

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**



CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Genipa americana* L.

RITA DE CÁSSIA VITAL SANTOS

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2005

RITA DE CÁSSIA VITAL SANTOS

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Genipa americana* L.

**Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.**

RITA DE CÁSSIA VITAL SANTOS

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2005

RITA DE CÁSSIA VITAL SANTOS

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Genipa americana* L.

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa
Cruz, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 03 de Agosto de 2005

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
UESC

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
UFRPE

Prof^a. Dr^a. Mônica Rosa Bertão
UNESP – Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico a Osvaldo e Mary, meus pais e a meus irmãos, pelo apoio na minha formação pessoal e a Charles, que foi amigo e companheiro indispensável, sempre presente na realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Amado Jesus**,

que me amou, salvou, libertou. Ele me chamou e capacitou-me para realizar esta obra. Toda visão, todo dom e todo talento pertencem a Ti! Porque dEle, por Ele e para Ele são TODAS as coisas.

Àos meus Pais,

pela vida, amor, dedicação, confiança e pelo ensinamento que me fez chegar aqui: os estudos são a maior riqueza que os pais podem dar aos seus filhos. Amo vocês!

Ao meu noivo, Charles,

pela constante colaboração e estímulo durante o decorrer do curso. Sempre vou te amar!

A toda a minha família e amigos,

que sempre torceram e confiaram na minha capacidade de realizar os meus sonhos.

Ao Pastor Acácio e sua esposa Jeane,

obrigada por serem realmente pastores, por estarem por perto nas horas de luta, por chorarem e rirem comigo, valeu! Que Deus os continue abençoando grandemente!

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PADCT) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À Dr^a Mônica Rosa Bertão, pela orientação, transmissão de conhecimentos e experiências, paciência e amizade dispensadas durante a realização deste trabalho.

À Dr^a Zeneide Martins da Silva, por ter me apresentado ao mundo científico em minha iniciação à Citogenética, e por desempenhar um papel indispensável na minha formação enquanto pesquisadora.

Ao Dr. Marco Antônio Costa, pela co-orientação, pelas valiosas contribuições, disponibilidade, assistência e pelo acolhimento e incentivos.

À Dr^a Janay Almeida Santos-Serejo, pela co-orientação através dos ensinamentos transmitidos, pela amizade, pela lição de paciência, pela atenção e apoio prestados.

Ao Dr. Leandro Lopes Loguercio, não apenas por toda colaboração prestada ao longo desses anos, pela correção do abstract e, especialmente, pela sua amizade, confiança e crédito confiado.

Ao Dr. Ronan Xavier Corrêa, pela experiência de vida profissional (ética), laboratorial e pessoal, não poderia esquecer da viabilização em viagens para andamento da dissertação através do PADCT/CNPq. Muito obrigada!

À Dr^a Neiva Izabel Pierozzi, pela colaboração com artigos importantes para revisão bibliográfica e comparação com o meu objeto de estudo.

Aos Professores do Curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela colaboração na minha formação profissional.

Aos colegas de turma Ademilde, Alayne, André, Claudine, Dahyana, Dorival, Lívia, Maíza, Márcia, Sônia, Stênio, Valéria, Vanderly, pelo companheirismo no decorrer do Curso.

A Brasilino Raimundo dos Santos, pela grande colaboração na coleta do material botânico.

À MSc. Patrícia Nayara Caldas Silva Rocha, pelo apoio, pelas sugestões, pela amizade e pelo carinho constantes.

Às colegas, em especial, Van e Alayninha, pelas ajudas não somente no laboratório, pelas proveitosas trocas de idéias e pela convivência agradável.

Às companheiras do Colegiado do Mestrado Melila, Expedito, Nayala, Jeiza, Fernanda e Andréa pela colaboração, todas às vezes de necessidade.

Ao “pessoal” do Laboratório de Citogenética, em especial a Rafael e Tiago, pela amizade, pela colaboração nos serviços laboratoriais e pelo excelente convívio durante este trabalho.

À “todos os meus amigos-irmãos em Cristo”, pois o homem de muitos amigos deve mostrar-se amigável, mas há um amigo mais chegado do que um irmão. Provérbios 18:24. Obrigada por TUDO.

À todos cujos nomes não estão aqui, mas que direta ou indiretamente me ajudaram, oraram e estiveram comigo neste trabalho.

A FÉ

Quando a força te faltar
A coragem te deixar
E as lágrimas banharem o teu rosto
E sentir a sensação de uma eterna solidão
Esperando um futuro que passou

É exatamente assim
Quando tudo está no fim
Quando já sofremos tanto no deserto
Se tua força não puder te fazer ficar de pé
Esse é o momento do poder da Fé

A Fé só abre os mares
Quando o momento chegar
A Fé se manifesta
Quando o limite da força acabar
A Fé tem seu segredo
Não se revela ao que tem medo
Mas ao que luta
Até o momento de a Fé chegar

A Fé – Sérgio Lopes

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| EXTRATO | ix |
| ABSTRACT..... | xi |
| Lista de Tabelas | xiii |
| Lista de Figuras..... | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 4 |
| 2. 1. Caracterização da família Rubiaceae..... | 4 |
| 2. 2. O gênero <i>Genipa</i> e a espécie <i>Genipa americana</i> L. | 7 |
| 2. 2. 1. Origem..... | 7 |
| 2. 2. 2. Distribuição Geográfica | 8 |
| 2. 2. 3. Características Botânicas..... | 8 |
| 2. 2. 4. Importância Econômica | 11 |
| 2. 2. 5. Aspectos históricos , cromossomos, estruturas e tipos..... | 13 |
| 2. 2. 6. Importância da citogenética no estudo das plantas cultivadas, discutindo e exemplificando..... | 15 |
| 2. 2. 7. Estudos Citogenéticos, Isoenzimáticos e Moleculares de <i>Genipa americana</i> ... | 21 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| 3. 1. Material..... | 29 |
| 3. 2. Métodos..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 3. 2. 1. Pré-tratamento e germinação de sementes | 30 |
| 3. 2. 2. Coleta, pré-tratamentos e fixação das raízes | 30 |
| 3. 2. 3. Método de Feulgen..... | 30 |
| 3. 2. 4. Bandamento C | 31 |
| 3. 2. 5. Coloração com nitrato de prata | 32 |
| 3. 2. 6. Coloração com DAPI e CMA ₃ | 33 |
| 3. 2. 7. Análise morfométrica dos cromossomos e elaboração do cariótipo..... | 34 |
| 4. RESULTADOS..... | 36 |
| 4. 1. Aspectos gerais do cariótipo | 36 |
| 4. 2. Aplicação de bandamento cromossômico | 39 |
| 4. 2. 1. Bandamento C | 39 |
| 4. 2. 2. Coloração com nitrato de prata | 43 |
| 4. 2. 3. Coloração com fluorocromos..... | 44 |
| 4. 2. 3. 1. DAPI - 4'-6-diamidino-2-fenilindol e cromomicina A ₃ - CMA ₃ | 44 |
| 5. DISCUSSÃO | 46 |
| 5. 1. Aspectos gerais do cariótipo | 46 |
| 5. 2. Aplicação de bandamento cromossômico | 48 |
| 5. 2. 1. Bandamento C | 48 |
| 5. 2. 2. Coloração com nitrato de prata | 51 |
| 5. 2. 3. Coloração com fluorocromos..... | 53 |
| 5. 2. 3. 1. DAPI - 4'-6-diamino-2-fenilindol e cromomicina - CMA ₃ | 53 |
| 6. CONCLUSÕES | 56 |
| 7. PERSPECTIVAS..... | 57 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |

EXTRATO

SANTOS, Rita de Cássia Vital, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Agosto de 2005. **Caracterização Citogenética de *Genipa americana* L.** Orientadora: Mônica Rosa Bertão. Co-orientador: Marco Antônio Costa. Colaboradora: Janay Almeida dos Santos-Serejo.

Genipa americana L. (Rubiaceae) é uma arbórea distribuída por toda América Tropical. Tem sua importância tanto como fonte alimentícia, quanto na extração de essência florestal. Apesar da utilização e exploração em todo o Brasil, devido ao seu potencial nutricional, fácil cultivo e pronta aceitação no mercado consumidor, são escassas as informações referentes à evolução, à variabilidade das populações e aos recursos genéticos. Este trabalho teve como objetivo a caracterização cromossômica da *Genipa americana* L. através de parâmetros morfométricos (cariótipo e ideograma), bem como a avaliação de regiões organizadoras dos nucléolos ativos (NOR), regiões de heterocromatina constitutiva (bandamento C) e regiões cromossômicas ricas em AT e CG (DAPI e CMA₃). Para obtenção das preparações metafásicas sementes de populações diferentes oriundas do *Campus* da UESC e de fazendas da região sul da Bahia foram dispostas para germinação em câmara úmida a 30°C. As raízes foram coletadas e submetidas ao pré-tratamento com 0,03% 8-hidroxiquinolina por 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente. Após fixação em Carnoy (3:1) as raízes foram transferidas para etanol 70%. Para as análises morfométricas as raízes foram coradas pelo método de Feulgen e as preparações cromossômicas obtidas mediante esmagamento da região meristemática e coloração com orceína acética a 2%. Para as demais análises, as

raízes foram esmagadas em ácido acético a 45% e as preparações cromossômicas submetidas à coloração com Giemsa (bandamento-C), nitrato de prata (RON) e fluorocromos CMA₃ e DAPI. A análise citogenética permitiu confirmar a ocorrência de $2n = 22$ para *Genipa americana* L., corroborando Guerra (1986). Para a análise morfométrica dos cromossomos desta espécie, foram selecionadas 10 melhores metáfases e com o auxílio do compasso de ponta de seca e papel milimetrado, foram medidas, possibilitando a elaboração de um cariótipo constituído de 11 pares cromossômicos sendo: oito pares metacêntricos e três pares submetacêntricos, onde dois pares (1 e 2) apresentaram constrição secundária no braço longo e dois pares (7 e 11) apresentaram constrição secundária no braço curto. Para cada par cromossômico foram obtidos os seguintes valores médios para comprimento absoluto (μm): **1**, CA-7,72; **2**, CA-6,68; **3**, CA-6,06; **4**, CA-5,51; **5**, CA-5,35; **6**, CA-5,11; **7**, CA-4,89; **8**, CA-4,50; **9**, CA-4,09; **10**, CA-3,45; **11**, CA-3,17. A aplicação da técnica de impregnação pelo nitrato de prata (RON) permitiu a visualização de no máximo dois nucléolos ativos por núcleo interfásico, não coincidindo com o número de RONS. A metodologia de bandamento C permitiu evidenciar blocos heterocromáticos terminais e intersticiais, em todos os pares cromossômicos, mostrando heteromorfismo em cromossomos homólogos. A aplicação dos fluorocromos CMA₃ e DAPI revelou regiões fortemente marcadas coincidentes presentes nas extremidades de alguns cromossomos, desta forma marcando os blocos heterocromáticos, encontrado com bandamento C. É importante salientar que as regiões satelitadas também se mostraram marcadas por ambos os fluorocromos.

Palavras-chave: Jenipapo, bandamento cromossômico, fluorocromos.

ABSTRACT

SANTOS, Rita de Cássia Vital, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, August, 2005. **Cytogenetics Characterization of *Genipa americana* L.** Advisor: Mônica Rosa Bertão. Advisor Committee Members: Marco Antônio Costa and Janay Almeida dos Santos-Serejo.

Genipa americana L., Rubiaceae is a tree species largely distributed over the tropical American continent, being important as a source of food and essences. Despite its large use in Brazil, due to its nutritional, farming and consumer acceptance characteristics, little is known about this species in terms of evolution, population variability and genetic resources available. In this work, we aimed at the karyotypic characterization of *G. americana* through morphometric parameters, as well as by evaluations of nucleolus organizing regions (NOR). Seeds collected in different locations in the state Bahia were germinated, the root tips collected and subjected to a pre-treatment with 0.03% of 8-hydroxyquinoline for 2,5 hours, to obtain cytological preparations at mitotic metaphases. The roots were fixed in Carnoy (3:1) and transferred to 70% ethanol, where they were subjected to staining assays by the methods of Feulgen and NOR banding. Cytological preps were obtained through the technique of smashing roots in 2% acetic orcein (Feulgen) and Carnoy fixer (NOR banding). The cytological analysis evidenced a diploid number of 22 chromosomes for *G. americana*, confirming previous data by Guerra (1986). The morphometric analysis of the chromosomes allowed the production of a standard karyotype constituted by, eleven pairs being: eight metacentric and three submetacentric pairs, with two pairs (1 and 2) presenting secondary constriction in the long arm and one

pair (11) presenting secondary constriction in the short arm. For each chromosomal pair the following mean values for absolute length had been calculated (μm): **1**, CA-7,72; **2**, CA-6,68; **3**, CA-6,06; **4**, CA-5,51; **5**, CA-5,35; **6**, CA-5,11; **7**, CA-4,89; **8**, CA-4,50; **9**, CA-4,09; **10**, CA-3,45; **11**, CA-3,17, whereas the NOR banding technique indicated the presence of interphase nuclei bearing 1 to 2 nucleolus organizing regions, corresponding to rDNA active sites. C banding evidenced interstitial and terminals heterochromatic blocks in all the chromosome pairs. Fluorochrome staining revealed coincident CMA₃ and DAPI markings in the chromosomal terminals, overlapping the heterochromatic blocks. This suggests that the heterochromatic blocks are rich in AT and CG base pairs. It is important to point out that the satellite regions were also marked by both the fluorochromes.

Key-words: Genipa, Chromosome banding, fluorochromes.

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Tipos cromossômicos e suas razões de braços. | 14 |
| Tabela 2. Detalhes da espécie, origem e número de plantas estudadas em 10 populações da <i>Genipa americana</i> L..... | 29 |
| Tabela 3. Valores de comprimento absoluto (CA - micrômetros), relação de braços (RB), comprimento relativo (CR - %) e comprimento do lote haplóide (CLH – micrômetros) da espécie <i>Genipa americana</i> L. | 42 |
| Tabela 4. Dados morfométricos em cromossomos metafásicos em dez células de <i>Genipa americana</i> L..... | 42 |

Lista de Figuras

- Figura 1.** Árvore de *Genipa americana* L., Foto G. P. Delprete, 20049
- Figura 2.** Flores de *Genipa americana* L., Foto G. P. Delprete, 2004..... 10
- Figura 3.** Fruto de *Genipa americana* L., Foto H. Lorenzi, 1992..... 10
- Figura 4.** Sementes da *Genipa americana* L., Foto H. Lorenzi, 1992..... 10
- Figura 5.** Cromossomos metafásicos de *Genipa americana* L. corados pelo Método de Feulgen ($2n = 22$). Setas indicam: grandes blocos heterocromáticos nas regiões terminais dos cromossomos. Pontas de seta indicam cromossomos satelitados.38
- Figura 6.** Cariótipo da espécie *Genipa americana* L. ($2n = 22$): Cromossomos corados pelo Método de Feulgen38
- Figura 7.** Metáfase mitótica de *Genipa americana* L. corada com a metodologia de Bandamento C.....40
- Figura 8.** Cariótipo da espécie *Genipa americana* L. ($2n = 22$): Cromossomos corados pelo Método de bandamento C com Giemsa.40
- Figura 9.** Ideograma da espécie *Genipa americana* L. ($2n = 22$), evidenciando o padrão de bandas C, as constrições secundárias no braço longo dos pares cromossômicos nº 1 e 2 e o pares nº 7 e 11 com constrições secundárias nos braços curtos. 40
- Figura 10.** Núcleos interfásicos de *Genipa americana* L. Setas evidenciam a ocorrência de 1 (a) e 2 (b) nucléolos.....45
- Figura 11.** Metáfase mitótica de *Genipa americana* L. corada com fluorocromo DAPI.(a). Metáfase mitótica de *Genipa americana* L. corada com fluorocromo CMA3 (b).45

Figura 10. Núcleos interfásicos de *Genipa americana* L. Setas evidenciam a ocorrência de 1 (a) e 2 (b) nucléolos..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 11. Metáfase mitótica de *Genipa americana* L. corada com fluorocromo DAPI.(a). Metáfase mitótica de *Genipa americana* L. corada com fluorocromo CMA3 (b). **Erro! Indicador não definido.**

1. INTRODUÇÃO

Genipa americana L., espécie da família Rubiaceae popularmente conhecida como jenipapeiro, constitui-se em uma espécie arbórea de grande porte, encontrada tanto no interior da mata primária como nas formações secundárias. Originária e distribuída por toda a América de clima tropical é uma espécie muito comum na região do Nordeste brasileiro.

Esta espécie representa uma atividade econômica extremamente promissora, principalmente por causa da excelência na qualidade dos frutos. Esta fruteira apresenta características econômicas peculiares, por causa de seu potencial em fornecer essência florestal, produto farmacêutico anticancerígeno, produto alimentício, matéria-prima útil à indústria madeireira para a produção de móveis, barcos e matriz de xilogravura ou para ser utilizada em plantios heterogêneos visando a recuperação de áreas degradadas e ao reflorestamento (FIGUEIREDO et al., 1986; BORGES et al., 1994; ZANETTE; KUDLA, 1994).

Análises do conteúdo de macro e micronutrientes da casca, polpa e sementes de jenipapo, têm evidenciado que esta espécie frutífera representa uma das mais ricas fontes de nutrientes para alimentação humana, além de seu valor social e econômico (SILVA et al., 1984), enquanto avaliações de características químicas e físicas de frutos pós-colheita têm demonstrado condições essenciais à conservação adequada de frutos (SILVA et al., 1998).

A despeito do elevado potencial da utilização e exploração da cultura do jenipapeiro em todo Brasil, principalmente na Bahia, são escassas as informações referentes à evolução, à variabilidade das populações, e aos recursos genéticos disponíveis (SILVA; SANTOS, 1999). É importante salientar que estas informações são importantes para o desenvolvimento de programas de melhoramento que visem

aumentar a produtividade, melhorar a qualidade nutricional dos frutos, conter a erosão genética através da caracterização e posteriormente amplificação da diversidade genética existente. Tais perspectivas, além de contribuir para a preservação e exploração ordenada de muitas espécies, tendem a ampliar a disponibilidade de recursos econômicos na região Sul da Bahia.

Entre as ferramentas que podem auxiliar na obtenção deste conhecimento encontram-se as análises citogenéticas, que são de suma importância na descrição da variabilidade genética e no entendimento da dinâmica cromossômica envolvendo uma determinada espécie. Além de permitirem a elucidação da estrutura e organização do genoma vegetal e de mecanismos evolutivos, tais análises viabilizam a elaboração de estratégias que podem ser utilizadas em programas de melhoramento visando transferência de genes de interesse. Os estudos citogenéticos sobre a espécie *G. americana* L. são escassos. Portanto, são necessários novos estudos para conhecer os parâmetros cariotípicos e a diferenciação morfológica. Contudo, os poucos trabalhos registrados na literatura merecem destaque.

Guerra (1986) relatou que o jenipapeiro é uma espécie diplóide com $2n = 22$ cromossomos, que apresenta uma das mais elevadas proporções de heterocromatina conhecida entre as espécies vegetais. Com relação à morfologia dos cromossomos, descrições foram realizadas por Pierozzi e Mendaçolli (1997), usando as técnicas de coloração convencional e bandamento C.

Em um trabalho empregando fluorocromos, Guerra (1993a), mostrou que *G. americana* tem uma grande quantidade de heterocromatina constitutiva e evidenciou ainda a diferença entre a eucromatina e heterocromatina, permitindo a direta comparação entre a riqueza de bases específicas GC e AT.

