



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**JOSÉ ACHILLES DE LIMA NEVES**

**Caracterização citogenética de representantes de *Asparagaceae s.l.* com ênfase nas subfamílias *Agavoideae* Herb., *Lomandroideae* Thorne & Reveal e *Nolinoideae* Burnett**

**Areia  
2023**

**JOSÉ ACHILLES DE LIMA NEVES**

**Caracterização citogenética de representantes de *Asparagaceae s.l.* com ênfase nas subfamílias *Agavoideae* Herb., *Lomandroideae* Thorne & Reveal e *Nolinoideae* Burnett**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Ecologia Vegetal e Meio Ambiente.

**Orientador:** Prof. Dr. LEONARDO PESSOA FELIX

**Co-orientadora:** Profa. Dra. ANA EMÍLIA BARROS E SILVA

**Areia  
2023**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

N518c Neves, Jose Achilles de Lima.

Caracterização citogenética de representantes de Asparagaceae s.l. com ênfase nas subfamílias Agavoideae Herb., Lomandroideae Thorne & Reveal e Nolinoideae Burnett / Jose Achilles de Lima Neves. -  
Areia:UFPB/CCA, 2023.

81 f. : il.

Orientação: Leonardo Pessoa Felix.  
Coorientação: Ana Emília Barros e Silva.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Agronomia. 2. Asparagaceae. 3. Bimodalidade. 4. Displóidias. 5. Poliploidia. I. Felix, Leonardo Pessoa. II. Barros e Silva, Ana Emília. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 631/635(043.3)

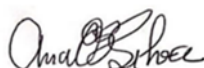
JOSÉ ACHILLES DE LIMA NEVES

**Caracterização citogenética de representantes de Asparagaceae s.l.  
com ênfase nas subfamílias Agavoideae Herb., Lomandroideae Thorne &  
Reveal e Nolinoideae Burnett**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Ecologia Vegetal e Meio Ambiente.

Aprovado em: 21/07/2014.

**Banca Examinadora**



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Emília Barros e Silva (Co-orientadora)  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



---

Prof. Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)



---

Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rego  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

*A Mainha,  
Rosilda Cardoso de Lima Neves,  
puro e maior sabor perdido da minha vida.*

***Dedico.***

## **Agradecimentos**

Ao Deus Pai todo poderoso, criador de toda existência na terra, pelo dom da minha vida e, por me dar a graça de pensar e agir em busca desta emancipação.

A Nossa Senhora da Conceição por interceder sempre por mim ao seu Filho, Jesus Cristo, e agora principalmente, por estar mais presente em minha vida preenchendo o vazio do regaço materno da minha vida.

Aos meus pais, Rosilda Cardoso e Sebastião de Souza, que desde o saber da minha existência fizeram e fazem todos os esforços e renúncias necessárias em minha causa. E aos meus irmãos Kleyton e Karolyne por me ensinar a ser uma pessoa melhor através da convivência, e pelo amor silencioso.

A minha esposa, Verônica Remígio, pela compreensão e estímulo através dos amparos em minhas quedas pelo caminho. Mais uma vez transcrevo este verso: “Eu preciso tanto de você, o seu amor é o que me faz crescer. E conhece como a própria mão, cada medo do meu coração”.

Ao meu orientador, Professor Leonardo Pessoa Felix, pela enorme contribuição nesta etapa de minha vida, pelos ensinamentos e, principalmente, pelo exemplo de ser humano que é, tornando-se exemplo para mim de “Pessoa” e profissional.

A minha, “mãe científica”, co-orientadora Ana Emília, também pelos ensinamentos e, principalmente, pelos momentos de escuta e sábios conselhos dados para minha vida. Sendo um ser muito importante na minha formação, justamente pela história de vida que diz que é possível se contarmos com força e perseverança.

Ao Professor Marcelo Guerra por permitir o uso de toda infraestrutura do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Vegetal – UFPE para realização deste trabalho, como também pelo fornecimento das sondas de DNAr.

A Enoque Medeiros pela ajuda incomensurável na confecção das pranchas deste trabalho, contribuindo para um melhor entendimento deste através de suas habilidades computacionais.

Aos meus amigos e minhas amigas de datas passadas que concorreram nesta etapa a Ana Cristina, Carlo, Cacau, Camila, Cassiana, Clarinha, Jaíse, Milene, Pedro, Rominho e Wanessa da Juventude Franciscana (JUFRA). E a Denízia Ribeiro, Eliane Agostinho, Jobson Targino e Robério de Oliveira, amigos que mesmo na distância tornam-se presentes.

Aos meus novos amigos e colegas pela convivência durante esta jornada de aprendizado e ensinamentos: Bruno César, Angeline Santos, Sarah Paz (B\_aS), Alex Willian, Claudio Montenegro, Emmanuely Calina, Enoque Medeiros, Erton de Mendonça, Felipe Nollet, Irenice Gomes, Jéssica Nascimento, Joel Maciel, Juliana Castro, Lania Isis, Maria Clara Lobo, Manoel Felix, Saulo Alves e Sócrates Carneiro. Citogeneticistas da nova era do Laboratório de Citogenética de Areia (CitoAreia).

Ao Instituto Nacional do Semiárido (INSA) pela disponibilidade de seus equipamentos para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias (CCA), Departamento de Fitotecnia e Ciências Ambientais, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por permitir o uso de suas dependências.

E a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa.

## *Epígrafe*

*Há criaturas como a cana: mesmo postas  
na moenda, esmagadas de todo, reduzidas a  
bagaço, só sabem dar doçura.*

*Dom Hélder Câmara*



## RESUMO

Asparagaceae *s.l.* é citologicamente caracterizada pela ocorrência de cariótipos bimodais e evolução por poliploidia. Este trabalho objetivou analisar a variabilidade cariotípica em representantes de três subfamílias de Asparagaceae e suas implicações taxonômicas, através do emprego de técnicas de coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, seguida pela hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 5S e 45S. Todas as 14 espécies analisadas apresentaram cariótipos bimodais ou levemente bimodais, constituídos por cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e/ou acrocêntricos. Os números cromossômicos variaram de  $2n = 38$  em *Cordyline fruticosa* a  $2n = \text{ca. } 180$  em *Agave decipiens*. O tamanho cromossômico médio variou de  $0,38 \mu\text{m}$  em *Furcraea foetida* a  $3,76 \mu\text{m}$  em *Furcraea selloa*. Das oito espécies analisadas da subfamília Agavoideae cinco (*Agave angustifolia*, *Furcraea foetida*, *F. gigantea*, *F. selloa* e *Yucca aloifolia*) apresentaram cariótipos formados por 60 cromossomos, sendo 10 grandes (*l*) e 50 pequenos a medianos (*s*), todas com bandas CMA<sup>+</sup> intersticiais, com dois a quatro sítios de DNAr 45S e 5S. Dentre as cinco espécies analisadas da subfamília Nolinoideae, quatro apresentaram  $2n = 40$  ( $8l + 32s$ ) e uma *Sansevieria cylindrica*  $2n = 120$  ( $24l + 96s$ ), todas com bandas CMA<sup>+</sup> pericentroméricas e dois sítios de DNAr 45S e 5S por complemento diploide. As dificuldades encontradas para compreender as relações filogenéticas entre Agavoideae, Nolinoideae e Lomandroideae podem está relacionadas ao fato de as mesmas compartilharem em parte o mesmo genoma ancestral. Como também terem sofrido, de forma independente, diferentes alterações e rearranjos nos seus genomas. Esses dois fatores seriam responsáveis tanto pelas semelhanças quanto pelas diferenças, respectivamente. Isto pode ser perceptível a nível morfológico e a nível genético, o que dificulta a delimitação taxonômica desses grupos.

**Palavras-chave:** Asparagaceae; bimodalidade; disploidias; poliploidia; variabilidade cariotípica.

## ABSTRACT

Asparagaceae *s.l.* it is cytologically characterized by the occurrence of bimodal karyotypes and evolution by polyploidy. This work aimed to analyze the karyotypic variability in representatives of three subfamilies of Asparagaceae and its taxonomic implications, using staining techniques with the fluorochromes CMA and DAPI, followed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with 5S and 45S rDNA probes. All 14 analyzed species showed bimodal or slightly bimodal karyotypes, consisting of metacentric, submetacentric and/or acrocentric chromosomes. Chromosome numbers ranged from  $2n = 38$  in *Cordyline fruticosa* to  $2n = ca. 180$  in *Agave decipiens*. The mean chromosome size ranged from  $0.38 \mu\text{m}$  in *Furcraea foetida* to  $3.76 \mu\text{m}$  in *Furcraea selloa*. Of the eight analyzed species of the Agavoideae subfamily, five (*Agave angustifolia*, *Furcraea foetida*, *F. gigantea*, *F. selloa* and *Yucca aloifolia*) presented karyotypes formed by 60 chromosomes, 10 large (*l*) and 50 small to medium (*s*), all with interstitial CMA<sup>+</sup> bands, with two to four 45S and 5S rDNA sites. Among the five analyzed species of the subfamily Nolinoideae, four presented  $2n = 40$  ( $8l + 32s$ ) and one *Sansevieria cylindrica*  $2n = 120$  ( $24l + 96s$ ), all with pericentromeric CMA<sup>+</sup> bands and two 45S and 5S rDNA sites per diploid complement. The difficulties encountered in understanding the phylogenetic relationships between Agavoideae, Nolinoideae and Lomandroideae may be related to the fact that they partly share the same ancestral genome. As well as having independently undergone different alterations and rearrangements in their genomes. These two factors would be responsible for both the similarities and the differences, respectively. This can be perceptible at the morphological and genetic level, which makes the taxonomic delimitation of these groups difficult.

**Keywords:** Asparagaceae; bimodality; dysploidy; karyotypic variability; polyploidy.

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Metáfases de *Dracaena* e *Sansevieria* coradas com CMA (amarelo) e DAPI (azul) e hibridizadas *in situ* com sondas de DNAr 45S (verde) e de DNAr 5S (vermelho). a-b. *Dracaena aubryana* ( $2n = 40$ ); c. *D. fragans* ( $2n = 40$ ); d. *D. braunii* ( $2n = 40$ ); e-f. *Sansevieria trifasciata* ( $2n = 40$ ) Setas em "a, c, d, e" indicam cromossomos do conjunto maior *l* (*larger*). Barra em "f" corresponde a  $10\mu\text{m}$ .....67
- Figura 2:** Metáfases de *Sansevieria cylindrica* ( $2n = 120$ , a-b) e *Cordyline fruticosa* ( $2n = 38$ , c) coradas com CMA (amarelo) e DAPI (azul) e hibridizadas *in situ* com sondas de DNAr 45S (verde) e de DNAr 5S (vermelho). Setas em "c" indicam cromossomos do conjunto maior *l* (*larger*). Barra em "b e c" corresponde a  $10\mu\text{m}$ .....68
- Figura 3:** Metáfases de Agave coradas com CMA (amarelo) e DAPI (azul) e hibridizadas *in situ* com sondas de DNAr 45S (verde) e de DNAr 5S (vermelho). *Agave angustifolia* ( $2n = 60$ , a-b); *A. wocomahi* ( $2n = 120$ , c-d); e. *A. americana* ( $2n = 120$ ); f. *A. decipiens* ( $2n = \text{ca. } 180$ ). Barra em "f" corresponde a  $10\mu\text{m}$ . Células incompletas de *Agave angustifolia* e *A. wocomahi* b e d.....69
- Figura 4:** Metáfases de *Furcraea* e *Yucca* coradas com CMA (amarelo) e DAPI (azul) e hibridizadas *in situ* com sondas de DNAr 45S (verde) e de DNAr 5S - (vermelho). a. *Furcraea foetida* ( $2n = 60$ ); b. *F. gigantea* ( $2n = 60$ ); c-d. *F. selloa* ( $2n = 60$ ); e-f. *Yucca aloifolia* ( $2n = 60$ ). Barra em "f" corresponde a  $10\mu\text{m}$ . Célula incompleta de *Furcraea selloa* em d.....70
- Figura 5:** Representação esquemática dos cariótipos de Agavoideae, Lomandroideae e Nolinoideae. Indicando os principais eventos, provavelmente, envolvidos na diversificação cromossômica do grupo.....71

## Lista de tabelas

**Tabela 1:** Números cromossômicos das subfamílias Agavoideae, Lomandroideae e Nolinoideae (Asparagaceae).....20

**Manuscrito I: Caracterização Citogenética de Representantes de Asparagaceae s.l. com Ênfase nas Subfamílias Agavoideae, Lomandroideae e Nolinoideae**

**Tabela 1:** Espécies das subfamílias de Asparagaceae, com seus respectivos locais de coleta, número cromossômico diplóide ( $2n$ ), fórmula de bimodalidade, dada por  $2n = l + s$  (*large e small*), número de bandas heterocromáticas (CMA/DAPI) e sítios de DNAr 45S e 5S. Abreviações: i = intersticial; pe = pericentromérica.....72

## **Anexos**

<b>Anexo:</b> Normas da revista <i>Cytogenetic and Genome Research</i> .....	74
--	----

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
<b>2.1 Agavoideae</b> .....	14
2.1.1 Características morfológicas gerais.....	14
2.1.2 Considerações filogenéticas e taxonômicas.....	15
2.1.3 Origem e distribuição.....	17
2.1.4 Importância econômica.....	17
<b>2.2 Citogenética de Asparagaceae</b> .....	17
<b>2.3 Bandeamentos cromossômicos CMA<sub>3</sub>/DAPI</b> .....	34
<b>2.4 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)</b> .....	36
<b>2.5 Mecanismos de evolução cariotípica</b> .....	37
<b>3. Referências</b> .....	40
<b>4. Manuscrito I: Caracterização Citogenética de Representantes de Asparagaceae s.l. com Ênfase nas Subfamílias Agavoideae, Lomandroideae e Nolinoideae</b> .....	51
Resumo.....	52
Abstract.....	52
Introdução.....	53
Material e Métodos.....	55
Resultados.....	56
Discussão.....	58
Referências.....	61

## 1. INTRODUÇÃO

A família Asparagaceae Juss. apresenta distribuição cosmopolita, com cerca de 2500 espécies, distribuídas em 120 gêneros. Atualmente, a família é formada por sete subfamílias: Aphyllanthoideae Lindl., Asparagoideae Burmeist., Brodiaeoideae Traub, Lomandroideae Thorne e Reveal, Nolinoideae Burnett, Scilloideae Burnett e Agavoideae Herb. (APG III, 2009; Chase et al., 2009). Esta última, e foco deste trabalho, tem como maior centro de diversidade o México (Souza e Lorenzi, 2012). No Brasil, Agavoideae apresenta 15 espécies e 5 gêneros endêmicos (Pirani e Lopes, 2013; Souza e Lorenzi, 2012). Apresentam folhas alternas espiraladas ou então dísticas, dificilmente opostas, nervuras paralelas (paralelinérveas), às vezes suculentas e fibrosas ou escariosas e escamiformes, com flores vistosas, que são bissexuadas ou unissexuadas, e inflorescência do tipo cimosa ou racemosa. A subfamília antes também era formada por algumas espécies circunscritas atualmente nas subfamílias Nolinoideae e Lomandroideae (Dahlgren et al., 1985 apud Eguiarte, 1995). Taxonomicamente é bastante controversa devido aos vários sistemas de classificação existentes (Cronquist, 1981; Dahlgren e Clifford, 1982; Yeo, 1985). Várias espécies de Agavoideae apresentam importância econômica como ornamentais, sendo também utilizadas na alimentação como, por exemplo, o gênero *Agave* (Souza e Lorenzi, 2012).

Citologicamente, Agavoideae é pouco estudada, apenas com registros de contagens cromossômicas, mais especificamente das espécies do Velho Mundo, com a utilização de técnicas convencionais. Algumas espécies da ordem Asparagales Bromhead são caracterizadas por apresentar cariótipos bimodais, apresentando dois conjuntos cromossômicos de macro e microcromossomos (Pires et al., 2006). Análises citogenéticas por meio de técnicas de coloração convencional em *Agave angustifolia* Haw., *A. aktites* Gentry, *A. tequilana* Weber e *Hyacinthus orientalis* L. sugerem a existência de variações cromossômicas numéricas e estruturais ocorrentes na família (Palomino et al., 2010; Moreno-Salazar et al., 2007; Palomino et al., 2003; Yoshida et al., 1976). Variações cromossômicas podem produzir cariótipos diferentes entre indivíduos da mesma espécie, entre indivíduos da mesma população ou entre populações da mesma espécie, podendo essas variações ser programadas geneticamente ou não (Guerra, 1988). Variações por poliploidias e disploidias possuem importante papel evolutivo nas espécies vegetais por produzirem uma série de variações interespecíficas e intraespecíficas (Saúl et al., 2010; Patil e Pai, 2011). O uso de dados citogenéticos (variações numéricas, morfológicas, comportamento meiótico e conteúdo de DNA) nas análises taxonômicas revelou-se como importante instrumento na compreensão

das relações de parentescos entre os táxons, uma vez que o cariótipo é praticamente insensível às variações ambientais ou fisiológicas (Guerra, 1988).

Divergências taxonômicas podem ter respostas no entendimento das variações cromossômicas numéricas ou estruturais, bem como, através do conhecimento dos cariótipos das espécies analisadas (Guerra, 2008). Estas análises consistem, por exemplo, na identificação dos padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva em diferentes espécies e mapeamento físico dos sítios de DNA ribossomais utilizando coloração diferencial, como bandeamento cromossômico com CMA/DAPI, e hibridização *in situ* fluorescente (FISH), respectivamente. A detecção da ocorrência e da posição física de diferentes famílias de DNA altamente repetitivo, geralmente blocos de heterocromatina, implica na melhor compreensão de como os genomas estão organizados; das relações entre espécies, gêneros e famílias, bem como dos mecanismos de ajustes genéticos que ocorrem nos cariótipos de diferentes organismos durante o processo evolutivo (Souza et al., 2008; Soares-Scott, 1998). Assim, estas técnicas têm sido utilizadas não apenas na caracterização do cariótipo, mas como caráter distintivo nas delimitações das espécies filogeneticamente.

Este trabalho teve por objetivo a caracterização citogenética de representantes da família Asparagaceae, através da identificação da constituição e distribuição da heterocromatina constitutiva em diferentes gêneros, utilizando o bandeamento com os fluorocromos CMA e DAPI; e localização da distribuição das sequências de DNAr 5S e 45S pela técnica de FISH nas espécies analisadas.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Agavoideae**

#### **2.1.1 Características morfológicas**

A subfamília Agavoideae é constituída por monocotiledôneas de hábito arborecente ou herbáceo. São espécies acaulescentes, bulbosas e rizomatosas com crescimento simpodial, algumas apresentam crescimento secundário atípico, com folhas em espiral dispostas em roseta (Judd et al., 2007). São caracterizadas por apresentarem uma das maiores inflorescências (paniculadas, espigas ou racemos) centrais conhecidas no reino vegetal (Gentry, 1982), com flores são actinomorfas ou ligeiramente zigomorfas, com perianto livre



ou unido, e ovário súpero (*Yucca*, *Phormium*) ou ínfero (*Agave*, *Furcraea*, *Doryanthes*, *Polianthes*) (Bogler e Simpson, 1995). Apresentam anteras bitecas, com grãos de pólen monosulcados a tricotomonosulcado, microsporogênese do tipo sucessiva, gineceu tricárpico, trilocular, óvulos anátropos, bitegmentados e crassinucelados com nectários septais. Ainda de acordo com o mesmo autor essas espécies possuem frutos do tipo baga ou cápsula, deiscentes ou indeiscentes (Verhoek, 1998).

Os representantes de Agavoideae apresentam plantas hermafroditas, dióicas ou monóicas, flores vistosas com nectários e as flores femininas apresentam estaminódios (Verhoek, 1998). A reprodução frequentemente ocorre por desenvolvimento de bulbilhos a partir das inflorescências e propagação vegetativa. Além da reprodução assexuada há polinização zoófila com dependência de polinizadores espécie-específicas (Smith et al., 2008). Vale a pena destacar que os membros da subfamília Agavoideae se reproduzem apenas uma única vez e em seguida morrem (Good-Avila et al., 2006).

### 2.1.2. Considerações filogenéticas e taxonômicas

A subfamília Agavoideae não possui consenso em diferentes sistemas de classificação (Cronquist, 1981; Dahlgren e Clifford, 1982; Yeo, 1985). Trabalhos mais recentes sugerem que os táxons que compõem a família Asparagaceae podem ser reconhecidos como grupos que compreendem famílias distintas (Souza e Lorenzi, 2012).

Muitas das divergências entre taxonomistas partem dos parâmetros taxonômicos utilizados. A posição do ovário, por exemplo, coloca todos os representantes da subfamília Agavoideae com ovário súpero na família Liliaceae, bem como, seus representantes de ovário ínfero na família Amaryllidaceae (Bentham e Hooker, 1983). O tipo de inflorescência e organização das folhas em rosetas e pontiagudas no ápice também tem sido utilizado como caráter distintivo para unir alguns gêneros desta família, formando uma única família referida como Agavaceae (Patil e Pai, 2011). Para maior confiabilidade na circunscrição do grupo também empregaram dados cariotípicos (Cronquist, 1968). Muitos sistemas taxonômicos foram feitos chegando a ter elementos problemáticos como, por exemplo, sementes cobertas por fitomelano e posição do ovário (Traub, 1975). A partir do sistema de Hutchinson (1973), os gêneros antes separados, foram reunidos em uma única família, Agavaceae, formada por seis tribos: Yuccaeae, Dracaeneae, Phormieae, Nolineae, Agaveae e Polyanteae. Evidências ecológicas apontam o surgimento da família Agavaceae a partir das Liliáceas tendo divergido

no Eoceno (Gibbs, 1974). Esta ideia é baseada fortemente no desenvolvimento do hábito arborecente, distribuição em regiões semiáridas e frias, aquisição de reprodução por apomixia, bimodalidade dos cariótipos e surgimento, em algumas espécies, de ovário inferior (Eguiarte, 1995; Patil e Pai, 2011). Posteriormente, alguns gêneros pertencentes a Agavaceae, foram reconhecidos como táxons que diferiam morfologicamente do restante da família (Dahlgren et al., 1977). Assim os gêneros *Sansevieria* e *Dracaena* constituíram a família Dracaenaceae, enquanto *Cordyline* foi transferido para a família Asteliaceae (Dahlgren e Clifford 1982; Dahlgren, 1985).

