

**MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA EM
ESPÉCIES TROPICAIS DE *Pinus***

LÍLIA ROSÁRIO RIBEIRO

2001



Handwritten mark or signature on the right edge of the page.

..... 82.10 -
.....
..... 82.10 -
..... 82.10 -
..... 82.10 -

52805

45/19702

LÍLIA ROSÁRIO RIBEIRO

MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES TROPICAIS
DE *Pinus*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas,
para obtenção do título de "Mestre" .

Orientadora

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2001



**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Ribeiro, Lília Rosário

Morfometria cromossômica em espécies tropicais de *Pinus* / Lília Rosário
Ribeiro. -- Lavras : UFLA, 2001.
42 p. : il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Cariótipo. 2. Construção secundária. 3. Cromossomo. 4. *Pinus oocarpa*. 5.
Pinus patula. 6. *Pinus tecunumanii*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.9751

LÍLIA ROSÁRIO RIBEIRO

MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES TROPICAIS DE
Pinus

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 18 de dezembro de 2001

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres

UFLA

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

UFJF



Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, José (in memorian) e Luiza,

Pelo amor e pela formação humana.

Ao meu querido Elessandro,

Pelo sentimento que nos une.

OFEREÇO

A Profa. Vitolina, pelo apoio e confiança.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de concluir este curso.

À UFLA e ao Departamento de Biologia, por possibilitarem minha participação no curso de pós-graduação.

À Professora Lisete Chamma Davide, pela orientação, carinho e conhecimentos científicos transmitidos.

À Professora Giovana Augusta Torres, pela amizade e valiosas sugestões.

Ao Professor Lyderson Facio Viccini (UFJF), pelas inúmeras contribuições.

Aos Professores e funcionários do DBI/UFLA, pelos momentos de aprendizagem e convivência.

À Professora Vitolina Ferreira Garcia (FAFI/Formiga), pela confiança, investimento, amizade e disponibilidade sempre constantes.

Aos Professores Aladir, Carlos, Elvira, Tacão, Veloso e Walmor (FAFI/Formiga), pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao Elessandro, por seu amor, incentivo e presença constante durante a realização deste curso.

Aos meus familiares, Itamar, José Afrane, Luiza, Mirlei, Vanda e Vanir, pela paciência e apoio durante esse período.

À D. Iraci, pelo apoio e carinho sempre dispensados.

À amiga Márcia, pelo incentivo e acolhida no início do curso.

À amiga Cássia, pelo companheirismo e ajuda nas preparações citológicas.

Aos amigos Vânia e Sandro, pelo convívio, ajuda nas análises de dados e leitura crítica deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética, Alzira, Cláudia, Fábio, Fernanda, Isabella, Josiane, Juliane, Juscélio, Patrícia, Rodrigo, Tatiana e Tharsio, pela alegria do convívio diário.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelo convívio e respeito partilhados.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao Vicente Pongitory Gifoni Moura (EMBRAPA/CENARGEN), Melhoramentos S/A e Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais – ESALQ/USP, pelo fornecimento das sementes para os experimentos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Características, distribuição geográfica e posição taxonômica de <i>Pinus oocarpa</i> , <i>Pinus patula</i> e <i>Pinus tecunumanii</i>	03
2.2 Citogenética do gênero <i>Pinus</i>	08
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Material genético	14
3.2. Avaliação citogenética	15
3.2.1. Preparação citológica	15
3.2.2. Análise morfológica dos cromossomos.....	16
3.3 Análise do comprimento relativo e comprimento total do lote haplóide entre as procedências.....	18
4 RESULTADOS	19
4.1 Análise cariotípica	19
4.1.1 <i>Pinus oocarpa</i>	19
4.1.2 <i>Pinus patula</i>	22
4.1.3 <i>Pinus tecunumanii</i>	23
4.1.3.1 Procedência Las Camelias	23
4.1.3.2 Procedência Jócon Yoro	24
4.1.3.3 Prodecência San Rafael del Norte	25
4.2 Coloração DAPI	25
4.3 Bandeamento C	29
4.4 Análise do Comprimento Total do Lote Haplóide (CTLH) entre procedências	29

5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

RESUMO

RIBEIRO, Lília Rosário. Morfometria cromossômica em espécies tropicais de *Pinus*. LAVRAS: UFLA, 2001. 42p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia / Genética e Melhoramento de Plantas)*

A uniformidade cariotípica das espécies do gênero *Pinus* dificulta a distinção entre cromossomos de um complemento que, além de apresentarem dados de interesse taxonômico, auxiliam quando se deseja associar grupos de ligação a cromossomos e integrar mapas físicos e de recombinação genética. Estudos citogenéticos baseados no comprimento total do lote haplóide (CTLH), comprimento dos braços, posição centromérica e presença de constrição secundária foram realizados em *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e nas procedências Las Camelias, Jócon Yoro e San Rafael del Norte do *Pinus tecunumanii*. Análises citogenéticas na mitose, utilizando coloração com Giemsa e o fluorocromo DAPI, confirmaram o padrão cariotípico descrito para a maioria das espécies do gênero, isto é, onze pares de cromossomos metacêntricos muito semelhantes quanto ao comprimento e morfologia e um par submetacêntrico, para todos os taxa estudados. A coloração homogênea dos cromossomos com o fluorocromo DAPI permitiu diferenciar consistentemente espécies e procedências pelo número e posição das constrições secundárias. Os resultados obtidos suportam o "status" específico para o *Pinus tecunumanii*, bem como fornecem evidências de que, além das mutações gênicas, alterações estruturais contribuíram para a diferenciação intra e interespecífica no gênero *Pinus*.

* Comitê Orientador: Dra. Lisete Chamma Davide - UFLA (Orientadora), Dra. Giovana Augusta Torres - UFLA.

ABSTRACT

RIBEIRO, Lília Rosário. Chromosomic morphometry in tropical species of *Pinus*. LAVRAS: UFLA, 2001. 42p. (Dissertation - Master in Agronomy / Genetics and Plant Breeding)*

The species karyotype uniformity of the genus *Pinus* makes difficult the distinction among chromosomes of a complement, which besides presenting data of taxonomic interest, they are able to assist when one wants to associate connection groups to chromosomes and to integrate physical and of genetic recombination maps. Cytogenetics studies based on total length of the haploid set (CTLH), arms' length, centromeric position and presence of secondary constriction were accomplished in *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* and in the provenances Las Camelias, Jócon Yoro and San Rafael del Norte of *Pinus tecunumanii*. Mitotic cytogenetic analysis using Giemsa and the fluorochrome DAPI, confirmed the standard karyotype described for most species of the genus, that is, eleven pairs of very similar metacentric chromosomes regarding length and morphology and one pair of a submetacentric chromosome, for all taxa studied. Fluorochrome DAPI made possible to differentiate consistently species and provenances using the number and position of secondary constrictions. The results support the specific status for *Pinus tecunumanii*, and supply evidences that besides genic mutations, structural alterations contributed to intra and interspecific differentiation in the genus *Pinus*.

* Guidance Committee: Dr. Lisete Chamma Davide - UFLA (Major Professor), Dr. Giovana Augusta Torres - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as coníferas de origem tropical introduzidas no Brasil destacam-se as do gênero *Pinus*, em função de sua alta produtividade e boa adaptação a uma grande variedade de solos e condições ambientais diversas. As espécies *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*, entre outras, são plantadas nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, para diversos fins, tais como reflorestamento, produção de matéria-prima para a indústria de celulose e papel, extração de resinas, fabricação de estacas, chapas e madeira para serrarias (Suassuna, 2001).

O complemento cromossômico das espécies do gênero *Pinus* tem sido estudado por vários autores (Sax & Sax, 1933; Saylor, 1961, 1964; Hizume et al., 1983, 1989; Davide & Araújo, 1993 a, b) e caracteriza-se por apresentar-se muito homogêneo, com cromossomos grandes, metacêntricos, muito semelhantes em comprimento, com somente um ou, às vezes, dois submetacêntricos de tamanho médio, os quais podem ser facilmente observados ao microscópio de luz. Essa uniformidade dificulta a distinção dos cromossomos e, portanto, a construção de cariótipos detalhados que são necessários quando se deseja associar grupos de ligação a cromossomos e integrar mapas físicos e de recombinação genética (Doudrick et al., 1995).

Além disso, essas informações são de interesse taxonômico. Das três espécies citadas, *Pinus oocarpa* e *Pinus patula* têm o “status” específico bem definido. Por outro lado, com relação ao *Pinus tecunumanii*, apesar de ter sido classificado recentemente por Frankis et al., (1999), baseado em características anatômicas e morfológicas, vários trabalhos anteriores ora têm considerado esse táxon como espécie, ora como subespécie do *Pinus patula* (Styles, 1985;

Davide, 1990; Grattapaglia, et al., 1992; Leão & Davide, 1993; Silva-Mann, et al., 2001).

A utilização de programas para medições pode ajudar no detalhamento de cariótipos homogêneos como os desse gênero, uma vez que as ferramentas desses programas permitem a identificação de diferenças que não são perceptíveis pelas técnicas de análise convencionais. Além disso, as constrições secundárias, estruturas utilizadas como marcadores citológicos e que auxiliam na identificação de cromossomos individuais, têm sido descritas no gênero *Pinus* (Saylor, 1961; Pederick, 1967; Davide & Araújo, 1993 a e b). No entanto, alguns trabalhos reportam que, neste gênero, elas têm se mostrado muito variáveis em aparência, sendo pouco consistentes para serem utilizadas para distinguir cromossomos de tamanhos semelhantes (Natarajan, et al., 1961; Davide, 1990). A possibilidade de usar várias metodologias para a identificação consistente deste marcador citológico forneceria informação complementar importante para a distinção de cromossomos.

As constrições secundárias são as regiões responsáveis pela organização dos nucléolos (RONs) e apresentam genes em seqüências repetidas em tandem que codificam para os rRNAs 18S, 5,8S e 28 S em diversos organismos. De acordo com Doudrick et al. (1995), estes genes localizados nas RONs e em blocos de DNAs satélites adjacentes a elas são relativamente ricos em GC e, portanto, CMA-positivos em cromossomos de plantas. Durante o ciclo celular, quando as RONs são ativas na intérfase, elas apresentam-se como constrições secundárias na metáfase e têm afinidade pela prata (Yonenaga-Yassuda, 1985; Guerra, 1989).

