al. (2006) fizeram hibridação *in situ* com as sondas de DNAr 45S e 5S no gênero *Cestrum* e mostraram que estes segmentos (genes) evolutivamente conservados são agrupados em *tandem*, porém, o conjunto varia em tamanho, posição e par cromossômico entre as espécies, sendo considerados importantes marcadores cromossômicos para estudos citogenéticos e evolutivos, como anteriormente sugerido por Heslop-Harrison (2000).

Análises de filogenia molecular têm alterado substancialmente a organização taxonômica de grupos acerca de *Solanum*, como por exemplo, a inclusão de *Cyphomandra* como uma seção de *Solanum* ao mesmo tempo em que grupos morfológicamente mais próximos como *Lycianthes* encontram-se fora da circunscrição em *Solanum* (OLMSTEAD; PALMER, 1992 1997; BOHS; OLMSTEAD, 1997, 1999; OLMSTEAD et al., 1999; BOHS, 2004, 2005). Contudo, a análise citogenética parece ir à contramão dos trabalhos filogenéticos que empregam poucos genes extra-genômicos. Para entender e contribuir melhor com estas

relações taxonômicas, este trabalho teve como objetivo geral a caracterização cariotípica de algumas espécies de *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora* (como grupo externo), utilizando metodologias de coloração convencional e técnicas de bandamento cromossômico (bandamento C-CMA<sub>3</sub>/DAPI), bem como a localização de segmentos repetidos de DNA (DNAr 45S e 5S) pela técnica de hibridação *in situ*. Estas informações também são úteis para avaliar o nível de organização cariotípica, bem como as diferenças e similaridades cariotípicas entre as espécies aqui relacionadas.

## **Materiais e métodos**

### Material botânico

Os exemplares de *Solanum*, *Lycianthes*, *Vassobia* e as sementes de cada espécie estudada foram coletados em diferentes localidades nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul, e cultivados em tubetes e vasos no viveiro de mudas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas – LABRE. Foram utilizados pelo menos três indivíduos de cada espécie para as análises citogenéticas. Amostras herborizadas encontram-se registradas no Herbário FUEL, da Universidade Estadual de Londrina (Tabela 1). As espécies foram arranjas em seções de acordo com a classificação taxonômica de Nee (1999).

## Análise convencional

Para a obtenção de lâminas foram utilizados meristemas radiculares, pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína 2 mM por uma hora a temperatura ambiente, seguido de quatro horas a 14°C. As amostras foram, fixadas em etanol:ácido acético (3:1, v:v), à temperatura ambiente, por até 12 horas. Em seguida, as raízes foram diretamente utilizadas no preparo de lâminas ou mantidas a -20°C até o uso. Para a coloração convencional as raízes foram digeridas em uma solução enzimática contendo celulase 4% e pectinase 40% por uma hora à 37°C. Em seguida, foram hidrolisadas em HCl 1M por 10 min à 60°C, dissecadas em uma gota de ácido acético 45% e esmagadas. As lamínulas foram retiradas após congelamento em nitrogênio líquido. A coloração das lâminas foi feita em Giemsa 2% e as lâminas permanentes montadas com Entellan (Merck).

A caracterização dos cariótipos foi determinada utilizando os seguintes parâmetros: relação de braços, fórmula cariotípica haplóide (FCH), tamanho do lote haplóide (TLH) em  $\mu\text{m}$  e dois índices de simetria, sendo o **TF%** calculado de acordo com Huziwara (1962) (Tabela 1) e o **R**, obtido pela razão entre o comprimento absoluto ( $\mu\text{m}$ ) do maior par cromossômico dividido pelo menor par. Os tipos cromossômicos foram classificados conforme a nomenclatura proposta por Guerra (1986) e as categorias de simetria foram determinadas de acordo com Stebbins (1971).

## Bandamento cromossômico

A heterocromatina foi detectada de acordo com o protocolo descrito por Schwarzacher et al. (1980), com modificações. Para tal, lâminas envelhecidas por três dias, sofreram três tratamentos: (i) ácido acético 45% à 60°C por 10 min, (ii) solução saturada de hidróxido de

bário 5% à temperatura ambiente por 10 min e (iii) 2×SSC à 60°C por 80 minutos. Após um novo envelhecimento de três dias, as lâminas foram coradas com CMA<sub>3</sub> (0,5 µg/µL) por 90 minutos e em seguida com DAPI 2 µg/µL por meia hora. Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada, secas com ar e montadas com um meio composto por glicerol/tampão McIlvaine (pH 7.0) 1:1, contendo MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM.

#### Hibridação *in situ* com fluorocromos (FISH)

A hibridação *in situ* foi realizada de acordo com Heslop-Harrison et al. (1991) e Cuadrado e Jouve (1994), com modificações. Foram utilizadas as sondas de trigo: pTa71 contendo a sequência de DNAr 45S e pTa794 contendo a sequência de DNAr 5S, marcadas com biotina ou digoxigenina por *nick translation*. As lâminas foram tratadas com uma solução de RNase (100 µg/mL) por 1 hora, lavadas com 2×SSC, pós-fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos e desidratadas em uma série alcoólica (70% - 100%), todos a temperatura ambiente. Sobre cada lâmina foram aplicados 32 µL de uma mistura de hibridação contendo 100 a 200 ng de cada sonda marcada (3 µL), formamida 100% (15 µL), polietilenoglicol 50% (6 µL), 3 µL de 20×SSC (pH 7,0), 1 µL de DNA de timo de bezerro fragmentado (100 ng) e SDS a 10% (1 µL). A mistura de hibridação foi desnaturada a 70°C por 10 min e imediatamente colocada no gelo por cinco minutos.

Os cromossomos e a sonda foram desnaturados simultaneamente em um termociclador a 90°C por 10 min, 50°C por 10 min e 38°C por 5 min. Em seguida, as lâminas foram colocadas em uma câmara úmida a 37°C por pelo menos 12 horas. As lavagens pós-hibridação foram feitas em 2×SSC, formamida 20% em 0,1×SSC, 0,1×SSC, 2×SSC e 4×SSC/Tween20 0,2%, todos a 37°C por 5 min sob agitação. As sondas foram detectadas com uma solução contendo avidina/FITC (verde) 1:99 em BSA 5%, quando apenas uma das

sondas foi empregada na FISH ou então com uma mistura contendo avidina/FITC (verde) 1:98 e anti-digoxigenina/rodamina (vermelho) 1:98 em BSA 5%, para a detecção dupla. Em seguida foram feitas duas lavagens pós-deteção com 4×SSC/Tween20 2%, por 10 min à temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram contra-coradas e montadas simultaneamente com antifade: 23 µL de antifade (1,4-diaza- bicyclo (2.2.2)-octane (2,3%), Tris HCl 20 mM, pH 8.0 (2%) e Glicerol (90%), em água destilada), 1 µL de DAPI (2 µg/mL) e 1 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM).

Todas as imagens foram adquiridas em um microscópio de epifluorescência Leica DM 4500 B, equipado com uma câmera DFC 300FX e com o programa IM50 4.0, também da Leica. As cinco melhores metáfases de cada preparação foram utilizadas na montagem dos idiogramas, utilizando o programa Micro Measure 3.3 (<http://www.biology.colostate.edu/MicroMeasure/>). Os idiogramas foram construídos com o auxílio do programa Corel Draw 12.

## Resultados

### Análise convencional

A análise citogenética por coloração convencional mostrou que as espécies de *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora* possuem núcleos interfásicos arreticulados e com condensação proximal (Figuras 1E, 1I e 1Q). Todas as espécies apresentaram número cromossômico constante ( $2n = 2x = 24$ ) e cariótipo com cromossomos pequenos, medindo em torno de 2 µm (Figuras 1 e 6; Tabela 1). Além disso, houve a predominância de cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos. Uma exceção em relação ao tamanho foi *Solanum corymbiflorum*, que mostrou cromossomos maiores em relação às

outras espécies (cerca de 6  $\mu\text{m}$ ), porém, com simetria cariotípica bem parecida às demais espécies (Tabela 1, Figuras 1R e 6I).

Análise citogenética mostrou que não há uma correlação clara entre características cariotípicas e os agrupamentos dentro e entre as seções de Nee (1999), portanto, a descrição dos dados segue um agrupamento de espécies pelas similaridades entre as fórmulas cariotípicas independente das seções. Nos subgêneros *Leptostemonum* e *Solanum* houve a predominância de cromossomos metacêntricos em relação aos submetacêntricos (Figura 6; Tabela 1). Entretanto, a fórmula cariotípica mais freqüente foi de  $6m + 6sm$ , observada em *S. artropurpureum*, *S. sisymbriifolium*, *S. trachytrichium*, *S. granulosoleprosum*, *S. corymbiflorum* e *Lycianthes australe* (Figuras 6C, 6D, 6L, 6M, 6I e 6Q; Tabela 1). Apesar de possuírem formas cromossômicas semelhantes, estas espécies apresentaram diferenças no tamanho do lote haplóide, variando de 13,5  $\mu\text{m}$  em *S. granulosoleprosum* a 77,88  $\mu\text{m}$  em *S. corymbiflorum* (Tabela 1).

A fórmula cariotípica  $7m + 5sm$  foi observada em *S. paniculatum*, *S. pseudocapsicum* e *S. mauritanum* (Figuras 6E, 6K e 6N) variando de 19,32  $\mu\text{m}$  a 21,07  $\mu\text{m}$  (Tabela 1) e a fórmula  $8m + 4sm$  foi observada em *S. guaraniticum*, *S. scuticum* e *S. amygdalifolium* (Figuras 6F, 6G e 6P). A variação no tamanho do complemento haplóide entre essas últimas espécies foi de 13,08  $\mu\text{m}$  em *S. amygdalifolium* a 25,87  $\mu\text{m}$  em *S. scuticum* (Tabela 1). Duas espécies não foram agrupadas com as demais por possuírem fórmulas bastante distintas. *Solanum viarum* (Figura 6A) exibiu  $11m + 1sm$  e complemento haplóide com 18,14  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). *Solanum americanum* (Figura 6J) apresentou  $10m + 2sm$  e complemento haplóide com 22,39  $\mu\text{m}$  (Tabela 1).

As duas únicas espécies que apresentaram a maioria dos cromossomos submetacêntricos foram *S. gemellum* com  $5m + 7sm$  (Figura 6O) e *S. palinacanthum* com  $3m + 9sm$  (Figura 6B), além do tamanho de seus complementos haplóides estarem dentre os

maiores entre as espécies estudadas (25,74  $\mu\text{m}$  e 27,9  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Por fim, a espécie analisada como grupo externo, *Vassobia breviflora*, apresentou a maioria dos cromossomos metacêntricos (9m + 3sm) e tamanho do complemento haplóide igual a 19,63  $\mu\text{m}$  (Figura 6R; Tabela 1), sendo mais similar a *S. americanum*.

Dessa forma, considerando a posição do centrômero e a variação no tamanho cromossômico, os cariótipos das espécies estudadas se mostraram simétricos, com a maioria classificada nas categorias 1A e 2A de índice de assimetria proposta por Stebbins (1971), como pode ser visto na Tabela 1. A espécie *S. palinacanthum*, em particular, foi a única classificada na categoria 3A, por possuir a maioria dos cromossomos de seu complemento do tipo submetacêntrico com razão de braços e razão entre os pares maior e menor, menor que a proporção 2:1 (Tabela 1; Figuras 1F, 6B e 7).