O sistema APG II (2003) permitiu duas opções quanto à circunscrição da família: Asparagaceae "*sensu lato*", que combina sete famílias reconhecidas anteriormente, ou Asparagaceae "*sensu stricto*" que reuni dois gêneros da família (*Asparagus*, e *Hemiphylacus*). A revisão do sistema APG III (2009) permite apenas o sentido mais amplo (Souza & Lorenzi, 2012). Chase et al. (2009) propuseram dividir a família Asparagaceae em sete subfamílias que correspondem às famílias originalmente separadas, entre elas Agavoideae correspondendo a Agavaceae (APG II, 2003). A delimitação taxonômica de Agavoideae a nível infrafamíliar e sua relação com os grupos mais próximos não é bem definida, mesmo após diversas abordagens moleculares utilizando sequências gênicas como, gene *rcbL* (Duvall et al., 1993; Eguiarte et al., 1994; Chase et al., 1995), espaçadores internos transcritos- ITS (Bogler e Simpson, 1996), que confirmam o parafiletismo de alguns dos representantes que compõem a família Asparagaceae, antigamente referidos como Agavaceae *sensu lato*. Bogler e Simpson (1995, 1996) realizaram estudos filogenéticos baseados em sequências nucleares e plastidiais revelaram que este grupo parece ter surgido de diferentes linhagens. Dados utilizando sítios de restrição *cpDNA* confirmam pelo menos duas linhagens em Asparagaceae, como também corroboram com os sistemas de classificação de Dahlgren, Clifford, e Yeo (1985) (Bogler e Simpson, 1995).

A variabilidade de sequência da região ITS do DNA ribossomal encontrada por Bogler e Simpson (1996) em alguns gêneros de Asparagaceae, sobretudo para a subfamília Agavoideae, associada à presença de um cariótipo bimodal notável, semelhanças nos frutos e sementes suporta fortemente as relações de parentesco entre os gêneros *Yucca*, *Hesperaloe*, *Beschorneria*, *Furcraea*, *Agave*, *Manfreda*, *Polianthes*, *Prochnyanthes* e, talvez, *Hosta*. Por outro lado, *Dasyilirion*, *Beaucarnea*, *Nolina*, *Calibanus*, *Dracaena*, e *Sansevieria* apresentaram diferenças tanto citologicamente, quanto morfologicamente, sendo considerada a possibilidade de exclusão desses gêneros da família, colocando-os em duas famílias separadas, Nolinaceae e Dracaenaceae. Dados de sítios de restrição de DNA de cloroplastos

suportam esta separação, sugerindo que Nolinaceae e Dracaenaceae estão mais proximamente relacionados com os representantes de Convallariaceae (*Maianthemum*, *Convallaria*, *Aspidistra*, *Liriope*) (Bogler e Simpson, 1995). Em geral, Agavoideae parece ser taxonomicamente desarmônico por abrigar representantes com alta diversificação vegetativa e floral (Patil e Pai, 2011), cuja circunscrição não é consenso entre diversos autores.

### 2.1.3. Origem e distribuição

A subfamília Agavoideae tem origem na América, com centro de diversidade o México (García-Mendoza e Chávez-Rendón, 2013) está distribuída no Novo Mundo, deste o centro dos Estados Unidos ao Panamá, Ilhas Caribenhas, e norte da América do Sul (Simpson, 2006). Sendo representada por cerca de 300 espécies distribuídas em 27 gêneros entre eles *Agave*, *Furcraea* e *Yucca* (Souza e Lorenzi, 2012). Destes, são nativos do Brasil *Furcraea* Vent. e outros foram introduzidos tais como *Agave* L., e *Yucca* L.. No Brasil ocorrem 15 espécies distribuídas em todas as regiões (Pirani e Lopes, 2013).

### 2.1.4. Importância econômica

Alguns dos gêneros da família Asparagaceae possuem importância econômica, um destes gêneros é o *Agave*, o qual fornece matéria-prima para a produção de bebidas alcoólicas, como, por exemplo, o pulque e a tequila, populares na América Central. Mas também são conhecidas em diversas partes do mundo: O sisal (*Agave sisalana*), que é uma planta fibrosa utilizada como alternativa agrícola em áreas secas do Nordeste (Martin et al., 2009). Espécies desta família também são utilizadas como ornamentais no Brasil e em todo o mundo. Entre as cultivadas no Brasil para fins ornamentais, podemos destacar as iucas (*Yucca spp.*), os agaves (*Agave spp.*), a pata-de-elefante (*Nolina recurvata*), o cordilíne (*Cordyline terminalis*), as dracenas (*Dracaena spp.*), e a espada-de-são-jorge (*Sansevieria trifasciata*). O clorofito (*Chlorophytum comosum*) é muito utilizado em canteiros, causando um bonito efeito na ornamentação. Uma das espécies do gênero *Dracaena* é muito conhecida (*Dracaena fragrans*) como pau-d'água da qual são comercializados fragmentos do caule que brotam muito facilmente em vasos com água (Souza e Lorenzi, 2012).

## 2.2. Citogenética de Asparagaceae

A família Asparagaceae apresenta grande variação cromossômica numérica, com registro de números cromossômicos que variam desde  $2n = 10$  em *Resnova humifusa* (Wetschnig e Pfosser, 2003) a  $2n = 180$  para *Agave decipiens* (Banerjee e Sharma, 1989). Os estudos citogenéticos para a família limitam-se quase que exclusivamente a contagens cromossômicas através de coloração convencional e análise do comportamento meiótico. Há registros de contagens cromossômicas para cerca de 920 espécies, que representa 36,8% da família, com grande parte destas contagens para os gêneros *Agave* (Ruvalcaba-Ruiz e Rodrigues-Garay, 2002), *Aspidistra* (Yamashita e Tamura, 2004), *Asparagus*, (Sheidai e Inamdar, 1993), *Dracaena* (Mathew e Vijayavalli, 1989) e *Scilla* (Ding et al., 1998). No Brasil, em particular o Nordeste, os estudos citológicos para a família são ainda mais escassos, com registro numérico para *Furcraea gigantea* com  $2n = 60$  (Carvalho et al., 1991). Os cariótipos das espécies da subfamília Agavoideae são claramente assimétricos e bimodais, apresentando como possíveis números básicos  $x = 12, 18, 19, 20$  e  $30$  (Patil e Pai, 2011). Esta diversidade cromossômica numérica poder ser explicada pela ocorrência de poliploidia seguida de disploidia ascendente a partir de  $x = 7$  resultando em  $x = 15 (14 + 1)$ , em um primeiro ciclo de poliploidia, posteriormente um segundo ciclo de poliploidia daria origem  $x = 30$ , número básico mais freqüente na família Asparagaceae (Darlington, 1963).

A bimodalidade dos cariótipos e o estabelecimento do número básico são características muito distintivas que podem auxiliar nas circunscrições taxonômicas da família (Patil e Pai, 2011). A descoberta do arranjo cromossômico formado por 5 cromossomos grandes (*larger = l*) e 25 pequenos (*smaller = s*) levou a reavaliação da posição do ovário para sistematização da família (Dahlgren et al., 1985). Em Agavoideae, o caráter bimodal parece ser de origem alopoliploide, ou seja, a hibridação de genomas distintos. Sendo considerado uma sinapomorfia, com cariótipo ancestral constituído por cinco pares de cromossomos maiores e 25 menores ( $n = 30, 25s + 5l$ ) ou múltiplos deste conjunto (Mckain et al., 2012).

A conservação deste caráter é controversa, embora seja explicada por alguns autores pelo processo de orto-seleção cariotípica, em que esta configuração cariotípica teria surgido diversas vezes independentemente durante a evolução da família por ser essencialmente mais estável que as demais formas (Moreno-Salazar et al., 2007; White, 1978). Isto resultaria na conservação do número básico,  $x = 30$ , com manutenção do complemento haploide, formado por um conjunto com 5 macrocromossomos e 25 microcromossomos (Brandham e Doherty, 1998). Dois processos têm sido hipotetizados para o surgimento dos macrocromossomos em Asparagales: o primeiro seria rearranjos cromossômicos, como fusões e fissões de cromossomos (Schubert e Lysak, 2011; Pires et al., 2006); o segundo processo seria eventos

de alopoliploidia, envolvendo espécies parentais com diferentes tamanhos cromossômicos, com a manutenção dos cromossomos (Brandham e Doherty, 1998; Vosa, 2005; Pires et al., 2006).

De modo geral, os trabalhos citológicos para a família Asparagaceae, são em sua maioria análises de números cromossômicos e comportamento meiótico (menos frequente) com enfoque filogenético e taxonômico. Porém pouco se conhece sobre os outros parâmetros citogenéticos, como padrões de bandeamento, quantidade de DNA, etc. Na Tabela 1 é fornecida uma revisão dos números cromossômicos para a família Asparagaceae com ênfase nas subfamílias Agavoideae, Lomandroideae e Nolinoideae disponíveis na literatura.

**Tabela 1:** Números cromossômicos das subfamílias Agavoideae, Lomandroideae e Nolinoideae (Asparagaceae sensu APG III, 2009).

Táxon	Família*	<i>n</i>	<i>2n</i>	Fonte**
<b>Agavoideae</b>				
<i>Agave</i> L	Agavaceae			
<i>A. amaniensis</i> Trel. & W. Nowell			60	GJ94
<i>A. americana</i> L.			60	G85, GJ91, GJ90
<i>A. americana</i> var. <i>marginata</i> Trel.			60, 120	GJ90, GJ91, GJ94
<i>A. angustifolia</i> Haw.			60	GJ10
<i>A. angustifolia</i> var. <i>angustifolia</i>			180	GJ94
<i>Agave</i> × <i>arizonica</i> Gentry & J. H. Weber (pro sp.)		30II, 30II+30I		GJ94
<i>A. attenuata</i> Salm-Dyck			60	GJ90
<i>A. capensis</i> Gentry		30II		GJ94
<i>A. chrysantha</i> Peebles		30II		GJ94
<i>A. decipiens</i> Baker			150, 160, 180, 190	GJ90, GJ91
<i>A. deserti</i> Engelm.		30II		G96
<i>A. filifera</i> Salm-Dyck			60	GJ90, GJ91
<i>A. fourcroydes</i> Lem.			60, 150	GJ90, GJ91, GJ94
<i>A. maculosa</i> Hook.			60	G88, GJ03
<i>A. murpheyi</i> F. Gibson		30II		GJ94
<i>A. ornithobroma</i> Gentry		90I		GJ94
<i>A. shawii</i> Engelm.		30II		GJ94
<i>A. palmeri</i> Engelm.		30II		GJ94
<i>A. parryi</i> Engelm.		60II		GJ94
<i>A. parviflora</i> Torr.			60	GJ90
<i>A. perigrina</i>			60	GJ90, GJ91
<i>A. rigida</i> Mill.			60, 90, 120	G81
<i>A. schottii</i> Engelm.		60II		G96
<i>A. sisalana</i> Perrine			60, 150	GJ90, GJ91, GJ94
<i>A. sobria</i> Brandegees		30II		GJ94
<i>A. striata</i> Zucc.			60	GJ90
<i>A. tequilana</i> F.A.C. Weber			60, 90, 120, 150	GJ90, GJ91, GJ94, GJ06
<i>A. toumeyana</i> Trel		30II	60	G84, GJ94
<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore			60	GJ90
<i>Anemarrhena</i> Bunge	Agavaceae, Anemarrhenaceae, Anthericaceae, Liliaceae			
<i>A. asphodeloides</i> Bunge			20, 21, 22	G84, G85, G88, GJ91, GJ03

Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	n	2n	Fonte**
<i>Anthericum</i> L.				
<i>A. algeriense</i> Skalicky			30	G96
<i>A. baeticum</i> Boiss.			30	GJ94, G96
<i>A. liliago</i> L.			30	G84, G88
<i>A. maurum</i> Rothm.		15	30	G84, GJ91
<i>A. ramosum</i> L.			30, 32	G84, G85, GJ06
<i>A. subpetiolatum</i> Baker		24	16, 48	GJ94
<i>A. suffruticosum</i> Milne-Redh.			32	G85, GJ94
<i>A. torreyi</i> Baker		32		GJ91
<i>A. welwitschii</i> Marais e Reilly		8, 16	16, 32	GJ94
<i>Camassia</i> Lindl.	Agavaceae, Hyacinthaceae, Liliaceae			
<i>C. cusickii</i> S. Watson			30	GJ94
<i>C. leichtlinii</i> (Baker) S. Watson			30	GJ94
<i>C. quamash</i> (Pursh) Greene			30	GJ94
<i>Chlorophytum</i> Ker Gawl.	Agavaceae, Anthericaceae, Liliaceae			
<i>C. africanum</i> (Baker) Engl.			ca.80	GJ94
<i>C. amaniense</i> Engl.			14	GJ94
<i>C. arundinaceum</i> Baker		21		G84
<i>C. attenuatum</i> Baker		21	16, 42	GJ90, GJ94
<i>C. bakeri</i> Poelln.			16	GJ94
<i>C. bharuchae</i> Ansari, Raghavan e Hemadri			16	GJ90
<i>C. blepharophyllum</i> Schweinf. ex Baker			28	GJ94
<i>C. borivilianum</i> Santapau e A. Fern.			28	GJ10
<i>C. brachystachyum</i> Baker			28	GJ94
<i>C. capense</i> (L.) Voss			28	GJ91
<i>C. collinum</i> (Poelln.) Nordal		8	16	GJ94
<i>C. colubrinum</i> (Baker) Engl.		8	16	GJ94
<i>C. comosum</i> (Thumb.) Jacques		14, 14II	28	G84, GJ90, GJ91, GJ94, GJ96, GJ06
<i>C. elatum</i> (Aiton) R. Br. ex Baker			28	GJ06
<i>C. elgonense</i>		7	14	GJ94
<i>C. engleri</i> (Baker) Poelln.			16	GJ94
<i>C. gallabatense</i> Schweinf. ex Baker			14	GJ94
<i>C. glaucoides</i> Blatt.		21	42	G85, GJ90
<i>C. glaucum</i> Dalzell		21	42	G85, GJ90, GJ91
<i>C. heyneanum</i> Wall. ex Hook. f.		7	14	GJ94, GJ98
<i>C. heynei</i> Rottler ex Baker			14	GJ06

Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	<i>n</i>	<i>2n</i>	Fonte**
<i>C. inornatum</i> Ker Gawl.			14	GJ94
<i>C. khasianum</i> Hook. f.			40	G84
<i>C. kirkii</i> Baker		7	14	GJ94
<i>C. laxum</i> R. Br.		8	16, 32	G85, GJ90, GJ91, GJ94, GJ06
<i>C. macrophyllum</i> (A. Rich.) Asch.			28	GJ94
<i>C. magnificum</i>			14	GJ94
<i>C. malabaricum</i>		21	42	GJ94
<i>C. malayense</i> Ridl.			56	GJ94
<i>C. neghellense</i>			16	GJ94
<i>C. nepalense</i> (Lindl.) Baker			56	GJ94
<i>C. occultum</i>			14	GJ03
<i>C. orchidastrum</i> Lindl.		21	42	GJ90, GJ91 GJ94
<i>C. papillosum</i> Rendle		8	16	GJ94
<i>C. sparsiflorum</i> Baker			14	GJ94
<i>C. tordense</i>		8	16	GJ94
<i>C. tuberosum</i> (Roxb.) Baker		8	16	G85, GJ90, GJ91
<i>C. viridescens</i> Engl.		8	16	GJ94
<i>Echeandia</i> Ortega	Agavaceae, Anthericaceae, Liliaceae			
<i>E. echeandioides</i> Cruden		8	16	GJ96
<i>E. flavescens</i> (Schult. e Schult. f.) Cruden			16, 32, 48	GJ00
<i>E. gracilis</i> Cruden		8		G84
<i>E. hintonii</i> Cruden		8	16	GJ00
<i>E. imbricata</i> Cruden		8	16	G96
<i>E. leptophylla</i> Benth.			48	GJ90
<i>E. longipedicellata</i> Cruden		40		G84
<i>E. mcvaughii</i> Cruden		8		G96
<i>E. mexicana</i>		8, 16	16	G84, GJ90, G96
<i>E. montealbanensis</i> Cruden		8	16	GJ00
<i>E. nana</i> (Baker) Cruden			16	GJ90, GJ03
<i>E. occidentalis</i> Cruden		40		G96
<i>E. parvicapsulata</i> Cruden		8		G96
<i>E. pihuamensis</i> Cruden		8		G96
<i>E. pubescens</i> Cruden		8		G96
<i>E. reflexa</i> (Cav.) Rose		8	16	G96, GJ00
<i>E. robusta</i> Cruden		8		G96



Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	<i>n</i>	<i>2n</i>	Fonte**
<i>E. udipratensis</i> Cruden		40		G96
<i>Furcraea</i> Vent.	Agavaceae			
<i>Furcraea gigantea</i> Vent.			34, 60	G84, C91, GJ98
<i>Herreria</i> Ruiz & Pav	Agavaceae, Herreriaceae, Liliaceae			
<i>Herreria salsaparilha</i>			58	L04
<i>Hesperaloe</i> Engelm.	Agavaceae			
<i>H. funifera</i> (K. Koch) Trel.		30II		GJ94
<i>Hosta</i> Tratt.	Agavaceae, Hostaceae, Liliaceae			
<i>H. capitata</i> Nakai			60	GJ94
<i>H. clausa</i> Nakai			60	GJ94
<i>H. japonica</i> Tratt.			60	G84
<i>H. jonessi</i> M. Chung			60	GJ94
<i>H. lancifolia</i> Engl.			60	GJ94
<i>H. minor</i> Nakai			60	GJ94
<i>H. ovata</i> Spring			120	GJ94
<i>H. plantaginea</i> (Lam.) Asch.			60	G84, GJ98, GJ06
<i>H. rectifolia</i> Nakai			60	GJ10
<i>H. tsushimensis</i> N. Fujita			60	GJ94
<i>H. ventricosa</i> (Salisb.) Stearn			60, 120	G84, GJ98
<i>H. venusta</i> F. Maek			60	GJ94
<i>H. yingeri</i> S.B. Jones			60	GJ94
<i>Leucocrinum</i> Nutt. Ex A. Gray	Agavaceae, Anthericaceae, Liliaceae			
<i>L. montanum</i> Nutt. Ex A. Gray		11, 13, 14	c.50	G84, GJ03
<i>Paradisea</i> Mazzucato	Agavaceae, Anthericaceae, Asphodelaceae, Liliaceae			
<i>P. liliastrum</i> (L.) Bertol.			30	GJ94
<i>Polianthes</i> L.	Agavaceae			
<i>P. tuberosa</i> L.			16	GJ06
<i>Yucca</i> L.	Agavaceae			
<i>Y. elata</i> (Engelm.) Engelm.		30II		GJ94
<i>Y. glauca</i> Nutt.			60	G84
<i>Y. gloriosa</i> L.		25, 30	54, 60	G84, G85, GJ90, GJ94
<i>Y. smalliana</i> Fernald			60	GJ06

Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	n	2n	Fonte**
<b>Lomandroide</b>				
<i>Arthropodium</i> R. Br.	Anthericaceae, Liliaceae, Lomandraceae			
<i>A. candidum</i>			22	GJ98
<i>A. cirratum</i> R. Br.			44	GJ98, GJ10
<i>A. curvipes</i> S. Moore			44	GJ98
<i>A. dyeri</i> Brittan			22	GJ98
<i>A. milleflorum</i> J.F. Macbr.			22	GJ06
<i>A. minus</i> R. Br.			22	GJ98
<i>A. strictum</i> R. Br.			66	GJ06
<i>Chamaescilla</i> F. Muell. ex Benth.	Anthericaceae, Liliaceae, Lomandraceae			
<i>C. corymbosa</i> F. Muell. ex Benth.			44	GJ06
<i>Chamaexeros</i> Benth.	Dasyogonaceae, Laxmanniaceae, Lomandraceae, Xanthorrhoeaceae			
<i>C. serra</i> Benth.			32	GJ06
<i>Cordyline</i> Comm. ex R. Br.	Agavaceae, Asteliaceae, Laxmanniaceae, Lomandraceae			
<i>C. australis</i> Hook. F.			38	GJ98
<i>C. indivisa</i> Hook. F.			38	GJ91, GJ94
<i>C. obtecta</i> Baker			38	GJ10
<i>C. rubra</i> Heugel ex. Kunth			152, c.152	GJ06
<i>C. stricta</i> Hook. F.			38, c.114	GJ91, GJ94 GJ06
<i>C. terminalis</i> (L.) Kunth			38	GJ91, GJ94
<i>Dichopogon</i> Kunth.	Anthericaceae, Laxmanniaceae, Liliaceae, Lomandraceae			
<i>D. fimbriatus</i> J.F. Macbr.		11	22	GJ98
<i>D. preissii</i> Brittan		22	44	GJ98
<i>D. strictus</i> Baker		33	66	GJ98
<i>Laxmannia</i> R. Br.	Anthericaceae, Laxmanniaceae, Liliaceae, Lomandraceae			
<i>L. brachyphylla</i> F. Muell.			8	GJ06
<i>L. gracilis</i> R. Br.			24	GJ06
<i>L. orientalis</i> Keighery			16	GJ06

Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	n	2n	Fonte**
<i>Lomandra</i> Labill.	Dasyogonaceae, Laxmanniaceae, Lomandraceae, Xanthorrhoeaceae			
<i>L. bracteata</i> A.T. Lee			16	GJ90
<i>L. caespitosa</i> (Benth.) Ewart		8		GJ90
<i>L. confertifolia</i> ssp. <i>rubiginosa</i> A. Lee			32	GJ90
<i>L. cylindrica</i> A.T. Lee			32	GJ90
<i>L. drummondii</i> (F. Muell.) Ewart		8		GJ90
<i>L. effusa</i> (Lindl.) Ewart		16		GJ90
<i>L. elongata</i> (Benth.) Ewart			c.28	GJ90
<i>L. filiformis</i> ssp. <i>coriácea</i> A. Lee			32, 58	GJ90
<i>L. filiformis</i> x? <i>L. gracilis</i>			16	GJ90
<i>L. filiformis</i> (Thumb.) Britten ssp. <i>filiformes</i>			36	GJ90
<i>L. fluvialis</i> (R. Br.) A.T. Lee			32	GJ90
<i>L. glauca</i> ssp. <i>collina</i> (R. Br.) A. Lee		14		GJ90
<i>L. glauca</i> (R. Br.) Ewart			14, 28	GJ90
<i>L. gracilis</i> (R. Br.) A.T. Lee			16, 32	GJ90
<i>L. hastilis</i> (R. Br.) Ewart		8		GJ90
<i>L. hermafrodita</i> C. Andrews		8		GJ90
<i>L. integra</i> Macfarlane		8		GJ90
<i>L. laxa</i> (R. Br.) A. Lee			16	GJ90
<i>L. leucocephala</i> (R. Br.) Ewart ssp. <i>leucocephala</i>			16	GJ90
<i>L. longifolia</i> Labill.			16, 32	GJ90, GJ06
<i>L. micranta</i> (Endl.) Ewart		8, 16	32	GJ90
<i>L. montana</i> (R. Br.) L. Fraser e Vickery			16	GJ90
<i>L. mucronata</i>		14		GJ90
<i>L. multiflora</i> (R. Br.) Britten ssp. <i>multiflora</i>			16	GJ90
<i>L. nana</i> A. Lee			14	GJ06
<i>L. nigricans</i> Macfarlane		8		GJ90
<i>L. obliqua</i> (Thumb.) Macbride			14	GJ90
<i>L. odora</i> (Endl.) Ewart		8		GJ90
<i>L. ordii</i> (F. Muell.) Ewart		8		GJ90
<i>L. pauciflora</i> (R. Br.) Ewart		c.7, 7		GJ90
<i>L. preissii</i> (Endl.) Ewart		8	16	GJ90
<i>L. purpúrea</i> (Endl.) Ewart		8		GJ90
<i>L. rígida</i> Labill.			16	GJ90
<i>L. sericea</i> (Endl.) Ewart		16	16	GJ90
<i>L. sericea</i> Endl.			16	GJ90
<i>L. sonderi</i> (F. Muell.) Ewart		16		GJ90
<i>L. sp.</i>		16		GJ90

Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	<i>n</i>	<i>2n</i>	Fonte**
<i>L. spartea</i> (Endl.) Ewart		16		GJ90
<i>L. suaveolens</i>		c.7		GJ90
<i>Thysanotus</i> R. Br.	Anthericaceae, Laxmanniaceae, Liliaceae, Lomandraceae			
<i>T. patersonii</i> R. Br.		44	80	GJ06
Nolinoideae				
<i>Aspidistra</i> Ker Gawl.	Convallariaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>A. attenuata</i> Hayata			36	GJ10
<i>A. caespitosa</i> C.Pei			38	GJ90
<i>A. cavicola</i> D. Fang e K.C. Yen			36	GJ03
<i>A. claviformis</i> Y. Wan			36	GJ03
<i>A. cruciformis</i> Y. Wan e X.H. Lu			76	GJ06
<i>A. daibuensis</i> Hayata			36	GJ10
<i>A. dolichanthera</i> X.X. Chen			36	GJ00, GJ03
<i>A. ebianensis</i> K.Y. Lang e Z.Y. Zhu			36	GJ06
<i>A. elatior</i> Blume			36, 38	GJ90, GJ00, GJ03, GJ06, GJ10
<i>A. fimbriata</i> F.T. Wang e K.Y. Lang			38+2B	GJ00
<i>A. flaviflora</i> K.Y. Lang e Z.Y. Zhu			38	GJ90
<i>A. fungilliformis</i> Y. Wan			36, 38	GJ00, GJ03, GJ10
<i>A. hainanensis</i> Chun e F.C. How			36	GJ06
<i>A. hexianensis</i> J.L. Huang e D.Y. Hong			36	GJ00
<i>A. leshanensis</i> K.Y. Lang e Z.Y. Zhu			38	G88, GJ90
<i>A. linearifolia</i> Y. Wan e C.C. Huang			36	GJ03
<i>A. locii</i> Arnautov e Bogner			36	GJ10
<i>A. longanensis</i> Y. Wan			38	GJ00, GJ03
<i>A. longifolia</i> Hook. F.			36, 38	GJ10, GJ94
<i>A. longiloba</i> G.Z. Li			38	GJ03, GJ00
<i>A. longipedunculata</i> D. Fang			36	GJ03
<i>A. luodianensis</i> D.D. Tao			38	GJ03
<i>A. lurida</i> Ker Gawl.			36	GJ03
<i>A. marginella</i> D. Fang e L. Zeng			38	GJ06
<i>A. minutiflora</i> Stapf			38	GJ00, GJ03
<i>A. muricata</i> F.C. How ex K.Y. Lang			36	GJ06
<i>A. oblanceifolia</i> F.T. Wan			38	GJ90
<i>A. omeiensis</i> Z.Y. Zhu e J.L. Lang			38	GJ90
<i>A. patentiloba</i> Y. Wan e X.H. Lu			38	GJ03
<i>A. retusa</i> K.Y. Lang e S.Z. Huang			36	GJ00, GJ03
<i>A. saxicola</i> Y. Wan			36	GJ06

Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	<i>n</i>	<i>2n</i>	Fonte**
<i>A. sichuanensis</i> K.Y. Lang e Z.Y. Zhu			38	G88, GJ90, GJ00, GJ03
<i>A. subrotata</i> Y. Wan e C.C. Huang			38	GJ00, GJ03
<i>A. tonkenensis</i> (Gagnep.) F.T. Wang e K.Y. Lang			36	GJ00, GJ03
<i>A. triloba</i> F.T. Wang e K.Y. Lang			36	GJ00
<i>A. xilinensis</i> Y. Wan e X.H. Lu			76	GJ06
<i>A. yingjiangensis</i> L.J. Peng			36	GJ06
<i>A. zongbayi</i> K.Y. Lang e Z.Y. Zhu			38	GJ90
<i>Calibanus</i> Rose	Agavaceae, Convallariaceae, Dracaenaceae, Liliaceae, Nolinaceae, Ruscaceae			
<i>C. hookeri</i> (Lem.) Trel.			38	G85
<i>Campylandra</i> Baker	Convallariaceae Liliaceae Ruscaceae			
<i>C. aurantiaca</i> Baker			38	GJ10
<i>C. chinensis</i> (Baker) M.N. Tamura, S. Yun Liang e Turland			38	GJ10
<i>C. fimbriata</i>			38	GJ10
<i>C. siamensis</i> Yamashita e M.N. Tamura			38	GJ10
<i>C. watanabei</i> (Hayata) Dandy			38	GJ10
<i>Comospermum</i> Rauschert	Agavaceae, Anthericaceae, Convallariaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>C. yedoense</i> Rauschert			40	GJ00
<i>Convallaria</i> L.	Convallariaceae Liliaceae Ruscaceae			
<i>C. keiskei</i> Miq.			38	G88, GJ91, GJ10
<i>C. keisukei</i> Miq.			34, 36, 38	G85
<i>C. majalis</i> L.			38	G84, G88, GJ90, GJ91, GJ94, GJ98, GJ06, GJ10
<i>Disporopsis</i> Hance	Convallariaceae, Liliaceae, Ruscaceae, Uvulariaceae			
<i>D. fuscopicta</i> Hance			40	G84
<i>Dracaena</i> L.	Agavaceae, Convallariaceae, Dracaenaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>Dracaena aurea</i> H. Mann			40	G88
<i>D. deremensis</i> Engl.		19	38	GJ91, GJ94
<i>D. draco</i> (L.) L.			40	GJ91
<i>D. forbesii</i>			40	G88

Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	n	2n	Fonte**
<i>D. fragrans</i> (L.) Ker Gawl.		19	38	GJ91, GJ94
<i>D. godseffiana</i> hort.		17, 18	34, 36	GJ91, GJ94
<i>D. kindtiana</i> De Wild.		19	38	GJ91, GJ94
<i>D. marginata</i> Lam.		20		GJ94
<i>D. marginata</i> hort.		19	38	G88, GJ91
<i>D. poggei</i> Engl.			42	G85
<i>D. reflexa</i> Lam.		19	38, 40, 42	G85, G88, GJ91, GJ94
<i>D. sanderiana</i> hort.		19	38, 40	GJ91, GJ94, GJ06
<i>D. spicata</i> Roxb.		19	38	GJ91, GJ94
<i>D. surculosa</i> Lindl.		20		GJ91, GJ94
<i>D. terniflora</i> Roxb.		19	38	GJ91, GJ94
<i>Eriospermum</i> Jacq. ex Willd.	Convallariaceae, Eriospermaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>E. abyssinicum</i> Baker			12	GJ03
<i>E. alpicorne</i> Baker			14, 42	GJ03
<i>E. aphyllum</i> Marloth			10	GJ03
<i>E. arenosum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. aribesense</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. armianum</i> Mitch.			14	GJ03
<i>E. bakerianum</i> Schinz			12	GJ03
<i>E. bayeri</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. bifidum</i> R.A. Dyer			28	GJ03
<i>E. bowieanum</i> Baker			14	G84, GJ03
<i>E. brevipes</i> Baker			14	GJ03
<i>E. breviscapum</i> Marloth ex P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. bruynsii</i> P.L. Perry			28	GJ03
<i>E. calcareum</i> P.L. Perry			28	GJ03
<i>E. capense</i> (L.) T.M. Salter			14	G84
<i>E. cernuum</i> Baker			14	GJ03
<i>E. cervicorne</i> Marloth			56	GJ03
<i>E. ciliatum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. coactum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. cooperi</i> Baker			14	GJ03
<i>E. cordiforme</i> T.M. Salter			14	GJ03
<i>E. corymbosum</i> Baker			12	GJ03
<i>E. crispum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. descendens</i> Marloth ex P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. deserticum</i> Marloth			28	GJ03
<i>E. dielsianum</i> Schltr. ex Poelln.			14	GJ03
<i>E. dissitifolium</i> Schltr.			14	GJ03
<i>E. dregei</i> Schonb.			14	G84, GJ03

Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	<i>n</i>	2 <i>n</i>	Fonte**
<i>E. dyerii</i> Marloth ex Archibald			14	GJ03
<i>E. erinum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. eriophorum</i> Marloth ex P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. ernstii</i> P.L. Perry			40	GJ03
<i>E. exile</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. filicaule</i> Marloth ex P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. flabellatum</i> Marloth			14	GJ03
<i>E. flavum</i> P.L. Perry			10	GJ03
<i>E. flexum</i> P.L. Perry			12	GJ03
<i>E. folioliferum</i> Andrews			14	GJ03
<i>E. fragile</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. glaciale</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. graminifolium</i> A.V. Duthie			28	GJ03
<i>E. inconspicuum</i> P.L. Perry			18	GJ03
<i>E. lancifolium</i> Jacq.			14	GJ03
<i>E. lanimarginatum</i> Marloth			14	GJ03
<i>E. lanuginosum</i> Jacq.			28	GJ03
<i>E. lavranosii</i> P.L. Perry			40	GJ03
<i>E. laxiracemosum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. macgregoriorum</i> P.L. Perry			12	GJ03
<i>E. mackeenii</i> Baker			18	GJ03
<i>E. marginatum</i> Marloth ex P.L. Perry			42	GJ03
<i>E. minutiflorum</i> Marloth ex P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. minutipustulatum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. multifidum</i> Marloth			14	G84, GJ03
<i>E. namaquanum</i> Marloth ex P.L. Perry			12	GJ03
<i>E. nanum</i> Marloth			14	GJ03
<i>E. occultum</i> Archibald			14	GJ03
<i>E. ornithogaloides</i> Baker			14	GJ03
<i>E. orthophyllum</i> (Archibald) P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. paradoxum</i> Ker Gawl.			14, 28	G84, GJ03
<i>E. parvifolium</i> Jacq.			14	GJ00
<i>E. patentiflorum</i> Schltr.			14	GJ03
<i>E. porphyrium</i> Archibald			14	GJ03
<i>E. porphyrovalve</i> Baker			20	GJ03
<i>E. proliferum</i> Baker			24, 36	GJ03
<i>E. pubescens</i> Jacq.			28	GJ03
<i>E. pumilum</i> T.M. Salter			14	GJ03
<i>E. pusillum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. pustulatum</i> Marloth ex Duthie			14	GJ03
<i>E. pustwatum</i> Marl. ex Duthie			14	G84
<i>E. ramosum</i> P.L. Perry			14	GJ03

Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	<i>n</i>	2 <i>n</i>	Fonte**
<i>E. ratelpoortianum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. rautanenii</i> Schinz			12	GJ03
<i>E. rhizomatum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. roseum</i> Schinz			40	GJ03
<i>E. sabulosum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. schinzii</i> Conrath & Baker			14	GJ03
<i>E. schlechteri</i> Baker			20	GJ03
<i>E. spirale</i> C.H. Bergius ex Schult.			10	GJ03
<i>E. subincanum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. subincanum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. subtile</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. triphyllum</i> Baker			18	GJ03
<i>E. tuberculatum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. undulatum</i> P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. vermiforme</i> Marloth ex P.L. Perry			14	GJ03
<i>E. villosum</i> Baker			14	GJ03
<i>E. volkmanniae</i> Dinter			40	GJ03
<i>E. zeyheri</i> R.A. Dyer			14, 28, 56	GJ03
<i>Liriope</i>	Convallariaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>L. muscari</i> var. <i>communis</i> (Maxim.) Hse e L.C. Li		18		GJ90
<i>Maianthemum</i> F.H. Wigg.	Convallariaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>M. atropurpureum</i> (Franch.) La Frankie			72	GJ10
<i>M. bifolium</i> (L.) F.W. Schmidt			36, 42, 54	G88, GJ90, GJ91, GJ94, GJ00, GJ10
<i>M. canadense</i> Desf.			36	GJ90
<i>M. dahuricum</i> (Turcz. ex Fisch. & C.A. Mey.) La Frankie			36	GJ10
<i>M. dilatatum</i> (Alph. Wood) A. Nelson & J.F. Macbr.		18	32, 36	GJ91, GJ03, GJ06, GJ10
<i>M. forrestii</i> (W.W. Sm.) La Frankie			36	GJ10
<i>M. fuscum</i> (Wall.) La Frankie			72	G96, GJ98
<i>M. henryi</i> (Baker) La Frankie			36	GJ10
<i>M. intermedium</i> Vorosch.			c.60, 65-70	GJ90
<i>M. japonicum</i> (A. Gray) La Frankie			36	GJ10
<i>M. lichiangense</i> (W.W. Sm.) La Frankie			36	GJ10
<i>M. purpureum</i> (Wall.) La Frankie			36	GJ10
<i>M. tatsienense</i> (Franch.) La Frankie			36	GJ10
<i>Nolina</i> Michx.	Agavaceae, Convallariaceae, Dracaenaceae, Liliaceae, Nolinaceae, Ruscaceae			



Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	n	2n	Fonte**
<i>N. microcarpa</i> S. Watson		19II		GJ94
<i>N. texana</i> S. Watson			38	G88
<i>Ophiopogon</i> Ker Gawl.	Convallariaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>O. aciformis</i> F.T. Wang & T. Tang ex H. Li & Y.P. Yang			36	GJ94
<i>O. bockianus</i> Diels			36	GJ94
<i>O. bodinieri</i> H. Lév.			36	GJ94
<i>O. brevipes</i> Craib			36	GJ06
<i>O. chekiangensis</i> Koiti Kimura e Migo			68, 72	G88, GJ91
<i>O. chingii</i> F.T. Wang e T. Tang			36	GJ94
<i>O. dracaenoides</i> (Baker) Hook. f.			36	GJ94, GJ96
<i>O. griffithii</i> (Baker) Hook. f.			36	GJ94
<i>O. intermedius</i> D. Don		18	36	GJ90, GJ94
<i>O. jaburan</i> (Siebold) Lodd.			36	GJ91, GJ06, GJ10
<i>O. japonicus</i> (L. f.) Ker Gawl.			36, 67, 68, 70, 72	GJ91, GJ94, GJ03, GJ06
<i>O. latifolius</i> L. Rodrigues			36	GJ94, GJ96
<i>O. marmoratus</i> Pierre ex L. Rodr.			36	GJ94
<i>O. megalanthus</i> F.T. Wang & L.K. Dai			36	GJ94
<i>O. peliosanthoides</i> F.T. Wang & T. Tang			36	GJ94
<i>O. pingbienensis</i> F.T. Wang & L.K. Dai			36	GJ94, GJ96
<i>O. planiscapus</i> Nakai			36, 72	GJ06
<i>O. reversus</i> C.C. Huang			36	GJ10
<i>O. revolutus</i> F.T. Wang & L.K. Dai			36	GJ94
<i>O. siamensis</i> M.N. Tamura			36	GJ06
<i>O. stenophyllus</i> (Merr.) L. Rodr.			36	GJ94
<i>O. sylarrhizus</i> Wang & Dai			36	GJ98
<i>O. sylvicola</i> F.T. Wang & T. Tang			54	GJ06
<i>O. tonkinensis</i> L. Rodr.			36	GJ94
<i>O. tsaii</i> F.T. Wang & T. Tang			36	GJ94
<i>O. xylorrhizus</i> F.T. Wang & L.K. Dai			36	GJ94
<i>Polygonatum</i> Mill.	Convallariaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>P. cirrhifolium</i> Royle			20	GJ90
<i>P. cyrtonema</i> Hua			22	GJ90
<i>P. filipes</i> Merr.			16, 18	GJ90
<i>P. humile</i> Fisch. ex Maxim.			20	GJ90
<i>P. involucratum</i> Maxim.			18	GJ90
<i>P. macropodium</i> Turcz.			22	GJ90
<i>P. odoratum</i>			20	GJ90
<i>P. odoratum</i> (Mill.) Druce			20	GJ90
<i>P. sibiricum</i> Delar. ex Redoute			24	GJ90

Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	<i>n</i>	<i>2n</i>	Fonte**
<i>Ruscus</i> L.	Convallariaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>R. aculeatus</i> L.			40	G84, GJ90, GJ91, GJ94, GJ98
<i>R. hypoglossum</i> L.			40	G85, GJ94
<i>R. ponticus</i> ex Grossh.			40, 60	GJ06
<i>R. streptophyllus</i> P.F. Yeo			40	GJ90
<i>Sansevieria</i> Thunb.	Agavaceae, Convallariaceae, Dracaenaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>S. canaliculata</i> Carrière		39		G88
<i>S. caulescens</i> N.E. Br.		20II, 20	40	G84, G88
<i>S. cylindrica</i> Bojer		20, 112	40, 120	G88, GJ94
<i>S. deserti</i> N.E. Br.		20	40	G88
<i>S. ehrenbergi</i> Schweinf.		20II	40	G84
<i>S. ehrenbergii</i> Schweinf. ex Baker		20	40	G88
<i>S. gracilis</i> N.E. Br.		19, 27	40, 60	G88
<i>S. hahnii</i> hort.			40	G85
<i>S. intermedia</i> N.E. Br.		20II, 20	40	G84, G88
<i>S. metallica</i> Gérôme & Labroy		20, 20II	40	G84, G88
<i>S. pearsonii</i> N.E. Br.		20, 20II	40	G84, G88
<i>S. powellii</i> N.E. Br.		120		G88
<i>S. roxburghiana</i> Schult. f.		20	40	GJ94
<i>S. senegambica</i> Baker		20	40	G85, G88
<i>S. subspicata</i> Baker		120		G88
<i>S. suffruticosa</i> N.E. Br.		20	40	G88
<i>S. trifasciata</i> Prain		20	40	G88, GJ94, GJ06
<i>S. zeylanica</i> Willd.		20	40	G88, GJ94
<i>Semele</i> Kunth.	Convallariaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>S. androgyna</i> Kunth <i>ssp. androgyna</i>			40	GJ90
<i>Speirantha</i> Baker	Convallariaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>S. gardenii</i> (Hook.) Baill.			38	G85
<i>Tupistra</i> Ker Gawl.	Convallariaceae, Liliaceae, Ruscaceae			
<i>T. albiflora</i> K. Larsen			38	GJ94, GJ10
<i>T. annulata</i> H. Li & J.L. Huang			38	GJ94
<i>T. aurantiaca</i> Wall.			38	GJ91, GJ94
<i>T. chinensis</i> Baker			38	GJ91, GJ94, GJ98
<i>T. delavayi</i> Franch.			38	GJ94

Continuação Tabela 1.

