

**BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO E
CONTEÚDO DE DNA EM ESPÉCIES
TROPICAIS DE *Pinus***

JULIANE DORNELLAS NUNES

2008

JULIANE DORNELLAS NUNES

**BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO E CONTEÚDO DE DNA EM
ESPÉCIES TROPICAIS DE *Pinus***

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

Orientadora

Profª. Dra. Giovana Augusta Torres

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

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

Nunes, Juliane Dornellas.

Bandeamento cromossômico e conteúdo de DNA em espécies tropicais de *Pinus* / Juliane Dornellas Nunes. – Lavras : UFLA, 2008.
53 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.
Orientadora: Giovana Augusta Torres.
Bibliografia.

1. *Pinus*. 2. Bandeamento cromossômico. 3. Conteúdo de DNA nuclear. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.9751

JULIANE DORNELLAS NUNES

**BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO E CONTEÚDO DE DNA EM
ESPÉCIES TROPICAIS DE *Pinus***

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

APROVADA em 31 de julho de 2008

Profª. Dra. Lisete Chamma Davide	UFLA
Prof. Dr. Juscélio Clemente de Abreu	UNINCOR
Prof. Dr. Sandro Barbosa	UNIFAL
Dra. Roselaine Cristina Pereira	UFLA

Profª. Dra. Giovana Augusta Torres
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus queridos pais, Elio Corrêa Nunes e Francisca Dornellas
Corrêa Nunes, que me ensinaram valores imprescindíveis para essa
conquista,

DEDICO.

A Deus, que ilumina meus caminhos ...

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A minha família, meus pais e irmãos, Jaqueline e Alexandro, por todo apoio, incentivo e amor.

Aos meus sobrinhos queridos, Rodrigo, Ricardo e Caio, pela alegria que trazem a minha vida.

Ao Ivens, por seu amor, apoio e compreensão, que foram fundamentais nessa difícil etapa final.

À Profa. Lisete Chamma Davide, pelos valiosos ensinamentos e oportunidades e por me dar as chaves do meu segundo lar em Lavras, o Laboratório de Citogenética, onde me apaixonei pelo mundo dos cromossomos e tanto pude aprender, crescer e conquistar.

À Profa. Giovana Augusta Torres, por todos os ensinamentos, oportunidades, orientação e auxílio.

A todos os professores da UFLA, em especial aos do Departamento de Biologia por todos ensinamentos e oportunidades.

Ao amigo Prof. Sandro Barbosa, pelos conselhos, ensinamentos e pelas importantes contribuições neste trabalho.

Ao amigo Prof. Juscélio Clemente de Abreu, meu primeiro co-orientador de iniciação científica, por seus valiosos ensinamentos e contribuições para este trabalho.

À amiga Roselaine Cristina Pereira, por todas as colaborações ao longo de tantos anos de convívio e especialmente neste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do mestrado e do doutorado e pelo ensino de qualidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Lyderson Facio Viccini, pela colaboração na captura de imagens no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora.

As empresas Aracruz e Melhoramentos S/A, pelo fornecimento das sementes utilizadas neste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética que ao longo desses 11 anos, tanto me ensinaram e pelos ótimos momentos compartilhados.

Ao querido amigo José Marcello, companheiro de mestrado e doutorado, por toda a sua ajuda ao longo desses anos e, em especial neste trabalho, pelas discussões científicas, conselhos e, acima de tudo, pela amizade.

Aos amigos Patrícia e Saulo, pelas contribuições para este trabalho, pelos conhecimentos compartilhados, pelas discussões científicas e felizes momentos vividos no laboratório.

A todos os amigos que ganhei em Lavras, por tantos momentos bons e felizes.

À grande amiga Alessandra, companheira para todos os momentos, juntamente com suas lindas filhas, Julia e Isadora, por tantas alegrias compartilhadas.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela convivência sempre amigável e colaborativa.

Aos funcionários da Universidade Federal de Lavras, laboratoristas, secretárias, assistentes administrativos da biblioteca e demais setores, auxiliares gerais, enfim, todos que, sempre disponíveis e atenciosos, foram imprescindíveis para a realização de todas as etapas deste trabalho.

A todos os meus familiares, em especial a querida Tia Belinha e minha prima Lane, sempre presentes me incentivando e torcendo por esta conquista.

À avó lavrense que ganhei, D. Ilda Borges (*in memoriam*), que me adotou como neta e tanto me ajudou para que fosse possível a conclusão deste trabalho.