#### Bandamento C-CMA<sub>3</sub>/DAPI

O bandamento cromossômico mostrou dois principais padrões de distribuição da heterocromatina, quando comparados o número, a posição e a composição de bases. Em *Vassobia breviflora* (Figuras 2Q e 6R) e dentro dos subgêneros *Leptostemonum* e *Solanum*, algumas das espécies estudadas (*S. sisymbriifolium*, *S. guaraniticum*, *S. scuticum*, *S. variabile*, *S. pseudocapsicum* e *S. americanum*) mostrou bandas C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> na região terminal de todos os cromossomos do complemento, além de um bloco maior associado ao satélite (Figuras 2E, 2I, 2K, 2O, 2S e 6A-R), enquanto que nas outras espécies (*S. viarum*, *S. artropurpureum*, *S. amygdalifolium*, *S. trachytrichium*, *S. granulosoleprosum*, *S. mauritanum*, *S. gemellum* e *Lycianthes australe*) as bandas C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> foram observadas apenas como um bloco associado ao satélite (Figuras 2A, 2C, 2G, 2U, 2W, 2Y, 3C, 3E e 6A, C, L, M, N, O, P, Q). *Solanum*

*palinacanthum* e *S. paniculatum* mostraram uma distribuição diferenciada da heterocromatina. *Solanum palinacanthum* exibiu banda terminal C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> associada ao satélite no par 10, *dots* proximais centroméricos nos braços longos e terminais nos braços curtos dos pares submetacêntricos (com exceção dos pares 4 e 5 que possuem apenas *dots* proximais nos braços longos), além de *dots* intersticiais nos dois braços cromossômicos dos pares metacêntricos 1, 2 e 9 (Figuras 3G e 6B). *Solanum paniculatum* exibiu todos os cromossomos metacêntricos com bandas C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> terminais e todos os cromossomos submetacêntricos (pares 3, 6, 8, com exceção do par 11) com bandas C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> terminais nos braços curtos, além de *dots* proximais nos braços longos (Figuras 2M e 6E). Dentro da seção *Pachyphylla*, *Solanum corymbiflorum*, apresentou dois pares cromossômicos contendo bandas C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> terminais, no primeiro par metacêntrico associado ao satélite e no braço curto do décimo par submetacêntrico (Figuras 3A e 6I). Com exceção de *Lycianthes australe* que apresentou bandas C-DAPI<sup>+</sup> na região centromérica de todos os cromossomos (Figuras 3F e 6Q), e *S. amygdalifolium* que mostrou bandas C-DAPI<sup>+</sup> na região centromérica dos dois maiores pares cromossômicos (Figuras 2H e 6P), todas as outras espécies não apresentaram bandas C-DAPI (Figuras 2B, 2D, 2F, 2J, 2L, 2N, 2P, 2R, 2T, 2V, 2X, 2Z, 3B, 3D, 3H e 6).

#### FISH com as sondas de DNAr

A hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 45S mostrou que em *Solanum* e em *Lycianthes australe* a sonda localizou dois sítios terminais de hibridação (Figuras 4A-H, 5A-H, 6A-H e 6J-Q). Contudo, tais sinais diferiram em localização entre os cariótipos. Os sítios de hibridação com DNAr 45S coincidiram com os satélites e com as bandas C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (Figura 6). Das espécies de *Solanum*, apenas em *S. corymbiflorum* a sonda de DNAr 45S

hibridou em dois pares cromossômicos. Um sítio foi localizado na região do satélite no par 1 metacêntrico, e o outro na região terminal do braço curto do par 10 submetacêntrico (Figuras 5I e 6I). Da mesma maneira, *Vassobia breviflora* exibiu dois pares cromossômicos contendo sítios de DNAr 45S, associado ao satélite do par 11 e na região proximal/centromérica do par 9 (Figuras 4I e 6R).

FISH com a sonda de DNAr 5S mostrou sinais de hibridação variáveis em tamanho e localização nas diferentes espécies. Em *S. palinacanthum*, *S. guaraniticum*, *S. scuticum* e *S. pseudocapsicum* a hibridação *in situ* evidenciou sinais sempre no par 9, o qual variou quanto ao tipo cromossômico (Figuras 6B, 6F, 6G e 6K). *Solanum palinacanthum* exibiu o sinal na região intersticial (Figuras 5G e 6B) e em *S. guaraniticum*, o sinal foi visto na região intersticial mais próxima do centrômero do par metacêntrico (Figuras 5F e 6F). *Solanum scuticum* e *S. pseudocapsicum* apresentaram os sinais de hibridação nas regiões proximal de pares submetacêntricos, sendo no braço longo (Figuras 5E e 6G) e no braço curto (Figuras 5B e 6K), respectivamente. Em *S. paniculatum*, a hibridação com sonda de DNAr 5S evidenciou um sinal proximal no braço curto do par 8 submetacêntrico (Figuras 5D e 6E). *Solanum corymbiflorum* e *S. mauritianum* mostraram sinais na região proximal do par 8 (Figuras 5I e 6I) e do par 12 (Figuras 5C e 6N), respectivamente, sendo ambos metacêntricos. *Lycianthes australe*, por sua vez, mostrou estes mesmos sinais na região intersticial do par 7 metacêntrico (Figuras 5A e 6Q). Diferentemente de todas as espécies aqui estudadas, *Solanum trachytrichium* apresentou quatro sinais de hibridação com a sonda de DNAr 5S. Estes sítios de DNAr 5S foram localizados na região intersticial do braço longo do par 5 e na região terminal do par 8 (Figuras 5H e 6L).

## Discussão

### Análise citogenética convencional

A análise convencional mostrou que as espécies de *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora* apresentaram  $2n = 24$  cromossomos, concordando com os números disponíveis no *Index to Plant Chromosome Numbers* (<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>), do Missouri Botanical Garden, U.S.A, para o gênero *Solanum*. Este número foi confirmado para a maioria das espécies estudadas aqui. Para *Solanum scuticum*, *S. gemellum*, *S. amygdalifolium* e *Lycianthes australe* a contagem foi inédita. Cerca de 50% das espécies de Solanaceae apresentam números múltiplos de  $x = 12$ , o qual é considerado o número básico para o grupo (HUNZIKER, 2001; RANDELL; SYMON, 1976). Este número básico também é predominante na subfamília Solanoideae para os gêneros *Triguera*, *Lycopersicon*, *Lycianthes* e *Vassobia* (HUNZIKER, 2001), assim como para *Solanum* (OLMSTEAD et al., 1999; HUNZIKER, 2001, ACOSTA et al., 2005). Somente duas espécies da seção *Acanthophora* apresentaram  $2n = 22$ , *Solanum mammosum* e *S. platense* (CHIARINI; BERNARDELLO, 2006). Números diferentes de  $x = 12$  foram descritos em grupos como *Petunia*, com  $x = 7$  (RAVEN, 1975) e *Fabiana*, com  $x = 9$  (HUNZIKER, 2001) bem como na subfamília Cestroideae, onde  $x = 8$  predomina (OLMSTEAD et al., 1999; HUNZIKER, 2001).

A análise convencional também mostrou que os núcleos são invariavelmente arreticulados e que a condensação profásica é proximal em todas as espécies de *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora*. Geralmente, espécies com cromossomos pequenos, menores que 3  $\mu\text{m}$ , possuem núcleos arreticulados e com condensação proximal em prófase (GUERRA, 2000). Nossos resultados mostraram que, com exceção de *S. corymbiflorum*, onde o tamanho do lote haplóide foi de 77,8  $\mu\text{m}$ , as demais espécies apresentaram cromossomos

pequenos, cerca de três vezes menores que em *S. corymbiflorum*, com o tamanho do lote haplóide variando entre 13,08  $\mu\text{m}$  e 27,9  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). Uma análise superficial dos idiogramas (Figura 6) dá a falsa impressão de que os cariótipos aqui estudados têm tamanhos similares. No entanto, nossos dados bem como a literatura descrita para outras espécies de *Solanum* e *Lycianthes* mostram que há uma clara variação neste tamanho como 12,14  $\mu\text{m}$  a 18,84  $\mu\text{m}$  (BERNARDELLO; ANDERSON, 1990), 24,8  $\mu\text{m}$  a 35,05  $\mu\text{m}$  (BERNARDELLO et al., 1994), 16,30  $\mu\text{m}$  a 38,75  $\mu\text{m}$  (ACOSTA et al., 2005) e 17,08  $\mu\text{m}$  a 33,71  $\mu\text{m}$  (CHIARINI; BERNARDELLO, 2006). Apesar de não ter sido feito nenhum teste estatístico com os nossos dados e os da literatura para comprovar se tal variação é significativa, nossos resultados sugerem que os cariótipos das diferentes espécies de *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora* se diferenciaram por perdas e/ou ganhos de segmentos de DNA, já que o número não variou.

Diferenças no tamanho cromossômico têm sido usadas para delimitar alguns grupos de solanáceas. A seção *Pachyphylla* Dunal do subgênero *Bassovia* (Aubl.) Bitter de *Solanum* possui cromossomos muito grandes em relação às demais espécies do gênero, além de possuir anteras com conectivos espessados e glandulosos. Estas características morfológicas e cariotípicas levaram alguns autores a considerar tal grupo como um gênero independente, *Cyphomandra* Mart. ex Sendtn. (BOHS, 1989, 1994; HUNZIKER, 2001; CHILD; LESTER, 2001). Contudo, análises de filogenia molecular utilizando genes conservados de cloroplasto, *ndhF* e *rbcL*, com enfoque em *Solanum* e gêneros relacionados, estabeleceram que *Cyphomandra* encontra-se filogeneticamente dentro do gênero *Solanum* (OLMSTEAD; PALMER, 1992; BOHS, 1995; OLMSTEAD; PALMER, 1997; BOHS; OLMSTEAD, 1997, 1999; OLMSTEAD et al., 1999; BOHS, 2004, 2005).

Nee (1999) adotou as modificações propostas pela filogenia molecular e aderiu à transferência dos táxons de *Cyphomandra* para *Solanum*, como previamente estabelecida por

Bohs (1995). *Solanum corymbiflorum*, anteriormente chamada de *Cyphomandra corymbiflora* Sendtn. e agora pertencente à seção *Pachyphylla* de *Solanum*, exibiu cromossomos grandes (6  $\mu\text{m}$ , em média) e o maior tamanho de lote haplóide (77,88  $\mu\text{m}$ ), como descrito anteriormente. A análise citogenética convencional sustenta que as espécies da seção *Pachyphylla* poderiam ser mantidas no gênero *Cyphomandra*, como proposto por Child e Lester (2001) e Hunziker (2001). Contudo, se tais espécies realmente pertencerem a *Solanum*, como indicam os estudos de filogenia molecular acima citados, teremos que admitir que os cariótipos da seção *Pachyphylla* se diferenciaram das demais espécies do gênero por acúmulo substancial de DNA, sem mudanças substanciais no número e na forma dos cromossomos (veja a Figura 6I).

Este conjunto de informações contrastantes levanta dúvidas sobre o valor das características diagnósticas utilizadas para alocar *Chyphomandra* dentro do gênero *Solanum*. Dessa maneira, nosso trabalho permite levantar a seguinte questão: será que esta análise filogenética baseada no sequenciamento de genes conservados de cloroplasto não deveria levar em consideração a reunião de características morfológicas exclusivas, como anteras com conectivos espessados e glandulosos e cariótipos com cromossomos muito grandes em relação aos do gênero *Solanum*?

Todos os cariótipos das espécies de *Solanum*, de *Lycianthes australe* e de *Vassobia breviflora* mostraram cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, sendo os menores cromossomos dos complementos geralmente submetacêntricos, exceto para *Solanum variabile* e *S. americanum* que apresentaram os menores cromossomos metacêntricos. Isto implica que a diminuição do tamanho cromossômico dentro do complemento foi acompanhada por uma mudança na posição do centrômero, quando comparado com os outros cromossomos. Tal tendência também pode ser observada nos idiogramas apresentados por Bernardello e Anderson (1990), Pringle e Murray (1991), Bernardello et al. (1994), Acosta et al. (2005) e Chiarini e Bernardello (2006).

