

JANAINA TEIXEIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES E
VARIEDADES DE BAMBU COM POTENCIAL
ECONÔMICO NO NORDESTE BRASILEIRO**

RECIFE – PE
FEVEREIRO - 2007

JANAINA TEIXEIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES E
VARIEDADES DE BAMBU COM POTENCIAL
ECONÔMICO NO NORDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais, Área de Concentração: Silvicultura.

Orientador:

Prof. Dr. Silmar Gonzaga Molica

Co-orientadores:

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

MSc. Gérman H. Gutierrez Céspedes

RECIFE – PE
FEVEREIRO - 2007

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Mariano e Prazeres, ao meu companheiro Clodoaldo, aos meus irmãos, Henrique e Juliana e a minha prima-afilhada Ana Beatriz (Bia).

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e saúde.

À minha família que sempre me incentivou, apoiou e compreendeu a minha ausência familiar para realização deste trabalho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais por terem dado estrutura necessária a minha formação, e aos professores que tanto contribuíram aos meus conhecimentos.

Ao Prof.º Dr. Silmar Gonzaga Molica, pela orientação e amizade.

Ao Prof.º Dr. Reginaldo de Carvalho pela orientação, prestatividade e amizade.

À Empresa Agrimex, pela colaboração do colega Gérman Hugo Gutierrez Céspedes, durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Laboratório de Genética Bioquímica e Sequenciamento de DNA da UFRPE, onde realizei toda parte experimental deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela disponibilidade dos equipamentos.

A CAPES pelo apoio financeiro oferecido para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do mestrado, Tarcísio, Kleybi, Fredê e Márcia pelo companheirismo e amizade.

A toda turma do “Genoma”, Bel, Bené, Beth, Cláudio, Fabi, Silvo, Manu, Jack, Lucília, Carlinha, Eliene, em especial ao Sr. Ivaldo, pelos momentos de cultura e sabedoria, e as Prof.^{as} Rose e Vilma, pelo incentivo e momentos de descontração.

A todos que contribuíram de alguma forma para minha formação e desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1. A importância Econômica dos Bambus	3
2.2. Taxonomia dos Bambus	4
2.3. Melhoramento Genético dos Bambus	5
2.4. Estudos Citogenéticos em Plantas Superiores	8
2.4.1. Análise Citogenética Convencional	9
2.4.2. Bandeamento Cromossômico	10
2.4.3. Poliploidia	12
2.5. Estudos Citogenéticos em Bambus	14
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
4. Caracterização Citogenética de Espécies e Variedades de Bambu com Potencial Econômico no Nordeste Brasileiro	
RESUMO	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
5. APÊNDICE	49

SILVA, JANAÍNA TEIXEIRA. Caracterização citogenética de espécies e variedades de bambu com potencial econômico no Nordeste brasileiro. 2007. Orientador: Silmar Gonzaga Molica. Co-orientadores: Reginaldo de Carvalho e German H. G. Céspedes

RESUMO

Bambusa vulgaris é amplamente cultivada nos estados de Pernambuco, Paraíba e Maranhão, visando à produção de celulose com fibras mais longas para fabricação de papel de alta qualidade para embalagens. O programa de melhoramento das espécies de bambu na região depende do estudo da variabilidade citogenética para disponibilizar informações de seus potenciais para manipulação genética. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar citogeneticamente, através de técnica convencional, bandeamento com fluorocromos (CMA₃ e DAPI) e com Nitrato de Prata (AgNO₃), seis espécies de bambu, sendo duas variedades com potencial econômico para o Nordeste. Os resultados obtidos mostraram semelhança no número cromossômico de *Dendrocalamus giganteus* (2n=64), *D. strictus* (2n=64), *D. asper* (2n=64), *Bambusa tuldoides* (2n=64), como também para *B. textilis* (2n=72) e *B. vulgaris* var. *vittata* (2n=72), tendo a última número distinto de sua outra variedade *B. vulgaris* var. *vulgaris* (2n=54). Os números básicos sugeridos variaram de x=8 a x=12 e o nível de ploidia de hexaplóide a octaplóide. Em geral, as espécies apresentaram elevado número cromossômico e cariótipo assimétrico. Os núcleos interfásicos foram dos tipos semi-reticulado com presença de alguns cromocentros. A morfologia dos cromossomos para todas as espécies analisadas variou de metacêntrico a submetacêntrico. A dupla coloração com fluorocromos CMA₃ e DAPI evidenciou blocos CMA₃⁺/DAPI⁻ na região terminal em cromossomos de todas as espécies analisadas. Nesta coloração, em metáfases, constrições secundárias mostraram-se distendidas e evidenciaram satélites nas espécies *B. tuldoides* e *B. textilis*, assim como, em *D. asper* e *D. giganteus*. As demais espécies mostraram blocos que evidenciaram as RON' s. A coloração com AgNO₃ mostrou a ocorrência de apenas um grande nucléolo ocupando grande parte do núcleo interfásico em todas as espécies.

SILVA, JANAÍNA TEIXEIRA. Cytogenetic characterization of species and varieties of bamboo with economic potential in the Brazilian Northeast. 2007. Adviser: Silmar Gonzaga Molica. Comittee: Reginaldo de Carvalho and German H. G. Céspedes

ABSTRACT

Bambusa vulgaris is cultivated in Pernambuco, Paraíba and Maranhão states, aiming at to the production of cellulose with longer staple fibres for manufacture of high quality paper for packings. The improvement program of this and the too much species of bamboo in the region depends on the study of the cytogenetic variability to inform of its potentials for genetic manipulation. The present paper characterized cytogenetically six species, with two varieties of bamboo with economic potential for the Northeast of Brazil using conventional technique, banding with fluorochromes (CMA₃ and DAPI) and Nitrate of Silver (AgNO₃). The results had not shown differences in the chromosomic number of the species *Dendrocalamus giganteus* (2n=64), *D. strictus* (2n=64), *D. asper* (2n=64) and *Bambusa tuldoides* (2n=64), as well as *B. textilis* (2n=72) and *B. vulgaris* var. *vittata* (2n=72), however the last specie had distinct number of its another variety *B. vulgaris* var. *vulgaris* (2n=54). The basic numbers ranges from x=8 to x=12 and the level ploidy varied from hexaploid to octaploid. In general, the species had presented high chromosomic number and had not presented karyotype symmetrical. The structure of the interphase nucleus had been semireticulated with presence of some chromocenteres. The morphology of the chromosomes for all the analyzed species consist of metacentric and submetacentric. The double coloration with fluorochromes CMA₃ and DAPI evidenced blocks CMA₃⁺/DAPI⁻ in the terminal region in chromosomes of all the analyzed species. In this coloration, in metaphase, had revealed secondary constrictions and had evidenced satellites in *B. tuldoides*, *B. textilis*, *D. asper* and *D. giganteus*. The others species had evidenced NOR's (Nucleolar Organization Regions). The coloration with AgNO₃ showed the occurrence of only one great nucleolar that occupies almost all part of the interphase nucleus in all the species.

1. INTRODUÇÃO

As espécies vegetais conhecidas como bambus pertencem à família Poaceae, uma das maiores entre as angiospermas, com cerca de mil espécies subordinadas a aproximadamente 651 gêneros, representados em muitas regiões do mundo, sendo dividida em seis subfamílias (CLAYTON e RENVOIZE, 1986). A subfamília Bambusoideae destaca-se por conter espécies ocorrentes na floresta tropical, estendendo-se até regiões temperadas (DAHLGREN *et al.*, 1985).

A maioria das espécies de bambu está distribuída nos continentes Asiático e Americano, nos quais são componentes típicos e bastante visíveis da flora. Na América, em geral, têm porte herbáceo, ocorrendo freqüentemente na Mata Atlântica. As espécies mais conhecidas de bambu têm origem na Ásia, que é considerada o berço e o centro de biodiversidade (BERALDO, 2002).

Segundo Bonilla (1991), o bambu tem características comercialmente importantes como facilidade de reprodução, curta rotação, alta longevidade e alta produtividade, razão pela qual tem sido intensamente usado para a obtenção de biomassa para extração de celulose de fibras longas para fabricação de papel de alta resistência. A maior produção é obtida no Nordeste do Brasil, em particular nos Estados de Pernambuco, Paraíba e Maranhão, onde estão os maiores plantios mundiais, usando *Bambusa vulgaris*. Em geral, outros países exploram basicamente populações naturais.

Em muitas espécies de bambu, cruzamentos podem ser inviáveis pelo ciclo reprodutivo incerto. A floração pode ser cíclica, mas restrita às plantas fisiologicamente maduras, em intervalos de 60 a 120 anos, ou floração única e tardia, precedendo a morte da planta (FILGUEIRAS, 1988).

Devido à reprodução sexual incerta, o melhoramento genético do bambu é feito, em geral, por clonagem de indivíduos selecionados dentro da variação genética natural de populações-base das melhores espécies e raças geográficas. O melhoramento posterior depende da manipulação de caracteres úteis por poliploidização dos cromossomos ou por fusão de protoplastos (hibridação somática). Nesses casos, é importante contar com determinações

citogenéticas, como o número de cromossomos e, por extensão, do parentesco filogenético entre raças geográficas ou espécies (STEBBINS, 1971).

A citogenética é a especialidade que trata de observações que permitem a caracterização do material genético das células, em especial número e morfologia de cromossomos, durante fase reprodutiva específica de células de tecidos em crescimento, que sejam favoráveis à visualização, em geral ápices radiculares (GUERRA, 1988). Assim, determinações cromossômicas, estudadas pela citogenética, associadas à observação de caracteres fenotípicos e da distribuição geográfica, podem contribuir para taxonomia e para o melhoramento genético.

O objetivo da pesquisa foi fornecer informações citogenéticas sobre seis espécies de bambus, sendo duas variedades, utilizadas como importantes culturas para a produção de papel e celulose no Nordeste do Brasil, com a finalidade de caracterização cromossômica intra e interespecífica além dos níveis de ploidia desses acessos, para subsidiar futuros trabalhos de taxonomia, evolução e melhoramento genético.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS BAMBUS

O bambu tem acompanhado o desenvolvimento do ser humano desde o princípio do desenvolvimento tecnológico, sendo conhecido no oriente como planta dos mil usos. Entre suas aplicações destacam-se a alimentação, uso medicinal, produção de cosméticos, fabricação de instrumentos musicais, artesanatos, construção civil, fabricação de papel, combate a erosão, proteção de margens de rios e reservatórios de água do assoreamento, quebra-ventos, recuperação ambiental, entre outros. Além disso, é uma cultura ecológica, por apresentar baixos impactos ambientais, podendo ser usada como protetor e regenerador do solo (RAO *et al.*, 1998).

A sua elevada utilidade se deve às suas excelentes características químicas, mecânicas e físicas, como por exemplo, alta resistência mecânica e durabilidade dos colmos, tendo as vantagens do ciclo curto e da produção de colmos assexuadamente por muitos anos sem replantio (LITTLE e WADSWORTH, 1964; BANIK, 1988).

Espécies de bambus ocorrem naturalmente em todos os continentes, com exceção da Europa, fornecendo matéria-prima de elevada importância particularmente nos países asiáticos, em que faz parte de uma cultura milenar e serve como fonte de renda para mais de um bilhão de pessoas. Contudo, o bambu ainda é pouco conhecido e divulgado na América Latina, pois países como Venezuela, Colômbia, Peru e Costa Rica, que têm grandes áreas florestais de bambu, fazem pesquisas muito restritas a seu uso na produção industrial e a sua exploração (HIDALGO-LOPEZ, 2003).

No Brasil, dentre as espécies comerciais introduzidas, destaca-se *Bambusa vulgaris*, usada em reflorestamentos para a produção de celulose de fibra longa principalmente na região Nordeste, chegando a ocupar de 35.000 a 40.000 ha (TOMAZELLO-FILHO e AZZINI, 1987). No estudo do potencial para fornecimento de fibras longas para a produção de papel Kraft pela indústria papeleira *Bambusa vulgaris* mostrou alto potencial devido à produção de fibras longas, em comparação a *Pinus elliottii* (GOMIDE *et al.*, 1982).

Comparando cinco espécies/variedades de bambu (*Bambusa vulgaris* var. *vittata*, *B. vulgaris* var. *vulgaris*, *B. tuldoides*, *Dendrocalamus giganteus* e *Guadua angustifolia*) com madeira de eucalipto, para análise de produção e caracterização de carvão vegetal, Brito et al. (1987) observaram valores de densidade aparente dos colmos de *Bambusa tuldoides* e *B. vulgaris* var. *vittata* superiores aos da madeira de eucalipto.

