

THAÍSSA BROGLIATO JUNQUEIRA ENGEL

ESTUDOS CARIOTÍPICOS EM *GRIFFINIA* KER GAWL E ESPÉCIES RELACIONADAS
(AMARYLLIDACEAE)

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

THAÍSSA BROGLIATO JUNQUEIRA ENGEL

**“ESTUDOS CAROTÍPICOS EM *GRIFFINIA* KER GAWL E
ESPÉCIES RELACIONADAS (AMARYLLIDACEAE)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pela candidata

Thaíssa Brogliato Junqueira Engel

Eliana Regina Forni Martins

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestra em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

En32e Engel, Thaíssa Brogliato Junqueira, 1989-
Estudos cariotípicos em *Griffinia* Ker Gawl e espécies relacionadas
(Amaryllidaceae) / Thaíssa Brogliato Junqueira Engel. – Campinas, SP : [s.n.],
2014.

Orientador: Eliana Regina Forni Martins.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Hibridização *in situ* fluorescente. 2. Citotaxonomia vegetal. 3. Citogenética.
I. Forni-Martins, Eliana Regina, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Karyotypic studies in *Griffinia* Ker Gawl and related species
(Amaryllidaceae)

Palavras-chave em inglês:

In situ hybridization, fluorescence

Plant cytotaxonomy

Cytogenetics

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestra em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Eliana Regina Forni Martins [Orientador]

Julia Yamagishi Costa

Julie Henriette Antoniette Dutilh

Data de defesa: 14-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 14 de fevereiro de 2014

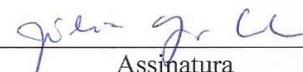
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins (orientadora)



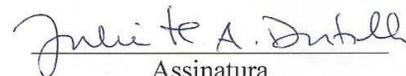
Assinatura

Profa. Dra. Julia Yamagishi Costa



Assinatura

Dra. Julie Henriette Antoinette Dutilh



Assinatura

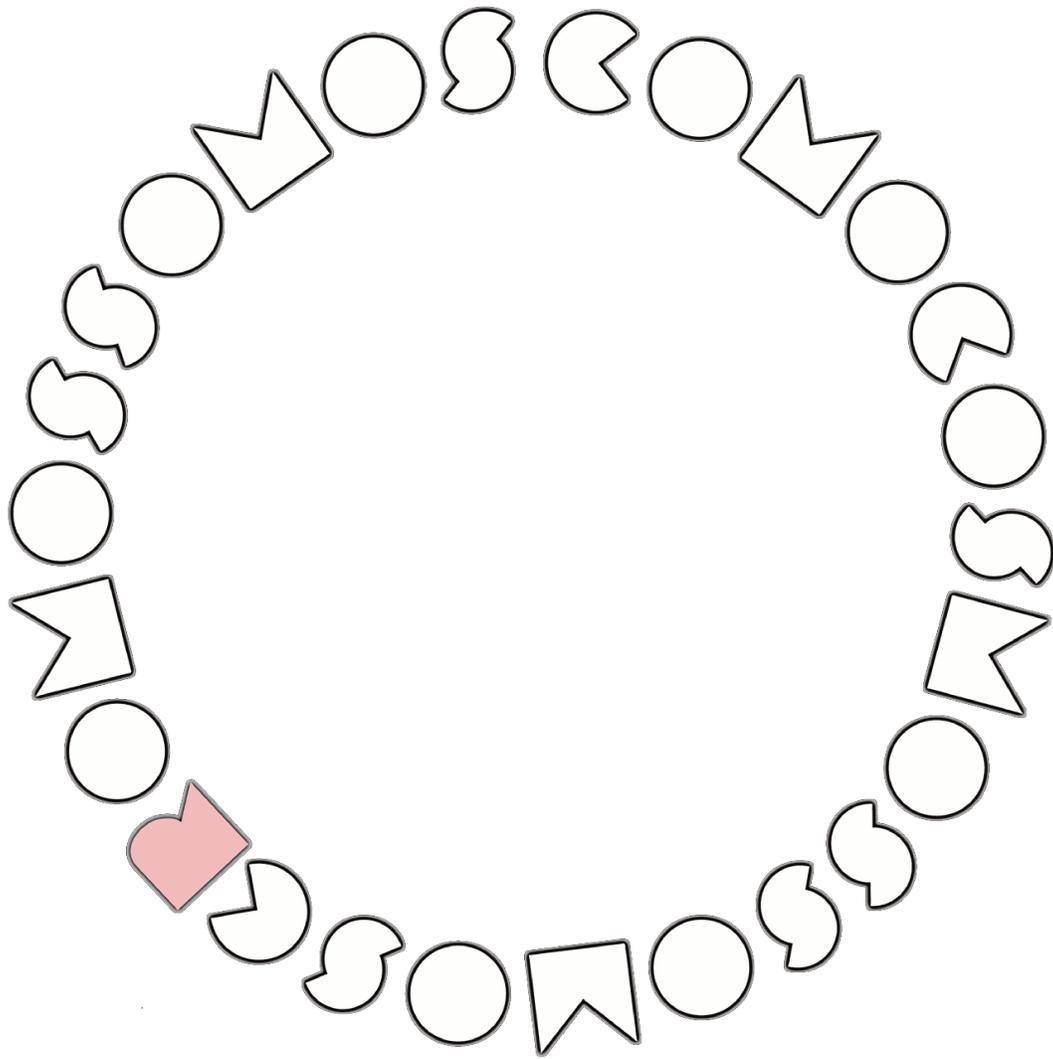
Dra. Maria Victoria Romero

Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello

Assinatura

Dedico este trabalho à minha mãe, Vergínia Maria Junqueira, de quem herdei os cromossomos que me trouxeram até aqui.



Arnaldo Antunes – Cromossomos

AGRADECIMENTOS

À minha professora e orientadora Eliana, que não poupa esforços para manter o laboratório funcionando e nos orienta com muita paciência e atenção, emprestando não apenas seus conhecimentos e sua experiência, mas também muito suporte emocional e apoio, principalmente naqueles momentos em que achamos que os cromossomos nunca vão colaborar, a técnica nunca vai funcionar, se funcionar, não será efetiva ao propósito do trabalho, nada vai dar certo e vamos perder o mestrado. Muito obrigada!

À Capes e ao CNPq, pelo apoio financeiro obrigada! À UNICAMP e ao instituto de Biologia, ao Laboratório de Biossistemática e Polinização, pela estrutura com a qual nos recebe, pela qualidade do ensino e do serviço que nos oferece, e pela formação profissional, acadêmica e pessoal que nos possibilita, muito obrigada! Também aos funcionários da Pós Graduação em Biologia Vegetal, em especial a Maria Roseli, e aos técnicos, Iara, João Carlos, Sebastião, aos funcionários do Herbário, muito obrigada pelo suporte prestado.

Obrigada à minha banca de qualificação e à minha pré-banca, Júlia Yamagishi Costa, André Olmo Simões, Luana Tacuatiá, Maria Victória Romero e Julie Dutilh, por suas contribuições valiosas e atenciosas, que foram essenciais para o direcionamento, o crescimento e a qualidade desse trabalho. Agradeço especialmente à Júlia, que me introduziu ao fantástico mundo dos cromossomos coloridos, me ajudando a encontrar a minha paixão dentre as inúmeras possibilidades da biologia. Agradeço por poder continuar contando com a sua ajuda e seus conselhos, e por poder compartilhar com ela mais que conhecimento: uma amizade que muito estimo.

Aos professores do departamento, muito obrigada pelos seus valiosos ensinamentos, especialmente aqueles despreziosos, no corredor! Quem Precisa do Google, quando tem na porta ao lado pessoas como a Eliana Forni-Martins, a Marlies Sazima, o Fernando Martins, o João Semir, o Tamashiro, e tantos outros?

Aos colegas da citogenética, Ana Paula Moraes, Caroline Polido, Klenya Rocha, Vanessa Mancuso, Nair Dahmer, Luana Tacuatiá, Maria Victória, Rafael Barbosa Pinto e Ana Laura, que compartilharam os segredos que aprenderam com seus anos de prática, muito obrigada! A todos colegas que dividem conosco não apenas o laboratório, mas também um pouco de seus trabalhos e suas experiências. Incluo aqui o pessoal da Polinização, Felipe, André, Maurício, Jefferson, Pietro, Vinícius, Fernanda e Pedro, os colegas da Biologia Vegetal, especialmente o Gu Shimizu, a pessoa mais generosa e prestativa que a biologia já conheceu, o Marcelinho, a Lu Franci, as meninas da Anatomia Vegetal, o

peçoal da Taxonomia, da Ecologia Vegetal e da Fisiologia Vegetal. Obrigada, por contribuírem sobremaneira para o nosso conhecimento e para o nosso constante crescimento enquanto biólogos! Agradeço especialmente aos que deixaram de ser apenas colegas com quem se discute biologia no laboratório, e se tornaram amigos valiosos, com quem se discute biologia nos intervalos de trabalho, no bandeirão, no happy hour, no Bar do Zé, na Borda, num almoço de domingo, num churrasco... ou até mesmo, com quem nem se discute biologia mais!

À Julie, que compartilhou comigo seu projeto, em troca de realizar o profundo e nobre desejo de compreender melhor as plantas às quais se dedica há anos. Ao Mauro Peixoto e sua equipe, pelo cuidado excepcional com as plantas e por disponibilizá-las generosamente para o desenvolvimento do trabalho. A todo o pessoal do Instituto Plantarum especialmente o Antônio, pelas *Griffinia*, pelas fotografias, os *vouchers*, a atenção dispensada e pela prestatividade de sempre. Muito obrigada!

Agradeço ao João Paulo, companheiro de mestrado, colega de laboratório, por ser, mais que isso tudo, meu vizinho caipira, um amigo valioso, atencioso, amoroso, carinhoso, que certamente levarei para a vida toda; sempre jogando *just dance*, discutindo os resultados, conferindo as referências e compartilhando as angústias e as alegrias. Agradeço à Carol, que guiou meus primeiros passos nesse laboratório, se tornou uma grande amiga e faz uma falta imensurável. À Vic, nossa *hermana* e amiga, querida e cuidadosa, atenta, prestativa, com quem aprendo e divido com enorme prazer. À Luana, amiga amada com quem, sinceramente, me identifico além da biologia: para a vida. Muitíssimo obrigada a vocês, meus queridos! Fellipe, Luis, Pedro, Peterson, Rafael, Rodrigo, Madalena, com quem divido a minha casa e a minha vida, meus companheiros queridos e amigos essenciais, bem como a Ana Paula, a Renata, o João, o pessoal da Amarela... À Sy, que segurou a barra, a onda, a minha mão... Muito obrigada a todos vocês!

Especialmente, agradeço à minha mãe, que é meu exemplo e a grande responsável pelo que sou hoje (espero que ela esteja orgulhosa disso!), ao meu irmão amado, meu orgulho, e ao Celso, que sempre carinhoso, prestativo e atento, protege cuidadosamente o que tenho de mais valioso nessa vida, a minha família! Muito obrigada!

Posso finalmente dizer que, ao concluir esse trabalho de mestrado, vejo nos meus resultados a marca deixada por cada um de vocês, e agradeço com profunda e sincera gratidão por terem dedicado de alguma forma, um pouquinho de seu tempo e sua atenção para tornar esse trabalho possível!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xix
RESUMO	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
ORGANIZAÇÃO GERAL DA DISSERTAÇÃO	xxv
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Amaryllidaceae.....	1
2. <i>Griffinia</i> (Ker Gawl).....	4
3. Citogenética.....	7
4. Citogenética em Amaryllidaceae e <i>Griffinia</i>	12
5. Referências Bibliográficas.....	16
ESTUDOS CARIOTÍPICOS EM <i>GRIFFINIA</i> KER GAWL E ESPÉCIES RELACIONADAS (AMARYLLIDACEAE)	26
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1. Espécies e locais de coleta.....	28
2.2. Preparações Cromossômicas.....	30
2.3. Bandamento CMA ₃ e DAPI	31
2.4.1. Extração de DNA genômico.....	31
2.4.2. Obtenção de sondas de DNAr 5S.....	32
2.4.3. Hibridização	33
2.5. Obtenção dos Ideogramas	33

3. RESULTADOS.....	34
3.1. Número e morfologia cromossômicos.....	34
3.2. Bandamento CMA ₃ e FISH	35
4. DISCUSSÃO	51
4.1. Número e morfologia cromossômicos.....	51
4.2. Bandamento CMA ₃ e FISH	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1 – Trecho da filogenia para Asparagales, obtida com o uso de dados de sequências plastidiais (*atpB*, *rbcL*, *trnL* intron e *trnL*–F intergenic spacer, *ndhF*, *matK*) e mitocondriais (*atp1*). Números acima das barras indicam distância entre os grupos e bootstrap (branch/bootstrap) para dados plastidiais e mitocondriais combinados. Números abaixo das barras indicam porcentagem de bootstrap para dados plastidiais apenas. O círculo contendo o número 1 à esquerda e acima na imagem, representa Alliaceae s.l. (sensu APG II 2003), grupo atualmente reconhecido como Amaryllidaceae (APG III 2009). Modificado de Pires et al. 2006. 2
- Figura 2 – Filogenia da família Amaryllidaceae, com suas três subfamílias e as tribos correspondentes, sensu APG III (2009). Em destaque, a tribo Griffineae. Modificado de Meerow em Kamenetsky e Okubo 2012. 3
- Figura 3 - Flores de *Griffinia*. *G. concinna* (A), *G. espiritensis*, populações de Nova Venécia (B) e Barra do Colégio (C), *G. hyacinthina* (D), *G. intermedia*, populações de Itatiaia (E) e Mangaratiba (F), *G. liboniana*, populações de Itapebi (G), Petrópolis (H), e Ceará (I) *G. paubrasílica* (J), *G. rochae* (K), *G. sp1*, Alto Cariri (L), *G. sp2*, Santa Teresa (M), *G. gardneriana*, populações de Tucuns (N) e Búzios (O) e *G. nocturna* (P). 5
- Figura 4 - Árvore morfológica com espécies de *Griffinia* feita com base em 23 caracteres morfológicos, por meio do software PAUP 4.0bl. Adaptado de Preuss 1999. 6

ESTUDOS CARIOTÍPICOS EM *GRIFFINIA* KER GAWL E ESPÉCIES RELACIONADAS (AMARYLLIDACEAE)

- Figura 1 - Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) em espécies *Griffinia liboniana*, populações de Itapebi (A e B), Petrópolis (C e D), Ceará (E e F) e Jaguaré (G e H). Em detalhe, cromossomo aumentado para melhor compreensão de sua morfologia (B). Setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10 μ m. 39
- Figura 2 - Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) em espécies *Griffinia espiritensis*, populações de Barra do Colégio (A e B), Nova Venécia (C e D), Domingos Martins (E e F) e Kautsky (I e J), e *G. rochae* (G e H). Em detalhe, cromossomos aumentado para melhor compreensão de sua morfologia (E). Setas indicam cromossomos pouco visíveis. Barra = 10 μ m. 40

- Figura 3 - Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) nas espécies *G. hyacinthina*, (A e B) e *G. sp1*, do Alto Cariri (C e D). Em detalhe, cromossomo aumentado para melhor compreensão de sua morfologia (D). Setas foram designadas apenas a sinais pouco visíveis. Barra = 10 μ m..... 41
- Figura 4 - Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) nas espécies do subgênero *Hylinae*. *Griffinia nocturna* (A a C) e *G. gardneriana*, populações de Canaã dos Carajás (D a F) e Verdelândia (G a I). Em detalhe, cromossomos observados em metáfases incompletas, livres de sobreposição, para melhor compreensão de sua morfologia (C, F e I). Cabeças de seta verdes mostram cromossomo sem correspondência no conjunto cromossômico, formando um par heteromórfico com algum cromossomo sem sinais de DNAr 5S. As demais setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10 μ m 42
- Figura 5 – Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) nas espécies *Griffinia intermedia*, populações de Mangaratiba (A e B) e Itatiaia (C e D). Cabeças de seta verdes chamam atenção para a diferença em posição do sinal no cromossomo. Setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10 μ m..... 43
- Figura 6 - Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) nas espécies *Griffinia parviflora* (A e B). Cabeças de seta verdes indicam par heteromórfico para banda CMA₃⁺. Setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10 μ m 44
- Figura 7 - Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) nas espécies *Griffinia paubrasilica* (A a D) e *G. concinna* (E e F). Cabeças de seta verdes chamam atenção para um par heteromórfico de cromossomos. Setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10 μ m..... 45
- Figura 8 - Cromossomos metafásicos e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) nas espécies *Griffinia sp2*, de Santa Teresa. Setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10 μ m. 46
- Figura 9 - Localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) em cromossomos metafásicos das espécies *Eithea blumenavia* ($2n= 18$, A e B), *Tocantinia mira* ($2n=22$, C e D), *Hippeastrum reticulatum* ($2n=44$,E e F) e *Worsleya procera* ($2n=42$, G e H). Setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10 μ m 47
- Figura 10 - Ideogramas das espécies de *Griffinia* do Complexo liboniana. Cor amarela representa bandas CMA3+, cor vermelha representa sítios de DNAr 5S. Desenho cromossômico sem borda

definida representa cromossomo para o qual não pôde ser determinada a posição do centrômero. A escala à esquerda dos cromossomos encontra-se em μm 48

Figura 11 - Ideogramas para espécies de *Griffinia*. Cor amarela representa bandas CMA3+, cor vermelha representa sítios de DNAr 5S. Desenho cromossômico sem borda definida representa cromossomo para o qual não pôde ser determinada a posição do centrômero. A escala à esquerda dos cromossomos encontra-se em μm 49

Figura 12 - Ideogramas para espécies proxivamente relacionadas a *Griffinia*. Cor amarela representa bandas CMA₃⁺, cor vermelha representa sítios de DNAr 5S. Desenho cromossômico sem borda definida representa cromossomo para o qual não pôde ser determinada a posição do centrômero. A escala à esquerda dos cromossomos encontra-se em μm 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de espécies de *Griffinia* e espécies proximamente relacionadas utilizadas no estudo cromossômico e suas respectivas procedências. 29

Tabela 2 – Número cromossômico, tamanho dos cromossomos (Maior – menor), bandas CMA3+ (número de pares cromossômicos com bandas/número de pares de bandas), quantidade e posição de sítios de DNAr 5S (número de pares cromossômicos com sítios/número de pares de sítios) em espécies de *Griffinia*, *Eitheia*, *Hippeastrum*, *Tocantinia* e *Worsleya*. “-“ simboliza dado não analisado..... 38

RESUMO

O gênero *Griffinia* Ker Gawl pertence à subfamília Amaryllidoideae que, junto às subfamílias Agapanthoideae e Allioideae, compõem a família Amaryllidaceae, com cerca de 73 gêneros e 1605 espécies. As Amaryllidaceae, incluindo as *Griffinia*, são apreciadas pelas suas flores e cultivadas para a jardinagem e ornamentação. Endêmico do Brasil, esse importante gênero está ameaçado de extinção pela constante degradação de seu ambiente natural, sendo que muitas espécies não foram mais encontradas na natureza e nem em cultivo. A taxonomia de *Griffinia* é bastante dificultada pela morfologia floral e vegetativa bastante semelhante entre algumas espécies, e pela variação morfológica dentro de uma mesma espécie, ocasionada pelo isolamento entre populações e pela existência de diferentes citótipos. Os objetivos deste trabalho foram obter o cariótipo de diferentes espécies de *Griffinia* e de espécies proximalmente relacionadas, e fornecer à sistemática informações que auxiliem na compreensão das relações filogenéticas e evolutivas das espécies desse gênero. Foram estudadas 10 espécies e duas morfoespécies não identificadas de *Griffinia*, bem como quatro espécies de gêneros próximos. Pontas de raízes coletadas dessas espécies foram pré-tratadas em colchicina e fixadas em solução Farmer para a produção de lâminas com metáfases mitóticas. Foram determinados número e morfologia cromossômicos e realizados bandamentos com os fluorocromos cromomicina₃ (CMA₃) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), e *in situ fluorescent hybridization* (FISH) com DNA ribossomal (DNAr 5S). Todas as espécies de *Griffinia* apresentaram $2n=20$. Os números cromossômicos para as espécies analisadas de *Eithea*, *Hippeastrum*, *Tocantinia* e *Worsleya* foram $2n=18$, 44, 22, e 42 respectivamente. Foram observadas espécies de *Griffinia* com duas, quatro, cinco e seis bandas CMA₃⁺. De um a três sítios de DNAr 5S foram observados em dois a seis pares cromossômicos, em posição terminal, subterminal ou pericentromérica. Para cada espécie, foi observado um padrão único de distribuição de sítios de DNAr 5S, sendo assim possível a delimitação de espécies por meio das técnicas citogenéticas aplicadas. As espécies do grupo reportado na literatura como complexo Liboniana

apresentaram semelhanças cariotípicas que podem corroborar a proximidade entre espécies: possuem apenas um par cromossômico com banda CMA_3^+ e dois pares cromossômicos com sítios de DNAr 5S. Variações cariotípicas foram observadas não apenas entre as espécies, mas também entre populações de uma mesma espécie. Casos de variação intraespecífica são conhecidos para plantas. Contudo, essa variação pode não ser uma variação interpopulacional, mas sim, reflexo da dificuldade taxonômica no gênero. Os resultados obtidos nesse estudo, apontam a citogenética como uma ferramenta útil na delimitação dos gêneros e espécies, e no reconhecimento de grupos dentro de *Griffinia*.