As únicas espécies estudadas neste trabalho que apresentaram a maioria dos cromossomos do tipo submetacêntricos foram *Solanum gemellum* da seção *Extensum* e *S. palinacanthum* da seção *Acanthophora*. Casos similares foram descritos por Acosta et al. (2005) para *S. tucumanense* e por Chiarini e Bernardello (2006) para *S. aenictum*. *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora* também seguem a tendência de possuir a maioria dos cromossomos do complemento do tipo metacêntrico. Cariótipos com cromossomos telocêntricos ou acrocêntricos são atípicos em espécies de *Solanum*, sendo reportados somente para *S. muricatum* e *S. basendopogon* da seção *Basarthrum* (BERNARDELLO; ANDERSON 1990). Pringle e Murray (1991) também observaram que os cariótipos de espécies anteriormente descritas como *Cyphomandra* possuem, ao menos, um par acrocêntrico em seus complementos.

Embora pequenas variações sejam encontradas na composição cariotípica em relação ao tamanho e morfologia cromossômica, os cariótipos das espécies de *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora* foram classificados nas categorias 1A ou 2A de assimetria de Stebbins (1971), por serem altamente simétricos assim como em outras espécies de *Solanum* (BERNARDELLO; ANDERSON, 1990; BERNARDELLO et al., 1994; ACOSTA et al., 2005; CHIARINI; BERNARDELLO, 2006). Dentro do subgênero *Leptostemonum*, Acosta et al. (2005) observaram que espécies da seção *Acanthophora* mostraram os cariótipos mais assimétricos, concordando com nossos resultados, uma vez que *S. palinacanthum*, também da seção *Acanthophora*, foi a única classificada na categoria 3A.

A análise dos índices de simetria **TF %** e **R** mostrou que dentre as espécies analisadas aqui, *S. guaraniticum* e *S. variabile* possuem os cariótipos mais simétricos, com um alto valor de **TF %**, devido a maioria dos cromossomos ser metacêntricos, e um baixo **R**, ou seja, com o primeiro par aproximadamente do mesmo tamanho do último par (Figura 7). *Solanum viarum*, *S. americanum*, *S. pseudocapsicum*, *S. paniculatum* e *S. scuticum* da seção *Torva*, *Lycianthes*

*australe* e *Vassobia breviflora* se destacaram por possuírem a maioria dos cromossomos metacêntricos, porém, o primeiro par consideravelmente maior que o último par. *Solanum palinacanthum* e *S. gemellum* apresentaram os cariótipos mais assimétricos com os menores valores de **TF%**, pois apesar de possuírem os primeiros e últimos pares cromossômicos de tamanhos aproximados, a maioria dos cromossomos foi do tipo submetacêntrico (Figura 7).

A presença de um par cromossômico com satélite é comum na maioria das espécies de *Solanum* (BERNARDELLO; ANDERSON, 1990; BERNARDELLO et al., 1994; ACOSTA et al., 2005). Essa tendência também foi observada nas espécies do presente estudo, que apresentaram apenas um par de cromossomos com satélite. A mesma situação foi vista na seção *Leptostemonum*, exceto para *S. pseudolulo* Heiser, que possui dois pares cromossômicos com satélites e as espécies do complexo *S. indicum* com um máximo de três pares com satélites (BERNARDELLO et al., 1994). Com relação ao tipo cromossômico, os satélites em *Solanum* se localizam em cromossomos metacêntricos (ACOSTA et al., 2005), enquanto no subgênero *Leptostemonum* se localizam em cromossomos metacêntricos e no braço curto de cromossomos submeta e subtlocêntricos (BERNARDELLO et al., 1994; CHIARINI; BERNARDELLO, 2006). Da mesma maneira, a maioria das espécies estudadas aqui apresentou os satélites em braços curtos de cromossomos submetacêntricos. Além disso, o par portador do satélite está entre os quatro últimos do complemento, com exceção de *S. corymbiflorum* (par 1), *Lycianthes australe* (par 2), *S. americanum* (par 3) e *S. gemellum* (par 6). Ao contrário do que foi visto na maioria das espécies aqui estudadas, Acosta et al. (2005) e Chiarini e Bernardello (2006) observaram que o par com satélite está entre os cinco maiores cromossomos do complemento das espécies de *Solanum*.

## FISH com as sondas de DNAr 45S e 5S

A aplicação da hibridação *in situ* com a sonda pTa71 (DNAr 45S de trigo) confirmou os sítios de satélites observados pelas técnicas convencional e de bandamento C-CMA<sub>3</sub> nas espécies estudadas aqui. Esta localização segue o padrão de distribuição comum à maioria das espécies vegetais, ocorrendo sempre nas regiões terminais dos cromossomos (Lima de Faria 1976). A localização terminal dos sítios de DNAr 45S também foi vista em outras solanáceas como *Solanum bulbocastanum* (DONG et al., 2000), *Capsicum* (MOSCONE et al., 1995), *Nicotiana* (YONG LIM et al., 2000) e *Cestrum* (FREGONEZI et al., 2006), bem como em outros grupos vegetais como *Hordeum* L. (LEITCH; HESLOP-HARRISON, 1992), *Sorghum* Moench (SANG; LIANG, 2000) *Helianthus* L. (VANZELA et al., 2002) e *Maxillaria* Ruiz e Pav. (CABRAL et al., 2006). Apesar da localização terminal do DNAr 45S ter sido comum a muitas espécies de plantas, o número de sítios foi variável. A maioria das espécies de *Capsicum* estudada por Moscone et al. (1995) possui dois sítios de hibridação assim como as espécies do presente estudo, com exceção de *S. corymbiflorum* e *Vassobia breviflora*. Em *Cestrum* (FREGONEZI et al., 2006) e *Hordeum vulgare* L. cv Sultan (LEITCH; HESLOP-HARRISON, 1992) foram observados quatro sítios de hibridação, enquanto em *Sorghum* (SANG; LIANG 2000) e *Maxillaria* (CABRAL et al., 2006) variou de dois a quatro sítios em diferentes espécies.

Embora a FISH não seja uma técnica totalmente quantitativa, a intensidade do sinal pode estar relacionada com o número de cópias dos genes de estruturas similares (LEICHT; HESLOP-HARRISON, 1992). O tamanho dos sítios em *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora* se manteve constante com exceção de *S. corymbiflorum* que apresentou o sinal de DNAr 45S do par 1 metacêntrico maior que o sinal do par submetacêntrico. Assim, diferenças nos tamanhos dos sítios podem refletir diferenças intraespecíficas no número de

repetições por *cístrons*, assim como acontece em *Cestrum* (FREGONEZI et al., 2006).

A hibridação com a sonda pTa794 (DNAr 5S de trigo) mostrou sinais na região pericentromérica, geralmente nos braços curtos dos menores cromossomos de cada complemento. A localização pericentromérica do DNAr 5S também ocorre em *S. bulbocastanum*, porém, no maior cromossomo do complemento (DONG et al., 2000). Em outros gêneros como *Nicotiana* (YONG LIM, et al. 2000; KITAMURA et al., 2001), *Lycopersicon* (LAPITAN et al., 1991) e *Cestrum* (FREGONEZI et al., 2006) sítios de DNAr 5S também foram localizados preferencialmente na região pericentromérica, porém nos braços longos e curtos dos cromossomos. Estas informações indicam que estas sequências possuem uma localização conservada nestes cariótipos, seguindo a teoria do campo cromossômico de Lima-de-Faria (1976) para regiões preferenciais de ocorrência e funcionamento de alguns segmentos de DNA. Independente do número de sítios de DNAr 5S localizados pela sonda, já que *S. trachytrichium* exibiu quatro sítios, estes também seguem o mesmo padrão descrito acima.

#### Bandamento C-CMA<sub>3</sub>-DAPI

O bandamento cromossômico nas espécies de *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora* mostrou dois principais padrões de distribuição da heterocromatina, quando comparados o tamanho, o número, a posição e a composição de bases: (i) bandas C-CMA<sub>3+</sub> na região terminal de todos os cromossomos do complemento, além de um bloco maior associado ao satélite e (ii) bandas C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> apenas como um bloco associado ao satélite. Esta distribuição da heterocromatina segue o modelo de dispersão equilocal/equidistante proposto por Schweizer e Loidl (1987). Esses autores observaram que em muitas espécies de plantas há uma predominância de bandas equilocais generalizadas, isto

é, bandas que ocorrem na mesma região em pelo menos 80% dos cromossomos de cada cariótipo. Assim, o padrão de distribuição da heterocromatina observado nas espécies do presente estudo foi equilocal uma vez que os *dots* C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> apareceram preferencialmente na região terminal dos cromossomos.

Esta distribuição equilocal da heterocromatina foi vista em algumas espécies de *Solanum* da seção *Petota* (PIJNAKER; FERWERDA, 1984), porém na região pericentromérica, assim como em outros gêneros de Solanaceae, como em *Capsicum* (MOSCONE et al., 1993) e em *Lycopersicon* (PETERSON et al., 1996), que exibiram a maioria dos cromossomos com bandas C pericentroméricas. Em *Nicotiana*, Merritt (1974) e Nakamura et al. (2001) encontraram bandas C principalmente terminais. Contudo, Fregonezi et al. (2006) encontraram diferentes famílias de heterocromatina em *Cestrum*, porém, algumas equilocais e equidistantes e outras não. Em gêneros de outras famílias como *Helianthus* (VANZELA et al., 2002) e *Hordeum* (LEITCH; HESLOP-HARRISON, 1992) a distribuição equilocal da heterocromatina ocorre principalmente nas regiões proximais dos cromossomos de cada complemento, enquanto diferentes espécies de *Maxillaria* apresentaram bandas com distribuições proximal, intersticial e terminal (CABRAL et al., 2006). Schweizer e Loidl (1987) mostraram que em alguns grupos os blocos de heterocromatina tendem a se distribuir nos braços de diferentes cromossomos a uma distância igual a partir do centrômero (bandas equidistantes). Isto fica bastante evidente quando comparamos a localização física dos blocos C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em *Solanum palinacanthum*. Tal distribuição simétrica foi atribuída à amplificação e à transposição de heterocromatina que ocorre entre heterólogos durante a intérfase de acordo com a disposição de Rabl (veja GUERRA, 2000). Dessa forma, os dois modelos de dispersão da heterocromatina, (i) bandas C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> na região terminal de todos os cromossomos do complemento, além de um bloco maior associado ao satélite (ii) bandas C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> apenas como um bloco maior associado ao satélite, foram observados nas espécies aqui estudadas.

Guerra (2000) comparou os padrões de distribuição de bandas C em mais de 100 espécies de angiospermas, a fim de identificar padrões gerais de distribuição de heterocromatina ou locais preferenciais em que esta pode ocorrer. Ele concluiu que a distribuição das bandas C, além de ser predominantemente equilocal, parece depender, ao menos em parte, do tamanho do cromossomo. Isto porque as bandas proximais, em geral, foram mais comuns nos cariótipos com cromossomos pequenos, como visto em espécies de *Solanum* da seção *Petota* (PIJNAKER; FERWERDA, 1984). Nossos resultados contradizem isso em parte, já que a maioria dos cromossomos de *Solanum* e *Vassobia breviflora* são considerados pequenos por medirem em média 2  $\mu\text{m}$ , e apresentaram distribuição equilocal da heterocromatina na região terminal.

Guerra (2000) também observou que em cariótipos com cromossomos pequenos, a heterocromatina localizada na região telomérica e intersticial são geralmente ricas em GC, enquanto a heterocromatina proximal é geralmente rica em AT, concordando com o tipo heterocromático encontrado nas espécies do presente estudo.