Táxon	Família*	<i>n</i>	2 <i>n</i>	Fonte**
<i>T. ensifolia</i> F.T. Wang & T. Tang			38	GJ94
<i>T. fimbriata</i> Hand.-Mazz.			38	GJ94
<i>T. fungilliformis</i> F.T. Wang & S.Yun Liang			38	GJ91, GJ94
<i>T. grandis</i> Ridl.			38	GJ10
<i>T. grandistigma</i> F.T. Wang & S.Yun Liang			38	GJ94
<i>T. longipedunculata</i> F.T. Wang & S.Yun Liang			38	GJ91, GJ94
<i>T. longispica</i> Y. Wan & X.H. Lu			38	GJ98
<i>T. nutans</i> Wall. ex Lindl.			38	GJ94
<i>T. pingbianensis</i> J.L. Huang & X.Z. Liu			38	GJ00
<i>T. urotepala</i> (Hand.-Mazz.) F.T. Wang & T. Tang			38	GJ94
<i>T. wattii</i> (C.B. Clarke) Hook. f.			38	GJ91, GJ94
<i>T. yunnanensis</i> F.T. Wang & S.Yun Liang			38	GJ91, GJ94

**Legenda:** \*Consideradas como famílias em antigos sistemas de classificação; \*\*Índices cromossômicos e literatura: C91 = Carvalheira et al., 1991; G81 = Goldblatt, 1981; G84 = Goldblatt, 1984; G85 = Goldblatt, 1985; G88 = Goldblatt, 1988; GJ90 = Goldblatt e Johnson, 1990; GJ91 = Goldblatt e Johnson, 1991; GJ94 = Goldblatt e Johnson, 1994; GJ96 = Goldblatt e Johnson, 1996; GJ98 = Goldblatt e Johnson, 1998; GJ00 = Goldblatt e Johnson, 2000; GJ03 = Goldblatt e Johnson, 2003; G04 = Gonçalves, 2004; GJ06 = Goldblatt e Johnson, 2006; GJ10 = Goldblatt, 2010.

### 2.3 Bandeamento cromossômico com CMA/DAPI

Com o advento das técnicas de análises citogenéticas, sobretudo com o uso de corantes fluorocromos base-específicos, é possível uma análise mais acurada da variabilidade cariotípica, que até então se baseava unicamente nas técnicas de coloração convencional, utilizando corantes, como Giemsa, Orceína Acética, reativo de Schiff, Hematoxilina/Eosina (Soares-Scott, 1998). Análises baseadas em técnicas utilizando fluorocromos base-específicos têm contribuído para o entendimento da evolução cariotípica em diversos grupos de plantas como nos gêneros *Citrus*, *Maxillaria*, *Spondias* e *Emilia* (Carvalho et al., 2005; Cabral et al., 2006; Almeida et al., 2007; Moraes e Guerra, 2010). As informações citogenéticas oriundas destas análises podem ser utilizadas nas comparações entre espécies do mesmo gênero, de diferentes gêneros ou de gêneros relacionados (Guerra, 2000). Além destas comparações, as técnicas com fluorescentes base-específicos podem ser empregadas na identificação de estruturas e/ou propriedades citoquímicas das regiões cromossômicas (Kim et al., 2002).

As técnicas com fluorocromos base-específicos permite a visualização de blocos de coloração diferenciada, essas regiões geralmente apresentam-se como faixas longitudinais fortemente coradas nos cromossomos, sendo denominadas bandas. A visualização destas bandas permite a identificação da distribuição e quantidade de regiões heterocromáticas constitutivas (HC), comumente encontrada em grandes blocos em torno do centrômero (regiões pericentroméricas), nos telômeros (terminais cromossômicos) e em regiões interciais dos cromossomos. Regiões heterocromáticas constitutivas são constituídas, principalmente, de sequências de DNA repetitivo em tandem, que varia em tamanho (satélites, macrosatélites e microsatélites) mesmo em cromossomos homólogos (Dimitri et al., 2004; Berjano et al., 2009). Os padrões de bandas heterocromáticas são geralmente conservados entre populações, variando ou não entre espécies, gêneros ou famílias (Greilhuber, 1984). Os fluorocromos podem expor diferentes constituições do segmento de DNA por meio de diferentes padrões de bandas produzidas, que podem ser ricas em –GC, –AT ou neutras, indicadas pela intensidade da fluorescência (Silva et al., 2010; Summer, 1990). As bandas heterocromáticas podem variar qualitativamente e quantitativamente entre populações e espécies (Guerra et al. 2000), explicada pela perda ou amplificação de sequências de DNA repetitivo (Berg e Greilhuber, 1993).

Entre os fluorocromos mais utilizados estão a cromomicina A<sub>3</sub> (CMA) e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que coram preferencialmente regiões de DNA ricas em guanina-citosina (–GC) e em adenina-timina (–AT), respectivamente (Schweizer, 1976; Kim

et al., 2002). Com a utilização de fluorocromos, especialmente CMA e DAPI, padrões de bandeamento são originados por meio de mecanismos de ligação entre os fluorocromos e a cromatina (Kim et al., 2002). De acordo com Manzini et al., (1983) são propostos três mecanismos de ligação entre o DAPI e o DNA: A primeira proposição é a incorporação da molécula de DAPI entre os sulcos menores do DNA para formar pontes de hidrogênio com pares de AT; a segunda é a ligação não específica entre as interações eletrostáticas das cargas positivas do DAPI e as cargas negativas dos grupos fosfatos do DNA; a última é a intercalação entre as moléculas de DAPI e as bases nitrogenadas. Por outro lado, há apenas um mecanismo de interação do CMA com os pares de bases específicos (-CG) é conhecido (Stancus et al., 1992). Sendo o CMA um fluorocromo base específico que forma um dímero em soluções aquosas na presença de  $Mg^{2+}$ , o dímero liga-se primariamente a sequência 5'-dGpC-3' e fica entre os sulcos menores do DNA.

A fluorescência emitida por esses fluorocromos não é indicada necessariamente pelo conteúdo de bases específicas do segmento de DNA, mas pelo número consecutivo de pares de bases específicas (Meister e Barow, 2007), que deve ter pelo menos quatro pares de bases específicas do DNA repetidas em tandem (Kim et al., 2002; Summer, 1990; Baguley, 1982).

A identificação da constituição e distribuição física de diferentes famílias de DNA repetitivo contribui para compreensão de como os genomas estão organizados em diferentes espécies, bem como para o entendimento das relações de parentesco entre táxons, tendo em vista os mecanismos de ajustes genéticos que ocorrem nos cariótipos de diferentes organismos durante o processo evolutivo (Souza et al., 2008). As regiões heterocromáticas identificadas por  $CMA^+/DAPI^-$  e  $CMA^-/DAPI^+$  têm significados citológicos como, por exemplo, regiões organizadoras de nucléolos (RONs) e replicação tardia de DNA, respectivamente (Liu et al., 2004). Estes dois padrões indicam também o reconhecimento de sítios ricos em -CG e -AT, respectivamente (Barros e Silva & Guerra, 2009). Além dos padrões convencionais de bandas, outros padrões são observados, como  $CMA^0/DAPI^0$  (neutralidade no balanço das ligações dos fluorocromos AT/CG),  $CMA^+/DAPI^+$ ,  $CMA^+/DAPI^0$  e  $CMA^-/DAPI^0$ .

Estudos realizados no gênero *Citrus* L. utilizando a coloração CMA/DAPI evidenciou claramente padrões de bandas que exibiram polimorfismos interespecíficos, além de alto grau de heterozigose (Guerra, 1993; Pedrosa, 1999; Carvalho et al., 2005; Barros e Silva et al., 2010;). Em *Citrus sinensis* ( $2n = 18$ ) foram visualizados diferentes padrões de CMA e DAPI, sugerindo que heteromorfismos são fixados na espécie. Para comprovar esta proposição, cariótipos de dez cultivares da espécie foram estudadas utilizando a dupla coloração com CMA/DAPI e FISH utilizando 18S-5.8S-25S rRNA e 5S rRNA. O mesmo padrão de bandas

CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> foi encontrado em todas as cultivares, confirmando o padrão invariável e o heteromorfismo que pode ser dividido em quatro grupos, segundo a classificação de Guerra (1993), dois cromossomos com uma grande banda telomérica e um com uma pequena banda proximal; dois cromossomos com bandas terminais em ambos telômeros, heteromórficas em tamanho cromossômico e bandas; sete cromossomos com uma única banda telomérica, variáveis bandas e tamanhos cromossômicos e sete cromossomos de tamanhos diferentes sem bandas ou com uma banda muito pequena fraca e terminal (Pedrosa et al., 2000). Deste modo, apresentando a utilidade da coloração com CMA/DAPI na caracterização de espécies da família Rutaceae, revelando um padrão bem diferenciado, que exibem grandes polimorfismos interespecíficos e alto grau de heterozigose (Guerra, 1993).

Moraes e Guerra (2010) realizaram um trabalho com duas espécies de *Emilia* Cass., *E. sonchifolia* ( $2n = 10$ ) e *E. fosbergii* ( $2n = 20$ ), esta última apresenta dois conjuntos de dez cromossomos, um grande e um pequeno, o conjunto menor é similar ao do complemento diploide. Isto sugere que *E. sonchifolia* participa na formação de *E. fosbergii*, para comprovar esta hipótese da relação entre os genomas utilizaram a dupla coloração com CMA e DAPI, além de FISH e GISH. Em *E. sonchifolia* foram encontrados dois pares de bandas CMA<sup>+</sup>, enquanto em *E. fosbergii* três pares. Evidenciando que *E. fosbergii* é um alotetraploide e que sugere que *E. sonchifolia* é um dos ancestrais. O terceiro par de bandas CMA<sup>+</sup> indica processos de pós poliploidização, que provavelmente são eventos recentes em *E. fosbergii* (Moraes e Guerra, 2010).

#### **2.4 Hibridização *in situ* fluorescente - FISH**

Tradicionalmente, os cromossomos de plantas têm sido um material rico para quase todo tipo de pesquisa citogenética. O desenvolvimento de técnicas citomoleculares, principalmente, a hibridização *in situ* fluorescente (fluorescence *in situ* hybridization – FISH) e variantes desta técnica, tornaram, nos últimos anos, a citogenética uma das áreas mais promissoras da genética (Guerra, 2004). Isto é ressaltado com uso de numerosas espécies modelos, tanto de plantas quanto de animais, que revelam inesperados detalhes do comportamento cromossômico e evolução nesses grupos, permitindo que os estudos citogenéticos ampliem cada vez mais seu campo de investigação (Summer, 2003). Por esse caráter informativo a técnica de FISH tem sido considerada uma forma elegante da citologia aplicada desde a citogenética vegetal, passando pela citogenética animal, a citogenética clínica humana (Guerra, 2004).

Esta técnica é muito utilizada no mapeamento físico e gênico das sequências, identificação e caracterização cromossômica, como também para apresentar modificações ocorrentes no genoma, além de evidenciar rearranjos cromossômicos (Schwarzacher e Heslop-Harrison, 2000). Pela alta sensibilidade da técnica (Lara, 1995) a compreensão da organização genômica em diferentes espécies, mesmo em genomas grandes ou pequenos, pode ser realizado, além da investigação da distribuição física das sequências de DNA em metáfases, intérfases e em meioses. A sensibilidade da hibridização *in situ* permitiu detectar sequências únicas ou pequenas de DNA em cromossomos humanos por hibridização *in situ* fluorescente. Por outro lado, a FISH tem sido utilizada na identificação de marcadores diversos no mapeamento físico dos cromossomos, sendo utilizado nas comparações cariotípicas entre espécies próximas, populações ou cultivares (Guerra, 2008; Pedrosa et al., 2006).

As vantagens do uso da técnica de FISH encontram-se na qualidade da resolução, contraste, velocidade e segurança, associada à localização simultânea de sequências de DNA diferentes (Levsky e Singer, 2003; Schwarzacher e Heslop-Harrison, 2000; Nederlof et al., 1990). A hibridização *in situ* fluorescente também é vista como alternativa aos métodos com radioisótopos, ou seja, métodos que utilizam sondas marcadas por radioisótopos (Gall e Pardue, 1969). A FISH por ser uma técnica versátil, tem possibilitado também o entendimento evolutivo das espécies por meio da detecção de eventos ao nível cromossômico como, por exemplo, translocação cromossômica, deleção, e amplificação de sequências de genes específicos (Price, 1993).

A técnica de FISH possibilita a identificações de marcadores moleculares, como sítios de DNAr 45S, que indicam a posição das regiões organizadoras do nucléolo (RONs), que comumente apresentam-se co-localizadas com as bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, como encontrado em espécies dos gêneros *Emilia* e *Citrus* (Moraes e Guerra, 2010; Barros e Silva et al., 2010). Em *Spondias*, a hibridação *in situ* fluorescente utilizando sondas de DNAr 45S e 5S revelaram diferenças no mapeamento físico destes sítios entre umbu-cajá (*Spondia* sp.) e seus supostos parentais. Isto permitiu afirmar que umbu-cajá não pode ser um híbrido entre *S. tuberosa* e *S. monbim*, mas uma espécie proximamente relacionada com estas últimas, que foram considerados por Mitchell e Daly (1998) e Silva Júnior et al. (2004) espécies parentais deste possível híbrido (Almeida et al., 2007).

## 2.5 Mecanismos de evolução cariotípica

Os cariótipos podem representar o resultado de diferentes mecanismos de evolução. As variações cromossômicas estruturais e/ou numéricas podem ocorrer nas diferentes células do indivíduo, entre diferentes indivíduos de uma mesma população ou entre populações da mesma espécie cujas variações podem ser programadas geneticamente ou não (GUERRA, 1988).

O número cromossômico inicialmente foi um dos parâmetros mais utilizados na citotaxonomia vegetal, e sobre o qual dispomos de maior número de dados em todas as floras (Guerra, 1990). Variações cromossômicas numéricas são mais facilmente observadas. A poliploidia é provavelmente a alteração cromossômica numérica mais importante na especiação e evolução vegetal (Stebbins, 1971). Diferentes tipos de célula podem sofrer ciclos endomitóticos ou mesmo um erro meiótico (não-redução cromossômica) que podem resultar em células poliploides (Guerra, 1988). Dentro de um gênero ou mesmo de uma espécie, podem ocorrer diversos números gaméticos que são múltiplos perfeitos, denominados de série poliploide, sendo considerado como número básico o número haplóide presente na população inicial de um clado ou táxon monofilético dessa série, representado por  $x$  (Adams e Wendel, 2005; Guerra, 1988). Ocorrência de poliploidia é rara nas gimnospermas e altamente variável nas angiospermas, sendo que 43% das dicotiledôneas (principalmente das famílias Rosaceae, Rubiaceae e Compositae) e 58% das monocotiledôneas (principalmente das famílias Iridaceae e Gramineae) são poliplóides (Bennett, 2004; Leitch e Leitch, 2008). Em torno de 40% das espécies cultivadas são poliploides, como *Medicago sativa*, *Gossypium hirsutum*, *Solanum tuberosum*, *Ipomoea batatas*, *Coffea arabica*, *Saccharum officinarum*, *Nicotiana tabacum*, *Fragaria ananassa*, *Triticum aestivum*, dentre outras (Leitch e Leitch, 2008). Em Agavoideae, foi verificada a ocorrência de séries poliploides como  $2n = 60, 90, 120$  e  $150$  em *Agave tequilana* (Palomino et al., 2003),  $2n = 60, 90$  e  $120$  em *A. rigida* (Bhattacharya e Ghose, 1977).

O aumento do nível de ploidia sugere aumento no conteúdo de DNA, o que é refletido no “efeito gigas” em que órgãos e células aumentam na mesma proporção do tamanho do genoma (Stebbins, 1971; Pereira et al., 2012). Contudo, essa relação é inapropriada para todos os táxons devido às interações com fatores ambientais e genéticos, pois há grupos que apresentam aumento no DNA, outros que mostram decréscimo no conteúdo de DNA e outros que apresentam uma baixa adição de DNA em relação aos diploides (Leitch e Bennett, 2004). Em *Brassica* mesmo com aumento no nível de ploidia não houve correspondência com a quantidade de DNA, tendo um evento de diploidização ao longo da evolução, mesmo com a triplicação do genoma do gênero (Lysak, 2007). Por outro lado, em *Atriplex confertiflora*



existe uma relação positiva entre os níveis de ploidia e conteúdo de DNA, apresentada nas taxas de fotossíntese por células nas folhas e atividade da rubisco (Warner e Ewards, 1989), isso visto que há uma relação entre dosagens de genes e produtos dos genes. No gênero

Nas angiospermas, fissão e fusão são tipos de rearranjos cromossômicos que parecem ser menos comuns que a poliploidia, mas não menos significativo na evolução do grupo (Jones, 1998). A disploidia corresponde a mudanças no número cromossômico devido a rearranjos cromossômicos estruturais, tais como a fusão e a fissão cêntrica (Guerra, 1988). Disploidias são o resultado das forças das variações cromossômicas estruturais que são refletidas nas variações numéricas, sem alteração no conteúdo do genoma. As disploidias podem ser produtos de translocações do tipo Robertsoniana, estas podem ser fusões ao nível do centrômero de dois cromossomos acro ou telocêntricos formando um cromossomo meta ou submetacêntrico sendo uma variação muito comum em diversos grupos de organismos. Fissões Robertsonianas são quebras ao nível de centrômero de cromossomos metacêntricos formando dois cromossomos telocêntricos, porém tem sido a forma menos frequente na evolução cromossômica (Summer, 2003; Guerra, 2000). Tais variações também são conhecidas por apenas fusões (disploidias descendentes) e fissões (disploidias ascendentes), respectivamente. No gênero *Nothoscordum* é facilmente encontrado espécies com  $n = 8$  e  $n = 10$  (Guerra, 2008), evidenciando disploidia ascendente ou descendente influenciado diretamente no número cromossômico. Em Asparagaceae, *Hyacinthus orientalis* pode ser encontrado indivíduos com  $2n = 16, 24, 25, 26, 27, 28, 30$ , sendo possível evidenciar a ocorrência de eventos de poliploidia seguidos de disploidia ascendente (Yoshida et al., 1976).

Outros mecanismos de variação cromossômica numérica responsáveis pelo aumento ou decréscimo do número cromossômico original, são a agmatoploidia e simpliploidia que são caracterizadas por eventos de fusão e fissão que ocorrem em organismos de cromossomos com cinetócoro difuso (cromossomos holocinéticos). Em Cyperaceae, vários gêneros apresentam uma grande variação cromossômica numérica ( $2n = 4$  a  $2n = 228$ ) e estrutural, devido principalmente a eventos de agmatoploidia, simpliploidia e poliploidia, considerados como os principais eventos responsáveis pela evolução cariotípica do grupo (Luceño et al., 1998; Vanzela et al., 2000).

A ocorrência de cromossomos Bs resulta em variações numéricas, não apresentando significado evolutivo além do nível de espécie (Guerra, 2008). Os cromossomos B são pequenos cromossomos extras ou supranumerários, diferindo dos demais cromossomos do cariótipo no tamanho e por serem em geral heterocromáticos (Guerra, 1988). São dispensáveis e podem estar presentes ou ausentes em indivíduos dentro de uma população, aparecem sem

par ou recombinado com quaisquer uns dos cromossomos na meiose do conjunto diplóide ou poliploide, e sua herança é irregular e não mendeliana (Jones e Houben, 2003). O número de famílias com ocorrência de cromossomos Bs é muito pequeno, destacando-se os registros em Asparagaceae, Asteraceae, Poaceae, Fabaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Iridaceae, Campanulaceae e Ranunculaceae (Levin e Palestis, 2005). Na família Asparagaceae, nos gêneros *Asparagus* e *Scilla* há um grande número de espécies com registro de cromossomos B, entre estas se encontram *A. adscendens* com  $2n = 20+3B$ , *A. gonocladus* com  $2n = 60+4B$ , *A. densiflorus* com  $2n = 40+3B$  (Sheidai e Inamdar, 1993), e *Scilla sinensis* com  $2n = 16, 18+2B, 27+2B, 34$  (Ding et al., 1998).

### 3. REFERÊNCIAS

Adams KL, Wendel JF. 2005. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 135–141.

Almeida CCS, Carvalho PCL, Guerra M. 2007. Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 155: 541-547.

APG. 1998. An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85: 531-553.

APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141: 399–436.

APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 161: 105–121.

Baguley BC. 1982. Non intercalative DNA-Binding Antitumor Compounds, *Mol. Cell. Biochem.*, 43: 167–181.

Banerjee S e Sharma KA. 1989. Structure and behaviour of chromosomes in four different species of *Agave*. *Cytologia* 54: 667–672.

- Barros e Silva AE e Guerra M. 2010. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotech Histochem.* 85:115–125.
- Bennett MD. 2004. Perspectives on polyploidy in plants – ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 411–423.
- Bentham G, Hooker JD. 1983. *Genera Plantarum III, Part2:748-836* (1965 reprint).
- Berg C, Greilhuber J. 1993. Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum-Aurantiacum* (Solanaceae). *Plant Syst Evol.* 185: 259–273.
- Berjano R, Roa F, Talavera S, Guerra M. 2009. Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. *Plant Syst Evol.* 280: 219–227.
- Bhattacharya GN, Ghose R. 1977. Chromosomes in some varieties of a wild species of *Agave*. *Bull. Bot. Soc. Bengal* 31: 31–34.
- Bogler DJ, Simpson BB. 1995. A Chloroplast DNA Study of the Agavaceae. *Systematic Botany*, 20: 191-205.
- Bogler DJ, Simpson BB. 1996. Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation. *Am J Bot* 83: 1225–1235.
- Brandham PE, Doherty MJ. 1998. Genome size variation in the Aloaceae, an angiosperm family displaying karyotypic orthoselection. *Annals of Botany* 82: 67-73.
- Cabral JS, Felix LP, Guerra M. 2006. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S DNAr sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genet. Mol. Biol.*, 29: 659-664.
- Carvalho GMG, Guerra M, Santos GA, Andrade VC, Farias MCA. 1991. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – IV. *Acta Bot. Brasil.* 5: 37–51.
- Carvalho R, Soares-Filho WS, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M. 2005. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet Genome Res* 109: 276–282.

Castorena-Sánchez I, Escobedo RM, Quiroz A. 1991. New cytotaxonomical determinants recognized in six taxa of *Agave* in the sections *Rigidae* and *Sisalanae*. *Canad. J. Bot.* 69: 1257–1264.

Chase MW, Reveal JL, Fay MF. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Bot J Linn Soc* 161: 132–136.

Chen RW, Li X, Li M, Liang G, Chen C. 2003. Chromosome Atlas of Major Economic Plants Genome in China. Chromosome Atlas of Garden Flowering Plants in China. Science Press, Beijing. 3.

Costa JY, Forni-Martins ER. 2004. A triploid cytotype of *Echinodorus tennellus*. *Aquatic Botany*.79: 325-332.

Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press.

Dahlgren R. 1977. A commentary on a Diagrammatic Presentation of the Angiosperms in Relation to the Distribution of Character States, *Plant Syst. Evol.*, 1:253-283.

Dahlgren RM, Clifford HT, Yeo PF. 1985. The Families of Monocotyledons. Springer, Berlin.

Dahlgren RMT, Clifford HT. 1982. The monocotyledons: a comparative study. Academic Press, New York.

Darlington CD. 1963. Chromosome Botany and the origins of cultivated plants, Allen & Unwin, London.

Deumling B, Greilhuber J. 1982. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by *in situ* hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. *Chromosoma* 84:535–555.

Dimitri P, Corradini N, Rossi F, Verni F. 2004. The paradox of functional heterochromatin. *BioEssays*, 27: 29-41.

Ding K, Ge S, Hong D, Yu Z. 1998. Cytotype variation and cytogeography of *Scilla sinensis* (Louriro) Merrill (Hyacinthaceae) in China. *Hereditas (Lund)* 129:151–160.

Duvall MR, Clegg MT, Chase MW, Clark WD, Kress WJ, Hills HG, Eguiarte LE, Smith JF, Gaut BS, Zimmer EA, Learn JR. 1993. Phylogenetic hypotheses for the monocotyledons constructed from the *rbcl* sequence data. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 607-619.

Eguiarte LE, Duvall MR, Learn JR, Clegg MT. 1994. The systematic status of the Agavaceae and Nolinaceae and related Asparagales in the monocotyledons: an analysis based on the *rbcl* gene sequence. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 54: 35-56.

Eguiarte LE. 1995. Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. *Bol. Soc. Bot. México* 56: 45-56.

Gall JG, Pardue ML. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 378-383.

Ganesan R, Kamaraj R, Vijayakumar N. 1984. Cytological studies of south Indian Liliaceae. *Proc. Indian Sci. Congr. Assoc.* 71(3-VI): 76.

García-Mendoza A. 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 4: 177-188.

Gentry HS. 1982. *Agaves of Continental North America*. Tucson: University of Arizona Press.

Gibbs RD. 1974. *Chemotaxonomy of flowering plants-III*, McGill-Queen's University Press, Montreal.

Goldblatt, P. & D. E. Johnson. 1990. Index to plant chromosome numbers 1986-1987. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 30:1-243.

Goldblatt, P. & D. E. Johnson. 1991. Index to plant chromosome numbers 1988-1989. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 40:1-238.

Goldblatt, P. & D. E. Johnson. 1994. Index to plant chromosome numbers 1990-1991. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 51:1-267.

Goldblatt, P. & D. E. Johnson. 1998. Index to plant chromosome numbers 1994-1995. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 69:1-208.

Goldblatt, P. & D. E. Johnson. 2000. Index to plant chromosome numbers 1996–1997. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 81:1–188.

Goldblatt, P. & D. E. Johnson. 2003. Index to plant chromosome numbers 1998–2000. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 94:1–297.

Goldblatt, P. & D. E. Johnson. 2006. Index to plant chromosome numbers 2001–2003. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 106:1–242.

Goldblatt, P. & D. E. Johnson. 2010. Index to plant chromosome numbers 2004–2006. *Regnum Veg.* 152:1–246.

Goldblatt, P. 1984. Index to Plant Chromosome Numbers, 1979-1981. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 8:1–427.

Goldblatt, P. 1985. Index to Plant Chromosome Numbers, 1982-1983. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 13:1–224.

Goldblatt, P. 1988. Index to Plant Chromosome Numbers, 1984-1985. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 23:1–264.

Goldblatt, P. 1996. Index to Plant Chromosome Numbers, 1992-1993. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 58:1–276.

Good-Avila SV, Souza V, Gaut BS, Eguiarte LE. 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 9124 – 9129.

Greilhuber J. 1984. Chromosomal evidence in taxonomy. In: Heywood VH, Moore DM, eds. *Current concepts in plant taxonomy*, no. 25. London: Academic Press, 157–180.

Guerra M, Santos KGB, Silva AEB, Ehrendorfer F. 2000. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - a case of parallel chromosomal evolution. *Am J Bot* 87(5): 735–747.

Guerra M. 2000. Chromosome number variation and evolution in monocots, in Wilson KL, Morrison DA (eds): *Monocots: Systematics and Evolution*, (CSIRO, Melbourne). 127–136.

Guerra M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet Mol Biol.* 23:1029–1041

Guerra M. 1988. *Introdução à Citogenética Geral*. Editora Guanabara, Rio de Janeiro.

Guerra, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic Genome Research*, 120: 339-350.

Guerra M. 1990. A situação da citotaxonomia de angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 4:75 – 86.

Guerra, M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity*, 71: 234 – 241.

Guerra, M. 2004. FISH-Conceitos e aplicações na citogenética. In: Pedrosa-Harand, A; Guerra, M. (eds.). *Contribuições da FISH para a citogenética de plantas*. SBG, Ribeirão Preto, pp. 33-59.

Haston E, Richardson JE, Stevens PF, Chase MW, Harri DJ. 2009. The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161: 128–131.

Huang S, Zhao Z, Chen Z, Chen S, Huang X. 1989. Chromosome counts on one hundred species and infraspecific taxa. *Acta Bot. Austro Sin.* 5: 161–176.

Hutchinson J: *The Families of Flowering Plants*. Vol II, Monocotyledons 2<sup>a</sup> ed., Clarendon Press, Oxford (1959).

Jiggins C, Salazar C, Linares M, Mavarez J. 2008. Hybrid trait speciation and *Heliconius* butterflies. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 3047–3054.

Jones K. 1998. Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution in higher plants. *Botanical Review* 64: 273-289.

Jones N, Houben A. 2003. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends Plant Sci.*, 8: 417-426.

Judd WS et al. 2007. Plant systematics: a phylogenetic approach. 3. ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 565 p.

Kaneko K. 1985. Karyomorphological studies of Hawaiian *Dracaena* and *Dianella*. Kromosomo 37: 1135–1139.

Kim ES, Punina EO, Rodionov AV. 2002. Chromosome CPD(PI/DAPI) and CMA/DAPI Banding Patterns in *Allium cepa* L. Russian Journal of Genetics. 38: 392–398.

Lara FJS. 1995. Hibridação de ácidos nucléicos. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.

Leitch AR, Leitch IJ. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. Science. 320: 481–483.

Leitch IJ, Bennett MD. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. Biological Journal of the Linnean Society. 82: 651–663.

Levin DA, Palestis BG, Jones RN, Trivers R. 2005. Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. Evolution. 59: 962–969.

Levsky JM, Singer RH. 2003. Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. Journal of Cell Science. 116: 2833–2838.

Liu JY, She CW, Hu ZL, Xiong ZY, Liu LH, Song YC. 2004. A new chromosome fluorescence banding technique combining DAPI staining with image analysis in plants. Chromosoma. 113: 16–21.

Luceño M, Vanzela ALL, Guerra M. 1998. Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. Can. J. Botany. 76: 440–449.

Lysak MA, Cheung H, Kitschke M, Bureš P. 2007. Ancestral chromosomal blocks are triplicated in Brassicaceae species with varying chromosome number and genome size. Plant Physiol. 145(2): 402–410.

Manzini G, Barselona ML, Avitabile M, Quadrifoglio F. 1983. Interaction of Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) with natural and synthetic Nucleic Acids. Nucleic Acids Res. 11: 8861–8876.



- Martin AR, Martins MA, Mattoso LHC, Silva ORRF. 2009. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 19: 40-46.
- Mathew PM e Vijayavalli B. 1989. Cytology of species of *Cordyline* and *Dracaena* from south India. *Cytologia*. 54: 573–579.
- Mckain MR, Wickett N, Zhang Y, Ayyampalayam S, McCombie WR, Chase MW, Pires JC, Depamphilis CW e Leebens-Mack J. 2012. Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in *Agavoideae* (Asparagaceae). *American Journal of Botany*. 99: 397–406.
- McKelvey SD, Sax K. 1933. *J. Arnold Arbor. Harv. Univ.* 14, 76-81.
- Meister A, Barow M. 2007. DNA base composition of plant genomes. In: Dolezel J, Greilhuber J, Suda J (eds) *Flow cytometry with plant cells*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 177-216.
- Mitchell JD, Daly DC. 1998. The ‘tortoise’s cajá’ – a new species of *Spondias* (Anacardiaceae) from southwestern Amazonia. *Britonia*. 50: 447–451.
- Moraes AP, Guerra M. 2010. Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). *Plant Syst Evol* 287:113–118.
- Moreno-Salazar SF, Esqueda M, Martínez J, Palomino G. 2007. Tamaño del genoma y cariotipo en *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* de Sonora, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 30: 13 – 23.
- Nederlof PM, van der Flier S, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ, Ploem JS, van der Ploeg M. 1990. Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*. 11: 126-131.
- Palomino G, Dolezel J, Méndez I, Rubluo A. 2003. Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia* 56:37–46.
- Palomino G, Martínez J, Méndez I. 2010. Análisis del tamaño del genoma y cariotipo de *Agave aktites* Gentry (Agavaceae) de Sonora, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 655-662.

Palomino G, Martínez J, Méndez I. 2005. Citotipos en *Agave angustifolia* Haw. determinados por citometría de flujo y análisis de sus cariotiops. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21:49–54.

Patil DA, Pai RM. 2011. The Agavaceae: Taxonomic and Phylogenetic Appraisal. *Journal of Experimental Sciences.* 2: 20-24.

Pedrosa A, Schweizer D, Guerra M. 2000. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theor Appl Genet.* 100: 361–367.

Pedrosa-Harand A, Souza de Almeida CC, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M. 2006. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor Appl Genet.* 112: 924–933.

Pereira RC, Davide LC; Techio VH, Timbo ALO. 2012. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. *Cienc. Rural.* 42: 1278-1285.

Pirani JR, Lopes RC. 2014. Agavaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB37>>. Acesso em: 09 Jun. 2014.

Pires JC, Maureira IJ, Givnish TJ, Sytsma KJ, Seberg O, Petersen G, Davis JI. 2006. Phylogeny, genome size, and chromosome evolution of Asparagales. *Aliso* 22: 287–304.

Robert ML, Lim KY, Hanson L, Sanchez-Teyer F, Bennett MD, Leitch AR, Leitch I. 2008. Wild and agronomically important *Agave* species (Asparagaceae) show proportional increases in chromosome number, genome size, and genetic markers with increasing ploidy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 158: 215–222.

Ruvalcaba-Ruiz D, Rodríguez-Garay B. 2002. Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. azul. *BMC Plant Biology* 2: 10–14.

Schubert I, Lysak M. 2011. Interpretation of karyotype evolution should consider structural constraints. *Genetics* 27: 207–216.

Schwarzacher T, Heslop-Harrison P. 2000. Practical in situ hybridization. Springer-Verlag, New York.

Schweizer D. 1976. Reverse fluorescent chromosome-banding with chromomycin A and DAPI. *Chromosoma* 58(4):307–324.

Sheidai, M, Inamdar AC. 1993. B-Chromosomes in *Asparagus L. nucleus*. *Calcutta*. 36: 141–144.

Silva Júnior JF, Bezerra JEF, Lederman IE, Alves MA, Melo Neto ML. 2004. Collecting, ex situ conservation and characterization of ‘cajá-umbu’ (*Spondias mombin* x *Spondias tuberosa*) germplasm in Pernambuco State, Brazil. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 343–349.

Silva SC, Martins MIG, Santos RC, Peñaloza APS, Melo Filho PA, Benko-Iseppon AM, Valls JFM, Carvalho R. 2010. Karyological features and banding patterns in *Arachis* species belonging to the *Heteranthae* section. *Plant Syst Evol*. 285: 201–207.

Simpson MG. 2006. *Plant Systematics*. Elsevier Academic Press.

Smith CI, Pellmyr O, Althoff DM, Balcazar-Lara M, Leebens-Mack J, Segraves KA. 2008. Pattern and timing of diversification in *Yucca* (Agavaceae): specialized pollination does not escalate rates of diversification. *Proc. R. Soc. B*. 275: 249–258.

Soares-Scott MD. 1998. Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora*. (Dissertação). Campinas. UNICAMP. 89p.

Souza MM, Pereira TNS, Vieira MLC. 2008. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 51: 247-258 (2008).

Souza VC, Lorenzi H. 2012. *Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III*. 3ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.

Stancus A, Goodisman J, Dabrowiak C. 1992. Quantitative Foot printing Analysis of the Chromomycin A<sub>3</sub>-DNA Interaction, *Biochemistry*. 31: 9310-9318.

Stebbins, GL. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold, London.

Summer, AT. 2003. *Chromosomes: Organization and Function*. Blackwell Publishing. pp. 287.

Sumner, AT. 1990. Chromosome Banding, London: Unwin Hyman.

Traub HP. 1975. Class Liliida of superclass Monocotydra, Taxon. 24: 453-460.

Vanzela ALL, Luceño M, Guerra M. 2000. Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). Bot. J. Linn. Soc. 134: 557-566.

Verhoek S. 1998. Agavaceae. In: Kubitzki K (ed.). Flowering Plants: Monocotyledons. Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp. 60-70.

Vijayavalli B, Mathew PM. 1990. Cytotax. Liliaceae Allied Fam. Continental Publishers, Kerala, India.

Vosa CG. 2005. On chromosome uniformity, bimodality and evolution in the tribe Aloineae (Asphodelaceae). Caryologia 58: 83–85.

Warner DA, Edwards GE. 1989. Effects of polyploidy on photosynthetic rates, photosynthetic enzymes, contents of DNA, chlorophyll, and sizes and numbers of photosynthetic cells in the C4 dicot *Atriplex confertifolia*. Plant Physiol. 91: 1143- 1151.

Wetschnig W, Pfosser M. 2003. The *Scilla plumbea* puzzle - present status of the genus *Scilla sensu lato* in southern Africa and description of *Spetaea lachenaliiflora*, a new genus and species of Massonieae (Hyacinthaceae). Taxon 52:c75–91.

White MJD. 1978. Modes of speciation. Freeman, San Francisco, California. p. 455.

Yamashita J e Tamura MN. 2004. Phylogenetic analyses and chromosome evolution in Convallarieae (Ruscaceae *sensu lato*), with some taxonomic treatments. J. Pl. Res. 117: 363–370.

Yeo PF. 1985. The families of the monocotyledons. Structure, evolution, and taxonomy Springer-Verlag, Berlin.

Yoshida, M., H. Takusagawa, Y. Kashiwagi & T. Yasukawa. 1976. On polyploidy of garden varieties II. *Tulipa gesneriana* L. Tottori-daigaku Iry; amogijutsu Tanki-daigakubu Kenky; amu H; amokoku. 1:12–17.

**MANUSCRITO**

---

**Caracterização Citogenética de Representantes de Asparagaceae *s.l.* com Ênfase nas Subfamílias Agavoideae, Lomandroideae e Nolinoideae**

## Caracterização Citogenética de Representantes de Asparagaceae *s.l.* com Ênfase nas Subfamílias Agavoideae, Lomandroideae e Nolinoideae

### Resumo

Asparagaceae *s.l.* é citologicamente caracterizada pela ocorrência mais ou menos acentuada de cariótipos bimodais e evolução por poliploidia. Este trabalho objetivou analisar a variabilidade cariotípica em representantes de três subfamílias de Asparagaceae e suas implicações taxonômicas, através do emprego de técnicas de coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, seguida pela hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 5S e 45S. Todas as 14 espécies analisadas apresentaram cariótipos bimodais ou levemente bimodais, constituídos por cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e/ou acrocêntricos. Os números cromossômicos variaram de  $2n = 38$  em *Cordyline fruticosa* a  $2n = \text{ca. } 180$  em *Agave decipiens*. O tamanho cromossômico médio variou de  $0,38 \mu\text{m}$  em *Furcraea foetida* a  $3,76 \mu\text{m}$  em *Furcraea selloa*. Os representantes analisados da subfamília Agavoideae apresentaram bandas CMA<sup>+</sup> intersticiais, com dois a quatro sítios de DNAr 45S e 5S em *A. angustifolia*, *A. wocomahi* e *F. selloa*. Por outro lado, as espécies da subfamília Nolinoideae, apresentaram bandas CMA<sup>+</sup> pericentroméricas, com dois sítios de DNAr 45S e 5S em *D. aubryana* e *S. trifasciata* e seis sítios de 45S e 5S em *S. cylindrica*. É possível que as dificuldades encontradas para compreender as relações filogenéticas entre as Agavoideae, Nolinoideae e Lomandroideae estejam relacionadas ao fato de as mesmas compartilharem em parte o mesmo genoma ancestral e de terem sofrido, de forma independente, diferentes alterações e rearranjos nos seus genomas.

Palavras-chave: Bimodalidade, evolução cariotípica, poliploidia e disploidia.

### Abstract

Asparagaceae *s.l.* is cytologically characterized by presenting bimodal karyotypes more or less pronounced and evolution through polyploidy. This study aimed to analyze the karyotype variability in representatives of three Asparagaceae subfamilies and its taxonomic implications, with staining techniques by using CMA and DAPI fluorochromes, followed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with 45S and 5S rDNA probes. All the 14 species showed bimodal or slightly bimodal karyotypes with metacentric, submetacentric and/or acrocentric chromosomes. Chromosome numbers ranged from  $2n = 38$  in *Cordyline fruticosa* to  $2n = \text{ca. } 180$  in *Agave decipiens*. The average chromosome size ranged from  $0.38 \mu\text{m}$  in *Furcraea foetida* to  $3.76 \mu\text{m}$  in *F. selloa*. Representatives of the subfamily Agavoideae analyzed showed CMA<sup>+</sup> interstitial bands, with two to four 5S and 45S rDNA sites verified *A. angustifolia*, *A. wocomahi* and *F. selloa*. On the other hand, the species of the subfamily Nolinoideae showed CMA<sup>+</sup> pericentromeric bands with two 45S and 5S rRNA sites observed in *D. aubryana* and *S. trifasciata* and six 45S and 5S sites in *S. cylindrica*. It is possible that the difficulties in understanding the phylogenetic relationships between Agavoideae, Nolinoideae and Lomandroideae are related to the fact that they partly share the same ancestral genome and have suffered, independently, several changes and rearrangements in their genomes.

**Keywords:** Bimodality, disploidy, karyotype evolution and polyploidy.

## Introdução

A ordem Asparagales é bem definida, embora o número de famílias com sua circunscrição e taxa relacionados são controversas [Seberg et al, 2012]. Asparagales é constituído por dois clados bem suportados, Alliaceae *s.l.* e Asparagaceae *s.l.* No último clado foram reunidas, recentemente, sete famílias (Agavaceae, Aphyllanthaceae, Asparagaceae *s.s.*, Hyacinthaceae, Laxmanniaceae, Ruscaceae e Themidaceae) [APG III, 2009; Chase et al., 2009], com distribuição cosmopolita, e cerca de 2500 espécies, distribuídas em 120 gêneros. As famílias que formam a atual Asparagaceae *s.l.* são heterogêneas, em termos morfológicos e citológicos, e isto dificulta suas circunscrições. Além disso, a caracterização molecular e citogenética da família é insuficiente para hipóteses filogenéticas [APG III, 2009; Patil e Pai, 2011] e assim, questões como padrões de divergências morfológicas e evolução cromossômica não são ainda inteiramente compreendidas, incluindo as subfamílias Agavoideae, Lomandroideae e Nolinoideae [Chase et al., 2009]. Estes táxons possuem circunscrições bastante controversas entre os diferentes tratamentos taxonômicos propostos para a família [Thorne, 1992; Eguiarte, 1995; APG I, 1998; APG II, 2003; APG III, 2009]. Mesmo sendo heterogêneas algumas espécies destes táxons apresentam altos graus de convergência morfológica dentro das subfamílias. Isto pode ser visualizado no habitat preferencial do grupo que se desenvolve em lugares áridos similares e, por conseguinte possuem características morfológicas muito semelhantes [Eguiarte, 1995], como também através da homologia genética entre estes táxons [Chupov, 2013].

Filogenias moleculares têm proporcionado a algumas subfamílias de Asparagaceae subtrações e adições de gêneros como, por exemplo, a inclusão de *Camassia* Lindl. e *Chlorogalum* Kunth e, gêneros próximos como *Herreria* Ruiz et Pav. [APG I, 1998] em Agavoideae, baseada em sequências gênicas como ITS, *ndhF* e *rbcL* [Bogler et al. 2006]. Estas mesmas filogenias baseadas em dados moleculares têm procurado esclarecer a circunscrição de alguns táxons da subfamília Agavoideae [Eguiarte, 1995; Bogler e Simpson, 1995, 1996; Kim et al., 2010; Lu e Morden, 2014] e estas apresentam similaridades entre si. A delimitação taxonômica a nível infrafamília e sua relação com os grupos mais próximos não é bem definida, mesmo após diversas abordagens moleculares utilizando sequências gênicas como, gene *rbcL* [Duvall et al., 1993; Eguiarte et al., 1994; Chase et al., 1995] e ITS [Bogler e Simpson, 1996], que confirmam o parafiletismo de alguns dos representantes que compõem a família Asparagaceae. Isto é perceptível pelo controvertido posicionamento de alguns gêneros como *Cordyline*, *Dracaena* e *Sansevieria* que dependendo do sistema de classificação

podem estar inseridos em Agavaceae [Hutchinson, 1959], ou separados em famílias ou subfamílias distintas [Dahlgren et al., 1985, APG I, 1998; APG II, 2003; APG III, 2009].

Outra ferramenta para a elucidação do caminho evolutivo são análises citogenéticas úteis aos estudos taxonômicos, podendo revelar afinidades citogenéticas como número básico ( $x$ ) e proporcionar informações de similaridades e diferenças cromossômicas entre populações e espécies. A maior parte dos estudos citológicos da família Asparagaceae refere-se a registros de contagens cromossômicas, outros estudos estão iniciando uma nova fase no entendimento da evolução genética deste táxon, como em outros taxons vegetais [Palomino et al., 2003, 2005, 2010; Adams et al., 2001].