2.2. TAXONOMIA DOS BAMBUS

Os bambus representam um dos grupos de monocotiledôneas arbóreas semelhantes a dicotiledôneas em termos tamanho e tipo de ramificação, sendo o único com gramíneas arbóreas ocorrentes no mundo (CALDERÓN e SODESTRON, 1980).

Estudando a família Gramineae com base em caracteres vegetativos e reprodutivos, Adanson (1763) dividiu-a em dois grupos gerais, Poae e Panica. Brown (1814), baseado na estrutura da frutificação, conceituou esses dois grupos em duas tribos chamando-as de Poaceae e Paniceae.

Posteriormente, Kunth (1815) apresentou uma lista de dez grupos dentro da família Gramineae, sendo o décimo os bambus, na primeira aparição no sistema taxonômico, em que foram classificados como Gramina Bambusaceae.

Em Berlim, Link (1827) listou as plantas cultivadas, e, entre elas, estava a cultivar *Bambusa glaucescens*, de origem oriental, com pequenas folhas e ramos delgados, mas com grande poder de adaptação.

A partir de então, os bambus foram observados mais detalhadamente por Nees (1829), com um experimento pioneiro no Brasil, que dividiu o grupo dos bambus em dois, que são os herbáceos e os arbóreos.

Posteriormente, Stebbins e Crampton (1961) lançaram um sistema de classificação para as gramíneas da América do Norte, em que bambus herbáceos e arbóreos misturavam-se, deixando a subfamília Bambusaceae bastante heterogênea. Isto elevou a subfamília Bambusoideae, com sua divisão nos grupos: Bambuseae (incluindo o gênero *Bambusa*), Arundinariae (incluindo o gênero *Arundinaria*) e Streptochoaea.

Os gêneros arbóreos e herbáceos em relação à morfologia e anatomia são muito parecidos, sendo por isso, compreendidos na subfamília Bambusoideae (CALDERÓN e SODESTRON, 1980).

Bambus do tipo arbóreo têm colmos lenhosos e caules segmentados muito fortes, possui sistema radicular bem desenvolvido e complexo, com florescimento em longos intervalos. Distribuem-se nas regiões tropical e subtropical, podendo desenvolver-se em regiões frias e em altitudes superiores a 4.500 m, em geral associados com plantas arbóreas como as da floresta tropical. Os bambus herbáceos são muitos pequenos e delicados, com colmos que diferem dos arbóreos e não sobrevivem a baixas temperaturas e altitudes maiores que 1.000 m (VERMAH e BAHADUR, 1980).

Atualmente a família Poaceae possui sete subfamílias: Arundinoideae, Bambusoideae, Centothecoideae, Chloridoideae, Panicoideae, Pooideae, Stipoideae, sendo a Bambusoideae uma das mais importantes (CALDERÓN E SODESTRON, 1980).

A subfamília Bambusoideae está dividida em tribos, levando-se em conta características da semente, anatomia das folhas, morfologia e número cromossômico. A tribo Bambusae, que inclui os bambus, foi agrupada na subfamília Bambusoideae quando estas características dos seus componentes foram comparadas com as características dos componentes das outras tribos, Panicoideae, Festucoideae e Chloridoideae. (RAO, 2000).

Quanto ao tipo de crescimento, há dois grupos de espécies de bambu: entouceirantes (paquimorfos) e alastrantes (leptomorfos). Os primeiros constituem a maioria das espécies tropicais e subtropicais, como as dos gêneros *Bambusa*, *Dendrocalamus*, *Thyrsostachys* e *Guandua*, todos introduzidos da Ásia, os quais se adaptam bem a temperaturas mais altas, tendo um considerável interesse para o Brasil (SALGADO, 1987).

2.3. MELHORAMENTO GENÉTICO DOS BAMBUS

O melhoramento genético é basicamente feito pela seleção de espécies, ecótipos e indivíduos reprodutivos, usados para produção de clones ou sementes, com o objetivo de obter características úteis que atendam requisitos

silviculturais, industriais ou comerciais relativos ao local de cultivo e ao uso das plantas (WRIGHT, 1964).

As características desejáveis em plantas de bambu para cultivo visando produção de celulose relacionam-se com adaptabilidade das plantas ao clima e ao solo, reduzindo o custo de produção, com a qualidade das fibras celulósicas, avaliada principalmente pelo comprimento, e com a produtividade em quantidade de biomassa, expressa pelo número, altura, diâmetro, e particularmente, peso dos colmos (MAOYI, 1998).

Variações inter e intra-específicas são comuns entre bambus, mesmo a maioria deles sendo considerada de propagação vegetativa, já que sementes são raramente formadas (GUANG-ZHU e CHEN, 1987). Assim, a poliploidia tem um efeito essencial na variabilidade genética do bambu. Guang-zhu (1987) relatou que *Bambusa variostratus* seria uma mutante natural, pois a espécie apresentava um grande número cromossômico de $2n = 96$.

Mutantes espontâneos foram detectados em *Bambusa vulgaris*, *Bambusa bamboos*, *Oxytennthera abyssinica*, *Phyllostachys edulis* e *Guadua angustifolia* mostrando variações morfológicas e na estrutura dos colmos (VENKATHESH, 1992).

Mutações induzidas foram testadas, mas de maneira incerta. Ueda (1960) não obteve sucesso induzindo mutação artificial em bambu, tratando sementes de *Phyllostachys reticulata* e *Bambusa bamboos* com raios-X. Mas a irradiação com raios gama de sementes de *Dendrocalamus stricus* produziu um mutante artificial de floração rápida, porém as sementes foram inviáveis (KAPOOR e SHARMA, 1992).

No caso do uso de melhoramento genético por fusão de protoplastos, para substituir a hibridação em espécies de reprodução assexual, o grau de ploidia pode definir a possibilidade de êxito, pois a compatibilidade dos genomas depende do pareamento dos cromossomos. A fusão de protoplastos pode ser bem sucedida se os números cromossômicos entre células a serem fundidas forem idênticos, mas, se os números cromossômicos forem diferentes, há incompatibilidade na reprodução celular por meiose (FERREIRA *et al.*, 1998).

Híbridos interespecíficos de *Bambusa* e híbridos intergenéricos entre *Bambusa*, *Dendrocalamus*, *Phyllostachys* e outros tiveram boa vitalidade, bom

potencial de reprodução e boa adaptabilidade, sendo muito cultivados na China. O crescimento de colmos fortes, a forma dos colmos, o tamanho de fibras e a resistência ao frio dos híbridos foram analisados e alguns deles foram cultivados em outros países (GUANG-ZHU, 1997).

Híbridos naturais podem ocorrer quando acontecem florescimentos simultâneos entre espécies diferentes de bambu numa mesma região da Índia (BANIK, 1996). Sementes de *Dendrocalamus longispathus* coletadas tinham caracteres morfológicos de híbridos (HASAN, 1979).

Venkatraman (1937) não teve êxito ao hibridizar cana-de-açúcar e bambu, sendo que os estudos indicaram que a fertilização dos gametas ocorreu, mas o embrião e o endosperma não se desenvolveram. Cruzamentos entre clones de *Saccharum officinarum*, *S. robustum* e *S. spontaneum*, como materiais femininos, e *Bambusa arundinacea* não foram bem sucedidos, pois foram evidenciadas, em um dos cruzamentos, anomalias no crescimento do tubo do grão de pólen, em outros dois houve fertilização, mas o ovário se desenvolveu apenas por 3 ou 4 dias e o embrião foi abortado. Usando a *Bambusa* como material feminino, em 960 cruzamentos, apenas 4 sementes foram produzidas, mas não ocorreu desenvolvimento de hipocótilo e depois de 4 dias apenas 5% dos floretes tiveram desenvolvimento embrionário normal, os demais foram degenerados (RAO *et al.*, 1967).

As variações genéticas entre populações ou espécies podem ser usadas em melhoramento genético, por seleção, hibridação ou indução de mutações. A adaptação de indivíduos mutantes e de seus descendentes pode, ao longo do espaço, dividir uma população em subpopulações, que podem sofrer seleção contra combinações sexuais, sendo sexualmente isoladas como raças geográficas, chamadas citótipos, que, de imediato ou ao longo do tempo, podem evoluir a espécies (GUERRA, 1990).

Se a indução de mutações não é viável ou vantajosa para o melhoramento genético, pode ser essencial a ampliação da coleção de germoplasma, com base nas variedades ou espécies disponíveis, por meio da introdução e comparação *in loco* de novos indivíduos reprodutivos de outras procedências geográficas ou de novas espécies, para se efetuar uma nova seleção (WRIGHT, 1964).

2.4. ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PLANTAS SUPERIORES

Entre as especialidades da genética, a citogenética trata da caracterização do material genético celular, em especial número e morfologia cromossômica, em fase reprodutiva específica de células de tecidos em crescimento e favoráveis à visualização, como ápices radiculares (GUERRA, 1988).

No contexto geral, as caracterizações cariológicas, sejam clássicas, especializadas ou associadas a técnicas modernas de engenharia genética, por detectarem polimorfismo citogenético, são importantes na definição de variação dentro de uma espécie, ou seja, entre raças geográficas, variedades, ou entre espécies (HESLOP-HARRISSON e SCHWARZACHER, 1993).

No contexto específico, segundo Guerra e Nogueira (1990), o uso mais comum da citogenética é em estudos filogenéticos e taxonômicos, relacionando determinações citogenéticas com caracteres vegetativos ou reprodutivos que afetam a adaptação geográfica e a evolução e com caracteres botânicos usados na taxonomia vegetal.

A análise citogenética complementa o uso da similaridade morfológica ou fisiológica na taxonomia botânica (citotaxonomia), tendo a vantagem de o cariótipo ser relativamente mais constante e definir mais o rumo evolutivo do que a morfologia ou a fisiologia do vegetal devido a influência nestes do ambiente (HESLOP-HARRISSON e SCHWARZACHER, 1993).

Alterações cromossômicas estruturais, como deleção, duplicação, inversão e translocação, mudando a posição do gene em relação à heterocromatina que inibe a leitura gênica, podem alterar a expressão gênica, a recombinação e o fluxo gênico por cruzamento. Alterações do número de cromossomos podem isolar, de pronto, um poliplóide e sua(s) espécie(s) ancestral (is) (GUERRA, 1988).

2.4.1. ANÁLISE CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL

Uma das técnicas citogenéticas comumente mais utilizadas é a coloração convencional seguida de observação microscópica. Como o número e a estrutura dos cromossomos podem sofrer variações entre espécies, variedades e indivíduos e a maioria das determinações cromossômicas é feita em um ou em poucos indivíduos, salientando que a repetição da técnica utilizada é um importante fator de segurança. (GUERRA, 1986).

Um exemplo da contribuição da análise citogenética convencional na detecção de alterações numéricas foi realizado por Nishikawa e Sato (2003), em que espécies do gênero *Erigeron* (Asteraceae) exibiram número diploide de $2n = 18$ para *E. miyabeanus*, *E. thunbergii* subsp. *glabratus* e *E. thunbergii* subsp. *glabratus* f. *kirigishiensis*, enquanto a espécie *E. thunbergii* subsp. *glabratus* var. *heterotrichus* diferenciou-se das demais apresentando indivíduos com $2n = 18$ e $2n = 27$, sendo considerado um triploide baseado em $x = 9$.

Variações numéricas são observadas dentro e entre famílias e gêneros. No caso da família Oxalidaceae, destaca-se o trabalho de citogenética desenvolvido por Azkue (2000) que, utilizando coloração convencional com Feulgen, contribuiu na análise do curso evolutivo do grupo. As Oxalis são marcadas tanto por variações morfológicas como numéricas. As espécies encontram-se agrupadas em seções subsidiadas principalmente por caracteres morfológicos, mas, citogeneticamente, apresentam seis diferentes números básicos $x = 5, 6, 7, 8, 9$ e 11 , sendo estes muito importantes nas relações filogenéticas entre espécies. Com a descrição dos cariótipos muitas seções apresentaram características próprias, destacando-se o número básico, a morfologia e o tamanho cromossômico ou ainda séries poliplóides.