Em conclusão, o mapeamento físico dos diferentes tipos de DNAs repetitivos gerados neste trabalho, quando comparados a outros idiogramas e medidas realizadas para outras espécies do gênero, reforçam a hipótese de que nas espécies de *Solanum* e *Lycianthes australe* as alterações cariotípicas ocorrem principalmente por mudanças nos padrões de amplificação/dispersão de diferentes segmentos de DNAs repetitivos. Contudo, as diferenças no tamanho dos cariótipos encontradas aqui, exceto para *S. corymbiflorum*, de 13,08  $\mu\text{m}$  em *S. amygdalifolium* a 27,90  $\mu\text{m}$  em *S. palinacanthum*, bem como aquelas descritas na literatura, de 12,14  $\mu\text{m}$  (BERNARDELLO; ANDERSON, 1990) a 38,75  $\mu\text{m}$  (ACOSTA et al., 2005), sugerem duas possibilidades: (i) acúmulo ou perda de outras famílias DNAs repetitivos (como por exemplo retrotransposons, SSRs, etc) não estudados nos artigos citados e/ou (ii) discrepâncias quanto aos critérios utilizados nas medições para montagem dos idiogramas

empregados pelos diferentes autores.

Um último aspecto a ser ressaltado, é que neste trabalho consideramos o cariótipo de *Vassobia breviflora* como um elemento externo, pois mesmo possuindo características citogenéticas convencionais semelhantes a *Solanum* e *Lycianthes australe*, esta espécie apresenta aspectos morfológicos evidentemente distintos, como a presença de antera com deiscência longitudinal e ovário com nectário. Já *Lycianthes* e *Solanum* apresentam características morfológicas muito similares, como antera poricida e ovário sem nectário, porém, são taxonomicamente distintos pelo fato de *Lycianthes* apresentar o cálice não dividido em lobos como em *Solanum* (HUNZIKER, 2001). Contudo, *Solanum* e *Lycianthes australe* compartilham das mesmas características citogenéticas como:  $2n = 24$ , núcleos arreticulados com condensação proximal em prófase, cromossomos pequenos, cariótipos de tamanhos semelhantes e simétricos com cromossomos meta e submetacêntricos e presença de dois sítios de hibridação com sonda de DNAr 45S coincidentes com a banda C/CMA<sub>3+</sub> em seus satélites. Se tomarmos como exemplo a circunscrição de *Cyphomandra* dentro de *Solanum*, onde existem mais diferenças morfológicas e citogenéticas contrastantes, do que quando comparado com *Solanum* e *Lycianthes australe*, por que não considerar outras características diagnósticas em novos estudos filogenéticos envolvendo *Lycianthes*, *Cyphomandra* e *Solanum*?

**Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

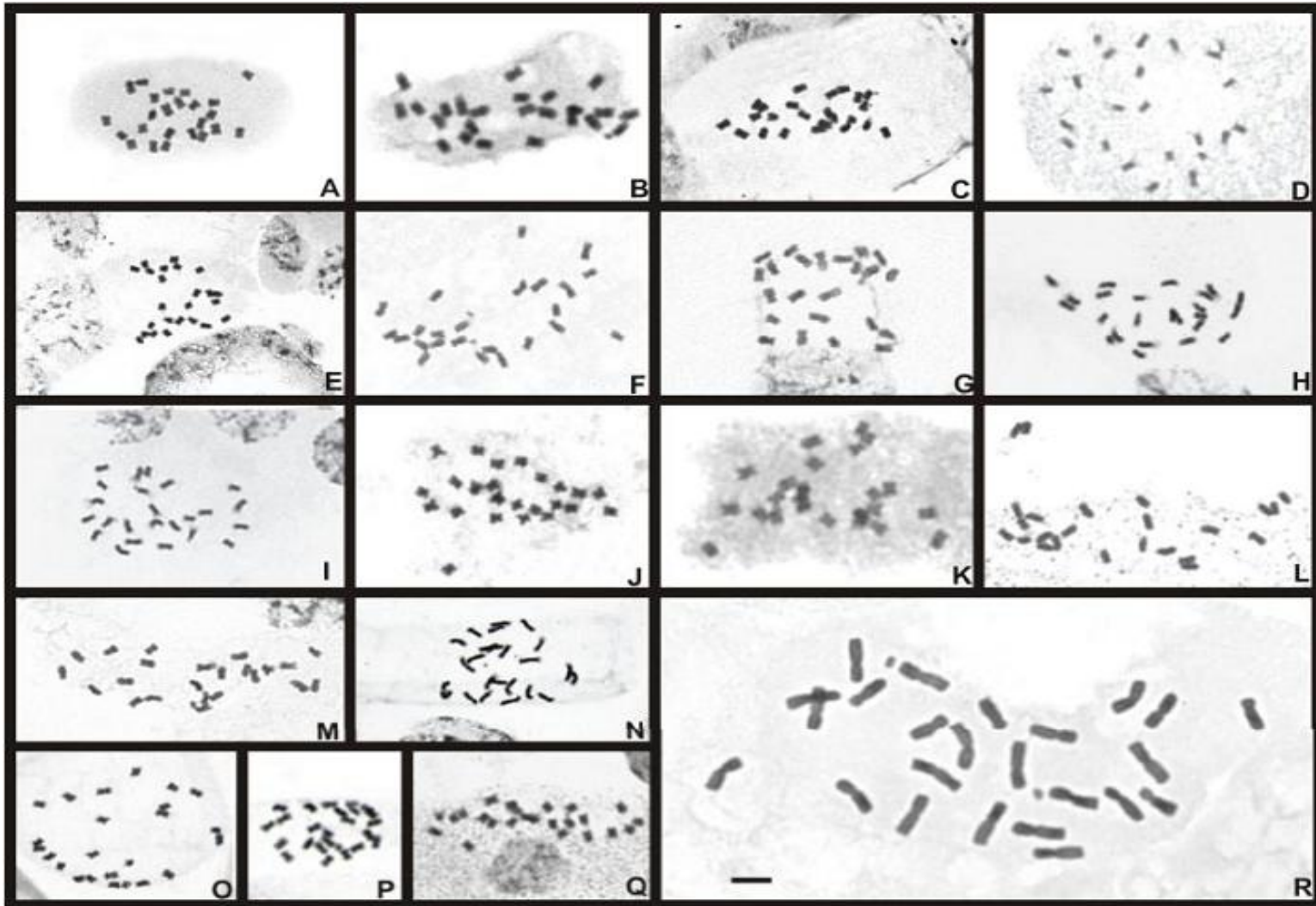


Figura 1. Coloração convencional (Giemsa) em (A) *Solanum americanum*, (B) *S. gemellum*, (C) *S. atropurpureum*, (D) *S. viarum*, (E) *S. granulosoleprosum*, (F) *S. palinacanthum*, (G) *S. pseudocapsicum*, (H) *S. scuticum*, (I) *S. variabile*, (J) *S. trachytrichium*, (K) *S. paniculatum*, (L) *S. mauritanium*, (M) *S. sisymbriifolium*, (N) *Vassobia breviflora*, (O) *S. guaraniticum*, (P) *S. amygdalifolium*, (Q) *Lycianthes australe* e (R) *S. corymbiflorum*. Barra corresponde a 5  $\mu$ m.

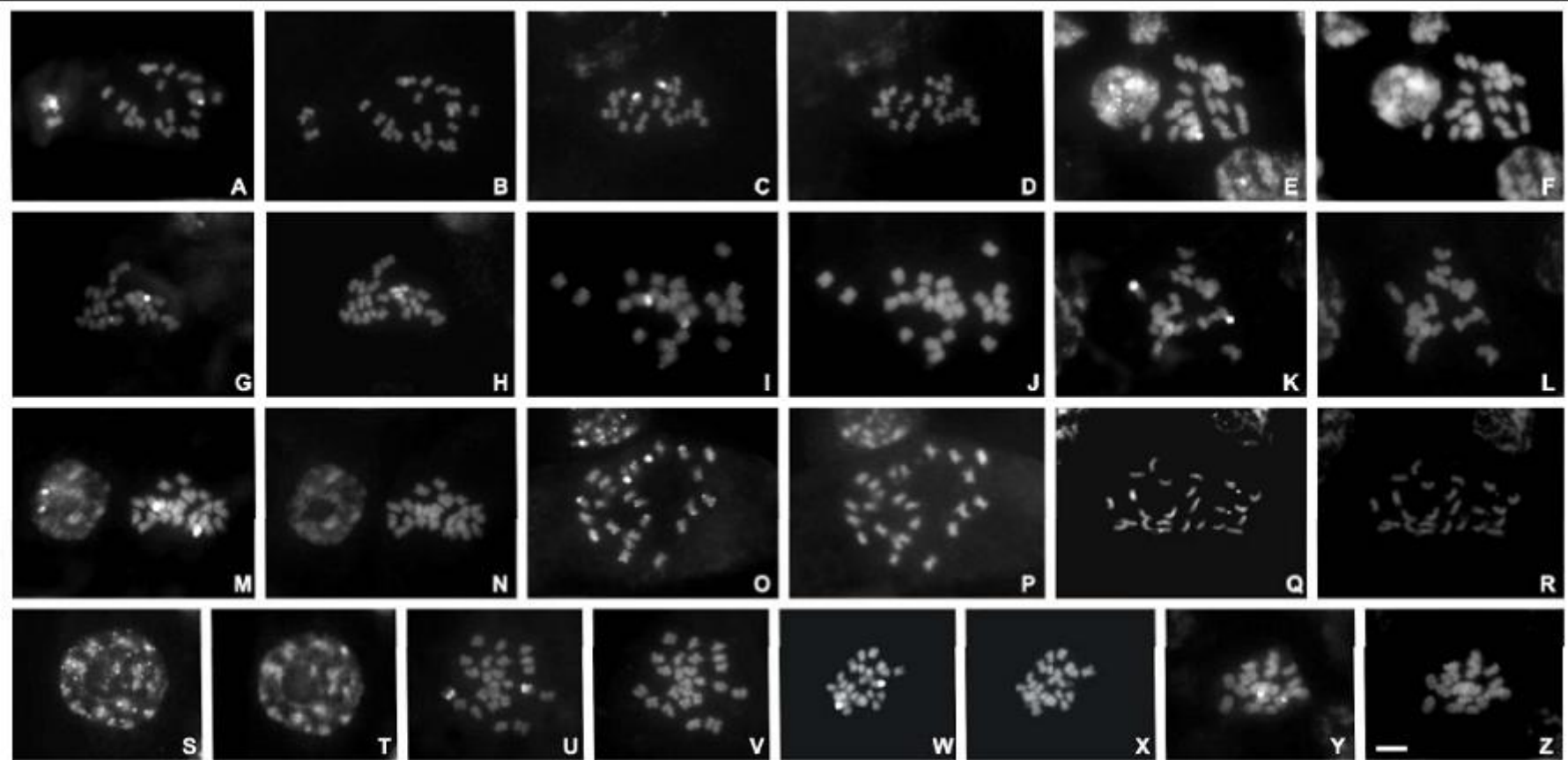


Figura 2. Bandamento C-CMA<sub>3</sub>/DAPI em (A-B) *Solanum viarum*, (C-D) *S. artropurpureum*, (E-F) *S. sisymbriifolium*, (G-H) *S. amygdalifolium*, (I-J) *S. guaranticum*, (K-L) *S. variabile*, (M-N) *S. paniculatum*, (O-P) *S. pseudocapsicum*, (Q-R) *Vassobia breviflora*, (S-T) *S. americanum*, (U-V) *S. trachytrichium*, (W-X) *S. granuloseleprosum* e (Y-Z) *S. mauritanum*. Barra corresponde a 5  $\mu$ m.

