

## O CARIÓTIPO DE *NOTHOSCORDUM PULCHELLUM* (ALLIACEAE), COM ÊNFASE NA HETEROCROMATINA E NOS SÍTIOS DE DNAR\*

MARCELO GUERRA<sup>1</sup> e LEONARDO P. FELIX<sup>2</sup>

**Summary:** The karyotype of *Nothoscordum pulchellum* (Alliaceae), with emphasis on the heterochromatin and rDNA sites. Two populations of *Nothoscordum pulchellum* Kunth from the Northeast of Brazil were investigated with several cytological methods in an attempt to obtain a better karyotype characterization. All thirty individuals analyzed showed  $2n = 10$  and a karyotype formula of  $6M+2A+2T$ . No chromosomal variation was found between or within populations. The meioses I and II of some individuals exhibited anaphase cells with a characteristic bridge-plus-fragment. After C-banding or CMA/DAPI fluorochrome staining, no heterochromatin was found, except the one associated with the nucleolus organizer region. It was observed as a C<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup> block occupying the whole short arm of the acrocentric chromosome pair. *In situ* hybridization with a 18S+25S rDNA probe labelled the C<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup> region, whereas a 5S rDNA probe revealed only a very small site at the short arm of the second largest metacentric pair. In comparison with other cytologically known species of the genus, the karyotype of *N. pulchellum* was distinguished by the presence of a telocentric chromosome pair, restriction of the nucleolus organizer region to a single pair and a very low amount of heterochromatin.

**Key words:** *Nothoscordum*, karyotype, C-banding, CMA/DAPI, DNAr

**Resumo:** Duas populações de *Nothoscordum pulchellum* Kunth foram encontradas no Nordeste do Brasil. Elas foram investigadas com diversos métodos citológicos, procurando uma melhor caracterização do cariótipo dessa espécie. Todos os trinta indivíduos analisados mostraram  $2n = 10$  e uma fórmula cariotípica de  $6M+2A+2T$ . Nenhuma variação cromossômica foi encontrada dentro ou entre as populações. A meiose I e II de alguns indivíduos mostrou células em anáfase com uma ponte e fragmento característicos. Após o bandeamento C ou a coloração com os fluorocromos CMA/DAPI, não foi observado nenhum indício de heterocromatina, exceto uma banda associada com a região organizadora do nucléolo. Essa banda apareceu como um bloco C<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup> ocupando todo o braço curto do par cromossômico acrocêntrico. Hibridização *in situ* com uma sonda de DNAr 18S+25S marcou a região C<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup>, enquanto a sonda para DNAr 5S revelou apenas um pequeno sítio no braço curto do segundo maior par metacêntrico. Em comparação com outras espécies citologicamente conhecidas do gênero, o cariótipo de *N. pulchellum* se distinguiu pela presença de um par cromossômico telocêntrico, restrição da região organizadora do nucléolo a um único par cromossômico e uma quantidade de heterocromatina muito baixa.

**Palavras chaves:** *Nothoscordum*, cariótipo, bandeamento C, CMA/DAPI, DNAr.

### INTRODUÇÃO

O gênero *Nothoscordum* é reconhecido como um grupo extratropical, constituído por cerca de 20 espécies distribuídas pelas regiões temperadas e subtropicais da América do Sul, principalmente Uruguai e Argentina, além de uma única espécie na América do Norte (Guaglianone, 1972; Crosa, 1996). No Brasil, o gênero tem sido registrado apenas para a região Sul, exceto *N. inodorum* (Soland.

ex Aiton) Nich. provavelmente originário do México e tornado cosmopolita, ocorrendo no Sul e Sudeste como ruderal (Lorenzi, 1982; Crosa, 1996).