Neste trabalho, procurou-se utilizar metodologias que permitissem a identificação individual dos cromossomos de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e do *Pinus tecunumanii* com o objetivo de fornecer subsídios para estudos taxonômicos e de ligação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características, distribuição geográfica e posição taxonômica de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*

Pinus oocarpa Schiede destaca-se entre as espécies florestais utilizadas para fins comerciais no Brasil, especialmente pelo seu potencial de crescimento em solos de baixa fertilidade, tornando-se uma das mais importantes coníferas para diversas regiões subtropicais e tropicais de nosso país (Kageyama et al., 1977). Em Minas Gerais, grandes áreas de reflorestamento têm ocupado as terras do sul do Estado, as vertentes a leste da Serra do Espinhaço, os chapadões da Serra da Canastra e seus prolongamentos até as proximidades de Patos de Minas (Zoneamento..., 2001).

Nas regiões norte e central do estado de São Paulo, onde se situam os cerrados, caracterizados por inverno e primavera secos e solos pobres, o *Pinus oocarpa* está entre as espécies de origem tropical que melhor se adaptaram sendo utilizada na produção de celulose e papel (Suassuna, 2001).

Estudos de tratamento preservativo de madeira, realizados por Zeca Filho & Targa (1998), comprovaram que o uso da madeira de *Pinus oocarpa* em redes de transmissão e distribuição de energia elétrica é perfeitamente viável.

Na região sul do Brasil, *Pinus oocarpa* é muito empregado na produção de chapas compensadas, madeira serrada, vigas laminadas, produção de papel e na construção civil (Matos & Dezgeniski, 2001).

Apesar de se adaptar a uma grande variedade de solos, *Pinus patula* alcança seu melhor desempenho em áreas de planície, com solos moderadamente férteis e úmidos, de textura arenosa a argilosa. Programas de reflorestamento em Minas Gerais introduziram essa espécie no sul do estado,

abrangendo grande parte da Serra da Mantiqueira e os maciços montanhosos de Poços de Caldas e de Ouro Fino, Serra do Brigadeiro e a Serra do Caparaó (Zoneamento..., 2001).

A madeira de árvores jovens é utilizada para a fabricação de caixas e caixotes para embalagem. A madeira de árvores maduras é utilizada na área de construção civil, para a produção de papel, para a fabricação de móveis e como combustível na Colômbia para a fabricação de carvão ativado. Algumas partes da planta têm propriedades medicinais. O chá de folhas jovens é utilizado no tratamento de bronquite e a fricção com a resina no tratamento do reumatismo (Pinus..., 2001).

O *Pinus tecunumanii* é um táxon com características excepcionais na região de origem: mais de 50 m de altura, tronco reto, mais de 1,40 m de diâmetro, com copa compacta e poucos ramos finos e laterais. Este táxon é encontrado em áreas de solos bem diversos, desde argilosos até os profundos de origem vulcânica, com pH ligeiramente ácido, distribuindo-se nas montanhas centrais da Guatemala, estendendo-se até El Salvador, Honduras e, provavelmente, Chiapas, no México (Eguiluz – Piedra & Perry, 1983).

Além do uso nas áreas de reflorestamento e indústria de celulose e papel, vários trabalhos vêm sendo realizados na região sul do Brasil, buscando gerar alternativas de introdução e uso de espécies tropicais de *Pinus*. No estado do Paraná, estudos sobre a caracterização tecnológica de quatro espécies de *Pinus*, entre elas o *Pinus tecunumanii*, desenvolvidos por Matos & Dezeniski (2001), visam à sua utilização potencial na produção de compensados, aglomerados, madeira serrada, vigas laminadas e usos estruturais.

De acordo com a classificação de Martinez (1948), empregando características de acúculas, cones e sementes, caducidade ou persistência das bainhas dos fascículos, o gênero *Pinus* foi dividido em nove seções. *Pinus*

oocarpa Schiede e *P. patula* Schiede & Deppe pertencem à seção Serotina, cujas plantas são divididas em três grupos: a) *oocarpa*, b) *patula* e c) peninsulares.

As espécies que abrangem o grupo *oocarpa* apresentam cones simétricos ovóides ou parcialmente ovóides. São representantes desse grupo: *P. oocarpa* Schiede e suas variedades *microphyla*, *manzonoi*, *trifoliata* e *ochoterenai*. A espécie *Pinus oocarpa* é encontrada no México, Belize, Guatemala, Honduras e Nicarágua, em regiões cujas altitudes variam de 700 a 2.000 metros, com estações secas.

O grupo *patula* caracteriza-se pela presença de cones oblíquos, brilhantes, duros e muito persistentes. Neste grupo estão *Pinus patula* Schiede & Deppe e sua variedade *longepedunculata*, *Pinus greggii* Engelm. e *Pinus pringlei* Shaw. *Pinus patula* ocorre nos estados mexicanos de Querétaro, Hidalgo, México, Puebla e Veracruz, em regiões montanhosas úmidas, com altitudes de 1.500 a 3.000 metros (Martinez, 1948).

Em uma classificação mais completa, segundo Little & Critchfield (1969), *Pinus oocarpa* e *Pinus patula* pertencem ao subgênero *Pinus*, seção *Pinus* e subseção *Oocarpae*. A subseção *Oocarpae* compreende três espécies da Califórnia (*Pinus radiata* D. Don, *P. attenuata* Lemm. e *P. muricata* D. Don) e quatro do México e América Central (*P. patula* Schiede & Deppe, *P. oocarpa* Schiede, *P. greggii* Engelm. e *P. Pringlei* Shaw).

Enquanto que o “status” taxonômico do *Pinus oocarpa* e *Pinus patula* está bem definido, para o *Pinus tecunumanii*, até o momento, não foram apresentados dados conclusivos a esse respeito. Em função disso, alguns trabalhos referem-se a esse táxon como *Pinus* de Tecun Umán. Entre eles, encontra-se o de Styles (1985), que relata que a descoberta do *Pinus* de Tecun Umán foi feita pelo patologista florestal alemão Fritz Schwerdtfeger, no final da década de 1940. Naquela época, esse pesquisador foi requisitado para analisar as perdas ocorridas nas florestas do gênero *Pinus* da Guatemala, na América

Central, causadas pelo coleóptero *Dendroctonus* sp. (Scolytidae). Por não possuir informações sobre a extensão e a ocorrência das espécies de *Pinus* naquelas florestas naturais, seus estudos sobre a biologia do inseto foram prejudicados.

Schwerdtfeger iniciou, dessa forma, seu trabalho sobre a sistemática dos *Pinus*, descrevendo um novo táxon, o qual denominou de *Pinus tecumumanii*. O nome foi uma homenagem a Tecun Umán, o último líder dos índios Quiché na Guatemala, morto em 1524 por Pedro de Alvarado, da Espanha, durante a conquista do Istmo da América Central. Por não ter observado as normas do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Jeffrey, 1976), sua descrição foi feita em espanhol e não em latim. Por essa razão foi rejeitada pelos taxonomistas da época.

As espécies de *Pinus* da América Central pertencem ao grupo dos cones fechados da subseção *Oocarpae* do gênero *Pinus*. Porém, o táxon descoberto por Schwerdtfeger despertou controvérsias entre botânicos e florestais quanto à sua posição taxonômica e o seu relacionamento dentro do grupo.

A morfologia, anatomia foliar e a presença de terpenos em resinas analisadas por Eguiluz-Piedra & Perry (1983) sugerem que o *Pinus* de Tecun Umán deve ser considerado uma espécie. Os autores fizeram sua descrição de acordo com as normas do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Jeffrey, 1976) e conferiram-lhe a categoria específica, alterando o epíteto específico denominando-o *Pinus tecunumanii* (Schw.) Eguiluz e Perry. Além disso, consideram o *Pinus* de Tecun Umán muito mais próximo do *Pinus oocarpa* var. *ochoterenai* do que de *Pinus patula*.

Contudo, Styles (1985), com base em estudos a partir de estudos sobre características morfológicas, anatômicas e de distribuição geográfica, sugere que o *Pinus* de Tecun Umán é mais relacionado com *Pinus patula* e confere-lhe a categoria subespecífica: *Pinus patula* subespécie *tecunumanii* (Styles).

Davide (1990), analisando características cromossômicas, da madeira e de acículas de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e das procedências Camélias, Mountain Pine Ridge, San Rafael e Yucul do *Pinus* de Tecun Umán, relatou uma maior proximidade desse táxon com *Pinus patula*, concordando com Styles (1985).

Leão & Davide (1993) realizaram estudos sobre características anatômicas e morfológicas de acículas de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e de quatro procedências do *Pinus* de Tecun Umán (Camélias, Mountain Pine Ridge, San Rafael e Yucul). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o *Pinus* de Tecun Umán deva ser considerado como uma subespécie de *Pinus patula*.

Procedências de *Pinus* de Tecun Umán do norte e do sul do México foram estudadas por Grattapaglia et al., (1992), utilizando dados obtidos por marcadores moleculares do tipo RAPD para análise filogenética envolvendo *P. patula*, *P. caribaea* e *P. oocarpa*, entre outros. Os autores observaram variação genética na sequência de DNA entre as procedências de elevada e baixa altitude do *Pinus* de Tecun Umán e que o mesmo não se apresenta fortemente relacionado com *P. patula*, apresentando uma proximidade com *P. oocarpa* seguida do *P. caribaea*

Por meio de estudos de similaridade genética utilizando RAPD, Silva-Mann et al., (1999) demonstraram um distanciamento genético das procedências do *Pinus* de Tecun Umán em relação ao *Pinus patula*. Silva-Mann et al., (2001), utilizando bandeamento com o fluorocromo cromomicina -A₃, encontraram maior proximidade entre procedências do *Pinus* de Tecun Umán e *Pinus oocarpa*, distanciando-se do *Pinus patula* e *Pinus caribaea*.

Uma classificação mais recente do gênero *Pinus* foi feita por Frankis et al., (1999), baseada nas características de cones, sementes e acículas. A classificação segue o método utilizado por Little & Critchfield (1969), com algumas modificações e adições. De acordo com esses autores, o gênero *Pinus*

divide-se em três subgêneros: *Strobus*, *Ducampopinus* e *Pinus*. O subgênero *Pinus* é dividido em três seções: *Pinus*, *Pinea* e *Trifoliae*. *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii* pertencem à seção *Trifoliae*, subseção *Oocarpae*, que compreende além dessas espécies, *Pinus radiata*, *P. attenuata*, *P. muricata*, *P. greggii*, *P. pringlei*, *P. jaliscana*, *P. teocote*, *P. herrerae*, *P. lawsonii* e *P. praetermissa*.

Apesar de Frankis et al., (1999) terem conferido a categoria específica ao *Pinus tecunumanii*, em um estudo taxonômico, os autores consideraram apenas as características de cones, sementes e acículas. Resultados sobre o complemento cromossômico e de marcadores moleculares poderiam dar um suporte maior a essa classificação.