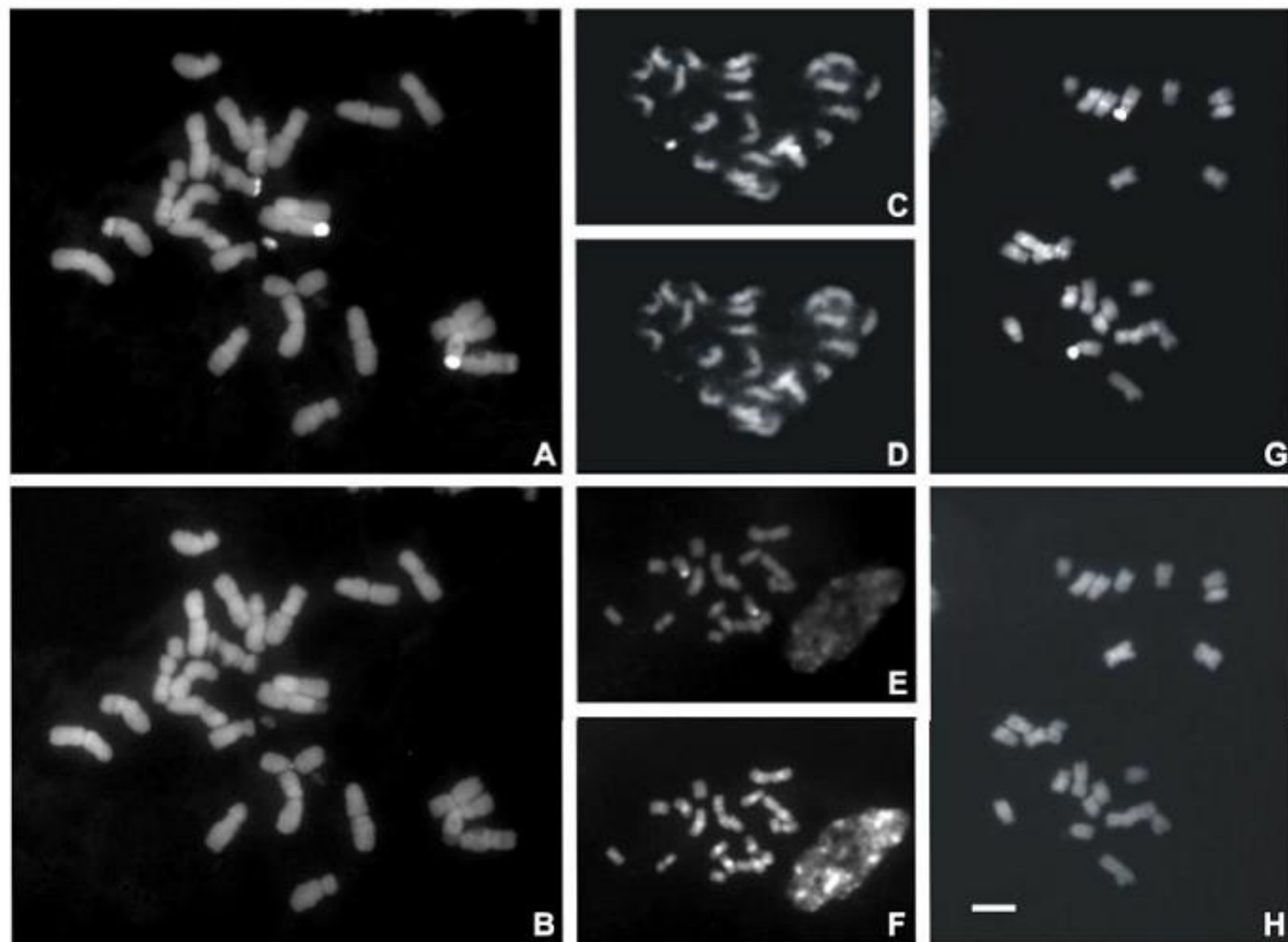


Figura 3. Bandamento C-CMA<sub>3</sub>/DAPI em (A-B) *Solanum corymbiflorum*, (C-D) *S. gemellum*, (E-F) *Lycianthes australe* e (G-H) *S. palinacanthum*. Barra corresponde a 5  $\mu$ m.

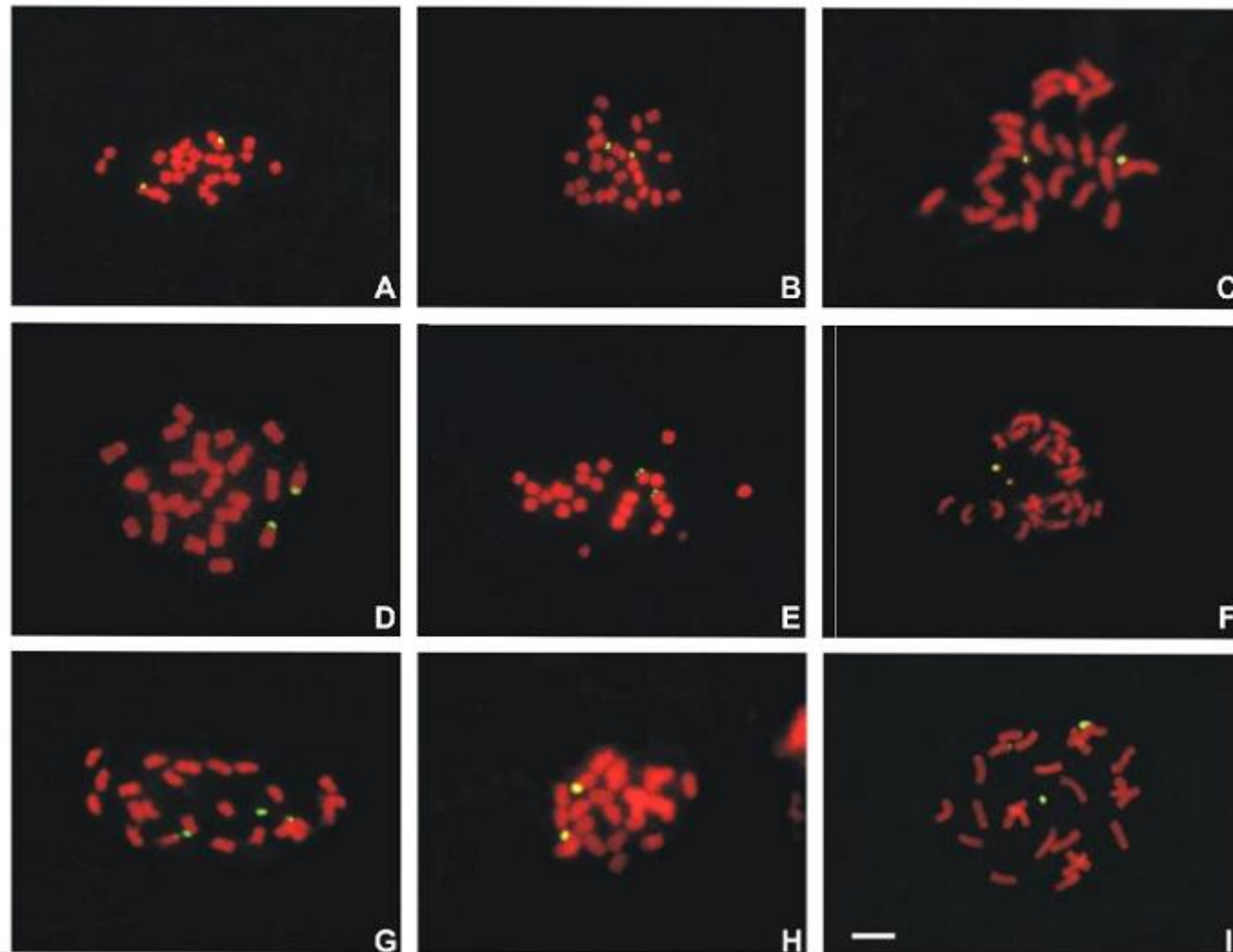


Figura 4. FISH com a sonda de DNAr 45S mostrando dois sítios de hibridação, coincidentes com os satélites em (A) *Solanum viarum*, (B) *S. artropurpureum*, (C) *S. sisymbriifolium*, (D) *S. variabile*, (E) *S. americanum*, (F) *S. amygdalifolium*, (G) *S. gemellum* e (H) *S. granulosooleprosum*. Exceção foi (I) *Vassobia breviflora*, com quatro sinais. Barra corresponde a 5  $\mu$ m.

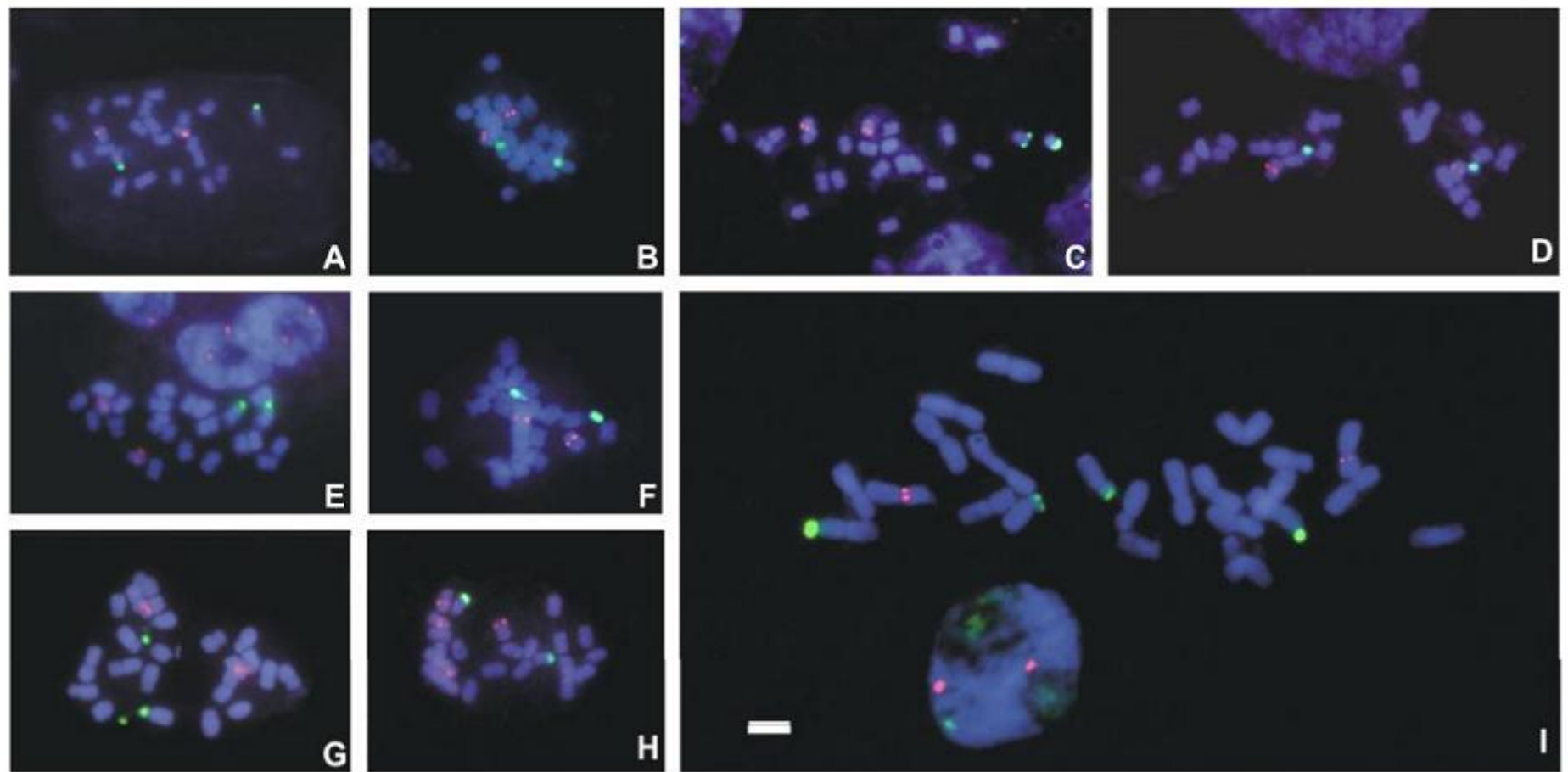


Figura 5. FISH com as sondas de DNAr 4S detectadas com biotina-FITC (verde) e a sonda de DNAr 5S detectada com anti-digoxigenina-rodamina (vermelho) em (A) *Lycianthes australe*, (B) *Solanum pseudocapsicum*, (C) *S. mauritianum*, (D) *S. paniculatum*, (E) *S. scuticum*, (F) *S. guaraniticum*, (G) *S. palinacanthum*, (H) *S. trachytrichium* e (I) *S. corymbiflorum*. Barra corresponde a 5  $\mu$ m.