Não seria possível citar todas as pessoas que conheci e que me ajudaram, em Lavras, durante todos esses maravilhosos anos da graduação, mestrado e doutorado. Portanto, a todos que, de uma forma ou de outra, participaram e contribuíram para a finalização desta etapa fundamental da minha vida, meus mais verdadeiros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Aspectos biológicos e econômicos do gênero <i>Pinus</i>	3
2.2 Os <i>Pinus</i> tropicais	8
2.3 Citogenética do gênero <i>Pinus</i>	12
2.4 Bandeamentos cromossômicos e localização de seqüências em <i>Pinus</i>	14
2.5 Conteúdo de DNA em <i>Pinus</i>	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Material genético.....	26
3.2 Bandeamentos cromossômicos	26
3.2.1 Preparo de lâminas.....	26
3.2.2 Coloração com fluorocromos DAPI e CMA ₃	27
3.2.3 Bandejamento com nitrato de prata	28
3.3 Obtenção de Imagens	28
3.4 Citometria de fluxo.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

RESUMO

NUNES, Juliane Dornellas. **Bandeamento cromossômico e conteúdo de DNA de espécies tropicais de *Pinus***. 2008. 53 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

Diversas espécies do gênero *Pinus*, inclusive algumas de origem tropical, vêm sendo amplamente utilizadas na produção de matérias-primas, como madeira e celulose. A espécie *Pinus tecunumanii* Eguiluz & J. P. Perry é motivo de uma controvérsia taxonômica há mais de 50 anos. Alguns trabalhos consideraram o *Pinus tecunumanii* uma subespécie de *Pinus patula*, enquanto outros, uma espécie distinta e mais próxima de *Pinus oocarpa*. Entretanto, os resultados obtidos apontam para a necessidade de mais informações, para um melhor entendimento da posição taxonômica do *Pinus tecunumanii*. No presente trabalho, foram avaliadas as espécies tropicais *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl., *Pinus patula* Schltdl. & Cham e *Pinus tecunumanii* Eguiluz & J. P. Perry, com $2n=24$ cromossomos, por meio de técnicas de bandeamento cromossômico fluorescente e AgNOR, a fim de identificar a existência de polimorfismos cromossômicos e variações na quantidade de DNA nuclear, por meio da citometria de fluxo, que possam contribuir para a diferenciação dos três taxa. *Pinus oocarpa* e *Pinus tecunumanii* apresentaram 12 bandas CMA_3^+ intersticiais e coincidentes com as constrições secundárias. *Pinus patula* apresentou 12 bandas intersticiais, também coincidentes com as constrições secundárias, além de 4 bandas centroméricas. O padrão de bandas CMA_3 evidenciou que as constrições secundárias são regiões ricas em bases GC e que o *Pinus tecunumanii* é mais próximo de *Pinus oocarpa* que de *Pinus patula*, no que diz respeito a essa característica. O bandeamento com fluorocromo DAPI não produziu bandas consistentes que permitissem a construção de um padrão. O bandeamento AgNOR não foi estabelecido nas metáfases. Foram observados somente os nucléolos corados em núcleos interfásicos. Estes variaram de 4 a 10 nas três espécies e evidenciaram uma possível inativação e ou fusão de nucléolos. *Pinus patula* apresentou o maior conteúdo de DNA entre as três espécies com 43,36 pg. Houve variação intra-específica no conteúdo de DNA de quatro procedências do *Pinus tecunumanii* e esta não apresentou correlação com a origem latitudinal das procedências. A variação no conteúdo de DNA não possibilitou a distinção entre os três taxa.

* Comitê Orientador: Giovana Augusta Torres - UFLA (Orientadora); Lisete Chamma Davide (Co-orientadora).

ABSTRACT

Nunes, Juliane Dornellas. **Fluorescent chromosome banding and DNA content in tropical species of *Pinus***. 2008. 53 p. Thesis (Doctor's Degree in Plant Genetics and Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Several species of the genus *Pinus*, including some of tropical origin have been widely used in the production of raw materials such as wood and cellulose. Since fifty years ago, *Pinus tecunumanii* Eguiluz & J. P. Perry species is the center of a taxonomic controversy. Some works considered *Pinus tecunumanii* as a *Pinus patula* subspecies, while others considered it as a distinct species closer to *Pinus oocarpa*. Nevertheless, the results obtained points out the lack of information to a better understanding of the taxonomic status of *Pinus tecunumanii*. In the present work the tropical species *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl., *Pinus patula* Schltdl. & Cham and *Pinus tecunumanii* Eguiluz & J. P. Perry, with $2n=24$ chromosomes, were evaluated through fluorescent banding and AgNor techniques to identify the existence of chromosomal polymorphisms and variations in the amount of nuclear DNA, by flow cytometry, which can contribute to the differentiation of the three taxa. *Pinus oocarpa* and *Pinus tecunumanii* displayed 12 interstitial bands CMA_3^+ coincident with the secondary constrictions. *Pinus patula* showed 12 interstitial bands, also coincident with the secondary constrictions beyond 4 centromeric bands. The pattern of bands CMA_3 showed that the secondary constriction regions are rich in GC bases and the *Pinus tecunumanii* is closer to *Pinus oocarpa* than to *Pinus patula*, with regard to this characteristic. The banding with DAPI fluorochrome didn't produce consistent bands to allow the pattern establishment. The AgNOR banding was not established in the metaphases. Only nucleoli in interphase nuclei were clearly observed. Their number ranged from 4 to 10 in the three species and showed a possible inactivation and/or fusion of some of them. *Pinus patula* displayed the highest content of DNA among the three species with 43.36 pg. There was intraspecific variation in the DNA content of four provenances of *Pinus tecunumanii* and this does not correlate with latitudinal origin of provenances. The variation in DNA content not allowed the distinction between the three taxa.