Análises citogenéticas em *Agave angustifolia*, *A. aktites* e *A. tequilana* sugerem a existência de variações cromossômicas numéricas e estruturais ocorrentes na subfamília Agavoideae [Palomino et al., 2010; Moreno et al., 2007; Palomino et al., 2003]. Sugerindo que análises cariotípicas de espécies relacionadas podem ser utilizadas para caracterizar o cariótipo, padrões e direções da evolução cromossômica dentro dos taxa, bem como entender o papel evolutivo de tais variações [Peruzzi et al., 2009]. Neste sentido, divergências taxonômicas podem ter respostas com o entendimento das variações cromossômicas numéricas ou estruturais por meio do conhecimento dos cariótipos das espécies analisadas [Guerra, 2008]. Isto pode ser realizado através da identificação dos padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva em diferentes espécies utilizando coloração diferencial como, por exemplo, CMA/DAPI. Bem como pelo mapeamento físico dos sítios de DNA ribossomais, através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH). A detecção da ocorrência e da posição física de diferentes sequências de DNA repetitivo, geralmente visualizado como blocos de heterocromatina, implica na melhor compreensão de como os genomas estão organizados; das relações entre espécies, gêneros e famílias. Além de compreender os mecanismos de ajustes genéticos que ocorrem nos cariótipos de diferentes organismos durante o processo evolutivo [Souza et al., 2008; Soares-Scott, 1998]. O presente trabalho teve por objetivo a caracterização citogenética de representantes de Asparagaceae, especialmente os gêneros relacionados *Agave*, *Cordyline*, *Dracaena*, *Furcraea*, *Sansevieria* e *Yucca* em Agavaceae *sensu* Hutchinson (1959), através da identificação dos padrões de heterocromatina constitutiva utilizando a dupla coloração (CMA/DAPI), e localizar a posição física das sequências de DNAr 5S e 45S pela hibridização *in situ* fluorescente (FISH) visando esclarecer o caminho evolutivo cromossômico destes gêneros e entender as relações filogenéticas destes taxons.



## Material e Métodos

Foram analisadas 14 espécies da família Asparagaceae, distribuídas entre as subfamílias Agavoideae (8spp.), Lomandroideae (1sp.) e Nolinoideae (5spp.), coletadas na região Nordeste do Brasil (Tabela 1). Exsicatas de todo material estudado foram depositadas no Herbário Prof. Jayme Coelho de Moraes (EAN) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba na cidade de Areia.

### Preparação cromossômica

Para as análises mitóticas foi seguido o protocolo de Guerra e Souza [2002]. Pontas de raízes jovens obtidas a partir de plantas adultas cultivadas em vasos plásticos foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (0,002 M) por 24 h a 10°C, posteriormente fixadas em etanol-ácido acético 3:1 (v/v) por 2 horas à temperatura ambiente e, em seguida, estocadas em *freezer* a -20°C até posterior análise. Para a preparação das lâminas as pontas de raízes foram lavadas em água destilada e digeridas em uma solução enzimática contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma) (w/v) por 30 min a 37°C. Em seguida, as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento, em uma gota de ácido acético 45%, e as lamínulas retiradas por congelamento em nitrogênio líquido. As lâminas foram coradas com uma solução de DAPI (2 µg/ml): glicerol (1:1, v/v) para permitir a seleção das melhores preparações. Subsequentemente, elas foram descoradas em etanol-ácido acético (3:1) por 30 min e mantidas em etanol absoluto por duas horas à temperatura ambiente ou a 10°C até o dia seguinte, secas ao ar e envelhecidas por três dias à temperatura ambiente.

Coloração com os fluorocromos CMA (cromomicina A<sub>3</sub>) e DAPI (4'-6, diamidino-2-fenilindol)

A coloração com os fluorocromos CMA e DAPI foi realizada de acordo Barros & Silva e Guerra [2010], com pequenas modificações. Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com 10 µL de CMA (0,1 mg/ml) por uma hora em câmara escura úmida. Para retirar o excesso de corante as lâminas foram lavadas com água destilada, em seguida coradas com 10 µL de DAPI (1 µg/ml) por meia hora, também mantidas em câmara úmida e lavadas com água destilada. As lâminas foram secas ao ar e montadas com meio contendo glicerol/tampão McIlvaine pH 7,0 (1:1), e estocadas por três dias no escuro para estabilização dos

fluorocromos. As melhores metáfases foram analisadas em fotomicroscópio Zeiss® com câmera de vídeo Axio Cam MRC5 usando o *software* Axiovision® 4.8.

#### Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Dentre as lâminas analisadas pela dupla coloração as melhores, as que apresentaram maior índice de células em metáfase, foram submetidas à localização dos sítios de DNAr 5S usando a sonda D2 de *Lotus japonicus*, com 500 pb, e DNAr 45S a utilizando a sonda R2 de *Arabidopsis thaliana*, com 6,5 kb (unidade de repetição 18S-5,8S- 25S). Para o DNAr 5S, a sonda foi marcada diretamente por *nick translation* (Invitrogen) com Cy3-dUTP (Amersham), e com digoxigenina-11-dUTP (Roche), para o DNAr 45S. A FISH foi desenvolvida conforme Pedrosa et al. [2002] com pequenas modificações. A mistura de hibridização constitui de 50% de formamida (v/v), 10% de dextran sulfato (w/v), 2×SSC e 5 ng/μl de cada sonda. O nível de estringência final da hibridização foi de 76%. A sonda de DNAr 45S foi detectada com anticorpo antidigoxigenina conjugada com FITC produzida em ovelha (Roche) e o sinal amplificado com anticorpo contra anticorpos de ovelha, produzido em coelho, conjugado com FITC (Sigma). Todas as preparações foram contracoradas e montadas com 2 μg/ml de DAPI em Vectashield (Vector) e as imagens das células capturadas como descrito acima para a coloração com fluorocromos.

#### Análises cariomorfológicas e medidas cromossômicas

Os cariótipos foram mensurados com a utilização do *software* Image Tool® 3.0. A nomenclatura cromossômica aplicada foi a de Guerra [1986] que identifica os cromossomos pela posição do centrômero através da razão entre os braços (R) ou pelo índice centromérico, sendo à primeira utilizada neste trabalho. Assim, para cada espécie foram utilizadas no mínimo três metáfases. A tabela 1 sumariza os resultados obtidos para todas as espécies analisadas, incluindo dados do coletor, local de coleta, contagens cromossômicas, fórmula de bimodalidade, padrões de bandas e posição dos sítios de DNAr (45S e 5S). Para descrição da fórmula cariotípica bimodal foram usados os símbolos seguintes: *l* (*larger*) para cromossomos maiores e *s* (*smaller*) para cromossomos menores.

## Resultados

Todas as espécies analisadas apresentaram cariótipos bimodais ou levemente bimodais, constituídos por cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e/ou acrocêntricos. Os números cromossômicos variaram de  $2n = 38$  em *Cordyline fruticosa* a  $2n = \text{ca. } 180$  em *Agave decipiens*. O tamanho cromossômico médio variou de  $0,38 \mu\text{m}$  em *Furcraea foetida* a  $3,76 \mu\text{m}$  em *Furcraea selloa*. As espécies que foram analisadas através da FISH, apresentaram apenas dois sítios de DNAr 5S por conjunto diploide, localizados na região intersticial de um dos menores pares cromossômicos. Os resultados obtidos no presente trabalho estão sumarizados na tabela 1.

### **Subfamília Agavoideae**

Entre as oito espécies analisadas da subfamília Agavoideae cinco (*Agave angustifolia*, *Furcraea foetida*, *F. gigantea*, *F. selloa* e *Yucca aloifolia*) apresentaram um cariótipo formado por 60 cromossomos, sendo 10 grandes (*l*) e 50 pequenos a medianos (*s*). *Agave angustifolia* apresentou bandas  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$  na região intersticial do braço longo de um par acrocêntrico e em um par cromossômico do tipo *s* na região intersticial  $\text{CMA}^+$  (Fig. 3a). *Furcraea foetida*, *F. gigantea*, *F. selloa* e *Yucca aloifolia* apresentaram banda  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$  na região intersticial de um par cromossômico de tamanho mediano (Fig. 4a-c, e). Além disso, *Y. aloifolia* apresentou um par de bandas  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$  intersticiais em um par cromossômico do tipo *s*, pequenas e nem sempre visíveis (Fig. 4e). Estas bandas  $\text{CMA}^+$  co-localizaram com sítios de DNAr 5S (Fig. 4e-f).

*Agave americana* (Fig. 3e) e *A. wocomahi* (Fig. 3c) apresentaram  $2n = 4x = 120$  ( $20l + 100s$ ), enquanto *A. decipiens* (Fig. 3f) apresentou  $2n = 6x = \text{ca. } 180$  ( $30l + 150s$ ). As espécies tetraplóides apresentaram quatro bandas  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ , localizadas na região intersticial de dois pares cromossômicos maiores do tipo *l* (Fig. 3c, e). A espécie hexaploide apresentou dez bandas  $\text{CMA}^+$  intersticiais, oito em quatro pares cromossômicos maiores e duas em um par cromossômico mediano (tipo *s*) (Fig. 3f). Nas espécies da subfamília Agavoideae que foram submetidas à FISH, os sítios de DNAr 45S sempre corresponderam as bandas  $\text{CMA}^+$  (Figs. 3b, d, 4d), exceto as pequenas bandas terminais e intersticiais observadas em *A. angustifolia* e *Y. aloifolia*.

### **Subfamília Nolinoideae**

Todas as espécies desta subfamília apresentaram  $2n = 2x = 40$ , com  $8l + 32s$  em *Dracaena aubryana* (Fig. 1a), *D. fragans* (Fig. 1c) e *D. braunii* (Fig. 1d) e *Sansevieria trifasciata* (Fig. 1e). Contudo, *S. cylindrica* (Fig. 2a) apresentou  $2n = 6x = 120$ , com  $20l$  e  $100s$ . Nas espécies do gênero *Dracaena* cada conjunto cromossômico diploide apresentou a bimodalidade  $8l + 32s$  e duas bandas  $\text{CMA}^+$  pericentromérica proeminente, em um dos

maiores pares cromossômico, correspondente aos sítios de DNAr 45S (Fig. 1a-d). *D. aubryana* apresentou também fracas bandas CMA<sup>+</sup> na região pericentromérica dos demais cromossomos do complemento cromossômico e bandas DAPI<sup>+</sup> nas regiões terminais de quase todos os cromossomos (Fig. 1a).

*Sansevieria trifasciata* com  $2n = 2x = 40 (8l + 32s)$  apresentou um par de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> em região pericentromérica em um dos maiores pares do conjunto cromossômico (Fig. 1e), enquanto *Sansevieria cylindrica* com  $2n = 6x = 120 (20l + 100s)$  apresentou três pares de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> pericentroméricas proeminentes nos maiores pares cromossômicos do complemento (Fig. 2a) Em ambos os casos as bandas CMA corresponderam aos sítios de DNAr 45S (Figs. 1f e 2b).

#### **Subfamília Lomandroideae**

*Cordyline fruticosa* com  $2n = 2x = 38 (2n = 10l + 28s)$  apresentou um par de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> pericentroméricas em um dos pares maiores, que provavelmente correspondem a sítios de DNAr 45S (Fig. 2c).

### **Discussão**

A família Asparagaceae [*sensu* APG III, 2009] parece ser taxonomicamente desarmônica por abrigar representantes com alta diversidade morfológica [Patil e Pai, 2011] e cuja circunscrição e relações filogenéticas não são consenso entre os autores [Cronquist, 1981; Dahlgren e Clifford, 1982; Yeo, 1985]. Vários gêneros das subfamílias Agavoideae, Nolinoideae e Lomandroideae têm sido reunidos dentro da família Agavaceae [Hutchinson, 1959] ou subdivididos em famílias distintas [Dahlgren et al., 1985; Thorne, 1992; APG I, 1998; APG II, 2003]. Citologicamente, este grupo é caracterizado pela ocorrência mais ou menos acentuada de cariótipos bimodais.

Os números cromossômicos por complemento diploide encontrados no presente trabalho estão de acordo com aqueles previamente reportado na literatura [Goldblatt, 1984, 1985 e 1988; Goldblatt e Johnson, 1990, 1991, 1994, 1996, 1998, 2000, 2003, 2006 e 2010; Carvalheira et al., 1991; Palomino et al., 2005]. As espécies dos gêneros *Agave*, *Yucca* e *Furcraea* se caracterizam por apresentar um cariótipo tipicamente bimodal, onde o complemento monoploide é constituído por  $5l + 25s$  [Patil e Pai, 2011; Palomino et al., 2005, 2008, 2010; McKain et al., 2012]. Por outro lado, as espécies de *Dracaena*, *Sansevieria* e *Cordilyne* estudadas no presente trabalho apresentaram um cariótipo simétrico, com a presença de quatro a cinco pares cromossômicos um pouco maiores.

A família Asparagaceae apresenta grande variação cromossômica numérica, com registro de números cromossômicos que variam desde  $2n = 10$  em *Resnova humifusa* [Wetschnig e Pfosser, 2003] a  $2n = 180$  para *Agave decipiens* [Banerjee e Sharma, 1989]. Esta variação cromossômica pode ser explicada a partir de um possível ancestral com número básico  $x = 7$ , em que este número tenha sofrido eventos seguidos de poliploidia e disploidias [Darlington, 1963 apud Patil e Pai, 2011] resultando na variabilidade cromossômica, isto pode ser corroborado por espécies que apresentam  $n = 7$  e  $n = 30$  como, por exemplo, *Chlorophytum kirkii* Baker e *Agave tequilana* Weber, respectivamente.

A origem do cariótipo bimodal dos atuais representantes da subfamília Agavoideae tem sido investigada por diversos autores. De uma forma geral tem sido demonstrado que os principais mecanismos envolvidos na formação de um cariótipo bimodal são eventos de disploidias [Schubert e Lysak, 2011] ou alopoliploidia [Mckain et al., 2012].

No caso das disploidias, cromossomos grandes teriam surgido por fusão de cromossomos pequenos e/ou cromossomos pequenos teriam surgido pela fissão de cromossomos grandes ou por processos de translocações não-recíprocas. Apesar de Robert et al. [2008] não terem encontrado sinais de DNA telomérico nas regiões pericentroméricas ou intersticiais dos cromossomos de *Agave*, o que evidenciaria a ocorrência de fusões cromossômica. Contudo, esta hipótese não pode ser descartada visto que estas sequências de DNA podem ter desaparecidas ao longo da evolução deste táxon. A segunda hipótese para origem do cariótipo bimodal é alopoliploidia, envolvendo espécies parentais com tamanhos cromossômicos diferentes. Isso tem sido demonstrado por hibridação genômica *in situ* (GISH) em algumas espécies, como em *Emilia fosbergii*, com  $2n = 20$ , cariótipo bimodal, sendo 10 menores e 10 maiores, e em *Millium* com 8 menores e 8 maiores. [Bennett et al., 1992].

Recentemente, McKain et al. [2012] através da análise de sequenciamento de transcriptoma sugeriram que o cariótipo bimodal deste grupo teria originado por alopoliploidia, envolvendo um ancestral com cromossomos maiores (*l*) e um outro com cromossomos menores (*s*). Segundo esses autores, pelo menos dois eventos independentes de poliploidia ocorreram dentro das Agavoideae, um dos quais formou o clado que originou as *Agave-Yucca* (incluindo *Furcraea*).

Segundo essa hipótese e com base nas análises cariológicas poderíamos imaginar a ocorrência de um ancestral comum para as Agavoideae, Nolinoideae e Lomandroideae. As Agavoideae poderiam ter surgido por eventos de hibridização e poliploidização entre uma espécie hipotética com  $2n = 10$ , com cromossomos longos e uma espécie com  $2n = 40$  com cromossomos menores. Desta forma teria surgido um indivíduo com  $2n = 50$  que, por

disploidia ascendente, envolvendo cinco pares do conjunto menor, originou o cariótipo com  $2n = 60$  do clado das Agavoideae (Figura 5).

Considerando que o número básico ancestral para esse grupo seria  $x = 7$ , como proposto por Darlington [1963 apud Patil e Pai, 2011], a espécie com  $2n = 40$ , doadora dos cromossomos  $s$  já seria um poliploide diploidizado, proveniente da mesma linhagem ancestral que deu origem as *Dracaena*, *Sansevieria*, *Cordyline* e gêneros proximamente relacionados. Neste caso, os cromossomos medianos observados em *Agave*, *Yucca* e *Furcraea* corresponderiam aos maiores cromossomos de *Dracaena*, *Sansevieria* e *Cordyline*.

Durante o processo de diploidização das espécies das Agavoideae os sítios duplicados de vários genes foram eliminados, entre os quais os genes para DNAr 5S e DNAr 45S. Nas Agavoideae, tanto os sítios de DNAr 5S quanto os sítios de DNAr 45S foram preferencialmente eliminados do genoma proveniente do parental doador dos cromossomos  $l$ , exceto em *Agave*, onde os sítios de DNAr 45S perdidos foram aqueles originários do doador do genoma com cromossomos  $s$ . Desta forma, os pares cromossômicos portadores dos sítios de DNAr 45S e 5S nas diferentes espécies analisadas seriam homeólogos entre si (exceto o par portador do DNAr 45S em *Agave*). A presença dos sítios de DNAr 45S e 5S, no conjunto  $l$  e  $s$ , respectivamente, também foi confirmada em outras espécies e variedades de *Agave* [Robert et al., 2008; Gomes-Rodrigues et al., 2013]. A eliminação preferencial dos sítios de DNAr de um dos genomas parentais em aloploplóides tem sido relatado em alguns grupos de plantas, como nas espécies alotetraplóides pertencentes a sessão *Repandae* (*Nicotiana*) [Leitch et al., 2005]. Neste caso os sítios de DNAr 5S foram perdidos do parental paterno enquanto os sítios de DNAr 45S eliminados foram aqueles pertencentes ao parental materno.

Apesar da poliploidia ser considerada principal evento associado a evolução cariotípica dentro das angiospermas [Leitch et al., 2010], outros mecanismos como disploidia, inversões cromossômicas, deleção e amplificação de sequências devem está também envolvidos na evolução do grupo como um todo [ver por exemplo, Gomes-Rodrigues et al., 2013]. Muitas espécies de *Dracaena*, *Sansevieria* e *Cordyline* possuem  $n = 20$  e/ou  $n = 19$  ou múltiplos desses [Chupov, 2013]. Considerando que todo esse grupo possui uma linhagem ancestral comum, as espécies com  $2n = 40$  surgiram provavelmente por eventos de poliploidia, a partir de um ancestral com  $n = 10$ , enquanto as espécies com  $2n = 38$  podem ter surgido por eventos de poliploidia seguido de disploidias. Uma evidência favorável a essa hipótese é o fato que *C. fruticosa* ( $2n = 38$ ) apresentou um par cromossômico do tipo  $l$  a mais, e dois pares cromossômicos do tipo  $s$  a menos ( $10l + 28s$ ) em relação às espécies *Dracaena* analisadas aqui e *S. trifasciata*, todas com  $2n = 40$  sendo  $8l + 32s$ .

*Yucca aloifolia* foi a única espécie analisada que apresentou os sítios de DNAr 5S co-localizados com uma pequena banda CMA. A co-localização de sítios de DNAr 5S com blocos CMA e/ou DAPI é um evento menos frequente em plantas, mas tem sido observado em algumas espécies de plantas como, por exemplo, em *Maxillaria* [Cabral et al., 2006]. A unidade do DNAr 5S é composta por uma região codificante bastante conservada, formada por 120 pb, e um espaçador não-transcrito (NTS), que pode variar entre as espécies tanto em relação ao tamanho quanto a composição dos pares de bases [Shibata e Hizume, 2002]. A formação de um tetranucleotídeo do tipo G-G-C-C na região do NTS, condição necessária para ocorrer a ligação CMA-DNA [Hou et al., 2004], seguido por uma homogenização dos *repeats* do DNAr 5S de *Y. aloifolia* poderia explicar a maior afinidade do CMA<sup>+</sup> por essa região.

Ao longo da evolução, distintas sequencias satélites surgiram nos diversos clados de Asparagaceae. Os blocos heterocromáticos CMA<sup>-</sup>/DAPI<sup>+</sup> observados em quase todos os cromossomos de *D. aubryana* podem ser constituídos por uma única sequencia satélite espalhada por todos os cromossomos através de recombinação ectópica ou com auxílio de elementos transponíveis, e estudos recentes têm demonstrado a presença de uma grande quantidade de elementos transponíveis em vários representantes de Asparagaceae, sugerindo que esses elementos possuam um papel importante na evolução dos genomas dessa família [Herteweck, 2013; Khaliq et al., 2012]. Por outro lado, o pequeno bloco CMA<sup>+</sup>, observado na região terminal de um único par cromossômico de *A. angustifolia* pode representar uma característica recente (apomorfia), visto que este bloco não foi observado em nenhuma outra espécie de *Agave* ou gêneros próximos.

É possível que as dificuldades encontradas para compreender as relações filogenéticas entre as Agavoideae, Nolinoideae e Lomandroideae estejam relacionadas ao fato das mesmas possuírem um dos dois genomas ancestrais em comum e de terem sofrido posteriormente diferentes alterações e rearranjos nos seus genomas.

## Referências

- APG: An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 531 – 553 (1998).
- APG II: An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399 (2003).