Citologicamente, o gênero se caracteriza por apresentar grandes cromossomos, que podem ser metacêntricos (M) ou telocêntricos/acrocêntricos (representados indistintamente por diferentes autores como T ou A, independente de serem rigorosamente telocêntricos ou acrocêntricos). Como os telocêntricos são mais raros na natureza, ambos os tipos foram representados aqui por 'A', apenas para generalizar a fórmula cariotípica dos dados prévios da literatura. São conhecidas espécies diplóides, com  $2n = 8$  (fórmula cariotípica: 8M) ou  $2n = 10$  (6M+4A), tetraplóides com  $2n = 16$  (16M),  $2n = 18$  (14M+4A) e  $2n = 19$  (13M+6A) e um hexaplóide com  $2n = 26$  (22M+4A). A espécie mais extensamente estudada citologicamente é *N. inodorum* [= *N. fragrans* (Vent.)

\*Dedicado al Prof. Dr. Juan H. Hunziker en ocasión de su 75º aniversario.

<sup>1</sup>Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Nelson Chaves, s/n, Recife, PE, Brasil. CEP 50.670-420. e-mail: mguerra@npd.ufpe.br

<sup>2</sup>Departamento de Fitotecnica, CCA, Universidade Federal da Paraíba, Campus III, Areia, PB, Brasil. CEP 58.397-000. e-mail: lpfelix@hotmail.com

Kunth], um apomítico com  $2n = 19$  (13M+6A), considerado por Nuñez *et al.* (1974) como um complexo poliplóide. Os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos dessas espécies são frequentemente associados ao nucléolo, mostrando constrições secundárias com ou sem satélites evidentes (Dyer, 1967; Nuñez *et al.*, 1974; Palomino *et al.*, 1992). Curiosamente, nenhuma espécie com  $2n = 20$  é conhecida, embora esse número tenha sido observado esporadicamente em plantas cultivadas, em mosaicos ou em raros indivíduos de populações naturais com  $2n = 19$  (Nuñez *et al.*, 1974; Nassar & Aguiar, 1978). O cariótipo fortemente bimodal dessas espécies, com braços cromossômicos grandes e muito similares, fizeram do gênero um exemplo clássico de evolução cariotípica por fusões ou fissões cêntricas (Jones, 1978).

Neste trabalho é reportada a ocorrência de uma espécie diplóide de *Nothoscordum* (*N. pulchellum*) em duas localidades do Nordeste brasileiro. O seu cariótipo foi investigado com diferentes técnicas (coloração convencional, bandeamento C, coloração com os fluorocromos CMA e DAPI e hibridização *in situ* com sondas de DNAr), visando obter um maior detalhamento estrutural e a localização dos genes ribossomais, de forma a compará-lo com o de outras espécies.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram encontradas duas populações de *Nothoscordum pulchellum*: uma no interior de uma mata seca na fazenda Macacos, município de Itapororoca, Est. Paraíba, e uma outra em campo aberto, à beira da rodovia BR-232, no município de Gravatá, Est. Pernambuco. Esta última população foi observada por dois anos seguidos florindo no período das chuvas (maio a agosto) e em estado latente durante o período de estiagem. Dez indivíduos da Paraíba e 20 de Pernambuco foram plantados em jarros etiquetados e citologicamente analisados individualmente. Exsicatas das duas populações estão depositadas nos herbários UFP e PEUFR.

Para a análise citológica, pontas de raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 0,002 M, durante 24 horas a cerca de 12 °C, e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético glacial). Para a análise meiótica, botões florais foram mergulhados diretamente no fixador de Carnoy. As fixações foram mantidas por 2 a 24 horas à temperatura ambi-

ente e em seguida estocadas no freezer por tempo indeterminado.