Bortoleti et al. (2002a) empregando metodologias de bandamento e fluorocromos, demonstraram um padrão de bandas CMA⁺ com variações na posição e tamanho das bandas entre populações, entre indivíduos da mesma população e mais raramente entre cromossomos homólogos do mesmo indivíduo. Houve fortes marcações das RONS com nitrato de prata nas populações, e nos núcleos interfásicos a coloração com nitrato de prata marcou desde um único nucléolo até 16 nucléolos.

Bortoleti et al. (2003) revelaram um padrão bastante irregular e assincrônico na meiose, como por exemplo na diacinese, com onze bivalentes individualizados, enquanto em outras células foram observados multivalentes de tamanho e número variável, sendo que em alguns casos foi observado um único multivalente, sugerindo a ocorrência de um complexo de translocação.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de aplicar técnicas citogenéticas visando a caracterização cromossômica da *G.americana* L, através de parâmetros morfométricos (cariotípico e ideograma) e descrever o padrão de diferenciação morfológica ao longo do seu complemento cromossômico por meio dos bandamentos C, NOR e fluorocromos DAPI e CMA₃.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1. Caracterização da família Rubiaceae

A família Rubiaceae está situada entre os quatro maiores grupos das Angiospermas, junto a Poaceae, Orchidaceae e Asteraceae, sendo constituída por 650 gêneros e aproximadamente 13.000 espécies (ROVA et al., 2002). No Neotrópico a família é representada por mais de 200 gêneros e mais de 5.000 espécies (DELPRETE et al., 2004) e no Brasil por aproximadamente 118 gêneros e 1.600 espécies (DELPRETE, 1998), que ocorrem principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, atingindo também as regiões temperadas e frias da Europa e Norte do Canadá (GERMANO-FILHO, 1999). Na classe das Gamopétalas, a família Rubiácea deve ser superada pelas Compostas, em número de espécies que são as mais importantes entre todas as famílias. Sem dúvida, elas compartilham com as Gamopétalas uma afinidade estreitíssima. Entre as Polipétalas, as Leguminosas aparecem com o maior número de espécies e entre as Monocotiledôneas, as Orquidáceas ultrapassam as Rubiáceas (CHIQUIERI et al., 2004).

É a maior família que contém espécies distílicas dentro das Angiospermas, espécies com este polimorfismo floral podem apresentar variações de diferentes formas e graus, tais como: originar derivações como homostília, monomórfica e diócia ou apresentar variações tanto entre populações distílicas da mesma espécie, quanto entre gêneros e espécies tipicamente distílicos (CONSOLARO, 2004).

Como as Rubiáceas estão presentes em quase todos os tipos de vegetação e com quase todos os tipos de hábitos, considera-se que representem uma das famílias mais importante, junto com as Leguminosas, a ser usada como indicador

ecológico e também como parâmetro para a avaliação do estado de conservação da maioria dos ambientes tropicais. A família Rubiaceae é mais representada em forma de arbustos na sobra das florestas úmidas, representando uma importante fonte de alimentação de insetos, aves e mamíferos locais. Num estudo preliminar sobre a vegetação neotropical (DELPRETE et al., 2004), foi estimado que as espécies de Rubiaceae representam de 5% a 30% das espécies de Fanerógamas, dependendo da altitude, tipo de solo, temperatura, precipitação e umidade atmosférica. Considerados os aspectos mencionados, a determinação e a observação de campo das Rubiáceas são de importância cardinal no estudo e conhecimento da ecologia das regiões tropicais do mundo.

A Rubiaceae contém um número amplo de acúmulo de alumínio (Al) de algumas famílias. Tradicionalmente, esta família teria sido dividida em duas subfamílias: Cinchonoideae, com muito óvulos por lóculos nos ovários e Coffeoidae, com um óvulo por lóculo (SCHUMANN, 1891). Bremekamp (1966; oito subfamílias) e Verdcourt (1958; três subfamílias) tinham introduzido uma série de novas características para delimitar subfamílias. Robbrecht (1988), utilizou correlações evolutivas tendendo a apresentar uma emenda para o sistema de Bremekamp e Verdcourt, identificando quatro subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae. Recentes novos sinais na família, todavia, foram obtidos através de dados moleculares (ANDERSSON; ROVA, 1999) e demonstrados à natureza polifiléticos para a subfamília Antirheoideae (LENS et al., 2000).

Com a introdução de estudos filogenéticos usando dados moleculares, durante a última década foi demonstrado que as Rubiaceae são naturalmente divididas entre três subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae, mas com a posição e definição das tribos completamente revolucionada. O primeiro estudo filogenético da família foi apresentado por Bremer e Jansen (1991), onde, usando *rbcl* e um número limitado de gêneros, foram encontrados três cladogramas principais, divisão que foi confirmada usando o mesmo marcador genético, mas usando 49 gêneros, por Bremer et al. (1995). Nessa última análise, *Luculia* (gênero de 5 espécies, endêmico da região do Himalaya e Província de Yunnan da China, Ásia subtropical), continua sendo encontrado num clado

separado, indicando a possibilidade em um futuro reconhecimento de uma subfamília monotípica.

Estudos sucessivos com outros marcadores genéticos e com um número maior de gêneros confirmaram a divisão das Rubiaceae em três subfamílias e começaram a indicar as principais tribos de cada subfamília, como por exemplo, os estudos filogenéticos onde foram usados *rbcl* e *ndhF* combinados, apresentados por Andreasen e Bremer (1996), Bremer (1996), Bremer et al. (1999), e usando *rps16* por Rova (1999).

De particular importância pelo uso de um marcador molecular adicional, é o estudo recentemente publicado por Rova et al. (2002), onde foi usado *trnL-F*. Neste estudo foi confirmada a monofilia da família e de quatro clados distintos, representando as três subfamílias e o gênero *Luculia*, com a mesma topologia encontrada por Bremer e colaboradores (1999).

Com esses estudos filogenéticos moleculares foi demonstrado que alguns caracteres morfológicos que foram usados ao nível de subfamília ou de tribo por Bremekamp (1966), Verdcourt (1958) e Robbrecht (1988, 1993), são caracteres altamente plásticos num sentido evolutivo, como por exemplo, a carnosidade do mesocarpo, o tipo de placentação e o número de óvulos por cada lóculo do ovário. Isso não significa que esses caracteres devem ser abandonados, mas significa que a utilidade taxonômica destes caracteres deve ser reavaliada com uma nova série de estudos detalhados de morfologia, anatomia e de desenvolvimento, e comparados com um contexto evolutivo (JANSEN et al., 1997; 1999, 2002; LENS et al., 2000).

Na América, a família está representada por 229 gêneros e 5.200 espécies. Apresenta amplas distribuições geográficas, ocupando principalmente as regiões tropicais do globo terrestre, sendo mais de 80% de seus gêneros constituídos predominantemente por espécies lenhosas (SILVA NETO; CALLADO, 2000). As espécies desta família são facilmente reconhecidas pelas folhas simples, opostas e estípulas interpeciolares (GERMANO-FILHO, 1999).

Algumas espécies da família Rubiaceae são muito importante comercialmente como, por exemplo: *Coffea arabica* e *Coffea canephora* com a utilização do grão fermentado, triturado, torrado, amadurecido, seco e principalmente a bebida. Uma outra espécie também importante comercialmente é a *Ixora sp.*, muito utilizada como

espécie ornamental e outra espécie é a *Cinchona pubescens* que, após a extração do quinino, o mesmo é utilizado para o tratamento da malária.

2. 2. O gênero *Genipa* e a espécie *Genipa americana* L.

2. 2. 1. Origem

Genipa L. (Rubiaceae, tribo Gardenieae) é um pequeno gênero neotropical que consiste em apenas três espécies, *Genipa americana* L., *G. infundibuliformis* Zappi et Semir e *G. williamsii* Stanley, todas árvores robustas, perenes e dióicas (PIEROZZI e MENDAÇOLLI, 1997). Linnaeus, (1759) baseou-se em duas ilustrações para o nome da *G. americana* L.: Plumier (1757) e Marcgrave (1648). A ilustração de Plumier baseou-se no material do Caribe, amostras de plantas com flor curta em forma de tubo e cálice truncado. Marcgrave ilustrou amostras onde os muitos espécimes citados poderiam ser encontrados no Nordeste do Brasil (provavelmente reconstituído com muito prejuízo do material do herbário), mas estes com cálices truncados perfeitamente visíveis. Este teria sido preferível para designar as ilustrações de Plumier como o leptótipo de *G. americana* L., todavia, Howard (1989) designou a ilustração de Marcgrave, seguindo a discussão apresentada por Steyermark (1972), que considerava isto importante para referência da espécie originada no Brasil (PIEROZZI et al., 1995).

A principal dificuldade concentrava-se na identidade da *G. americana* L. por acaso originada a partir da ilustração usada por Schumann (1889) na Flora do Brasil recentemente reproduzida na lista de *Rubiaceae* Neotropical, compilado por Andersson, 1992. O hábito de retirar claramente amostras de flores de *G. infundibuliformis*, apesar da dissecação das flores até a parte mais baixa da folha (SCHUMANN, 1889) amostras que poderia ser possivelmente de árvore *G. americana* L. Este misturado de folhas é a razão porque estas espécies foram permanecendo examinadas por mais de um século. Todavia, o conceito de *G. americana* L. pode ser acoplado para o material na qual a espécie foi inicialmente baseada, e sobre seus leptótipos ilustrações de Marcgrave (1648).

2. 2. 2. Distribuição Geográfica

A *Genipa americana* L. é a mais conhecida do gênero, sendo uma espécie arbórea originada em áreas de Cuba, Espanha, Porto Rico. Estas foram transportadas para a Índia e reportada para Europa e cultivadas no Brasil no espaço de 100 anos (MORTON, 1987). Foi espalhada através dos Trópicos Americanos por seres humanos em tempos pré-históricos. Hoje em dia é distribuída por toda América Tropical (SEBBENN et al., 2003). Sua distribuição geográfica no Brasil abrange desde a Guiana e Marajó até São Paulo e Mato Grosso. Fora do Brasil sua distribuição também é vasta, estendendo-se do México às Antilhas (GOMES, 1982).

A exemplo da *G. americana*, tanto a *G. infundibuliformis* quanto a *G. williansii* são desconhecidos os centros de origem porém, a distribuição é respectivamente no Sudeste do Brasil e Costa Rica e Panamá (PIEROZZI et al., 1995).

2. 2. 3. Características Botânicas

Planta semicídua, heliófita, seletiva higrófila, característica das florestas pluvial e semicídua situada em várzeas úmidas e brejosas. Pode ocorrer também em outras formações florestais, porém sempre em terrenos muito úmidos. É encontrada tanto no interior da mata primária como nas formações secundárias (LORENZI, 1992).

O jenipapeiro adapta-se muito bem ao clima tropical, não existindo restrições quanto a altas temperaturas, mas não é aconselhável o seu plantio onde o inverno é rigoroso e ocorrem geadas (XAVIER, M; XAVIER, A, 1976). É uma fruteira que apresenta ampla dispersão nas florestas Neotropicais e intensa regeneração em áreas de elevada atividade antrópica (CARVALHO, 1994), além disso, é considerada uma espécie tolerante ao alagamento e indicada para recomposição de matas ciliares (ANDRADE et al., 2000; LOBO; JOLY, 1996).

Entre as espécies arbóreas tropicais adaptadas às matas ciliares, é destacada a *Genipa americana* L., representando espécies de dispersão hidrocórica, díocicas e de polinização entomofílica. Devido às características adaptativas ao ambiente ciliar,

combinadas com o rápido crescimento e abundante produção de sementes, *G. americana* L. tem sido muito recomendada e utilizada na recuperação de áreas degradadas (DURIGAN; NOGUEIRA, 1990; ALMEIDA et al., 1994; RODRIGUES et al., 1994; ZELAZOWISKI; LOPES, 1994).

Produzindo anualmente grande quantidade de sementes viáveis, o jenipapeiro tem sua importância econômica tanto pela essência florestal, quanto pela produção de alimentos (FIGUEIREDO et al., 1986). “Bela árvore da família das rubiáceas que se eleva até 14 metros; de ordinário, porém não excede 8-10 metros, as suas folhas, verde-escuras, são glabras em ambas as faces, grandes, inteiras, raramente sinuadas, coriáceas, luzidias, levemente pecioladas (5-15 mm), inseridas muito próximo umas das outras, junto da extremidade dos raminhos glabros, a ramagem simula não raro a disposição verticilada de um guarda-chuva (BRAGA, 1923)”. (Figura 1).

A madeira é moderadamente pesada, flexível, compacta, fácil de trabalhar, de longa durabilidade quando não exposta ao solo e à umidade; alborno estreito e distinto (LORENZI, 1992).



Figura 1. Árvore de *Genipa americana* L., Foto G. P. Delprete, 2004.

As flores de *Genipa americana* L. apresentam-se dispostas em cimeiras curtas (4-5 cm) ou compridas (10-15 cm), e constam de cálice tubuloso, dentado ou crenado, glabo por fora, do comprimento do ovário ou bastante mais longo do que este; de corola com 2-4,5 cm de comprimento, branca ou amarelada, com o tubo polínico dividido em lacínias, estames inclusos (comprimento: 1,8-2,5 cm), estilete comprido (1-8,4 cm), pentágono, engrossado acima do meio, estigma fusiforme ou aclavado (BRAGA, 1923). (Figura 2).

O jenipapeiro tem uma baga de 10 a 12 cm de diâmetro, globosa, mas um tanto alongada, sendo sua casca mole, parda ou pardacento, amarelada, membranosa, fina, enrugada. A polpa mostra-se sucosa doce, parda, perfumada e acre. Envolve numerosas sementes que se encontram reunidas na parte interna do núcleo, são pardas, achatadas, mais ou menos do tamanho do grão de milho. (Figura 3 e 4).



Figura 2. Flores de *Genipa americana* L., Foto G. P. Delprete, 2004.



Figura 3. Fruto de *Genipa americana* L., Foto H. Lorenzi, 1992.



Figura 4. Sementes da *Genipa americana* L. Foto H. Lorenzi, 1992.

No jenipapeiro nunca faltam flores e frutos em fase de amadurecimento e maduros. Em um jenipapeiro, enquanto uma parte floresce a outra frutifica. E geralmente em novembro, ele desfaz das folhas ficando encaroçado com frutos verdes, grandes e pequenos, logo depois enfolha novamente e os frutos grandes começam a

amadurecer sempre em fevereiro a maio e depois da colheita surgem novas flores (FONSECA, 1971).

A espécie parece desenvolver-se melhor em áreas com pluviosidade entre 1.200 e 4.000 mm e com temperatura médias anuais entre 18° C e 28° C (FAO, 1986).

2. 2. 4. Importância Econômica

A árvore é muito útil para plantios mistos em áreas brejosas e degradadas de preservação permanente, visto fornecer abundante alimentação para a fauna em geral. O jenipapo raramente é consumido tal como se encontra na natureza. É servido passado na frigideira com manteiga e depois adoçado com bastante açúcar e pó de canela. Seus frutos são bastantes apreciados, quando ainda verde fornecem suco de cor azulada que é consumido e também utilizado como corante (LORENZI, 1992).

Após a maturação presta-se para compotas, cristalizados, sorvetes e refrescos; se colocado em infusão de álcool, prepara-se dias depois um saboroso licor; e se submetido à fermentação, tem-se um vinho também muito saboroso (GOMES, 1982). São muito apreciados e consumidos pelas populações mais carentes, pois apresentam alto teor de ferro e podem ser consumidos tanto no natural, como na forma processada (CARVALHO, 1994).

A casca e os frutos verdes contêm uma substância corante violeta ou azul-escuro (PRANCE, 1975), denominada genipina, isolada pela primeira vez em 1960 (ESTRELLA, 1995). Essa matéria corante é solúvel na água e no álcool, mas torna-se preta em contato com o ar (PRANCE, 1975). Antigamente era usada pelos índios para se pintarem de negro e como repelente contra insetos (KEELER, 1964) e, ainda hoje, é empregada na marcação de peças de roupas, pintura de palha e tecidos. A madeira clara do jenipapeiro é utilizada na fabricação de raquetes, cabos de ferramentas e utensílios domésticos (GOMES, 1973; FIGUEIREDO et al., 1986; ALMEIDA, 1993). E ainda na construção civil, carrocerias, marcenaria, coronhas de armas, peças curvadas, carpintaria em geral (LORENZI, 1992).

Silva et al. (1984) relataram resultados da análise do conteúdo de macro e micronutrientes de casca, polpa e sementes de jenipapo, e ressaltaram que esta

espécie frutífera representa uma das mais ricas fontes de nutrientes para alimentação humana, além de seu valor social e econômico. Assim, fica evidente que a cultura do jenipapeiro, muito comum na região do Nordeste brasileiro, constitui uma atividade econômica extremamente promissora, principalmente devido a excelência na qualidade dos frutos.

Figueiredo (1984), estudando as características físicas do jenipapo, obteve dados médios importantes para a caracterização dos frutos desta espécie como: peso do fruto (168 g); peso da casca (11g); peso das sementes (67,5g). Com relação às características químicas, os frutos de jenipapo, em condições comerciais, devem apresentar teores de sólidos solúveis entre 18 e 20° Brix; acidez total titulável entre 0,20 e 0,40%, e o teor de vitamina C entre 1,0 e 2,0 mg de ácido ascórbico/100g de polpa (WONG, 1995).

O teor de ácidos orgânicos, com poucas exceções, tende à diminuição com o amadurecimento dos frutos, em decorrência do processo respiratório ou de sua conversão em açúcares. Sendo o período do amadurecimento o de maior atividade metabólica, pode-se dizer que os ácidos orgânicos constituem uma excelente reserva energética dos frutos, através de sua oxidação no ciclo de Krebs (BRODY, 1996).

De acordo com Lorient e Linden (1996) os teores de vitamina C em frutos, tendem a aumentar com o avanço do amadurecimento, alcançando um pico alguns dias ou semanas antes de completo, e decrescendo na senescência.

Na medicina popular, os frutos maduros são utilizados no tratamento para anemia, asma e diarreia; a extração da casca é utilizada contra mordida de insetos e o látex da casca dissolvido em água serve como colírio; o fruto verde cozido serve para feridas e pequenas úlceras e o fruto verde ralado é utilizado para cicatrizar umbigos, calos, além de ser anti-sifilítico; a decocção da flor serve como tônico e é febrífugo e mais outras utilidades encontradas nas folhas, raízes, brotações (SALVADOR, 1986).

2. 2. 5. Aspectos históricos , cromossomos, estruturas e tipos

As primeiras idéias sobre cromossomos surgiram no fim do século XIX, quando os primeiros estudos sobre mitose foram realizados. Em 1866, Haeckel propôs que o núcleo celular era o principal agente responsável pela divisão das células. O primeiro cientista, entretanto, a descrever o processo da divisão celular mitótica de forma clara foi o zoólogo alemão Anton Schneider, em 1873.

Posteriormente, outros pesquisadores ampliaram os estudos sobre mitose. Contribuições importantes foram dadas por Strasburger, em 1875 e por Flemming, de 1879-1822, este último o responsável pelo termo “mitose”. A partir disso, a divisão mitótica foi melhor compreendida em animais e vegetais. Em 1880, Balbiani descobriu a existência dos cromossomos politênicos de díptero *Chironomus*, bastante comuns em insetos. Em 1881, Flemming descobriu os cromossomos plumosos nos ovócitos do anfíbio *Siredon*.