O gênero *Cassia* (Caesalpinoideae) destaca-se por variações numéricas entre espécies, podendo ser considerado um grupo multibásico, com $x = 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13$ e 14 . Como a família é descrita com $x = 7$, o gênero *Cassia* também é considerado com $x = 7$, mas tendo amplas variações causadas por disploidia. Durante o curso evolutivo, rearranjos cromossômicos podem ter tornado o cariótipo heterogêneo, sendo, portanto, primitivas as espécies dos gêneros *Caesalpinia* e *Bauhinia*, devido ao cariótipo bastante simétrico e de morfologias similares (SOUZA e BENKO-ISEPPON, 2004).

Os gêneros *Oplismenus*, *Elymus* e *Fetusca*, da família Poaceae, são cosmopolitas e têm sido bem estudados citologicamente. Análise convencional feita por Murray e Ernst (2000), usando o corante Feulgen e orceína lacto-acética mostrou grande variação no número cromossômico de $2n = 28$ até $2n=84$ em *Elymus*, $2n = 14$ até $2n = 70$ para *Fetusca*, com algumas aneuploidias relatadas. O gênero *Oplismenus* apresentou poliploidia e variações inter e intraespecíficas abundantes, com $2n = 18, 36, 54, 72, 90$ para $x = 9$ e $2n = 20, 40, 60$ para $x = 10$, e uma espécie apresentou $2n = 44$, aparentemente baseado em $x = 11$.

A análise convencional tem permitido várias observações no decorrer do ciclo mitótico e divisão meiótica. Nos núcleos interfásicos são evidentes regiões condensadas, denominadas heterocromáticas, e estruturas densas, conhecidas como cromocentros. A partir da quantidade de eucromatina condensada os núcleos interfásicos comportam-se em três padrões principais: arreticulado, no qual a eucromatina se encontra descondensada e os cromocentros ficam distintos; reticulado, se a maior parte da eucromatina se condensa; ou semi-reticulado, onde as regiões condensadas tanto são formadas por heterocromatina como por eucromatina (GUERRA, 1985).

A forma da reorganização e condensação da cromatina nos períodos de interfase até a metáfase também são úteis na avaliação citogenética, indicando a região onde se inicia condensação cromossômica (HAO *et al.*, 1994). Em bromeliáceas, a prometáfase mostrou condensação proximal, ou seja, condensação próxima ao centrômero (GITAI *et al.*, 2005). O gênero *Senna* (Caesalpinoideae) destaca-se em relação ao padrão de condensação, pois tem condensação homogênea em toda extensão cromossômica, enquanto esta é proximal na maioria dos vegetais (SOUZA e BENKO-ISEPPON, 2004).

2.4.2. BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO

Se a análise convencional não evidencia as possíveis variações existentes, em cariótipos similares, técnicas citogenéticas mais refinadas são essenciais (SUMNER, 2003).

O bandejamento C é uma das técnicas na citogenética vegetal utilizada para localizar regiões de heterocromatina constitutiva e evidencia sua

localização em cada cromossomo (SCHWEIZER, 1976). Populações diplóides ($2n = 10$) e tetraplóides ($2n = 20$) de *Gibasis* (Commelinaceae) apresentaram altos níveis de variações heterocromáticas dentro e entre populações (KENTON, 1987).

Em milho foi possível identificar o padrão de bandas heterocromáticas de dois parentais em uma variedade híbrida pela técnica de bandeamento C (AGUIAR - PERECIN, 1985). No híbrido *Triticale* (trigo x centeio), o padrão de bandas heterocromáticas peculiares a cada espécie parental auxiliou na identificação dos cromossomos dos dois parentais (SEAL e BENNETT, 1982).

Outra técnica de bandeamento usada para se efetuar análise citogenética fina em algumas espécies de difícil observação é a coloração com fluorocromos, que consiste na aplicação de corante fluorescente para marcação diferencial de segmentos cromossômicos evidenciando possíveis variações na estrutura e na composição da cromatina ao longo dos braços. Esta técnica se relaciona a heterocromatina constitutiva, e as variações decorrentes desta coloração são diferenças em propriedades físico-químicas da cromatina do cromossomo, que se apresentam na forma de segmentos diferencialmente corados, denominados blocos (SCHWEIZER, 1976).

Os corantes fluorescentes base-específicos mais utilizados são o DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol), que tem afinidade por regiões do DNA ricas em pares de bases A-T, e o CMA₃ (Cromomicina A₃), que tem afinidade por pares de bases G-C (SCHWEIZER, 1976). Esta dupla coloração permite uma identificação precisa de cromossomos, bem como na avaliação da composição de DNA-satélite, o qual equivale à heterocromatina altamente repetitiva (SUMNER, 1990).

Um bom exemplo do uso desses corantes fluorescentes como ferramenta foi demonstrado por Guerra *et al.* (2000) em estudo do padrão heterocromático na subfamília Aurantioideae. Por essa técnica de CMA/DAPI, esses autores encontraram padrões de bandas distintas para as espécies *Murraya paniculata* e *M. koenigii*, o suficiente para sugerirem a separação em dois gêneros distintos.

Bortoleti (2003) verificou a ocorrência de alta frequência de heteromorfismo cromossômico nos níveis intra e interpopulacional em *Genipa*

americana, o que poderia ser explicado pela elevada afinidade de heterocromatina CMA₃⁺, padrão de bandas ricas em G-C presente na espécie.

A coloração com nitrato de prata tem se mostrado uma técnica bastante esclarecedora quando se procura determinar o número máximo de regiões organizadoras (RON's) ativas para formação dos nucléolos nas células. As RON's podem se visualizadas nos cromossomos pela afinidade do AgNO₃ por proteínas nucleolares. Nesta região, estão os genes de DNA ribossomais. Através da coloração com nitrato de prata, portanto, é possível verificar se todos os sítios de DNAr são ativos numa célula, tanto pela detecção da RON, quanto pelo número de nucléolos corados nos núcleos interfásicos (PEDROSA *et al.*, 1997).

A citogenética molecular é a técnica usada mais frequentemente. O processo consiste basicamente na desnaturação do ácido nucléico alvo, seja DNA ou RNA, e a sua hibridização com uma sonda adequada. Esta sonda é constituída por segmento de ácido nucléico, previamente conhecido e marcado, a qual permite reconhecimento e localização de seqüências específicas, permitindo o reconhecimento de cromossomos ou genomas inteiros (LEITCH *et al.*, 1994).

Esta é uma das técnicas mais informativas e que gerou mais impacto na citogenética nos últimos anos. Desenvolvida por Gall e Pardue (1969), é utilizada para localizar seqüências de ácidos nucléicos diferentemente sobre os cromossomos. Esta técnica tem sido utilizada com muito sucesso em estudos de espécies nativas bem como em espécies cultivadas, para fins de melhoramento.

2.4.3. POLIPLOIDIA

A poliploidia é um evento relativamente comum e muito importante na evolução de plantas superiores, podendo gerar raças cromossômicas distintas em uma espécie ou gerar novas espécies, de imediato (SEGRAVES *et al.*, 1999; SCHIFINO-WITTMANN *et al.*, 1999). Embora rara em animais e em gimnospermas, a poliploidia ocorre em 30 a 35% das espécies angiospermas (STEBBINS, 1971). Mais recentemente, constatou-se que a poliploidia ocorre em 95% das pteridófitas e 80% das angiospermas (LEITCH e BENNET, 1997).

Assim, a variabilidade citogenética originada por poliploidia também pode ser relacionada com a variação morfológica e adaptativa entre espécies, ecótipos e indivíduos (WRIGHT, 1964).

A poliploidia é a alteração no número do conjunto total de cromossomos, como, por exemplo, para triploidia, tetraploidia, pentaploidia, hexaploidia, septaploidia ou octaploidia. Como o número gamético haplóide continua sendo n e o número somático diplóide continua sendo $2n$, o nível relativo de ploidia é indicado em relação ao número básico de cromossomos (x), como triploida ($3x$), a tetraploidia ($4x$), e assim por diante (SOLTIS e SOLTIS, 1995).

O poliplóide origina-se por endomitose ou não-redução cromossômica na meiose, resultando gameta com número de cromossomos duplicado ($2n$), o qual ao fecundar com gameta normal, gera um triplóide e, se fecundar com gameta $2n$, gera um tetraplóide. Desses poliplóides, outros podem ser gerados, por duplicação cromossômica e, ou por hibridação (STEBBINS, 1971).

O efeito fenotípico da poliploidia, resultante do aumento do tamanho e do volume celular, pode ser a elevação de caracteres importantes para a produção, podendo haver reflexo no aumento de vários órgãos da planta, com decorrente aumento do tamanho de fibras, folhas, flores, entre outros SEGRAVES *et al.* (1999).

A poliploidia ímpar induz esterilidade, permitindo a geração de frutos sem sementes. O baixo nível de fertilidade e a ausência de sementes para reprodução em algumas espécies são características importantes em alguns poliplóides. Nos bambus, a poliploidia modifica o sistema reprodutivo, causando tendências apomíticas e partenocárpicas, substituindo a reprodução sexual pela assexual. Devido à ampla distribuição dos poliplóides dentro desse grupo, pode ser evidenciada a diferenciação por estudos citogenéticos, em metáfases mitóticas, podendo-se identificar os autopoliplóides e os alopólíides (RAO, 2000).

Devido à aptidão pela reprodução assexual, o melhoramento genético dos bambus, em geral, é feito por métodos alternativos, como indução de mutações, como a poliploidização, e fusão de protoplastos de células cultivadas *in vitro*. Estas técnicas são dependentes de determinações citogenéticas, em particular do número cromossômico (FILGUEIRAS, 1988).

Conforme as pesquisas desenvolvidas, o grau de ploidia varia muito entre espécies do mesmo gênero, demonstrando que os dados citogenéticos são importantes na revisão taxonômica (HEYWOOD, 1995).

D'Hont *et al.* (1998) demonstraram correspondência entre o nível de ploidia e o número de sinais de DNA ribossômico 5s e 45s, em três espécies do gênero *Saccharum* (Poaceae) por hibridização *in situ*.

2.5. ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM BAMBUS

Citologicamente, os membros arbóreos da subfamília Bambusoideae possuem cromossomos pequenos, são poliplóides variando de tetraplóides ($2n=48$) a hexaplóides ($2n=72$) e os herbáceos são diplóides (SORDESTRON, 1981).

Segundo Vermah e Bahadur (1980), espécies asiáticas de *Bambusa* em geral são hexaplóides, mas espécies tetraplóides também existem. Em geral, os números mais observados foram 48 e 72, ocorrendo espécies com 96.

Conforme Darlington e Wylie (1955), Ueda (1960) e Soderstron (1981), entre espécies de porte arbóreo da subfamília Bambusoideae, o número básico (x) mais comum é 12, sendo $2n = 36, 48, 72$ e 96 cromossomos para triplóides, tetraplóides, hexaplóides e octaplóides, respectivamente (Tabela 1). Porém Guang-Zhu (1987) relatou para as espécies arbóreas o número básico (x) podendo ser 6, 8 ou 9. Em bambus herbáceos, o número básico (x) mais comum é 11, embora 7, 9, 10 ou 12 também ocorram (SODERSTRON, 1981).

Assim, é difícil definir o grau de ploidia em espécies de bambu, pois há grande diversidade no número básico (x), elevado número e reduzido tamanho de cromossomos, resultando na necessidade de uso de técnicas mais específicas de citogenética (BANIK, 1996).

Em bambus, os ancestrais diplóides não foram encontrados, tendo o nível diplóide sido encontrado em gramíneas bambusoides ou bambus herbáceos (BANIK, 1986). Assim, pode ser que as espécies de bambu tenham evoluído por poliploidização, a partir de gramíneas bambusoides diplóides, já que os poliplóides podem se separar sexualmente de diplóides em apenas uma

geração. A evolução dos bambus também deve ter tido influência da hibridação entre variedades ou espécies, constituindo a alopoliploidia (RAO, 2000).

Para Guang-zhu (1987), o fator responsável pela poliploidia pode ser geográfico, pois o número de cromossomos cresce gradualmente da zona subtropical para a zona tropical, sendo esperado que, em regiões frias, em altas latitudes e grandes altitudes, $2n$ seja menor que 48.