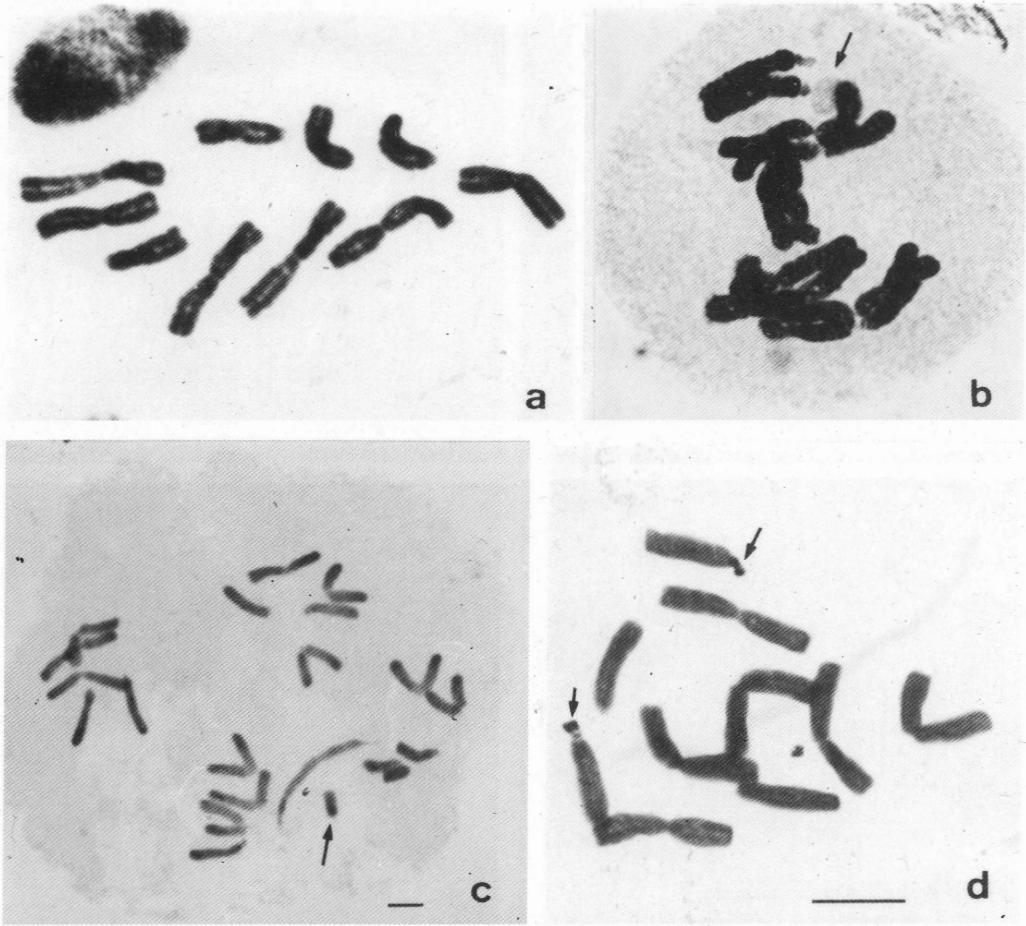
A coloração convencional foi feita com hematoxilina 1% contendo alumínio férrico, como descrito por Guerra (1999). A técnica de bandeamento C foi feita de acordo com Schwarzacher *et al.* (1980) e a dupla-coloração com os fluorocromos CMA/DAPI foi baseada em Schweizer (1976). A técnica de hibridização *in situ* foi empregada para localizar os genes ribossomais 45S (18S+5,8S+25S) e o 5S. Para os primeiros, foi utilizada a sonda SK 18S+25S, contendo fragmentos do DNA ribossomal 18S e 25S, obtidos originalmente de *Arabidopsis thaliana* (Unfried *et al.*, 1989; Unfried & Gruendler, 1990). O DNAr 5S foi obtido por PCR, a partir do DNA genômico de *Passiflora edulis*, utilizando um par de primers universais para esses genes. Tanto as sondas para o DNAr 45S quanto os primers para o DNAr 5S foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dieter Schweizer, da Universidade de Viena. O procedimento e as condições da hibridização *in situ* foram feitos como descrito por Moscone *et al.* (1996). A sonda SK 18S+25S foi marcada com biotina e detectada com rodamina, enquanto a sonda para DNAr 5S foi marcada com digoxigenina e detectada com FITC.