Embora os estudos com cromossomos tenham se tornado freqüentes, a idéia de que estavam envolvidos com herança somente surgiu em 1887, nos trabalhos de Weismann, que os introduziu na teoria de herança. A Teoria de Weisman, mesmo sido formulada com total ignorância das leis de Mendel, foram redescobertas apenas em 1900, por três cientistas: Correns, de Vries e Tschermak, em uma série de estudos de citologia. Com renascimento das leis de Mendel, surgiu a Teoria da herança cromossômica, que relaciona os cromossomos, onde a citologia e a genética passaram a sobrepor seus conhecimentos numa área posteriormente denominada Citogenética (Guerra, 1988).

Na maioria das vezes em que é observado o termo cromossomos, este está relacionado com cromossomos metafásicos mitóticos de eucariotos.

Os procariotos são monoplóides, enquanto muitos dos animais e vegetais superiores são diplóides, tendo dois conjuntos de genes, um de cada progenitor. Há também várias plantas poliplóides, carregando várias cópias do genoma. A informação genética da maioria dos procariotos é armazenada em um único cromossomo. Além dos eucariotos excederem em muitas vezes o número de cópias do genoma quando comparados aos procariotos, este DNA também está organizado em vários cromossomos e estes cromossomos podem estar presentes na célula em

duas (diplóide) ou várias (poliplóides) cópias. A citogenética tem como objeto de estudo principal os cromossomos de eucariotos (White, 1977).

O cromossomo metafásico típico é formado por duas cromátides irmãs, uma delas oriunda de processo de duplicação da cromatina. As cromátides se encontram presas por uma região delgada, chamada constrição primária ou centrômero. O centrômero divide a cromátide em dois braços cromossômicos, ou pode estar localizado na região terminal de um braço, formando um cromossomo com um braço apenas. Em alguns cromossomos pode ser visualizada ainda uma constrição secundária, outra região de condensação diferenciada no cromossomo. O segmento seccionado pela constrição secundária e anterior ao telômero. É conhecido como satélite. Com base na localização dos centrômeros são feitas as classificações dos tipos cromossômicos. Um exemplo é a classificação de Levan et al. (1964) que considera quatro tipos cromossômicos em relação à razão de braços de acordo com a Tabela 1. A razão é calculada dividindo-se a medida do braço maior (q) pela do braço menor (p).

Tabela 1. Tipos cromossômicos e suas razões de braços.

| TIPO CROMOSSÔMICO | RAZÃO DE BRAÇOS |
|--------------------------|------------------------|
| metacêntrico | RB = 1,00 – 1,70 |
| submetacêntrico | RB = 1,71 – 3,00 |
| subtelocêntrico | RB = 3,01 – 7,00 |
| acrocêntrico | RB > 7,01 |

A partir da forma e do número de cromossomos de uma espécie, é estabelecido seu cariótipo. Os cromossomos mitóticos, em fase de metáfase, são utilizados para a descrição do cariótipo da espécie. Além das colorações ditas como convencionais (Giemsa, Orceína Acética, Reativo de Schiff, etc), podem ser aplicadas nos cromossomos metodologias que identificam “bandas”. Os

bandamentos (C, G, Q, R, Ag-NOR) são importantes para identificação de cromossomos homólogos e homeólogos e na caracterização de polimorfismos ou de relações de parentesco entre espécies próximas, distinguindo possíveis rearranjos cromossômicos.

2. 2. 6. Importância da citogenética no estudo das plantas cultivadas, discutindo e exemplificando

O conhecimento citogenético das espécies vegetais, apesar de ainda muito restrito, tem tido um avanço considerável e uma posição de destaque no cenário nacional. Noutras regiões do Brasil, embora os trabalhos de citogenética vegetal tenham sido iniciados muito mais cedo, eles foram voltados principalmente às plantas cultivadas. Um exemplo disso pode ser observado na excelente revisão sobre a pesquisa em citogenética vegetal realizada em mais de meio século no Sudeste apresentada recentemente por Cruz et al. (1993). Diversos outros estudos têm sido também desenvolvidos com plantas cultivadas.

O volume de dados existente sobre números cromossômicos de nossa flora ainda é muito pequeno, o que dificulta enormemente a compreensão da citotaxonomia dos grupos endêmicos. A resolução desse problema provavelmente dependerá de que os taxonomistas incorporem a metodologia de contagem cromossômica à sua rotina de pesquisa, como ocorre em muitos outros países, ou se aliem a citogeneticistas para um trabalho conjunto.

Nos últimos anos, começaram a surgir alguns grupos de pesquisa em citogenética vegetal em diferentes lugares do Nordeste, resultando na produção de algumas listas de números cromossômicos. A simples publicação dessas listas é uma contribuição muito importante para a citotaxonomia, uma vez que nesse tipo de estudo a aplicação correta dos dados na filogenia do grupo depende muito de um conhecimento completo da variação dos números cromossômicos no táxon em questão. Enquanto, quando não se dispõe de um volume substancial de dados sobre um determinado táxon é preferível acumular informações na forma de listas objetivas e deixar a análise citotaxonomica para uma revisão posterior. Isso é

particularmente verdadeiro quando o número cromossômico é muito variável, como nos gêneros *Rhynchospora* (LUCENÑO et al., 1995) e *Philodendron* (RAMALHO, 1995), por exemplo.

Em grupos mais estáveis, como gêneros *Crotalaria* (SOARES et al., 1988, OLIVEIRA, 1992) e *Anthurium* (RAMALHO, 1995) ou na tribo Phaseoleae (ALVES et al., 1990), a identificação do número cromossômico básico, ou ancestral do grupo, é possível mesmo quando os dados são ainda restritos.

Entre esses se destacam o trabalho pioneiro de Dias (1980), sobre o tamanho dos cromossomos mitóticos e o comportamento meiótico de *Rheo spathacea*, e o extenso trabalho desenvolvido com material dos bancos de germoplasmas. Esse último inclui a análise de diversas espécies e variedades de abacaxi (LIN, 1987) e de citrus (MIRANDA; GUERRA, 1992, SILVA et al., 1992, SANTOS; GUERRA, 1993a, b; SANTOS et al., 1993, CORNÉLIO, 1994) e de feijão (CARVALHEIRA, 1993, CARVALHO; GUERRA, 1995).

Tanto em abacaxi quanto em feijão e espécies cítricas, a maior dificuldade no estudo citológico é o reconhecimento de cada cromossomo individualmente, uma vez que todos são pequenos e morfológicamente semelhantes. Em *Citrus* e gêneros próximos, no entanto, foi possível caracterizar a maioria dos cromossomos de cada cariótipo por sua reação diferencial com corantes fluorescentes que se ligam preferencialmente ao DNA rico em pares de bases Adenina-Timina ou Guanina-Citosina (GUERRA 1993b). Com isso, está sendo possível caracterizar germoplasmas, identificar embriões zigóticos e nucleares, identificar híbridos interespecíficos (NOGUEIRA; GUERRA, 1992, CORNÉLIO; GUERRA, 1993, CORNÉLIO, 1994) e examinar a evolução da subfamília Aurantieae a nível cromossômico (SANTOS; GUERRA, 1993a, b; SILVA; GUERRA, 1995).

O estudo do cromossomo de feijão está principalmente voltado para a análise de cromossomos gigantes encontrados no tapete da antera. Esses cromossomos foram inicialmente descobertos, e mais intensamente estudados, no tapete da antera *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e em algumas espécies de *Phaseolus* (CARVALHEIRA; GUERRA, 1994). A importância maior do estudo desses cromossomos é que eles podem permitir uma análise na estrutura mais detalhada, fornecendo uma melhor compreensão da atividade gênica a nível cromossômico, principalmente no tapete,

onde a transcrição gênica parece ser muito intensa (MASCARENHAS 1990, CARVALHEIRA; GUERRA, 1994). Além disso, eles facilitam enormemente a construção de mapas físicos, fundamentais para a manipulação cromossômica. No momento, a estrutura desses cromossomos também tem sido analisada por meio de técnicas de bandamento cromossômico (CARVALHEIRA 1993; CARVALHO; GUERRA, 1995) e de hibridização *in situ* com marcadores moleculares (GUERRA, 1993c).

A análise citogenética ao nível populacional muitas vezes é fundamental para esclarecer dúvidas sobre a identificação taxonômica e a variabilidade cromossômica atribuída a determinados grupos. Um exemplo disso foi mostrado no gênero *Emilia*, para o qual havia registro na literatura de três espécies, todas supostamente com poliploidia intraespecífica. O exame de numerosas populações revelou que ocorrem apenas duas espécies: *E. sonchifolia* var. *sonchifolia* (de flores geralmente lilás, ou, mais raramente, brancas ou creme) e *E. fossbergii* (de flores vermelhas) e que cada espécie apresenta sempre o mesmo número cromossômico, $2n = 10$ e $2n = 20$, respectivamente, em toda a sua distribuição no Brasil (GUERRA; NOGUEIRA, 1990).

Estudos citológicos no gênero *Coffea* têm sido feitos com a tentativa de caracterizar os cromossomos mitóticos, através de técnicas convencionais e de bandamento C (PIEROZZI et al., 1999). No entanto, essas análises comparativas de cariótipos, mostraram-se difíceis e, até certo ponto, ineficientes devido ao pequeno tamanho e similaridade dos cromossomos, o que tem impedido a identificação de cada um deles dentro e entre os diferentes genomas. Informações cariológicas adicionais, realizadas a partir de análises de padrão cromomérico, na fase de paquíteno da divisão meiótica (PINTO-MAGLIO; CRUZ, 1987; 1998), confirmaram essa similaridade morfológica.

Concluiu-se, portanto, que há a necessidade de se utilizar outras técnicas para determinar a estrutura dos cromossomos das várias espécies desse gênero, para tentar estabelecer marcadores cromossômicos adequados, com a finalidade de empregá-los no monitoramento da transmissão e introgressão de caracteres de interesse para o melhoramento genético e para o estudo das relações evolutivas neste gênero. Uma nova perspectiva na caracterização de cromossomos, tem

surgido com o emprego de fluorocromos e de técnicas de citogenética molecular, mais precisamente as técnicas de hibridação *in situ*, Fish (fluorescent *in situ hybridization*) e Gish (*genomic in situ hybridization*) (PINTO-MAGLIO et al., 2000).

Guerra et al. (1988), com o intuito de contribuir para o conhecimento da diversidade citogenética de algumas espécies neotropicais, buscou identificar espécies vegetais que oferecem melhores condições para pesquisa acerca da evolução cromossômica ou cariotípica, e assim essa abordagem deveria fornecer um melhor conhecimento dos mecanismos de diversificação e evolução cromossômica da região neotropical.

O gênero *Cassia* parece promissor para um estudo taxonômico e evolutivo devido à sua grande diversidade cariotípica. Constitui o maior gênero da subfamília Caesalpinoidea e um dos 25 maiores gêneros entre as angiospermas, apresentando grande diversidade de hábito e caracteres vegetativos. Embora tenha três espécies que sejam cariotipicamente similares, tem uma quarta espécie, cuja identificação não foi possível (provavelmente *Cassia subtriflora*), onde não foi encontrado o número diplóide de $2n = 32$, sendo os cromossomos duas a três vezes maiores que nas demais espécies. O núcleo interfásico das três espécies é do tipo arreticulado com uma menor densidade do retículo cromático com *C. tora*. Os cromossomos profásicos apresentam também uma estrutura semelhante à de *Indigophera hirsuta* (GUERRA et al., 1988).

Em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), por exemplo, com $2n = 36$ e com cromossomos pequenos e muito semelhantes, a análise de 35 diferentes cultivares não mostrou nenhuma diferença cariotípica reconhecível com técnicas convencionais, exceto pela ocorrência de triploidia em uma cultivar estéril (CARVALHO, 1999; CARVALHO et al., 1999). O emprego de técnicas de bandamento C e coloração com fluorocromos CMA₃ e DAPI, também não revelou nenhuma diferenciação além das regiões organizadoras do nucléolo. A análise de oito espécies silvestres de *Manihot* também repetiu o mesmo resultado (CARVALHO, 1999).

Em outros grupos, como nos maracujás (*Passiflora*), se observa uma maior diferenciação cariológica. As espécies cultivadas como fruteiras possuem sempre $2n = 18$, mas variam no tamanho cromossômico e no número de satélites. Por outro

lado, as espécies estritamente ornamentais podem ter $2n = 12, 18, 24$ ou 36 , e uma espécie ruderal possui $2n = 20$. Contudo, em todas essas espécies, a única diferenciação com bandamento C ou com fluorocromos é restrita à heterocromatina nucleolar (MELO et al., 2001).

Em *Vigna*, a análise de 28 cultivares de *V. unguiculata* (L.) Walp. (feijão macassar) e três outras espécies, com coloração convencional, não mostrou praticamente nenhuma diferença (CARVALHO; GUERRA, 1995, 1996). Esse grupo, entretanto, chamou a atenção pelo fato de que as células do tapete da antera apresentam núcleos e cromossomos politênicos (GUERRA; CARVALHEIRA, 1994).

Em plantas, os cromossomos politênicos não são tão informativos quanto os de dípteros, devido, principalmente, à ausência de sinapse entre as cromátides-irmãs (revisado por CARVALHEIRA, in press). Por outro lado, como apresentam todo seu DNA amplificado, essas células podem se constituir num excelente material para localização de seqüências de DNA específicas por hibridização *in situ* (GUERRA; KENTON, 1996; GUERRA et al., 1996).

O gênero *Citrus* tem sido extensamente estudado devido à sua importância econômica e suas características citogenéticas. Todas as espécies de *Citrus* apresentam $2n = 18$ cromossomos, metacêntricos a submetacêntricos. O pequeno tamanho do genoma das espécies de *Citrus* foi estimado em $0,62$ pg de DNA para *C. sinensis* (GUERRA, 1984), o que significa um genoma quase 30 vezes menor que o de trigo ou de cebola. Guerra et al. (1997), examinaram 51 acessos do banco de germoplasma do Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura Tropical (EMBRAPA, Cruz das Almas, BA), e não encontraram nenhuma variação cromossômica numérica ou morfológica que permitisse caracterizar, com segurança, esses acessos, exceto em alguns casos pelo número e posição das constrições secundárias (PEDROSA et al., 1997).

Por outro lado, as espécies de *Citrus* mostram alta diversidade de bandas heterocromáticas e diversos pares cromossômicos heteromórficos para bandas C ou CMA_3 (GUERRA, 1985). Recentemente, a coloração CMA_3 foi combinada com a técnica de hibridização *in situ* para localizar a posição de genes e de outras seqüências do DNA em *Citrus*. Pedrosa et al. (2000) analisaram o padrão de bandas CMA_3 em dez cultivares diferentes de *C. sinensis* e a localização dos sítios DNAr

45S e 5S em três dessas cultivares. Esses autores observaram que todas as variedades de *C. sinensis* têm o mesmo padrão de bandas CMA₃, os mesmos heteromorfismos e a mesma distribuição de sítios do DNAr 5S e 45S. Esses dados sugerem que *C. sinensis* não seja uma espécie verdadeira, mas sim um híbrido interespecífico (PEDROSA et al., 2000). Contudo, esse heteromorfismo aparentemente não interfere no pareamento dos homólogos na meiose, não comprometendo, portanto, a fertilidade da espécie (CORNÉLIO, 1994).

Como as espécies de outros gêneros próximos a *Citrus* também têm importância como porta-enxerto, a análise citogenética foi estendida a outros gêneros da subfamília Aurantioideae (Rutaceae). As características citológicas dos outros gêneros conhecidos são muito similares com as de *Citrus*. A morfologia e o número cromossômico ($2n = 18$) são constantes, exceto pela presença de umas poucas espécies poliplóides.

A estrutura do núcleo interfásico das espécies de *Citrus*, caracterizada pela presença de cromocêntricos bem delineados em uma rede de cromatina fracamente corada, é igualmente observada nos demais gêneros (GUERRA, 1987). Guerra et al. (2000), analisando o padrão de bandas CMA₃ em representantes de 15 gêneros da subfamília Aurantioideae, incluídos em cinco das seis subtribos, observaram uma grande variação no padrão de bandas. Curiosamente, alguns gêneros mais evoluídos, pertencentes a diferentes subtribos de Aurantioideae, mostraram padrões de bandas semelhantes aos *Citrus*, sugerindo que tenha ocorrido uma evolução cromossômica paralela em diferentes subtribos ou que a classificação do grupo precisa ser revista.

Estudos citogenéticos de plantas cultivadas *in vitro* são ainda muito incipientes (MELO, 1994), mas certamente se tornarão mais freqüentes na medida em que essas técnicas estiverem mais difundidas.

É importante salientar que tais informações são importantes para o desenvolvimento de programas de melhoramento que visam aumentar a produtividade, melhorar a qualidade nutricional dos frutos, conterem a erosão genética através da caracterização e posteriormente amplificação da diversidade genética existente. Essas perspectivas, além de contribuírem para a preservação e exploração ordenada de muitas espécies, tendem a ampliar a disponibilidade de recursos econômicos na região.

2. 2. 7. Estudos Citogenéticos, Isoenzimáticos e Moleculares de *Genipa americana* L.

Apesar da utilização e exploração desta espécie em todo o Brasil, devido ao seu potencial nutricional e seu fácil cultivo, são escassas as informações referentes à variabilidade das populações e dos recursos genéticos disponíveis. Poucas pesquisas são atualmente realizadas com esta espécie, concentrando-se principalmente, na área de botânica, de sementes e de produção de mudas.

Várias técnicas citogenéticas são hoje indispensáveis para análise de cromossomos vegetais. Até a década de 70 as técnicas convencionais de coloração permitiam apenas a cariotipagem das espécies com base na determinação do número e tamanho dos cromossomos, e na posição do centrômero (GUERRA, 1983, 1988).

Entre os estudos citológicos que visam, principalmente, esclarecer aspectos da organização estrutural e do comportamento cromossômico por meio de avaliações comparativas e diferentes metodologias, pode-se incluir: a contagem do número cromossômico e as análises da morfologia de cromossomos mitóticos e meióticos, para o estabelecimento de padrões cariotípicos; análises do comportamento de espécies e híbridos intra e interespecíficos quanto ao pareamento meiótico, para a avaliação da homologia genômica e análises da estrutura genômica pela determinação de tipos de DNA, evidenciados por métodos citoquímicos, hibridização *in situ*, técnicas de bandamento cromossômico e moleculares como RFLP, RAPD, QTL, entre outros (BERTÃO, 1993).

De modo geral, os estudos citogenéticos partem da premissa de que análises de complemento cromossômico nos diversos grupos de seres vivos podem fornecer informações essencialmente básicas para a características e distinção de espécies.

Tejavathi e Nijalingappa (1990) consideram que a aplicação de tais estudos cromossômicos em vegetais e animais, pode ser mais efetiva quando em conjunto com a avaliação de parâmetros morfológicos, ecológicos, geográficos e outros, onde essa interação pode conduzir a uma determinação mais precisa de padrões taxonômicos, relações filogenéticas e dos mecanismos evolutivos aparentes nos organismos.

Em muitos casos o número cromossômico aliado a dados de outras abordagens, como a embriologia, morfologia e distribuição geográfica, fornece informações

fundamentais para a compreensão da filogenia e evolução de determinado grupo, onde o número e tamanho dos cromossomos são normalmente muito bem conservados de geração a geração. A análise citogenética em nível populacional é fundamental para esclarecer dúvidas sobre a identificação taxonômica e variabilidade cromossômica atribuída a determinados grupos (GEBER, 1989).