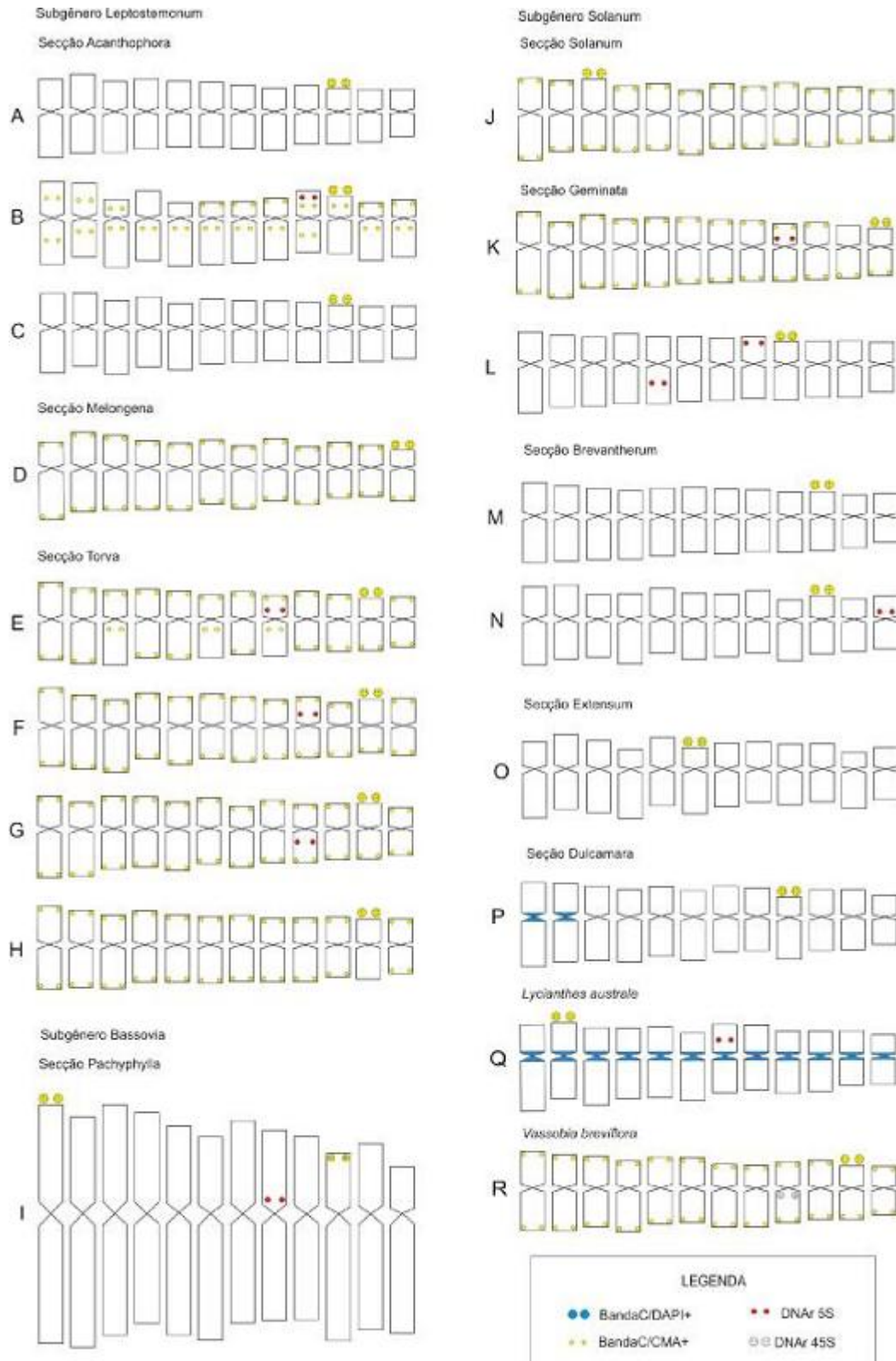


Figura 6. Idiogramas de (A) *Solanum viarum*, (B) *S. palinacanthum*, (C) *S. artropurpureum*, (D) *S. sisymbriifolium*, (E) *S. paniculatum*, (F) *S. guaraniticum*, (G) *S. scuticum*, (H) *S. variabile*, (I) *S. corymbiflorum*, (J) *S. americanum*, (K) *S. pseudocapsicum*, (L) *S. trachytrichium*, (M) *S. granulosoleprosum*, (N) *S. mauritanium*, (O) *S. gemellum*, (P) *S. amygdalifolium*, (Q) *Lycianthes australe* e (R) *Vassobia breviflora*.

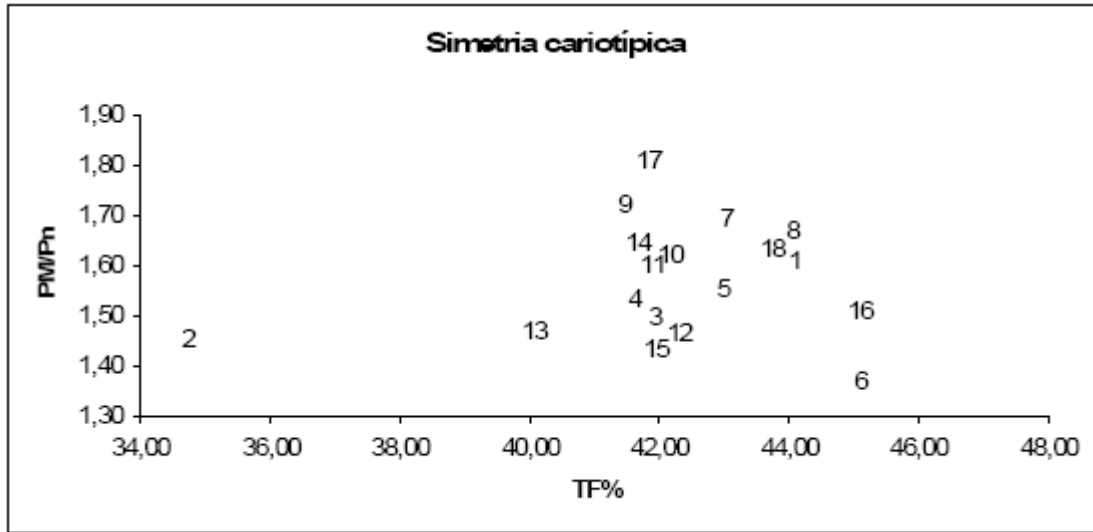


Figura 7. Simetria cariotípica. (1) *Solanum viarum*, (2) *S. palinacanthum*, (3) *S. artropurpureum*, (4) *S. sisymbriifolium*, (5) *S. paniculatum*, (6) *S. guaraniticum*, (7) *S. scuticum*, (8) *S. americanum*, (9) *S. pseudocapsicum*, (10) *S. trachytrichium*, (11) *S. granulosoleprosum*, (12) *S. mauritanium*, (13) *S. gemellum*, (14) *S. amygdalifolium*, (15) *S. corymbiflorum*, (16) *S. variabile*, (17) *Lycianthes australe* e (18) *Vassobia breviflora*.

**Tabela 1.** Características cariotípicas de espécies de *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora*.

| Espécies   | 2n | FCH       | TLH (µm) | R    | TF%   | AC | Localidades e Registro                  |
|--|----|-----------|----------|------|-------|----|---|
| <b>Subgênero <i>Leptostemonum</i> Dunal (bitter)</b> |    |           |          |      |       |    |   |
| <b>Seção <i>Acanthophora</i> Dunal</b>               |    |           |          |      |       |    |   |
| <i>S. viarum</i> Dunal                               | 24 | 11m + 1sm | 18,14    | 1,62 | 43,65 | 1A | Ibiporã, PR, 41933                      |
| <i>S. palinacanthum</i> Dunal                        | 24 | 3m + 9sm  | 27,90    | 1,45 | 34,38 | 3A | Jataizinho, PR, 41938                   |
| <i>S. artropurpureum</i> Schrank                     | 24 | 6m + 6sm  | 23,04    | 1,49 | 41,69 | 2A | Tibagi, PR, 41937                       |
| <b>Seção <i>Cryptocarpum</i> Dunal</b>               |    |           |          |      |       |    |   |
| <i>S. sisymbriifolium</i> Lam.                       | 24 | 6m + 6sm  | 27,41    | 1,53 | 41,28 | 2A | Londrina, PR, 41949                     |
| <b>Seção <i>Torva</i> Nees</b>                       |    |           |          |      |       |    |   |
| <i>S. paniculatum</i> L.                             | 24 | 7m + 5sm  | 19,32    | 1,55 | 42,63 | 1A | Londrina, PR, 41950                     |
| <i>S. guaraniticum</i> A. St. Hil.                   | 24 | 8m + 4sm  | 19,90    | 1,37 | 44,75 | 2A | Faxinal, PR, 41935; Londrina, PR, 41936 |
| <i>S. scuticum</i> M. Nee                            | 24 | 8m + 4sm  | 25,87    | 1,69 | 42,67 | 2A | Londrina, PR, 41934                     |
| <i>S. variabile</i> Mart.                            | 24 | 12m       | 20,50    | 1,51 | 44,63 | 1A | Londrina, PR, 41084                     |
| <b>Subgênero <i>Solanum</i> L.</b>                   |    |           |          |      |       |    |   |
| <b>Seção <i>Solanum</i></b>                          |    |           |          |      |       |    |   |
| <i>S. americanum</i> Mill.                           | 24 | 10m + 2sm | 22,39    | 1,67 | 43,57 | 2A | Londrina, PR, 41939; Ibiporã, PR, 41940 |
| <b>Seção <i>Geminata</i> G. Don.</b>                 |    |           |          |      |       |    |   |
| <i>S. pseudocapsicum</i> L.                          | 24 | 7m + 5sm  | 20,99    | 1,72 | 41,12 | 2A | Londrina, PR, 41941                     |
| <i>S. trachytrichium</i> Bitter                      | 24 | 6m + 6sm  | 15,47    | 1,62 | 41,71 | 1A | Londrina, PR, 41942                     |
| <b>Seção <i>Brevantherum</i> (Seithe) D'Arcy</b>     |    |           |          |      |       |    |   |
| <i>S. granuloseleprosum</i> Dunal                    | 24 | 6m + 6sm  | 13,50    | 1,60 | 41,40 | 1A | Sapopema, PR, 41943                     |
| <i>S. mauritanum</i> Martius ex Sendtn.              | 24 | 7m + 5sm  | 21,04    | 1,46 | 41,70 | 2A | Porto Alegre, RS, 41952                 |
| <b>Seção <i>Extensum</i> D'Arcy</b>                  |    |           |          |      |       |    |   |
| <i>S. gemellum</i> Martius ex Sendtn.                | 24 | 5m + 7sm  | 25,74    | 1,47 | 39,61 | 2A | Londrina, PR, 41953                     |
| <b>Seção <i>Dulcamara</i> (Moench) Dumort</b>        |    |           |          |      |       |    |   |
| <i>S. amygdalifolium</i> Steud.                      | 24 | 8m + 4sm  | 13,08    | 1,62 | 41,37 | 2A | Aquidauana, MS, 42116                   |
| <b>Subgênero <i>Bassovia</i> (Aubl.) Bitter</b>      |    |           |          |      |       |    |   |
| <b>Seção <i>Pachyphylla</i> Dunal</b>                |    |           |          |      |       |    |   |
| <i>S. corymbiflorum</i> (Sendtn.) Bohs               | 24 | 6m + 6sm  | 77,88    | 1,43 | 41,50 | 2A | Sapopema, PR, 41947                     |
| <i>Lycianthes australe</i> (Morton) A.T.Hunz.        | 24 | 6m + 6sm  | 20,02    | 1,81 | 41,38 | 1A | Londrina, PR, 41951                     |
| <i>Vassobia breviflora</i> (Sendtn.) Hunz.           | 24 | 9m + 3sm  | 19,63    | 1,63 | 43,45 | 1A | Londrina, PR, 42117                     |