A fotografia em microscopia de campo claro foi feita com filme Imagelink da Kodak, ajustado para ASA 25, e as fotos em microscopia de fluorescência foram feitas em T-Max ASA 400 da Kodak.

## RESULTADOS

Plantas de ambas as populações de *N. pulchellum* mantidas em cultivo no Jardim Experimental do Departamento de Botânica da UFPE, floraram e frutificaram durante todo o ano. A análise da morfologia floral e alguns outros parâmetros vegetativos mostraram que as duas populações são idênticas, inclusive no número de óvulos por lóculo do ovário (1 a 3 em ambas as amostras), considerando uma característica importante na separação de algumas espécies (Guaglianone, 1972).

A análise mitótica de todos os indivíduos das duas populações mostrou sempre  $2n = 10$  (Fig. 1a), com três pares metacêntricos, um par telocêntrico e um par acrocêntrico possuindo um braço curto muito pequeno, geralmente descondensado, como uma constrição secundária, algumas vezes com um pequeno satélite. Observe na Fig. 1a que os



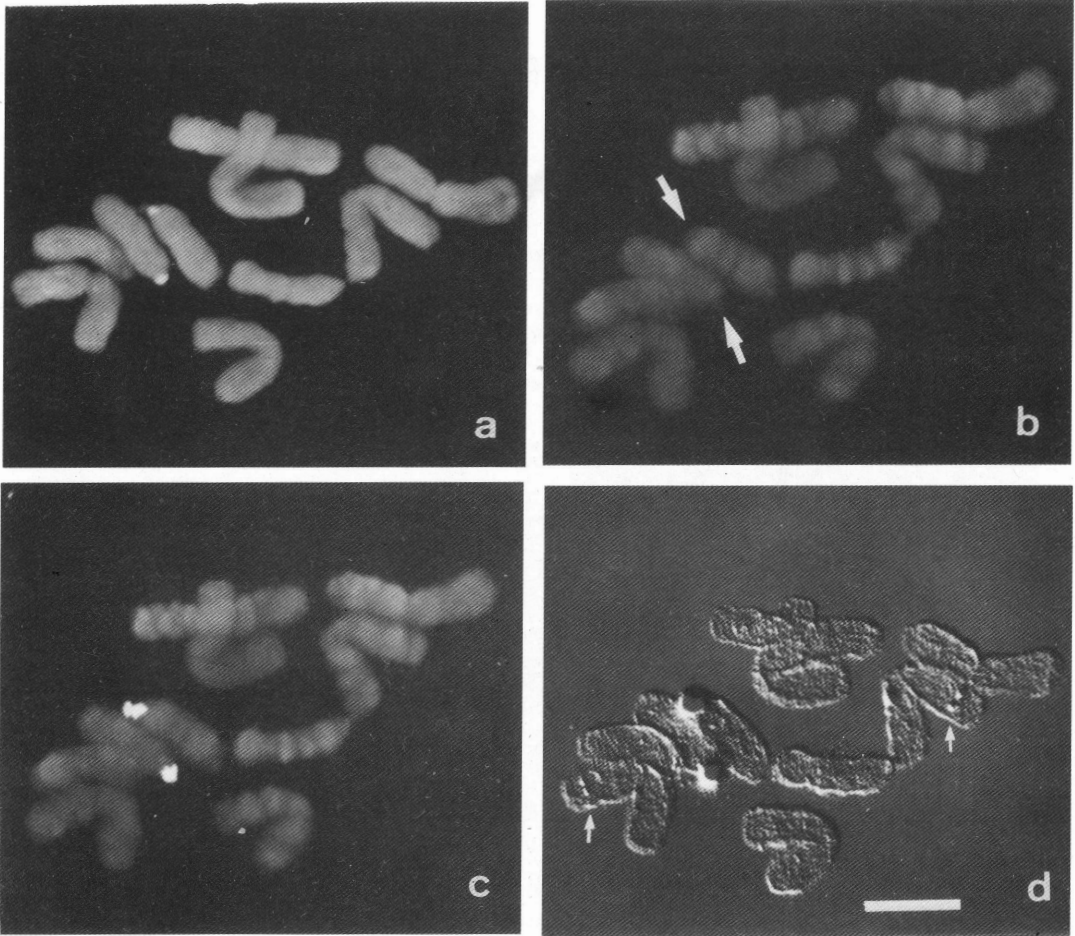
**Fig. 1.** Cromossomos mitóticos (a, d) e meióticos (b, c) de *Nothoscordum pulchellum*. a, Metáfase mitótica ( $2n=10$ ) e núcleo interfásico corados com hematoxilina. b, Metáfase I mostrando nucléolo associado ao bivalente acrocêntrico (seta). c, Final de anáfase II com ponte e fragmento (seta). d, Metáfase mitótica após o bandejamento C, revelando a hêterocromatina dos acrocêntricos (setas). Barras em c e d correspondem a 10  $\mu\text{m}$ , sendo essa última válida também para as fotos a e b.