Palavras-chave: Hibridização *in situ* fluorescente, bandamento cromossômico, Hippeastreae, Griffiniae

ABSTRACT

The genus *Griffinia* Ker Gawl belongs to the subfamily Amaryllidoideae which together with the subfamilies Agapanthoideae and Allioideae, forms the Amaryllidaceae family, with about 73 genera and 1605 species. Amaryllidaceae plants, including *Griffinia*, are appreciated because of their flowers and cultivated for gardening and ornamentals. Endemic to Brazil, the genus is endangered by the continuous degradation of their natural environment, and many species have not been found in nature. Taxonomy of *Griffinia* is very complicated because of its vegetative and floral morphology, which are quite similar between some species. There is also some morphological variation within a single species, caused by the isolation between populations and the existence of different cytotypes. The aim of this study was to obtain the karyotype of different species of *Griffinia* and closely related species, thus providing for systematic studies some information to assist in the understanding of the evolutionary and phylogenetic relationships of the species of this genus. We studied 10 species and two unidentified morphospecies of *Griffinia*, as well as four species of closely related genera. Root tips collected from these species were pretreated with colchicine and fixed in Farmer solution for the production of slides with metaphasic cells. We determined the number and chromosomal morphology. We performed banding with chromomycin₃ (CMA₃) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluorochromes and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with ribosomal DNA (5S rDNA). All *Griffinia* species presented 20 chromosomes. Chromosome numbers for the analyzed species of *Eithea*, *Hippeastrum*, *Tocantinia* and *Worsleya* were $2n = 18, 44, 22$ and 42 respectively. *Griffinia* species presented two, four, five or six CMA₃⁺ bands. One to three 5S rDNA sites were observed in two to six chromosome pairs in the terminal, subterminal or pericentromeric position. For each species, there was a unique pattern of distribution of DNAr 5S sites, so it is possible to delimitate species through this cytogenetic technique. The species of a group reported in the literature as Liboniana complex showed similar karyotypes that can corroborate the closeness among the species of the group:

they have only one chromosome pair with a CMA₃⁺ band and two chromosome pairs with 5S rDNA sites. We observed karyotypic variations not only among species but also between populations of the same species. Cases of intraspecific variation are known for plants. However, this variation may be either an interpopulational variation, or a simple reflection of the difficulty in taxonomy of the genus. The data found at this analysis proved cytogenetic studies to be a quite useful tool in the delimitation of genera and species, and recognition of groups within *Griffinia*.

Keywords: Fluorescent *in situ* hybridization, chromosome banding, Hippeastreae, Griffineae

ORGANIZAÇÃO GERAL DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação, abordando o estudo citogenético de algumas espécies de *Griffinia* (Amaryllidaceae) ocorrentes no Brasil, está organizada em dois tópicos:

- 1) Introdução Geral, onde são apresentadas informações gerais sobre a taxonomia e distribuição geográfica de Amaryllidaceae e de *Griffinia*, além da contribuição dos estudos cromossômicos (e do desenvolvimento/aperfeiçoamento de técnicas) para taxonomia e evolução de plantas em geral e para representantes de Amaryllidaceae;
- 2) Manuscrito sobre a citogenética de espécies de *Griffinia* e de gêneros próximos, empregando técnicas de citogenética.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Amaryllidaceae

A família Amaryllidaceae J. Saint-Hilaire, com cerca de 73 gêneros e 1605 espécies (Stevens 2001 onwards), pertence à ordem Asparagales, no grupo das monocotiledôneas. Composta por três subfamílias, Agapanthoideae Endlicher (= Agapanthaceae F. Voigt), Allioideae Herbert e Amaryllidoideae Dumortier (APG III), que já foram consideradas famílias em classificações anteriores (Givnish *et al.* 2006), Amaryllidaceae forma um grupo monofilético fortemente embasado (Fay & Chase 1996, Fay *et al.* 2000, Givnish *et al.* 2006, Pires *et al.* 2006) (Figura 1).

As Amaryllidaceae são plantas bulbosas e perenes de hábito herbáceo, com folhas com filotaxia dística ou em espiral, inflorescência escaposa, umbeliforme ou uniflora, envolta por duas ou três brácteas maiores (espatas) e geralmente com mais brácteas internas pequenas, pedicelos não articulados, estilete longo e estigma seco ou úmido (Meerow 1998). Amaryllidoideae diferencia-se das demais subfamílias pela presença de alcaloides característicos, aminoácidos não proteicos e ovário ínfero (Stevens 2001 onwards).

Amaryllidaceae apresenta uma distribuição cosmopolita, sendo que as Allioideae concentram-se principalmente no hemisfério norte e as Agapanthoideae, no sul da África (Stevens 2001 onwards). As espécies da subfamília Amaryllidoideae distribuem-se no hemisfério sul, sendo os gêneros, em sua maioria, endêmicos da América do Sul ou África, locais que são também centros de distribuição para essas espécies (Arroyo & Cutler 1984).

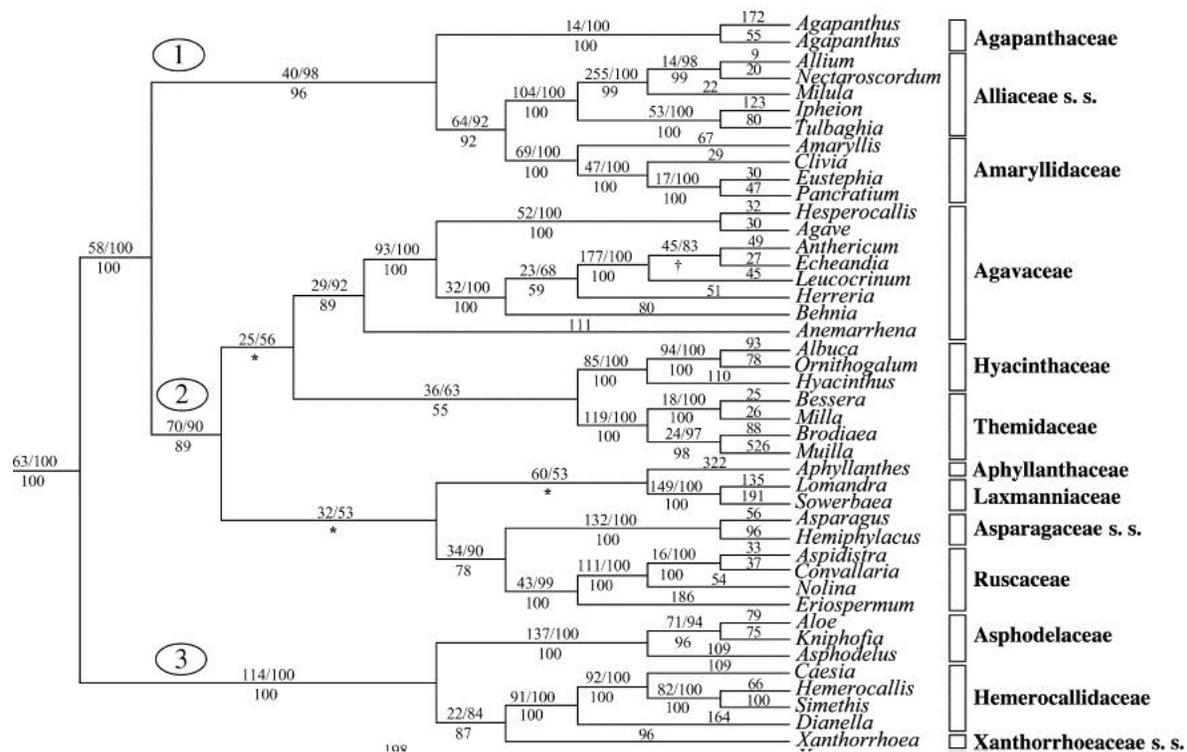


Figura 1 – Trecho da filogenia para Asparagales, obtida com o uso de dados de seqüências plastidiais (atpB, rbcL, trnL intron e trnL–F intergenic spacer, ndhF, matK) e mitocondriais (atp1). Números acima das barras indicam distância entre os grupos e bootstrap (branch/bootstrap) para dados plastidiais e mitocondriais combinados. Números abaixo das barras indicam porcentagem de bootstrap para dados plastidiais apenas. O círculo contendo o número 1 à esquerda e acima na imagem, representa Alliaceae s.l. (sensu APG II 2003), grupo atualmente reconhecido como Amaryllidaceae (APG III 2009). Modificado de Pires et al. 2006.

Muitas Amaryllidaceae foram utilizadas como medicamento ou veneno pelos povos africanos (Snijman & Linder 1996, Nair & van Staden 2013), e para produção de veneno para setas por povos caçadores-coletores em tempos bastante remotos (Snijman & Linder 1996, Forbes 1986, Bradlow 1994). Algumas Amaryllidaceae são cultivadas, tendo em vista o uso das belas flores para ornamentação e jardinagem (Strydom 2005). Atualmente há uma intensa investigação nos compostos de Amaryllidaceae visando a obtenção de diversos fármacos que têm mostrado atividades terapêuticas (Rønsted *et al.* 2012).

Em Amaryllidoideae, a tribo Griffineae, proposta por Ravenna (1974), aceita por Preuss (1999) e legitimada por Meerow *et al.* (2000), é composta por dois gêneros endêmicos do Brasil, o gênero monoespecífico *Worsleya* (Lem.) Traub e o gênero *Griffinia* Ker Gawl. A tribo é uma linhagem antiga de Amaryllidaceae das Américas e se mostra irmã de Hippeastreae (Fig. 2).

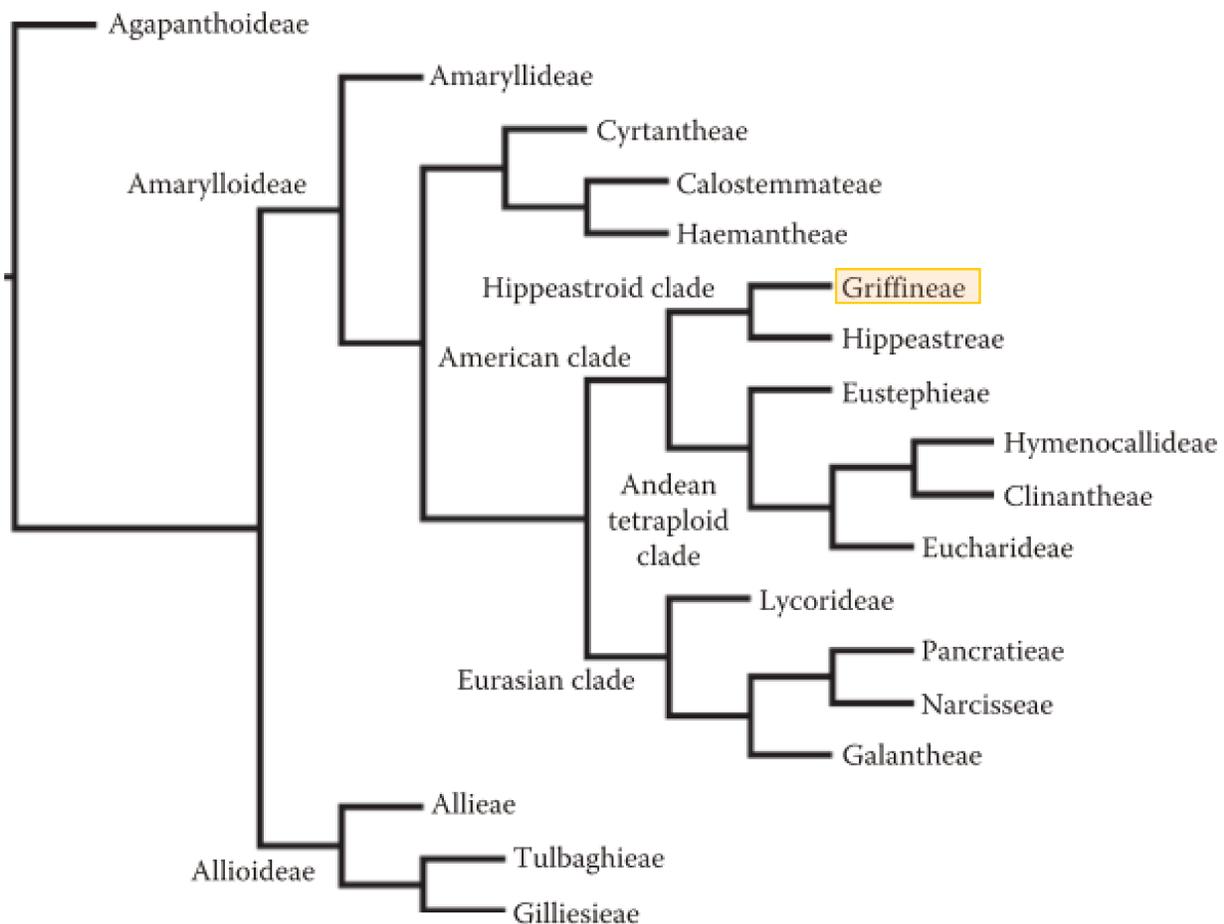


Figura 2 – Filogenia da família Amaryllidaceae, com suas três subfamílias e as tribos correspondentes, sensu APG III (2009). Em destaque, a tribo Griffineae. Modificado de Meerow em Kamenetsky e Okubo 2012.

2. *Griffinia* (Ker Gawl)

O gênero *Griffinia* possui 19 espécies geófitas, distribuídas pela Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica nos estados do Tocantins, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro (Dutilh & Oliveira 2012).

Griffinia constitui-se de plantas de elevado potencial na horticultura, pois são bastante apreciadas por suas belíssimas flores (Fig. 3). Entretanto, esse gênero de plantas endêmicas encontra-se seriamente ameaçado de extinção (Dean 1995, Walter & Gillet 1997, Preuss 1999, Kirizawa *et al.* 2005). Atualmente, algumas espécies não têm sido mais encontradas em seus habitats originais, e algumas poucas são cultivadas em coleções particulares (Preuss 1999, Merow *et al.* 2002, Kirizawa *et al.* 2005).

O gênero é formado por dois subgêneros; *Griffinia* (Fig. 3, A a M), composto por espécies com quatro a quinze flores sem odor, de cor lilás, azulada ou branca e antese diurna; e *Hyline* (Fig. 3, N a P), cujas espécies geralmente produzem duas ou quatro flores grandes brancas e com odor, de antese noturna (Preuss & Meerow 2001a). A filogenia para o grupo (Fig. 4), feita com base em 23 caracteres morfológicos (Preuss 1999), colocou *G. gardneriana* (Herb.) Ravenna e *G. nocturna* Ravenna (subg. *Hyline*) ao lado do subgênero *Griffinia*, em que ainda se pode distinguir o complexo Liboniana, formado pelas espécies *G. aracensis* Ravenna, *G. espiritensis* Ravenna, *G. itambensis* Ravenna, *G. liboniana* E. Morren e *G. rochae* G.M. Morel, que seria grupo irmão de *G. intermedia* e *G. parviflora* Ker Gawl. As espécies *G. hyacintina* Ker Gawl, *G. alba* Preuss & Meerow e *G. ornata* Moore constituem um outro clado do subgênero *Griffinia*. (Fig 4).



Figura 3 - Flores de *Griffinia*. *G. concinna* (A), *G. espiritensis*, populações de Nova Venécia (B) e Barra do Colégio (C), *G. hyacinthina* (D), *G. intermedia*, populações de Itatiaia (E) e Mangaratiba (F), *G. liboniana*, populações de Itapebi (G), Petrópolis (H), e Ceará (I) *G. paubrasilica* (J), *G. rochae* (K), *G. sp1*, Alto Cariri (L), *G. sp2*, Santa Teresa (M), *G. gardneriana*, populações de Tucuns (N) e Búzios (O) e *G. nocturna* (P). Fotografias: A, D, G, H, M – Julie Dutilh. B, P – Antônio Campos. C, E, F, J, K, L, N, O – Mauro Peixoto. I – Gustavo Shimizu

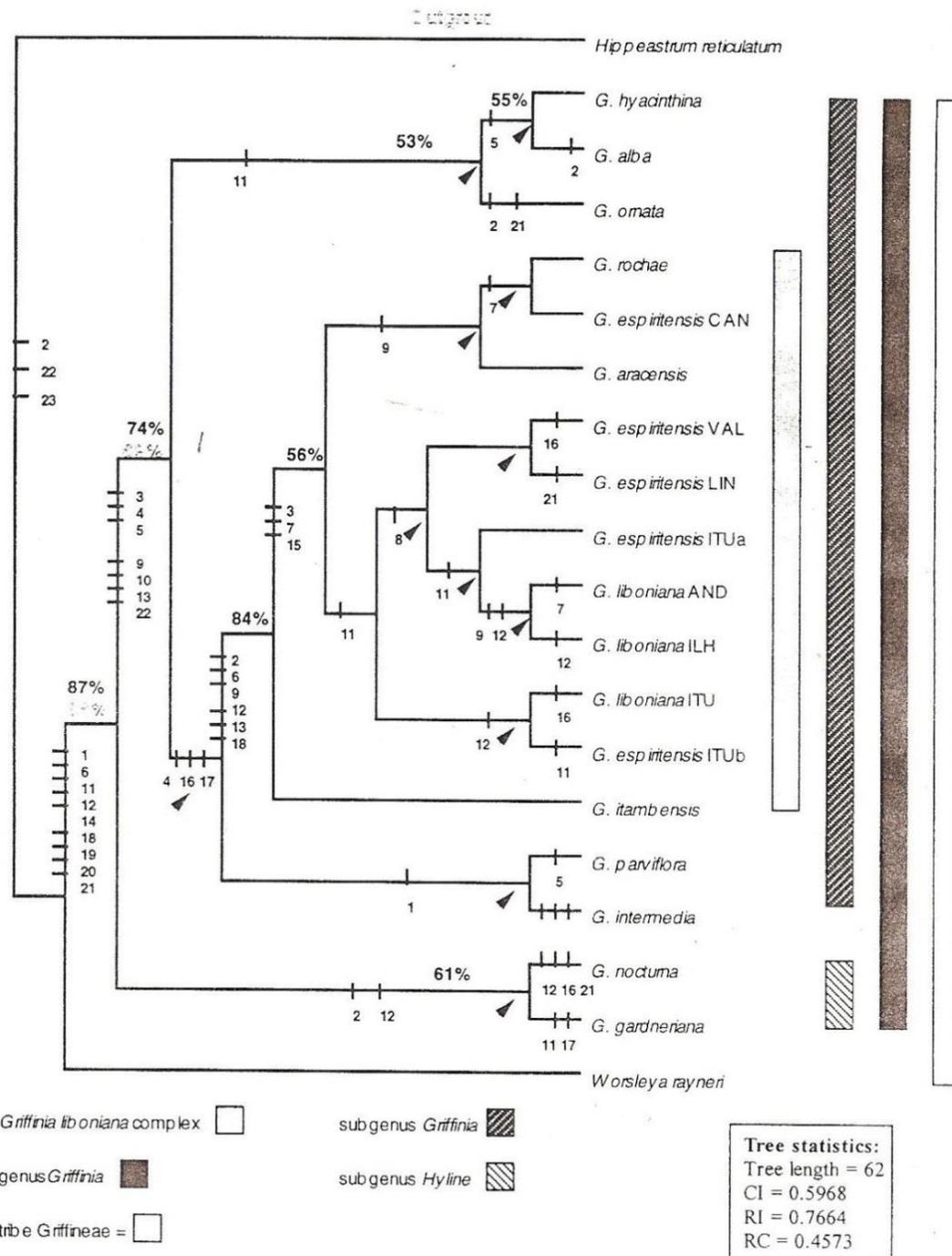


Figura 4 - Árvore morfológica com espécies de *Griffinia* feita com base em 23 caracteres morfológicos, por meio do software PAUP 4.0b1. Adaptado de Preuss 1999

Apesar de já existirem estudos morfológicos (Preuss 1999, 2000) a taxonomia no gênero *Griffinia* é muito dificultada pela morfologia floral e vegetativa bastante semelhante entre algumas espécies (Figura 3), a exemplo do ocorrido com *G. alba* Preuss & Meerow, inicialmente identificada como *G. intermedia* Lindl. Para Preuss & Meerow (2000), outros fatores que causam dificuldades taxonômicas são a variação morfológica ocasionada pelo isolamento geográfico entre populações distantes, a exemplo de *G. spiritensis* Rav. (Preuss & Meerow 2001b), e a existência de diferentes citótipos em uma espécie, como observado para *G. spiritensis* (Preuss & Meerow 2001b) e *G. liboniana* Morren (Preuss 1999), ambas com populações com $2n=20$ e $2n=30$ cromossomos.