Dependendo de tendências evolucionárias, a hibridação entre poliplóides ocorre entre espécies próximas, largamente ou pouco correlacionadas ou até mesmo entre gêneros (STEBBINS, 1971). Para WRIGHT (1964), em geral, há mais chance de hibridação entre variedades da mesma espécie, ocorrendo com freqüência entre espécies do mesmo gênero e de habitats vizinhos.

Além da alta variação entre espécies de bambu, em observações citogenéticas, têm sido constatados ecótipos geográficos ou variedades em populações de várias espécies, em especial com diferentes níveis de ploidia (MAOYI, 1995).

Contudo, tendências evolutivas não são propriamente traçadas ou determinadas em bambus e informações obtidas nesta linha ajudariam a estreitar relações taxonômicas e identificar o avanço para táxons superiores, pois não existem evidências de fósseis em bambus (RAO, 2000).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANSON, M. **Familles des plantes**. Paris. Vicent, 1763. 640p.

AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Bandeamento – C e tipos de heterocromatina em milho. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, p. 51-67, 1985.

AZKUE, D. Chromosome diversity of South America *Oxalis* (Oxalidaceae). **Botanical Journal of Lin. Society**. v. 132, p. 143-152, 2000.

BANIK., R. L. Observations on special features of flowering in some bamboos species of Bangladesh. **Bamboo Production and Utilization**. p. 7-21, 1986.

BANIK, R. L. Investigation on the culms production and clump expansion behavior of five bamboo species of Bangladesh. **Indian Forester**, v. 102, n. 9, p. 576-583, 1988.

BANIK, R. L. **Domestication and improvement of bamboos**. Bangladesh: International Network for Bamboo and Rattan (INBAR). 1996. 55p.

BERALDO, A. L. Os mais variados usos de bambus, estudados e testados na Faculdade de Engenharia Agrícola da Unicamp. **Revista de Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 81, p. 13, 2002.

BONILLA, O. H. **Análises quantitativas da produção de *Bambusa vulgaris* Scharder ex Wendland for. *vulgaris* no Estado da Paraíba**. 1991. 95f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BORTOLETI, K. C. A. **Variabilidade citogenética em plantas nativas e cultivadas de *Genipa americana* L. (Rubiaceae)**. 2003. 54f. Monografia (Graduação em Biologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife.

BRITO, J. O.; TOMAZELLO-FILHO, M.; SALGADO, A. L. B. Produção e caracterização do carvão vegetal de espécies e variedades de bambu. **IPEF**, n.36, p.13-17, 1987.

BROWN, R. General remarks, geographical and systematical. **Botany of Terra Australis**. Londres, v. 2, p. 538-618, 1814.

CALDÉRON, C. E.; SORDERSTRON, T. R. **The genera of Bambusoideae (Poaceae) of the American Continent: keys and comments**. Washington. Smithsonian Institution, 1980. 25p.

CLAYTON, W.D.; RENVOIZE, S.A. **Genera graminum**. London. Kew Bulletin: Royal Botanic Garden, 1986. 389p.

DAHLGREN, R. M.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The families of the monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy**. New York. Springer-Verlag, 1985. 520p.

DARLINGTON, C.D.; WYLIE, A. P. **Chromosome Atlas of Flowering Plants**. 2. ed. London. George Allen e Unwin Ltd., 1955. _p.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K. ROUX, C.; GLASZMAMM, J.C. determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**. v. 41, p. 221-225, 1998.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. IN: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. 509 p.

FILGUEIRAS, T. S. Bambus nativos do Distrito Federal, Brasil (Gramineae:Bambusoideae). **Revista Brasileira de Botânica**. v. 11, p. 47-66, 1988.

GALL, J. G.; PARDUE, M. L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceeding National Academy Science**. USA, v. 63, p. 378-383, 1969.

GHORAI, A. & SHARMA, A. Cytotaxonomy of *Bambuseae*. **Plant Resources of South-East Asia**, v. 33, p.135-149, 1981.

GHORAI, A. & SHARMA, Cytotaxonomy of Indian *Bambuseae* (*Dendrocalameae* and *Melocanneae*). **Acta Botânica Indica**. v. 8, p. 134-138,1980.

GITAÍ, J.; HORRES, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. Chromosome features and evolution of Bromeliaceae. **Plant System Evolution**, v. 253, p. 65-80, 2005.

GOMIDE, J.L.; COLODETTE, J.L.; OLIVEIRA, R.C. Estudos das potencialidades de *Bambusa vulgaris* para produção de papéis tipo *Kraft*. **O Papel**, São Paulo, v. 43, n. 7, p. 38-42, 1982.

GOULD, F. W. & SODERSTROM, T. R. Chromosome numbers of some Ceylon grasses. **Canadian Journal of Botanic**. v. 52, p.1075-1090, 1974.

GUANG-ZHU, Z. **Bamboo breeding – Today and Tomorrow**. (Abstract) Workshop in Nanji, China. 1997.

GUANG-ZHU, Z. Studies on the chromosome number of some bamboo species with clump rhizomes. **Guangdong Forestry Institute**. p. 175-178, 1987.

GUANG-ZHU, Z.; CHEN, F. Studies on bamboo hybridization. **Guangdong Forestry Institute**. p. 179-184, 1987.

GUERRA, M.; SANTOS, K. G.B.; SILVA, A. E. B.; EHRENDORFER, F. Heterocromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantoideae – A case of parallel chromosomal evolution. **American Journal of Botanic**. v. 87, n. 5, p. 735-747, 2000.

GUERRA, M. A situação da citotaxonomia de angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 4, n. 2, p. 75-86, 1990.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

GUERRA, M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco - I. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto-Brasil, v. 9, p. 21-40, 1986.

GUERRA, M. Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas. **Sociedade Brasileira de Genética**, São Paulo - Brasil, p. 137-153, 1985.

GUERRA, M.; NOGUEIRA, M.T.M. The cytotaxonomy of *Emilia* spp. (*Asteraceae: Senecioneae*) occurring in Brazil, **Plant System Evolution**, v. 170, p. 229-236, 1990.

HAO, S.; JIAO; ZHAO, J.; XING, M.; HUANG, B. Reorganization and condensation of chromatin in mitotic prophase nuclei of *Allium cepa*. **Chromosoma**, v. 103, p. 432-440, 1994.

HASAN, S. M. Observation on culms and culms-sheaths of bamboo raised from seeds. **Bano Biggyan Patrika**. v. 8, p. 13-26, 1979.

HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T. Molecular cytogenetics-biology and applications in plant breeding. **Chromosomes Today**, v.11, p. 191-199, 1993.

HEYWOOD, V. H. **Global biodiversity assessment**. Cambridge. Cambridge: University Press, 1995. _p.

HIDALGO - LOPEZ, O. **Bamboo the gift of the gods**. Bogotá. 2003. 553 p.

HUANG, S.; WANG, Y.; LOU, Y. & XIAO, J. A report on chromosome numbers in Bambusoideae. **Forest Research (China)**. v.1, p. 109-111, 1988.

International Network for Bamboo and Rattan (INBAR)

Disponível em: <<http://inbar.org>> Acesso em: 20 Out. 2006.

JANNAKI-AMMAL, E. K. **Chromosome Atlas of Cultivated Plants**. London: University Press. _p. 1945.

JANNAKI-AMMAL, E. K. Chromosome numbers in sugarcane×bamboo hybrids. **Nature**, n.141, v. 3577, p. 925-926, 1938.

KAPOOR, M. L.; SHARMA, V. K. Induced early flowering mutants in *Dendrocalamus strictus* Nees after gamma irradiation. **Indian Forester**, v. 1, n. 118, p. 66-69, 1992.

KENTON, A. Giemsa C- banding in *Gibasis* (Commelinaceae). **Chromosoma**. v. 65, p. 309-324, 1987.

KUNTH, C.S. Considérations générales sue les graminées. **Memoires du Muséum d' Histoire Naturelle**, v. 2, p. 62-75, 1815.

LEITCH, I.J.; BENNET, M.D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 12, p. 470-476, 1997.

LINK, H.F. **Hortus regius botanicus berolinensis**. 1. ed. Berlim. G. Reimer, 1827. 884p.

LITTLE, E. L.; WADSWORTH, F. H. **Common trees of Puerto Rico and Virgin Islands**. Washington. Department of Agriculture, 1964. 548p.

MAOYI, F. **Critérios para a seleção de variedades, e para a propagação e estabelecimento de plantas superiores de bambu da plantação.**

1998. Disponível em: <http://w.w.w.inbar.int/publication/txt/INBAR>. Acesso em: 26 Nov. 2006.

MAOYI, F. A review on crossing between bamboo species. **Genetic Enhancement of Bamboo and Rattan**. p. 87-98, 1995.

MEHRA, P. N. & SHARMA, M. L. Cytological studies in some central and eastern Himalayan grasses. **Cytologia**. v. 40, p. 61-74, 1975.

Missouri Botanical Garden

Disponível em: <<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>> Acesso em: 26 Nov. 2006.

MURRAY, I.D.; ERNST, J. B. Contributions to a chromosome atlas of the New Zealand flora. **New Zealand Journal of Botany**, v. 38, p. 1-23, 2000.

NEES, C. G. D. **Agrostologin brasiliensis: Gramineae of flora brasiliensis**. Stuttgart. C. F. D. von Martius, 1829. 884p.

NISHKAWA, T., SATO, K. Chromosome numbers of *Erigeron miyabeanus* Tatew & Kitam (Asteraceae) and the allien taxa from Hokkaido, Northern Japan. **Bull Natn Sci. Mus. Ser.** v. 29, p. 145-148, 2003.

PARTHASARATHY, N. Chromosome numbers in Bambuseae. **Current Science**. v. 15, n. 8, p. 233-234, 1946.

PEDROSA, A.; GUERRA, M.; SOARES-FILHO, W. S. An hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Cytobios**, v.92, p. 43-51, 1997.

RAO, A. N. **Genetic diversity of woody bamboos – Their conservation and improvement**. 2000. Disponível em: [http://w.w.w.ipgri.egi-ar.org/Publications/HTML Publications](http://w.w.w.ipgri.egi-ar.org/Publications/HTML%20Publications). Acesso em: Out. 2006.

RAO, A. N.; RAMANATHA, R.; WILLIAMS, J. T. **Priority species of bamboo and rattan**. IPGRI e INBAR, 1998. 116p.

RAO, J. T.; ALEXANDER, M. P.; KANDASWAMI, P. A. Intergeneric hybridization between *Saccharum* (sugarcane) and *Bambusa* (bamboo). **Journal of the Indian Botanical Society**. v. 46, p. 199-208, 1967.

RICHHARIO. R. H.; KOTWAL, J. P. Chromosome number in bamboo (*Dendrocalamus strictus*). **India Journal of Agriculture**. V. 10, n. 6, p.1033-1033, 1940.

SALGADO, A. L. B. Propagação vegetativa de bambu. **Instituto Agrônomo**, Campinas, v. 39, n. 3, p. 17, 1987.

SARKAR. A. K. ;CHARKRABORTY, N. C.; SAHA, S. K; HAZRA, D. Chromosome number reports LVII. **Taxon**, v. 26, p. 443-452, 1977.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; CARDOSO, M.; BOFF, T. Chromosome numbers of *Leucaena* species: filling the gaps and discovering a new tetraploid species. **Leucnet News**, Oxford, v. 6, p. 10 -12, 1999.

SCHWEIZER, D. Reverse Fluorescent Chromosome Banding with Chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, v. 58, n.4. p. 307-324, 1976.

SEAL A. G.; BENNETT, M. D. Preferential C-banding of wheat or rye chromosomes. **Theory Applicator Genetic**, v. 63, p. 227-233, 1982.

SEGRAVES, K.A. et al. Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossularifolia*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 253 - 262, 1999.

SOBITA DEVI, T.; SHARMA, G. J. Chromosome numbers in some bamboo species of Manipur. **BIC-India Bulletin**.v. 3, n. 1, p. 16-21, 1993.

SODERSTROM, T. R. Some Evolutionary Trends in the Bambusoideae (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 68, n. 1, p. 15-47, 1981.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. The dynamic nature of polyploid genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, New York, v. 92, p. 8089-8091, 1995.

SOUZA, M.G. C.; BENKO-ISEPPON, A. M. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionoideae species of Pará and Amazonas, Brazil. **Botanic Journal Lin. Society**, v. 144, p. 181-191, 2004.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal Evolution in Higher Plants** – London. 1971. 216 p.