cromossomos acrocêntricos e telocêntricos nem sempre são claramente distinguíveis devido à baixa colorabilidade do braço curto do acrocêntrico. O tamanho dos cromossomos, baseado em medições feitas nas cinco melhores metáfases coradas com CMA/DAPI e em duas com bandejamento C, variou entre 22,33  $\mu\text{m}$ , no par I, e 14,25  $\mu\text{m}$ , no par V. Entretanto, as diferenças de tamanho entre os metacêntricos e entre os acro/telocêntricos foram muito pequenas. Cromossomos B, ou algum outro tipo de variação cromossômica numérica, não foram observados.

Em meiose, o comportamento cromossômico foi normal, com formação de cinco bivalentes e um nucléolo associado ao par acrocêntrico (Fig. 1b). Em

alguns indivíduos, foram observadas em células de anáfase I e II a formação de uma ponte e um fragmento acêntrico, frequentemente envolvendo o cromossomo telocêntrico (Fig. 1c).

Na análise com bandejamento C e com os fluorocromos CMA e DAPI, os cromossomos apareceram uniformemente corados, exceto o braço curto do par acrocêntrico, que se mostrou fortemente corado com Giemsa no bandejamento C (Fig. 1d), muito brilhante com o CMA e fraco ou negativamente corado com o DAPI (Fig. 2a, b). Em algumas células foi possível observar o bloco C+/CMA+ dividido em dois blocos menores por uma constrição de tamanho variável. Nos núcleos interfásicos a cromatina C+/CMA+ foi quase sempre associada