- APG III: An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 161:105–121 (2009).
- Banerjee S, Sharma AK: Structure and behaviour of chromosomes in four different species of *Agave*. *Cytologia* 54:667-672 (1989).
- Barros e Silva AE, Guerra M: The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotech Histochem* 85:115–125 (2010).
- Bennett ST, Kenton AY, Bennett MD: Genomic *in situ* hybridization reveals the allopolyploid nature of *Milium montianum* (Gramineae). *Chromosoma* 101:420–424 (1992).
- Bennetzen JL: Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants. *Genetica*, 115(1):29–36 (2002).
- Bogler DJ, Pires JC, Francisco-Ortega J: Phylogeny of Agavaceae based on *ndhF*, *rbcL* and ITS sequences: Implications of molecular data for classification. *Aliso* 22:313 – 328 (2006).
- Bogler DJ, Simpson BB: A chloroplast DNA study of the Agavaceae. *Systematic Botany*, 20:191-205 (1995).
- Bogler DJ, Simpson BB: Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation. *Am J Bot* 83:1225–1235 (1996).
- Cabral JS, Felix LP, Guerra M: Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S DNAr sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genet. Mol. Biol.*, 29: 659-664 (2006).
- Carvalho GMG, Guerra M, Santos GA, Andrade VC, Farias MCA: Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco IV. *Acta Bot. Brasil* 5:37–51 (1991).
- Chase MW, Duvall MR, Hills HG, Conran JG, Cox AV, Eguiarte LE, Hartwell J, Fay MF, Caddick LR, Cameron KM, Hoot S: Molecular phylogenetics of Liliaceae, pp. 109–137. *In* P. J. Rudall, P. J. Cribb, D. F. Cutler, and C. J. Humphries (eds.), *Monocotyledons: systematics and evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK (1995).
- Chase MW, Reveal JL, Fay MF: A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Bot J Linn Soc* 161:132–136 (2009).
- Chupov VS: Dynamics of chromosome number in long structured phylogenetic branch of monocotyledons: A general scheme of karyotype evolution. *Uspekhi Sovremennoi Biologii*, 133(3):227–253 (2013).
- Cronquist A: *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press (1981).

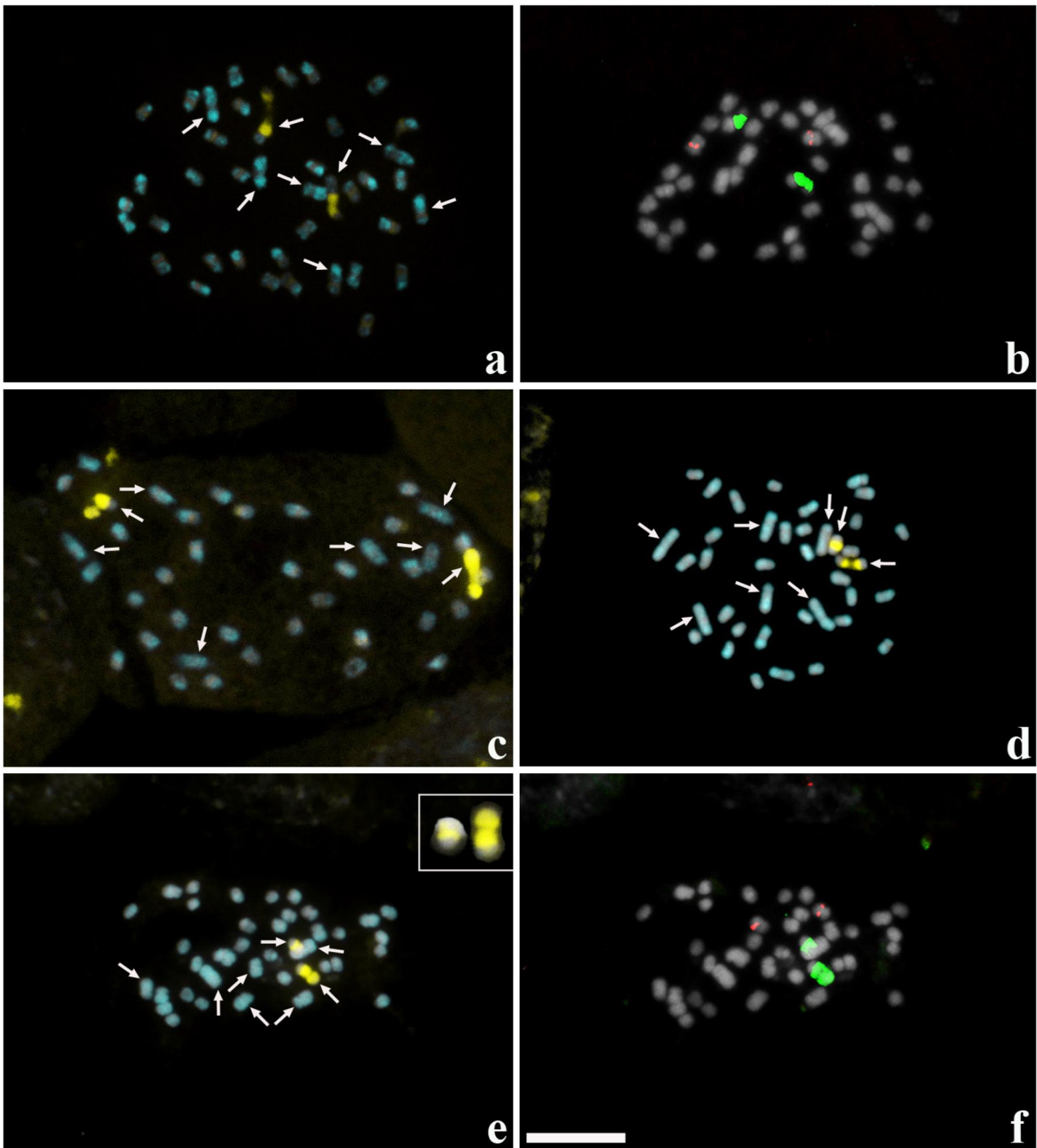


- Dahlgren RM, Clifford HT, Yeo PF: The Families of Monocotyledons. Springer, Berlin (1985).
- Dahlgren RMT, Clifford HT: The monocotyledons: a comparative study. Academic Press, New York (1982).
- Duvall MR, Clegg MT, Chase MW, Clark WD, Kress JW, Hills HG, Eguiarte LE, Smith JF, Gaut BS, Zimmer A, Learn Jr.GH: Phylogenetic hypothesis for the Monocotyledons constructed from *rbcL* sequence data. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80:607-619 (1993).
- Eguiarte LE, Duvall MR, Learn JR GH, Clegg MT: The systematic status of the Agavaceae and Nolinaceae and related Asparagales in the Monocotyledons: an analysis based on the *rbcL* gene sequence. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 54:35-56 (1994).
- Eguiarte LE: Hutchinson (Agavales) Vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. *Bol. Soc. Bot. México* 56:45-56 (1995).
- Goldblatt P, Johnson DE: Index to plant chromosome numbers 1988-1989. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 40:1-238 (1991).
- Goldblatt P, Johnson DE: Index to plant chromosome numbers 1990-1991. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 51:1-267 (1994).
- Goldblatt P, Johnson DE: Index to plant chromosome numbers 1994-1995. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 69:1-208 (1998).
- Goldblatt P, Johnson DE: Index to plant chromosome numbers 1996-1997. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 81:1-188 (2000).
- Goldblatt P, Johnson DE: Index to plant chromosome numbers 1998-2000. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 94:1-297 (2003).
- Goldblatt P, Johnson DE: Index to plant chromosome numbers 2001-2003. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 106:1-242 (2006).
- Goldblatt P, Johnson DE: Index to plant chromosome numbers 2004-2006. *Regnum Veg.* 152:1-246 (2010).
- Goldblatt P, Johnson DE: Index to plant chromosome numbers 1986-1987. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 30:1-243 (1990).
- Goldblatt P: Index to Plant Chromosome Numbers, 1984-1985. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 23:1-264 (1988).
- Goldblatt P: Index to Plant Chromosome Numbers, 1979-1981. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 8:1-427 (1984).

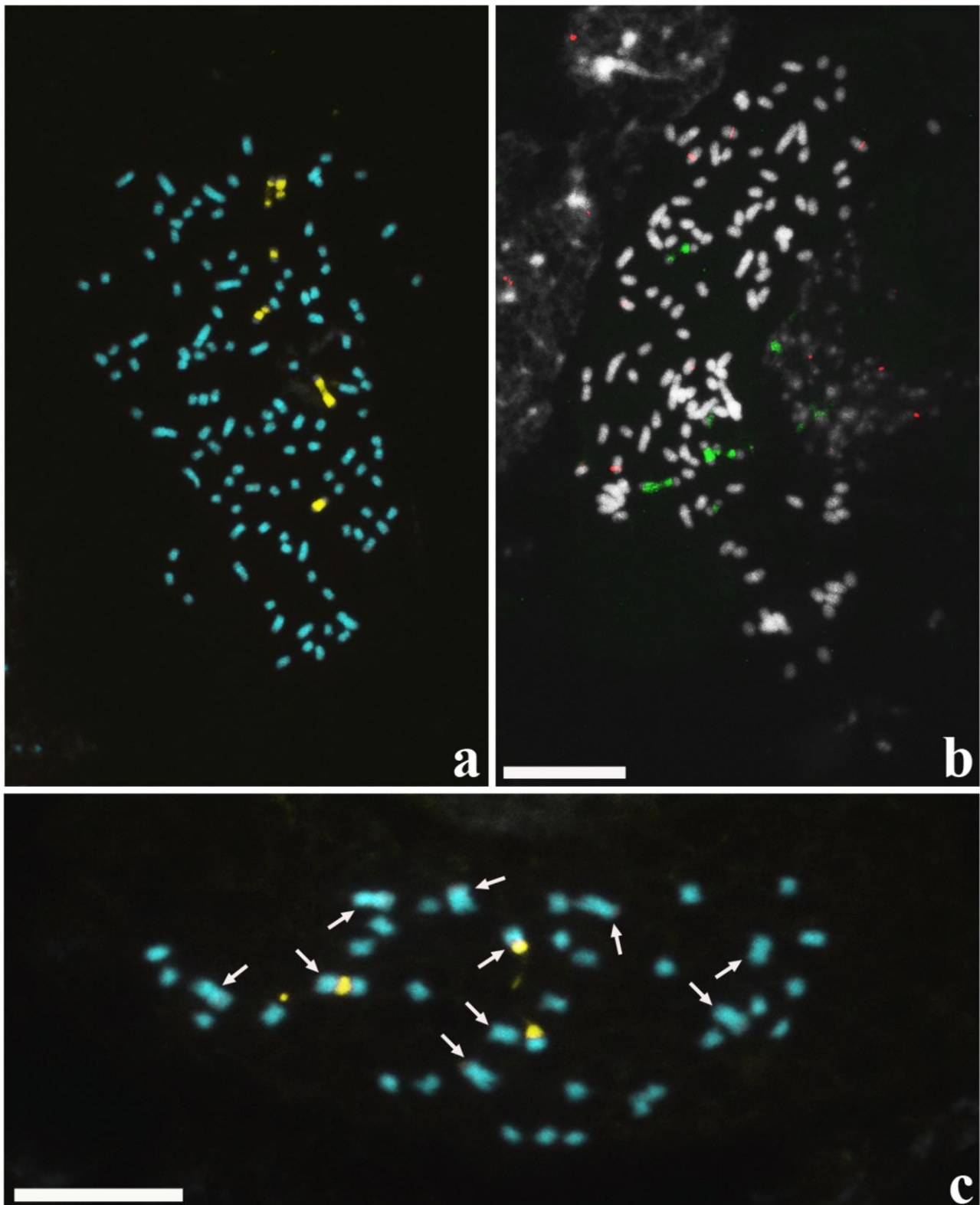
- Goldblatt P: Index to Plant Chromosome Numbers, 1982-1983. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 13:1–224 (1985).
- Goldblatt P: Index to Plant Chromosome Numbers, 1992-1993. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 58:1–276 (1996).
- Gomez-Rodriguez VM, Rodriguez-Garay B, Palomino G, Martínez J, Barba-Gonzalez R: Physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in three species of *Agave* (Asparagales, Asparagaceae). *CompCytogen* 7(3): 191–203 (2013).
- Guerra M, Souza MJ: Como observar cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana. Ribeirão Preto, SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto (2002).
- Guerra M: Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetics and Genome Research* 120:339-350 (2008).
- Guerra M: Introdução à Citogenética Geral. Editora Guanabara, Rio de Janeiro (1988).
- Hertweck KL: Assembly and comparative analysis of transposable elements from low coverage genomic sequence data in Asparagales. *Genome* 56:487–494 (2013).
- Hou MH, Robinson H, Gao YG, Wang AHJ: Crystal structure of the  $(Mg^{2+}-(chromomycin\ A_3)_2)-d(TTGGCCAA)_2$  complex reveals GGCC binding specificity of the drug dimer chelated by a metal ion. *Nucleic Acids Research* 32:2214-2222 (2004).
- Hutchinson J: The Families of Flowering Plants. Vol II, Monocotyledons 2<sup>a</sup> ed., Clarendon Press, Oxford (1959).
- Khaliq I, Khan MA, Pearce S: Ty1-Copia retrotransposons are heterogeneous, extremely high copy number and are major players in the genome organization and evolution of *Agave tequilana*. *Genet Resour Crop Evol* 59:575–587 (2012).
- Kim JH, Kim DK, Forest F, Fay MF, Chase MW: Molecular phylogenetics of *Ruscaceae sensu lato* and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* 106:775–790 (2010).
- Leitch IJ, Beaulieu JM, Chase MW, Leitch AR, Fay MF: Genome size dynamics and evolution in monocots. *Journal of Botany* (2010).
- Lu PL, Morden CW: Phylogenetic relationships among Dracaenoid genera (Asparagaceae: Nolinoideae) inferred from chloroplast DNA loci. *Systematic Botany* 39(1):90-104 (2014).
- Mckain MR, Wickett N, Zhang Y, Ayyampalayam S, McCombie WR, Chase MW, Pires JC, Depamphilis CW, Leebens-Mack J: Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in *Agavoideae* (Asparagaceae). *American Journal of Botany* 99:397–406 (2012).

- Moraes AP, Guerra M: Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). *Plant Syst Evol* 287:113–118 (2010).
- Moreno-Salazar SF, Esqueda M, Martínez J, Palomino G: Tamaño del genoma y cariotipo en *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* de Sonora, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 30:13–23 (2007).
- Palomino G, Dolezel J, Méndez I, Rubluo A: Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia* 56:37–46 (2003).
- Palomino G, Martínez J, Méndez I: Análisis del tamaño del genoma y cariotipo de *Agave aktites* Gentry (Agavaceae) de Sonora, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81:655-662, (2010).
- Palomino G, Martínez J, Méndez I: Citotipos en *Agave angustifolia* Haw. determinados por citometría de Flujo y análisis de sus cariótipos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21:49-54 (2005).
- Palomino G, Martínez J, Méndez I: Karyotype studies in cultivars of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia* 61:144-153 (2008).
- Patil DA, Pai RM: The Agavaceae: Taxonomic and Phylogenetic Appraisal. *Journal of Experimental Sciences*, 2:20-24 (2011).
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A: Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics*, 161: 1661-1672 (2002).
- Peruzzi L, Leitch IJ, Caparelli KF: Chromosome diversity and evolution in Liliaceae. *Annals of Botany* 103:459–475 (2009).
- Robert ML, Lim KY, Hanson L, Sanchez-Teyer F, Bennett MD, Leitch AR, Leitch I: Wild and agronomically important *Agave* species (Asparagaceae) show proportional increases in chromosome number, genome size, and genetic markers with increasing ploidy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 158:215–222 (2008).
- Seberg O, Petersen G, Davis JI, Chris Pires J, Stevenson DW, Chase MW, Fay MF, Devey DS, Jørgensen T, Sytsma KJ, Pillon Y: Phylogeny of the Asparagales based on three plastid and two mitochondrial genes. *American Journal of Botany* 99(5):875– 889 (2012).
- Soares-Scott MD: Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora*. (Dissertação). Campinas. UNICAMP. 89p. 1998.
- Souza MM, Pereira TNS, Vieira MLC: Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51: 247-258 (2008).

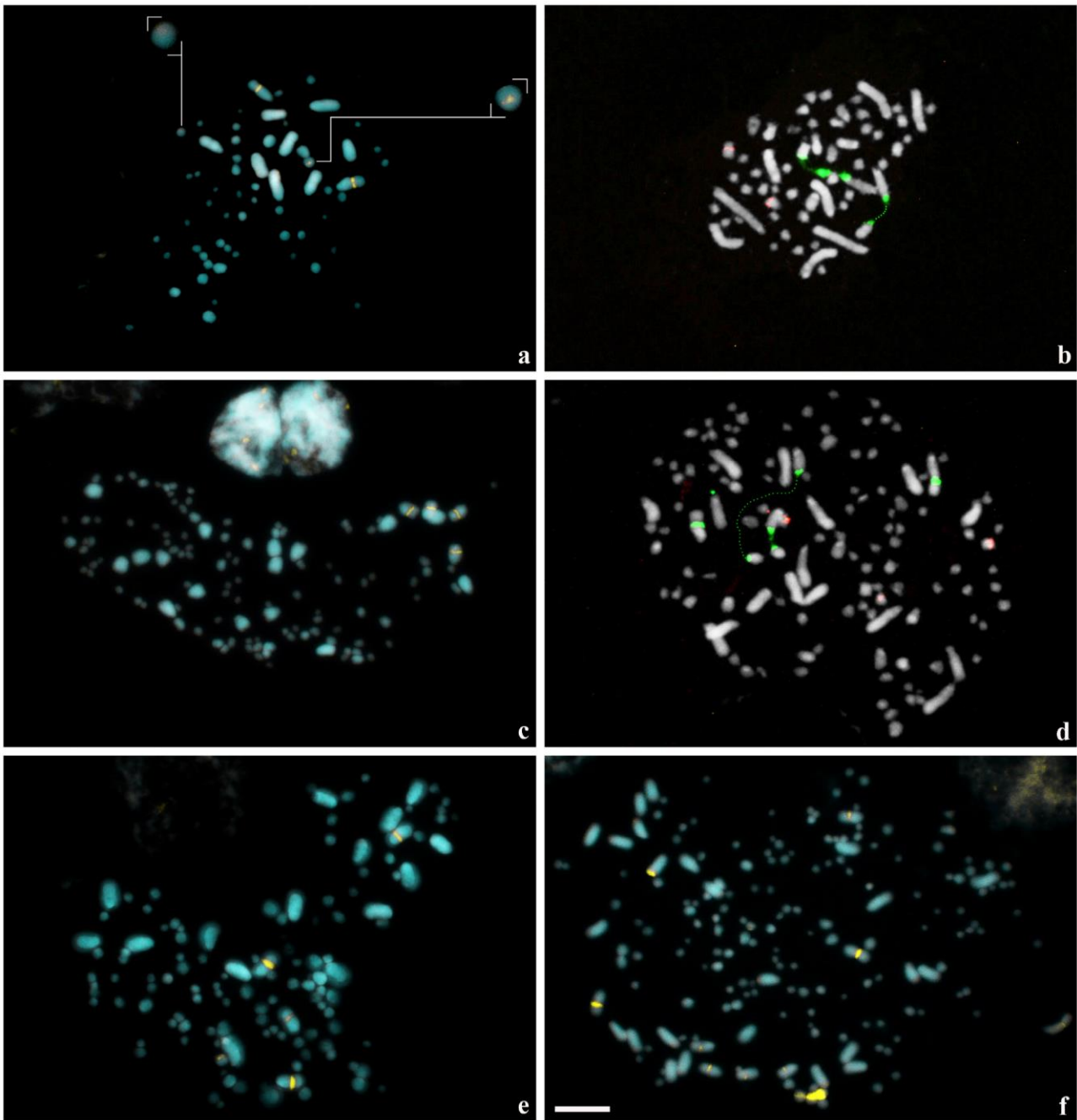
- Souza VC, Lorenzi H: Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum (2012).
- Thorne RF: Classification and geography of the flowering plants. *The Botanical Review* 58:225-348 (1992)
- Wetschnig W, Pfosser M: The *Scilla plumbea* puzzle—present status of the genus *Scilla* sensu lato in southern Africa and description of *Spetaea lachanaliiflora*, a new genus and species of Massonieae (Hyacinthaceae). *Taxon* 52: 75–91 (2003).
- Yeo PF: The families of the monocotyledons. structure, evolution, and taxonomy. Springer-Verlag, Berlin (1985).