2.2 Citogenética do gênero *Pinus*

A contribuição da citogenética para os estudos taxonômicos apresenta grande importância, uma vez que o processo evolutivo envolve os cromossomos de diversas maneiras. Além das mutações gênicas, o material genético sofre rearranjos estruturais e numéricos nos cromossomos, que podem conduzir a variações cariotípicas aparentes, tornando possível a diferenciação entre taxa (Davide, 1990).

O cariótipo pode ser utilizado como um dos critérios para distinguir diferentes espécies em vários grupos de animais e vegetais (Swanson, 1960; Saylor, 1961; Guerra, 1989). Mais recentemente, quando todos os cromossomos de uma espécie podem ser identificados, tornou-se essencial para complementar estudos sobre genética molecular e quantitativa. Com a hibridização *in situ*, o cariótipo tornou-se a chave para associar os resultados moleculares com os citogenéticos (Doudrick et al., 1995).

Todavia, o avanço da pesquisa citogenética das coníferas tem sido limitada pela dificuldade na identificação de cromossomos individuais (Pederick, 1967). No gênero *Pinus*, particularmente, o cariótipo das espécies constituído de doze pares de cromossomos, apresenta uma notável uniformidade quanto ao tamanho e forma, sendo que dez ou onze pares são metacêntricos e com comprimentos muito semelhantes. Somente um ou dois pares são submetacêntricos, podendo ser distinguidos claramente (Sax & Sax, 1933; Natarajan et al., 1961; Saylor, 1961, 1964; Hizume et al., 1983).

Embora na predomine o padrão cariotípico descrito por Sax & Sax (1933), estudos mais detalhados utilizando coloração convencional e técnicas de bandejamento têm demonstrado a ocorrência de variações cromossômicas no gênero *Pinus*.

Em um estudo do complemento cromossômico de espécies do grupo Laricion, Saylor (1964) observou que o décimo primeiro cromossomo poderia ser diferenciado pela presença de centrômero submediano. Essa evidência confirma os dados da literatura, sugerindo a existência de diferenças na estrutura cromossômica intergrupos.

Tanaka & Hizume (1980) aplicaram o bandejamento C com sucesso em três espécies de gimnospermas, entre elas *Pinus densiflora*, em que bandas C centroméricas foram observadas em todos os cromossomos do complemento.

Mac Pherson & Fillion (1981), estudando espécies dos subgêneros *Pinus* e *Strobus*, concluíram que os dois subgêneros podem ser distinguidos um do outro com base na heterocromatina pericentromérica. Os mesmos autores verificaram que os cromossomos II, V, VI, VIII e XII de *Pinus rigida* não apresentam bandas na região do centrômero e que as bandas intercalares estão associadas com as constrições secundárias.

Os cromossomos de *Pinus nigra* foram claramente identificados por Hizume et al., (1983), utilizando a técnica de bandejamento fluorescente, em que

as bandas cromomicina-A₃ (CMA) e diamidino-2-fenilindol (DAPI) apareceram nas regiões intersticiais e/ou proximais da maioria dos cromossomos.

Em estudos de relações filogenéticas, Hizume et al., (1989) descreveram diferenças significativas entre *Pinus densiflora* e *Pinus thunbergii*, por meio de técnicas de bandeamento fluorescente utilizando também CMA e DAPI. Todos os membros do complemento cromossômico de *Pinus densiflora* mostraram bandas CMA nas regiões proximais e/ou intersticiais, enquanto que, em *Pinus thunbergii* os pares I, IV e XI não apresentaram bandas. Sete pares de cromossomos em *Pinus densiflora* e cinco em *Pinus thunbergii* exibiram bandas CMA intersticiais fortes. O décimo par apresentou banda CMA na região proximal em *Pinus densiflora* e banda DAPI nessa mesma região em *Pinus thunbergii*.

Informações cariotípicas foram utilizadas por Davide & Araújo (1993) para identificar fenótipos diferentes em povoamentos de origem incerta de *Pinus oocarpa*. O cariótipo destas árvores foi comparado com os de *Pinus oocarpa* e *Pinus patula*, sendo possível demonstrar que se tratavam de variantes da espécie *Pinus oocarpa*.

Silva (1996) utilizou bandeamento fluorescente para comparar o complemento cromossômico de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula*, *Pinus caribaea* var. *hondurensis* e da procedência Mountain Pine Ridge do *Pinus* de Tecun Umán. Foi verificada a presença de bandas CMA centroméricas nos cromossomos V e VII do *Pinus* de Tecun Umán, bem como bandas intersticiais nos cromossomos II, III, IV e VII. Em *Pinus oocarpa* foram observadas bandas centroméricas nos cromossomos VII e IX e bandas intersticiais nos cromossomos III, IV, V e VII. Bandas intersticiais foram observadas nos cromossomos IV, V, VII, VIII, IX e X de *Pinus patula* e na região centromérica dos cromossomos IV e VII. Em *Pinus caribaea* foram observadas seis bandas CMA sendo quatro intersticiais (cromossomos I, VI, VII e VIII) e duas

centroméricas (cromossomos VII e XI). Estes resultados permitiram a diferenciação dos cromossomos das espécies analisadas e, associados aos de análises de RAPD, mostraram maior similaridade entre os genótipos do *Pinus* de Tecun Umán e de *Pinus oocarpa*.

Em vários destes trabalhos sobre a citogenética das espécies de *Pinus*, os autores referem-se às constrições secundárias como um marcador citológico para a comparação do complemento cromossômico destas espécies.

De acordo com Natarjan et al., (1961) em um estudo de morfologia cromossômica de *Pinus silvestris* foi relatada a ocorrência de constrições secundárias em cinco pares de cromossomos e a presença de dois pares de cromossomos submetacêntricos.

Pederick (1967), fundamentado principalmente no tamanho e localização de constrições secundárias, conseguiu distinguir nove espécies de *Pinus*. Cromossomos na prometáfase mitótica foram utilizados neste estudo por apresentarem-se mais distendidos e mostrarem grande número de constrições secundárias de tamanhos variáveis.

Davide & Araújo (1993), analisando o complemento cromossômico de três espécies de *Pinus* por meio de coloração convencional e técnicas de análise de imagem, conseguiram identificar quatro constrições secundárias em *Pinus oocarpa* e sete em *Pinus patula*.

As constrições secundárias constituem-se em sítios cromossômicos que codificam para os rRNAs 18S, 5,8S e 28S, responsáveis pela síntese e processamento dos pré ribossomos no nucléolo, que se tornam maduros em última instância no citoplasma (Sumner, 1990). Os cromossomos que possuem essa constrição são freqüentemente vistos, durante a prófase, associados ao nucléolo. Daí chamar-se também essa constrição de região organizadora do nucléolo (RON).

Segundo Bicudo (1985), com as técnicas de coloração comum, essas regiões diferenciam-se do restante do cromossomo, corando-se fracamente e mostrando-se mais finas que as demais. São chamadas de constrições secundárias, para serem diferenciadas das constrições primárias que apresentam aspecto semelhante mas que incluem o centrômero.

De acordo com esse mesmo autor, as RONS têm mostrado uma grande variabilidade quanto a vários aspectos, tais como o número e a localização das regiões organizadoras nucleolares presentes ou ativas e a quantidade de DNA ribossômico presentes nas mesmas.

Cada espécie normalmente possui, pelo menos, um par de cromossomos homólogos organizador de nucléolo (Schulz-Schaffer, 1980). Na drosófila, no milho e na cebola, por exemplo, existe apenas um cromossomo com constrição secundária, enquanto que na espécie humana elas estão presentes em cinco dos 23 cromossomos do conjunto haplóide (Guerra, 1989).

Deve ser esclarecido, porém, que nem toda constrição secundária é uma RON, assim como nem todos os locais de rDNA aparecem como constrições secundárias (Sumner, 1990). Em *Microtus agrestis*, um tipo de rato silvestre, a região organizadora do nucléolo está tão próxima à extremidade terminal do cromossomo, que não produz nenhuma constrição secundária (Swanson, 1981). Em casos como este, as constrições secundárias podem ser fortemente coradas com nitrato de prata, que tem grande afinidade com o rRNA transcrito nos sítios de rDNA. Provavelmente, algumas proteínas nucleolares persistem na constrição secundária durante todo o ciclo celular, permitindo corar não apenas os nucléolos como também as constrições secundárias em metáfase (Guerra, 1989, Yonenaga-Yassuda, 1985).

Outra técnica que vem sendo utilizada no estudo dessas regiões é a coloração diferencial por meio de fluorocromos. Como as RONS possuem os sítios cromossômicos para os genes de rRNA que consistem em vários blocos de

rDNA (18S e 28S) ricos em seqüências de bases GC (Sumner, 1990), a utilização de fluorocromos específicos para essas seqüências, como a cromomicina-A₃, que possui afinidade pelos segmentos de DNA ricos em pares de bases GC pode ser útil para a identificação dessas regiões (Doudrick et al., 1995).

Em *Pinus*, em que complemento cromossômico é tão homogêneo, as constrições secundárias representam um elemento importante para a distinção entre cariótipos, apesar de terem sido consideradas inconsistentes em alguns trabalhos (Natarajan et al., 1961; Saylor, 1961, 1964; Davide & Araújo, 1993; Doudrick et al., 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

Foram utilizadas sementes coletadas de forma aleatória, obtidas de povoamentos de *Pinus oocarpa* e de *Pinus patula*, bem como das procedências do *Pinus tecunumanii* como segue:

-*Pinus oocarpa* Schiede: sementes coletadas de árvores de um plantio estabelecido em Agudos, SP, pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais IPEF-ESALQ/USP. Material provavelmente originário da América Central e encontrado em altitudes de 700 a 2.000m.

-*Pinus patula* Schiede & Deppe: foram coletadas sementes de árvores de um plantio estabelecido em Camanducaia, MG, pela empresa Melhoramentos S/A. Material originário da África do Sul e encontrado em altitudes que variam de 1.500 a 3.000m.

-*Pinus tecunumanii*: sementes fornecidas pela EMBRAPA/CENARGEN:

- a) procedência Jócon Yoro: material originário de Honduras e encontrado em altitudes variando de 775 a 1.000m;
- b) procedência Las Camelias: material originário da Nicarágua e encontrado em altitudes de 950 a 1.060m;
- c) procedência San Rafael del Norte: material originário da Nicarágua e encontrado em altitudes de 1.080 a 1.330m.

3.2 Avaliação citogenética

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, UFLA.

3.2.1 Preparação citológica

Sementes de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e das procedências Jócon Yoro, Las Camelias e San Rafael del Norte do *Pinus tecunumanii* foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio 3% por 5 minutos. Foram então colocadas para germinar por 7 a 10 dias sobre papel de germinação umedecido em placas de Petri, à temperatura ambiente.