O número básico de cromossomos na Rubiaceae é $n = 11$, porém tipos diplóides e poliplóides ($2x - 6x$) são comuns dentro da tribo Gardenieae (ROBBRECHT, 1988). Com relação aos estudos citogenéticos envolvendo a espécie *G. americana* L., são poucos os relatos encontrados na literatura pertinentes. Os estudos citogenéticos desenvolvidos na espécie têm demonstrado que a mesma é diplóide, com número básico $x = 11$ pares cromossômicos, $2n = 22$ cromossomos, conforme descrito por Gibbs e Ingram (1982), Guerra (1986) e Kiehn (1986).

Uma nova e interessante espécie de *Genipa* L., *G. infundibuliformis* Zappi & Semir foi descrita no sudeste do Brasil e difere da espécie neotropical *G. americana* L. no que diz respeito ao cálice, número cromossômico e flores (ZAPPI et al., 1995).

Alguns trabalhos têm procurado contribuir ao melhor entendimento das relações filogenéticas, taxonômicas e evolutivas. Segundo Zappi et al. (1995) é possível que a *G. infundibuliformis* tenha sido derivada da *G. americana* através de tipos ancestrais por meio de aneuploidia (situação em que o número de cromossomos não é um múltiplo exato do número haplóide característico da espécie), tendo *G. infundibuliformis* $2n = 20$ cromossomos, conforme descrito por Pierozzi e Cruz, 1988.

Entretanto, as características cariotípicas podem sofrer pequenas alterações que podem gerar uma mudança gradual na estrutura ou número de cromossomos e, muitas dessas mudanças parecem ter caráter adaptativo. Por outro lado, algumas alterações de número e tamanho cromossômico parecem ser devidas exclusivamente a acidentes evolutivos que, se forem tolerados pelo indivíduo podem gerar isolamento reprodutivo e especiação (RAMALHO, 1995).

Estudos com o uso de Giemsa e técnicas fluorescentes em cromossomos mitóticos demonstrou a caracterização dos cromossomos de *G. americana* L. e *G. infundibuliformis*, através de cariograma, ideograma e técnicas de bandamento C (PIEROZZI e MENDAÇOLLI, 1997).

Guerra (1993a) caracterizou a proporção e os modelos da heterocromatina e eucromatina da *G. americana*, com base no comportamento da condensação cromossômica durante o ciclo de divisão celular e a riqueza do DNA em termos de pares de bases AT e CG, através dos fluorocromos DAPI e CMA₃. O autor demonstrou, através das taxas de proporção entre heterocromatina e eucromatina, que em cromossomos metafásicos esta relação aproximava-se a 50%, uma das maiores taxas observadas em angiospermas. Comparando com outras espécies, com alta quantidade de heterocromatina, sugere-se que esta acumulação heterocromática pode ter ocorrido de forma especialmente aleatória antes do processo de adaptação.

Na conceituação original de Heitz (1928,1932), existiriam no núcleo interfásico apenas dois componentes: os cromocêntricos (heterocromatina) e a cromatina difusa (eucromatina). Entretanto, em muitas espécies, a eucromatina se apresenta condensada de tal maneira, que pode formar grandes blocos irregulares de cromatina condensada, dando origem a cromocêntricos eucromáticos, ou se associado aos cromocêntricos heterocromáticos dando-lhes um aspecto maior e mais irregular (AGUIAR-PERECIN, 1985).

Na *G. americana* L. de acordo com Guerra (1993a) a estrutura do núcleo interfásico é uma característica notável, onde observa-se uma estrutura reticular na cromatina quase invisível e inúmeros cromocêntricos densamente compactados e ainda durante a prófase os cromossomos mostram-se muito grandes aparentemente correspondendo a cromocêntricos (DELAY, 1949). Nesta espécie, a cromatina tem característica organizada tipo arreticulada de estrutura nuclear na intérfase. Todavia, núcleo arreticulado típico tem sido associado com cariótipos que tem cromossomos muito pequenos, usualmente menores que 2,0 µm (LANFONTAINE, 1974), embora os cromossomos de *G. americana* L. sejam mais longos, com 4,0 µm.

A introdução de técnicas de bandamento em estudos de cromossomos de plantas tem ajudado a elucidar vários problemas da estrutura dos cromossomos e mostrado ser uma importante ferramenta para identificação de alterações cromossômicas. Estas técnicas também são importantes para esclarecer problemas de ordem citotaxonômica, de sistemática e estudos sobre a origem de plantas cultivadas, entre outros.

As técnicas de bandamento cromossômico evidenciam bandas que representam uma diferenciação longitudinal existente nos cromossomos. Essas técnicas são aplicadas principalmente em cromossomos metafásicos (FERREIRA, 1998).

O bandamento C revela padrões de heterocromatina constitutiva nas espécies. A aplicação dessa técnica em cromossomos vegetais foi introduzida por Vosa e Marchi (1972) e tem contribuído com informações valiosas sobre a quantidade, localização e origem da heterocromatina, bem como sua importância no processo de evolução cariotípica (BERTÃO, 1993).

Através desta metodologia, ocorre coloração seletiva das regiões heterocromáticas, corresponde a segmentos do cromossomo geneticamente inativos e, que estão constantemente condensados. Tais segmentos são, compostos por DNA altamente repetitivo, denominado de DNA satélite e que se replica tardiamente na fase S. Através desta metodologia são formadas bandas que estão, na maioria das vezes, localizadas nas regiões centroméricas dos cromossomos e que podem ser denominadas como bandas C positivas (GUERRA, 1988).

As alterações cromossômicas podem ser avaliadas através da aplicação das técnicas de bandamento cromossômico e em estudos evolutivos, e estas metodologias têm sido eficientes em evidenciar as transformações que ocorrem em grupos de espécies próximas com cariótipos semelhantes.

De acordo com Pierozzi e Mendaçolli (1997) esta espécie apresenta heterocromatina na posição terminal e na região próxima ao centrômero de alguns cromossomos. Em alguns casos, a banda C mostrou-se do mesmo comprimento do braço curto nas espécies *Genipa americana* e *Genipa infundibuliformis* e em outros a banda C mostrou-se corada na região terminal do braço curto na espécie *G. americana*, diferenciando da *G. infundibuliformis*. Ambas espécies são apreciadas com alta quantidade de heterocromatina constitutiva, reveladas com a técnica de bandamento C. Mostra-se ainda cromossomos que possuem blocos heterocromáticos, nas regiões centroméricas e pericentroméricas com o bandamento C, isto é causado pela intensidade da banda na região ou pela de contração do cromossomo.

Entre os métodos de bandamento envolvendo fluorocromos, encontra-se aquele que utiliza o 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), um fluorocromo que se liga tanto a regiões AT quanto CG, e que, no entanto, reflete padrões de banda brilhantes mais

acentuados em regiões ricas em AT. As bandas resultantes da coloração com DAPI aparentemente refletem as áreas que contém diferentes níveis de bases AT. Seu padrão de coloração específico é útil na identificação precisa de pontos de quebra quando estes se encontram perto das regiões coradas, e ainda pode ser aplicado na identificação de satélites pequenos derivando de cromossomos acrocêntricos (VERMA; BABU, 1995).

Outro método de bandamento com fluorocromo envolve o uso da cromomicina A₃ (CMA₃), um antibiótico que tem a afinidade com pares de bases CG. Cromossomos podem ser corados pela cromomicina A₃, evidenciando um padrão reverso às bandas R. Essas bandas R podem ser significativamente aumentadas pela contra-coloração com uma ligação de DNA AT-específico. Em adição, cromossomos podem ser triplamente corados pela cromomicina A₃, seguida pela DA (Distamicina) e DAPI, evidenciando dois modelos sucessivos fluorescentes e aumentando a ocorrência de bandas R de cromomicina A₃ e bandas DA/DAPI das células idênticas (VERMA; BABU, 1995).

Bortoleti et al. (2001) verificaram a existência de polimorfismos de bandas CMA₃ (fluorocromo que cora o DNA repetitivo rico em CG) na *G. americana* L., identificando possíveis variações no padrão de bandas heterocromáticas entre populações, tendo como resultado um padrão de bandas CMA₃ bem característico. Foram visíveis bandas CMA⁺⁺/DAPI⁻⁻, CMA⁺/DAPI⁻ e CMA⁺⁺/DAPI neutras, distribuídas em regiões subteloméricas, terminais e intercalares, porém com diferenças entre os cromossomos homólogos e entre as duas populações quanto a intensidade de coloração e por vezes na posição das bandas.

Aparentemente, a elevada quantidade de heterocromatina rica em GC seria geneticamente menos estável que outras porções cromossômicas, o que explicaria as variações observadas na distribuição e no tamanho das bandas entre as duas populações analisadas. Essa constatação leva à suposição de que o indivíduo poliplóide possa ter se originado de flor fecundada por um indivíduo poliplóide geneticamente divergente resultando no fenômeno da alopoliploidia (BORTOLETI et al., 2001).

Bortoleti et al. (2002a) na análise com fluorocromos, revelaram um padrão de bandas CMA⁺ peculiar para cada população, com variações na posição e nos

tamanhos das bandas entre populações, entre indivíduos da mesma população e mais raramente entre cromossomos homólogos do mesmo indivíduo. Nas duas populações estudadas houve forte marcação das RONS com AgNO_3 , evidentes no par 2 de uma população e no par 11 na outra população. Além destes sítios, vários pares adicionais apresentaram marcação menos intensa com AgNO_3 , coincidindo com bandas CMA+ terminais e subterminais. Nos núcleos interfásicos a coloração com AgNO_3 marcou desde o um único nucléolo, que ocupou mais de um terço de sua superfície, até 16 nucléolos, neste último caso, os núcleos apresentaram 1 a 2 pares de nucléolos maiores e vários outros de tamanho diminuto. Esta observação confirma a possível presença de outros sítios de DNAr expressos nos demais cromossomos que apresentaram marcação AgNO_3 menos intensa.

Bortoleti et al. (2002b) observaram variações no número cromossômico em algumas populações ($2n = 20/21/22$) e em outras ($2n = 22/24/28$) e verificaram a presença de tetraploidia. Os representantes das diferentes populações apresentaram padrão de bandas CMA+/DAPI- e CMA++/DAPI- com bandas proeminentes em posições terminais, subterminais e intercalares, indicando quantidade significativa de heterocromatina rica em GC. Porém, claros polimorfismos foram detectados quanto ao tamanho, intensidade de coloração e posição dos blocos CMA+++ entre populações e indivíduos, bem entre homólogos do mesmo par. Tais variações foram mais evidentes nas populações com variações de número cromossômico, levando a supor que o acúmulo de mutações da heterocromatina esteja isolando alguns indivíduos reprodutivamente. Além disso, foi observado um número variável de sementes por frutos e baixíssimas taxas de germinação.

Em um estudo diferenciado da *G. americana*, Bortoleti et al. (2003) revelaram através da análise meiótica, um padrão bastante irregular e assincrônico. Na segunda fase da diacinese, algumas vezes os onze bivalentes apresentaram-se individualizados, enquanto em outras células multivalentes de tamanho e número variável foram reconhecidos, em alguns casos havendo um único multivalente, sugerindo a ocorrência de um complexo de translocação. Além disso, observou-se a presença constante de micronúcleos, ao lado de pontes anafásicas, bem como de fragmentos e cromossomos retardatários.

Em revisão sobre o assunto, Guerra (1993a) caracterizou a proporção e os tipos de heterocromatina e eucromatina da *G. americana* nos seus comportamentos de condensação durante o ciclo da célula e a sua riqueza em pares de bases específicas AT e GC, com a utilização do DAPI e CMA₃, onde tem preferência por AT e GC respectivamente. Visto que, regiões heterocromáticas são usualmente ricas em AT ou CG do que eucromatina, esses fluorocromos podem ser usados simultaneamente para distinguir eucromatina de heterocromatina e para permitir a comparação da riqueza relativa em cada fração da cromatina.

Em muitos casos, as regiões coradas pelo CMA₃ são coincidentes com as RONS. Desse modo, observa-se a produção de bandas brilhantes associadas às RONS, sem depender da atividade transcricional na intérfase precedente. No entanto, outras regiões heterocromáticas podem ser evidenciadas pela mesma técnica (MAYER et al., 1985 citado por Margarido, 2000).

Regiões específicas do cromossomo, que participam da formação do nucléolo, são denominadas de regiões organizadoras do nucléolo (RONS), e se constituem de múltiplas cópias de seqüências de DNA ou genes responsáveis pela formação de RNA ribossômico.

Para detecção das RONS são utilizadas diversas técnicas, sendo a mais comum a técnica de impregnação pela prata, a qual detecta as regiões ativadas na síntese de rRNA na intérfase precedente, devido à associação da prata com as proteínas nucleolares (MILLER et al., 1985 citado por Margarido, 2000). Esta técnica envolve a extração do DNA, RNA e histonas, sendo sugerido que as proteínas residuais não histônicas seriam os componentes cromossômicos que se coram pela prata. No entanto, a verdadeira natureza das proteínas responsáveis pela impregnação ainda não é conhecida. Contudo a constatação de que apenas as regiões ativas das RONS (ou que foram ativadas na fase precedente de formação do nucléolo) coram pela prata fez sugerir que as mesmas devem ser proteínas associadas à atividade transcricional dos ribossomas.

Diferentes espécies podem apresentar variações na posição, no número e no tamanho das constrições secundárias e satélites cromossômicos. Esses marcadores cromossômicos podem ser perdidos ou incorporados ao longo do processo evolutivo,

ou ainda sofrer acréscimos ou decréscimos e sua atividade referente à RON podem ser variáveis (STEBBINS, 1950; MURRAY, 1976).

Pierozzi e Mendaçolli (1997) descreveram que os pares cromossômicos nº 1 e 4 de *G. americana* L. possuem constrição secundária e, de acordo com observações na citologia da espécie, somente o par cromossômico nº 4 possui o sítio de RON, apresentando banda C negativa e a região satelitada com banda C positiva. Em observações diferentes encontradas em cromossomos mitóticos em *G. americana* por Guerra (1993a), foi concluído que o cromossomo 11 está associado a RON, baseado no sinal positivo da cromomicina no segmento terminal. Essa espécie de fluorocromo é muitas vezes encontrada no NOR e designa a presença de seqüências ricas em GC, mas esta não é exclusivamente para esta região (CERBAH et al., 1995).

Considerando a grande aplicabilidade dos métodos citados acima, envolvendo técnicas convencionais e de bandamento cromossômico para caracterização cariotípica de *G. americana* L., sendo que o número cromossômico é um dos parâmetros mais utilizados para a caracterização citológica de uma espécie, este trabalho reveste-se de uma importância, uma vez que os dados obtidos possibilitarão um melhor entendimento da evolução cariotípica, além de contribuir para estudos taxonômicos do gênero.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1. Material

Os frutos de *Genipa americana* L. foram coletados nas áreas de mata do *Campus* “Soane Nazaré de Andrade”, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, BA e em fazendas nas proximidades do *Campus*, a partir de exemplares previamente identificados de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Detalhes da espécie, origem e número de plantas estudadas em 10 populações da *Genipa americana* L.

| Espécie | Origem | Número de plantas |
|------------------------|-----------------------------|-------------------|
| <i>G. americana</i> L. | Tancredo Neves - BA | 05 exemplares |
| <i>G. americana</i> L. | Itamaraca - BA | 05 exemplares |
| <i>G. americana</i> L. | CEPLAC - BA | 05 exemplares |
| <i>G. americana</i> L. | <i>Campus</i> da UESC - BA | 05 exemplares |
| <i>G. americana</i> L. | Itapetinga - BA | 05 exemplares |
| <i>G. americana</i> L. | Ibicaraí - BA | 05 exemplares |
| <i>G. americana</i> L. | Luís Eduardo Magalhães - BA | 05 exemplares |
| <i>G. americana</i> L. | Salobrinho - BA | 05 exemplares |
| <i>G. americana</i> L. | Una - BA | 05 exemplares |
| <i>G. americana</i> L. | Itajuípe - BA | 05 exemplares |

3. 2. Métodos

3. 2. 1. Pré-tratamento e germinação de sementes

Após despulpamento dos frutos, as sementes foram tratadas com hipoclorito 4% em agitador magnético, durante 1 minuto para evitar contaminação fúngica. As sementes foram germinadas em placas de Petri, contendo papel de filtro umedecido, e dispostas em estufa a 30° C.

3. 2. 2. Coleta, pré-tratamentos e fixação das raízes

Após aproximadamente 10 dias de germinação as pontas de raízes com 0,5 a 2,0 cm de comprimento foram coletadas e submetidas ao tratamento com solução de 0,03% de 8-hidroxiquinolina, agente mitogênico que bloqueia as células em divisão metafásica, por 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente. Após o tratamento as raízes foram fixadas em solução Carnoy (3 partes de álcool etílico e 1 parte de ácido acético PA), durante um período mínimo de 12 horas, transferidas para etanol a 70%, e armazenadas a 4 ou -20 °C, até o momento da aplicação de técnicas de coloração.

3. 2. 3. Método de Feulgen

O método de coloração de Feulgen foi utilizado para a visualização de metáfases mitóticas nas preparações citológicas, conforme descrito por Bertão (1998). As raízes previamente tratadas com 8-hidroxiquinolina 0,03%, por duas horas e trinta minutos, foram retiradas da geladeira até atingirem temperatura ambiente, lavadas em água destilada por 5 minutos e submetidas à hidrólise ácida

em HCl 1N, a 60 °C por 6 minutos. Após lavagem em água destilada por 5 minutos as raízes foram incubadas em Reativo de Schiff, durante 45 minutos, no escuro.

Após lavagem em água corrente por 5 minutos, as raízes foram transferidas para ácido acético a 45% por 2 minutos, a região meristemática excisada e submetida à maceração e ao esmagamento em solução de orceína acética a 2%. As lamínulas foram removidas em ácido acético a 45% ou pelo método seco com nitrogênio líquido e, após secagem ao ar, as lâminas permanentes foram montadas em Neo-mount, resina de montagem anídrico, (Merck – DARMSTADT, originado na Alemanha), para melhor visualização das células em microscópio.

3. 2. 4. Bandamento C

O procedimento adotado para obtenção de bandas C seguiu em linhas gerais a técnica descrita por Aguiar-Perecin e Vosa (1985). As raízes armazenadas no fixador Carnoy foram retiradas do freezer até atingir temperatura ambiente. Em seguida, foram transferidas para ácido acético 60 % por um período de 2 minutos, no intuito de promover amolecimento no tecido. Foi realizada a dissecação da ponta da raiz, região de maior concentração do tecido meristemático e então maceradas e esmagadas na mesma solução.

As preparações foram observadas ao microscópio de contraste de fase, para verificar a presença de metáfases com boa qualidade, contendo cromossomos nítidos e espalhados. As melhores preparações foram selecionadas para a aplicação da metodologia de bandamento C. A separação de lâminas e lamínulas foi obtida através da remoção das lamínulas pelo método seco com nitrogênio líquido, as preparações foram dispostas para secagem ao ar e armazenadas em etanol absoluto a -20 °C, por no mínimo 24 horas. Posteriormente, as preparações foram dispostas para secagem ao ar, e submetidas a tratamento com solução saturada de hidróxido de bário 5% a 37 °C, por um período de 20 minutos, para desnaturação cromossômica, seguindo de duas lavagens subseqüentes com água desionizada. As preparações foram então transferidas para solução salina 2 x SSC (cloreto de sódio

0,3 M + citrato de sódio 0,03 M pH 7,0), à temperatura ambiente, por 5 minutos e incubadas na mesma solução de 2 x SSC a 60 °C, por 60 minutos.