3. Citogenética

Estudos citogenéticos permitem analisar a morfologia, a organização, a replicação, a variação e a função dos cromossomos (Guerra 1988), e dessa forma compreender mecanismos evolutivos e relações filogenéticas (Stebbins 1971). O número cromossômico por si só, um parâmetro cariotípico simples, obtido através de uma técnica simples e barata, já oferece resultados interessantes à taxonomia. Um exemplo pode ser retirado da observação da família Agavaceae. O estabelecimento dessa família foi influenciado pela uniformidade cariotípica dos gêneros *Agave* (antes pertencente a Amaryllidaceae) e *Yucca* (antes pertencente a Liliaceae), que possuíam $n=30$ cromossomos, ou múltiplos desse número. Apesar de a princípio outros gêneros terem sido incluídos em Agavaceae, análises moleculares dividiram o táxon em famílias menores, e apenas gêneros com o cariótipo característico ($n=30$) e alguns gêneros com cariótipos bimodais parecidos foram mantidos (Guerra 2008). Na classificação atual (APG III), o grupo é considerado uma subfamília (Agavoideae) dentro da família Asparagaceae (Chase *et al.* 2009).

Apesar de confiável, a contagem cromossômica nem sempre é suficiente para elucidar relações taxonômicas. No caso de números cromossômicos coincidentes, a análise do tamanho e da morfologia dos cromossomos pode ser útil. Técnicas que promovem a diferenciação longitudinal dos cromossomos, como bandamentos, que diferenciam regiões de heterocromatina e sua composição de bases nitrogenadas; e a hibridização *in situ*, que permite o mapeamento físico de sequências gênicas, vêm sendo cada vez mais utilizadas nos estudos citotaxonômicos.

O uso de fluorocromos com afinidade base-específica nos estudos cromossômicos teve início com os estudos de Caspersson e colaboradores (Caspersson *et al.* 1968, Caspersson *et al.* 1969a, Caspersson *et al.* 1969b). Nesses trabalhos foi hipotetizado que agentes alquilantes, os quais interagem com o átomo N7 da guanina no DNA, provavelmente se acumulariam preferencialmente onde há regiões cromossômicas ricas em guanina. Assim, se esse agente alquilante fosse fluorescente, regiões ricas em guanina poderiam ser distinguidas do restante do cromossomo, sob microscópio de fluorescência. O agente utilizado para essa alquilação foi quinacrina mostarda. A quinacrina mostarda, conquanto permitisse a identificação de regiões ricas em bases específicas, causava quebra nos cromossomos nessas mesmas regiões com bastante frequência (Caspersson *et al.* 1969b). Muitos outros agentes base-específicos vinham sendo estudados quanto às suas propriedades químicas e sua aplicabilidade na citogenética, na década de 60 (e.g. Goldberg 1965, O'Brien *et al.* 1966). Além dos fluorocromos que se ligavam à guanina, também foram identificados outros agentes, também base-específicos, com maior afinidade por timina e adenina (e.g. Bhuyan & Smith 1965). Tais agentes, contudo, não apresentavam uma fluorescência que permitisse a visualização de regiões ricas em determinadas bases. Mesmo que ainda se pesquisasse drogas e reagentes, o bandamento com químicos base-específicos já vinha sendo utilizado no estudo dos cromossomos (e.g. Caspersson 1969b, Vosa 1970).

A importância da região heterocromática poligênica da cromatina associada ao nucléolo, devido à sua função na rápida iniciação da síntese de ribossomos, era uma descoberta recente. Assim, a ação de agentes alquilantes fluorescentes (além do bandamento NOR (*nucleolus organizer region*) com nitrato de prata) que permitissem localizar tais regiões no conjunto cromossômico, constituía-se de uma ferramenta inovadora e promissora para a compreensão da organização e da estrutura do DNA (Caspersson *et al.* 1968).

Na década de 70, os estudos sobre agentes fluorescentes base-específicos já haviam atingido um enorme avanço e muitas drogas já estavam disponíveis, tais como Hoechst 33.258, quinacrina e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que coravam regiões ricas em AT, e mitramicina, olivomicina e cromomicina A₃ (CMA₃), que coravam regiões ricas em CG (Sumner 1990). Schweizer (1976) testou essas e outras drogas, buscando a combinação que oferecesse os resultados com a melhor resolução possível sobre a constituição da cromatina, e considerou a CMA₃ um bom fluorocromo para se utilizar sequencialmente junto ao fluorocromo DAPI. Essa técnica foi considerada um método confiável para a identificação e diferenciação de regiões heterocromáticas ricas em CG e AT (Sumner 1990, Schweizer & Ambros 1994, Guerra 2000) e é utilizada desde então por muitos pesquisadores, auxiliando na compreensão dos mecanismos evolutivos e das relações filogenéticas entre as plantas.

Em *Citrus* (Rutaceae), a coloração sequencial com CMA₃ e DAPI gerou padrões de bandamentos cromossômicos distintos para cada uma das seis espécies estudadas por Guerra (1993). A análise desses cariótipos com marcadores distintos para cada espécie permitiu não apenas a diferenciação das espécies entre si, mas também a confirmação da origem híbrida de algumas espécies e clones, além da possibilidade do uso dos dados citológicos para estudos de biologia reprodutiva e evolução no grupo (Guerra 1993). Por corresponderem frequentemente a sítios de DNAr 45S e à região organizadora do nucléolo, as bandas CMA₃ constituem uma

informação importante à compreensão da estrutura dos cromossomos, especialmente quando somam-se a ela outras informações. Barros e Silva *et al.* (2010) amplificaram por PCR (reação em cadeia da polimerase) um DNA satélite sabidamente rico em CG extraído de *Citrus sinensis*. Após o bandamento com CMA₃, hibridizaram essa sonda de DNA satélite em sete espécies de *Citrus* e seis espécies proximalmente relacionadas, a fim de compreender a evolução de bandas heterocromáticas ricas em CG dentro da subfamília Aurantioideae. Também foram utilizadas sondas de DNA ribossômico (DNAr 45S), para identificar quais bandas CMA₃⁺ corresponderiam a esses sítios. Os autores obtiveram um padrão de bandas muito semelhante dentro do grupo, com satélites frequentemente em regiões terminais nos cromossomos. Concluíram que, muito provavelmente, o cariótipo básico de Aurantioideae já possuía repetições em tandem de algum tipo ancestral desse satélite rico em CG, que se encontrava na maioria das terminações cromossômicas e foram amplificadas ou reduzidas durante o curso evolutivo da subfamília. Isso teria resultado nesse padrão de bandas bastante semelhante entre as espécies do grupo, em que provavelmente a maioria dos gêneros manteve a distribuição terminal do satélite. As hibridizações foram feitas via hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

A FISH é uma técnica que derivou da hibridização *in situ* (ISH). Essa técnica, desenvolvida concomitante e independentemente por Pardue & Gall (1969) e John *et al.* (1969) baseia-se na propriedade cromossômica da complementaridade das fitas, e constituía-se em hibridizar sondas de RNA mensageiro em solução com o conjunto cromossômico em preparações citológicas. As sondas, contudo, eram marcadas com radioatividade e detectadas por autorradiografia. Langer *et al.* (1981) introduziram novidades à técnica: as sondas passaram a ser marcadas por *nick translation* com nucleotídeos biotinilados, e detectadas com anticorpos, pela ligação de avidina ou streptoavidina marcadas com fluorescência às sondas. Após esse desenvolvimento inicial, a sensibilidade da técnica, agora chamada FISH, aumentou rapidamente com o surgimento de novos haptenos,

fluorocromos, anticorpos e enzimas, e também com o desenvolvimento marcante das técnicas e ferramentas de microscopia de fluorescência (Liehr 2009). Tornou-se possível a “*multicolor FISH*”, que consiste em mapear simultaneamente diversas sequências gênicas distintas, mediante a utilização de fluorocromos emissores de luz em frequências distintas, e filtros adequados para a visualização desses fluorocromos (Liehr *et al.* 2006).

O desenvolvimento da FISH marcou a transição da citogenética clássica para a citogenética molecular, a qual deslumbrava pesquisadores em todo o mundo. Agora era possível ver cromossomos com um novo nível de detalhamento. Trabalhos belíssimos foram desenvolvidos com essa poderosa ferramenta. A morfologia dos cromossomos de *Pinus* é bastante conservada entre as espécies, sendo difícil até mesmo identificar os pares dentro de cada espécie mediante a utilização de técnicas de coloração convencional. Hizume *et al.* (2002) aplicaram em quatro espécies de *Pinus* a técnica de “*multicolor FISH*”, em que quatro sondas foram utilizadas. Os autores conseguiram obter marcadores suficientes não apenas para identificar os pares cromossômicos dentro de cada espécie, mas também para diferenciar eficientemente cada uma das espécies. Num segundo trabalho desenvolvido com outras cinco espécies de *Pinus* (Liu *et al.* 2003), os autores conseguiram, além de distinguir as espécies, relacionar as alterações cariotípicas com as posições filogenéticas que as espécies ocupavam. Também reconheceram a origem híbrida de uma das espécies, bem como as alterações que a mesma sofreu no curso de seu estabelecimento enquanto nova espécie.

Para o gênero *Zea*, Kato *et al.* (2004) utilizaram-se da FISH e encontraram marcadores que permitiram a identificação de cada um dos 10 pares cromossômicos. Posteriormente, Albert *et al.* (2010) aplicaram a técnica a 52 amostras (entre espécies do gênero e linhagens de cada espécie), e determinaram quais marcadores eram estáveis e quais variavam entre as espécies e linhagens. A comparação entre as espécies permitiu uma melhor compreensão da evolução dos caracteres

cromossômicos. A técnica de mapeamento dos marcadores nos cromossomos via FISH vem sendo muito utilizada, e uma revisão bastante informativa sobre ela pode ser encontrada em Kato *et al.* (2005).

De fato, mesmo na era da genômica, em que técnicas moleculares permitem sequenciar o DNA e elucidar a exata composição de suas bases, a citogenética ainda desempenha um papel crucial. A compreensão dos cromossomos traz contribuições essenciais aos projetos de genômica, pois delinea a ordem de marcadores, define lacunas e revela rearranjos genômicos (Figuroa & Bass 2010). Para compreender melhor como a Citogenética constitui-se em uma ferramenta extremamente útil e informativa às mais variadas áreas da Biologia, estão disponíveis diversas revisões (e.g. Guerra 1990, Schwarzacher 2003, Dobigny *et al.* 2004, Jiang & Gill 2006, Liehr *et al.* 2006, Guerra 2008, Figuroa & Bass 2010). Dentre elas, Guerra (1990, 2008) e Dobigny *et al.* (2004) tratam especificamente sobre a citogenética aplicada à taxonomia e cladística.

4. Citogenética em Amaryllidaceae e *Griffinia*

Em Amaryllidaceae, o número cromossômico e o cariótipo básico mostraram-se bastante úteis para a caracterização e delimitação de gêneros (Flory 1977, Arroyo 1982, Kubitzki 1998, Muñoz *et al.* 2011). Como exemplo, a simples morfologia cromossômica permitiu a Ising (1969, 1970) a compreensão de espécies de *Cyrtanthus*, possibilitando a delimitação de grupos dentro do gênero, segundo a similaridade dos cariótipos. Também a separação de *Rhodophiala* de *Hippeastreae*, inicialmente baseada na largura da folha e na distribuição geográfica, ganhou o respaldo nos estudos citotaxonômicos, que revelaram os números cromossômicos $x=11$ para *Hippeastreae* e $x=9$ em *Rhodophiala* (Guerra 2008). No trabalho desenvolvido por Muñoz *et al.* (2011), diferenças cariotípicas em número e morfologia dos cromossomos mostraram que é viável manter a separação

dos gêneros *Rhodophiala* C. Presl. e *Rhodolirium* Phil. Bandamentos cromossômicos com fluorocromos auxiliaram Ran *et al.* (1999) a compreender o gênero *Clivia* Lindl. Embora o número e a forma dos cromossomos fossem muito semelhantes entre as quatro espécies estudadas, os padrões de bandas forneceram resultados suficientes para identificar com precisão cada uma delas. Atualmente, catorze microssatélites já foram isolados e identificados em *Clivia* (Gao *et al.* 2012), restando agora localizar fisicamente tais microssatélites nos cromossomos. Para o gênero *Crinum* L., a morfologia das plantas não é suficiente para separar *C. pratense* e *C. defixum* eficientemente, e nem tampouco o número cromossômico e a morfologia dos cromossomos corados com orceína (Alam *et al.* 1991). Entretanto, o bandamento com CMA₃/DAPI mostrou padrões de bandas diferentes para as espécies, permitindo sua diferenciação (Alam *et al.* 1998). Posteriormente, o grupo foi estudado por meio de FISH, e a elaboração de um cariótipo bastante completo, aliado a análises filogenéticas, permitiu profunda compreensão do gênero (Ran *et al.* 1999, 2001a, 2001b, 2001c, Murray *et al.* 2011).

Alguns trabalhos foram desenvolvidos na Itália para os gêneros *Leucojum*, *Sternbergia*, *Galanthus* e *Narcissus* (D'Amato & Bianchi 1999, Dominicis *et al.* 2002, D'Amato 2004), os quais elucidaram os cariótipos dessas espécies e revelaram a origem híbrida de *Narcissus biflorus*. Dada a grande facilidade de formação de híbridos, também foram estudados o tamanho de genoma e a variação na composição de bases em híbridos naturais e artificiais de *Narcissus* (Marques *et al.* 2012). Existem também alguns trabalhos para *Zephyranthes* (Felix *et al.* 2007, 2008, 2011a, 2011b), com elaboração de cariótipo, e discussão da grande variabilidade no número cromossômico e dos diferentes níveis de ploidia dentro do gênero ou até mesmo dentro de uma população (Felix *et al.* 2008).

Apesar da evidente eficiência da citogenética como ferramenta à compreensão da taxonomia e da evolução das espécies em Amaryllidaceae, são relativamente pouco numerosos os estudos

cromossômicos para a família. Embora haja estudos cromossômicos mais detalhados para alguns gêneros, a maioria dos representantes de Amaryllidaceae não possui tais estudos, ou possui apenas contagens. Para outros gêneros, como *Tocantinia* e *Eithea* (Figura 5), nem mesmo os números cromossômicos estão disponíveis. Até mesmo para gêneros bastante estudados, como *Hippeastrum* (Figura 5), ainda há espécies cujos cromossomos nunca foram analisados. O número cromossômico básico para a subfamília Amaryllidoideae é $x=11$ (Goldblatt 1976). No gênero *Griffinia* contagens revelaram o número cromossômico $2n=20$ para *G. aracensis* Ravenna, *G. parviflora* Ker Gawl, *G. hyacinthina* Ker Gawl, *G. liboniana* Morren, *G. spiritensis* Ravenna, *G. nocturna* Ravenna e *G. rochae* Morel, além de citótipos com $2n=30$ cromossomos em *G. liboniana* e *G. spiritensis* (Preuss 1999). Para *Worsleya* (Figura 5), o número cromossômico é $2n=42$ (Dutilh 2005). Entretanto, técnicas citogenéticas de bandamentos e hibridizações de DNA *in situ*, que fornecem mais detalhes sobre os cromossomos, ainda não foram aplicadas para a tribo Griffinieae.



Figura 5 - Espécies de Amaryllidaceae, proximamente relacionadas com *Griffinia*, para as quais não há estudos citogenéticos. *Eithea* sp (A), *Hippeastrum reticulatum* (B), *Tocantinia* sp (C), *Worsleya procera* (D). Fotografias: A, B, D – Mauro Peixoto. C – Julie Dutilh.

O objetivo geral deste trabalho é obter o cariótipo de diferentes espécies de *Griffinia* e de algumas espécies proximamente relacionadas (grupos externos), a fim de obter informações acerca da evolução cariotípica do grupo. São objetivos específicos:

- Mediante a análise do cariótipo de diferentes espécies de *Griffinia*, revelar possíveis caracteres cromossômicos que possam ser utilizados para auxiliar na circunscrição e na delimitação de espécies.
- Por meio da comparação dos cariótipos de *Griffinia* com os cariótipos de grupos externos proximamente relacionados, compreender as relações filogenéticas e evolutivas dentro do grupo.
- Investigar possíveis variações populacionais e poliploidizações, a fim de compreender a dinâmica e possíveis mecanismos de especiação.
- Fornecer à sistemática informações que auxiliem na compreensão desse gênero taxonomicamente complicado, e na preservação dessas espécies seriamente ameaçadas.
- Contribuir para o conhecimento cromossômico sobre espécies de cerrado, caatinga e mata atlântica, onde estudos citogenéticos e citotaxonômicos são pouco numerosos, em contraste com a enorme biodiversidade de nossa flora.

5. Referências Bibliográficas

- Alam, S.K.S., Zaman, M.A., Akhter, S., Patwary, M.U. (1991). Karyotype analysis of *Crinum defixum* Ker-Gawl and *Crinum pratense* herb. *Bangladesh Journal of Botany*, 20(1), 1-6.
- Alam, S.K.S., Azhar, S.S., Sarker, R.H., Zaman, M.A. (1998). Karyotype analysis with different banding in *Crinum pratense* and *Crinum defixum*. *Cytologia*, 63, 223-227.
- Albert, P. S., Gao, Z., Danilova, T. V., & Birchler, J. A. (2010). Diversity of chromosomal karyotypes in maize and its relatives. *Cytogenetic and genome research*, 129(1-3), 6-16.
- Almeida, C., & Pedrosa-Harand, A. (2011). Contrasting rDNA evolution in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and common bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). *Cytogenetic and genome research*, 132(3), 212.
- Angiosperm Phylogeny Group 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(2), 105-121.
- Arroyo, S. C. (1982). The Chromosomes of *Hippeastrum*, *Amaryllis* and *Phycella* (Amaryllidaceae). *Kew Bulletin*, 37(2), 211-216.
- Arroyo, S. C., Cutler, D. F. (1984). Evolutionary and taxonomic aspects of the internal morphology in Amaryllidaceae from the South America and Souther Africa. *Kew Bulletin*, 39(3), 467-498.
- Barros e Silva, A. E., Marques, A., dos Santos, K. G., & Guerra, M. (2010). The evolution of CMA bands in Citrus and related genera. *Chromosome Research*, 18(4), 503-514.

- Bhuyan, B. K., & Smith, C. G. (1965). Differential interaction of nogalamycin with DNA of varying base composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(2), 566.
- Bradlow, F. R. (1994). *Francis Masson's Account of Three Journeys at the Cape of Good Hope 1772-1775*. Tablecloth Press, Cape Town.
- Caspersson, T., Farber, S., Foley, G. E., Kudynowski, J., Modest, E. J., Simonsson, E., & Zech, L. (1968). Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Experimental cell research*, 49(1), 219-222.
- Caspersson, T. O. R. B. J. O. R. N., Zech, L., Modest, E. J., Foley, G. E., Wagh, U., & Simonsson, E. (1969a). Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. *Experimental cell research*, 58(1), 128-140.
- Caspersson, T., Zech, L., Modest, E. J., Foley, G. E., Wagh, U., & Simonsson, E. (1969b). DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus. *Experimental cell research*, 58(1), 141-152.
- Chase, M. W., Reveal, J. L., & Fay, M. F. (2009). A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 132-136.
- D'amato, G. F., & Bianchi, G. (1999). The chromosome banding of some Italian Amaryllidaceae. *Caryologia*, 52(1-2), 87-92.
- D'Amato, G. (2004). Karyotype and heterochromatin characterization in some species of *Narcissus* (Amaryllidaceae). *Caryologia*, 57(1), 99-105.

- Dean, W. (1995). *With broadax and firebrand: the destruction of the Brazilian Atlantic forest*. University of California Press, Berkely.
- Dobigny, G., Ducroz, J. F., & Robinson, T. J. (2004). *Cytogenetics and cladistics. Systematic biology*, 53(3), 470-484.
- Dominicis, R. D., D'amato, G., & Tucci, G. F. (2002). On the hybrid origin of *Narcissus biflorus* (Amaryllidaceae): *analysis of C-banding and rDNA structure. Caryologia*, 55(2), 129-134.
- Dutilh, J. A. H. (2005). Ornamental bulbous plants of Brazil. In *V International Symposium on New Floricultural Crops 683* (pp. 37-42).
- Dutilh, J.H.A., Oliveira, R.S. (2012) Amaryllidaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Fay, M.F., Chase, M.W. (1996). Resurrection of Themidaceae for the Brodiaea alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae, and Agapanthoideae. *Taxon*, 45(3), 441-451.
- Fay, M. F., Rudall, P. J., Sullivan, S., Stobart, K. L., De Bruijn, A. Y., Reeves, G., Qamaruz-Zaman, F., Hong, W., Joseph, J., Hahn, W. J., Conran, J. G., Chase, M. W. (2000). Phylogenetic studies of Asparagales based on four plastid DNA regions, pp.360–371. In K. L. Wilson and D. A. Morrison [eds.], *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia
- Felix, W. P., Dutilh, J. H., Melo, N. F., Almeida, A., & Felix, L. P. (2007). Citogenética de duas espécies de *Zephyranthes* Herb.(Amaryllidaceae–Hipeastreae) cultivadas. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(S1), pg-294.