Após a germinação, as radículas com aproximadamente 0,5 cm foram pré-tratadas com solução aquosa de colchicina 0,05% a 4°C por 24 horas, fixadas em Carnoy (álcool etílico p.a. - ácido acético glacial p.a. 3:1), sendo efetuadas três trocas do fixador a cada quinze minutos e estocadas em freezer (-20°C) até o uso.

Para a confecção das lâminas, as raízes passaram por tratamentos hipotônicos com água deionizada por três vezes, com duração de dez minutos cada. Posteriormente, foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 1h30min, para digestão com solução enzimática de celulase 2% e pectinase 20%.

Após o tratamento enzimático, as raízes passaram por três banhos hipotônicos de cinco minutos com água deionizada. A região meristemática foi excisada e macerada em ácido acético 45%. As lamínulas foram removidas pelo método do nitrogênio líquido e as lâminas foram secas ao ar.

As lâminas foram submetidas a três tipos de tratamentos, à coloração convencional com Giemsa para análise cariotípica e, para a obtenção de bandas, às técnicas de bandeamento C e de bandeamento fluorescente com DAPI. A

coloração com Giemsa foi realizada de acordo com Guerra (1983) com modificações. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa 3% por 12 minutos e, após serem secas ao ar, foram montadas de forma permanente em Entellan®.

A metodologia de coloração fluorescente com 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) foi empregada de acordo com Hizume et al., (1989), com algumas modificações. Lâminas envelhecidas por, no mínimo, três dias foram pré incubadas por dez minutos em tampão McIlvaine (ácido cítrico-fosfato monohidratado de sódio, pH 7,0) e tratadas com DAPI (2µg/ml) por 40 minutos. As lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada e montadas de forma semi-permanente em tampão McIlvaine com 2,5mM de MgCl₂.

A técnica de Bandeamento C foi realizada de acordo com Tanaka & Hizume (1980). As lâminas passaram por um processo de envelhecimento mínimo de três dias e, posteriormente, foram tratadas com solução hipotônica de BaOH₂ 5% a 60°C por cinco minutos e lavadas em água destilada por quinze minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas em 4xSSC a 60°C por duas horas, passando por um banho rápido em água destilada. As lâminas foram secas ao ar e coradas com solução de Giemsa 1% por vinte minutos.

3.2.2 Análise morfológica dos cromossomos

Para cada espécie/procedência estudada foram selecionadas dez metáfases coradas com Giemsa. Elas foram fotomicrografadas em microscópio Olympus BX60, utilizando-se filmes preto e branco Pro Image 100 (Kodak) revelados com D-76 (Kodak) e copiados em papel Kodabrome Print RCF3.

As fotomicrografias foram digitalizadas por meio de um Scan Jet 4c, 2000 DPI, acoplado a um microcomputador. As imagens digitalizadas foram analisadas utilizando software Jandel Sigma Scan® Pro v.2.0. As medidas de

comprimento dos cromossomos, obtidas pelo processo de análise de imagem, foram determinadas pela média de dez avaliações, utilizando-se as “ferramentas” do programa citado.

A medida do comprimento dos braços dos cromossomos foi feita a partir da extremidade até o centrômero, incluindo constrições secundárias quando presentes. As constrições secundárias foram medidas a partir do telômero. Foram avaliados:

- a) comprimento do braço maior: BL;
- b) comprimento do braço menor: BC;
- c) comprimento total do cromossomo i: $Cti = BL + BC$;
- d) relação de braços (Saylor, 1961): $RB = BC/BL$;
- e) comprimento total do lote haplóide: $CTLH = \sum Cti/2$;
- f) comprimento relativo: $CR = Cti/CTLH \times 100$.

Com esses dados foi feita a identificação dos pares homólogos e das constrições secundárias e foram calculadas as médias dos valores de relação de braços (RB) e de comprimento relativo (CR). Os cromossomos foram organizados e numerados em ordem decrescente de tamanho de I a XII e representados na forma de idiograma.

As lâminas coradas com DAPI foram observadas em microscópio Olympus BX60, utilizando-se filtro com comprimento de onda de 330 a 385 nm. As figuras de interesse foram capturadas por meio de microcâmera Optronics® acoplada ao microscópio e a um microcomputador Pentium III equipado com placa digitalizadora.

As lâminas submetidas à técnica de Bandeamento C foram observadas em microscópio de campo claro e as figuras de interesse foram capturadas como descrito para o bandeamento DAPI.

3.3 Análise do comprimento relativo e comprimento total do lote haplóide entre as procedências

Foi efetuada a análise de variância para detectar a existência de variação para o comprimento relativo (CR) e para o comprimento total do lote haplóide (CTLH) entre as procedências.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado considerando-se cinco procedências e dez repetições.

O modelo estatístico adotado foi:

$$Y_{ij} = m + t_i + e_{ij}$$

Y_{ij} = observação da procedência i referente a repetição j

M = média geral do experimento

t_i = efeito da procedência i

e_{ij} = erro experimental

A comparação entre as procedências foi feita utilizando-se o teste de Scott-Knott (1974), adotando-se o nível de significância de 5%.

As análises foram realizadas utilizando o programa Sisvar versão 4.0, desenvolvido pelo Professor Daniel Ferreira Furtado do Departamento de Ciências Exatas da Universidade Federal de Lavras (DEX/UFLA).

4 RESULTADOS

Confirmando os dados existentes na literatura a respeito do gênero *Pinus*, o padrão cariotípico dos cinco genótipos analisados neste trabalho apresentou complemento haplóide de doze cromossomos. Dentre eles, onze eram metacêntricos muito semelhantes quanto ao comprimento total e um submetacêntrico, podendo ser facilmente distinguido dos demais por ser também o menor deles (Figura 1). Embora o complemento cromossômico dos genótipos estudados tenha sido muito semelhante, foi possível diferenciá-los pela presença de constrições secundárias que se apresentaram bastante consistentes, como mostram os resultados a seguir.

4.1 Análise cariotípica

4.1.1 *Pinus oocarpa*

O cariótipo de *Pinus oocarpa* apresentou comprimento total do lote haplóide (CTLH) de 162,05 μm , com os cromossomos variando em comprimento relativo de 9,92 μm a 5,97 μm (Tabela 1). Verificou-se uma diferença de tamanho de 3,95 μm entre os cromossomos I e XII, sendo que o braço curto foi o que mais contribuiu para essa diferença (2,49 μm).

As maiores diferenças de comprimento entre cromossomos adjacentes ocorreram entre I e II (0,62 μm), X e XI (0,51 μm) e XI e XII (1,33 μm). O cromossomo XII é o único submetacêntrico apresentando relação de braços de 0,64. Os cromossomos que apresentaram a maior relação de braços foram I, II, VI e VIII sendo, portanto, os que apresentam centrômero mais medianos.

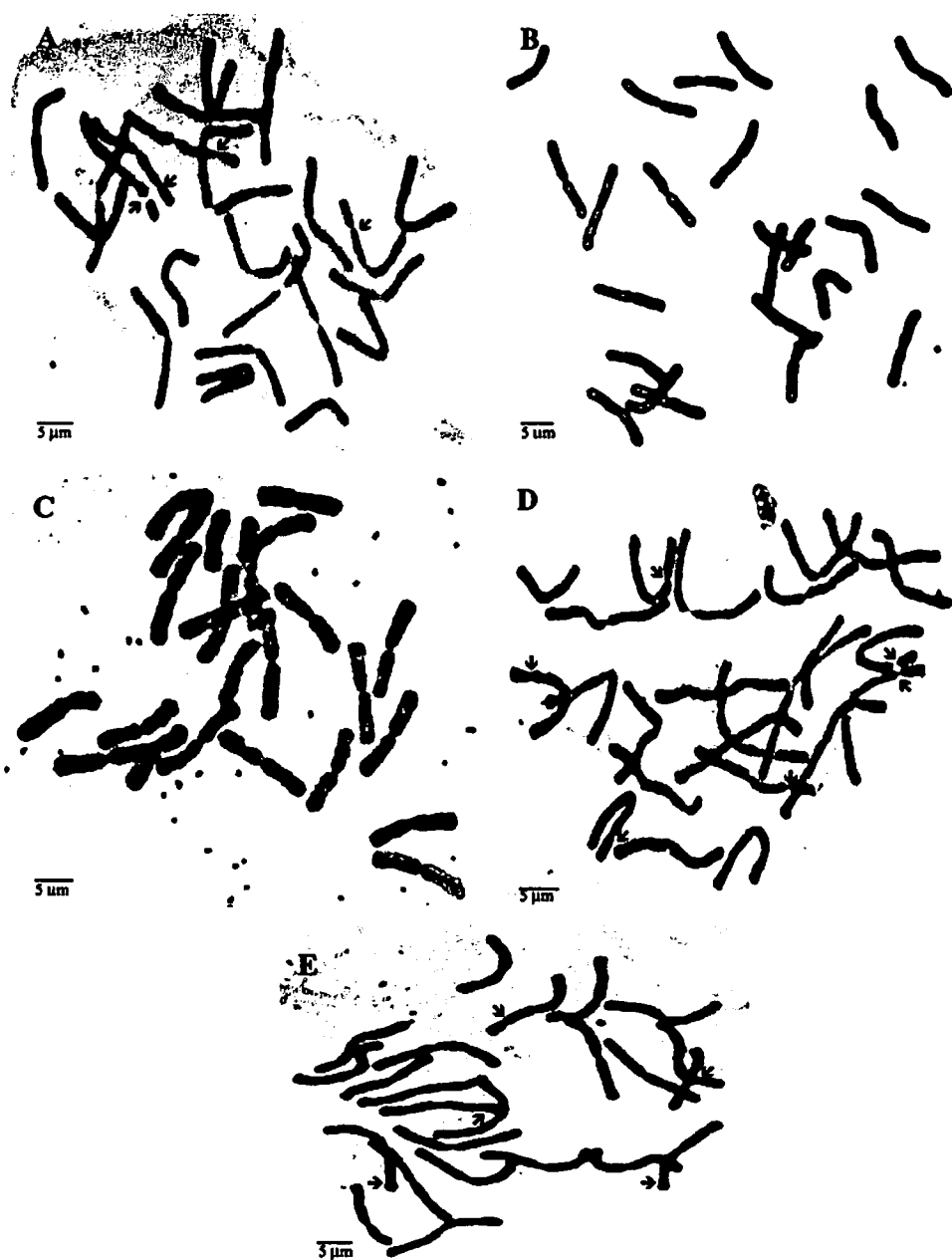



FIGURA 1 Metáfases mitóticas coradas com Giemsa. A- *Pinus oocarpa*; B- *Pinus patula*; C- *Pinus tecunumanii* procedência Las Camelias D- *Pinus tecunumanii* procedência Jócon Yoro; E- *Pinus tecunumanii* procedência San Rafael del Norte. As setas indicam as constrições secundárias.