Após lavagem em água destilada, o material foi desidratado através de imersão seqüencial em uma série de etanol (70%, 95% e 100%), seguida de posterior secagem à temperatura ambiente. Para visualização das bandas, as preparações foram coradas em solução de Giemsa a 8%, preparadas em tampão Sorensen (pH 6,8), por 20 minutos, lavadas em água destilada, novamente dispostas para secagem e, então, montadas com resina de montagem.

3. 2. 5. Coloração com nitrato de prata

A técnica de Howell e Black (1980) foi utilizada para estabelecer a localização de regiões de rDNA nos cromossomos metafásicos da espécie em análise. Raízes pré-tratadas e mantidas em solução Carnoy foram empregadas para a obtenção de preparações citológicas. Após esmagamento em ácido acético a 60% e monitoramento da qualidade das preparações citológicas em microscópio de contraste de fase as lâminas e lamínulas foram separadas em nitrogênio líquido e dispostas para secar à temperatura ambiente.

Para coloração cromossômica, foi adicionada às preparações uma gota de solução de gelatina a 2% e duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50%. As preparações foram então incubadas em câmara úmida a 60 °C, e o tempo de coloração (dois a cinco minutos) monitorado através de observações ao microscópio óptico. Após separação de lâminas e lamínulas com água destilada, seguida de secagem ao ar, as preparações citológicas foram montadas com resina de montagem.

Foi adotado o procedimento para a coloração dos nucléolos em núcleos interfásicos descrito por Fernandez-Gomes et al. (1969). As raízes foram fixadas diretamente em solução contendo uma parte de formol a 10% e uma parte de hidroquinona a 1% por uma a duas horas, à temperatura ambiente, seguindo-se de lavagem em água destilada, por três vezes. Após transferência para solução aquosa de nitrato de prata a 2%, as preparações foram incubadas no escuro, a 70 °C, por 10

a 15 horas. Foram realizadas novas lavagens em água destilada, por três vezes, e as raízes foram novamente submetidas à mistura fixadora por duas horas, à temperatura ambiente. As raízes foram maceradas em ácido acético a 45% para obtenção das preparações citológicas. Após visualização em microscópio óptico, as melhores preparações foram selecionadas, dispostas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula, seguindo-se de secagem e montagem das mesmas em resina de montagem.

3. 2. 6. Coloração com DAPI e CMA₃

Para o procedimento de coloração com DAPI e CMA₃ foi utilizado o protocolo descrito por Schweizer (1976). As lâminas foram preparadas com digestão enzimática 20% celulase e 2% pectinase e armazenadas por pelo menos três dias à temperatura ambiente. Foi adicionada à lâmina uma gota de DAPI (2 µg/mL) e esta coberta com uma lamínula. As lâminas foram guardadas em uma caixa escura por meia hora. Para CMA₃, foi adicionado à lâmina uma gota do CMA₃ (0,5 µg/mL) e esta coberta com uma lamínula. As lâminas foram guardadas em uma caixa escura por uma hora. Em seguida, retiraram-se as lamínulas e o excesso de corante com um jato de água destilada, secando-as rapidamente com uma bomba de ar. A montagem da lâmina foi realizada com uma gota de meio de montagem (glicerol / Mellvaine / MgCl₂), cobrindo a mesma com uma lamínula e comprimindo ligeiramente entre duas folhas de papel de filtro para tirar o excesso de meio.

Após um mínimo de três dias de armazenamento das lâminas em caixas escuras, as mesmas foram visualizadas e microfotografadas em microscópio de epifluorescência com um filtro de excitação A com 340 a 380 nm comprimento de faixa de luz ultravioleta, utilizando filme de ASA 400, num tempo de 0,26 segundos em média para DAPI e com um filtro de excitação D com 355 a 425 nm comprimento de faixa de luz ultravioleta, utilizando também filme de ASA 400 num tempo correspondente para CMA₃.

3. 2. 7. Análise morfométrica dos cromossomos e elaboração do cariótipo

Foi realizada a análise das preparações mitóticas coradas pelo método de Feulgen visando à confirmação do número cromossômico da espécie e identificação de cromossomos individuais. Para a obtenção das medidas cromossômicas foram utilizadas metáfases mitóticas intactas, que apresentaram cromossomos morfologicamente nítidos e adequadamente espalhados.

Dez metáfases mitóticas foram selecionadas e fotomicrografadas em fotomicroscópio Olympus, com objetiva de imersão 100, utilizando-se o filme Kodak Technical Pan. Para a obtenção das ampliações fotográficas foi empregado papel KODABROME PRINT RC F3.

As micrografias foram ampliadas e utilizadas para a medição dos cromossomos das espécies. Desse modo, foi identificado cada par cromossômico e feita a organização dos cromossomos em ordem decrescente de tamanho.

As medidas cromossômicas foram realizadas com auxílio de compasso de ponta seca e papel milimetrado (limite de 0,5 mm) em ampliações fotográficas de 6.904 vezes, determinando-se os valores de comprimento cromossômico em milímetros (comprimento do braço maior e do braço menor). Com base nestes dados foram determinados os seguintes parâmetros: comprimento absoluto (CA, em micrômetros), comprimento relativo (CR, em %), relação de braços (RB) e comprimento do lote haplóide (CLH, em micrômetros).

Os valores de comprimento relativo e relação de braços foram estimados de acordo com a metodologia descrita por Aguiar-Perecin e Vosa (1985), conforme apresentado a seguir:

$$RB = \frac{\text{Braço maior}}{\text{Braço menor}}$$

A média de relação de braços dos dois elementos de cada par de homólogos foi determinada para cada célula analisada. O comprimento relativo de cada cromossomo foi estimado em termos de percentagem em relação ao comprimento total do lote haplóide, e a média de cada par de homólogos foi estimada para cada célula analisada.

$$CR = \frac{\text{Comprimento absoluto do par}}{\text{Comprimento total do lote haplóide}} \times 100$$

A partir desses dados foi determinado o cariótipo da espécie, onde os cromossomos foram pareados conforme seus valores de comprimento absoluto e relações de braços, sendo então organizados em ordem decrescente de tamanho.

Os cromossomos satelitados foram pareados, principalmente, através dos valores de relação de braços.

4. RESULTADOS

4. 1. Aspectos gerais do cariótipo

A descrição do cariótipo de *Genipa americana* L. foi realizada com base na coloração pelo Método de Feulgen. Para a análise morfométrica dos cromossomos, foram avaliadas dez metáfases mitóticas, contendo cromossomos morfologicamente nítidos e espalhados. A identificação de todos os pares cromossômicos, a confecção do cariótipo e a elaboração de ideograma da espécie analisada no presente trabalho, foram feitas a partir dos dados de comprimento cromossômico absoluto, relação de braços e comprimento relativo dos cromossomos, conforme demonstrado na Tabela 3.

Os resultados das análises das metáfases mitóticas (Figura 5) evidenciaram um número cromossômico diplóide para a espécie $2n = 22$, corroborando com os dados reportados na literatura (GUERRA, 1986).

A análise das Figuras 5, 6 e 9, correspondentes às metáfases, ao cariótipo e ao ideograma, revelou detalhes importantes com relação à morfologia, tamanho e estrutura do complemento cromossômico desta espécie.

Quanto à morfologia cromossômica, os pares nº 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, e 10 apresentaram centrômero mediano e os pares nº 4, 5 e 11, centrômeros submedianos. Determinou-se a fórmula cariotípica haplóide $n = 11$ consistindo de $8m + 3sm$, com uma relação de braços variando entre 1,16 e 2,04 (Figura 6 e Tabela 3).

A análise morfométrica aqui apresentada evidenciou que o comprimento absoluto dos cromossomos desta espécie variou de 3,17 a 7,72 micrômetros para os pares cromossômicos maior e menor, e o comprimento relativo ficou entre 11,77 e 6,62

% (Tabela 3). Esta ampla variação no tamanho absoluto dos cromossomos tende a refletir diferenças reais no comprimento cromossômico, condicionadas pelo grau de condensação cromossômica diferencial, haja vista que no desenvolvimento do presente trabalho procurou-se selecionar metáfases mitóticas onde os cromossomos apresentassem níveis correspondentes de condensação. A análise das metáfases mitóticas neste material revelou o posicionamento dos satélites nos pares cromossômicos (nº 1, 2, 7 e 11).

Uma característica marcante no cariótipo referiu-se à variação nas duas regiões de constrição secundária nítidas nos braços longos dos pares nº 1 e 2. Nos pares cromossômicos nº 7 e 11 também apresentaram constrição secundária, localizada nos braços curtos, porém de forma menos evidente, devido ao tamanho reduzido da constrição secundária (Figura 6).

Os pares cromossômicos nº 1, 2 e 7 evidenciaram RONS bastante coradas e diferenciadas nos cromossomos e ainda localizadas nas constrições secundárias. Os pares cromossômicos de nº 4 e 8 apresentaram-se ligeiramente polimórficos quanto ao tamanho de bandas heterocromáticas (Figura 7).

O ideograma, a representação do cariótipo, apresentado neste trabalho mostrou diferenças morfológicas nos cromossomos homólogos principalmente por diferenças na quantidade e distribuição da heterocromatina ao longo dos cromossomos, indicando uma característica própria da espécie (Figura 9).

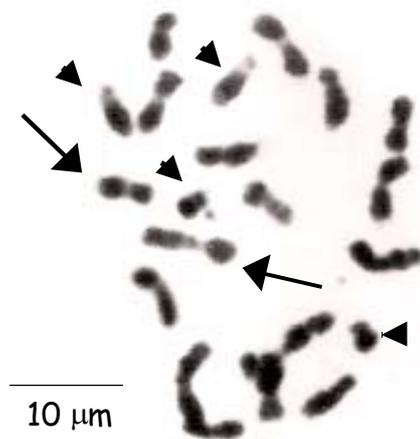


Figura 5. Cromossomos metafásicos de *Genipa americana* L. corados pelo Método de Feulgen ($2n = 22$). Setas indicam: grandes blocos heterocromáticos nas regiões terminais dos cromossomos. Pontas de seta indicam cromossomos satelitados.

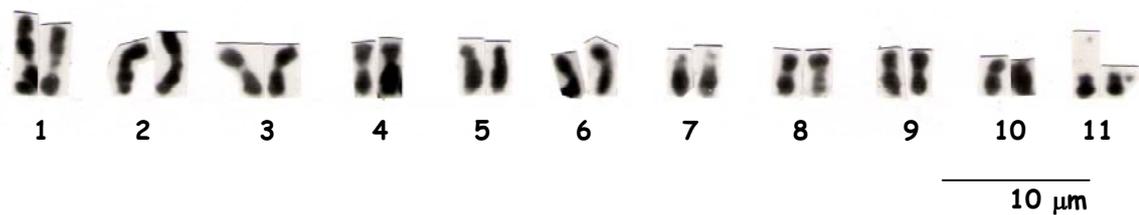


Figura 6. Cariótipo da espécie *Genipa americana* L. ($2n = 22$): Cromossomos corados pelo Método de Feulgen.

4. 2. Aplicação de bandamento cromossômico

4. 2. 1. Bandamento C

As técnicas de bandamento cromossômico empregadas no presente trabalho revelaram aspectos interessantes sobre a possibilidade de se evidenciar diferenciação cromossômica e detecções de possíveis polimorfismos entre os homólogos da *Genipa americana* L.

A avaliação das metáfases coradas pela técnica de bandamento C revelou diferenças significativas quanto ao padrão de distribuição, tamanho, intensidade de coloração e conteúdo de heterocromatina dentro da espécie estudada. Os cromossomos apresentaram grande quantidade de heterocromatina constitutiva distribuída em grandes blocos heterocromáticos nas regiões teloméricas e intersticiais, presentes na maioria dos cromossomos. A grande variação observada referiu-se às bandas teloméricas (incluindo o satélite), as quais correspondem à maior proporção de heterocromatina (Figura 8).

O par cromossômico n^o7 apresentou uma coloração mais homogênea ao longo de todo o braço longo, padrão diferente do observado para o par cromossômico n^o8, o qual apresentou coloração mais evidente ao longo de todo o braço curto, evidenciando assim um braço longo totalmente eucromático. Esta diferença de coloração pode ter sido devida à maior quantidade de heterocromatina no braço mais corado. As regiões de heterocromatina, geralmente mais compactadas que as de eucromatina na metáfase coram-se mais fortemente. Sendo assim, os pares cromossômicos n^o 1, 2, 3, 4, 5, 9, e 10 têm um grande conteúdo de heterocromatina ao longo de ambos os braços (Figura 9).



Figura 7. Metáfase mitótica de *Genipa americana* L. corada com a metodologia de Bandamento C.

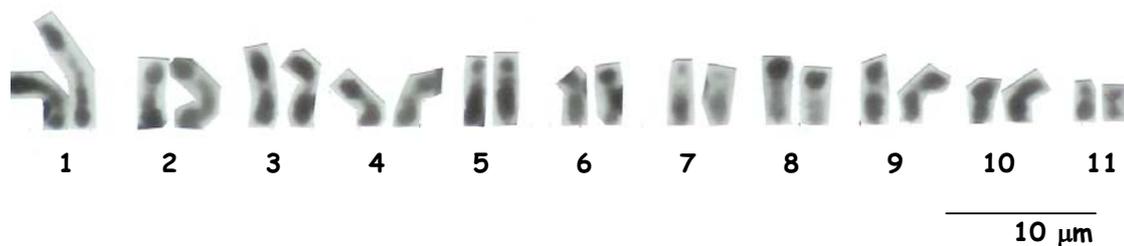


Figura 8. Cariótipo da espécie *Genipa americana* L. ($2n = 22$): Cromossomos corados pelo Método de bandamento C com Giemsa. .

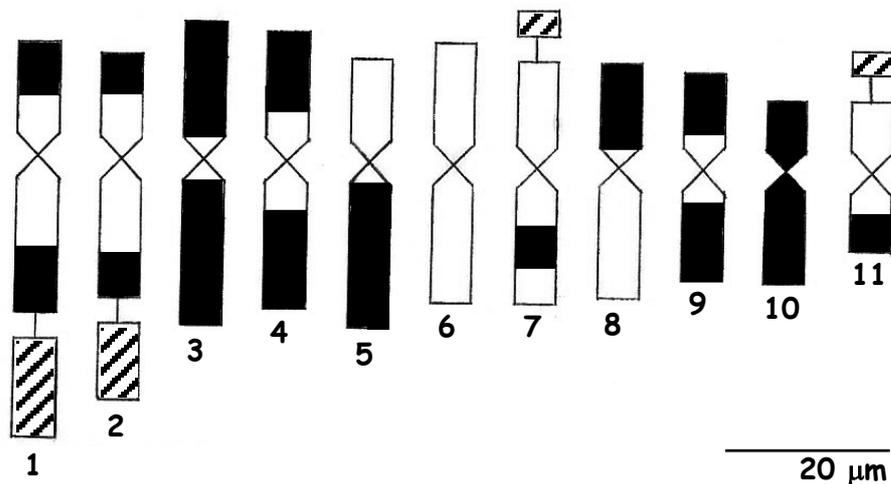


Figura 9. Ideograma da espécie *Genipa americana* L. ($2n = 22$), evidenciando o padrão de bandas C, as constrições secundárias no braço longo dos pares cromossômicos nº 1 e 2 e o pares nº 7 e 11 com constrições secundárias nos braços curtos.

Tabela 3. Valores de comprimento absoluto (CA - micrômetros), relação de braços (RB), comprimento relativo (CR - %) e comprimento do lote haplóide (CLH – micrômetros) da espécie *Genipa americana* L.

| Cromossomo | Comp. Abs. / s | | Rel. Braços / s | | Comp. Relat./ s | |
|-------------------|-----------------------|---------|------------------------|--------|------------------------|--------|
| 1 | 7,72 | ± 1,42 | 1,60 | ± 0,42 | 10,39 | ± 1,16 |
| 2 | 6,68 | ± 1,10 | 1,37 | ± 0,32 | 9,68 | ± 1,26 |
| 3 | 6,06 | ± 1,46 | 1,27 | ± 0,17 | 11,77 | ± 0,76 |
| 4 | 5,51 | ± 1,38 | 1,16 | ± 0,11 | 10,68 | ± 0,56 |
| 5 | 5,35 | ± 1,38 | 2,04 | ± 0,96 | 10,31 | ± 0,45 |
| 6 | 5,11 | ± 1,52 | 1,41 | ± 0,13 | 9,81 | ± 0,58 |
| 7 | 4,89 | ± 1,45 | 1,36 | ± 0,77 | 9,32 | ± 0,65 |
| 8 | 4,50 | ± 1,50 | 1,33 | ± 0,26 | 8,56 | ± 0,76 |
| 9 | 4,09 | ± 1,14 | 1,45 | ± 0,11 | 7,91 | ± 0,68 |
| 10 | 3,45 | ± 1,08 | 1,67 | ± 0,77 | 6,62 | ± 0,86 |
| 11 | 3,17 | ± 0,66 | 1,75 | ± 0,36 | 9,57 | ± 2,55 |
| CLH | 56,53 | ± 14,09 | | | | |

Tabela 4. Dados morfométricos em cromossomos metafásicos em dez células de *Genipa americana* L.

| Cromossomo | Comp. Abs. (µm) | | Comp. Rel. (%) | Índ. Centrom. (CI) |
|-------------------|------------------------|--------|-----------------------|---------------------------|
| 1 | 4,22 | ± 0,10 | 13,08 ± 0,33 | 34,60 ± 0,89 |
| 2 | 3,58 | ± 0,11 | 11,06 ± 0,19 | 37,48 ± 1,39 |
| 3 | 3,42 | ± 0,10 | 10,56 ± 0,15 | 43,49 ± 1,49 |
| 4 | 3,28 | ± 0,11 | 10,12 ± 0,15 | 33,01 ± 0,80 |
| 5 | 3,06 | ± 0,09 | 9,45 ± 0,57 | 32,18 ± 1,09 |
| 6 | 2,87 | ± 0,09 | 8,87 ± 0,15 | 32,87 ± 2,02 |
| 7 | 2,84 | ± 0,09 | 8,77 ± 0,13 | 46,01 ± 1,20 |
| 8 | 2,58 | ± 0,07 | 7,89 ± 0,17 | 38,81 ± 1,02 |
| 9 | 2,35 | ± 0,10 | 7,27 ± 0,22 | 34,86 ± 1,66 |
| 10 | 2,19 | ± 0,09 | 6,77 ± 0,18 | 36,65 ± 1,89 |
| 11 | 1,98 | ± 0,10 | 6,12 ± 0,28 | 44,81 ± 3,05 |
| CLH | 32,37 | ± 1,05 | | |

Fonte: Pierozzi e Mendaçolli, 1997.

4. 2. 2. Coloração com nitrato de prata

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) são regiões dos cromossomos envolvidas na transcrição dos genes ribossômicos e, de acordo com sua atividade na intérfase anterior, podem ser visualizadas através da coloração com nitrato de prata. Após a coloração, as RONs são visualizadas sobre os cromossomos, constituindo-se em importantes marcadores citológicos. O método de Howell e Black (1980) utilizado para detectar as regiões organizadoras de nucléolos (RONs), particularmente em cromossomos mitóticos, não apresentou resultados satisfatórios, pois foram observadas apenas marcações inespecíficas em vários cromossomos metafásicos.