STEBBINS, G. L.; CRAMPTON, B. A suggest revision o grass genera of temperate North America. **Recent Advances in Botany**, v. 1, p. 133-145, 1961.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: Organization and Function**. Oxford - United Kingdom. Blackwell Publishing Ltd., 2003. 287 p.

SUMNER, A.T. **Chromosome banding**. London. 1990. 434 p.

TOMAZELLO-FILHO, M.; AZZINI, A. Estrutura anatômica, dimensões das fibras e densidade básica de colmos de *Bambusa vulgaris* Schrad. **IPEF**, n.36, p.43-50, 1987.

UCHIKAWA, I. Karyological studies in Japanese bamboo - Further studies on chromosome numbers. **Japanese Journal of Genetic**, n.11, v. 6, p. 308-312, 1935.

UEDA, K. Studies on the physiology of bamboo with reference to practical application. **The Kyoto University Forest**, n. 30, p. 167, 1960.

VERMAH, J. C.; BAHADUR, K. N. Bamboo research in Asia. **International Development Research Centre**, p. 19-46, 1980.

VENKATESH, C. S. Bamboo improvement through breeding and biotechnology. **Wood**, v. 3, p. 5-10, 1992.

VENKATRAMAN, T.S. Sugarcane x bamboo hybrids. **Indian Agriculture Science**, v. 7, p. 513-514, 1937.

WRIGHT, J. W. **Mejoramiento genetico de los arboles forestales**. Roma. FAO, 1964. 436p.

YAKAMAURA, A. Karyologische und embryologische Studien über einige Bambus-Arten. **Botanical Magazine**. v. 47. n. 559, p. 551-555, 1933.

ZHANG, X. Z. Study on chromosome numbers of clustered bamboo. **Guangdong Linye Keji**. v. 4, p. 16-21, 1985.

Tabela 1. Espécies dos Gêneros *Bambusa* e *Dendrocalamus* (Tribo Bambuseae), descritas citogeneticamente, com respectivos números diplóides, nível de ploidia, origem e referência

Espécie	Número Diploide (2n)	Nível de ploidia	Origem	Referência
<i>Bambusa</i>				
<i>B. amahussana</i>	72	Hexaplóide	Oeste da Índia	Sarkar <i>et al.</i> , 1977
<i>B. arundinacea</i>	70		Índia	Parthasarthy, 1946
	72	Hexaplóide	Oeste da Índia	Sarkar <i>et al.</i> , 1977
<i>B. arundinaceae</i> var. <i>orientalis</i>	72	Hexaplóide	Índia	Ghorai e Sharma, 1981
<i>B. bambos</i>	72			Jannaki Ammal, 1938
<i>B. bicitricatus</i>	64, 72	Hexaplóide		Zhang, 1985
<i>B. chungii</i>	64, 72	Hexaplóide	Sul da China	Zhang, 1985
<i>B. disseimulator</i> var. <i>albinodia</i>	64	Hexaplóide	Sul da China	Zhang, 1985
<i>B. glauca</i>	70		Índia	Ghorai e Sharma, 1981
<i>B. lapídea</i>	52, 64		Sul da China	Zhang, 1985
<i>B. lineata</i>	72	Hexaplóide	Índia	Ghorai e Sharma, 1981
<i>B. multiplex</i>	72	Hexaplóide	Japão	Uchikawa, 1935
<i>B. nana</i>	70	Hexaplóide	Índia	Ghorai e Sharma, 1981
	72		Japão	Yakamura, 1933

<i>B. nutans</i>	72	Hexaplóide	Índia	Ghorai e Sharma, 1981
<i>B. omeienses</i>	70	Hexaplóide	Sul da China	Zhang, 1985
<i>B. pevariabilis</i>	54, 64	Hexaplóide	Sul da China	Zhang, 1985
<i>B. polymorpha</i>	72	Hexaplóide	Myanmar	Jannaki Ammal, 1945
<i>B. rutila</i>	64		Índia	Zhang, 1985
<i>B. siamensis</i>	70	Hexaplóide	Índia	Ghorai e Sharma, 1981
<i>B. sinospinosa</i>	64		Sul da China	Zhang, 1985
<i>B. spinosa</i>	72	Hexaplóide	Índia	Ghorai e Sharma, 1981
<i>B. stenoauritus</i>	68		Sul da China	Zhang, 1985
<i>B. textilis</i>	64	Pentaplóide	Sul da China	Guang-Zhu, 1987
<i>B. tulda</i>	70	Hexaplóide	India	Ghorai e Sharma, 1981
<i>B. variostratus</i>	96, 84		Sul da China	Zhang, 1985
<i>B. ventricosa</i>	72	Hexaplóide	China	Huang et al., 1988
<i>B. vulgaris</i>	74		India	Ghorai e Sharma, 1981
	72	Hexaplóide	India	Sarkar et al., 1977
	72	Hexaplóide	India	Jannaki Ammal, 1945
<i>B. vulgaris</i> var. <i>aureovariegata</i>	72, 66	Hexaplóide	India	Ghorai e Sharma, 1981
<i>B. vulgaris</i> var. <i>constrictinoda</i>	72	Hexaplóide	India	Ghorai e Sharma, 1981

Dendrocalamus

<i>D. brandisii</i>	72, 74	Hexaplóide	Myanmar	Jannaki Ammal, 1945
<i>D. brandisii</i>	72		Índia	Ghori e Sharma, 1980
	72	Hexaplóide	Índia	Sobita Devi e Sharma, 1993
<i>D. giganteus</i>	72		Sri Lanka	Gould e Soderstrom, 1974
	72	Hexaplóide	Myanmar	Jannaki Ammal, 1945
	72		Índia	Ghorai e Sharma, 1980
	72		Índia	Sobita Devi e Sharma, 1993
<i>D. hamiltonii</i>	70	Aneuploidia	Índia	Sobita Devi e Sharma, 1993
<i>D. latiflorus</i>	48		Sul da China	Zhang, 1985
<i>D. longifimbriatus</i>	56	Aneuploidia	Índia	Sobita Devi e Sharma, 1993
<i>D. longispathus</i>	70	Hexaplóide	Índia	Ghorai e Sharma, 1980
	72		Myanmar	Jannaki Ammal, 1945
	48	Aneuploidia	Índia	Sobita Devi e Sharma, 1993
<i>D. membranaceous</i>	72		Índia	Ghorai e Sharma, 1980
	46		Índia	Sobita Devi e Sharma, 1993
<i>D. minor</i>	72	Hexaplóide	Sul da China	Zhang, 1985
<i>D. strictus</i>	72	Hexaplóide		Richhario e Kotwal, 1940
	70		India/Indonesia	Parthasarthy, 1946

Fonte: International Network for Bamboo and Rattan (INBAR)

**Manuscrito a ser enviado para a revista: Genetics and
Molecular Biology (ISSN-0100-8455)**

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES E VARIEDADES DE BAMBU COM POTENCIAL ECONÔMICO NO NORDESTE BRASILEIRO

Janaina Teixeira da Silva ¹, Silmar Gonzaga Molica ¹, Gérman Hugo Gutierrez ² e Reginaldo de Carvalho ³

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciência Florestal, Recife, PE, Brasil.

² Agrimex S.A.

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia/Genética, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Seis espécies, sendo duas variedades botânicas de bambu, pertencentes aos gêneros *Bambusa* Scherb e *Dendrocalamus* Nees, foram analisadas citogeneticamente, quanto ao número cromossômico, estrutura do núcleo interfásico, padrão de condensação profásico, número máximo de nucléolos formados e padrão de bandas heterocromáticas. Os números cromossômicos observados foram $2n=64$ para as espécies *Dendrocalamus giganteus*, *D. strictus*, *D. asper* e *Bambusa tuldoides*, $2n=72$ para *B. vulgaris* var. *vittata* e *B. textilis* e $2n=54$ para *B. vulgaris* var. *vulgaris*, revelando uma variação numérica intraespecífica no gênero *Bambusa*. Os cariótipos apresentaram-se, de um modo geral, assimétricos e o padrão de condensação foi do tipo proximal. Os núcleos interfásicos foram do tipo semi-reticulado e bastantes uniformes entre as espécies analisadas. Em relação à morfologia dos cromossomos, para todas as espécies predominou os tipos metacêntricos e submetacêntricos. Na coloração com nitrato de prata, observou-se a ocorrência de apenas um grande nucléolo ocupando grande parte do núcleo interfásico em todos os materiais analisados. Por outro lado, a coloração com fluorocromos evidenciou a presença de bandas CMA⁺/DAPI⁻ mostrando um número de sinais diferentes entre as espécies analisadas. O número de blocos CMA positivos variou de três a seis, tanto em células metafásicas como em núcleos interfásicos.

Palavras-chaves: Bambu, CMA/DAPI, Poliplóides; Variação Numérica.

INTRODUÇÃO

A família Poaceae é uma das maiores entre as angiospermas. Possui cerca de 10.000 espécies, aproximadamente 651 gêneros e encontra-se dividida em seis subfamílias representadas em diversas regiões fitogeográficas no mundo (Clayton e Renvoize, 1986). A subfamília Bambusoideae destaca-se por conter espécies ocorrentes na floresta tropical estendendo-se até as regiões temperadas (Dahlgren et al., 1985).

As espécies da América ocorrem como variedades herbáceas que são encontradas na Mata Atlântica. Tanto na Ásia quanto na América, espécies de bambus são bastante comuns como componentes típicos da flora. Apresentam variadas aplicações, incluindo alimentação, uso medicinal, artesanato, construção, fabricação de papel, combate à erosão, recuperação ambiental, indústrias de cosméticos, entre outros, devido às suas excelentes características químicas, mecânicas e físicas (Banik, 1988).

No Brasil, as espécies mais conhecidas de bambu são de origem asiática (Beraldo, 2002). Segundo Tomazello-Filho e Azzini (1987), a espécie que apresenta maior área de plantio é a *Bambusa vulgaris*, que se desenvolve, principalmente, na Região Nordeste, onde é utilizada para produção de celulose e papel, nos Estados de Pernambuco, Paraíba e Maranhão. Com ciclo de vida ainda pouco compreendido fica inviável o melhoramento do bambu por polinização artificial, pois muitas espécies de bambus morrem após a primeira e única floração (Ghinkul, 1936). O florescimento também pode ser cíclico, ocorrendo com longos intervalos, onde algumas espécies para estarem fisiologicamente maduras precisam viver de 60 a 120 anos antes de florescer (Filgueiras, 1988; McClure, 1966).

De acordo com estudos feitos por Darlington e Wylie (1955) e Ueda (1960) na subfamília Bambusoideae são raras espécies diplóides, sendo todas consideradas poliplóides de níveis variáveis, com número básico $X=12$, para espécies de porte arbóreo, havendo triplóides, tetraplóides e hexaplóides com $2n=36, 48, 72$, respectivamente. No grupo dos bambus herbáceos o número básico mais comum parece ser $x=11$, embora $x=7, 9, 10$ e 12 também tenham sido relatados (Soderstron, 1981). Em geral, o número total de cromossomos é de 48, 74 ou até 96, decrescendo gradualmente da zona tropical para a zona subtropical, sendo esperado que em regiões frias, assim como em altas latitudes e grandes altitudes $2n$ seja menor que 48 (Guang-Zhu, 1987).

Com base nestas informações o presente trabalho objetivou comparar os cariótipos de sete espécies, sendo duas variedades botânicas, da coleção de bambus da Empresa Agrimex S.A., utilizando métodos de coloração convencional e bandeamento CMA/DAPI com a finalidade de identificar variabilidade cromossômica intra e interrespecífica além dos níveis de ploidia dos acessos.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies e Variedades de Bambu Estudadas

As espécies e variedades estudadas, todas de porte arbóreo, compõem a coleção da Empresa Agrimex, em Goiana – PE: *Bambusa textilis* McClure, *Bambusa tuldoides* Munro, *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*, *Bambusa vulgaris* var. *vittata* Rivière & C. Rivière, *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Becker ex K. Heyne, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro e *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) Nees.

Coleta, Pré-tratamento, Fixação, Digestão Enzimática e Hidrólise

A análise citogenética foi realizada seguindo a metodologia descrita por Guerra e Lopes (2002), com modificações. As pontas das raízes foram pré-tratadas com solução de 8-hidroxiquinoleína (8HQ) a 2 mM, fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético/ 3:1) e estocadas em freezer a -20° C. Em seguida, as raízes foram digeridas com solução enzimática (1% celulase / 10% pectinase), por 3 horas e meia, em uma estufa a 37°C. Então, foram hidrolisadas em HCl 5N, por 2 mim.