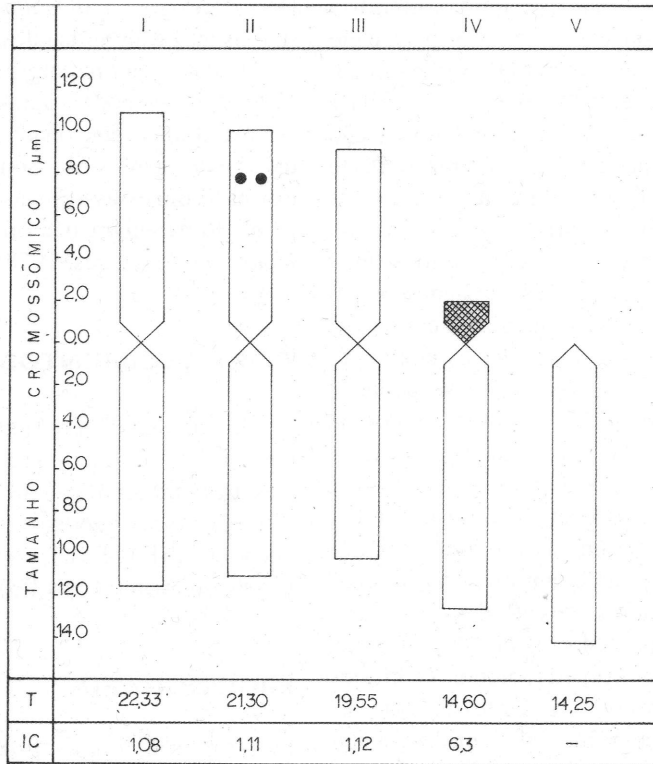


**Fig. 2.** Metáfase de *Nothoscordum pulchellum* ( $2n = 10$ ) corada com CMA/DAPI, descorada e hibridizada *in situ* com as sondas para o DNAr 45S e 5S. **a.** Coloração com CMA revelando região mais brilhante no braço curto do acrocêntrico. **b-d.** a mesma célula vista com DAPI após hibridização *in situ* (**b**), mostrando os sítios de RNAr 45S (**c**) e mais os sítios de RNAr 5S (setas em **d**). Barra em **d** corresponde a 10  $\mu$ m.

ao nucléolo, podendo em alguns casos se encontrar dividida em dois ou mais blocos menores.

Na hibridização *in situ* com a sonda para DNAr 45S foi observada uma marcação semelhante à revelada pelo CMA, marcando todo o braço curto do acrocêntrico. Nos núcleos interfásicos, os sítios marcados apareceram associados ao nucléolo. A Fig. 2b-d mostra a mesma célula que havia sido fotografada com CMA, hibridizada com as sondas de DNAr 45S e 5S e contracorada novamente com o DAPI. Em 2b observa-se apenas a coloração DAPI após a hibridização, revelando uma diferença de brilho ao longo de alguns cromossomos que é um artefato causado por essa técnica em algumas células. A Fig. 2c mostra os sítios do DNAr 45S corados com

rodamina e contracorados com DAPI. A Fig. 2d mostra a mesma célula anterior revelando simultaneamente os sítios para o DNAr 45S e o 5S. A sonda para DNAr 5S hibridizou unicamente num sítio muito pequeno, nos braços curtos do par metacêntrico II ou III, formando dois pontos intersticiais próximos à região distal. Devido à similaridade muito grande de tamanho entre esses pares não foi possível distinguir com segurança em qual dos dois se encontrava o sítio. Nesse caso, consideramos o par II aquele que apresentava esse sítio. A imagem foi digitalizada para evidenciar melhor os pequenos blocos do DNAr 5S. O idiograma da Fig. 3 resume esses resultados.



**Fig. 3.** Idiograma de *Nothoscordum pulchellum*. Os números romanos na linha superior indicam a numeração cromossômica. As linhas inferiores apresentam o comprimento médio total desses cromossomos (T) e o índice centromérico (IC). A região reticulada do cromossomo IV mostra a localização dos genes para DNAr 45S e os pontos no cromossomo II indicam o sítio para o DNAr 5S.

## DISCUSSÃO

O presente registro de duas populações de *Nothoscordum* no Nordeste brasileiro, em região de clima tipicamente tropical, com baixas latitude e altitude, sugere que a distribuição do gênero na América do Sul seja bem mais ampla que a atualmente reconhecida (Crosa, 1996). As características descritas por Guaglianone (1972) para *N. pulchellum* coincidem bem com as do presente material, embora esta autora tenha observado dois óvulos por lóculo do ovário enquanto no presente material foi encontrada uma maior variação (1 a 3), possivelmente devido ao maior tamanho desta amostra. *N. pulchellum*, pertencente à seção *Nothoscordum*, aparentemente era conhecida apenas pelo material tipo, proveniente do Brasil meridional. Segundo Guaglianone (1972), esta espécie apresenta afinidade com *N. bonariense* (Persoon) Beauverd e *N. bivalve* (L.) Britton. Entretanto, além de algumas características morfológicas diferenciais impor-

tantes, essas últimas apresentam números cromossômicos  $2n = 26$  e  $2n = 18$ , respectivamente (Nuñez *et al.*, 1974; Palomino *et al.*, 1992), muito diferentes do cariótipo aqui reportado.