- Felix, W. J., Dutilh, J. H., Melo, N. F. D., Fernandes, A. A., & Felix, L. P. (2008). Intrapopulation chromosome number variation in *Zephyranthes sylvatica* Baker (Amaryllidaceae: Hippeastreae) from northeast Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, 31(2), 371-375.
- Felix, W. J. P., Felix, L. P., Melo, N. F., Dutilh, J. H. A., & Carvalho, R. (2011a). Cytogenetics of Amaryllidaceae species: heterochromatin evolution in different ploidy levels. *Plant Systematics and Evolution*, 292(3-4), 215-221.
- Felix, W. J. P., Felix, L. P., Melo, N. F., Oliveira, M. B. M., Dutilh, J. H. A., & Carvalho, R. (2011b). Karyotype variability in species of the genus *Zephyranthes* Herb. (Amaryllidaceae–Hippeastreae). *Plant Systematics and Evolution*, 294(3-4), 263-271.
- Figuroa, D. M., & Bass, H. W. (2010). A historical and modern perspective on plant cytogenetics. *Briefings in functional genomics*, 9(2), 95-102.
- Flory W.S. (1977). Overview of chromosome evolution in the Amaryllidaceae. *Nucleus*, 20.
- Forbes, V. S. (1986). Carl Peter Thunberg. *Travels at the Cape of Good Hope 1772-1775. Second Series No. 17. Van Riebeeck Society, Cape Town*
- Frumhoff, P. C. & H. K. Reeve. (1994). Using phylogenies to test hypotheses of adaptation: A critique of some current proposals. *Evolution*, 48, 172-180.
- Gao, W., Zhao, H., Liu, Y., Li, M. R., Nurmat, E., Li, L. F., Ren, Y.Y., Xiao, H. X. (2012). Isolation and Identification of Fourteen Microsatellite Markers in *Clivia miniata* and *Clivia nobilis* (Amaryllidaceae). *International journal of molecular sciences*, 13(8), 9609-9614.
- Givnish, T.J., Pires J.C., Graham, S.W., McPherson, M.A., Prince, L.M., Patterson, T.B., Rai, H.S., Roalson, E.R., Evans, T.M., Hahn, W.J., Millam, K.C., Meerow, A.W., Molvray, M., Kores, P.,

- O'brien, H.E., Kress, W.J., Hall, J., Sytsma, K.J. (2006). Phylogeny of the monocotyledons based on the highly informative plastid gene *ndhF*: evidence for widespread concerted convergence. Pp. 28-51 in J.T. Columbus, E.A. Friar, J.M. Porter, L.M. Prince, M.G. Simpson (eds.) *Monocots: Comparative Biology and Evolution (excluding Poales)*. Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont, CA.
- Goldberg, I. H. (1965). Mode of action of antibiotics: II. Drugs affecting nucleic acid and protein synthesis. *The American journal of medicine*, 39(5), 722-752.
- Goldblatt, P. (1976). Chromosome cytology os *Hessea*, *Strumaria* and *Carpolyza* (Amaryllidaceae). *Annals of Missouri Botanical Garden*, 63, 314-320.
- Guerra, M. (1988). *Introdução à citogenética geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Guerra, M. (1990). A situação da citotaxonomia de Angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 4(2): 75-86
- Guerra, M. (1993). Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity - London*, 71, 234-234.
- Guerra, M. (2000). Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4), 1029-1041.
- Guerra, M. (2008). Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(3-4), 339-350.
- Guerra, M., & Souza, M. (2002). Como analisar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC.

- Hizume, M., Shibata, F., Matsusaki, Y., & Garajova, Z. (2002). Chromosome identification and comparative karyotypic analyses of four *Pinus* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(4), 491-497.
- Jiang, J., & Gill, B. S. (2006). Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*, 49(9), 1057-1068.
- John, H. A., Birnstiel, M. L., & Jones, K. W. (1969). RNA-DNA Hybrids at the Cytological Level. *Nature*, 223, 582-587.
- Kamenetsky, R., & Okubo, H. (Eds.). (2012). *Ornamental geophytes: from basic science to sustainable production*. CRC Press.
- Kato, A., Lamb, J. C., & Birchler, J. A. (2004). Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(37), 13554-13559.
- Kato, A., Vega, J. M., Han, F., Lamb, J. C., & Birchler, J. A. (2005). Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Current opinion in plant biology*, 8(2), 148-154.
- Kirizawa, M., Lopes, E.A., Silveira, R.B.A., Tavares, A.R., Kanashiro, S. (2005) *Griffinia hyacinthina* (Ker Gawl.) Ker Gawl., Amaryllidaceae da Mata Atlântica, endêmica e em perigo de extinção: estudos morfológico e horticultural. *Hoehnea*, 32, 87-92.
- Langer, P. R., Waldrop, A. A., & Ward, D. C. (1981). Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11), 6633-6637.
- Liehr, T. (Ed.). (2009). *Fluorescence in situ hybridization (FISH): application guide*. Springer.

- Liehr, T., Starke, H., Heller, A., Kosyakova, N., Mrasek, K., Gross, M., Karst, C., Steinhäuser, U., Hunstig, F., Fickelscher, I., Kuechler, A., Trifonov, V., Romanenko, S.A., Weise, A. (2006). Multicolor fluorescence *in situ* hybridization (FISH) applied to FISH-banding. *Cytogenetic and genome research*, 114(3-4), 240-244.
- Liu, Z. L., Zhang, D., Hong, D. Y., & Wang, X. R. (2003). Chromosomal localization of 5S and 18S–5.8 S–25S ribosomal DNA sites in five Asian pines using fluorescence *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(2), 198-204.
- Marques, I., Feliner, G. N., Martins-Loução, M. A., & Aguilar, J. F. (2012). Genome size and base composition variation in natural and experimental *Narcissus* (Amaryllidaceae) hybrids. *Annals of Botany*, 109(1), 257-264.
- Meerow, A.W. (1998). Amaryllidaceae. IN: *The families and genera of vascular plants*. vol III, ed K. Kubitzki. Springer Verlag, Heidelberg.
- Meerow, A.W., Guy, C.L., Li, Q-B., Yang, S-L. (2000). Phylogeny of the American Amaryllidaceae Based on nrDNA ITS Sequences. *Systematic Botany*, 25(4), 708-726.
- Meerow, A.W., Preuss, K.D., Tombolato, A.F.C. (2002). *Griffinia* (Amaryllidaceae), a critically endangered Brazilian geophyte with horticultural potential. *Acta Hort.* 570:57-64.
- Meerow, A. (2012). Chapter II. Taxonomy and Phylogeny. In *Ornamental geophytes: from basic science to sustainable production*. Kamenetsky, R., & Okubo, H. (Eds.). CRC Press.
- Muñoz, M; Riegel, R., Seeman, Peñalillo, P, Schiappacasse, F. & Nuñez, J. (2011). Phylogenetic relationships of *Rhodolirium montanum* Phil. and related species based on nucleotide sequences from ITS region and karyotype analysis. *Gayana Botany*, 68(1), 40-48.

- Murray, B.G., Wong, C., & Hammett, K. R. (2011). The karyotype of *Clivia mirabilis* analyzed by differential banding and fluorescence in-situ hybridization. *Plant Systematics and Evolution*, 293(1-4), 193-196.
- Nair, J.J., & van Staden, J. (2013). Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 262-275.
- O'Brien, R.L., Olenick, J. G., & Hahn, F. E. (1966). Reactions of quinine, chloroquine, and quinacrine with DNA and their effects on the DNA and RNA polymerase reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(6), 1511.
- Pardue, M.L., & Gall, J. G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 64(2), 600-604.
- Pires, J.C., Maureira, I.J., Givnish, T.J., Sytsma, K.J., Seberg, O., Petersen, G., Davis, J.I., Stevenson, D. W., Rudall, P. J., Fay, M. F., Chase, M. W. (2006). Phylogeny, genome size, and chromosome evolution of Asparagales. Pp. 287-304 in J. T. Columbus, E.A. Friar, J.M. Porter, L.M. Prince, M.G. Simpson (eds.) *Monocots: Comparative Biology and Evolution - Poales*. Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont, CA
- Preuss, K. D. (1999). Systematic Studies in the Genus *Griffinia* (Amaryllidaceae). Dissertação de Mestrado. University of Florida, Gainesville.
- Preuss, K. D. (2000) The genus *Griffinia* Ker Gawler (Amaryllidaceae), revisited. *Herbertia*, 54, 51-66
- Preuss, K. D., Meerow, A. W. (2000). *Griffinia alba* (Amaryllidaceae), a new species from northeastern Brazil. *Novon*, 10(3), 230-233.

- Pruess, K. D., Meerow, A.W. (2001a). Two new white-flowered *Griffinia* species. *Herbertia*, 56, 127-130.
- Preuss K. D., Meerow, A.W. (2001b). A closer look at *Griffinia espiritensis* Rav. (Amaryllidaceae). *Herbertia*, 56, 119-126
- Ran, Y., Murray, B. G., & Hammett, K. R. W. (1999). Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and *in situ* hybridization. *Euphytica*, 106(2), 139-147.
- Ran, Y., Hammett, K. R., & Murray, B. G. (2001a). Hybrid identification in *Clivia* (Amaryllidaceae) using chromosome banding and genomic *in situ* hybridization. *Annals of Botany*, 87(4), 457-462.
- Ran, Y., Hammett, K. R., & Murray, B. G. (2001b). Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia* (Amaryllidaceae). *Annals of botany*, 87(6), 823-830.
- Ran, Y., Murray, B. G., & Hammett, K. R. W. (2001c). Evaluating genetic relationships between and within *Clivia* species using RAPDs. *Scientia horticultrae*, 90(1), 167-179.
- Ravenna, P. (1974). Studies in the genus *Griffinia*. *Plant Life*, 30, 64-65.
- Rønsted, N. et al. (2012). Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of Amaryllidaceae. *BMC Evolutionary Biology* 12:182-194.
- Schwarzacher, T. (2003). Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent *in situ* hybridization data in plants. *Journal of experimental botany*, 54(380), 11-23.
- Schweizer, D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58(4), 307-324.
- Schweizer, D., Ambros, P. F. (1994). Chromosome banding. In *Chromosome Analysis Protocols*. Humana Press.

- Snijman, D. A., Linder, H.P. (1996). Phylogenetic relationships, seed characters, and dispersal system evolution in Amaryllideae (Amaryllidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 83, 362-386.
- Stebbins, G.L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. London: Edward Arnold.
- Stevens, P. F. (2001) onwards. *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 12, July 2012
- Strydom, A. (2005). Phylogenetic relationships in the family Amaryllidaceae. Tese de Doutorado. University of the Free State, Bloemfontein, South Africa.
- Sumner, A. T. (1990). *Chromosome banding*. London: Unwin Hyman.
- Vosa, C. G. (1970). Heterochromatin recognition with fluorochromes. *Chromosoma*, 30(3), 366-372.
- Walter, K.S., Gillet, H.J. (1997). *IUCN red list of threatened plants*. IUCN the World Conservation Unit, Cambridge

ESTUDOS CARIOTÍPICOS EM *GRIFFINIA* KER GAWL E ESPÉCIES RELACIONADAS (AMARYLLIDACEAE)

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Griffinia* Ker Gawl (Amaryllidaceae) ocorre exclusivamente no Brasil, na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. É composto por 19 espécies geófitas, bulbosas, distribuídas entre dois subgêneros: *Griffinia*, cujas espécies possuem de quatro a quinze flores sem odor, de cor lilás, azulada ou branca e antese diurna; e *Hyline*, cujas espécies geralmente produzem duas ou quatro flores grandes brancas e com odor, de antese noturna (Preuss & Meerow 2001). Em função da beleza de suas flores, *Griffinia* possui elevado potencial na horticultura, sendo inclusive bastante comercializada em sites de vendas principalmente na Europa, nos Estados Unidos e no Japão. Entretanto, esse gênero de plantas endêmicas encontra-se seriamente ameaçado de extinção (Dean 1995, Walter & Gillet 1997 apud Meerow *et al.* 2002, Preuss 1999, Kirizawa *et al.* 2005), sendo que atualmente, algumas espécies são cultivadas em coleções particulares e não mais encontradas em seus habitats originais (Preuss 1999, Meerow *et al.* 2002, Kirizawa *et al.* 2005).

A filogenia para o grupo, desenvolvida com base em 23 caracteres morfológicos (Preuss 1999), resultou em uma árvore em que diferentes acessos de *G. espiritensis* distribuem-se ao longo da árvore filogenética em clados distintos, bem como os acessos de *G. liboniana*, desfazendo a unidade desses indivíduos dentro de suas respectivas espécies. Em uma segunda filogenia, desenvolvida a partir de região ITS de DNA ribossomal (Preuss 1999), as mesmas amostras aparecem reunidas em grupos coesos que refletem sua circunscrição dentro da espécie. Dessa forma, a análise filogenética molecular mostra-se promissora. Entretanto, cabe observar que devem ser utilizados mais marcadores e amostragens mais representativas.

Observa-se uma discrepância entre os resultados obtidos por meio das análises morfológica e molecular. A falta de resolução das relações filogenéticas na análise baseada em caracteres morfológicos pode ser reflexo das dificuldades taxonômicas dentro do grupo, que advêm dos seguintes fatores: 1) as descrições são, em sua maioria, antigas, de difícil acesso, bastante imprecisas e, às vezes, a prancha e a descrição possuem incongruências; 2) as flores podem ser muito parecidas entre espécies distintas, variando apenas em características inconspícuas; 3) dentro de uma mesma espécie, pode haver grande plasticidade fenotípica; 4) populações geograficamente isoladas podem acumular variações morfológicas; 5) a mesma espécie pode apresentar diferentes citótipos (Preuss 1999). A dificuldade de circunscrição das espécies do grupo, oriunda dos fatores supracitados, aponta para a necessidade de que novas ferramentas investigativas sejam aplicadas, gerando novos marcadores morfológicos que permitam uma melhor compreensão das espécies, permitindo ao taxonomista a correta identificação das mesmas.

Estudos citogenéticos, por suas propriedades elucidativas acerca da morfologia, organização, variação, replicação e função dos cromossomos (Guerra 1988), vêm se mostrando excelentes ferramentas à compreensão de mecanismos de evolução, especiação e relações filogenéticas (Stebbins 1971, Guerra 1990). Entre as técnicas de bandamentos cromossômicos, que permitem uma diferenciação longitudinal dos mesmos, está o bandamento com fluorocromos. Essa técnica revela algumas regiões heterocromáticas nos cromossomos, à medida em que evidenciam regiões cromossômicas “ricas” em bases AT (DAPI) e GC (CMA₃) (Sumner 1990). Também é bastante empregada a (FISH) com diversas sequências de DNA, sendo as mais comuns as sequências de genes ribossomais (DNAr 45S e 5S), a qual permite o mapeamento físico das sequências pretendidas no conjunto cromossômico das espécies estudadas.

O número cromossômico básico para a subfamília Amaryllidoideae é $x=11$ (Goldblatt 1976). Para a tribo Griffineae, o gênero *Worsleya* apresenta $2n=42$ cromossomos (Dutilh 2005), e para o

gênero *Griffinia* há contagens de $2n=20$ para *G. aracensis* Ravenna, *G. parviflora* Ker Gawl, *G. hyacinthina* Ker Gawl, *G. liboniana* Morren, *G. espiritensis* Ravenna, *G. nocturna* Ravenna e *G. rochae* Morel. Também há ocorrência de citótipos com $2n=30$ em *G. liboniana* e *G. espiritensis* (Preuss 1999). Contudo, técnicas citogenéticas de bandamentos e hibridizações de DNA *in situ*, que fornecem mais detalhes sobre os cromossomos, ainda não foram aplicadas.

O objetivo deste estudo foi obter o cariótipo de espécies de *Griffinia* e de gêneros proximalmente relacionados, a fim de fornecer informações que possam auxiliar na circunscrição e na delimitação das espécies. Além disso, o estudo visa auxiliar a compreensão das relações filogenéticas e evolutivas, dos mecanismos cromossômicos envolvidos na especiação, e identificar possíveis variações populacionais dentro do grupo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Espécies e locais de coleta

Como resultado de coletas de pesquisadores colaboradores, foi reunida uma coleção de 13 espécies de *Griffinia*, sendo que para quatro delas, há duas populações distintas coletadas (Tabela 1). Como espécies externas proximalmente relacionadas, para fins de comparação, foi estudada uma espécie de cada um dos gêneros: *Eithea* Ravenna, *Hippeastrum* Herb., *Tocantinia* Ravenna e *Worsleya* Traub. Todas as espécies estudadas estão sendo cultivadas no Jardim Botânico do Instituto Plantarum (Nova Odessa, SP) e em coleção particular (Mogi das Cruzes, SP). Materiais-testemunha (voucher) foram incorporados nos herbários da Unicamp (UEC) e do Jardim Botânico Plantarum (HPL) (Tabela 1).

Tabela 1- Lista de espécies de *Griffinia* e espécies proximoamente relacionadas utilizadas no estudo cromossômico e suas respectivas procedências.

Espécie	Local de procedência	Vouchers
<i>G. concinna</i> (Mart. ex Schult. & Schult.) Ravenna	RJ, Italva	HPL-12979
<i>G. espiritensis</i> Ravenna	ES, Nova Venécia	RB 86879
	ES, Domingos Martins	HPL 12196
	ES, Kautsky	UEC 170483
<i>G. affines espiritensis</i>	ES, Barra do Colégio	HPL-13185
<i>G. gardneriana</i> (Herb.) Ravenna	RJ, Búzios	IAC 47870
	PA, Canaã dos Carajás	HPL 13179
	ES, Verdelândia	BHCB64866
<i>G. hyacinthina</i> Ker Gawl.	RJ, Parati	IAC 36315/UEC 136346
<i>G. intermedia</i> Lindl.	RJ, Itatiaia	RB 384524
	RJ, Mangaratiba	HPL 13180
<i>G. liboniana</i> E. Morren	BA, Itapebi;	HPL 13054
	RJ, Petrópolis	HPL 13181
	ES, Jaguaré	HPL 13182
	CE, Maranguape	ESA 78389
<i>G. nocturna</i> Ravenna	MT, Barra do Garças	HPL 12898
<i>G. parviflora</i> Ker Gawl.	BA, Ubaitaba	HPL 12195
<i>G. paubrasilica</i> Ravenna	BA, Porto Seguro	HPL 336
<i>G. rochae</i> G.M. Morel	RJ, Baixada Fluminense	HPL 13186
<i>G. sp 1</i>	MG, Alto Cariri	BHCB 86730/HPL 13187
<i>G. sp 2</i>	ES, Santa Teresa	MBML 40564
<i>E. blumenavia</i> (Koch & Bouché) Ravenna	PR, Castro	HPL 12098
<i>Hippeastrum reticulatum</i> Herb.	SC, Joinville (cultivo)	HPL
<i>Tocantinia sp</i> Ravenna	MG, Jaíba	BHCB 21977
<i>Worsleya procera</i> (Lem.) Traub	RJ, Petrópolis	RB 555427

2.2. Preparações Cromossômicas

A fim de realizar as contagens cromossômicas, elaborar cariótipos, identificar padrões de bandas CMA₃ e DAPI e localizar sítios de DNAr 5S nos cromossomos, foi aplicado o mesmo procedimento de preparo das lâminas para obtenção de metáfases mitóticas. Para tal, pontas de raízes jovens foram coletadas diretamente das plantas mantidas nas coleções de espécies. As pontas de raízes foram pré-tratadas em solução anti-mitótica de colchicina 0,05% por 8 horas em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi fixado em solução Farmer (álcool etílico 3:1 ácido acético) por 24 h em temperatura ambiente e armazenadas a -20°C. Para o preparo das lâminas, as pontas de raízes foram lavadas em água destilada por duas vezes durante cinco minutos, e então sobre lâmina, cada ponta de raiz recebeu uma gota de solução enzimática com 1% de macerozima, 2% de celulase e 20% de pectinase. Após 25 minutos na estufa a 37°C, o material foi novamente lavado com água destilada e recebeu uma gota de ácido acético (60%). Foram retirados a coifa e os demais tecidos da ponta de raiz, sob estereomicroscópio, para que restasse apenas o meristema, o qual foi cortado, desfiado em pequenos pedaços e espalhado a fim de se obter o melhor espalhamento possível das células. O espalhamento do material foi reforçado com suaves batidas sobre a lamínula, e a lâmina foi aquecida para otimizar a hidrólise. A lâmina foi apertada entre duas camadas de papel filtro, a fim de retirar o excesso de ácido acético e espalhar ainda mais os cromossomos. A seguir, a lâmina foi congelada em nitrogênio líquido para a definitiva fixação do material e retirada da lamínula. Após três dias, as lâminas foram submetidas aos processos de coloração sequencial com fluorocromos. Para cada espécie, as contagens cromossômicas foram confirmadas a partir da análise de pelo menos 5 células em condições de espalhamento cromossômico suficiente para contagem.