TABELA 1. Valores médios, em micrômetros, das variáveis cromossômicas de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e das procedências do *Pinus tecunumanii*. (C = cromossomo; BL = braço longo; BC = braço curto; Cti = comprimento total do cromossomo; RB = relação de braços; CR = comprimento relativo e MO = morfologia dos cromossomos quanto à posição do centrômero; sendo: M = metacêntrico e SM = submetacêntrico). Valores em negrito representam presença de constrição secundária. UFLA. Lavras, MG, 2001.

	<i>Pinus oocarpa</i>						<i>Pinus patula</i>						Las Camélias						Jócon Yoro						San Rafael del Norte					
C	BL	BC	Cti	CR	RB	MO	BL	BC	Cti	CR	RB	MO	BL	BC	Cti	CR	RB	MO	BL	BC	Cti	CR	RB	MO	BL	BC	Cti	CR	RB	MO
I	8,25	7,81	16,07	9,92	0,95	M	7,74	7,10	14,84	9,71	0,92	M	10,16	9,25	19,41	9,91	0,91	M	11,85	10,55	22,39	10,17	0,89	M	10,48	9,47	19,95	9,80	0,90	M
II	7,86	7,20	15,06	9,30	0,92	M	7,40	6,72	14,12	9,24	0,91	M	9,53	8,76	18,29	9,34	0,92	M	10,89	9,85	20,74	9,42	0,90	M	10,01	9,09	19,10	9,38	0,91	M
III	7,70	6,83	14,53	8,97	0,89	M	7,18	6,52	13,70	8,96	0,91	M	9,24	8,67	17,91	9,15	0,94	M	10,79	9,46	20,25	9,20	0,88	M	9,78	8,74	18,52	9,10	0,89	M
IV	7,48	6,75	14,23	8,78	0,90	M	7,06	6,38	13,45	8,80	0,90	M	9,31	8,28	17,59	8,98	0,89	M	10,28	9,30	19,58	8,89	0,90	M	9,64	8,62	18,26	8,97	0,89	M
V	7,43	6,62	14,05	8,67	0,89	M	6,92	6,32	13,24	8,67	0,91	M	9,00	8,02	17,01	8,69	0,89	M	10,13	9,00	19,13	8,69	0,89	M	9,26	8,47	17,73	8,71	0,92	M
VI	7,21	6,61	13,83	8,53	0,92	M	6,85	6,24	13,09	8,57	0,91	M	8,70	7,98	16,67	8,51	0,92	M	10,22	8,72	18,94	8,60	0,85	M	9,19	8,21	17,40	8,55	0,89	M
VII	7,20	6,40	13,60	8,39	0,89	M	6,87	6,07	12,94	8,47	0,88	M	8,59	7,85	16,44	8,39	0,91	M	9,76	8,71	18,47	8,39	0,89	M	8,99	8,09	17,07	8,39	0,90	M
VIII	6,99	6,42	13,41	8,28	0,92	M	6,62	6,12	12,73	8,33	0,92	M	8,40	7,68	16,08	8,21	0,91	M	9,26	8,49	17,75	8,06	0,92	M	8,77	7,85	16,62	8,17	0,90	M
IX	6,88	6,23	13,11	8,09	0,91	M	6,54	5,94	12,48	8,17	0,91	M	8,17	7,51	15,68	8,01	0,92	M	9,06	8,22	17,27	7,84	0,91	M	8,65	7,70	16,36	8,04	0,89	M
X	6,67	5,99	12,65	7,81	0,90	M	6,27	5,67	11,94	7,81	0,90	M	8,09	7,11	15,19	7,76	0,88	M	8,87	7,89	16,76	7,61	0,89	M	8,27	7,34	15,61	7,67	0,89	M
XI	6,23	5,60	11,82	7,30	0,90	M	5,95	5,23	11,19	7,32	0,88	M	7,60	6,70	14,30	7,30	0,88	M	8,31	7,44	15,76	7,16	0,90	M	7,73	6,66	14,38	7,07	0,86	M
XII	5,89	3,79	9,68	5,97	0,64	SM	5,48	3,61	9,09	5,95	0,66	SM	6,80	4,44	11,24	5,74	0,65	SM	7,72	5,32	13,03	5,92	0,69	SM	7,28	5,25	12,52	6,15	0,72	SM
CTLH	162,05						152,81						195,81						220,07						203,52					



Os cromossomos de *Pinus oocarpa* não apresentaram valores de relação de braços em ordem decrescente do primeiro ao último.

As constrições secundárias foram observadas no braço longo dos cromossomos II, III e VIII, medindo, respectivamente, 4,01 μm , 3,49 μm e 3,81 μm bem como no braço curto do cromossomo VII (3,91 μm), utilizando-se coloração com Giemsa (Figura 1A).

4.1.2 *Pinus patula*

A análise do complemento cromossômico de *Pinus patula* apresentou CTLH de 152,81 μm (Tabela 1). De acordo com os dados de comprimento relativo, a diferença entre o maior cromossomo e o menor foi de 3,76 μm , valor atribuído à diferença dos braços curtos (2,29 μm) que, no cromossomo I, apresentou o dobro do tamanho do cromossomo XII.

Os cromossomos I e II, X e XI, XI e XII apresentaram as maiores diferenças dentre os cromossomos adjacentes: 0,47 μm ; 0,49 μm e 1,37 μm , respectivamente. A diferença entre os cromossomos I e II foi devido tanto à BL quanto à BC (0,22 μm e 0,25 μm), que contribuíram com valores aproximadamente iguais. A diferença de tamanho entre os três cromossomos menores do complemento se deu, principalmente, devido ao BC, que entre X e XI, contribuiu com 0,28 μm e entre XI e XII com 1,07 μm .

As posições de centrômero mais próximas da região mediana foram encontradas nos cromossomos I e VIII. O cromossomo XII apresentou o centrômero mais afastado, com relação de braços (RB) igual a 0,66 (Tabela 1). A ordem decrescente dos valores de RB foi quebrada pelos cromossomos V, VIII e IX.

As constrições secundárias em *Pinus patula* foram observadas nos braços longo e curto do cromossomo I (4,06 μm e 3,55 μm), no braço longo dos cromossomos III, VI, IX e X (3,40 μm ; 3,02 μm ; 2,77 μm e 2,85 μm) e no braço curto do cromossomo VIII (2,52 μm).

A Figura 1B mostra uma metáfase mitótica de *Pinus patula* corada com Giemsa.

4.1.3 *Pinus tecunumanii*

4.1.3.1 Procedência Las Camelias

Os dados do complemento cromossômico dessa procedência estão apresentados na Tabela 1. O CTLH foi de 195,81 μm , com valores de comprimento relativo variando entre 9,91 μm e 5,74 μm . A diferença de tamanho entre os cromossomos I e XII foi de 4,17 μm , sendo esse valor decorrente da diferença entre os braços curtos desses cromossomos (2,45 μm).

Dentre os cromossomos adjacentes, os que apresentaram maior diferença de tamanho foram I e II (0,57 μm), X e XI (0,46 μm) e XI e XII (1,56 μm). A diferença entre I e II foi devido ao braço longo que contribuiu com 0,32 μm . BL e BC contribuíram com valores muito próximos (0,25 μm e 0,21 μm) para a diferença entre o décimo e o décimo primeiro par e BC foi o responsável pela grande diferença de comprimento (1,15 μm) entre os dois últimos pares.

De acordo com a relação de braços, os cromossomos com centrômeros mais medianos foram II, III, VI e IX. Dentre os metacêntricos, X e XI apresentaram centrômeros mais afastados do centro. Os cromossomos dessa procedência não mostraram uma ordem decrescente do valor de relação de braços.

A coloração convencional evidenciou a presença de constrições secundárias nos braços longos dos cromossomos I, II, V e IX (3,90 μm ; 3,96 μm ; 3,58 μm e 3,65 μm) e nos braços curtos dos cromossomos IV e VII (3,76 μm e 3,23 μm).

A Figura 1C mostra uma metáfase mitótica da procedência Las Camélias corada com Giemsa.

4.1.3.2 Procedência Jócon Yoro

A procedência apresentou CTLH de 220,07 μm . Os cromossomos I e XII mostraram uma variação em comprimento relativo de 10,17 μm a 5,92 μm (Tabela 1). A diferença de tamanho entre esses dois cromossomos (4,25 μm) deve-se principalmente à diferença dos seus braços curtos (2,38 μm).

A maior diferença entre os cromossomos adjacentes ocorreu em I e II (0,75 μm). O braço longo foi o maior contribuinte (0,43 μm) para essa diferença;. Para X e XI (0,45 μm), o braço longo contribuiu de maneira considerável (0,25 μm) e para os cromossomos XI e XII, que mostraram a maior diferença de tamanho (1,24 μm), o braço curto contribuiu mais efetivamente (0,97 μm).

Os cromossomos que apresentaram centrômero mais próximo da região mediana foram II, IV, VIII, IX e XI. Não houve decréscimo gradativo na posição do centrômero (Tabela 1).

A coloração com Giemsa permitiu a observação de constrições secundárias nos braços longos dos cromossomos I, II e V (4,52 μm ; 4,45 μm e 4,13 μm) e nos braços curtos dos cromossomos IV, VII e IX (3,70 μm ; 3,55 μm e 3,52 μm .) (Figura 1D).

4.1.3.3 Procedência San Rafael del Norte

O comprimento total do lote haplóide observado para essa procedência foi de 203,52 μm . Os dados de comprimento relativo mostram que a diferença de comprimento entre os cromossomos I e XII foi de 3,65 μm (Tabela 1). O braço curto contribuiu mais efetivamente para essa diferença (2,08 μm).

Como mencionado para as outras procedências em estudo, os cromossomos adjacentes I e II; X e XI; XI e XII, foram os que apresentaram maior diferença de comprimento (0,42 μm ; 0,60 μm e 0,92 μm). Para os dois primeiros cromossomos, a diferença se deu pelo braço longo (0,23 μm) e para os três últimos cromossomos o braço curto foi o que contribuiu mais acentuadamente (0,34 μm e 0,70 μm).

Os maiores valores de relação de braços foram observados para os cromossomos II e V, sendo estes os representantes de centrômeros mais medianos. Entre os metacêntricos, o cromossomo XI apresentou a menor relação de braços (0,86). Como observado para os outros táxons analisados, a decrescência dos valores de relação de braços foi quebrada.

Os resultados da coloração com Giemsa são coincidentes aos da procedência Las Camelias: os cromossomos I, II, V e IX mostraram constrições secundárias nos braços longos (3,76 μm ; 3,30 μm ; 3,32 μm e 3,16 μm) e os cromossomos IV e VII nos braços curtos (3,77 μm e 2,92 μm . Figura 1E).