Cariologicamente, *N. pulchellum* se assemelha bastante às demais espécies diplóides de *Nothoscordum* com  $2n = 10$ , neste caso, com fórmula cariotípica  $6M+2A+2T$ . O tamanho dos seus cromossomos diferiu dos limites de variação observados por Crosa (1975, 1996) em outras espécies diplóides do gênero, sendo claramente maiores e mais similares entre si.

A presença de pontes e fragmentos, observados em alguns meiócitos, indica a ocorrência de indivíduos heterozigotos para uma inversão paracêntrica. O fato de que essa alteração foi vista também em anáfases II, revela que nessa espécie a ponte formada na meiose I pode persistir até a meiose II, como observado em espécies de Aloineae (Brandham, 1977).

O cariótipo de *N. pulchellum* claramente apre-

senta um par cromossômico telocêntrico e outro acrocêntrico. O braço curto deste último, hibridiza intensamente com a sonda SK 18S+25S, parecendo estar constituído basicamente por DNA ribossomal. A análise com FISH, e indiretamente as análises com cromomicina A e com bandeamento C, não deixam dúvidas de que a região organizadora do nucléolo (RON) está restrita a um único par cromossômico. Em outras espécies de *Nothoscordum*, a presença de cromossomos telocêntricos não é evidente e os acrocêntricos parecem possuir RONS em todos os braços curtos. No tetraplóide *N. bivalve*, por exemplo, os dois pares acrocêntricos apresentam constrições secundárias terminais (Palomino *et al.*, 1992). Em *N. inodorum*, Dyer (1967) e Sato (1980) observaram constrições secundárias nos braços curtos de todos os acrocêntricos. Crosa (1996), analisou o cariótipo de quatro entidades taxonômicas diplóides e cinco tetraplóides da secção *Inodorum* de *Nothoscordum* com nitrato de prata, que cora as RONS diferencialmente, e constatou que todos os braços curtos dos acrocêntricos coravam positivamente. O mesmo autor observou que os seis braços curtos de uma planta de *N. nudicaule* com  $2n = 19$  hibridizavam *in situ* com uma sonda de DNAr contendo os genes 18S, 5,8S e 26S. Nuñez *et al.* (1974), entretanto, observaram constrições secundárias em apenas alguns desses cromossomos.

Comparando-se a distribuição de heterocromatina em *N. pulchellum* e em *N. inodorum*, a única outra espécie do gênero estudada por técnicas de bandeamento, observa-se que, enquanto na primeira as bandas C foram restritas à RON, em *N. inodorum* as bandas C ocorreram em duas regiões: na região proximal dos braços longos de cinco dos seis acrocêntricos e subterminalmente em um dos braços de três dos treze metacêntricos (Sato *et al.*, 1979). Sato (1980) observou que esses três tipos de heterocromatina reagem diferentemente com Giemsa, acridina orange e Hoechst 33258 após o tratamento com a técnica de bandeamento C, sugerindo que se tratem de seqüências de DNA diferentes. Por outro lado, a heterocromatina observada no cromossomo metacêntrico de *N. inodorum* tem uma posição similar à do sítio para DNAr 5S encontrada em *N. pulchellum*. Em algumas poucas espécies, o sítio do DNAr 5S parece coincidir com uma fina região heterocromática vista com bandeamento C (veja, por exemplo, Bennett *et al.*, 1995). Se essas regiões forem coincidentes nessas duas espécies de

*Nothoscordum*, o pequeno tamanho do sítio de DNAr 5S em *N. pulchellum* pode ter dificultado a sua visualização no bandeamento C.