2.3. Bandamento CMA₃ e DAPI

Para o bandamento CMA/DAPI (Guerra & Souza 2002) foi utilizada a coloração sequencial, com os corantes CMA₃ e DAPI. Inicialmente, com micropipeta automática, foram adicionados 10µl de CMA₃ (0,5mg/ml) sobre as células, e colocada a lamínula. Após uma hora em caixa escura, a lâmina foi lavada para retirada da lamínula e excesso de fluorocromo, e as células receberam 10µl de DAPI (2µg/ml). Após meia hora em caixa escura, a lâmina foi lavada com um jato de água destilada. Após a secagem da lâmina, foi colocada uma gota de meio de montagem (glicerol/tampão McIlvaine pH 7, com MgCl₂) sobre as células, e feita a cobertura com lamínula. A lâmina descansou em caixa escura para estabilização dos fluorocromos durante três dias antes da análise sob fotomicroscópio óptico de fluorescência. As melhores células foram fotografadas utilizando o microscópio Olympus BX51, equipado com sistema digital de captura de imagem com câmera Evolution MT CCD, por meio do software Image ProPlus v6 (Media Cybernetics, Inc.).

2.4. FISH

2.4.1. Extração de DNA genômico

Para se obter sondas de DNA r 5S, a serem utilizadas na técnica de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH), foi feita a extração de DNA genômico de *G. liboniana* e *Herbertia pulchella* Sweet (Iridaceae), ambas espécies da ordem Asparagales. A extração seguiu Weising *et al.* (2005). Um fragmento de folha de ca. 1cm² foi macerado em nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para um tubo com o *buffer* de extração e clorofórmio. O tubo foi incubado com agitação por 10 minutos a 55°C, e em seguida centrifugado a 12.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram acrescentados 1,2 volumes de isopropanol 100% para precipitação dos ácidos nucleicos. O tubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos, o

sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado duas vezes em 1 ml de álcool etílico 70%. O pellet foi seco e dissolvido em 50 µl de TE.

2.4.2. Obtenção de sondas de DNAr 5S

Duas sondas foram produzidas, sendo a primeira, a partir do DNA genômico de *G. liboniana*. Segmentos de DNAr 5S foram obtidos por meio de PCR com os *primers* 5SrDNA-3 (5'-GTG CTT GGG CGA GAG TAG TA-3') e 5SrDNA-4 (5'-GGT GCG TTA GTG CTG GTA TG-3') (Kitamura *et al.* 2001, Venkateswarlu *et al.* 1991). Para a segunda sonda, produzida a partir do DNA genômico de *H. pulchella*, fragmentos de DNAr 5S foram obtidos por meio de PCR com os primers 5SL1 (5'-CGGTGCATTAATGCTGGTAT-3') e 5SL2 (5'-CCATCAGAACTCCGCAGTTA- 3') (Hizume 1993). As reações de PCR para um volume total de 200 µl para cada sonda, constaram de solução tampão 1x, MgCl 2mM, dNTP 0,4mM, *primers* 1µM (cada *primer*), Taq 1,25 unidades, e 15,5ng de DNA para a reação com *G. liboniana*, e 50ng para a reação com *H. pulchella*. A amplificação consistiu em 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 66°C para *G. liboniana* e 60°C para *H. pulchella* por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. O DNA amplificado foi precipitado com acetato de sódio 3M 0,1 volume e etanol 2 volumes, homogeneizado, e incubado em freezer *overnight*. O pellet foi novamente precipitado e ressuspendido em água deionizada autoclavada. As sondas foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP por *nick translation*. Para tal, cada tubo contendo 1.000ng de DNA e o kit de marcação (DIG *Nick Translation Mix*, Roche) foi incubado a 15°C por 1 hora e 30 minutos. Precipitamos as sondas em 2 volumes de etanol 100% e 10% de acetato de sódio 3M. Os tubos foram incubados em freezer *overnight* e centrifugados no dia seguinte, quando os pellets foram secos e ressuspendidos em 30µl de água deionizada e autoclavada.

2.4.3. Hibridização

A FISH seguiu o protocolo de Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000), com pequenas modificações. As lâminas foram incubadas por 30 minutos a 60°C, e então descansaram até atingirem temperatura ambiente novamente. Em seguida foram incubadas com solução de RNAase por uma hora a 37°C. Após duas lavagens com 2xSSC por cinco minutos e incubação em paraformaldeído 4% por 10 minutos, as lâminas foram novamente lavadas em solução salina de citrato de sódio (SSC), desidratadas em série etanólica, e secas. As lâminas receberam a mistura de hibridização (com a sonda proveniente de *G. liboniana* na maior parte dos casos), e foram cobertas com lamínula para então serem desnaturadas. Os ciclos de desnaturação foram de 90°C por 10 minutos, seguido de 48°C por 10 minutos e finalmente de 38°C por 10 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas a 37°C *overnight*. Após o banho pós-hibridação em SSC, foi aplicado o anticorpo Anti-DIG-Rhodamina (Sigma) para detecção da sonda de DNAr 5S marcada com digoxigenina. Após nova lavagem em SSC, a lâmina recebeu o meio de montagem (DAPI/Vectashield 1:1 v/v), foi coberta com lamínula e vedada.

2.5. Obtenção dos Ideogramas

Para o desenho dos ideogramas, cromossomos de uma metáfase com boas condições de espalhamento, em que a morfologia cromossômica pudesse ser determinada, foram mensuradas por meio do software Micro Measure© 3.3. A classificação da morfologia cromossômica, seguiu Levan *et al.* (1964). Devido à dificuldade de encontrar células com bom espalhamento, foram utilizadas metáfases que exibiram níveis variados de condensação cromossômica. Assim, os valores de comprimento cromossômico obtidos não podem ser comparados entre as espécies. Os

cromossomos foram desenhados no Excel, e bandas e sinais foram acrescentados por meio do software Adobe® Photoshop® CS6 13.0x32.

3. RESULTADOS

3.1. Número e morfologia cromossômicos

Todas as 13 espécies (21 populações) analisadas de *Griffinia* (Tabela 1) apresentaram número cromossômico conservado, $2n=20$ cromossomos (Tabela 2, Figuras 1 a 8). Nos demais gêneros, as espécies *E. blumenavia*, *Tocantinia sp*, *H. reticulatum* e *W. procera* apresentaram respectivamente $2n=18$, $2n=22$, $2n=44$ e $2n=42$ cromossomos (Tabela 2, Figura 9).

Em 10 populações analisadas, de diferentes espécies de *Griffinia*, o tamanho dos cromossomos variou entre 21,2 a 9,2 (*G. concinna*) e 12,7 a 6,1 μ m (*G. sp* – Santa Teresa) (Tabela 2, Figuras 1 a 5, 7 a 8). Entre as espécies dos grupos externos, os cromossomos medem 10,8 a 5,7 μ m para *Eithea*, 9,5 a 3,4 μ m para *Tocantinia sp*, e 9,8 a 4,3 μ m para *Worsleya* (Tabela 2, Figuras 6 e 9). Contudo, não se pode comparar os tamanhos cromossômicos, pois em função de dificuldades com a técnica, os cromossomos medidos não apresentavam o mesmo nível de condensação.

Nas mesmas 10 populações, pertencentes a várias espécies de *Griffinia*, os cromossomos são, em sua maioria, metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm), porém alguns subtelocêntricos (st) e telocêntricos (t) também foram observados. *Griffinia concinna* possui fórmula cariotípica $18m+2st$, enquanto *Griffinia espiritensis* (população de Nova Venécia), $16m+2sm+2st$. *Griffinia liboniana* possui apenas cromossomos metacêntricos (20m), enquanto *G. intermedia* (população de Itatiaia) apresenta a fórmula $18m+2st$ e *G. nocturna* $14m+4sm+2st$. *Griffinia rochae* e uma das espécies não identificadas, *G. sp1* (Alto Cariri), apresentaram a fórmula $16m+4sm$. Para as espécies *G. aff*

espiritensis (Barra do Colégio) e *G. sp2* (Santa Teresa), em um par cromossômico não pode ser definida a posição do centrômero devido ao mal espalhamento dos cromossomos, e os demais 9 pares são metacêntricos (Figuras 10 e 11). *Eithea blumenavia* apresenta fórmula cariotípica $4m+12sm+2st$, e *Tocantinia sp*, $4m+14sm+2st+2t$, (Figura 12).

3.2. Bandamento CMA₃ e FISH

Todas as espécies estudadas apresentam bandas CMA₃⁺, sempre em posição terminal. Quanto ao padrão de sítios de DNAr 5S, cada espécie apresentou um padrão diferente, ao contrário dos resultados do bandamento com fluorocromos (Tabela 2 e Figuras 1 a 9). Os sítios encontram-se em forma de bloco (sinal grande, bem visível) ou, frequentemente como dots (sinais menores, às vezes, inconspícuos). Não raramente, um par cromossômico apresenta mais de um sítio.

As espécies do “complexo liboniana” (Preuss 1999), *G. spiritensis*, *G. liboniana* e *G. rochae*, apresentaram apenas um par cromossômico com banda CMA₃⁺ (Figuras 1, 2 e 10, Tabela 2). *Griffinia rochae* e todas as populações de *G. liboniana* apresentaram dois pares cromossômicos com um par de dots (com exceção da população de Itapebi, em que um dos pares cromossômicos apresenta dois pares de dots) em posição terminal ou subterminal (Figuras 1, 2 e 10). A intensidade desses sítios, contudo, varia bastante entre as populações (Figura 1). Entre as populações de *G. spiritensis* a de Nova Venécia apresenta dois pares cromossômicos com sítios em posição terminal, a de Barra do Colégio, dois pares cromossômicos com sítios de DNAr 5s, sendo um em posição terminal e o outro, pericentromérica. As populações de Domingos Martins e do Kautsky apresentam o mesmo padrão: dois pares cromossômicos com sítios de DNAr 5s em posição terminal, e um par cromossômico com dois sítios, sendo um em posição terminal e o outro em posição pericentromérica (Figuras 2 e 10).

Também apresentaram duas bandas CMA₃⁺ a espécie *G. hyacinthina* (Figura 3, Tabela 2), mais basal que o complexo liboniana segundo a filogenia para o grupo (Preuss 1999), as espécies do subgênero *Hyline* (*G. gardneriana* e *G. nocturna*), e *G. sp1* (Figuras 3, 4 e 11, Tabela 2). Em *G. hyacinthina* os cromossomos com banda CMA₃⁺ apresentam um sítio de DNAr 5S em posição subterminal no braço longo. Um segundo par cromossômico exibe dois sítios de DNAr 5S, sendo um em posição terminal em um dos braços, e um em posição subterminal no outro braço (Figura 3, Tabela 2). As espécies do subgênero *Hyline*, *G. gardneriana* e *G. nocturna*, apresentaram mais sítios de DNAr 5s que as espécies do subgênero *Griffinia*. Indivíduos de *G. gardneriana* apresentaram, para a população de Canaã dos Carajás, 20 sítios de DNAr 5s, sendo que o par de cromossomos com banda CMA₃⁺ apresenta sítio em posição pericentromérica e os demais 18 sítios estão distribuídos entre 10 cromossomos, nas posições terminal, subterminal e pericentromérica. Na população de Verdelandia, foram observados 18 sítios distribuídos entre 11 cromossomos, sendo que os cromossomos com banda CMA₃⁺ não possuem sítios de DNAr 5s, e há um cromossomo heteromórfico para sítios de DNAr 5s. Ainda, os tipos cromossômicos para as populações não são iguais (ver cromossomos em detalhe na figura 4). Em metáfases de *G. nocturna*, o par cromossômico com banda CMA₃⁺ possui também sítio de DNAr 5s em posição subterminal. Podem ser observados mais 14 sítios distribuídos entre 6 cromossomos, nas posições terminal, subterminal e pericentromérica (Figuras 4 e 11, Tabela 2). A espécie sem identificação coletada no Alto Cariri exibe dois pares cromossômicos com um sítio de DNAr 5s em posição terminal, e um par com dois sítios em posição subterminal (Figuras 3 e 11, Tabela 2).

Em ambas as populações de *Griffinia intermedia* foram observados dois pares cromossômicos com bandas CMA₃⁺, os quais também possuíam sítios de DNAr 5s em posição terminal além de um terceiro par cromossômico com sítio em posição pericentromérica (Figuras 5 e 11, Tabela 2). *Griffinia concinna*, também com dois pares cromossômicos com banda CMA₃⁺, possui em um deles, dois

sítios de DNAr 5s. Mais três sítios podem ser observados, dois em posição terminal e um em posição subterminal no outro braço, do maior par cromossômico do conjunto (Figuras 7 e 11). *G. paubrasilica* possui dois pares cromossômicos com bandas CMA_3^+ . Essa espécie apresenta um par cromossômico heteromórfico para o sítio de DNAr 5s, sendo que um cromossomo possui um sítio em posição terminal no braço curto, e um sítio em posição subterminal no braço longo, e o outro cromossomo possui apenas um sítio em posição terminal no braço curto (Figura 7).

Griffinia parviflora apresenta cinco bandas, sendo portanto, um desses cromossomos, heteromórfico para essa banda CMA_3^+ . Quanto aos sítios de DNAr 5s, a espécie mostra um par cromossômico com um sítio em cada braço, ambos em posição subterminal, sendo que desse par cromossômico, um possui banda CMA_3^+ e o outro não. (Figura 6, Tabela 2).

Griffinia sp2, de Santa Teresa, possui três pares cromossômicos com bandas CMA_3^+ (Figuras 8 e 11, Tabela 2). Um desses pares exibe também um sítio de DNAr 5s em posição terminal, e mais dois pares cromossômicos com sítio de DNAr 5s podem ser observados, um em posição terminal, e outro em posição pericentromérica (Figuras 8 e 11).

Entre as espécies externas, *E. blumenavia* possui dois pares de cromossomos com banda, um deles com sítio de DNAr 5s e um segundo par com um sítio em posição pericentromérica. Para *Tocantinia sp*, é possível observar um par cromossômico com bandas CMA_3 e três pares cromossômicos com um sítio terminal. *H. reticulatum* possui um par cromossômico com banda CMA_3 e três pares com sítio de DNAr 5s em posição terminal. *W. procera* também apresentou apenas um par cromossômico com bandas CMA_3 e cinco pares cromossômicos com um sítio de DNAr 5s terminal (Figuras 9 e 12, Tabela 2)

Tabela 2 – Número cromossômico (#), variação de tamanho cromossômico, bandas CMA3+ (número de pares cromossômicos com bandas/número de pares de bandas), quantidade e posição (Terminais (T), Subterminais (S) e Pericentroméricas (P)) de sítios de DNAr 5S (número de pares cromossômicos com sítios/número de pares de sítios) em espécies de *Griffinia*, *Eithea*, *Hippeastrum*, *Tocantinia* e *Worsleya*. *Números dentro de parênteses representam cromossômicos heteromórficos e suas bandas. "-" simboliza dado não analisado.

<i>Espécie</i>	População	#	Tamanho (µm)	Morfologia	Bandas CMA ₃ ⁺			
					Terminais	T	S	P
<i>G. concinna</i>	RJ, Italva	20	21,2 – 9,1	18m+2st	2/2	1/1	2/3	0
<i>G. espiritensis</i>	ES, Nova Venécia	20	13,3 – 6,2	16m+2sm+2st	1/1	0	2/2	0
	ES, Domingos Martins	20	-	-	1/1	3/3	0	1/1
	ES, Kautsky		-	-	1/1	3/3	0	1/1
<i>G. aff espiritensis</i>	ES, Barra do Colégio	20	13,3 – 6,9	18m+2?	1/1	1/1	0	1/1
<i>G. gardneriana</i>	RJ, Búzios	20	-	-	1/1	-	-	-
	PA, Canaã dos Carajás		-	-	1/1	2/2	5/5	3/3
	ES, Verdelândia		-	-	1/1	1/1	2(+1)/4(+2)	3/3
<i>G. hyacinthina</i>	RJ, Parati	20	-	-	1/1	1/1	2/2	0
<i>G. intermedia</i>	RJ, Itatiaia	20	17,3 – 7,6	18m+2st	2/2	1/1	1/1	1/1
	RJ, Mangaratiba	20	-	-	2/2	1/1	1/1	1/1
<i>G. liboniana</i>	BA, Itapebi;	20	13,6 – 6,8	20m	1/1	1/1	2/2	0
	RJ, Petrópolis	20	13,5 – 7,9	20m	1/1	1/1	1/1	0
	ES, Jaguaré	20	-	-	1/1	1/1	1/1	0
	CE, Maranguape	20	-	-	1/1	1/1	1/1	0
<i>G. nocturna</i>	MT, Barra do Garças	20	14,2 – 6,8	14m+4sm+2st	1/1	2/3	4/5	0
<i>G. parviflora</i>	BA, Ubaitaba	20	-	-	2/2(+1)*	0	2/4	0
<i>G. paubrasílica</i>	BA, Porto Seguro	20	-	-	2/2	1/1	(1)/(1)	0
<i>G. rochae</i>	RJ, Baixada Fluminense	20	14,3 – 7,7	16m+4sm	1/1	2/2	0	0
<i>G. sp 1</i>	MG, Alto Cariri	20	12,6 – 7,4	16m+4sm	1/1	1/1	3/3	0
<i>G. sp 2</i>	ES, Santa Teresa	20	12,7 – 6,1	18m+2?	3/3	2/2	0	1/1
<i>E. blumenavia</i>	PR, Castro	18	10,8 – 5,7	4m+12sm+2st	2/2	1/1	0	1/1
<i>H. reticulatum</i>	SC, Joinville (cultivo)	44	-	-	1/1	3/3	0	0
<i>Tocantinia sp</i>	MG, Jaiba	22	9,5 – 3,4	4m+14sm+2st+2t	1/1	3/3	0	0
<i>W. procera</i>	RJ, Petrópolis	42	9,8 – 4,3	-	1/1	5/5	1/1	0

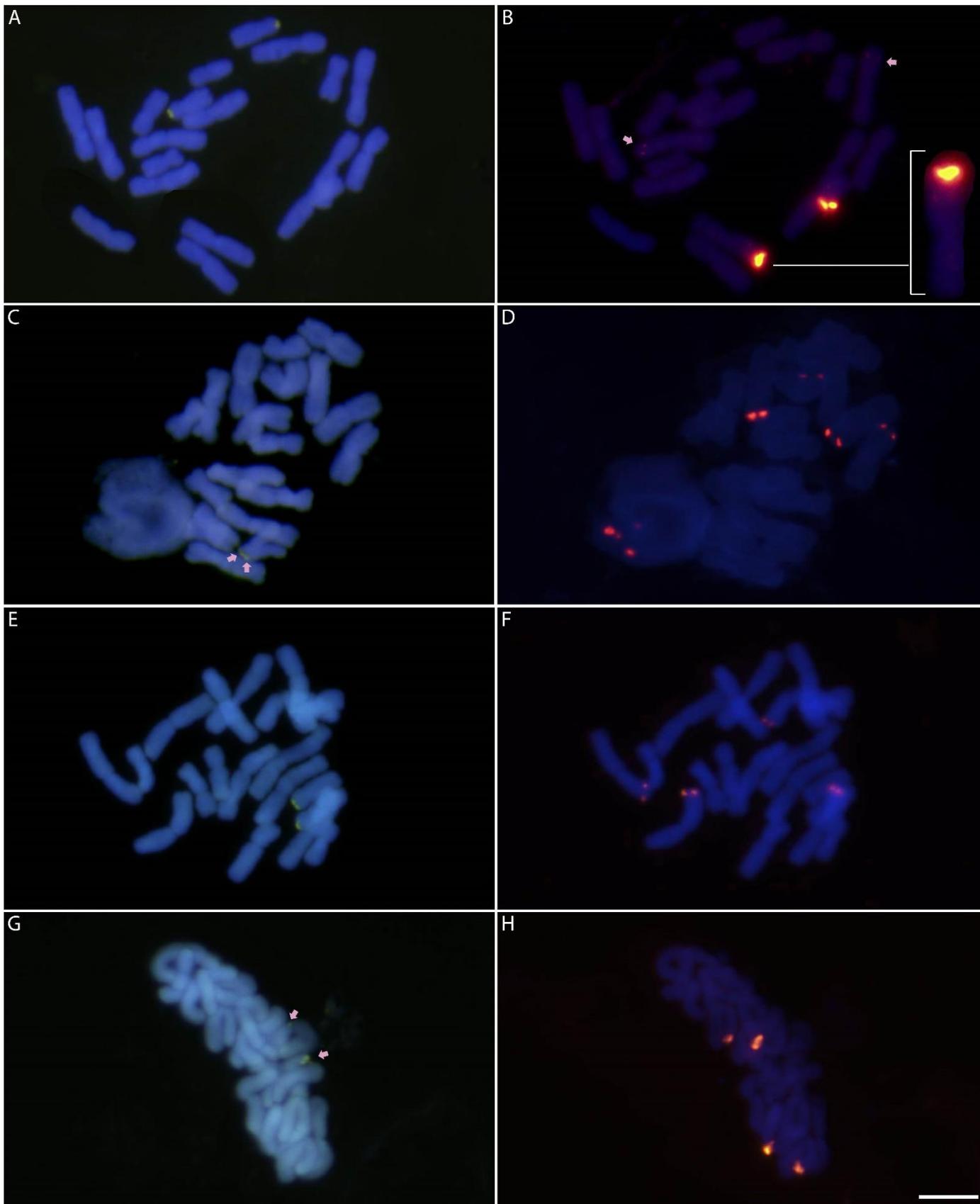


Figura 1 - Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) em espécies *Griffinia liboniana*, populações de Itapebi (A e B), Petrópolis (C e D), Ceará (E e F) e Jaguaré (G e H). Em detalhe, cromossomo aumentado para melhor compreensão de sua morfologia (B). Setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10 μ m.