FCH = fórmula cariotípica haploide; TLH = tamanho do lote haploide; R = razão entre o maior e o menor per cromossômico; AC = Tipo de assimetria cariotípica de acordo com Stebbins (1971)

$$TF\% = \frac{\sum \text{comprimento braços curtos}}{\text{comprimento cromossômico total}} \times 100$$

## Referências

- Acosta M. C., Bernardello G., Guerra M., Moscone E. A. (2005) Karyotype analysis in several South American species of *Solanum* and *Lycianthes rantonnei* (Solanaceae). *Taxon*. 54: 713-723.
- Bernardello L. M., Anderson G. J. (1990) Karyotype studies in *Solanum* section *Basarthrum* (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 77: 420-431.
- Bernardello L. M., Heiser C. B., Piazzano M. (1994) Karyotype studies in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 81: 95-103.
- Bohs L. (1989) *Solanum allophyllum* (Miers) Standl. and the generic delimitation of *Cyphomandra* and *Solanum* (Solanaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 76: 1129-1140.
- Bohs L. (1994) *Cyphomandra* (Solanaceae). *Flora Neotropica*, New York, Monograph. 63: 1-175.
- Bohs L. (1995) Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and its species to *Solanum*. *Taxon*. 44: 583-587.
- Bohs L. (2004) A Chloroplast DNA Phylogeny of *Solanum* Section *Lasiocarpa*. *Syst. Bot.* 29: 177-187.
- Bohs L. (2005) Major clades in *Solanum* based on *ndhF* sequences. In Keating R. C., Hollowell V. C., Croat T. B (eds.) A festschrift for William G. D'Arcy: the legacy of a taxonomist. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, Vol. 104. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. pp 27-49.
- Bohs L., Olmstead R. (1997) Phylogenetic Relationships in *Solanum* (Solanaceae) Based on *ndhF* Sequences. *Syst. Bot.* 22: 5-17.
- Bohs L., Olmstead R. (1999) *Solanum* phylogeny inferred from chloroplast DNA sequence data. In: Nee M., Symon D. E., Lester R. N. e Jessop J. P. (Eds.) *Solanaceae IV: advances in biology and utilization*. Kew, The Royal Botanic Gardens. pp 97-109.

- Cabral J. S., Felix P. L., Guerra M. (2006) Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Gen. Mol. Biol.* 29: 659- 664.
- Chiarini F., Bernardello G. (2006) Karyotype Studies in South American Species of *Solanum* subgen. *Leptostemonum* (Solanaceae). *Plant Biol (Stott)*. 8:486-493.
- Child A., Lester R. N. (2001) Synopsis of the genus *Solanum* L. and its infrageneric taxa. In: van der Berg R. G., Barendse G. W. N., van der Weeden e Mariani C. (Eds.). *Solanaceae V: Advances in Taxonomy and Utilization*. Nijmegen, Nijmegen University Press, pp 39-52.
- Cuadrado A., Jouve N. (1994) Highly repetitive sequences in B chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence in situ hybridization. *Genome*. 37:709-712.
- Dong F., Song J., Naess S.K., Helgeson J.P., Gebhardt C., Jiang J. (2000). Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet*. 101:1001–1007.
- Flavell R. B. (1986) Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philosophical Transcriptions of the Royal Society of London Series B*. 312: 227-242.
- Fregonezi J. N., Fernandes T., Torezan J. M. D., Vieira A. O., Vanzela A. L. L. (2006) Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on physical mapping of repetitive DNA. *Gen. Mol Biol.* 29: 97-104.
- Guerra M. (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Rev. Bras. Gen.* 9: 741-743.
- Guerra M. (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Gen. Mol. Biol.* 23(4): 1029-1041.
- Heslop-Harrison J. S. (1991) The Molecular cytogenetics of plants. *J. Cell Scien.* 100: 15-21.

- Heslop-Harrison J. S. (2000) Comparative Genome Organization in Plants: From Sequence and Markers to Chromatin and Chromosomes. *Pl. Cell.* 12: 617-635.
- Hunziker, A. T. (2001) *Genera Solanacearum*. The genera of Solanaceae illustrate, arranged according to a new system. Ruggell: A. R.G. Gantner Verlag. 500p. 136 fig. Huziwaru Y. (1962) Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on chromosome of Aster. *Amer. J. Bot.* 49: 116-119.
- Kitamura S., Inoue M., Shikazono N., Tanaka A. (2001) Relationship among *Nicotiana* species revealed by the 5S rDNA spacer sequence and fluorescence *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet.* 103: 678- 686.
- Komarova N. Y., Grabel T., Huigen D. J., Hemleben V., Volkov R. A. (2004) Organization, differential expression and methylation of rDNA in artificial *Solanum* allopolyploids. *Pl. Mol. Biol.* 56: 439–463.
- Lapitan N. L. V., Ganal M. W., Tanksley S. D. (1991) Organization of the 5S ribosomal RNA genes in the genome of tomato. *Genome.* 34: 509-514.
- Lapitan N. L. V. (1992) Organization and evolution of higher plant nuclear genomes. *Genome.* 35:171- 181.
- Lima de Faria A. (1976) The chromosome field I. Prediction of the location of ribosomal cistrons *Hereditas.* 83: 1-22.
- Leicht I. J., Heslop-Harrison J. S. (1992) Physical mapping of the 18S-5,8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome.* 35:1013-1018.
- Merritt J. F. (1974) The distribution of heterochromatin in the genus *Nicotiana* (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 61(9): 982-994.
- Moscone E. A. (1992) Estudios de cromosomas meióticos en Solanaceae de Argentina. *Darwiniana.* 31: 261-297.

- Moscone E. A. (1993) Estudios cromosomicos em *Capsicum* (Solanaceae) II. Analisis cariotipico de *C. parvifolium* y *C. annum var. annum*. Kurtiziana. 22: 9-18.
- Moscone E. A., Lambrou M., Hunziker A. T., Ehrendorfer F. (1993) Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). Pl. Syst. Evol. 186: 213-229.
- Moscone E. A., Loidl J., Ehrendorfer F., Hunziker A. T. (1995) Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. Amer. J. Bot. 82: 276-287.
- Nakamura R., Kitamura S., Inoue M., Ohmido N. (2001) Karyotype analysis of *Nicotiana kawakamii* Y. Ohashi using DAPI banding and rDNA FISH. Theor Appl Genet. 102: 810-814.
- Nee M. (1999) Synopsis of *Solanum* in the New World. In: Nee M., Symon D. E., Lester R. N., Jessop J. P. (Eds.). Solanaceae IV: Advances in biology and utilization. The Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 285-333.
- Obute G. C., Ndukwu B. C., Okoli B. E. (2006) Cytogenetic studies on some Nigerian species of *Solanum* L. (Solanaceae). Afr. J. Biotec. 5: 689-692.
- Olmstead R., Palmer J. (1992) A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationships and character evolution. Ann. Miss. Bot. Gard. 79 (2): 346-360.
- Olmstead R., Palmer J. (1997) Implications for the phylogeny, classification and biogeography of *Solanum* from cpDNA restriction-site variation. Syst. Bot. 22: 19-29.
- Olmstead R., Sweere J. A., Spangler R. E., Bohs L., Palmer J. D. (1999) Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: Nee M., Symon D. E., Lester R. N., Jessop J. P. (Eds.). Solanaceae IV: Advances in biology and utilization. The Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 111-137.
- Peterson D. G., Price H. J., Johnston J. S., Stack S. M. (1996) DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lycopersicon esculentum*) pachytene chromosomes. Genome. 39: 77-82.

- Pijnaker L. P., Ferwerda M. A. (1984) Giemsa C-banding of potato chromosomes. *Can. J. Gen. Cyt.* 26: 415-419.
- Pringle G. J., Murray B. G. (1991) Karyotype diversity and nuclear DNA variation in *Cyphomandra*. In: Hawkes J. G., Lester R. N., Nee M., Estrada N. (Eds) *Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution*. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, pp. 247-252.
- Randell B. R., Symon D. E. (1976) Chromosome numbers in Australian *Solanum* species. *Austr. J. Bot.* 24: 369–379.
- Raven P. H. (1975) The bases of angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 62:724-764.
- Sang Y., Liang G. H. (2000) Comparative physical mapping of the 18S-5,8S-26S rDNA in three sorghum species. *Genome.* 43:918-922.
- Schwarzacher T. P., Ambros P., Schweizer D. (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Pl. Syst. Evol.* 134: 293-297.
- Schweizer D., Loidl J. (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chrom. Today.* 9: 61-74.
- Srebniak M., Rasmussen O., Małuszyńska J. (2002) Cytogenetic analysis of an asymmetric potato hybrid. *J. Appl. Genet.* 43(1): 19-31.
- Stebbins G L (1971) *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Addison-Wesley Publishing Company, 216p.
- Vallejos C. E., Tanksley S. D., Bernatzky R. (1986) Localization in the tomato genome of DNA restriction fragments containing sequences homologous to the rRNA (45S), The major chlorophyll a/b binding polypeptide and the ribulose bisphosphate carboxylase genes. *Genetics.* 112: 93-105.

- Vanzela A. L. L., Ruas C. F., Oliveira M. F., Ruas P. M. (2002) Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. *Genetica*. 114: 105-111.
- Volkov R. A., Zanke C., Panchuk I. I., Hemleben V. (2001) Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding. *Theo. Appl. Genet.* 103:1273-1282.
- Yoong Lim K, Matyasek R, Lichtenstein C P, Leitch A R (2000) Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. *Chromosoma*. 109: 245-258.

## CONCLUSÕES

1. A análise convencional reforçou que as espécies de *Solanum*, *Lycianthes australe* e *Vassobia breviflora* possuem estabilidade cromossômica numérica com  $2n = 24$ , confirmando a contagem para a maioria das espécies estudadas aqui. Para *Solanum scuticum*, *S. gemellum*, *S. amygdalifolium* e *Lycianthes australe* a contagem é inédita.
2. Todas as espécies apresentaram núcleos arreticulados com condensação profásica proximal, cariótipos simétricos com cromossomos pequenos (cerca de 2  $\mu\text{m}$ ) e predominância dos tipos meta e submetacêntricos.
3. A análise por bandamento cromossômico mostrou dois principais padrões de distribuição da heterocromatina: (i) bandas C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> na região terminal de todos os cromossomos do complemento, além de um bloco maior associado ao satélite (ii) bandas C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> apenas como um bloco maior associado ao satélite.
4. Os blocos heterocromáticos ricos em GC exibiram distribuição equilocal e equidistante, com sítios preferenciais de ocorrência, como por exemplo, região terminal de todos os cromossomos e/ou blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> associados aos satélites.
5. Com exceção de *Lycianthes australe* que apresentou bandas C-DAPI<sup>+</sup> na região centromérica de todos os cromossomos e *S. amygdalifolium* que mostrou bandas C-DAPI<sup>+</sup> na região centromérica dos dois maiores pares cromossômicos, todas as outras espécies não apresentaram bandas C-DAPI, mostrando que as regiões ricas em GC são mais dinâmicas que aquelas ricas em AT.
6. A hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 45S mostrou dois sítios coincidentes com os satélites e com as bandas C-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, ocorrendo preferencialmente nas regiões terminais dos braços curtos de tipos submetacêntricos, com variações nos cromossomos de ocorrência. Exceções foram *S. corymbiflorum* e *Vassobia breviflora* que apresentaram quatro sinais marcados com a sonda de DNAr 45S.

7. O DNAr 5S ocorreu preferencialmente nas regiões pericentroméricas dos braços curtos dos menores pares cromossômicos de cada complemento, com exceção de *Solanum trachytrichium*, que apresentou quatro sinais de hibridação.
  