Os dados acima sugerem que as espécies de *Nothoscordum* podem apresentar pequenas diferenças estruturais relacionadas à distribuição de bandas C e de cistrons ribossomais. A análise de outras espécies com essas técnicas podem auxiliar na compreensão da enigmática origem do cariótipo de *N. inodorum* (ver Jones, 1978).

## AGRADECIMENTOS

Os autores são profundamente gratos ao Prof. Orfeo Crosa pelo auxílio na identificação da espécie. Esse trabalho foi desenvolvido com apoio das agências brasileiras Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## BIBLIOGRAFIA

- BENNETT, S. T., I. J. LEITCH & M. D. BENNETT. 1995. Chromosome identification and mapping in the grass *Zingeria biebersteiniana* ( $2n = 4$ ) using fluorochromes. *Chrom. Res.* 3: 101-108.
- BRANDHAM, P. E. 1977. The meiotic behaviour of inversions in polyploid Aloineae. I. Paracentric inversions. *Chromosoma* 62: 69-84.
- CROSA, O. 1975. Las especies unifloras del género *Nothoscordum* Kunth y el género *Ipheion* Rafinesque de la tribu *Allieae* (Liliaceae). *Darwiniana* 19: 335-344.
- CROSA, O. 1996. *Sistemática e Evolução das Espécies da Seção Inodorum Guag. do Gênero Nothoscordum Kunth (Allieae, Alliaceae)*. Tese de outorado, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- DYER, A. F. 1967. The maintenance of structural heterozygosity in *Nothoscordum fragrans*. *Caryologia* 20: 287-308.
- GUAGLIANONE, E. R. 1972. Sinopsis de las especies de *Ipheion* Raf. y *Nothoscordum* Kunth (Liliaceae) de Entre Ríos y regiones vecinas. *Darwiniana* 17: 160-243.
- GUERRA, M. 1999. Hematoxylin: a simple, multiple-use dye for chromosome analysis. *Genet. Mol. Biol.* 22: 77-80.
- JONES, K. 1978. Aspects of chromosome evolution in higher plants. *Adv. Bot. Res.* 6: 119-194.
- LORENZI, H. 1982. *Plantas Daninhas do Brasil*. Ed. do Autor, Nova Odessa.
- MOSCONE, E. A., M. A. MATZKE & A. J. M. MATZKE. 1996. The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* 105: 231-236.

- NASSAR, N. M. A. & M. L. R. DE AGUIAR. 1978. Multiple karyotypes in individuals of *Nothoscordum fragrans* Kunth. *Caryologia* 31: 7-14.
- NÚÑEZ, O., N. FRAYSSINET, H. H. RODRÍGUEZ & K. JONES. 1974. Cytogenetic studies in the genus *Nothoscordum* Kunth. I The *N. inodorum* polyploid complex. *Caryologia* 27: 403-441.
- PALOMINO, G., V. ROMO & R. RUENES. 1992. Fisiones céntricas en cromosomas metacéntricos de *Nothoscordum bivalve* (Alliaceae) de México. *Bol. Soc. Bot. México* 52: 121-124.
- SATO, S. 1980. Differential staining of C-bands with acridine orange and Hoechst 33258 in chromosomes of *Nothoscordum fragrans*. *Cytologia* 45: 127-136.
- SATO, S., Y. KUROKI & S. OHTA. 1979. Two types of color-differentiated C-banding positive segments in chromosomes of *Nothoscordum fragrans*, Liliaceae. *Cytologia* 44: 715-725.
- SCHWARZACHER, T., P. AMBROS & D. SCHWEIZER. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst. Evol.* 126: 107-148.
- SCHWEIZER, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307-324.
- UNFRIED, I. & P. GRUENDLER. 1990. Nucleotide sequence of the 5.8S and 25S rRNA genes and of the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 18: 4011.
- UNFRIED, I., U. STOCKER & P. GRUENDLER. 1989. Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from *Arabidopsis thaliana* Co10. *Nucleic Acids Res.* 17: 7513.

Recibido el 24 Octubre 2000, aceptado el 22 Noviembre de 2000.