4.2 Bandeamento DAPI

Apesar de terem sido utilizados vários protocolos, o fluorocromo DAPI permitiu a observação de bandas apenas nos cromossomos de *Pinus patula*. Estas apareceram somente na região centromérica de oito cromossomos do complemento (Figura 2).

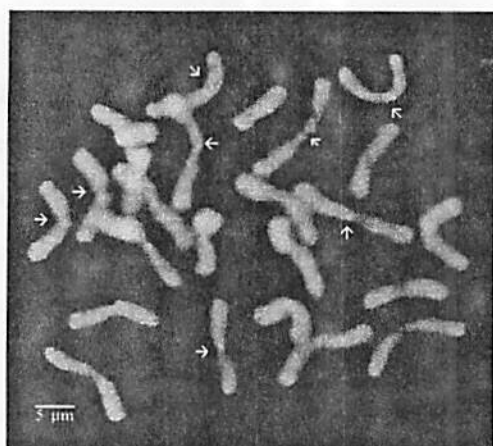


Figura 2 Metáfase submetida a técnica de bandeamento DAPI em *Pinus patula*. As setas indicam as bandas centroméricas

Em todos os genótipos, os cromossomos apresentaram grande afinidade pelo fluorocromo DAPI, corando-se homogeneamente, favorecendo a observação das constrições secundárias, que puderam ser evidenciadas na maioria das células analisadas (Figura 3).

Pinus oocarpa mostrou quatro constrições secundárias em seu complemento haplóide (Figura 3A), confirmando o resultado obtido pela coloração com Giemsa.

Em *Pinus patula*, o fluorocromo DAPI permitiu a observação de sete constrições secundárias no complemento haplóide (Figura 3B), sendo que em um dos seis cromossomos, estas se apresentaram em ambos os braços. A coloração com Giemsa permitiu evidenciar quatro constrições no complemento haplóide dessa espécie.

Nas procedências do *Pinus tecunumanii* também houve coincidência quanto à presença de constrições secundárias quando foram comparadas as duas metodologias (Figuras 3 C, D e E).

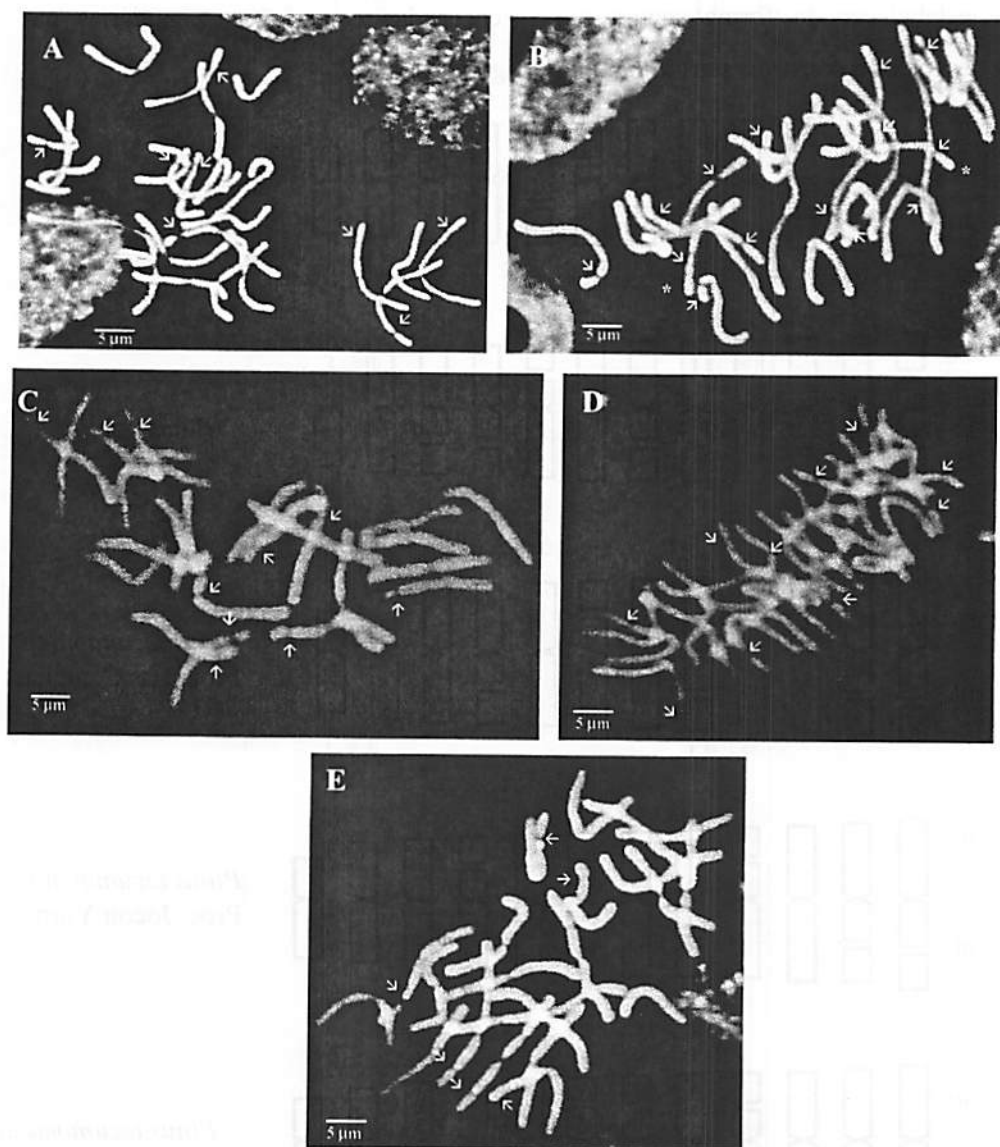


FIGURA 3 Metáfases mitóticas coradas com DAPI. A - *Pinus oocarpa*; B - *Pinus patula*; C - *Pinus tecunumanii* procedência Las Camelias; D - *Pinus tecunumanii* procedência Jócon Yoro; E - *Pinus tecunumanii* procedência San Rafael Del Norte. As setas indicam as constrições secundárias. * Cromossomos com constrições em ambos os braços.

Associando-se a coloração com Giemsa e com DAPI foi possível estabelecer de forma segura a ocorrência das constrições secundárias nas espécies e construir seus idiogramas (Figura 4).

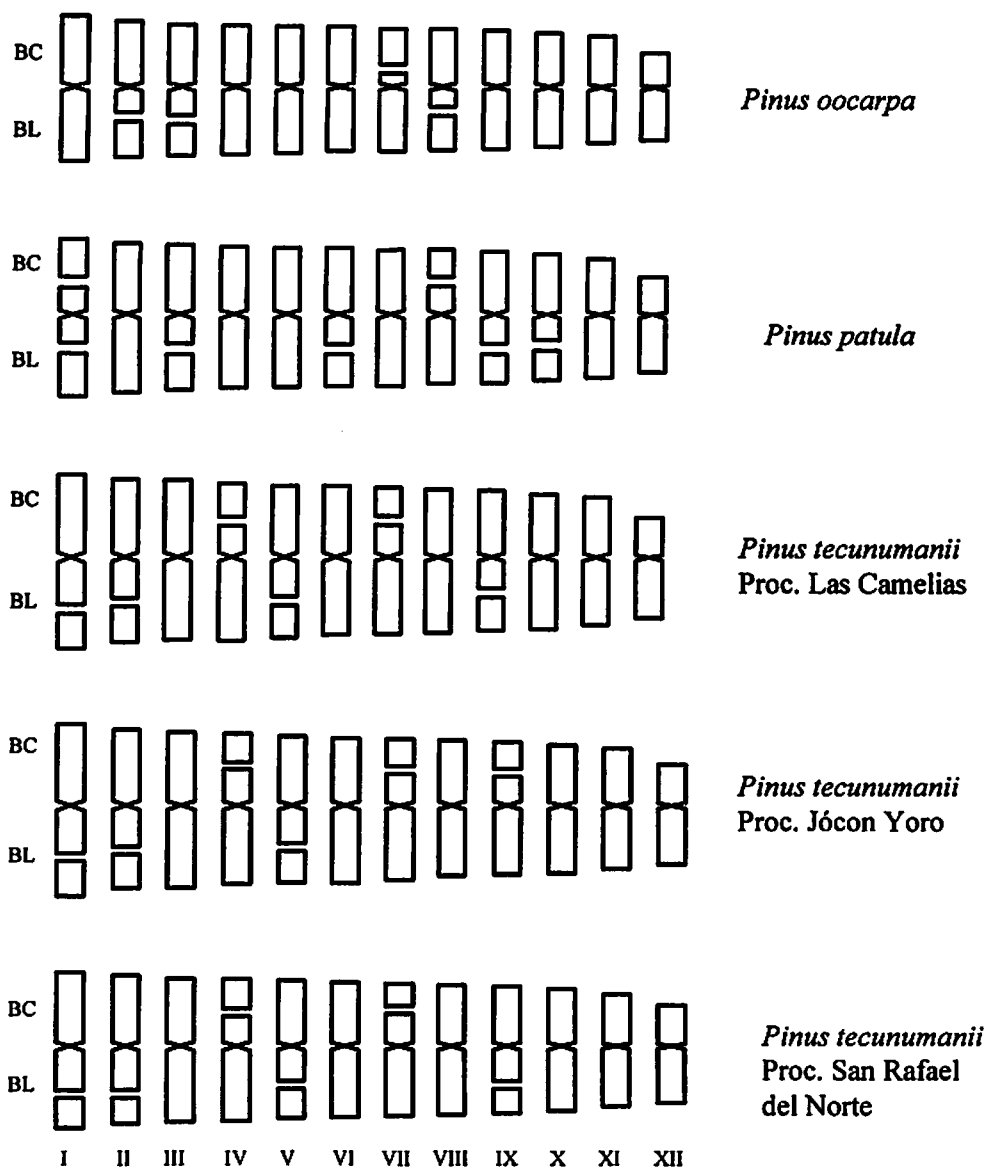


FIGURA 4 Idiogramas das espécies de *Pinus* analisadas. BC = braço curto; BL = braço longo. As falhas indicam a localização das constrições secundárias.

4.3 Bandeamento C

Diversas variações da técnica de bandeamento C foram aplicadas, tendo-se obtido bandas apenas na procedência Jócon Yoro do *Pinus tecunumanii*. A Figura 5 mostra bandas C teloméricas em todos os cromossomos do complemento dessa procedência.



Figura 5 Metáfase mitótica da procedência Jócon Yoro do *Pinus tecunumanii* submetida à técnica de bandeamento C.