Preparação das Lâminas, Coloração Convencional com Giemsa

As células foram maceradas numa gota de ácido acético 45%, sobre lâmina de microscopia e imersa em nitrogênio líquido (gelo seco). Para definição do cariótipo e caracterização cromossômica, as lâminas contendo o tecido vegetal, foram coradas seguindo a metodologia de coloração convencional descrita por Guerra (1983) e Guerra e Lopes (2002). As lâminas foram montadas com uma gota de Entellan (MERK).

Bandeamento CMA e DAPI e Coloração com Nitrato de Prata (AgNO₃)

As metodologias utilizadas para as duas técnicas foram descritas por Guerra e Lopes (2002), com modificações. Após o envelhecimento por três dias, as lâminas receberam 10µL de CMA₃ (cromomicina A - 0,5 mg/ml) por 20 a 30 minutos. Em seguida foram montadas com 10µL de DAPI/glicerol (4'-6'-Diamidino-2-Fenilindol). Envelhecendo por mais três dias em temperatura ambiente e em câmara escura. A observação das lâminas foi feita em

microscópio com filtros de fluorescência (ultravioleta), com comprimento de onda de 360-390 nm para DAPI e de 430-470 nm para CMA₃.

Na análise de nucléolos, uma gota da solução corante de nitrato de prata diluído em água formicada (1:1) foi colocada em cada lâmina, em estufa a 60 °C durante 15 minutos. Então foram montadas com Entellan (MERK) e observadas cerca de 2.000 células para cada espécie.

Documentação Fotográfica e Caracterização Cromossômica

As dez melhores células observadas nas lâminas com coloração convencional e as células mais representativas da coloração com AgNO₃ foram fotografadas em fotomicroscópio Leitz DM, usando filme Fuji Asa 200 ou 100.

Para a coloração com fluorocromos foi utilizado o sistema de fotomicroscopia, que consiste na observação das lâminas em microscópio Leica DMRB com câmera Leica DC 300F acoplada, as imagens foram passadas para o computador através do Programa IM 50. A nomenclatura da morfologia cromossômica seguiu Levan et al. (1964). As classificações de núcleos interfásicos e padrão de condensação seguiram as nomenclaturas propostas por Guerra (1985) e Morawetz e Samuel (1988), respectivamente.

Para que pudessem ser feitas medições e análise cariomorfológica foi utilizado o programa Image Tool - versão 3, ampliando-se as imagens junto com a barra de escala de 10µm.

RESULTADOS

As sete espécies de bambus estudadas no presente trabalho foram consideradas poliplóides e apresentaram variação numérica com os seguintes números cromossômicos: *Dendrocalamus giganteus*, *D. strictus*, *D. asper* e *Bambusa tuldoides* ($2n=64$), *B. vulgaris* var. *vittata* e *B. textilis* ($2n=72$) e *B. vulgaris* var. *vulgaris* ($2n=54$) (Figura 1). Em geral, o número cromossômico mais comum é $2n=72$. Os núcleos interfásicos foram do tipo semi-reticulado e bastante uniforme entre as espécies (Figura 1h). O padrão de condensação cromossômica, observado em prometáfases, foi do tipo proximal, ou seja, condensação inicial nas regiões centroméricas e os telômeros condensando mais tardiamente. A determinação do número exato de satélites foi bastante difícil, pela análise convencional, devido ao pequeno tamanho dos cromossomos e à falta de distensão das RON's em prometáfase e metáfase. Mesmo assim, alguns deles foram visualizados (Figuras 1 e 3d). Os cariótipos mostraram-se assimétricos, com cromossomos variando de 0,81 a 2,26 μm em células prometáfásicas e morfologia cromossômica de metacêntricos a submetacêntricos. Uma clara visualização do nível assimétrico dos cariótipos pode ser detectada em *Bambusa tuldoides* (Figura 2d).

Nas espécies do gênero *Dendrocalamus*, *D. giganteus*, *D. strictus* e *D. asper* não ocorreu variação numérica. As três espécies analisadas apresentaram $2n=64$, com variação apenas no tamanho dos cromossomos, de 0,89 a 2,02 μm , 0,83 a 2,07 μm e 0,75 a 2,03 μm , respectivamente. Em relação aos satélites, as espécies parecem apresentar de três a seis satélites, porém com melhor visualização apenas pela coloração com os fluorocromos.

O gênero *Bambusa* mostrou variação numérica entre as três espécies e também entre as duas variedades analisadas no presente trabalho. *Bambusa tuldooides* apresentou $2n=64$ cromossomos com tamanho variando de 0,81 a 2,25 μm , *B. textilis* e *B. vulgaris* var. *vittata* apresentaram $2n=72$ com tamanhos cromossômicos de 0,88 a 2,05 μm e de 0,89 a 2,26 μm , respectivamente. *B. vulgaris* var. *vulgaris* apresentou $2n=54$, com tamanho cromossômico variando de 0,87 a 2,21 μm . Foram vistos de quatro a seis satélites mas igualmente pouco perceptíveis pela coloração convencional.

A coloração com nitrato de prata revelou apenas um nucléolo por núcleo em todas as espécies estudadas. De cada material foram coradas quatro lâminas pré-tratadas e quatro sem pré-tratamento obtendo-se o mesmo resultado. Não foi possível evidenciar as RON's marcadas e nem quantos cromossomos estavam associados ao nucléolo, mas percebeu-se um volume nucleolar ocupando grande parte do núcleo celular (Figura 1i).

A dupla coloração com fluorocromos CMA e DAPI evidenciou blocos do tipo $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$, na região terminal em cromossomos de todas as espécies analisadas, alguns claramente evidenciando satélites (Figura 3d). Diferenciação em relação ao número de blocos CMA ocorreu de forma interespecífica. Para as espécies de *Bambusa* (Figura 2), *B. tuldooides* apresentou apenas três blocos CMA^+ , dois nas regiões terminais do braço curto de um par cromossômico e um terceiro bloco representando o satélite em heterozigose (Figura 2d). Observou-se nas duas variedades de *B. vulgaris*, var. *vittata* e var. *vulgaris* quatro blocos CMA^+ localizados na posição terminal do braço curto de dois pares cromossômicos (Figuras 2b e 2h). *Bambusa textilis*

foi a única espécie do gênero a apresentar seis marcações positivas para o CMA no braço curto de três de pares de cromossomos (Figura 2f).

As espécies do gênero *Dendrocalamus* apresentaram de três a seis blocos CMA⁺ (Figura 3). Em *D. strictus* e *D. giganteus* somente três blocos CMA positivos foram visualizados. Os satélites se apresentaram claramente destacados nesta segunda espécie (Figura 3d). *D. asper* assim como *B. textilis*, apresentou seis blocos de CMA⁺ em três pares cromossômicos (Figura 3f). Nenhuma banda DAPI⁺ foi revelada. Considerou-se numa análise preliminar, com o uso dos corantes fluorescentes base-específicos (AT/GC), que as espécies analisadas são constituídas por uma pequena quantidade de heterocromatina constitutiva e que esta possui riqueza de pares de base GC.

DISCUSSÃO

Para as espécies de Bambusoideae estudadas, alguns números cromossômicos já haviam sido descritos com exceção para *Dendrocalamus asper* e *Bambusa tuldoides* as quais não tiveram seus números descritos anteriormente. Mesmo tendo a maioria das espécies seus números descritos previamente, ocorreram divergências entre esses registros e os resultados do presente trabalho. Segundo Zhang (1985), por exemplo, *Bambusa textilis* possui número diplóide $2n=64$, porém esta mesma espécie apresentou $2n=72$ no presente trabalho.

Os gêneros *Bambusa* e *Dendrocalamus* (subfamília Bambusoideae) são considerados grupos multibásicos ou polifiléticos. As espécies de porte arbóreo em geral, apresentam os números básicos $x=6$, 8, 9 e 10, embora o número básico mais freqüente seja $x=12$. Todas as espécies arbóreas são

consideradas poliplóides, com níveis de ploidia variáveis. No grupo dos bambus herbáceos o número básico mais freqüente é $x=11$, embora $x=7$, 9, 10 e 12 também tenham sido relatados (Soderstron, 1981). Para Guang-Zhu (1987) o número $x=8$ é derivado do $x=9$ devido a processo de aneuploidia.

O gênero *Dendrocalamus* não apresentou variação cromossômica numérica em suas espécies. *D. giganteus*, *D. strictus* e *D. asper* apresentaram número diplóide $2n=64$. Ao menos para *D. giganteus*, o número encontrado não está de acordo com dados da literatura. Rao et al. (1998) relatou o número $2n=72$ tanto para *D. giganteus* assim como para *Bambusa vulgaris*. *Dendrocalamus strictus* foi descrito por Richharia e Kotwal (1940) como hexaplóide com $2n=72$, no presente trabalho foi observado para esta espécie $2n=64$. Isso sugere um nível octaplóide baseado em $x=8$. *Dendrocalamos asper* apresentou igualmente o número diplóide $2n=64$ e nível octaplóide, não sendo encontrados registros na literatura para esta espécie.

O gênero *Bambusa* apresentou variação numérica inter e intraespecífica. *Bambusa tuldoides* apresentou número diplóide $2n=64$ e igualmente as espécies de *Dendrocalamus*, foi considerada octaplóide baseado em $x=8$. Não foi encontrado registro de número cromossômico para esta espécie na literatura. *Bambusa vulgaris* var. *vittata* e *B. textilis* apresentaram $2n=72$, estavam concordando com o relato de RAO et al. (1998). Esse autor sugere a condição hexaplóide para espécies que apresentam $2n=72$ considerando o número básico $x=12$.

Por outro lado, no caso de *B. textilis*, os dados obtidos no presente trabalho discordaram da descrição de Guang-Zhu (1987) o qual observou $2n=64$, considerando a espécie um pentaplóide baseado em $x=12$, com

ocorrência de aneuploidia, com fórmula cariotípica $[5 \times 12 + 4]$. Em relação ao nível de ploidia, os dados obtidos para *B. vulgaris* var. *vittata* não corroboram com a literatura. Neste trabalho a mesma foi classificada como um provável octaplóide baseado em $x=9$, uma vez que a espécie *B. vulgaris* var. *vulgaris* apresentou $2n=54$ cromossomos sugerindo-se um nível hexaplóide com base em $x=9$.

De acordo com Guang-Zhu (1987), a poliploidia está diretamente relacionada com a localização geográfica das populações, pois o número decresce gradualmente da zona tropical para a zona subtropical, sendo esperado que em regiões frias, assim como em altas latitudes e grandes altitudes o número diplóide $2n$ seja menor que 48.

Makepeace (1981) analisou a espécie *Hieracium pilosella*, originária da Europa, e verificou que as populações locais apresentaram os números $2n=18$, $2n=27$ e $2n=36$, dependendo do tipo de habitat. Populações introduzidas na Nova Zelândia originaram indivíduos pentaplóides com $2n=45$. Similarmente, as espécies analisadas neste trabalho podem ter sofrido poliploidia como resposta genética para melhor adaptação em diferentes habitats.

Observou-se, após análise de dados da literatura, que uma mesma espécie pode apresentar dois ou mais números cromossômicos. Trabalhos relataram erros de contagem devido à ocorrência de constrição secundária proximal distendida como observado por Guerra et al. (1997) em espécies de *Citrus*. Pedrosa et al. (1999) analisaram a espécie *Eugenia malaccensis* e encontraram uma grande constrição do tipo proximal em um dos pares cromossômicos, evidenciando a possibilidade de registro dos satélites como um par cromossômico adicional. Porém, nas espécies de bambus analisadas

os satélites observados são de tamanho muito pequeno e os números registrados de forma errônea são devido ao elevado número e ao difícil espalhamento dos cromossomos.

A localização da constrição secundária em espécies do gênero *Lathyrus*, com ocorrência na América do Sul e do Norte, foi utilizada como fator de diversificação cariotípica. Os satélites das espécies da América do Sul, devido ao seu grande tamanho, foram denominados de macrossatélites, enquanto os satélites das espécies da América do Norte apresentaram-se como microssatélites (Seijo e Fernandez, 2003). De acordo com o tamanho, as constrições secundárias das espécies estudadas no presente trabalho foram do tipo microssatélites.