Com o objetivo de aprimorar a técnica para melhor evidenciar os nucléolos de nos cromossomos metafásicos da espécie em estudo, foram feitas várias tentativas para obtenção de preparações citológicas, porém não foi evidenciada nenhuma ocorrência de cromossomos metafásicos marcados. Constatou-se que a qualidade das preparações não foi ideal para a observação de cromossomos metafásicos distintos, revelando a necessidade de um melhor refinamento na obtenção das preparações.

O método de Fernandez-Gomez (1969) utilizado para detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) em núcleos interfásicos apresentou resultados positivos. Conforme demonstrado na Figura 10 a e b, foi possível observar a marcação de 1 e 2 nucléolos, variáveis em tamanho nos núcleos interfásicos e correspondentes a 1-2 sítios ribossômicos ativos. A confirmação destes dados poderão ser feita posteriormente através da aplicação da técnica de hibridização *in situ*.

4. 2. 3. Coloração com fluorocromos

4. 2. 3. 1. DAPI - 4'-6-diamidino-2-fenilindol e cromomicina A₃- CMA₃

Os fluorocromos DAPI e o CMA₃ são conhecidos por marcarem preferencialmente frações de DNA ricas em AT e CG, respectivamente. São fluorocromos que podem ser usados para distinguirem simultaneamente heterocromatina de eucromatina e ainda para permitir uma comparação direta das riquezas relativa à composição de bases CG e AT na cromatina.

Os resultados obtidos com a aplicação dos fluorocromos CMA₃ e DAPI revelaram marcações coincidentes presentes nas extremidades cromossômicas, corando, desta forma, os blocos heterocromáticos. Isso sugere que os blocos heterocromáticos são moderadamente ricos em pares de bases AT e CG. É importante salientar, que as regiões satelitadas também se mostraram coradas por ambos os fluorocromos. (Figura 11 a e b).

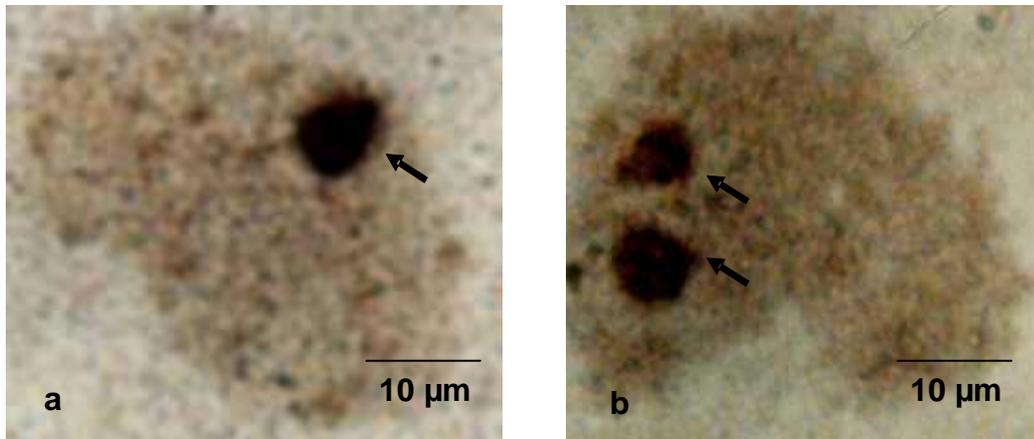


Figura 10. Núcleos interfásicos de *Genipa americana* L. Setas evidenciam a ocorrência de 1 (a) e 2 (b) nucléolos.

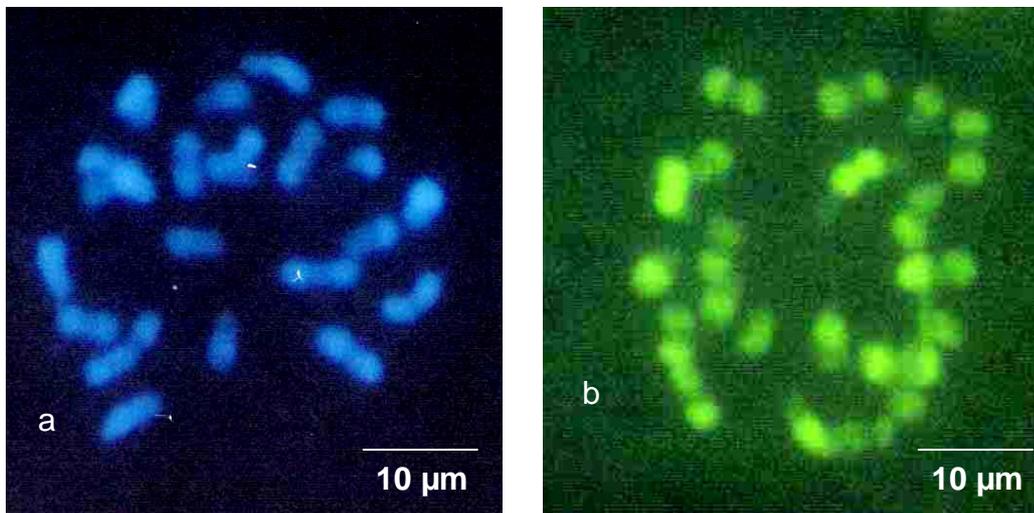


Figura 11. Metáfase mitótica de *Genipa americana* L. corada com fluorocromo DAPI.(a). Metáfase mitótica de *Genipa americana* L. corada com fluorocromo CMA₃ (b).

5. DISCUSSÃO

5. 1. Aspectos gerais do cariótipo

O gênero *Genipa* é um grupo pouco estudado do ponto de vista citogenético, constando na literatura apenas alguns trabalhos (GUERRA, 1993, PIEROZZI e MENDAÇOLLI, 1997, ZAPPI et al., 1995; BORTOLETI, 1999, 2001, 2002, 2003).

O número diplóide 22 cromossomos é comum à família Rubiaceae. Por exemplo, no gênero *Coffea*, todas as espécies são diplóides ($2n = 2x = 22$) exceto *C. arabica*, única sp tetraplóide ($2n = 4x = 44$), resultante do cruzamento entre *C. engenioides* e *C. congensis* e endêmica ao sudoeste da Etiópia.

O mesmo número diplóide ($2n = 22$) foi encontrado na *Genipa americana* L. estudada neste trabalho, mas diferiu de algumas populações estudadas por Bortoleti et al. (2002 b), que procederam uma análise cariotípica de cinco populações, através de técnicas de bandamento cromossômico com fluorocromos CMA/DAPI. Três destas populações apresentaram número cromossômico $2n = 22$, conforme reportado anteriormente na literatura (GUERRA, 1985). Por outro lado observou-se variações no número cromossômico ($2n = 20/21/22$), enquanto em outra população um indivíduo mixoplóide foi detectado ($2n = 22/24/28$). Adicionalmente verificou-se a presença de um tetraplóide $2n = 4x = 44$ para uma segunda população. Tais variações de número cromossômico foram evidentes, levando a supor que o acúmulo de mutações da heterocromatina esteja isolando alguns indivíduos reprodutivamente (BORTOLETI, 2002b).

Embora o número cromossômico tenha sido conservativo para a espécie na maioria dos autores, as variações morfológicas.

Pierozzi e Mendaçolli (1997) apresentaram a fórmula cariotípica haplóide estabelecida $n = 11: 3m + 7 sm + 1sms$, a qual evidencia diferenças quanto aos pares cromossômicos nº 3, 7 e 11, descritos como tendo centrômeros medianos e os pares nº 1, 2, 4, 7, 9 e 10. As autoras apresentaram um cariótipo com duas regiões de constrição secundárias e satélites pouco evidentes, localizados nos braços longos, dos pares cromossômicos nº 1 e 4, sendo submetacêntricos, novamente divergindo dos resultados aqui descritos.

Ao se comparar os valores referentes ao comprimento absoluto, relação de braços e comprimento relativo de metáfase somática coradas, algumas variações foram observadas, como uso da técnica de coloração convencional e bandamento C. Segundo as autoras, o comprimento absoluto variou de 4,22 a 1,98 micrômetros para o par maior e menor, enquanto que o comprimento relativo variou de 13,08 a 6,12%. Todos os resultados aqui demonstrados divergiram dos reportados por Pierozzi e Mendaçolli (1997), exceto o número cromossômico. Deve-se considerar o pré-tratamento e a metodologia de bandamento C utilizados, onde os valores de comprimento absoluto das metáfases deste presente trabalho são maiores quando comparados com os valores do comprimento absoluto das metáfases de Pierozzi e Mendaçolli, 1997 (Tabela 4).

Bortoleti et al. (2001) num estudo a caracterização cariomorfológica de *Genipa americana*, mostraram que a variação para o tamanho máximo dos cromossomos metafásicos encontrados foi de 3,7 e 6,8 μm para o menor e maior cromossomo respectivamente, chegando a uma semelhança com o trabalho apresentado, sendo resultado para o menor e maior de 3,17 e 7,2 μm , respectivamente.

Análise comparativa cariotípica entre *G. americana* e *G. infundibuliformis* demonstrou diferenças para o comprimento cromossômico e, comprimento cariotípico haplóide além da grande quantidade de heterocromatina de *G. americana* em relação a *G. infundibuliformis*. Inversamente, *G. infundibuliformis* apresentou um cariótipo mais assimétrico que *G. americana* (PIEROZZI e MENDAÇOLLI, 1997).

Em adição, para *G. infundibuliformis* existe heteromorfismo, uma nova característica nas Rubiaceas neotropicais (ZAPPI et al., 1995). As informações cariológicas sobre a Rubiaceas Neotropicais são limitadas (KIEHN, 1985, 1995)

porém o número básico $n = 11$ é comum entre espécies Rubiaceae estudadas, sugerindo que este é o número básico primário e proveniente de outros números derivados por aneuploidia (LEE e RINK, 1985; SELVARAJ, 1987). Isto faz parecer provável que *G. infundibuliformis* tenha sido derivada de *G. americana* ou de um ancestral comum de ambas dessas, por um mecanismo de aneuploidia, o qual eliminou cromossomos, sendo sucedido por alterações no comprimento cromossômico e redução da quantidade de heterocromatina.

Lavinia e Sharma (1980) citam que a tendência para número cromossômico decrescente, associado à restrição em áreas de ocorrência geográfica parece ocorrer para *Crepis neglecta* ($n = 4$) e para a espécie derivada *C. fuliginosa* ($n = 3$). Esta última espécie têm um grande limite de distribuição geográfica (STEBBINS 1966). *G. americana* tem uma larga distribuição na América Tropical, ocupando áreas úmidas, e estão sujeitas a inundações periódicas. A *G. infundibuliformis* é distribuída em maior quantidade, no Sul e Sudoeste do Brasil, ocorrendo em áreas que se modificam com muita umidade na Costa da Floresta Atlântica para floresta seca do Nordeste do estado de Minas Gerais (ZAPPI et al., 1995).

O presente trabalho evidenciou tamanho, morfologia e marcações de bandas diferentes. A suposição apresentada é que essas diferenças podem ter ocorrido devido aos diferentes padrões de condensação, uso de populações diferentes, de regiões geográficas diferentes. Os resultados aqui descritos se mostram essencialmente importantes para caracterizar a posição desta espécie no gênero, suas relações de parentesco, variações intra e interespecíficas e sua participação no processo evolutivo.

5. 2 Aplicação de bandamento cromossômico

5. 2. 1 Bandamento C

A heterocromatina é um dos componentes cromossômicos que atrai muito a atenção dos citogeneticistas, por causa do silêncio funcional, decorrente da aparente

ausência de genes e devido ao fato de apresentar coloração diferencial em relação ao restante do cromossomo. Especialmente depois do desenvolvimento de técnicas de diferenciação da heterocromatina em cromossomos metafásicos para uma grande diversidade de organismos, um largo número de pesquisas foram desenvolvidas, demonstrando a presença, variabilidade, composição molecular, efeitos direto e indireto no cariótipo, funções quase reais da heterocromatina (MIZIANTY, 1984 a,b, JOHN, 1988; HENNIG, 1999).

A análise de distribuição do padrão de heterocromatina no complemento cromossômico de angiospermas em geral é impedido pela particularidade da grande variabilidade de heterocromatina ligada a variabilidade de outros parâmetros cariotípicos.

A comparação de padrão de heterocromatina de diferentes espécies possui alguns aspectos consideráveis: a heterocromatina não é homogênea, variando qualitativamente e quantitativamente entre as espécies, dentro de uma simples espécie; o, polimorfismo de número e tamanho cromossômico é freqüente; a quantidade de heterocromatina varia independentemente da quantidade de eucromatina ou do conteúdo de DNA no núcleo; ambas heterocromatina e eucromatina podem sofrer variações relativamente num curto espaço de tempo; diferentes técnicas de coloração podem revelar diferentes frações de heterocromatina; muitas espécies diferentes podem apresentar simultaneamente, diferenças no número, tamanho e morfologia, tanto quanto na quantidade, composição e distribuição da heterocromatina (GREILHUBER, 1982; VOSA, 1985; JOHN, 1988; SUMNER, 1990).

Um aspecto mais importante da pesquisa sobre heterocromatina é o estudo sobre a sua distribuição em blocos ou bandas no cariótipo. Bandas heterocromáticas em plantas têm sido analisadas principalmente pelo bandamento C ou pelo uso de corantes fluorocromos base-específica (GUERRA, 2000).

O mecanismo funcional e evolutivo da heterocromatina pode não ser o mesmo para todas as espécies, e um simples padrão de distribuição pode não existir para todas as angiospermas, somente tendências ou padrões diferenciais para diferentes genomas e cariótipos.

De forma geral, o padrão de distribuição de bandas C encontrado em *Genipa americana* L. apresenta relativa discordância ao padrão encontrado por Pierozzi e Mendaçolli (1997) para bandamento C. Tais discordâncias ocorrem em relação aos pares satelitados, distribuição das bandas C, e com a quantidade de heterocromatina entre os cromossomos.

O padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva nesta espécie discorda quanto ao padrão apresentado por Pierozzi e Mendaçolli (1997) onde pequenas bandas C terminais e centroméricas foram observadas na maioria dos cromossomos. Em algumas metáfases aqui analisadas, o tamanho da banda C foi aproximadamente o mesmo para a maioria os pares cromossômicos. As autoras, ainda mostram uma banda C terminal no braço curto do par cromossômico n^o4. Uma explicação para essa localização e extensão dos segmentos de bandas C nos cromossomos mitóticos de *G. americana* L. coincide com grande quantidade de sinais fluorescentes de cromomicina descrito por Guerra (1993a), o que significa dizer que heterocromatina C em *G. americana* L. pode ser rica em seqüências CG.

Bortoleti et al. (2001) mostraram que a espécie possui um alto conteúdo de heterocromatina rica em GC e isso pode ser a causa também de um alto polimorfismo encontrado nas populações de *G. americana* estudadas, com diferenças entre os cromossomos homólogos e entre as duas populações quanto a o tamanho, intensidade de coloração e por vezes na posição das bandas. Aparentemente, a elevada quantidade de heterocromatina rica em GC seria geneticamente menos estável que outras porções cromossômicas, o que explicaria as variações observadas na distribuição e no tamanho das bandas entre as duas populações analisadas. Tal constatação leva à suposição de que o indivíduo poliplóide possa ter se originado de flor fecundada por um indivíduo geneticamente divergente resultando no fenômeno da aloploidia, hipótese que merece uma análise mais detalhada.

De acordo com Greilhuber (1984) diferenças no aumento ou diminuição da heterocromatina (banda C) pode refletir no valor C adaptativo da espécie. Em associação ao ganho de heterocromatina nas regiões de banda C telomérica, a existência da aparência e grau evolutivo podem ser vistos em alguns grupos de espécies relatadas como equivalente *Anacyclus* (SCHWEIZER e EHRENDORFER,

1983), ou *Capsicum* (MOSCONE et al., 1993) ou *Orchis* (D' EMERICO et al., 1996). A maioria das espécies considerada avançadas possui grande quantidade de heterocromatina e também predominância de bandas C telomérica. De acordo com Pierozzi e Mendaçoli, (1997) neste caminho, *G. americana* pode ser considerada uma espécie derivada como foi a *G. infundibuliformis*.

A presença dessas bandas teloméricas, intersticiais e satélites heterocromáticos nos cromossomos de *G. americana* sugerem uma estabilidade desses marcadores citológicos, sendo considerados como um componente antigo do genoma, representando um aumento adicional de heterocromatina no genoma dessa espécie, sendo isto interpretado como um avanço evolucionário.

Em *Vicia faba*, por exemplo, foi observado que a heterocromatina está preferencialmente localizada nas regiões intersticiais, enquanto que em *Allium cepa* está distribuída preferencialmente em regiões terminais. Após realização das análises cromossômicas de algumas espécies animais ou vegetais, Heitz (1957) considerou que cada distribuição tem uma regra universal. Em algumas espécies de *Lathyrus*, uma progressiva redução em heterocromatina constitutiva (banda C) ocorreu devido a exogamia perene.

5. 2. 2. Coloração com nitrato de prata

Para a detecção das RONS são utilizadas diversas técnicas. A mais comum é a técnica de impregnação de prata, a qual detecta as regiões ativas na interfase precedente pela associação de prata com proteínas nucleares (MARGARIDO, 2000).

Na literatura há poucos artigos referindo-se a um número elevado de RONS ativos em plantas diplóides, como encontrado por Moscone et al. (1995) para *Capsicum baccatum* var. *pendulum* através de método de coloração com nitrato de prata.

A *Genipa americana*, estudada neste trabalho apresentou até duas RONS coradas pelo nitrato de prata no núcleo interfásico, embora tenha-se observado um número máximo de dois nucléolos com o mesmo tamanho e vários outros de tamanhos diminutos, o que se refere a presença de duas RONS correspondentes às

construções secundárias de apenas um par cromossômico satelitado, a maioria dos núcleos interfásicos apresentaram apenas um nucléolo.

Em Solanáceas a técnica de impregnação de prata para identificação da região organizadora de nucléolo foi aplicada em três gêneros *Solanum* (PIJNACKER, FERWEDA, 1984, 1991), *Cestrum* (BERG, GREILHUBER, 1992,1993 a, b) e *Capsicum* (MOSCONE et al., 1995). Variação quanto ao número de RONS em relação ao número de núcleo interfásico é relatada para maioria das espécies. Esta variação pode ser devido à fusão tardia de nucléolos (LACADENA et al., 1984).

Em *Cestrum* as RONS não são evidenciadas em cromossomos metafásicos pela coloração de nitrato de prata, sendo marcadas somente na intérfase, prometáfase e prófase (BERG, GREILHUBER, 1992,1993 a, b). Já em *Coffea arabica*, foram identificados seis sinais de hibridação que correspondem aos cistrons ribossomais, estes sinais evidenciaram-se na posição distal de três pares cromossômicos, sendo dois sinais relativamente fortes, dos sinais medianos e ainda, dois outros sinais mais fracos. Os núcleos interfásicos exibiram também seis sinais de hibridação (PINTO-MAGLIO e CRUZ, 1998).

Pierozzi e Mendaçolli (1997) identificaram na *Genipa americana*, através da análise citológica, que somente o cromossomo 4 é associado com a região organizadora de nucléolo. Estas observações divergiram dos resultados apresentados por (GUERRA,1993a), que concluiu que o cromossomo 11 está associado com o NOR, baseado nos sinais de cromomicina positivo no segmento terminal.