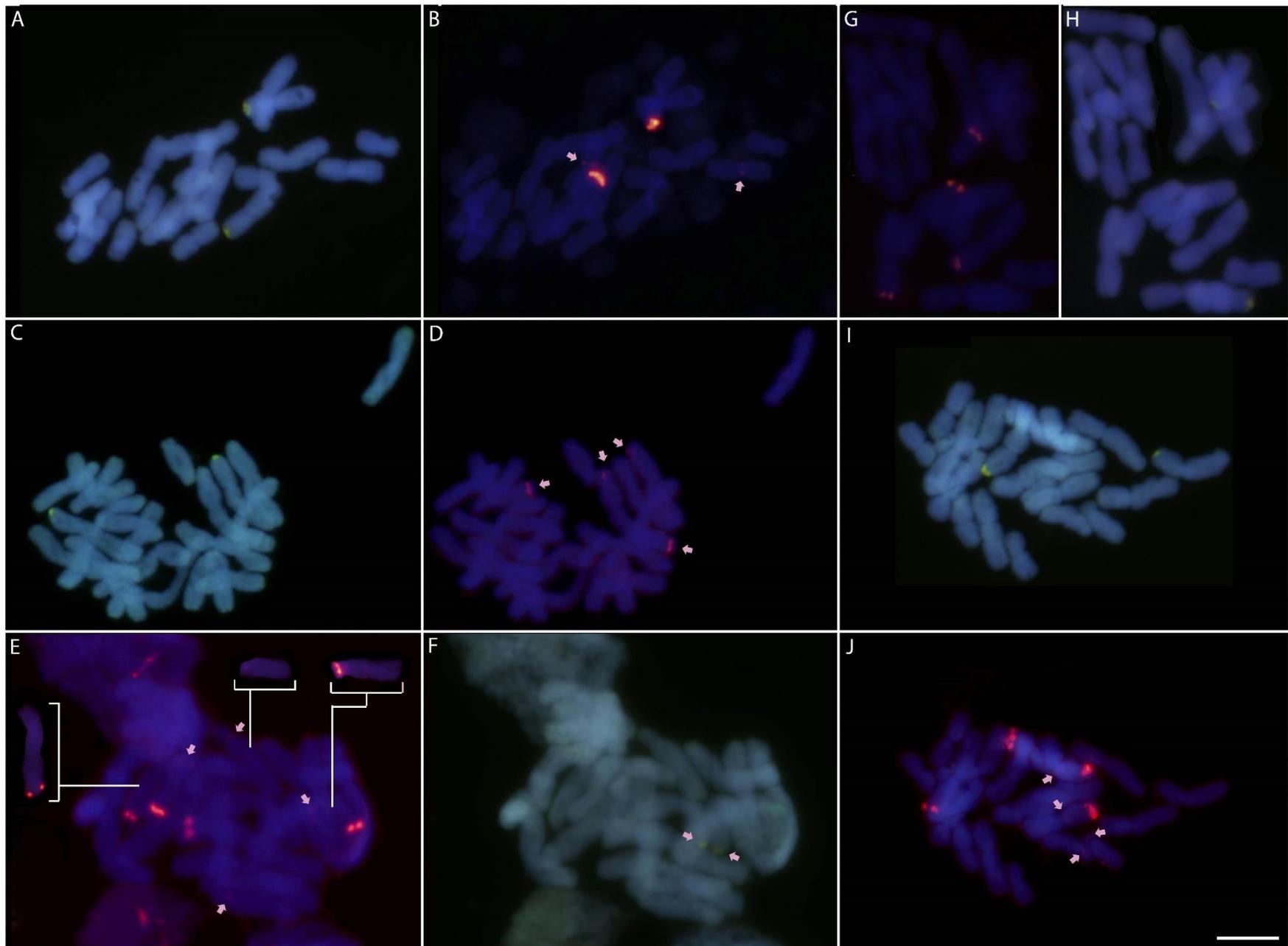


Figura 2 - Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNR 5S (sinais vermelhos) em espécies *Griffinia spiritensis*, populações de Barra do Colégio (A e B), Nova Venécia (C e D), Domingos Martins (E e F) e Kautsky (I e J), e *G. rochae* (G e H). Em detalhe, cromossomos aumentado para melhor compreensão de sua morfologia (E). Setas indicam cromossomos pouco visíveis. Barra = $10\mu\text{m}$.

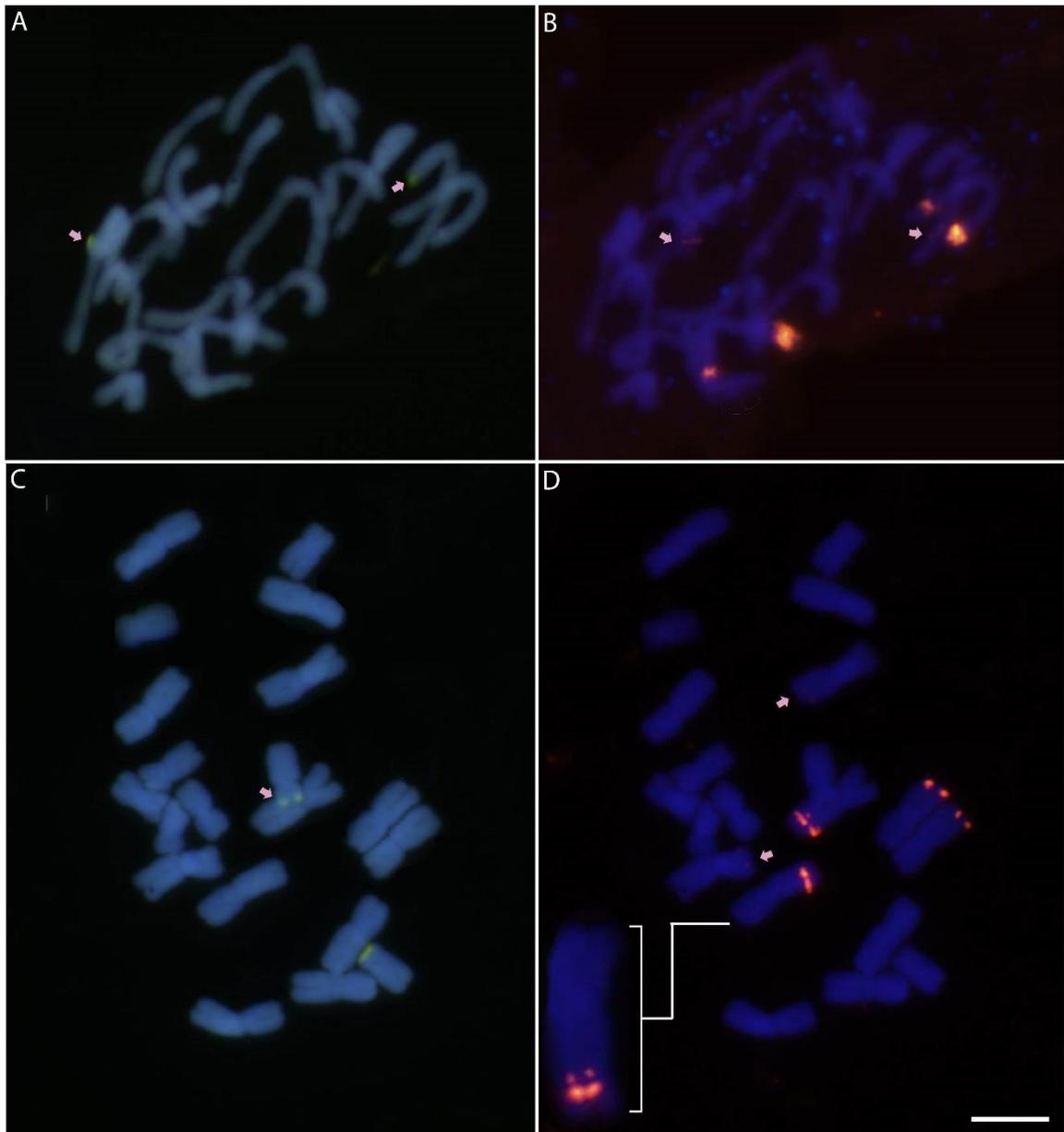


Figura 3 - Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) nas espécies *G. hyacinthina*, (A e B) e *G. sp1*, do Alto Cariri (C e D). Em detalhe, cromossomo aumentado para melhor compreensão de sua morfologia (D). Setas foram designadas apenas a sinais pouco visíveis. Barra = $10\mu\text{m}$

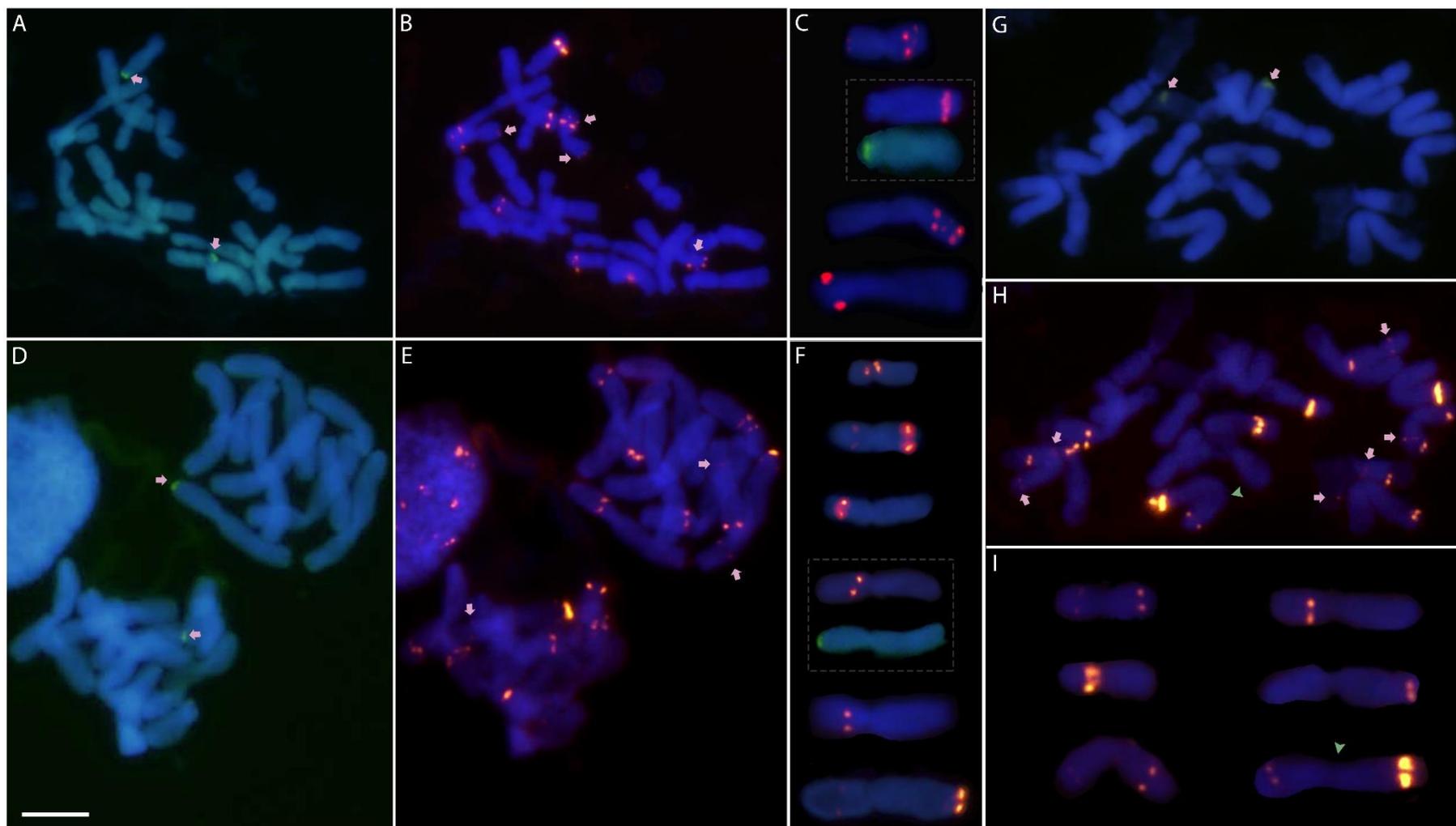


Figura 4 - Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) nas espécies do subgênero *Hyline*. *Griffinia nocturna* (A a C) e *G. gardneriana*, populações de Canaã dos Carajás (D a F) e Verdelândia (G a I). Em detalhe, cromossomos observados em metafases incompletas, livres de sobreposição, para melhor compreensão de sua morfologia (C, F e I). Cabeças de seta verdes mostram cromossomo sem correspondência no conjunto cromossômico, formando um par heteromórfico com algum cromossomo sem sinais de DNAr 5S. As demais setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10µm

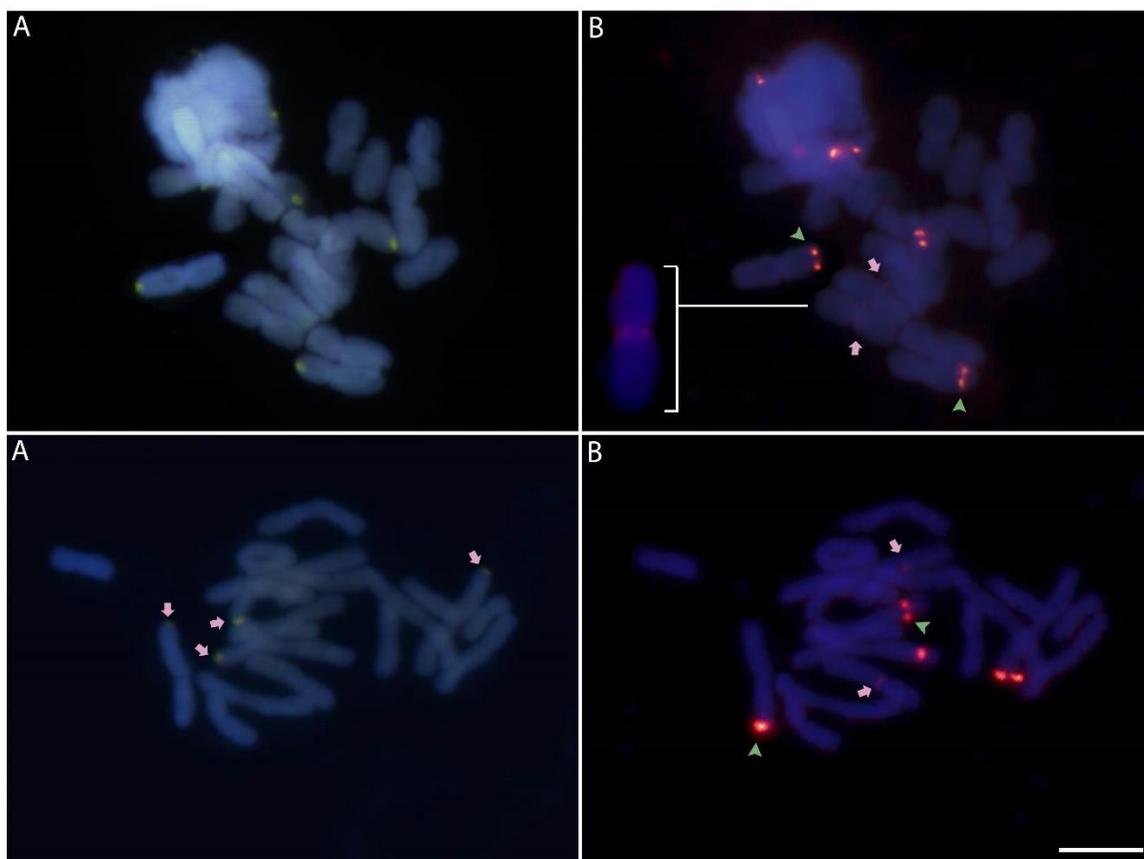


Figura 5 – Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) nas espécies *Griffinia intermedia*, populações de Mangaratiba (A e B) e Itatiaia (C e D). Cabeças de seta verdes chamam atenção para a diferença em posição do sinal no cromossomo. Setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = $10\mu\text{m}$

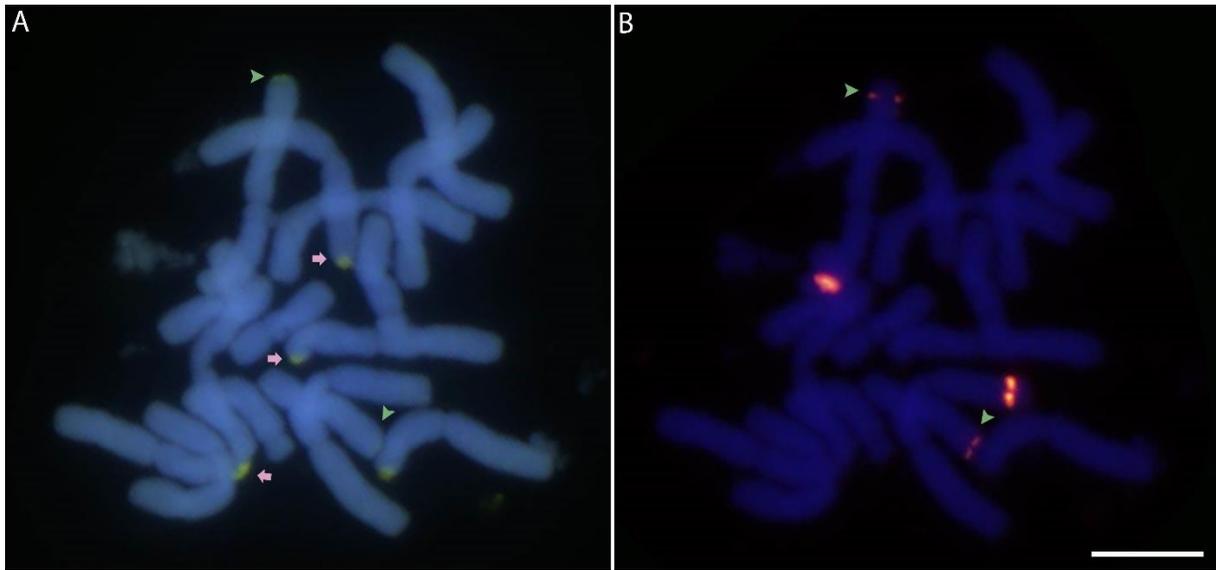


Figura 6 - Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) nas espécies *Griffinia parviflora* (A e B). Cabeças de seta verdes indicam par heteromórfico para banda CMA₃⁺. Setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10 μ m

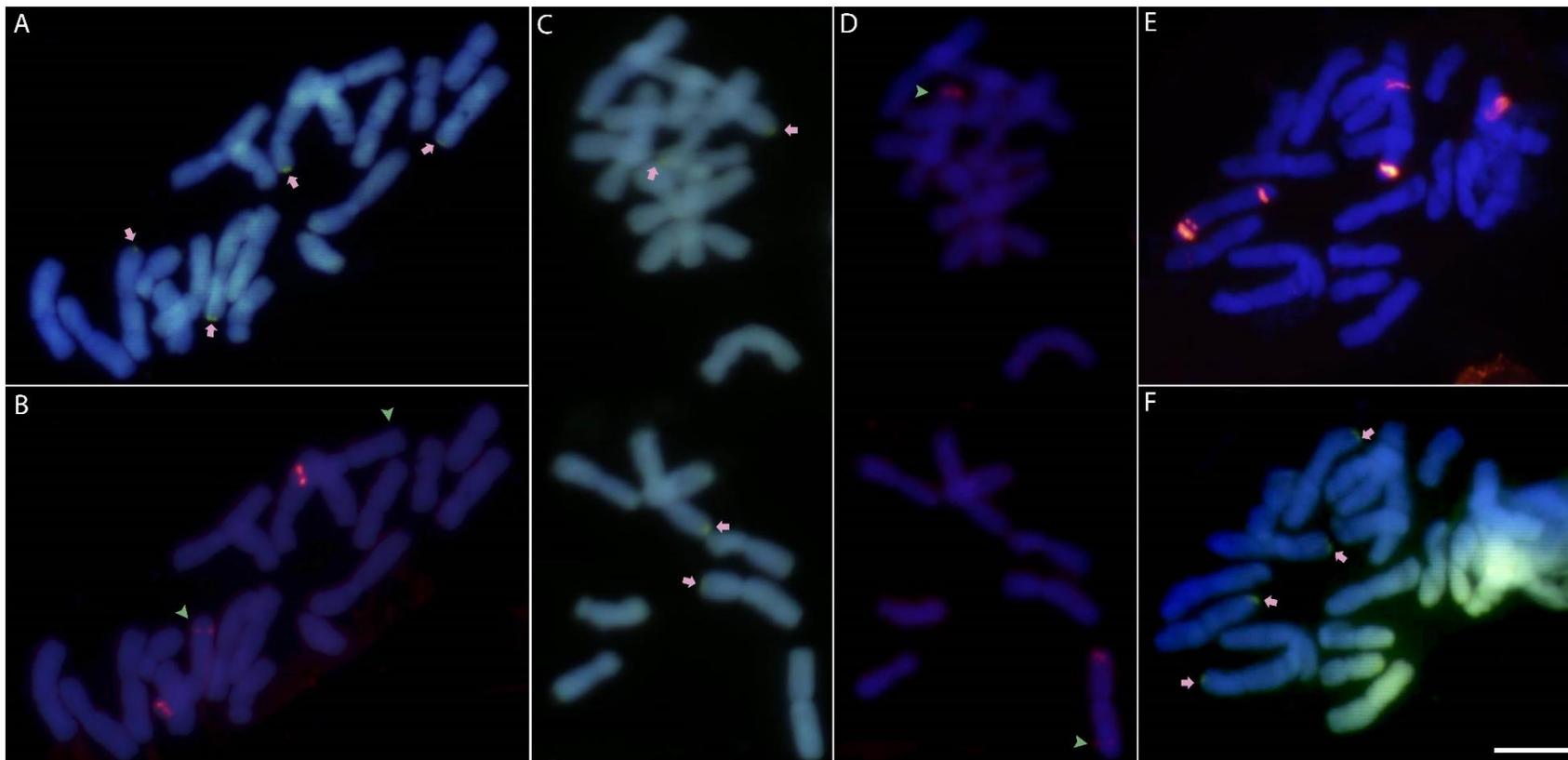


Figura 7 - Cromossomos metafásicos ($2n=20$) e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) nas espécies *Griffinia paubrasilica* (A a D) e *G. concinna* (E e F). Cabeças de seta verdes chamam atenção para um par heteromórfico de cromossomos. Setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10 μ m.