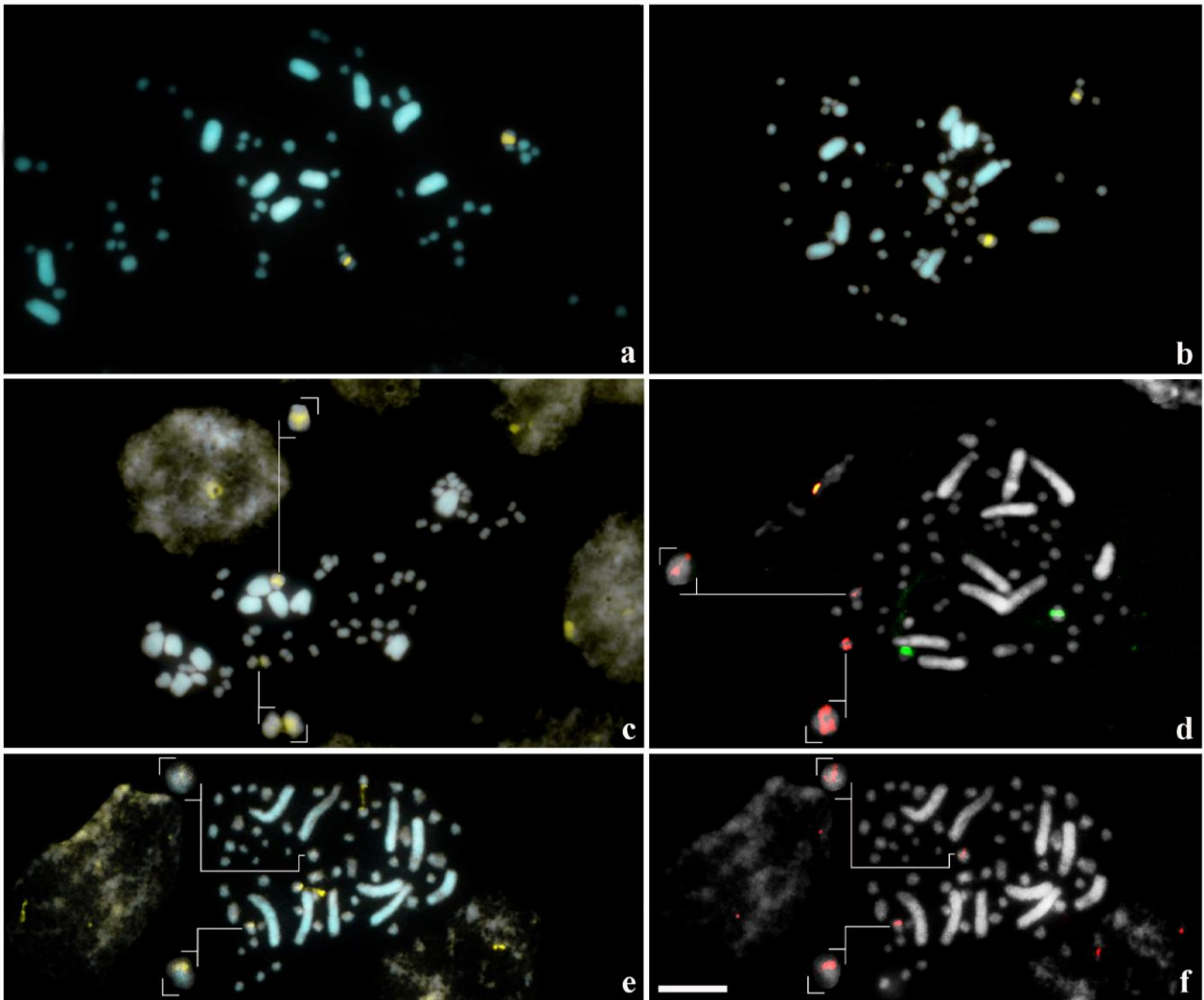
**Figura 1:** Metáfases de *Dracaena* e *Sansevieria* coradas com CMA (amarelo) e DAPI (azul) e hibridizadas *in situ* com sondas de DNAr 45S (verde) e de DNAr 5S (vermelho). a-b. *Dracaena aubryana* ( $2n = 40$ ); c. *D. fragans* ( $2n = 40$ ); d. *D. braunii* ( $2n = 40$ ); e-f. *Sansevieria trifasciata* ( $2n = 40$ ) Setas em "a, c, d, e" indicam cromossomos do conjunto maior *l* (*larger*). Barra em "f" corresponde a  $10\mu\text{m}$ .



**Figura 2:** Metáfases de *Sansevieria cylindrica* ( $2n = 120$ , a-b) e *Cordyline fruticosa* ( $2n = 38$ , c) coradas com CMA (amarelo) e DAPI (azul) e hibridizadas *in situ* com sondas de DNAr 45S (verde) e de DNAr 5S (vermelho). Setas em "c" indicam cromossomos do conjunto maior *l* (*larger*). Barra em "b e c" corresponde a 10 $\mu$ m.

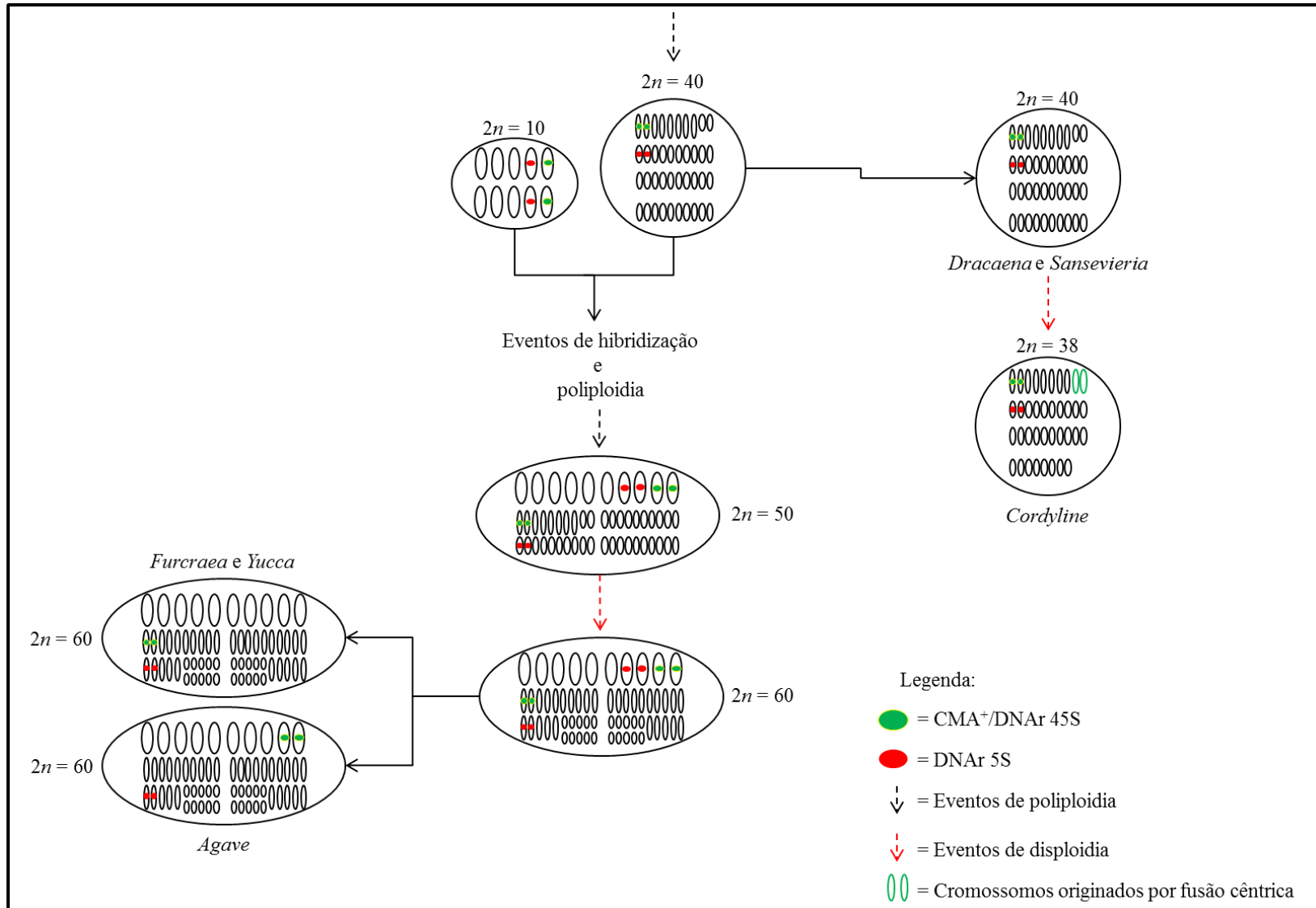


**Figura 3:** Metáfases de *Agave* coradas com CMA (amarelo) e DAPI (azul) e hibridizadas *in situ* com sondas de DNAr 45S (verde) e de DNAr 5S (vermelho). *Agave angustifolia* ( $2n = 60$ , a-b); *A. wocomahi* ( $2n = 120$ , c-d); e. *A. americana* ( $2n = 120$ ); f. *A. decipiens* ( $2n = \text{ca. } 180$ ). Barra em “f” corresponde a  $10\mu\text{m}$ . Células incompletas de *Agave angustifolia* e *A. wocomahi* b e d.



**Figura 4:** Metáfases de *Furcraea* e *Yucca* coradas com CMA (amarelo) e DAPI (azul) e hibridizadas *in situ* com sondas de DNAr 45S (verde) e de DNAr 5S - (vermelho). a. *Furcraea foetida* ( $2n = 60$ ); b. *F. gigantea* ( $2n = 60$ ); c-d. *F. selloa* ( $2n = 60$ ); e-f. *Yucca aloifolia* ( $2n = 60$ ). Barra em “f” corresponde a  $10\mu\text{m}$ . Célula incompleta de *Furcraea selloa* em d.





**Figura 5:** Representação esquemática dos cariótipos de Agavoideae, Lomandroideae e Nolinoideae. Indicando os principais eventos provavelmente envolvidos na diversificação cromossômica do grupo.

**Tabela 1.** Espécies das subfamílias de Asparagaceae com seus respectivos locais de coleta, número cromossômico diplóide ( $2n$ ), fórmula de bimodalidade, bandas heterocromáticas (CMA/DAPI) e sítios de DNAr (45S e 5S). Abreviações: i = intersticial; pe = pericentromérica.

Táxon	Coletor	Local de Coleta	$2n$	$2n = l + s$	CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	DNAr 45S	DNAr 5S
<b>Subfamília Agavoideae</b>							
<b>Herb.</b>							
<b><i>Agave</i> L.</b>							
<i>A. americana</i>	JALN 21	Areia, PB	120	$20l + 100s$	4i		
<i>A. angustifolia</i>	JALN 06	Areia, PB	60	$10l + 50s$	2i	2i	2i
<i>A. decipiens</i>	JALN 22	Areia, PB	ca. 180	$30l + 150s$			
<i>A. wocomahi</i>	LPF 13187	Feira de Santana, BA	120	$20l + 100s$	4i	4i	4i
<b><i>Furcraea</i> Vent.</b>							
<i>F. foetida</i>	JALN 10	Areia, PB	60	$10l + 50s$	2i		
	LPF 13523						
<i>F. gigantea</i>	AEBS S/N	Recife, PE	60	$10l + 50s$	2i		
<i>F. selloa</i>	JALN 03, 08	Areia, PB	60	$10l + 50s$	2i	2i	2i
<b><i>Yucca</i> L.</b>							
<i>Y. aloifolia</i>	AEBS S/N	Recife, PE	60	$10l + 50s$	2i		2i

Tabela 1. Cont.

Taxon	Coletor	Local de Coleta	2n	2n = l + s	CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	DNAr 45S	DNAr 5S
<b>Subfamília Nolinoideae</b>							
<b><i>Dracaena</i> Vand. ex L.</b>							
<i>D. aubryana</i>	JALN 02	Areia, PB	40	8l + 32s	40pe	2pe	2pe
<i>D. fragrans</i>	JALN 04, 07	Areia, PB	40	8l + 32s	40pe		
<i>D. braunii</i>	JALN 23	Areia, PB	40	8l + 32s	40pe		
<b><i>Sansevieria</i> Thunb.</b>							
<i>S. cylindrica</i>	JALN 01	Areia, PB	120	24l + 96s	6pe	6pe	6pe
<i>S. trifasciata</i>	JALN 09	Areia, PB	40	8l + 32s	2i	2pe	2pe
<b>Subfamília Lomandroideae</b>							
<b><i>Cordyline</i> Comm. ex R.Br.</b>							
<i>C. fruticosa</i>	JALN 05, 11	Areia, PB	38	10l + 28s	2pe		

**Anexo**

## Norma da revista *Cytogenetic and Genome Research*

### Guidelines for Authors

[www.karger.com/cgr\\_guidelines](http://www.karger.com/cgr_guidelines)

- Introduction
- Categories of Manuscripts
- Single Topic Issues
- Submission
- Plagiarism Policy
- Arrangement
- Literature Cited
- Gene Symbols
- Cell Lines in Cancer Research
- Supplementary Material
- *Author's Choice*<sup>TM</sup>, NIH-Funded Research, Self-Archiving
- Page Charges, Color Reproductions
- Electronic Proofs
- Supplementary Material
- Reprints
- Requirements for Gene Mapping Reports

---

### Introduction

'Cytogenetic and Genome Research' publishes high quality original reports and reviews covering all aspects of chromosomes, genes and genomes in man, animals and plants.

---

### Categories of Manuscripts for Conventional Issues

**Original Articles** are reports on

- Human, Animal and Plant Cytogenetics
- Cancer Cytogenetics
- Molecular Cytogenetics
- Gene Mapping, Cloning and Sequencing
- Gene Characterization
- Comparative Gene Mapping
- Somatic Cell Genetics
- Genes and Diseases
- Developmental Genetics
- Epigenetics.

Other categories closely related to the above topics could be considered by contacting the Editors.

**Reviews** covering a timely topic by experts in the field are either invited by the Editors or may be submitted for consideration.

**Short Reports** must present results of sufficient importance to justify accelerated acceptance. They should not be longer than 4 printed pages, including figures, tables and references.

**Human Cytogenetics Case Reports** are for de novo observations, particularly such which apply the use of HGMP (Human Genome Mapping Project) resources to the detailed characterization of chromosome rearrangements thereby further highlighting the nature of the abnormalities being described.

**Cytogenetics of Rare or Endangered Species** with straightforward karyotype descriptions of animals or plants should not be longer than 3 printed pages, including figures, tables and references. **Chromosome and Gene Workshops or Reports** compile data that have been collected for single chromosomes, genes or genomes, hereditary diseases and gene-phenotype correlations in man, animals and plants. Illustrations and tables may be included.

**Collaborative and Interactive Research Projects** are contributions from investigators who are in need of research materials, or need the assistance of colleagues with specialized expertise, or who have data that is inadequate for a full report but which could be published when combined with data of others.

**Commentaries** are a forum for observations, opinions, and comments outside the realm of conventional scientific papers. Original data, illustrations and tables may be included.

---

#### Single Topic Issues

The journal has a tradition in publishing a series of themed issues. For these publications we are soliciting the assistance of one or more expert investigators to act as Guest Editors in an area that is particularly interesting and/or one in which there is a need for a thorough overview. The Guest Editors invite top researchers to contribute original research reports or reviews of a topic that is in their main area of interest. These manuscripts are peer reviewed the same way as the papers received for the conventional issues. Proposals clearly outlining a theme and nominating potential Guest Editors are welcome.

---

#### Submission

Manuscripts should be submitted online

#### Online Manuscript Submission

Should you experience any problems with your submission, please contact the editorial office: [claus.steinlein@biozentrum.uni-wuerzburg.de](mailto:claus.steinlein@biozentrum.uni-wuerzburg.de)

Claus Steinlein  
Department of Human Genetics  
University of Würzburg  
Biozentrum, Am Hubland  
D-97074 Würzburg (Germany)  
Tel. (+49) 931 31-88091

Fax (+49) 931 31-84058

Authors should indicate which of the Executive or Associate Editors they feel would be most appropriate for their report.

All manuscripts are subject to editorial review. The editors reserve the right to improve style and, if necessary, return the manuscript for rewriting to the authors. The editorial office reserves rights to reject manuscripts based on priorities and space availability in the journal.

---

### Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation. If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

---

### Arrangement

Manuscripts must be prepared strictly in accordance with the style of this journal.

**Title page:** The first page should give the full names of the authors and their affiliations, the full postal address, telephone and fax numbers, as well as the e-mail address of the corresponding author.

**Abstracts** should be provided for all Original Articles, Reviews, Human Cytogenetics Case Reports, and Cytogenetics of Rare or Endangered Species.

**Figures:** Digital illustrations should be sharp with good contrast and color rendition. Resolution for all graphics should be at least 300 dots per inch. We request that all illustrations be in a common format such as .jpg (.jpeg, .jpe), .tif (.tiff), .eps or .ppt.

**Tables** must be in Word format. Please use MS WORD Table > Insert > Table command from the menu bar to make tables.

---

### Literature Cited

References should be quoted in the text as follows:

Single author: Jones (1999)

Two authors: Jones and Smith (2000)

More than two authors: Jones et al. (2001)

The reference list should be arranged alphabetically according to the first author's surname. Titles should be given in full.

Papers published in electronic format should list authors, title and journal as above followed by the journal's URL, eg:

Chinnappan D, Zhang Y, Ravid K:

AIM-1 Transgenic mice with a curly tail phenotype and its chromosome location.

Cytogenet Genome Res 98:231A (2002)

<http://karger.com/doi/10.1159/000069799>

Book references must include the book title, editor(s), publisher, and city of publication.

Recent issues of the journal should be carefully consulted for reference list style.

Agreement between text citations and the reference list should be checked carefully, and the latter checked for accuracy. If many errors are found, the manuscript will be returned for corrections which may cause considerable publication delay.

---

## Gene Symbols

**Human gene symbols:** Only official gene symbols of the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) are accepted. Authors must obtain or verify the official gene symbol of the gene(s) mapped and indicate that they have done so in the manuscript submitted. This can be accomplished for human genes by contacting

HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)

European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)

Wellcome Trust Genome Campus

Hinxton, Cambridgeshire

CB10 1SA, UK

Fax +44 (0)1223 494 468

E-Mail [hgnc@genenames.org](mailto:hgnc@genenames.org)

Website: [www.genenames.org](http://www.genenames.org)

Guidelines set forth by the HUGO Gene Nomenclature Committee are available at <http://www.genenames.org/guidelines.html>.

New symbols and names for genes can be requested electronically through the online gene symbol request form at [http://www.genenames.org/cgi-bin/hgnc\\_request.pl](http://www.genenames.org/cgi-bin/hgnc_request.pl).

**Animal gene symbols:** Authors submitting material on mouse and rat genetics should obtain correct genetic nomenclature before publication. Contact

Dr. Lois Maltais

MGD Nomenclature Coordinator

The Jackson Laboratory

600 Main Street

Bar Harbour ME 04609 (USA)

Tel. +1 (207) 288 6429

Fax +1 (207) 288 6132

E-mail [nomen@informatics.jax.org](mailto:nomen@informatics.jax.org)



MGD home page: [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)

Guidelines set forth by the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice are available at [www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/table.shtml](http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/table.shtml)

New symbols and names for genes can be requested electronically through the online symbol registry form at [www.informatics.jax.org/mgihome/nomen](http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen)

Gene mapping data for the mouse should also be submitted to the Mouse Genome Database (MGD) following the guidelines at [www.informatics.jax.org/mgihome/submissions/submit.shtml](http://www.informatics.jax.org/mgihome/submissions/submit.shtml).

The assigned MDG accession numbers should be included in the manuscript for publication. Assistance with submissions can be obtained by sending an e-mail to [submissions@informatics.jax.org](mailto:submissions@informatics.jax.org).

---

### Guidelines for the Use of Cell Lines in Cancer Research

Guidelines published by the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research may be downloaded from the NCRN website: <http://www.ncrn.org.uk/csg/publications.htm>.

---

### Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional data that are not necessary for the scientific integrity and conclusions of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for Web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. All figures and tables should have titles and legends and all files should be supplied separately and named clearly. Acceptable files and formats are: Word or PDF files, Excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a PDF file), and video files (.mov, .avi, .mpeg).

---

### *Author's Choice*<sup>TM</sup>

Karger's Author's Choice<sup>TM</sup> service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at [www.Karger.com](http://www.Karger.com). The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at [www.karger.com/authors\\_choice](http://www.karger.com/authors_choice).

### NIH-Funded Research

The U.S. National Institutes of Health (NIH) mandates under the NIH Public Access Policy that final, peer-reviewed manuscripts appear in its digital database within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits your manuscript on your behalf to PubMed Central (PMC) immediately upon publication. It usually receives a PMCID within approximately a month and will appear in PMC after 12 months. For those selecting our

premium Author's Choice™ service, the usual embargo will be overridden, accelerating the accessibility of your work. More details on NIH's Public Access Policy are available here.

### Self-Archiving

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-refereeing) or post-prints (i.e. final draft post-refereeing) on their personal or institution's servers, provided the following conditions are met: Articles may not be used for commercial purposes, must be linked to the publisher's version, and must acknowledge the publisher's copyright. Authors selecting Karger's Author's Choice™ feature, however, are also permitted to archive the final, published version of their article, which includes copyediting and design improvements as well as citation links.

---

### Page Charges, Color Reproductions

The journal will defray the costs of the first eight printed pages (a total of about 8,000 words minus any tables or figures). Any additional pages will be defrayed on a cost-sharing basis by the authors at the rate of CHF 325.00 per page.

There are no charges for illustrations and color reproductions.

---

### Electronic Proofs

Unless otherwise indicated, proofs are e-mailed to the corresponding author.

---

### Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional data that are not necessary for the scientific integrity and conclusions of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for Web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. All figures and tables should have titles and legends and all files should be supplied separately and named clearly. Acceptable files and formats are: Word or PDF files, Excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a PDF file), and video files (.mov, .avi, .mpeg).

---

### Reprints

Reprints are available against payment.

Order forms listing prices are provided with the proofs. If no reprints are desired this should be indicated on the form.

Orders submitted after the issue has gone to press are subject to considerably higher prices.

---

## Requirements for Gene Mapping Reports

**1. The gene must not have been previously mapped by any technique.** Authors should check the above listed databases to determine if this is true. This means that mapping confirmations will not be accepted. Relocations of genes incorrectly mapped within a major chromosome band, i.e., to a different subband, will not be accepted. However, genes that are relocated a significant distance from the one to which it had been assigned, or to another chromosome, will be accepted. The evidence for the new assignment must be obtained with two different methods.

**2. Well-described flanking markers must be given for all mapping assignments.** The relative location of the flanking markers can be established by standard radiation hybrid or mouse backcross panels. For mapping by fluorescence in situ hybridization (FISH), the markers must be within 5 cM or 5 Mb of the gene or genes that have been mapped.

**3. The results from DNA sequence database searches must be given for the mapped gene(s).** The entire sequences should not be given, just the size, degree of the matches and their significance. If several sequences are involved, this should be presented in a concise table listing the standardized gene names as established by the HUGO Gene Nomenclature Committee (see above) and accession numbers of the matching sequences. The human chromosome reference sequences nucleotide position of mapped genes should also be given as they become available.

**The following categories must be collected into a single publication if submitted from one group of investigators:**

- (a) All cDNAs representing a single multigene family
- (b) Genes located within a single chromosome band
- (c) A series of orthologous genes when the results of comparative mapping studies in the mouse (or some other species) and human genes are reported.

**Authors of both accepted and not accepted papers are encouraged to submit their data to mapping databases.** The mirror sites of the Genome Database ([www.gdb.org](http://www.gdb.org)) are prepared to accept the data if presented in the short report format.