Analisando cromossomos metafásicos de duas populações de *G. americana*, Bortoleti et al. (2002a), encontraram fortes marcações das RONS com nitrato de prata, nos pares cromossômicos (2) e (9) de cada população estudada. Entretanto, nos núcleos interfásicos, a coloração com nitrato de prata marcou desde um único nucléolo, que ocupou mais de um terço de sua superfície, até 16 nucléolos. Neste último caso, os núcleos apresentaram de um a dois pares de nucléolos maiores e vários outros de tamanho diminuto. Esta observação confirma a possível presença de outros sítios de DNAr expressos nos demais cromossomos que apresentaram marcação com nitrato de prata menos intensa.

Em um novo trabalho, Bortoleti et al. (2003) observaram novamente sítios no mesmo par cromossômico (9), onde vários pares adicionais apresentam marcação menos intensa com coloração com nitrato de prata, coincidindo com bandas CMA+ terminais e subterminais, e nos núcleos interfásicos a coloração marcou até 12 nucléolos.

Um outro exemplo é do gênero *Lathyrus* L., mostrado por Battistin e Fernandez (1994). Empregando, a coloração com nitrato de prata, quatro espécies estudadas mostraram um padrão característico de NORs para os cromossomos metafásicos e para núcleos interfásicos. Todas as espécies evidenciaram um número máximo quatro nucléolos por núcleo interfásico, indicando quatro regiões com genes ribossomais ativos em cada espécie. E para os cromossomos metafásicos, em todas as espécies foram evidenciadas marcações em posições diferentes nos cromossomos, nos braços curtos e longos e em posições terminais e proximais do centrômero.

A coloração com nitrato de prata em populações de *Allium* L, correspondentes a bandas C, CMA/DAPI e ainda sítios de hibridação *in situ*, foram nos cromossomos 7 e 8, entretanto nos núcleos interfásicos diferiram entre as espécies (BESENDORFER et al., 2002).

5. 2. 3. Coloração com fluorocromos

5. 2. 3.1. DAPI - 4'-6-diamino-2-fenilindol e cromomicina - CMA₃

O 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) é um fluorocromo que se liga tanto na região AT quanto GC, no entanto os padrões de banda brilhantes são mais acentuados em regiões ricas em AT. As bandas resultantes da coloração com DAPI aparentemente refletem as áreas que contém diferentes níveis de bases AT. A cromomicina A₃ (CMA₃) é um antibiótico que tem afinidade com pares de bases GC, se ligando às regiões coincidentes com as RONS, desse modo ela produz bandas brilhantes associadas às RONS, sem depender da atividade transcricional na

intérfase precedente. Entretanto, outras regiões heterocromáticas podem ser evidenciadas pela mesma técnica (MARGARIDO, 2000).

Neste trabalho a *Genipa americana* apresentou um padrão com marcações coincidentes de DAPI/CMA nas extremidades dos cromossomos, corando as regiões heterocromáticas (bandas C). Em comparação com Guerra (1993a), o DAPI tem os sinais brilhantes reduzido, correspondendo aos blocos de CMA⁺ esse resultado caracteriza do mesmo modo CMA⁺/DAPI⁺. Em geral todos os blocos em profase e intérfase são observados CMA⁺/DAPI⁺, porém poucos apresentam CMA⁻/DAPI⁺. Também são apresentados CMA⁻/DAPI⁺⁺ e apresentam, de forma conspícua, blocos pequenos CMA⁻/DAPI⁺⁺. Quase todas as regiões pericentroméricas apresentaram CMA⁻, e a posição centromérica poderia ser melhor identificada com DAPI.

Bortoleti et al. (2001) mostraram que coloração cromossômica com fluorocromos em *G. americana* revela uma quantidade visível de heterocromatina rica em GC proeminente CMA⁺⁺/DAPI⁻ ou CMA⁻/DAPI neutro, visivelmente nas posições subtlocêntricas de todos os braços cromossômicos e em posições intercalares. Cada bloco tem sido completamente ausente na posição de todos os cromossomos. A grande quantidade de heterocromatina rica em GC e estas posições são características muito comuns em árvore desta espécie.

Outro resultado foi obtido por Bortoleti et al. (2002a) num estudo de polimorfismos cromossômicos entre indivíduos e populações de *G. americana*, onde os fluorocromos revelaram um padrão de bandas CMA⁺ peculiar para cada população, com variações na posição e no tamanho das bandas entre populações, entre indivíduos da mesma população e mais raramente entre cromossomos homólogos do mesmo indivíduo. Referindo-se a variabilidade inter e intrapopulacional, alguns representantes das diferentes populações apresentaram um padrão de bandas CMA⁺/DAPI⁻ e CMA⁺⁺/DAPI⁻ com bandas proeminentes em posições terminais, subterminais e intercalares, indicando quantidade significativa de heterocromatina rica em GC. Porém, nítidos polimorfismos foram detectados quanto ao tamanho, intensidade de coloração e posição dos blocos CMA^{+/++} entre populações e indivíduos, bem como entre homólogos do mesmo par (BORTOLETI, 2002b).

Em *Coffea arabica*, uma Rubiaceae também muito estudada, as seqüências altamente repetitivas presentes na heterocromatina puderam ser detectadas com o uso de fluorocromos DAPI/CMA, devido à sua especificidade por regiões ricas em AT e GC, respectivamente. Segundo estudos de cromossomos meióticos na fase de paquíteno, observou-se um padrão heterocromático restrito às regiões pericentroméricas em todos os cromossomos do complemento (PINTO-MAGLIO e CRUZ; 1998). Outro resultado importante obtido é a constatação de que a heterocromatina associada às constricções secundárias apresenta riqueza relativa em pares de base GC, revelada pelo tratamento com fluorocromo CMA₃, e está associada às regiões organizadoras de nucléolo em *C. arabica*. De fato, segundo Schweizer (1980) e Sumner (1990), parece existir uma riqueza relativa em pares de bases GC nos cistrons ribossômicos, por isto estas regiões se revelam habitualmente positivas com o fluorocromo CMA₃.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados da análise cromossômica de *Genipa americana* L. foi possível chegar as seguintes conclusões:

1. A espécie *G. americana* L. é diplóide com $2n = 22$, corroborando, Guerra (1986), e Pierozzi e Mendaçolli (1997), e que apresenta um cariótipo padrão constituído de 11 pares cromossômicos com centrômeros medianos e submedianos.

2. A fórmula cariotípica haplóide para a espécie foi $n = 11 = 8m + 3sm$, com quatro pares cromossômicos satelitados, os pares nº 1, 2, 7 e 11. Diferente de Pierozzi e Mendaçolli (1997), que apresentou a fórmula cariotípica com $n = 11: 3m + 7sm + 1sm^s$.

3. A técnica de bandamento C evidenciou regiões heterocromáticas, formando bandas localizadas nas regiões terminais e intersticiais, chamando a atenção para os blocos heterocromáticos encontrados.

4. Os resultados obtidos a partir dos métodos de impregnação pela prata permitiram considerar que a espécie em análise evidenciou um máximo de dois nucléolos por núcleo interfásico, correspondentes à existência de dois sítios contendo genes ribossomais ativos.

5. Os fluorocromos DAPI e CMA₃ evidenciaram regiões heterocromáticas mostrando um padrão heterogêneo de distribuição de pares AT e GC, sem predominância de uma ou outra.

7. PERSPECTIVAS

1. Estabelecimento de novos experimentos de impregnação pelo nitrato de prata visando identificar os sítios ativos de genes ribossomais nas metáfases mitóticas.
2. Aplicação da metodologia de hibridação molecular *in situ* para localização das regiões cromossômicas contendo as seqüências de rDNA 45 S e 5S
3. Análise citogenética das espécies *Genipa infundibuliformis* e *Genipa williamsii* do gênero *Genipa* buscando o estabelecimento das relações filogenéticas entre estas espécies e *Genipa americana* elucidando à evolução do gênero.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-PERECIN, M. L. R. DE; VOSA, C.G. C-Banding in maize II. Identification of somatic chromosomes. **Heredity**, v. 54, p. 37-42, 1985.

ALMEIDA, A. C.; NASSUR, C. A.; FONSECA, S.; PACCAGNELLA, S. G. Aplicação de alternativas na recuperação de área degradada: estudo de caso na Aracruz Celulose. In: Simpósio Nacional sobre recuperação de áreas degradadas, 2, Foz do Iguaçu. **Anais**. Curitiba: FUPEP, v. 1, p. 473-486, 1994.

ALMEIDA, E. R. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: **Hemus**, p. 215-216, 1993.

ALVES, M. A. O.; CUSTÓDIO, A. V. C.; NUNES, E. P.; FERNANDES, A. G. Citotaxonomia da tribo Phaseoleae (Leguminodae). **Resumos** do VII Encontro de Genética do Nordeste. Aracaju, Sociedade Brasileira de Genética, Regional de Sergipe, v. 7, p. 51, 1990.

ANDERSSON, L.; ROVA, J. H. E. A Provisional Checklist of Neotropical Rubiaceae. **Scripta Botanica Belgica**, v. 1, p. 1-200, 1999.

ANDRADE, A. C. S. DE.; SOUZA, A. F. DE; RAMOS, F. N.; PEREIRA, T. S.; CRUZ, A. P. M. GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE JENIPAPO: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 609-615, 2000.

ANDREASEN, K; BREMER, B. Phylogeny of the subfamily Ixonoideae (Rubiaceae). **Opera Bot. Belg.**, v. 7, p. 119-138, 1996.

BATTISTIN, A.; FERNANDEZ, A. Karyotypes of four species of South America natives and one cultivated species of *Lathyrus* L. **Caryologia**, v. 47, p. 325-330, 1994.

BERG, C.; GREILHUBER, J. Cold-sensitive regions and their relation to constitutive heterochromatin in *Cestrum parqui* (Solanaceae). **Genome**, v. 35, p. 921-930, 1992.

_____. Cold sensitive regions and heterochromatin in *Cestrum* (Solanaceae): *C. strigillatum*, *C. fasciculatum*, and *C. elegans*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 85, p. 133-151, 1993a.

_____. Cold-sensitive regions and heterochromatin in *Cestrum aurantiacum* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 185, p. 259-273, 1993b.

BERTÃO, M. R. **Caracterização Citogenética de Linhagens de Milho (*Zea mays* L.) Através de Bandamento Cromossômico e Hibridação Molecular *in situ*.**

1998. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

_____. **Evolução Cariotípica no Gênero *Capsicum* (Solanaceae).** 1993. 148 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M. E.; PAPES, D. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 139, p. 99-108, 2002.

BORGES, J. D.; CORRÊA, G. C.; NAVES, R. V.; CHAVES, L. J.; ROCHA, M. R. DA. Efeito do armazenamento de sementes de jenipapo (*Genipa americana*) sobre a emergência de plântulas. XIII **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Salvador, BA. v. 3, p. 1079-1080, 1994.

BORTOLETI, K. C. A.; BENKO-ISEPPON, A. M.; GITAÍ, J. Variabilidade citogenética em plantas nativas e cultivadas de *Genipa americana* L. através da coloração convencional HCl/Giemsa e fluorocromos CMA/DAPI. In: **Anais do IX Congresso de Iniciação Científica**, Recife, PE. v. 9, 2001.

BORTOLETI, K. C. A.; GITAÍ, J.; BENKO-ISEPPON, A. M. Polimorfismo cromossômicos entre indivíduos e populações de jenipapo (*Genipa americana* L.) detectados com técnicas de bandeamento (Fluorocromos CMA/DAPI e AgNO₃). 48º **Congresso Brasileiro de Genética**, Águas de Lindóia, SP. v. 48, p. 892, 2002a.

BORTOLETI, K. C. A.; BENKO-ISEPPON, A. M.; GITAÍ, J. Variabilidade citogenética intra e interpopulacional em *Genipa americana* L. detectada com fluorocromos CMA e DAPI 53º **Congresso Nacional de Botânica e 25ª Reunião Nordestina de Botânica**, Recife, PE. v. 53, p. 460, 2002b.

BORTOLETI, K. C. A.; CARVALHO, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. Irregularidades nas divisões mitótica e meiótica em *Genipa americana* L. 49º **Congresso Brasileiro de Genética**, Águas de Lindóia, SP. v. 49, p. 537, 2003.

BRAGA, J. DA S. T. **As Fruteiras do Brasil**. Broteria: Série de vulgarização Científica, 1923.

BREMEKAMP, C. E. B. Remarks on the position, the delimitation and the subdivision of the Rubiaceae. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 15, p. 1-33, 1966.

BREMER, B. Phylogenetic studies within Rubiaceae and relationships to other families based on molecular data. **Opera Bot. Belg.**, v. 7, p. 33-50, 1996.

BREMER, B.; JANSEN, R. K. Comparative restriction site mapping of chloroplast DNA implies new phylogenetic relationships within the Rubiaceae. **Amer. J. Bot.**, v. 78, p. 198-213, 1991.

BREMER, B.; ANDREASEN, K.; OLSSON, D. Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on *rbcL* sequence data. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v. 82, p. 383-397, 1995.

BREMER, B.; JANSEN, R. K., OXELMAN, B., BACKLUND, M., LANTZ, H., KIM, J. K., More characters and more taxa for robust phylogeny – case study from the coffee family (Rubiaceae). **Syst. Biol.**, v. 48, p. 413-435, 1999.

BRODY, A. L. Envasado de alimentos en atmosferas controladas, modificadas y a vacio. Zaragoza: **Acribia**, p. 220, 1996.

CARVALHEIRA, G. M. G.; GUERRA, M. The polytene chromosomes of the anther tapetum of some *Phaseolus* species. **Cytologia**, v. 59, p. 211-217, 1994.

CARVALHEIRA, G. M. G. **Análise comparada entre os cromossomos mitóticos e politênicos de *Vigna unguiculata* e algumas espécies de *Phaseolus***. 1993. Mestrado – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1993.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras – Recomendações, Silviculturas, Potencialidades e Uso de Madeira**. Embrapa/CNPQ. Colombo, p. 639, 1994.

CARVALHO, R. **Citogenética de *Manihot esculenta* Crantz (mandioca) e algumas espécies afins**. 1999. Mestrado. - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

CARVALHO, R.; GUERRA, M. Análise cromossômica de 10 cultivares de feijão massacar *Vigna unguiculata* (L) Walp. **Resumos** do IX Encontro de Genética do Nordeste, Natal, Sociedade Brasileira de Genética - Regional do Rio Grande do Norte, p. 59, 1995.

_____. Caracterização citogenética de cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e *V. radiata* (L.) Wilczek. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 19, p. 132, 1996.

CARVALHO, R.; GUERRA, M.; CARVALHO, P. C. Occurrence of spontaneous triploidy in *Manihot esculenta* Crantz. **Cytologia**, v.64, p. 137-140, 1999.

CERBAH, M., COULAUD, J., GODELLE, B. SILJAK-YAKALEV, S. Genome size, fluorochrome banding and caryotype evolution in some *Hypochoeris* species. **Genome**, v. 38, p. 689-695, 1995.

CHIQUIERI, A.; DI MAIO, F. R.; PEIXOTO, A. L. A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na *Flora Brasiliensis* de Martius. **Rodriguésia**, v. 55 (84). p. 47-57, 2004.

CONSALARO, H. N. **Biologia reprodutiva de duas espécies de Rubiaceae de mata de galeria do Triângulo Mineiro**. 2004. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004.

CORNÉLIO, M. T. M.; GUERRA, M. Heteromorfismo cromossômico em duas espécies de *Citrus* (*C. deliciosa* Tenore, *C. reticulada* Blanco) e um híbrido interespecífico (*C. deliciosa* Tenore x *C. aurantium* L.) **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 184, 1993.

CORNÉLIO, M. T. M. **Variabilidade cromossômica em cultivares poliembrionários e monoembrionários de *Citrus***. 1994. Mestrado - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1994.

CRUZ, N. M.; BOAVENTURA, Y. M. S.; CONAGIN, C. H. T. M.; DUTILH, J. H. A.; FORNI-MARTINS, E. R.; MEDINA, D. M.; MENDES, A. J. T.; PIEROZZI, N. I.; PINTO-MAGLIO, C. A. F. **Citogenética vegetal: cinquenta e três anos de pesquisa da Seção de Citologia do Instituto Agrônomo Campinas**: Instituto Agrônomo de Campinas. Documentos IAC 27, 1993.

D' EMERICO, S.; PIGNONE, D.; BIANCO, P. Karyomorphological analyses and heterochromatin characteristics disclose phyletic relationships among $2n = 32$ and $2n = 36$ species of *Orchis* (Orchidaceae). **Plant. Syst. Evol.**, v. 200, p. 111-124, 1996.

DELAY, C. Recherches sur la Structure des Noyaux Quiescents chez les Phanerogames. **Masson & Ciência**, Paris, 1949.

DELPRETE, G. P. Notes on calycophyllous Rubiaceae. Part II. Morphological comparison of the cerrado and Atlantic forests. **Brittonia**, v. 50, p. 487-497, 1998.

DELPRETE, G. P.; MOTLEY, T. J.; WURDACK, K. J. Molecular systematics of the Catesbeeae – Chiococceae Complex (Rubiaceae): flower and fruit evolution and biogeographic implications. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 316-329, 2004.

DIAS, M. G. L. **Efeito da temperatura no comportamento meiótico de *Rhoeo spathaceae* (Swartz) Stearn (1978)**. 1980. Mestrado - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1980.

DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J. C. B. Recomposição de matas ciliares. **IF Série registros**, v. 4, p. 1-14, 1990.

ESTRELLA, E. **Plantas medicinales amazonicas: realidad y perspectivas**. Manaus: TCA, p. 268, 1995.

FAO, (Rome , Italy). **Food and fruit-bearing forest species 3: examples from Latin America**. Rome, p. 308 1986.

FERNANDEZ-GOMES, E.; STOCKERT, J. C.; LOPEZ-SAEZ, J. F.; GIMENEZ-MARTIN, G. Staining plant cell nucleoli with AgNO₃, after formalin-hydroquinone fixation. **Stain Technology**, v. 44, p. 48-49, Geneva, 1969.

FERREIRA, M. A. M. M. **Determinação do Padrão de Regiões Heterocromáticas no Gênero *Capsicum* Através de Métodos de Bandamento**. 1998. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba 1998.

FIGUEIREDO, R. W. **Estudo da industrialização do jenipapo (*Genipa americana* L.)**. 1984. 171 f. Dissertação (Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação) - Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, 1984.

FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; HOLANDA, L. F. F. DE; MONTEIRO, J. C. S. Características Físicas e Químicas do Jenipapo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 421-428, 1986.

FONSECA, A. Serviço de extensão rural da Bahia. **Frutas da Bahia (notas suscintas)**, Salvador / BA, 1971.

GEBER, G. **Zur Karyosystematik der Lemnaceae**. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Universität Wien, Wien, 1989.

GERMANO-FILHO, P. Estudos Taxonômicos do gênero *Bathysa* C. Presl (Rubiaceae, Rondeletieae), no Brasil. **Rodriguésia**, v. 50 (76-77). p. 49-75, 1999.

GIBBS, P.; INGRAM, R. **Chromosome numbers of some Brazilian flowering plants**. Notes RGB Edinb., v. 40, p. 299-407, 1982.

GOMES, R. P. **Fruticultura Brasileira**, São Paulo, Nobel, 1973.