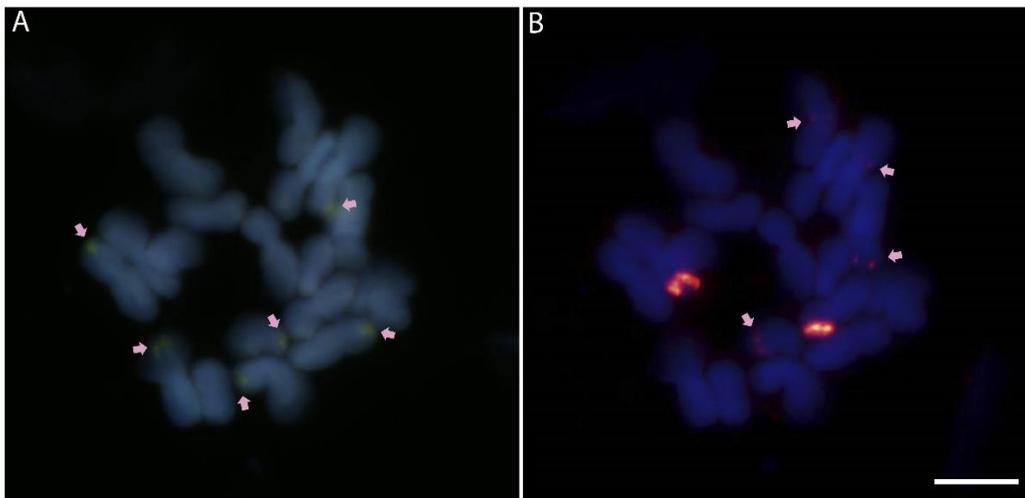


Figura 8 - Cromossomos metafásicos e localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) nas espécies *Griffinia sp2*, de Santa Teresa. Setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10 μ m.

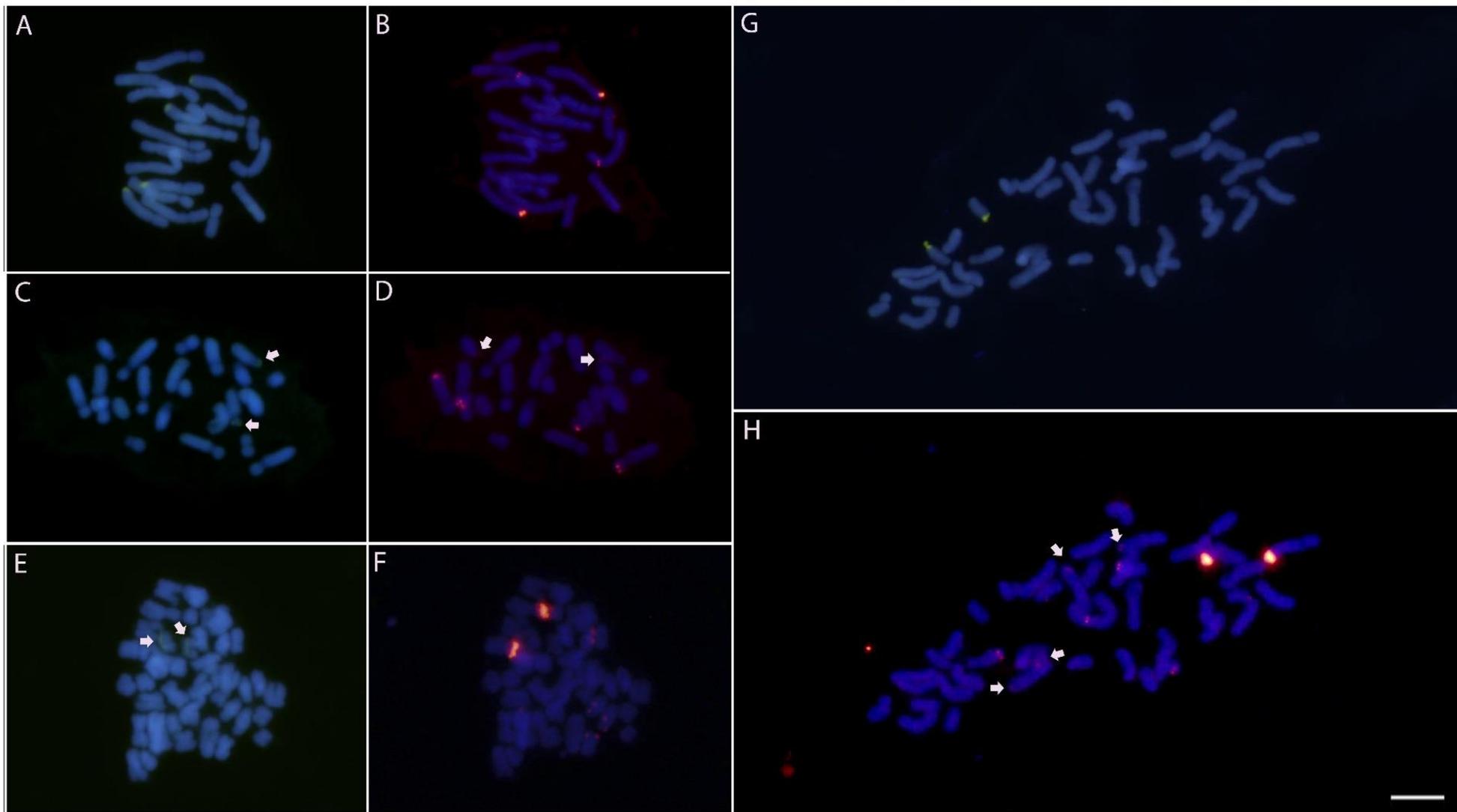


Figura 9 - Localização de bandas CMA3+ (sinais amarelos) e/ou sítios de DNAr 5S (sinais vermelhos) em cromossomos metafásicos das espécies *Eitheia blumenavia* ($2n= 18$, A e B), *Tocantinia* sp ($2n=22$, C e D), *Hippeastrum reticulatum* ($2n=44$, E e F) e *Worsleya procera* ($2n=42$, G e H). Setas indicam sinais pouco visíveis. Barra = 10µm

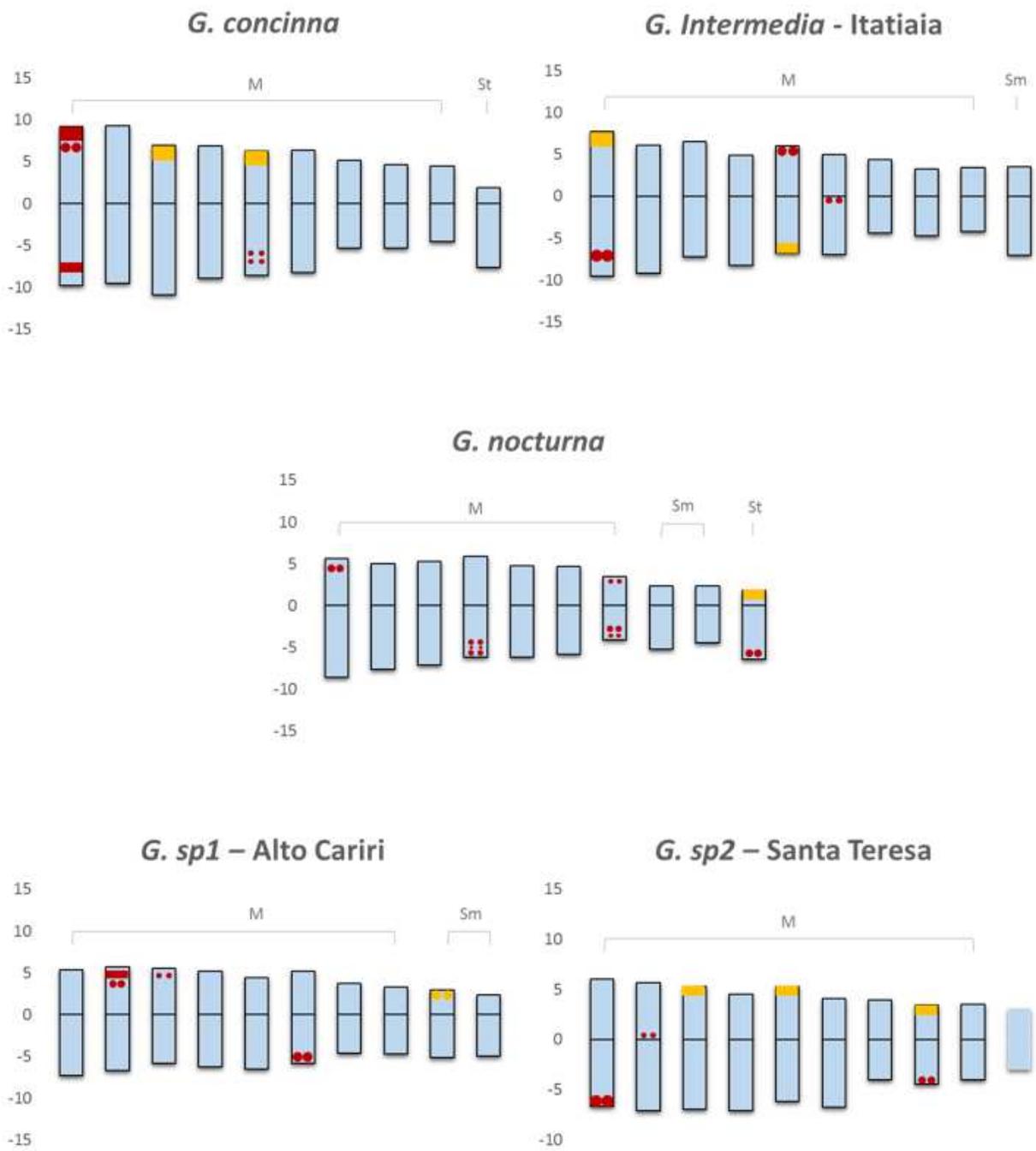


Figura 10 - Ideogramas das espécies de Griffinia do Complexo liboniana. Cor amarela representa bandas CMA3+, cor vermelha representa sítios de DNAr 5S. Desenho cromossômico sem borda definida representa cromossomo para o qual não pôde ser determinada a posição do centrômero. A escala à esquerda dos cromossomos encontra-se em µm

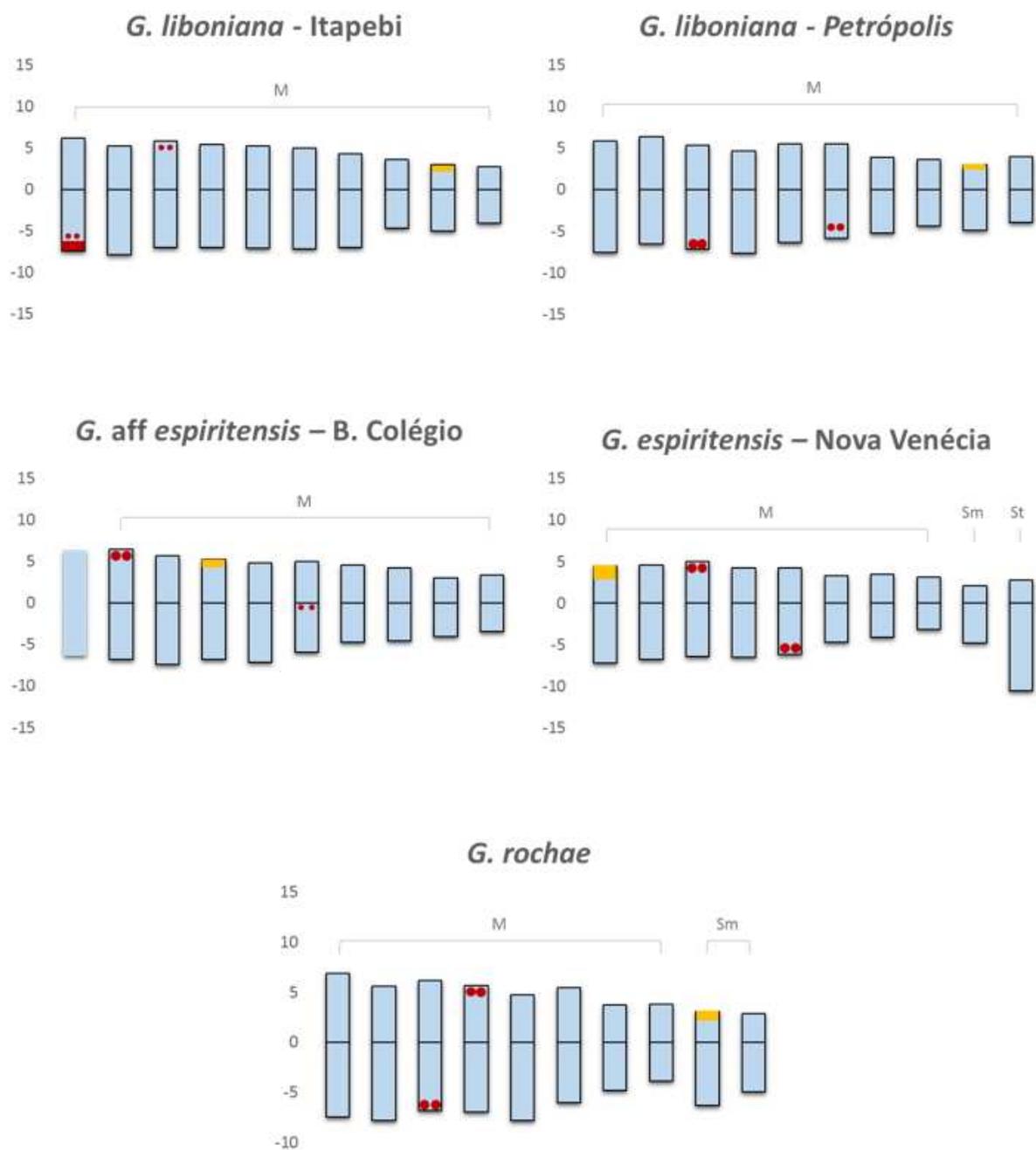


Figura 11 - Ideogramas para espécies de Griffinia. Cor amarela representa bandas CMA3+, cor vermelha representa sítios de DNAr 5S. Desenho cromossômico sem borda definida representa cromossomo para o qual não pôde ser determinada a posição do centrômero. A escala à esquerda dos cromossomos encontra-se em μm.

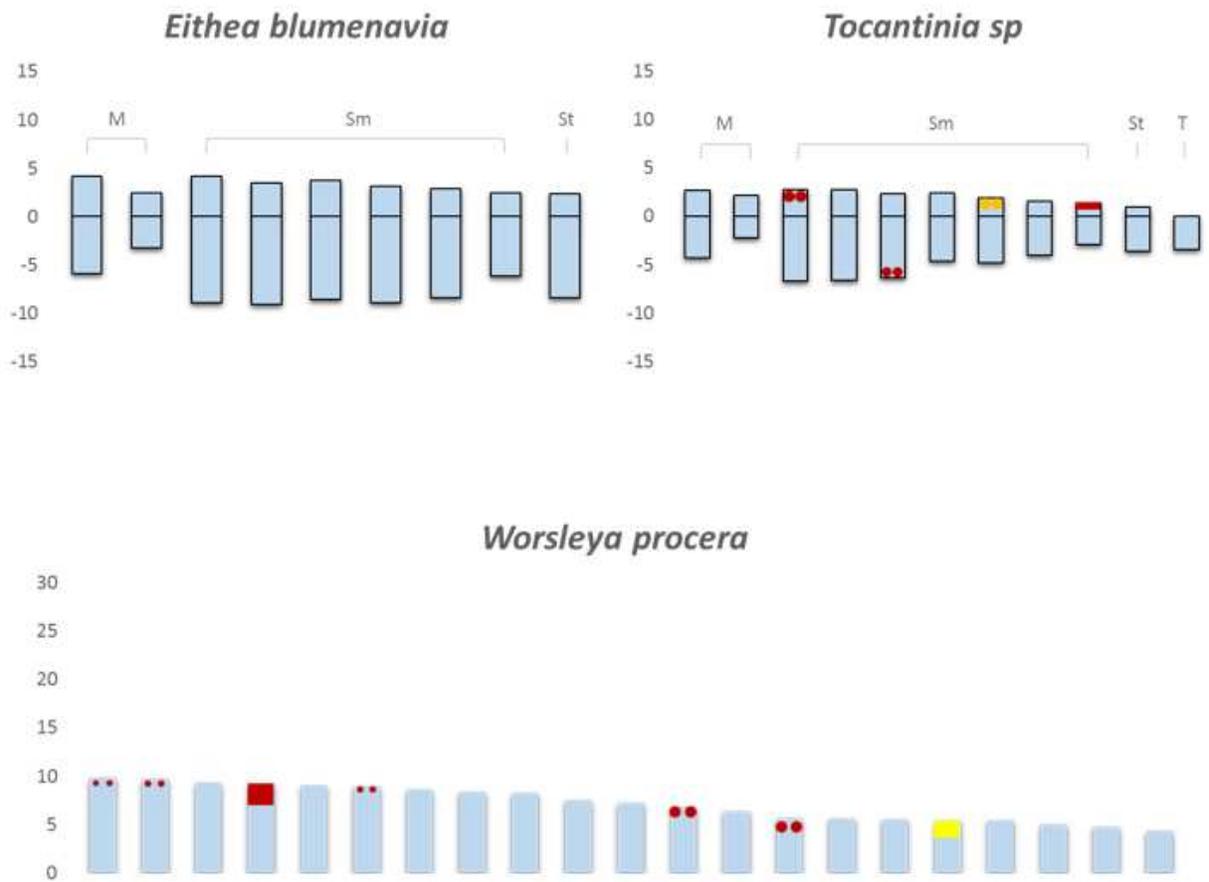


Figura 12 - Ideogramas para espécies proxicamente relacionadas a *Griffinia*. Cor amarela representa bandas CMA₃⁺, cor vermelha representa sítios de DNAr 5S. Desenho cromossômico sem borda definida representa cromossomo para o qual não pôde ser determinada a posição do centrômero. A escala à esquerda dos cromossomos encontra-se em μm .

4. DISCUSSÃO

4.1. Número e morfologia cromossômicos

O números cromossômicos observados estão de acordo com contagens anteriores para *Worsleya* (Dutilh 2005) e para *Griffinia* (Preuss 1999). Contudo também são conhecidas populações com $2n=30$ para *G. espiritensis* e *G. liboniana* (Preuss 1999). Além das espécies de *Griffinia* supracitadas, já foi documentado o número cromossômico para *G. aracensis* e, assim, são conhecidos os números cromossômicos para a maioria das 19 espécies do gênero. As contagens são inéditas para *G. concinna*, *G. gardneriana*, *G. intermedia*, *G. paubrasilica* e *H. reticulatum*. Também houve ineditismo para o gênero *Tocantinia*. Para *E. blumenavia*, o número encontrado diverge do resultado obtido por Arroyo (1982), que observou 20 cromossomos. Naquele trabalho, a espécie foi denominada *Hippeastrum blumenavia* (K.Koch & C.D.Bouché ex Carrière) Sealy (hoje sinônimo homotípico de *Eithea blumenavia*).

Na tribo Griffineae, dois números cromossômicos principais são observados: $2n=20$ em *Griffinia* e $2n=42$ em *Worsleya* (Tabela 2). Na tribo Hippeastreae, também há variação de números cromossômicos entre gêneros, como $2n=22$ para *Tocantinia*, $2n=18$ para *Eithea* (Tabela 2), $2n=22$, 44 ou 66 para *Hippeastrum* (Dutilh 2005) e $2n=44$ para *Habranthus* (Felix *et al.* 2011). Também existe variação dentro de um mesmo gênero, como em *Zephyranthes*, com $2n=12$, 18, 24, 25 e 38 (Felix *et al.* 2011), ou até mesmo dentro de uma população, como observado em *Z. sylvatica*, com $2n=12$, 13 e 18 (Felix *et al.* 2008).