8. *Solanum corymbiflorum*, antiga *Chyphomandra corymbiflora*, é citogeneticamente diferente dos demais grupos aqui estudados, sugerindo que o sistema de classificação proposto por Bohs (1995), juntamente com aqueles trabalhos com filogenia molecular baseados na sequência de poucos genes extragenômicos, deveria levar em consideração um número maior de características diagnósticas antes de propor reformulações sistemáticas tão significativas.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA M. C., Bernardello G., Guerra M., Moscone E. A. (2005) Karyotype analysis in several South American species of *Solanum* and *Lycianthes rantonnei* (Solanaceae). *Taxon*. 54: 713-723.
- BERNARDELLO L. M., Anderson G. J. (1990) Karyotype studies in *Solanum* section *Basarthrum* (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 77: 420-431.
- BERNARDELLO L. M., Heiser C. B., Piazzano M. (1994) Karyotype studies in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 81: 95-103
- BOHS L. (1989) *Solanum allophyllum* (Miers) Standl. and the generic delimitation of *Cyphomandra* and *Solanum* (Solanaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 76: 1129-1140.
- BOHS L. (1994) *Cyphomandra* (Solanaceae). *Flora Neotropica*, New York, Monograph. 63: 1-175.
- BOHS L. (1995) Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and its species to *Solanum*. *Taxon*. 44: 583-587.
- BOHS L. (2004) A Chloroplast DNA Phylogeny of *Solanum* Section *Lasiocarpa*. *Syst. Bot.* 29: 177-187.
- BOHS L. (2005) Major clades in *Solanum* based on *ndhF* sequences. In Keating R. C., Hollowell V. C., Croat T. B (eds.) *A festschrift for William G. D'Arcy: the legacy of a taxonomist. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, Vol. 104. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. pp. 27-49.
- BOHS L., Olmstead R. (1997) Phylogenetic Relationships in *Solanum* (Solanaceae) Based on *ndhF* Sequences. *Syst. Bot.* 22: 5-17.
- BOHS L., Olmstead R. (1999) *Solanum* phylogeny inferred from chloroplast DNA sequence data. In: Nee M., Symon D. E., Lester R. N. e Jessop J. P. (Eds.) *Solanaceae IV: advances in biology and utilization*. Kew, The Royal Botanic Gardens. pp. 97-109.
- CABRAL J. S., Felix P. L., Guerra M. (2006) Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Gen. Mol. Biol.* 29: 659- 664.

CHIARINI F., Bernardello G. (2006) Karyotype Studies in South American Species of *Solanum* subgen. *Leptostemonum* (Solanaceae). *Plant biol* (Stott). 8:486-493.

CHILD A., Lester R. N. (2001) Synopsis of the genus *Solanum* L. and its infrageneric taxa. In: van der Berg R. G., Barendse G. W. N., van der Weeden e Mariani C. (Eds.). *Solanaceae V: Advances in Taxonomy and Utilization*. Nijmegen, Nijmegen University Press, pp. 39-52.

CRONQUIST A. (1988) *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. New York: The New York Botanical Garden. pp. 423-424.

CUADRADO A., Jouve N. (1994) Highly repetitive sequences in B chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence in situ hybridization. *Genome*. 37: 709-712.

D'ARCY W. G. (1991) The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Hawkes J. G., Lester R. N., Nee M., Estrada N. (Eds) *Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution*. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, pp. 75-137.

DONG F., Song J., Naess S.K., Helgeson J.P., Gebhardt C., Jiang J. (2000). Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet*. 101:1001–1007.

FLAVELL R. B. (1986) Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Phylosophical Transcriptions of the Royal Society of London Series B*. 312: 227-242.

FREGONEZI J. N., Fernandes T., Torezan J. M. D., Vieira A. O., Vanzela A. L. L. (2006) Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on physical mapping of repetitive DNA. *Gen. Mol Biol*. 29: 97-104.

GERLACH W. L., Bedbrook J. R. (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucl. Ac. Res*. 7: 1869-1885.

GERLACH W. L., Dyer T.A. (1980) Sequence organization of the repeated units in the nucleus of wheat which contain 5S-rRNA genes. *Nucl. Ac. Res*. 8: 4851-4865.

GUERRA M. (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Rev. Bras.Gen.* 9: 741-743.

GUERRA M. (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Gen. Mol. Biol*. 23(4): 1029-1041.

- HESLOP-Harrison J. S. (1991) The molecular cytogenetics of plants. *J. Cell Sci.* 100: 15-21.
- HESLOP-Harrison J. S. (2000) Comparative Genome Organization in Plants: From Sequence and Markers to Chromatin and Chromosomes. *Pl.Cell.* 12: 617-635.
- HUNZIKER, A. T. (2001) *Genera Solanacearum*. The genera of Solanaceae illustrate, arranged according to a new system. Ruggell: A. R.G. Gantner Verlag. 500p. 136 fig.
- HUZIWARA Y. (1962) Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on chromosome of Aster. *Amer. Jour. Bot.* 49: 116-119.
- KITAMURA S., Inoue M., Shikazono N., Tanaka A. (2001) Relationship among *Nicotiana* species revealed by the 5S rDNA spacer sequence and fluorescence *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet.* 103:678- 686.
- KOMAROVA N. Y., Grabel T., Huigen D. J., Hemleben V., Volkov R. A. (2004) Organization, differential expression and methylation of rDNA in artificial *Solanum* allopolyploids. *Pl. Mol. Biol.* 56: 439–463.
- LAPITAN N. L. V., Ganal M. W., Tanksley S. D. (1991) Organization of the 5S ribosomal RNA genes in the genome of tomato. *Genome.* 34: 509-514.
- LAPITAN N. L. V. (1992) Organization and evolution of higher plant nuclear genomes. *Genome.* 35: 171- 181.
- LIMA de Faria A. (1976) The chromosome field I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. *Hereditas.* 83: 1-22.
- LEICHT I. J., Heslop-Harrison J. S. (1992) Physical mapping of the 18S-5,8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome.* 35: 1013-1018.
- LEVIN R. A., Watson K., Bohs L. (2005) A Four-Gene Study of Evolutionary Relationships in *Solanum* section *Acanthophora*. *Amer. J. Bot.* 92: 603-612.
- LEVIN R. A., Myers N. R., Bohs L. (2006) Phylogenetic relationships among the “spiny *Solanums*” (*Solanum* subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 93(1): 157-169.
- MENTZ L. A., Oliveira P. L. (2004) *Solanum* (Solanaceae) na região sul do Brasil. *Pesquisas 2004, Botânica* n° 5, 327p.

MERRITT J. F. (1974) The distribution of heterochromatin in the genus *Nicotiana* (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 61(9): 982-994.

MOSCONE E. A. (1992) Estudios de cromosomas meióticos en Solanaceae de Argentina. *Darwiniana*. 31: 261-297.

MOSCONE E. A. (1993) Estudios cromosómicos em *Capsicum* (Solanaceae) II. Analisis cariotipico de *C. parvifolium* y *C. annum var. annum*. *Kurtiziana*. 22: 9-18.

MOSCONE E. A., Lambrou M., Hunziker A. T., Ehrendorfer F. (1993) Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Pl. Syst. Evol.* 186: 213-229.

MOSCONE E. A., Loidl J., Ehrendorfer F., Hunziker A. T. (1995) Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *Amer. J. Bot.* 82: 276-287.

NAKAMURA R., Kitamura S., Inoue M., Ohmido N. (2001) Karyotype analysis of *Nicotiana kawakamii* Y. Ohashi using DAPI banding and rDNA FISH. *Theor Appl Genet.* 102: 810-814.

NEE M. (1991) The Systematics of Lesser Known Edible Solanaceae of the New World. In: Hawkes J. G., Lester R. N., Nee M., Estrada N (Eds) *Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution*. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, pp. 365-368.

NEE M. (1999) Synopsis of *Solanum* in the New World. In: Nee M., Symon D. E., Lester R. N., Jessop J. P. (Eds.). *Solanaceae IV: Advances in biology and utilization*. The Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 285-333.

OBUTE G. C., Ndukwu B. C., Okoli B. E. (2006) Cytogenetic studies on some Nigerian species of *Solanum* L. (Solanaceae). *Afr. J. Biotec.* 5: 689-692.

OLMSTEAD R., Palmer J. (1992) A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationships and character evolution. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79 (2): 346-360.

OLMSTEAD R., Palmer J. (1997) Implications for the phylogeny, classification and biogeography of *Solanum* from cpDNA restriction-site variation. *Syst. Bot.* 22: 19-29.

OLMSTEAD R., Sweere J. A., Spangler R. E., Bohs L., Palmer J. D. (1999) Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: Nee M., Symon D. E., Lester R. N., Jessop J. P. (Eds.). *Solanaceae IV: Advances in biology and utilization*. The Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 111-137.

PETERSON D. G., Price H. J., Johnston J. S, Stack S. M. (1996) DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lycopersicon esculentum*) pachytene chromosomes. *Genome*. 39: 77-82.

PIJNAKER L. P., Ferwerda M. A. (1984) Giemsa C-banding of potato chromosomes. *Can. J. Gen. Cyt.* 26: 415-419.

PRINGLE G. J., Murray B. G. (1991) Karyotype diversity and nuclear DNA variation in *Cyphomandra*. In: Hawkes J. G., Lester R. N., Nee M., Estrada N. (Eds) *Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution*. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, pp. 247-252.

PRINGLE G. J., Murray B. G. (1993) Karyotypes and C-banding patterns in species of *Cyphomandra* Mart. ex Sendtn. (Solanaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 111: 331-342.

RANDELL B. R., Symon D. E. (1976) Chromosome numbers in Australian *Solanum* species. *Austr. J. Bot.* 24: 369–379.

RAVEN P. H. (1975) The bases of angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 62: 724-764.

SANG Y., Liang G. H. (2000) Comparative physical mapping of the 18S-5,8S-26S rDNA in three sorghum species. *Genome*. 43: 918-922.

SCHWARZACHER T. P., Ambros P., Schweizer D. (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Pl. Syst Evol.* 134: 293-297.

SCHWEIZER D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI) in human chromosomes. *Cyt. Cell Gen.* 77: 190-193.

SCHWEIZER D., Loidl J. (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chrom. Today.* 9: 61-74.

SHARMA A., Sen S. (2002) Chromosome Botany Science. Calcutá, Índia, Science Publishers, Inc, 115 p.

Snowdon R., Kusterer B., Horn R (2001) Structural genome analysis using molecular cytogenetic techniques. *Prog. Bot.* 63: 55-79.

SOARES E. L. C., Mentz L. A. (2006) As espécies de *Solanum* subgênero *Bassovia* seção *Pachyphylla* (= *Cyphomandra* Mart. Ex Sendtn. - Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisas 2006 Botânica* .57: 231-253.

SPOONER D., Anderson G., Jansen R. (1993) Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 80: 676-688.

SREBNIAK M., Rasmussen O., Małuszyńska J. (2002) Cytogenetic analysis of an asymmetric potato hybrid. *J. Appl. Genet.* 43(1): 19-31.

STEBBINS G. L. (1971) Chromosomal Evolution in Higher Plants. Addison-Wesley Publishing Company, 216p.

SUMNER A. T. (2003) Chromosomes – Organization and Function. North Berwick, United Kingdom, Blackwell Publishing. 287 p.

VALLEJOS C. E., Tanksley S. D., Bernatzky R. (1986) Localization in the tomato genome of DNA restriction fragments containing sequences homologous to the rRNA (45S), The major chlorophyll a/b binding polypeptide and the ribulose biphosphate carboxylase genes. *Genetics.* 112: 93-105.

VANZELA A. L. L., Ruas C. F., Oliveira M. F., Ruas P. M. (2002) Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. *Genetica.* 114: 105-111.

VOLKOV R. A., Zanke C., Panchuk I. I., Hemleben V. (2001) Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. Petota): application for molecular phylogeny and breeding. *Theo. Appl. Genet.* 103:1273-1282.

YOONG Lim K, Matyasek R, Lichtenstein C P, Leitch A R (2000) Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. *Chromosoma.* 109: 245-258.