_____. **Fruticultura brasileira**, 8. ed. São Paulo: Nobel, p. 278-281, 1982.

GREILHUBER, J. Trends in der Chromosomenevolution von *Scilla* (Lilliaceae). **Stapfia**, v. 10, p. 11-51, 1982.

_____. Chromosomal evidence in taxonomy. In: Heywood, V. H. and Moore, D. M. 1984. "Current concepts in plant taxonomy." London, **Academic Press**, p. 448, 1984.

GUERRA, M. DOS S. O Uso do Giemsa na Citogenética Vegetal – Comparação entre a Coloração simples e o Bandamento. **Ciência e Cultura**, v. 35, n. 2, p. 190-192, 1983.

_____. Cytogenetics of Rutaceae. II. Nuclear DNA content. **Caryologia**, v. 37, p. 219-226, 1984.

_____. Cytogenetics of Rutaceae. III. Heterochromatin patterns. **Caryologia**, v. 38, p. 335-346, 1985.

_____. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco I. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 21-40, 1986.

_____. Cytogenetics of Rutaceae. IV. Structure and systematic significance of the interphase nuclei. **Cytologia**, v. 52, p. 213-222, 1987.

_____. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara. 24-35 p, 1988.

_____. A situação da citotaxonomia de angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 4, p. 75-86, 1990.

_____. High amount of heterochromatin in a tropical tree species: *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Cytologia**, v. 58, p. 437-442, 1993a.

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

_____. Localização dos genes RNAr em cromossomos mitóticos e politênicos de *Vigna unguiculata* (L) Walp. **Resumos** do IX Encontro de Genética do Nordeste, Teresina, Sociedade Brasileira de Genética – Regional do Piauí, p.163, 1993c.

GUERRA, M. dos S. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

GUERRA, M.; SOARES, M. M. M.; GALLINDO, F. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco II. **Ciência e Cultura**, v. 40, n. 8, p. 780-786, 1988.

GUERRA, M.; NOGUEIRA, M. T. M. The cytotaxonomy of *Emilia* (Astereaceae:Senecioneae) species occurring in Brazil. **Pl. Syst. Evol.**, v. 170, p. 229-236, 1990.

GUERRA, M.; CARVALHEIRA, G. M. G. Occurrence of polytene chromosome in the abther tapetum of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **J. Hered.**, v. 68, p. 288-292, 1994.

GUERRA M.; KENTON, A. Distribution of telomere DNA in mitotic and polytene nuclei of the anther tapetum of a tetraploid hybrid bean, *Phaseolus vulgaris* x *P. acutifolius*. **Braz. J. Genet.**, v. 19, p. 313-318, 1996.

GUERRA, M.; KENTON, A.; BENNETT, M. DNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization. **Ann. Bot.**, v. 78, p. 157-161, 1996.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A. E. B.; CORNÉLIO, M. T. M.; SANTOS, K.; SOARES-FILHO, W. S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. **Brazil. J. Genet.**, v. 20, p. 489-496, 1997.

GUERRA, M.; SANTOS, K. G. B.; SILVA, A. E. B.; EHRENDORFER, F. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioidae - A case of parallel chromosomal evolution. **Am. J. Bot.**, v. 5, p. 735-747, 2000.

HEITZ, E. Das Heterochromatin der Moose I. **Jb. Wiss. Bot.**, v. 69, p. 762-818, 1928.

_____. Die Herkunft des Chromozentren. **Planta**, v. 18, p. 571-636, 1932.

_____. Die Chromosomenstruktur im Kern während der Kernteilung und der Entwicklung des Organismus. In: Conference on Chromosomes. **W. E. J. Tjeenk Willink Verlagsgesellschaft**, Zwolle, p. 1-22, 1957.

HENNING, W. Heterochromatin. **Chromosoma**, v. 108, p. 1-9, 1999.

HOWARD, R. H. **Rubiaceae**. In: Flora of the Lesser Antilles, v. 6, p. 413-415, 1989.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JANSEN, S. E.; ROBBRECHT, E.; BEECKMAN, H.; SMETS, E. Wood anatomy of the predominantly African representatives of the tribe Psychotrieae (Rubiaceae-Rubioideae). **IAWA J.**, v. 18 n. 2, p. 169-196, 1997.

JANSEN, S. E.; DE BLOCK, P.; BEECKMAN, H.; SMETS, E. Systematic wood anatomy of the Pavetteae (Rubiaceae-Ixoroideae). **Syst. Geogr.**, v. 68, p. 113-133, 1999.

JANSEN, S. E.; ROBBRECHT, E.; BEECKMAN, H.; SMETS, E. A survey of the systematic wood of the Rubiaceae. **IAWA J.**, v. 23, n. 1, p. 1-67, 2002.

JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: Heterochromatin Molecular and Structural Aspects (Verma, R. S., ed.). **Cambridge University Press**, Cambridge, pp. 1-47, 1988.

KEELER, C. Cuna devil repellent in insect repellent. Bull.Ga. **Acad. Sci.**, v. 22, p. 15-19, 1964.

KIEHN, M. Karyologische Untersuchungen an *Rubiaceae*: chromosomenzählungen aus Afrika, Madagascar un Mauritins. **Plant. Syst. Evol.**, v. 149, p. 89-118, 1985.

_____. **Karyologische Untersuchungen und DNA-Messungen an Rubiaceae und ihre Bedeutung für die Systematik dieser Familie**. Dissertation zur Doktorgrades, Universität Wien, 1986.

_____. Chromosome survey of the Rubiaceae. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v. 82, p. 398-408, 1995.

LACADENA, J. R.; CERMEÑO, M. C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J. L. Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty) in triticales by silver-staining procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 67, p. 207-213, 1984.

- LANFONTAINE, J. G. Ultrastructural organization of plant cell nuclei. In: The Cell Nucleus. **Academic Press**, New York. v. 1, p. 149-185, 1974.
- LAVINIA, U. C.; SHARMA, A. K. Giemsa C-banding in Lathyrus L. **Bot. Gaz.**, v. 141, p. 199-203, 1980.
- LEE, Y. S.; RINK, R. M. Remarks on the chromosome numbers in the rubiaceae. **Phytologia**, v. 57, p. 73-79, 1985.
- LENS F.; JANSEN, S. E.; ROBBRECHT, E.; SMETS, E. Wood anatomy of the Vanguerieae (Ixoroidea - Rubiaceae), with special emphasis on some geofrutices. **IAWA J.**, v. 21, n. 4, p. 443-455, 2000.
- LEVAN, A.; FREDGA, A.; SANDERBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position in chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.
- LIN, B. Y. Número cromossômico de exemplares da família Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 9, p. 49-55, 1987.
- LINNAEUS, C. **Systemae Naturae**...edition decimal, 2. Imp. Laurentii Salvii, Stockholm, 1759.
- LOBO, P. C.; JOLY, C. A. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Talauma ovata* St. Hil. (Magnoliaceae), uma espécie típica de matas de brejo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 19, p. 35-40, 1996.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Lorenzi, Harri (Ed.). Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 302p, 1992.
- LORIENT, D.; LINDEN, G. Bioquímica Agroindustrial. Zaragoza: **Acribia**, p. 454, 1996.
- LUCEÑO, M.; VANZELA, A. L. L.; GUERRA, M. Cromossomos holocêntricos e meiose pós-reducional em Cyperaceae. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p. 412, 1995.
- MARCGRAVE, G. **Historiae rerum naturalium Brasiliae**, libro octo, cum appendice..., J. de Laet, Lugduni Batavorum, p. 92, 1648.
- MARGARIDO, V. P. **Uma contribuição à citogenética de Anostomidae, com ênfase na variabilidade das regiões organizadoras de nucléolos no gênero Leporinus (Pisces, Characiformes)**. 2000. Tese - Universidade Federal de São Carlos – São Carlos, 2000.
- MASCARENHAS, J. P. Gene activity during pollen development. **Ann. Ver. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol**, v. 41, p. 317-338, 1990.
- MELO, N. F. DE.; CERVI, A.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus Passiflora L. (Passifloraceae). **PI. Syst. Evol.** v. 226, p. 69-84, 2001
- MELO, N. F. **Cultivo in vitro de cará-da-costa (Dioscorea cayensis Lam.)**. 1994. Mestrado – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1994.

- MIRANDA, M.; GUERRA, M. Variabilidade cromossômica em algumas espécies de limão. **Revista Brasileira de Genética**, v. 15, n. 2, p. 67, 1992.
- MIZIANTY, M. Banding patterns in plant chromosomes. II. Bibliography (1970-1980) – *Anthophyta*. **Acta Soc. Bot. Poloniae**, v. 53, n. 1, p. 485-487, 1984a.
- _____. Banding patterns in plant chromosomes. II. Bibliography (1970-1980) – *Anthophyta*. **Acta Soc. Bot. Poloniae**, v. 53, p. 111-136, 1984b.
- MORTON, J. **Genipap**. In: Fruits of warw climates, Miami, FL. p. 441-443, 1987.
- MOSCONE, E. A.; LAMBROU, M. A.; HUNZIKER, A. T.; EHRENDORFER, F. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). **Plant. Syst. Evol.**, v. 186, p. 213-229, 1993.
- MOSCONE, E. A.; LAMBROU, M. A.; EHRENDORFER, F.; HUNZIKER, A. T. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. **American Journal of Botany**, v. 82, p. 276-282, 1995.
- MURRAY, B. G. The cytology of the genus *Brisa*, L. Gramineae. I. Chromosome Numbers, karyotypes and nuclear DNA variation. **Chromosoma**, Berlin, v. 54, p. 141-154, 1976.
- NOGUEIRA, M. T. M.; GUERRA, M. Heterozigosidade cariotípica em representantes híbridos e não híbridos do gênero *Citrus*. **Revista Brasileira de Genética**, v. 15, n. 2, p. 67, 1992.
- OLIVEIRA, A. L. P. C. **Evolução cariotípica no gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae)**. Piracicaba. 1992. Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, São Paulo, 1992.
- PEDROSA, A.; GUERRA, M.; SOARES-FILHO, W. An hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Cytobios**, v. 92, p. 43-51, 1997.
- PEDROSA, A.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Theor. Appl. Genet.**, v. 100, p. 361-367, 2000.
- PIEROZZI, N. I.; CRUZ, N. D. Número e identificação dos cromossomos de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) através de técnicas de banda-C. **Ciên. e Cult.**, v. 40, p. 802, 1988.
- PIEROZZI, N. I.; ZAPPI, D. C.; SEMIR, J. *Genipa infundibuliformis* sp. Nov. And notes on *Genipa americana* (Rubiaceae). **Kew Bulletin**, v. 50, n. 4, 1995.
- PIEROZZI, N. I.; MENDAÇOLLI, S. L. J. Karyotype and C-band Analysis in Two Species of *Genipa americana* L. (Rubiaceae, Gardenieae Tribe). **Cytologia**, v. 62, p. 81-90, 1997.

PIEROZZI, N. I.; PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. DA. Characterization of somatic chromosome of two diploid species of *Coffea* L. with acetic orcein and C-bands techniques. **Caryologia**, v. 52, p. 1-8, 1999.

PIJNAKER, L. P.; FERWERDA, M. A. Giemsa C-banding of potato chromosomes. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.26, p. 415-419, 1984.

_____. Nucleolar organizer function in developing potato calli. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 82, p. 587-592, 1991.

PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. DA. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar chromosomes. **Caryologia**, v. 40, p. 7-23, 1987.

_____. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. arabica* L. complement. **Caryologia**, v. 51, p.19-35, 1998.

PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CUÉLIAR, T.; BARBOSA, R. L. Aplicação de técnicas de citogenética molecular, **Resumos** do I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, v. 1, 2000.

PLUMIER, C. **Plantarum americanarum**, ed. J. Burman, 6. Amsterdam, 1757.

PRANCE, G. T. **Árvores de Manaus**. 17. ed. Manaus: INPA, p. 223-225, 1975.

RAMALHO, F. C. **Citogenética e citotaxonomia de representantes da família Araceae em Pernambuco**. Recife. 1995. Dissertação - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 1995.

ROBBRECHT, E. Tropical wood *Rubiaceae*. Characteristic features and progressions. Contributions to new subfamilial classification. **Opera Bot. Belgica**, v. 1, p. 1-271, 1988.

_____. Advances in Rubiaceae macrosystematics. **Opera Bot. Belg.**, v. 6, p. 1-200, 1993.

RODRIGUES, R. R.; GANDOLFI, S.; RIBEIRO, C. A. Revegetação em áreas degradadas da bacia do Ceveiro. In: Simpósio Nacional sobre recuperação de áreas degradadas, 2, Foz do iguaçu. **Anais**. Curitiba: FUPEP, v. 1, p.178-188, 1994.

ROVA, J. H. E. **The Condamineae – Rondeletieae – Sipaneeae complex (Rubiaceae)**. Doctoral Dissertation. Goteborg University, Botanical Institute, 1999.

ROVA, J. H. E.; DELPRETE, P. G.; ANDERSSON, L.; ALBERT, V. A. A *tml-F* cpDNA sequence study of the Condamineae – Rondeletieae – Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. **Amer. J. Bot.**, v. 89, p. 145-159, 2002.

SALVADOR, J. L. G. Comportamento de espécies florestais nativas em áreas de depleção de reservatórios. **IPEF**, v. 33, p. 73-78, 1986.

SANTOS, K. G. B.; GUERRA, M.; SOARES-FILHO, W. S. Padrão de bandas cromossômicas obtida com o fluorocromo CMA em três espécies de tangerinas. **Resumos** do IX Encontro de Genética do Nordeste, Teresina, Sociedade Brasileira de Genética - Regional de Piauí, p.167, 1993.

SANTOS, K. G. B.; GUERRA, M. Padrão de bandas CMA em representantes de alguns gêneros próximos *Citrus* I. Tribo Clauseneae. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p.183, 1993a.

_____. Padrão de bandas CMA em representantes de alguns gêneros próximos *Citrus* II. Tribo *Citreae*. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p.196, 1993b.

SCHUMANN, K. *Rubiaceae*. In: Martius (ed.), **Flora Brasiliensis**, v.6, n. 6, p. 350-353, pl. 143, 1889.

_____. *Rubiaceae*. In: A. Engler and K. Prantl (eds.), **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**, v. 4, n. 4, p. 1-156, 1891.

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

_____. Fluorescent chromosome bands in plants: applications, mechanisms and implications for chromosome structure. “**The plant Genome**”, Ed. By Davies, D. R. & Hopwood, R. A. John Innes Charity, Norwich, U. K. Proceedings of the 4th John Innes Symposium, 1980.

SCHWEIZER, D.; EHRENDORFER, F. Evolution of C-band patterns in Asteraceae - Anthemideae. **Biol. Zentralbl**, v. 102, p. 637-655, 1983.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSKY, R. *In situ* genetic conservation and number of tree for seed collect in *Genipa americana* L. population. **Scientia Forestalis**, n. 63, p. 13-22, 2003.

SELVARAJ, R. Karyomorphological studies in South Indian Rubiaceae. **Cytologia**, v. 52, p. 343-356, 1987.

SILVA-NETO, S. J. DA; CALLADO, H. C. **O gênero *Simira* Aubl. (Rubiaceae, Rondeletieae) no Brasil extra-amazônico**. 2000. 80 f. Dissertação (Mestrado de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

SILVA, A. E. B.; SOARES-FILHO, W. S.; GUERRA, M. Número cromossômico em algumas espécies de *Citrus*. **Resumos** do VIII Encontro de Genética do Nordeste, São Luís, Sociedade Brasileira de Genética, Regional do Maranhão, p. 32, 1992.

SILVA, A. E. B.; GUERRA, M. Avaliação do conteúdo de hetero e eucromatina em representantes de diferentes gêneros da subfamília Aurantieae (Rutaceae). **Resumos** do XI Encontro de Genética do Nordeste, Natal, Sociedade Brasileira de Genética – Regional do Rio Grande do Norte, p.77, 1995.

SILVA, A. P. DA; LIMA, C. L. C. DE; VIEITES, R. L. Caracterização química e física do jenipapo (*Genipa americana* L.) armazenado. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 1, p. 29-34, 1998.

SILVA, H.; SILVA, A. Q. DA; CAVALCANTE, A. T.; MALAVOLTA, E. Composição Mineral das Folhas de Algumas Fruteiras do Nordeste. In: VII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Florianópolis, **Resumos**, v. 1, p. 5, 1984.

SILVA, P. N. C.; SANTOS, M. V. F. D. L. DOS. Análise Citogenética de Espécies Vegetais da Mata Atlântica: *Dalbergia nigra*. In: V Seminário Anual de Iniciação Científica da UESC. Ilhéus, Livro de **Resumos**, v.5, p. 33, 1999.

SOARES, M. M.; GUERRA, M.; GALDINO, F. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – II. **Ciência e Cultura**, v. 40, p. 780-786, 1988.

STEBBINS, G. L. Variation and evolution in plants. New York. **Columbia University**, p. 643, 1950.

_____. Chromosomal variation and evolution. **Science**, v. 152, p. 1463-1469, 1966.

STEYERMARK, J. A. **Rubiaceae**. In: B. Maguire (ed.), The Botany of the Guyana Highlands, part IX. Mem. New York Bot. Gard., v. 23, p. 227-832, 1972.

SUMNER, A. T. Chromosome banding. **Unwin Hyman**, London, 1990.

TEJAVATHI, D. H.; NIJALINGAPPA, B. H. M. Cytological studies in some members of *Cyperaceae*. **Cytologia**, Tokyo, v. 55, p. 363-372, 1990.

VERDCOURT, B. Remarks on the classification of the Rubiaceae. **Bulletin van de Rijksplantentuin van Brussel**, v. 28, p. 209-281, 1958.

VERMA, R. S.; BABU, A. **Human chromosomes: principles and techniques**. New York: Mcgraw-hill, p. 419, 1995.

VOSA. C. G.; MARCHI, P. Quinacrine Fluorescence and Giemsa staining in Plants. **Nature (New Bio)**, v. 237, p. 191-192, 1972.

VOSA. C. G. Chromosome banding im plants. In: Chromosome and Cell Genetics (Sharma, A. k. and Sharma, A., eds.). **Gordon and Breach Science Publishers**, London, p. 79-104, 1985.

WHITE, M. J. D. Os Cromossomos. **Companhia Editora Nacional**, São Paulo – SP. p.196, 1977.

WONG, S. W. S. Química de lo alimentos: mecanismos y teoria. Zaragoza: **Acribia**, p. 475, 1995.

XAVIER, M; XAVIER, A. T. T. N. **Jenipapo: espécie indígena para reflorestar. Cerrado**, v. 8, n. 34, p. 20-23, 1976.

ZANETTE, F.; KUDLA, A. P. Propagação do jenipapo - *Genipa americana in vitro* a partir de embriões imaturos. XIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, **Resumos**, Salvador, BA. v. 3, p. 1077, 1994.

ZAPPI, D.; SEMIR, J.; PIEROZZI, N. I. *Genipa infundibuliformis* (sp ined.) a remarkable brasilian species overlooked since 1889. **Kew Bulletin**, v. 50, n. 4, p. 761-771, 1995.

ZELAZOWISKI, V. H.; LOPES, G. L. Revegetação em áreas de embate no refúgio biológico de Santa Helena, Itaipu Binacional – margem esquerda. In: Simpósio Nacional sobre recuperação de áreas de gradadas, 2, Foz do Iguaçu. **Anais**. Curitiba: FUPEP, v. 1, p.417-424, 1994.