4.4 Análise estatística do Comprimento Relativo (CR) e Comprimento Total do Lote Haplóide (CTLH) entre procedências

A aplicação do teste de F para a comparação da variância do comprimento relativo (CR) demonstrou a existência de diferenças significativas a 1% entre os cromossomos III, IV, VIII e IX das espécies estudadas (Tabela 2). Considerou-se, para efeito de comparação, *Pinus oocarpa* e *P. patula* representados por uma procedência e o *Pinus tecunumanii*, como descrito anteriormente, por três procedências.

Tabela 2. Análise de variância para o comprimento relativo (CR) entre *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*. UFLA, Lavras, MG, 2001.

FV	GL	QM	CV (%)
Procedência / Cromossomo 1	4	0,23	3,80
Erro	45	0,14	
Procedência / Cromossomo 2	4	0,04	2,65
Erro	45	0,60	
Procedência / Cromossomo 3	4	0,09**	1,69
Erro	45	0,02	
Procedência / Cromossomo 4	4	0,06**	1,25
Erro	45	0,01	
Procedência / Cromossomo 5	4	0,00	1,44
Erro	45	0,01	
Procedência / Cromossomo 6	4	0,00	1,75
Erro	45	0,02	
Procedência / Cromossomo 7	4	0,01	1,64
Erro	45	0,01	
Procedência / Cromossomo 8	4	0,09**	1,85
Erro	45	0,02	
Procedência / Cromossomo 9	4	0,13**	2,00
Erro	45	0,02	
Procedência / Cromossomo 10	4	0,06	2,15
Erro	45	0,02	
Procedência / Cromossomo 11	4	0,09	4,32
Erro	45	0,09	
Procedência / Cromossomo 12	4	0,20	4,65
Erro	45	0,07	

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

A Procedência Jócon Yoro do *Pinus tecunumanii* diferiu estatisticamente quanto ao comprimento relativo do cromossomo IX das demais procedências pelo teste de Scott-Knott, a 5% (Tabela 3).

Tabela 3. Comprimento relativo (CR) do cromossomo IX, expresso em micrômetros (μm), para *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*. Classificação baseada no teste de Scott-Knott para a fonte de variação procedência a 5% de significância. UFLA, Lavras, MG, 2001.

Procedências	Médias
<i>Pinus tecunumanii</i> (Jócon Yoro)	7,84 a
<i>Pinus tecunumanii</i> (Las Camelias)	8,01 b
<i>Pinus tecunumanii</i> (San Rafael del Norte)	8,04 b
<i>Pinus oocarpa</i>	8,09 b
<i>Pinus patula</i>	8,17 b

A análise de variância do comprimento total do lote haplóide (CTLH) demonstrou a existência de diferenças significativas a 1% entre as espécies (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância para o comprimento total do lote haplóide (CTLH) entre *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*. UFLA, Lavras, MG, 2001.

FV	GL	QM	CV (%)
Procedência	4	8234,09**	22,33
Erro	45	1746,18	

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Pinus oocarpa não diferiu estatisticamente de *Pinus patula* pelo teste de Scott-Knott a 5% (Tabela 5), mas ambos diferiram significativamente do *Pinus tecunumanii*.

Este teste separou as espécies em dois grupos. Um deles inclui *Pinus oocarpa* e *Pinus patula*, enquanto que no outro estão as três procedências do *Pinus tecunumanii* (Tabela 5), apresentando os valores mais altos de CTLH.

Tabela 5. Comprimento total do lote haplóide (CTLH), expresso em micrômetros (μm), para *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*. Classificação baseada no teste de Scott-Knott para a fonte de variação procedência, a 5% de significância. UFLA, Lavras, MG, 2001.

Procedências	Médias
<i>Pinus patula</i>	152,81 a
<i>Pinus oocarpa</i>	162,05 a
<i>Pinus tecunumanii</i> (Las Camelias)	195,81 b
<i>Pinus tecunumanii</i> (San Rafael del Norte)	203,52 b
<i>Pinus tecunumanii</i> (Jócon Yoro)	220,07 b

* médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Os cromossomos das espécies do gênero *Pinus* favorecem a observação devido ao tamanho, sendo possível observá-los com facilidade, mesmo em objetivas a seco. No entanto, a homogeneidade destes cromossomos é tal que dificilmente a distinção entre os mesmos pode ser feita. Somente os cromossomos I e XII e, em algumas espécies o cromossomo XI, podem ser diferenciados sem a utilização de medições e análises estatísticas (Sax & Sax, 1933; Saylor, 1961, 1964; Hizume et al., 1983, 1989; Davide & Araújo, 1993a).

Se, por um lado, o tamanho dos cromossomos facilita a sua visualização, pelo outro dificulta o espalhamento dos mesmos nas células, constituindo-se num dos maiores obstáculos para o desenvolvimento deste trabalho. Além disso, um fenômeno bastante comum em cromossomos de *Pinus* é o do cromossomo pegajoso “sticky phenomenon” (Borzan & Papes, 1978; Davide, 1990), que dificulta a separação dos mesmos. Também durante as medições há dificuldades, uma vez que alguns cromossomos se apresentam muito alongados e podem se dobrar, dificultando a sua análise. Os programas para se obter medições mais acuradas vêm se tornando uma estratégia para superar tais problemas (Davide & Araújo, 1993; Doudrick et al., 1995; Lubaretz, 1996) e constituiu uma ferramenta importante neste trabalho, facilitando a obtenção de dados confiáveis.

Apesar dessas dificuldades, as metodologias empregadas forneceram número suficiente de boas metáfases, tendo o número ($2n=24$) e a morfologia dos cromossomos característicos do gênero sido confirmados.

Saylor (1961) realizou a classificação morfológica e o pareamento dos cromossomos de *Pinus* para um grande número de espécies, principalmente para aquelas do subgênero *Pinus*, em que a relação de braços foi calculada pela razão braço curto/braço longo. Na determinação dos pares, o autor considerou o

comprimento do braço curto mais apropriado por ser menos susceptível ao esmagamento. Para obter resultados mais críticos, Saylor (1961) comparou as espécies pela indicação dos cromossomos com maior relação de braços, como também pela variação no comprimento do braço longo, de acordo com a sua posição na seqüência normal descendente. No presente trabalho, essa metodologia também foi utilizada para fins de comparação com os trabalhos de Saylor (1961, 1964, 1972) e Davide & Araújo (1993a).

Em todos os taxa estudados, destaca-se o cromossomo II entre aqueles que apresentam o centrômero mais mediano. Os cromossomos I e V também apresentaram essa característica em *Pinus oocarpa* e *Pinus patula* e na procedência San Rafael Del Norte do *Pinus tecunumanii*. É interessante notar que Saylor (1972) e Davide & Araújo (1993a) também obtiveram esse resultado para *Pinus oocarpa* e *Pinus patula*. As procedências Las Camelias e Jócon Yoro apresentaram, além do cromossomo II, o IX entre os mais medianos.

A alteração na ordem decrescente do comprimento do braço longo não ocorreu em *Pinus oocarpa* e na procedência San Rafael del Norte. Em *Pinus patula* e nas procedências Las Camelias e Jócon Yoro, os cromossomos VII, IV e VI, respectivamente, quebraram essa ordem. Saylor (1972) e Davide & Araújo (1993a), encontraram três ou quatro cromossomos quebrando essa ordem decrescente e, mesmo assim, não houve coincidência entre os pares, em ambos os trabalhos.

Uma outra característica citada por Saylor (1972) foi o comprimento do braço longo do cromossomo I. Nas espécies da subseção *Oocarpae*, o autor verificou que somente *P. greggii* não tem o cromossomo I com o maior braço longo. Neste trabalho, como no de Davide & Araújo (1993a), em que espécies dessa subseção foram analisadas, todos os taxa apresentaram essa característica.

Somente usando as características apresentadas acima, Saylor (1972) propõe dois diferentes padrões cariotípicos para os membros da subseção

Oocarpae: os da Califórnia (*P. radiata*, *P. muricata* e *P. attenuata*) formam um grupo e os restantes, originários da América Latina (*P. greggii*, *P. patula*, *P. oocarpa* e *P. pringlei*) formam outro grupo, menos unificado. Neste trabalho essa desuniformidade também foi observada, mas permitiu, considerando o comprimento total do lote haplóide, a posição do centrômero e a variação na ordem decrescente do braço longo, agrupar *Pinus oocarpa* e *Pinus patula*.

Em vários trabalhos anteriores, onde utilizou-se a coloração convencional, as constrições secundárias não apresentaram-se como um dado consistente (Saylor, 1961; 1964; 1972; Natarajan et al., 1961; Pederick, 1967; Davide & Araújo, 1993a). Neste trabalho, associou-se o uso de técnicas de coloração Giemsa e de bandeamento justamente com o objetivo de localizá-las com maior precisão e usá-las como um dado citotaxonômico e para a distinção de cromossomos individuais.

Foram utilizados diferentes protocolos para bandeamento fluorescente (DAPI) e bandeamento C. No entanto, somente o DAPI contribuiu de forma efetiva nos resultados. Esse fluorocromo, em função de sua alta especificidade pelo DNA, corou homogeneamente todos os cromossomos nas metáfases, favorecendo a definição das constrições secundárias. Elas apareceram de forma consistente em todas as metáfases analisadas e permitiram diferenciar o *Pinus oocarpa* do *Pinus patula* e estes das três procedências do *Pinus tecunumanii*. A única diferença foi quanto à posição da constrição secundária do cromossomo IX (em Jócon Yoro foi localizada no braço curto e nas duas outras procedências, no braço longo).

Essa variação na posição da constrição secundária parece estar correlacionada com a distribuição geográfica destas procedências. Las Camelias e San Rafael del Norte encontram-se em locais considerados de elevada altitude (950 a 1.330 m) e Jócon Yoro em locais de baixa altitude (775 a 1.000m).

Grattapaglia, et al. (1992) também encontraram diferenças entre procedências de baixa e elevada altitude do *Pinus tecunumanii* utilizando marcadores de RAPD.

Em função de fatores ambientais, modificações estruturais podem ter ocorrido, justificando a variação na posição dessa constrição secundária. Em termos de comprimento relativo, o cromossomo IX de Jócon Yoro é significativamente menor que o mesmo par nas procedências San Rafael del Norte e Las Camelias (Tabela 3), indicando a ocorrência de deleções. Isto não impede que outras alterações estruturais, como inversões e translocações, também tenham ocorrido.