O número máximo de nucléolos e de região organizadora de nucléolo (RON) podem ser revelados por impregnação por nitrato de prata, evidenciando os sítios de DNA ribossômicos ativos. Apenas um único nucléolo por núcleo foi visto em todas as espécies analisadas, ocupando grande parte do conteúdo nuclear, sugerindo uma associação de todos os cromossomos portadores de RON's na formação do nucléolo único e uma provável super expressão de genes organizadores de nucléolos. Gusmão (2004) encontrou em *Ricinus cummunis* um volume nucleolar representando de 70 a 80% da área nuclear. Sugerindo que a mamona como a espécie conhecida com o maior nível de expressão de genes ribossômicos.

Para os bambus não foi encontrado na literatura, nenhum dado sobre heterocromatina. Porém, no presente trabalho foram visualizados blocos heterocromáticos ricos em GC em todas as espécies analisadas através da técnica diferencial CMA/DAPI.

Nas espécies *B. vulgaris* var. *vittata* ($2n=72$) e para *B. vulgaris* var. *vulgaris* ($2n=54$), com base na coloração com o fluorocromo cromomicina (CMA), observou-se quatro blocos $CMA^+/DAPI^-$ no telômero do braço curto de dois pares cromossômicos. Isso sugere que os blocos heterocromáticos mantiveram-se nas duas variedades, mesmo ao longo do processo de especiação. Em geral, as metáfases com alto grau de condensação apresentaram maior dificuldade para visualização dos blocos heterocromáticos e sua localização nos cromossomos como observado nestas duas variedades.

Como descrito por Vermah e Bahadur (1980), o nível hexaplóide sugerido para as espécies do gênero *Bambusa* com base no número $x=12$, foi observado neste trabalho apenas para a espécie *B. textilis* que apresentou $2n=72$. Esse resultado foi corroborado pelos dados da coloração diferencial com fluorocromos, pela constatação de seis blocos $CMA^+/DAPI^-$ em três pares de cromossomos.

As espécies *Dendrocalamus strictus*, *D. giganteus*, *D. asper* e *Bambusa tuldoides*, com $2n=64$, são possíveis octaplóides com $x=8$ como número básico. *Dendrocalamus strictus* apresentou apenas três blocos CMA_3^+ , porém sem uma evidencia clara de que eram satélites em virtude dos cromossomos não terem sido bem espalhados. Similarmente, *D. giganteus* mostrou três blocos, representando claramente os satélites.

Por outro lado, *D. asper* apresentou resultado semelhante a *B. textilis* com seis blocos CMA^+ e *B. tuldoides* mostrou três blocos CMA positivos. Através desses dados, pôde-se deduzir que essas espécies evoluíram por processo de poliploidização com ocorrência de eliminação de porções heterocromáticas do genoma. Essa eliminação parece não ter ocorrido de

forma uniforme nos dois gêneros, uma vez que *D. asper* e *B. textilis* mostraram um número de marcações com CMA aparentemente estáveis.

A presença de blocos CMA⁺ na região terminal de alguns cromossomos, em geral, está relacionada com as regiões organizadoras dos nucléolos (RON's), conforme observado por Guerra (2000) para a maioria das angiospermas. A coloração diferencial com fluorocromos base-específicos tem se mostrado bastante informativa quanto à caracterização cromossômica de diversas espécies cultivadas. Carvalho *et al.* (2005) e Cornélio *et al.* (2003) analisaram diversas espécies e híbridos do gênero *Citrus* com os fluorocromos CMA e DAPI, distinguindo e caracterizando cada espécie através da localização das regiões heterocromáticas CMA positivas as quais, revelaram um padrão de bandas espécie-específico.

Desse modo, considerando que apesar de poliplóides e de possuírem elevado número cromossômico, as espécies de bambu apresentam pouca quantidade de heterocromatina constitutiva em seus cariótipos com riqueza de pares de base GC. Divergências genéticas, entre espécies, ainda têm que ser estudadas nos bambus, sendo que a diversidade genética intraespecífica é o principal bloco de construção na evolução por especiação (RAO, 2000).

Provavelmente, divergências de número, morfologia cromossômica e de satélites podem ser suficientes para provocar incompatibilidades genético-fisiológicas que ocorrem em eventos pós-zigóticos, a exemplo das dificuldades encontradas para obtenção de híbridos férteis e interseccionais no gênero *Arachis* devido à esterilidade apresentada pela maioria dos descendentes (Stalker, 1997).

A caracterização genética de diferentes acessos de bancos de germoplasma constitui-se em importante fonte de dados para melhoristas, uma vez que permite um melhor gerenciamento do “*pool*” gênico, bem como uma seleção mais eficiente dos recursos genéticos, facilitando a detecção da real variabilidade genética para fins de melhoramento convencional ou com fins biotecnológicos, bem como de conservação (Benko-Iseppon, 2001). Com isso, é relevante ressaltar a existência de lacunas a serem preenchidas, no que diz respeito aos estudos genéticos dos bambus, sendo que novas contribuições podem aumentar a eficácia das estratégias em programas de melhoramento e na taxonomia das espécies.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal Rural de Pernambuco, (UFRPE) pela estrutura física, à CAPES pelo apoio financeiro e à Empresa Agrimex S.A., pela disponibilização das espécies/variedades analisadas no presente trabalho.

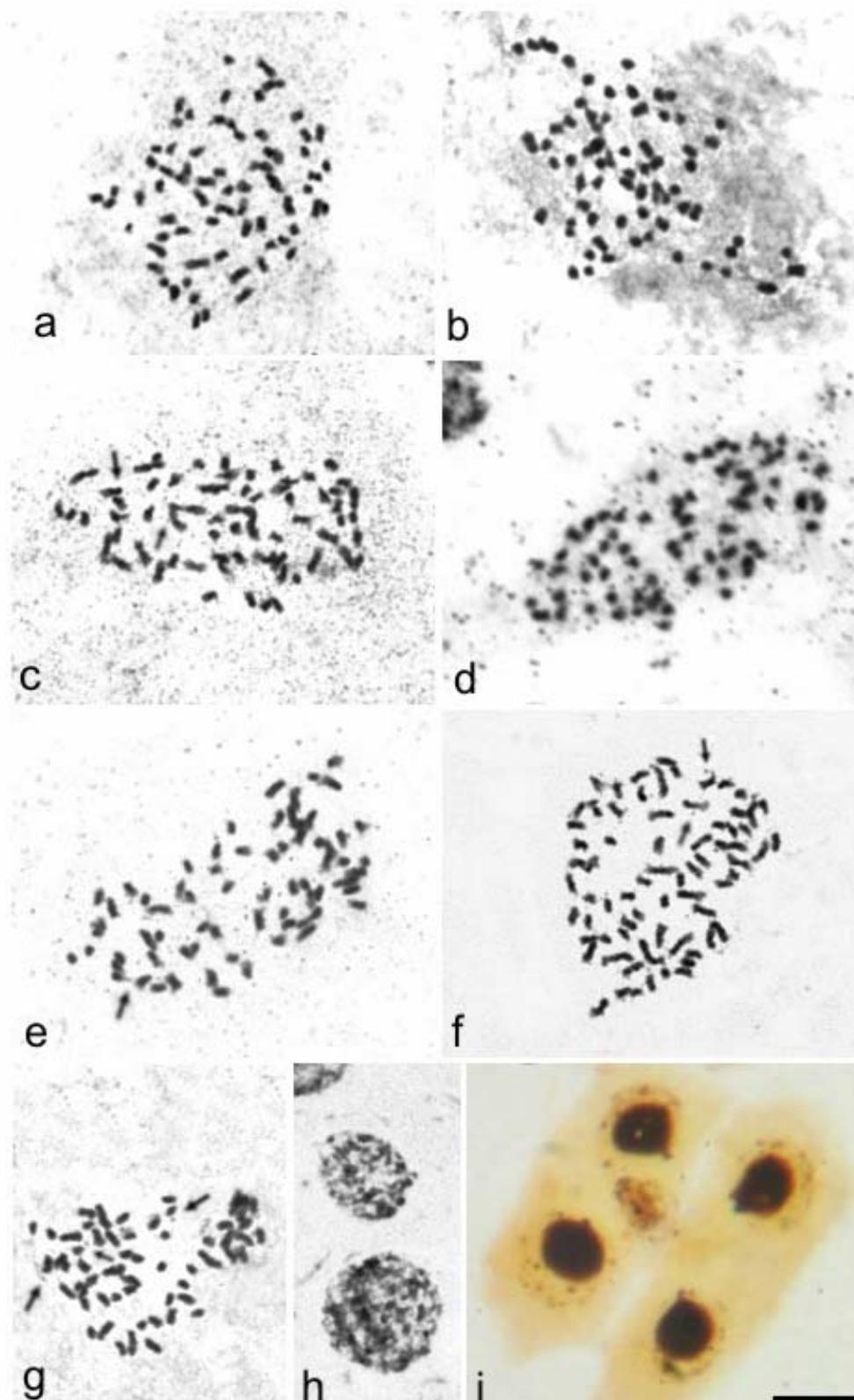


Figura 1. Metáfases coradas com Giemsa. (a) *Dendrocalamus asper*, $2n=64$; (b) *D. giganteus*, $2n=64$; (c) *D. strictus*, $2n=64$; (d) *Bambusa textillis*, $2n=72$; (e) *B. tuldooides*, $2n=64$; (f) *B. vulgaris* var. *vittata*, $2n=72$ e (g) *B. vulgaris* var. *vulgaris*, $2n=54$. Em (h) núcleos interfásicos do tipo semi-reticulado e (i) coloração com Nitrato de Prata mostrando um nucléolo por núcleo. Setas apontam prováveis

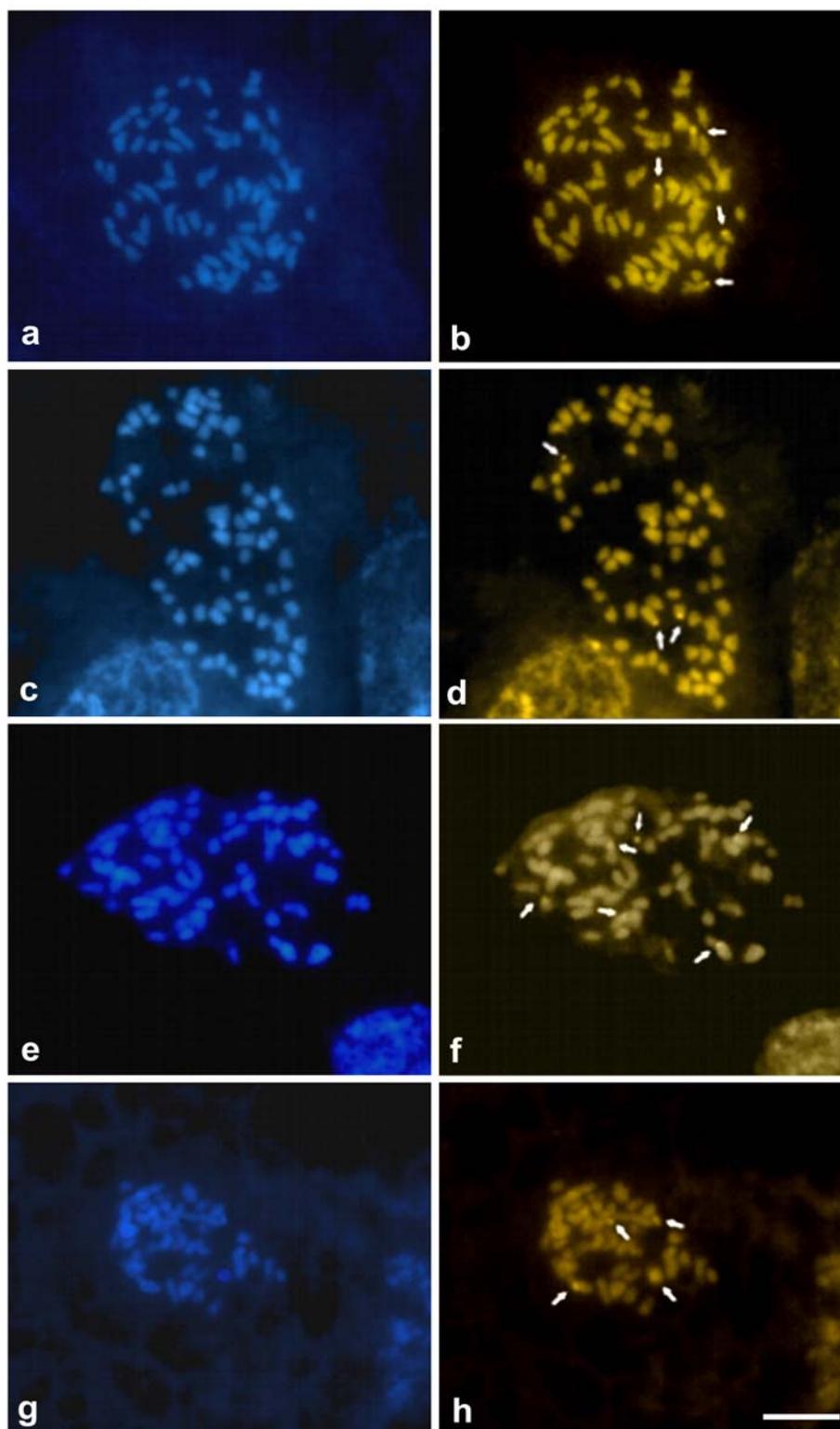


Figura 2. Coloração com fluorocromos DAPI (a, c, e, g) e CMA (b, d, f, h) em cromossomos de *Bambusa*. *B. vulgaris* var. *vittata* (a, b); *B. vulgaris* var. *vulgaris* (g, h) mostrando quatro blocos CMA⁺; *B. tuldooides* (c, d) evidenciando três blocos CMA⁺; *B. textillis* (e, f) com seis blocos corados com CMA. Setas apontam blocos de CMA⁺. Barra corresponde a 10µm.