Apesar de os tamanhos cromossômicos das espécies não poderem ser comparados devido à falta de padronização na condensação cromossômica, em termos gerais, pode-se dizer que os cromossomos de *Griffinia* são grandes (variam de 21,2 a 6,2 μ m) (Tabela 2, Figuras 1 a 5, 7 a 8). Medidas aferidas em metáfases publicadas por Meerow *et al.* (2002), revelam tamanhos

cromossômicos dentro da variação observada no presente estudo: 17,44 a 8,01µm para *G. liboniana* e 10,61 a 5,10µm para *G. aracensis*. Aparentemente, os cromossomos das espécies dos grupos externos, especialmente *Eithea*, são menores que os de *Griffinia* (10,8 a 5,7 µm, Tabela 2, Figuras 6 e 9). Cromossomos de *Griffinia* são aparentemente maiores também que os de representantes da tribo Hippeastreae, como *Hippeastrum* (12,5 a 3,0µm - Shafiq & Vahidy 1998) e de *Zephyranthes* (10,4 a 3,8µm – Felix *et al.* 2007). Entretanto, há outras Amaryllidaceae com tamanhos cromossômicos aproximadamente semelhantes aos observados em *Griffinia*, como *Clivia* (19,5 a 6,6 µm - Ran *et al.* 1999), pertencente à tribo Haemantheae.

No geral pode-se dizer que os cromossomos de *Griffinia* apresentam variação gradual no tamanho, embora em algumas espécies possam ser identificados de dois a quatro pares menores (ver Figuras 7 e 8, espécies *G. liboniana*, *G. espiritensis*, *G. concinna*, *G. sp1*, *G. sp2*). Entretanto, essa diferença de tamanho ainda não caracteriza bimodalidade em *Griffinia*. Em *Eithea* e *Tocantinia*, a variação dos tamanhos cromossomos também é gradual (Figura 9).

Arroyo (1982) elaborou cariótipos de algumas espécies de Amaryllidaceae (*Hippeastrum*, *Phycella* e *Amaryllis*). Verificou que algumas espécies de *Hippeastrum* apresentavam cariótipos biomodais, mas outras não. Dentre elas, *H. blumenavia*, (= *Eithea blumenavia*,) não apresentava bimodalidade, o que foi confirmado em nosso estudo.

Dentro do clado Hippeastroide (Tribos Griffineae e Hippeastreae), os estudos cariotípicos para Griffineae são pioneiros. Contudo, estão disponíveis dados cariotípicos para Hippeastreae. No estudo de Arroyo (1982), apesar de não serem apresentadas fórmulas cariotípicas, os cariogramas apresentados mostram predomínio de cromossomos submetacêntricos e subtlocêntricos, com poucos cromossomos metacêntricos. Para *E. blumenavia*, embora o número cromossômico obtido no presente estudo seja diferente do encontrado pela autora, a morfologia dos cromossomos é

bastante semelhante, sendo que o par menor é metacêntrico em ambos os estudos. Para *Zephyranthes*, outro gênero da tribo Hippeastreae, o trabalho desenvolvido por Felix *et al.* (2011) mostrou que para a maioria das espécies, os cromossomos são geralmente submetacêntricos ou subtelocêntricos, com poucos cromossomos metacêntricos. O mesmo foi observado para os gêneros *Placea* (Perry & Schrader 2004) e *Rodophiala* (Muñoz *et al.* 2011).

Em tribos mais basais, proximamente relacionadas à tribo Griffineae, como Haemantheae, existem estudos para *Clivia* (Ran *et al.* 2001b) que mostram que a morfologia cromossômica é predominantemente submetacêntrica a subtelocêntrica. Para o gênero *Cyrtanthus* (Tribo Cyrtantheae), Ising (1969, 1970) estudou 21 espécies e observou que na maioria delas, a morfologia predominante é também submetacêntrica a subtelocêntrica, com apenas alguns cromossomos metacêntricos.

Portanto, *Griffinia*, ao contrário dos representantes dos grupos mais proximamente relacionados, possui predominantemente cromossomos metacêntricos (Figuras 7 e 8, Tabela 2), configurando um cariótipo mais simétrico. Stebbins (1970) postulou que a partir de cariótipos simétricos (com cromossomos de tamanhos semelhantes e centrômeros medianos) existe uma tendência no sentido do aumento da assimetria cariotípica. Essa tendência não foi observada em *Griffinia*, que apesar de na filogenia ser apontado como um grupo bastante derivado em Amaryllidaceae, possui carótipos relativamente simétricos. Situações semelhantes já haviam sido relatadas para Amaryllidaceae, a exemplo do que ocorre em *Lycoris* (Stebbins 1970).

4.2. Bandamento CMA₃ e FISH

Bandas CMA₃⁺ em posição terminal em Amaryllidaceae são frequentemente observadas e já foram reportadas para *Zephyranthes* (Felix *et al.* 2011b) *Clivia* (Ran *et al.* 1999), *Crinum* (Alam *et al.* 1998) e *Narcissus* (D'amato *et al.* 2004). Bandas em posição intersticial foram observadas para *Zephyranthes brachyandra* (Felix *et al.* 2011a), porém, são menos frequentes.

A heterocromatina é reconhecida por variar quantitativa e qualitativamente em relativamente pouco tempo na escala evolutiva como consequência de mutações Robertsonianas e replicação de DNA saltatório (Schweizer & Loidl 1987). Contudo, não foi observada muita variação no padrão de bandas heterocromáticas CMA₃⁺. Entre os padrões observados (duas, quatro, cinco e seis bandas), nenhum reúne espécies em concordância com a filogenia para o grupo (Preuss 1999) ou de alguma outra forma que pareça parcimoniosa. Embora todas as espécies do Complexo Liboniana possuam um par cromossômico com bandas CMA₃⁺, outras espécies apresentam o mesmo padrão a exemplo das espécies do subgênero *Hyline*. Da mesma forma, *G. intermedia* e *G. parviflora*, espécies proximamente relacionadas segundo a filogenia, apresentam respectivamente 4 e 5 cromossomos com bandas CMA₃⁺. Entretanto, como a maioria das espécies apresentou um par cromossômico com banda CMA₃⁺, pode-se inferir que essa seja possivelmente uma característica mais basal na história evolutiva do gênero.

Ao contrário dos resultados do bandamento com fluorocromos, a hibridização com DNAr 5s revelou um padrão de sítios para cada espécie, além de diferenças interpopulacionais. Assim, observando em conjunto os resultados de bandamento e hibridização, é possível tirar conclusões acerca das relações entre espécies. Como exemplo, algumas espécies do Complexo Liboniana (populações de Nova Venécia e Barra do Colégio de *G. espiritensis*, *G. liboniana* e *G. rochae*) apresentam um par cromossômico com banda CMA₃⁺ e dois pares de cromossomos metacêntricos com sítios de DNAr 5S, embora a posição dos sítios possa variar entre as espécies (Figuras 1 e 7). *Griffinia concinna*, que também apresenta dois pares cromossômicos com sítios, difere das espécies

do Complexo Liboniana por possuir não um, mas dois pares cromossômicos com bandas CMA₃⁺ (Figuras 4 e 8). Da mesma forma, *Griffinia intermedia*, *G. sp1* e *G. sp2* apresentam 3 pares cromossômicos com sítios DNAr 5S, porém diferem entre si em número e posição dos sítios, bem como em número e posição de bandas CMA₃⁺ e na morfologia cromossômica (Figuras 3, 5 e 8).

A variação cariotípica em *Griffinia* pôde ser observada não apenas entre as espécies, mas também entre populações de uma mesma espécie. *Griffinia espiritensis* de Nova Venécia apresenta sítios em posição terminal no braço longo do cromossomo 4 e no braço longo do cromossomo 6. Para a mesma espécie, na população de Barra do Colégio, os sítios encontram-se em posição terminal no braço curto do cromossomo 1 e em posição pericentromérica no braço longo do cromossomo 6. Não só a disposição de marcadores, mas também a morfologia cromossômica difere entre as populações, sendo que uma apresenta a fórmula cariotípica 16M+1Sm+1St, enquanto a outra possui 18 cromossomos metacêntricos e dois cuja posição do centrômero não pôde ser identificada (Figuras 1 e 7). A espécie coletada em Barra do Colégio foi identificada pelo especialista na família como *Griffinia affines espiritensis*. As populações do Kautsky e de Domingos Martins possuem padrão semelhante entre si, e diferente das demais, exibindo um terceiro par cromossômico subtlocêntrico, com sítio de DNAr 5S no braço curto. Assim, essas populações fogem inclusive ao padrão que reúne as espécies do Complexo Liboniana (um par de cromossomos com banda CMA₃⁺ e dois pares de cromossomos com sítio de DNAr 5S). Ainda que existam casos de variação dentro da espécie entre populações documentados para outras espécies (Almeida e Pedrosa-Harand, 2011, Engel 2011), existe a possibilidade de a diferença cariotípica observada entre populações de uma mesma espécie em *Griffinia* não ser uma variação, mas sim um indicativo da necessidade de rever a taxonomia do grupo e, possivelmente, separar espécies.

Em *G. liboniana*, os sítios de DNAr 5S encontram-se em posição terminal e subterminal (2 sítios) no braço longo do cromossomo 1, e em posição subterminal no braço curto do cromossomo 3 para

a população de Itapebi. Indivíduos de Petrópolis da mesma espécie apresentam sítios nos cromossomos 3 e 6, em posição terminal e subterminal, respectivamente. Contudo, existe a possibilidade de essa diferença decorrer do fato de apenas uma metáfase ter sido medida. Para as populações de Jaguaré e Ceará embora não tenha sido possível determinar a morfologia cromossômica, é possível observar que a quantidade de bandas e sítios é semelhante à das demais populações. Existem diferenças na intensidade do sinal, a qual indica diferença no tamanho dos sítios de DNAr 5S. Porém essa diferença pode ser atribuída a variações decorrentes do isolamento entre as populações e, provavelmente, não é suficiente para separar as populações em espécies distintas.

Diferenças interpopulacionais também podem ser observadas em *G. gardneriana*. A população de Verdelândia possui onze cromossomos com sítios de DNAr 5S, sendo que um dos cromossomos, marcado com um sítio subterminal em cada um dos braços, não possui correspondência no conjunto cromossômico, constituindo portanto um caso de heteromorfismo. Canaã dos Carajás não apresenta heteromorfismos entre seus cromossomos. As populações compartilham 3 pares cromossômicos semelhantes para localização de sítios de DNAr 5S e morfologia (ver cromossomos em detalhes na figura 4, F e I). O cromossomo heteromórfico nas metáfases de Verdelândia também assemelha-se com um dos pares cromossômicos de Canaã dos Carajás. Para *G. gardneriana* ainda podem ser observados mais dois pares cromossômicos que diferem entre as populações. Todos esses cromossomos podem ser vistos em detalhe na figura 4 (F e I). Mais uma vez, embora as populações compartilhem semelhanças que apontam para uma certa proximidade evolutiva, talvez as diferenças justifiquem a separação dessas populações em espécies distintas.

Para Amaryllidaceae, não existem muitos estudos citológicos com FISH com os quais se possa comparar os dados obtidos no presente estudo. O trabalho citotaxonômico desenvolvido com *Clivia*, contudo, revelou um padrão conservado de sítios de DNAr 5S. Ran *et al.* (2001b) estudaram cinco

espécies de *Clivia* e observaram que, apesar de algumas variações no número e na localização de sítios de DNAr 45S e bandas heterocromáticas, todas as espécies apresentaram um único sítio de DNAr 5S, sempre em posição intersticial no braço curto do cromossomo 8. Na verdade, apesar de a sequência do DNAr 5S ser um pouco variável, seu padrão de distribuição é mais constante, ocorrendo geralmente em um único par cromossômico e, menos frequentemente em dois pares ou mais (Guerra 2004). Assim, o gênero *Clivia* está de acordo com essa tendência, mas *Griffinia* (ou algumas de suas espécies), não. Outro exemplo que foge à tendência geral de estabilidade para os sítios de DNAr 5S pode ser observado para o gênero *Lycoris*. Cada espécie exibe de quatro a 14 sítios de DNAr 5s distribuídos em diferentes posições nos cromossomos (Chang *et al.* 2009).

A partir da variação em número e posição de sítios de DNAr 5S observada em *Griffinia*, é possível sugerir que inversões, translocações e rearranjos estejam envolvidas na diversificação de espécies. As forças responsáveis pelo estabelecimento das inversões, assim como sua significância para a evolução, permaneçam desconhecidas. Contudo, já é conhecida sua importância no isolamento de populações e na especiação (Kirkpatrick e Barton 2005). Para espécies do gênero *Lycoris*, além das fusões e fissões, inversões também estão envolvidas na evolução cromossômica (Chang *et al.* 2009). Rearranjos de braços inteiros de cromossomos também já foram observadas em Amaryllidaceae, assim como amplificação de sequências repetitivas (DNAr 5S, DNAr 45S e sequências teloméricas), seguida da adição dessas sequências às extremidades de cromossomos quebrados sendo esses eventos seriam responsáveis por mudanças cariotípicas (Jones 1998).

As espécies de grupos externos possuem cariótipos bastante distintos entre si, e distintos também das espécies de *Griffinia*, corroborando a circunscrição dessas espécies em gêneros distintos. Análises com mais marcadores poderiam indicar quais fenômenos - poliploidização, fissão, fusão, entre outros – estariam envolvidos na diversificação dessas espécies.

A elaboração de cariótipos com aplicação de bandamento CMA₃/DAPI e FISH é inédita para todas espécies estudadas, e mostrou-se uma ferramenta útil à taxonomia. O número cromossômico manteve-se constante em *Griffinia* e diferiu entre os gêneros, confirmando a delimitação desses grupos. No que diz respeito ao bandamento, ainda que bandas heterocromáticas não tenham por si só delimitado espécies ou grupos, somadas às informações de tamanho, morfologia e posição de sítios de DNAr 5S, essas bandas ajudaram a diferenciar as espécies. Diferentemente dos marcadores obtidos por bandamento, os marcadores oriundos da FISH podem, por si só, auxiliar na compreensão das relações filogenéticas, uma vez que sua distribuição diferencial entre as espécies caracteriza um pequeno grupo (Complexo Liboniana).

Os resultados do presente estudos sugerem a necessidade de novos estudos morfológicos para identificações mais precisas das espécies de *Griffinia*. As informações citológicas devem também ser consideradas caracteres taxonômicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, S.K.S., Azhar, S.S., Sarker, R.H., Zaman, M.A. (1998). Karyotype analysis with different banding in *Crinum pratense* and *Crinum defixum*. *Cytologia*, 63, 223-227.
- Almeida, C., & Pedrosa-Harand, A. (2011). Contrasting rDNA evolution in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and common bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). *Cytogenetic and genome research*, 132(3), 212.
- Arroyo, S. C. (1982). The Chromosomes of *Hippeastrum*, *Amaryllis* and *Phycella* (Amaryllidaceae). *Kew Bulletin*, 37(2), 211-216.
- Chang, Y. C., Shii, C. T., & Chung, M. C. (2009). Variations in ribosomal RNA gene loci in spider lily (*Lycoris* spp.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(5), 567-573.
- D'Amato, G. (2004). Karyotype and heterochromatin characterization in some species of *Narcissus* (Amaryllidaceae). *Caryologia*, 57(1), 99-105.
- Dean, W. (1995). *With broadax and firebrand: the destruction of the Brazilian Atlantic forest*. University of California Press, Berkely.
- Dutilh, J. A. H. (2005). Ornamental bulbous plants of Brazil. In *V International Symposium on New Floricultural Crops* 683 (pp. 37-42).
- Engel, T.B.J. (2011). Evidências de hibridação natural entre *Adenocalymma campicola* e *A. peregrinum*. Monografia. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.
- Felix, W. P., Dutilh, J. H., Melo, N. F., Almeida, A., & Felix, L. P. (2007). Citogenética de duas espécies de *Zephyranthes* Herb. (Amaryllidaceae–Hipeastreae) cultivadas. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(S1), pg-294.

- Felix, W. J., Dutilh, J. H., Melo, N. F. D., Fernandes, A. A., & Felix, L. P. (2008). Intrapopulational chromosome number variation in *Zephyranthes sylvatica* Baker (Amaryllidaceae: Hippeastreae) from northeast Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 31(2), 371-375.
- Felix, W. J. P., Felix, L. P., Melo, N. F., Dutilh, J. H. A., & Carvalho, R. (2011a). Cytogenetics of Amaryllidaceae species: heterochromatin evolution in different ploidy levels. *Plant Systematics and Evolution*, 292(3-4), 215-221.
- Felix, W. J. P., Felix, L. P., Melo, N. F., Oliveira, M. B. M., Dutilh, J. H. A., & Carvalho, R. (2011b). Karyotype variability in species of the genus *Zephyranthes* Herb. (Amaryllidaceae–Hippeastreae). *Plant Systematics and Evolution*, 294(3-4), 263-271.
- Goldblatt, P. (1976). Chromosome cytology of *Hessea*, *Strumaria* and *Carpolyza* (Amaryllidaceae). *Annals of Missouri Botanical Garden*, 63, 314-320.
- Guerra, M. (1988). *Introdução à citogenética geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Guerra, M. (1990). A situação da citotaxonomia de Angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 4(2): 75-86
- Guerra, M. (2004). *FISH: conceitos e aplicações na citogenética*. Sociedade Brasileira de Genética.
- Guerra, M., & Souza, M. (2002). *Como analisar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC.
- Hizume, M. (1993). Chromosomal localization of 5S rRNA genes in *Vicia faba* and *Crepis capillaris*. *Cytologia*, 58(4), 417-421.
- Ising, G. (1969). Cytogenetic studies in *Cyrtanthus*. *Hereditas*, 61(1-2), 45-114.
- Ising, G. (1970). Evolution of karyotypes in *Cyrtanthus*. *Hereditas*, 65(1), 1-28.

- Jones, K. (1998). Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. *The Botanical Review*, 64(3), 273-289.
- Kirizawa, M., Lopes, E.A., Silveira, R.B.A., Tavares, A.R., Kanashiro, S. (2005) *Griffinia hyacinthina* (Ker Gawl.) Ker Gawl., Amaryllidaceae da Mata Atlântica, endêmica e em perigo de extinção: estudos morfológico e horticultural. *Hoehnea*, 32, 87-92.
- Kirkpatrick, M., & Barton, N. (2006). Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics*, 173(1), 419-434.
- Kitamura, S., Inoue, M., Shikazono, N., & Tanaka, A. (2001). Relationships among *Nicotiana* species revealed by the 5S rDNA spacer sequence and fluorescence *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(5), 678-686.
- Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201-220.
- Meerow, A.W., Preuss, K.D., Tombolato, A.F.C. (2002). *Griffinia* (Amaryllidaceae), a critically endangered Brazilian geophyte with horticultural potential. *Acta Hort.* 570:57-64.
- Muñoz, M; Riegel, R., Seeman, Peñalillo, P, Schiappacasse, F. & Nuñez, J. 2011. Phylogenetic relationships of *Rhodolirium montanum* Phil. and related species based on nucleotide sequences from ITS region and karyotype analysis. *Gayana Botany*, 68(1), 40-48.
- Perry, C. B., & Schrader, O. (2004). Karyotype analysis of *Placea amoena* Phil.(Amaryllidaceae) by double fluorescence *in situ* hybridization. *Caryologia*, 57(2), 200-205.
- Preuss, K.D. (1999). Systematic Studies in the Genus *Griffinia* (Amaryllidaceae). Dissertação de Mestrado. University of Florida, Gainesville.

- Preuss, K.D., Meerow, A.W. (2001a). Two new white-flowered *Griffinia* species. *Herbertia*, 56, 127-130.
- Ran, Y., Murray, B. G., & Hammett, K. R. W. (1999). Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and *in situ* hybridization. *Euphytica*, 106(2), 139-147.
- Ran, Y., Hammett, K. R., & Murray, B. G. (2001a). Hybrid identification in *Clivia* (Amaryllidaceae) using chromosome banding and genomic *in situ* hybridization. *Annals of Botany*, 87(4), 457-462.
- Ran, Y., Hammett, K. R., & Murray, B. G. (2001b). Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia* (Amaryllidaceae). *Annals of botany*, 87(6), 823-830.
- Schweizer, D., & Loidl, J. (1987). A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. In *Chromosomes today* (pp. 61-74). Springer Netherlands.
- Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, P. (2000). Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Shafiq, F. A., & Vahidy, A. A. (1998). Chromosomal heteromorphy in the karyotypes of three local cultivars of *Hippeastrum vittatum* (Amaryllidaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 1.
- Stebbins, G.L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. London: Edward Arnold.
- Sumner, A. T. (1990). *Chromosome banding*. London: Unwin Hyman.
- Venkateswarlu, K., Lee, S. W., & Nazar, R. N. (1991). Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. *Gene*, 105(2), 249-253.
- Walter, K.S. and Gillet, H.J. (1997). *IUCN red list of threatened plants*. IUCN the World Conservation Unit, Cambridge

Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*. CRC press.