A análise estatística realizada para comparação dos CTLHs das três espécies mostrou diferenças significativas entre elas (Tabela 4). A Tabela 5 mostra que, por meio do teste de Scott-Knott, as procedências do *Pinus tecunumanii* foram classificadas dentro de um mesmo grupo e as espécies *Pinus oocarpa* e *Pinus patula* em outro grupo. Esse procedimento concorda com Davide & Araújo (1993a) que também não encontraram diferenças significativas entre o CTLH de *Pinus oocarpa* e *Pinus patula*. Estes resultados mostram também que os genomas de *Pinus oocarpa* e *Pinus patula* são menores que os de *Pinus tecunumanii*. O fato de não ter ocorrido diferença significativa entre o tamanho dos genomas das procedências do *Pinus tecunumanii* não invalida a possibilidade de ter ocorrido deleção no cromossomo IX da procedência Jócon Yoro, uma vez que a perda da cromatina de somente um dos cromossomos estaria diluída no complemento como um todo.

Bandas DAPI foram obtidas apenas em *Pinus patula*. Estas foram localizadas nas regiões centroméricas de oito cromossomos, mas não apresentaram repetibilidade suficiente para permitir a construção de um padrão. Bandas DAPI centroméricas e intersticiais já foram observadas em outras espécies de *Pinus* (Hizume et al., 1989).

Bandas C foram obtidas somente para o *Pinus tecunumanii* (procedência Jócon Yoro), sendo observadas nas regiões teloméricas de todos os cromossomos. Usando essa metodologia, Hizume & Tanaka (1980) obtiveram bandas centroméricas e intersticiais para outras espécies desse gênero.

Apesar dessas dificuldades, é possível concordar com Saylor (1961, 1964, 1972). Esse autor afirma que as espécies de *Pinus* têm cariótipos similares, mas não idênticos e que o grau de diferenciação cromossômica que se consegue detalhar está correlacionado com aspectos evolutivos e são de importância para taxonomistas e melhoristas.

No caso específico deste trabalho, as informações cariotípicas como posição do centrômero, variação na ordem decrescente do comprimento dos braços longos, constrições secundárias e o CTLH, forneceram informações suficientes para separar os três taxa estudados. As procedências do *Pinus tecunumanii* constituíram um grupo à parte, fornecendo subsídios para concordar com o trabalho de Frankis et al., (1999), que confere a esse táxon a categoria específica.

6 CONCLUSÕES

Dados cariotípicos, como posição do centrômero, variação na ordem decrescente do comprimento dos braços longos, constrições secundárias, comprimento relativo e comprimento total do lote haplóide, permitiram distinguir as espécies *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*. Essa última, ora considerada como espécie, ora como subespécie, teve a categoria específica confirmada do ponto de vista citogenético.

A utilização do fluorocromo DAPI, por seu caráter específico pela molécula de DNA, tornou mais evidentes as constrições secundárias nos cromossomos homogeneamente corados das três espécies estudadas.

Além das mutações gênicas, alterações estruturais, como adições, deleções, inversões e translocações, contribuíram para a diferenciação intra e interespecífica no gênero *Pinus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORZAN, Z.; PAPES, D. Karyotype analysis in *Pinus*: a contribution to the standardization of the karyotype analysis and review of some applied techniques. *Silvae Genetica*, Frankfurt, v. 27, p.144-150, 1978.
- BICUDO, H. E. M. C. Organizadores de nucléolos em insetos *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 440-448, 1985.
- DAVIDE, L. C. **Características cromossômicas, da madeira e das acículas como uma contribuição para a definição taxonômica do *Pinus* de Tecun Umán.** Curitiba: UFPR, 1990, 111p. (Tese Doutorado em Ciências Florestais).
- DAVIDE, L. C.; ARAÚJO, A. J. DE. Características cromossômicas para a identificação de fenótipos diferentes em povoamentos de *Pinus oocarpa* Schiede. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 17: n. 3, p.327-338, 1993a.
- DAVIDE, L. C.; ARAÚJO, A. J. DE. Características da madeira e das acículas como uma contribuição para a definição taxonômica do *Pinus* de Tecun Umán. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 17, n. 3 p. 358-368, 1993b.
- DOUDRICK, R. L.; HESLOP - HARRISON, J. S.; NELSON, C. D; SCNHIDT, T.; NANCE, W. L.; SCHARZACHER, T. Karyotype of Slash Pine (*Pinus elliottii* var. *elliottii*) using patterns of fluorescence in situ hybridization and fluorochrome banding. *The Journal of Heredity*, Baltimore, v. 86, p. 289-296, 1995.
- EGUILUZ-PIEDRA, T.; PERRY, J. P. JR. *Pinus tecunumanii*: uma espécie nueva de Guatemala. *Ciencia Florestal*, Guatemala, v. 8, n. 41, p. 3-22, 1983.
- FRANKIS, M; PERRY, J. P.; RUSHFORTH, K.; VIDAKOVIC, M. **Classification of the genus *Pinus*.** 1999. Disponível em: <<http://www.lovet-pinetun.org>>. Acesso em: 13 nov. 2001.
- GRATTAPAGLIA, D.; O'MALLEY, DVORAK, W. Phylogenetica analysis of Central American and Mexican pines using RAPD markers on bulked DNA samples. **Proceedings of IUFRO International Conference "Breeding tropical trees"** Section 2.02 - 08 Cali, Colombia, p. 132 - 147, 1992.

GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1989, 142p.

HIZUME, M.; OHGIKU, A.; TANAKA, A. Chromosome banding in the genus *Pinus*. I. Identification of chromosome in *P. nigra* by fluorescent banding method. **Botanical Magazine of Tokyo** . Tokyo, v. 96, p. 273 - 276, 1983.

HIZUME, M.; OHGIKU, A.; TANAKA, A. Chromosome banding in the genus *Pinus*. II. Interspecific variation of fluorescent banding patterns in *P. densiflora* e *P. thunbergii*. **Botanical Magazine of Tokyo** . Tokyo, v. 102, p. 25 - 36, 1989.

HIZUME, M. ARAI, M.; TANAKA, A. Chromosome banding in the genus *Pinus*. III. Fluorescent banding pattern of *P. luchuensis* and its relationships among the Japanese Diploxylon pines. **Botanical Magazine of Tokyo** . Tokyo, v. 103, p. 103 - 111, 1990.

JEFFREY, C. Código internacional de nomenclatura botânica. In: _____ **Nomenclatura biológica**. Madrid: Herman Blume, 1976. p. 105 - 216.

KAGEYAMA, P. Y.; VENCovsky, R.; FERREIRA, M.; NICOLIELO, N. Variação genética entre procedências de *Pinus oocarpa* Schiede na região de Agudos, SP. **IPEF**, Piracicaba, v. 14, p. 77 - 120, 1977.

LEÃO, F. F.; DAVIDE, L. C. Posição taxonômica do *Pinus* de Tecun Umán: análise das características de acículas. **IPEF**, Piracicaba, v. 46, p. 96-106, 1993.

LITTLE, J. R.; CRITCHFIELD, W. B. **Subdivision of the genus *Pinus* (pines)** . Washington, USDA. Forest Service, 1969, 51p. (Miscellaneous Publication, n. 1144).

LUBARETZ, O.; FUCHS, J.; AHNE, R.; MEISTER, A. Karyotyping of three Pinaceae species via fluorescent in situ hybridization and computer-aided chromosome analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 411-416, 1995.

MACPHERSON, P.; FILION, W. G. Karyotype analysis and the distribution of constitutive heterochromatin in five species of *Pinus*. **The Journal of Heredity** Washington, v. 72, p. 193-198, 1981.

MARTINEZ, M. **Los pinos mexicanos** . 2 ed. México: Ediciones Botas, 1948, 361p.

MATOS, J. L. M.; DEZGENISKI, E. V. **Caracterização tecnológica de madeiras de *Pinus* tropicais para fins de processamento e uso.** UFRP. Disponível em:<<http://www.ufrp.br/200.17.237.141/online/arquivo134.htm>>. Acesso em 13 nov. 2001.

NATARAJAN, A. T.; OHBA, K.; SIMAK, M. Karyotypes analysis in *Pinus sylvestris*. **Hereditas** , Lund - Sweden, v. 47, p. 379 - 382, 1961.

PEDERICK, L. A. The structure and identification of the chromosomes of *Pinus radiata* D. Don. **Silvae Genética**, Frankfurt, v. 16, n. 2, p. 69 - 77, 1967.

Pinus patula Schl. Et Cham. Disponível em :<<http://www.agrosofot.com.co>>. Acesso em 20 jul. 2001.

SAX, K. SAX, H. J. Chromosome number and morphology in the conifers **Journal of the Arnold Arboretum** , Cambridge, v. 14, p. 357 - 375, 1933.

SAYLOR, L. C. Karyotype analysis of selected species of *Pinus*. **Silvae Genetica** , Frankfurt, v. 10, p. 77 - 84, 1961.

SAYLOR, L. C. Karyotype analysis of *Pinus* - group Lariciones. **Silvae Genetica** , Frankfurt, v. 13, p. 165 - 170, 1964.

SAYLOR, L. C. Karyotype analysis of *Pinus* - subgenus *Pinus*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 21, p.155-163, 1972.

SCHULZ-SCHAEFFER, J. **Cytogenetics, plants, animals, humans.** Springer-Verlag. New York, 1980, 446p.

SCOOT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Releigh, v. 30, p. 507-512, 1974.

SILVA, R. **Bandeamento fluorescente e marcador de RAPD em espécies próximas ao *Pinus* de Tecun Umán .** 1996. 55p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras,Lavras.

SILVA-MANN, R.; DAVIDE, L. C.; SANTOS, J. B. dos. Diversidade genética em coníferas uma aproximação usando acículas. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 23, n. 1, p. 214-221, 1999.

SILVA-MANN, R.; DAVIDE, L. C.; REIS, M. A. Fluorescent banding in tropical conifer chromosomes. 2001. (No prelo)

STYLES, B. T. The identify of Schwerdtferger's Central American pine. **Forest Genetic Resources Information** , Rome, n. 13, p. 47 - 51, 1985.

SUASSUNA, J. A cultura do *Pinus*: uma perspectiva e uma preocupação. Disponível em:<<http://www.fundaj.gov.br>>. Acesso em: 11 nov. 2001.

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

SWANSON, C. P. **Cytology and cytogenetics** . MacMillan: London, 1960, 596p.

TANAKA, R.; HIZUME, M. C Banding treatment for the chromosomes of some gymnosperms **Botanycal Magazine of Tokyo**. Tokyo, v. 93, p. 167-170, 1980.

YONENAGA-YASSUDA, Y. Variabilidade das regiões organizadoras de nucléolos nos roedores. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 453 - 456, 1985.

ZECA FILHO, A.; TARGA, L. A. Tratamento preservativo de madeira (*Pinus oocarpa*) para uso como postes de linhas de eletrificação. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 13, n. 4, p. 55-66, 1998. Disponível em :<<http://www.fca.unesp.br>>. Acesso em 26 out. 2001.

Zoneamento ecológico. Disponível em:
<<http://www.agridata.mg.gov.br/mapgeo/html>>. Acesso em: 13 nov. 2001.