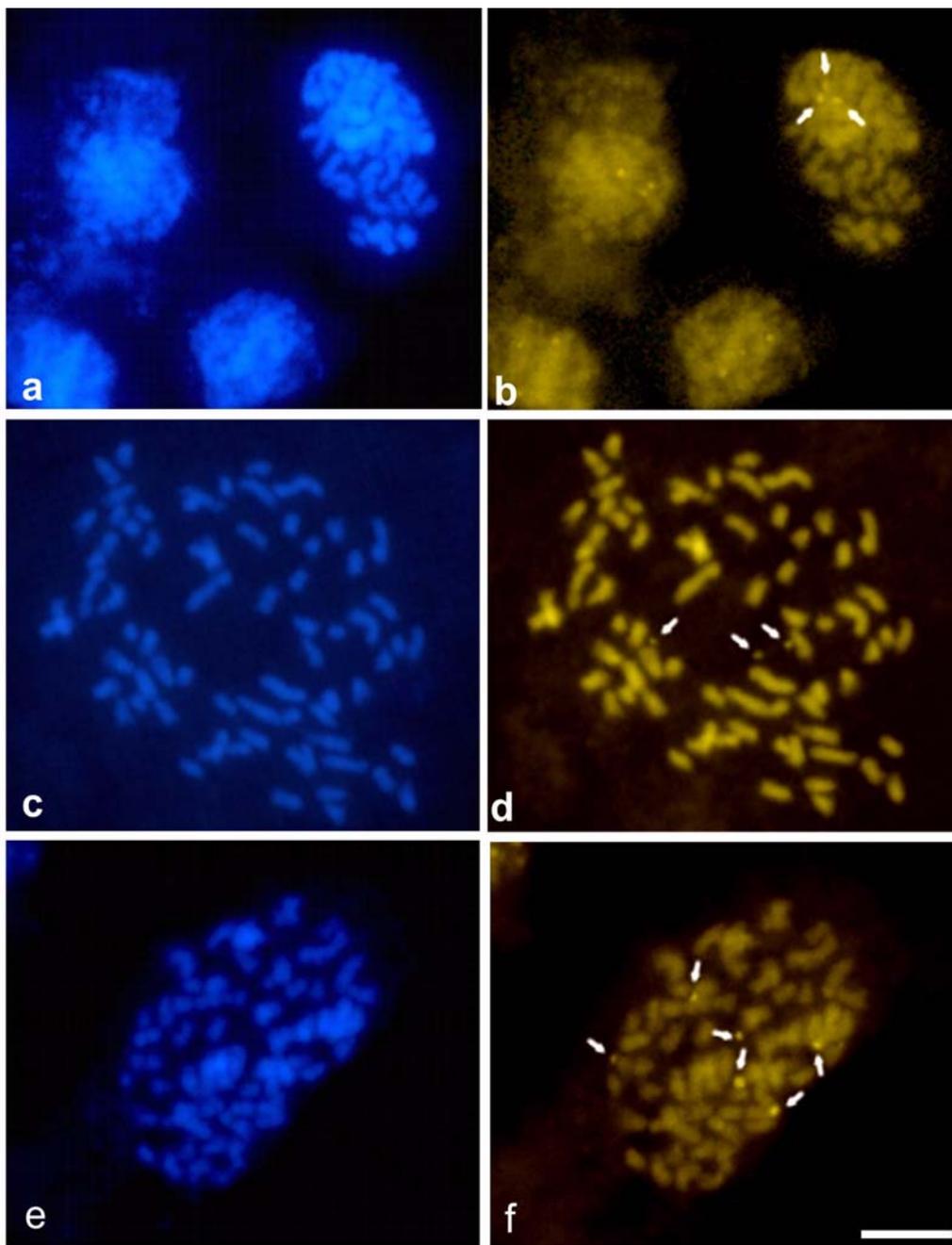


Figura 3. Coloração com fluorocromos DAPI (a, c, e) e CMA (b, d, f). *Dendrocalamus strictus* (a, b) e *D. giganteus* (c, d), ambas com três blocos CMA⁺, sendo três satélites na espécie *D. giganteus*. *D. asper* (e, f) mostrando seis blocos CMA⁺, dois blocos pequenos, dois blocos maiores e dois satélites evidenciados. Setas indicando blocos de CMA⁺ e satélites. Barra corresponde a 10µm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANIK RL (1988) Investigation on the culms production and clump expansion behavior of five bamboo species of Bangladesh. *Indian Forester*. 102: (9)576-583.

BENKO-ISEPPON AM (2001) Estudos moleculares e citogenéticos no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e Perspectiva. *Anais da V Reunião Nacional do Caupi – V RENAC-EMBRAPA*, Teresina 327-332 pp.

BERALDO AL (2002) Os mais variados usos de bambus, estudados e testados na Faculdade de Engenharia Agrícola da Unicamp. *Revista de Pesquisa FAPESP*, 81:13-14.

CARVALHO R, GUERRA M, VIDAL ACB and SOARES-FILHO WS (2005) The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenetic Genome Research* 109:276-282.

CLAYTON WD and RENVOIZE SA (1986) *Genera graminum*. Royal Botanic Garden, London, 389pp.

CORNÉLIO MTM, CARVALHO R, FIGUEIRÔA ARS, SANTOS KGB, SOARES-FILHO WS and GUERRA M. (2003) Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Systematic And Evolution*, Austria, 240:149-161.

DAHLGREN RM, CLIFFORD HT and YEO PF (1985) *The families of the monocotyledons - Structure, evolution and taxonomy*. Springer-Verlag, New York, 520pp.

DARLINGTON CD and WYLIE A P (1955) *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. 2nd edition. George Allen & Unwin Ltd., London, _pp.

FILGUEIRAS TS (1988) Bambus nativos do Distrito Federal, Brasil (Gramineae:Bambusoideae). *Revista Brasileira de Botânica* 11:47-66.

GHINKUL SG (1936) Mass blossoming of bamboo in the light of phasic development theory. *Soviet Subtropics* 10(26):24-29.

GUANG-ZHU Z (1987) Studies on the chromosome number of some bamboo species with clump rhizomes. *Guangdong Forestry Institute* (-):175-178.

GUERRA M (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetic and Molecular Biology* 23(4):1029-1041.

GUERRA M (1985) Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas. *Sociedade Brasileira de Genética* (-):137-153.

GUERRA M (1983) O uso Giemsa na citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura* 35:190-193.

GUERRA M and LOPES MJS (2002) Como observar cromossomos - Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. 1st edition FUNPEC, Ribeirão Preto, 131 pp.

GUERRA M, PEDROSA A, SILVA AEB, CORNÉLIO MTM, SANTOS K and SOARES-FILHO WS (1997) Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of *Citrus* germoplasm bank. *Genetic and Molecular Biology* 20:489-496.

GUSMÃO CLS (2004) Citogenética da família Euphorbiaceae do Nordeste brasileiro. 97f.

International Network for Bamboo and Rattan (INBAR)

<http://www.inbar.org> (June 20, 2006)

LEVAN A, FREDGA K and SANDBERG AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.

MAKEPEACE W (1981) Polymorphism and the chromosomal number of *Hieracium pilosella* L. in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 19:255-257.

MCCLURE FA (1966) The bamboos: a fresh perspective. University Press, Harvard, 347 pp.

Missouri Botanical Garden

<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html> (October 26, 2006).

MORAWETZ W and SAMUEL MRA (1988) Karyological patterns in the Hamamelidae. In: CRANE P and BLACKMORE S (eds) Evolution, systematics and fossil history of the *Hamamelidae* (-) edition. Clarendon Press, Oxford, pp 129-154.

PEDROSA A, GITAÍ J, SILVA AEB, FÉLIX LP and GUERRA M (1999) Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – V. Acta Botânica Brasílica 13(1):49-60.

RAO AN (2000) Genetic diversity of woody bamboos – Their conservation and improvement.

<http://w.w.w.ipgri.egiar.org/Publications/HTMLPublications> (October 26, 2000).

RAO AN, RAMANATH R and WILLIAMS JT (1998) Priority species of bamboo e rattan. IPGRI e INBAR, 116pp.

SEIJO JG and FERNANDEZ A (2003) Karyotype analysis and chromosome evolution in South American species of *Lathyrus* (Leguminosae). American Journal of Botanic 90(7):380-387.

SODERSTROM TR (1981) Some Evolutionary Trends in the Bambusoideae (Poaceae). Annals of the Missouri Botanical Garden 68(1):15-47.

STALKER HT (1997) Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Field Crops Research 53:205-217.

TOMAZELLO-FILHO M and AZZINI A (1987) Estrutura anatômica, dimensões das fibras e densidade básica de colmos de *Bambusa Vulgaris* Schrad. IPEF, 36:43-50.

UEDA K (1960) Studies on the physiology of bamboo with reference to practical application. The Kyoto University Forest 30:167-168.

VERMAH JC and BAHADUR KN (1980) Bamboo research in Asia. International Development Research Centre (-):19-46.

ZHANG XZ (1985) Study on chromosome numbers of clustered bamboo. Guangdong Linze Keji 4:16-21.

5. APÊNDICE

SUBMISSION OF PAPERS (GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY)

1. Manuscripts should be submitted to:

Angela M. Vianna-Morgante, Editor-in-Chief
Genetics and Molecular Biology
Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 Ribeirão Preto, SP - Brasil

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

a) A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere.

b) A copy of the manuscript, including original figures.

c) A copy of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.

d) A copy of the text, tables and figures. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h). Mailed disks must be labeled with the first author's last name, platform and software. (See detailed instructions below). Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution, and manuscripts may be returned before being reviewed.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. *Text citation s*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use "et al.". List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: FreireMaia et al., 1966a, 1966b, 2000; Frota-Pessoa et al., 1994). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name ("et al" should not be used). *Number s*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. *Binomial Name s*: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the reference section.

The text includes the following elements:

Introduction – Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by

references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. Use standard abbreviations for journal titles.

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted to a publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eye-lid-less microteiid lizard radiation: The X 1X 1X 2X 2:X 1X 2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophtalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:103-120.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From Cytogenetics to Molecular Genetics. In Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd.ed. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample Electronic Article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD, Van Dyke T (2004) pRb Inactivation in Mammary Cells Reveals Common Mechanisms for Tumor Initiation and Progression in Divergent Epithelia. *Plos Biol* 2: 194-205. <http://www.plosbiology.org> .

f) Internet Resources Section

This section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. When databases are cited, date of consultation must be stated.

Sample Internet Resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM),

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

LEM Software,

http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm

g) Tables each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

h) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. A set of original illustrations of the highest quality must be provided in glossy paper. If you have created figures electronically submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600–1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

i) Nomenclature should adhere to current international standards.

j) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

k) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

3.2 Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type,

including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews: publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs: Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

5. Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.