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

INTRODUÇÃO

A introdução de espécies do gênero *Pinus* ocorreu no Brasil há mais de um século. É notável o espaço conquistado pelo *Pinus* na silvicultura brasileira; são cerca de 1,8 milhão de hectares de florestas plantadas no país (Kronka et al., 2005).

Atualmente, quando há tanta preocupação com o desenvolvimento sustentável e a redução dos impactos ambientais, a atividade silvicultural baseada nessas espécies ganha enorme destaque, uma vez que a obtenção de produtos oriundos de árvores de áreas de reflorestamento auxilia na redução do desmatamento de ecossistemas, como a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado, para a utilização de espécies nativas.

Diversas espécies do gênero *Pinus*, inclusive algumas de origem tropical, como *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl., *Pinus patula* Schltdl. & Cham e *Pinus tecunumanii* Eguluz & J. P. Perry, vêm sendo amplamente utilizadas na produção de matérias-primas para as indústrias de papel e celulose, painéis e compensados de madeira, móveis e na indústria química.

Além da importância econômica das espécies tropicais de *Pinus*, controvérsias a respeito da posição taxonômica do *Pinus tecunumanii* Eguluz & J. P. Perry existiram desde a sua descoberta, no final da década de 1940, pelo alemão Fritz Schwerdtferger (Schwerdtferger, 1953). Essa espécie, também conhecida como *Pinus* de Tecun Umán, já foi considerada uma subespécie do *Pinus patula* (Styles, 1985; Davide & Araújo, 1993a; Leão & Davide, 1993) ou uma espécie muito próxima de *Pinus oocarpa* (Piedra & Perry, 1983; Furman et al., 1997; Silva-Mann et al., 1999). Nesses trabalhos foram avaliadas características morfológicas e anatômicas da madeira e acículas, análise de terpenos, características cromossômicas e marcadores moleculares RAPD.

Os estudos citogenéticos envolvendo *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii* têm demonstrado inconsistências com relação à posição e ao número de constrições secundárias, ao comprimento total do lote haplóide e de bandas cromossômicas (Davide & Araújo, 1993b; Ribeiro, 2001; Silva-Mann et al., 1999, 2002).

A utilização de características citogenéticas constitui um desafio, pois as espécies do gênero *Pinus* distinguem-se por apresentarem cariótipos muito semelhantes, com grandes cromossomos, que dificultam a obtenção de boas metáfases. O cariótipo das espécies analisadas consiste de dez ou onze pares de cromossomos metacêntricos longos e um ou dois pares de cromossomos submetacêntricos mais curtos. Os cromossomos metacêntricos são similares na forma e no tamanho e são dificilmente distintos por meio de análise de cariótipo convencional (Hizume et al., 1983). Diante da grande uniformidade dos cariótipos de *Pinus*, a utilização de técnicas de bandeamento cromossômico e hibridização *in situ* são essenciais na geração de informações mais detalhadas, possibilitando a identificação de variações cromossômicas e uma melhor delimitação do táxon em várias espécies.

A citometria de fluxo também tem se mostrado uma estratégia eficiente na identificação de variações intra e interespecíficas no gênero *Pinus*, o que possibilita um melhor entendimento dos mecanismos de plasticidade do DNA e auxilia no esclarecimento do processo evolutivo das espécies.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de identificar polimorfismos no padrão de bandas CMA₃, DAPI e AgNOR e, ainda, variações na quantidade de DNA nuclear das espécies tropicais *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*, que possam contribuir para a diferenciação dessas espécies.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos biológicos e econômicos do gênero *Pinus*

Geógrafos e paleobotânicos acreditam que, durante as eras Mesozóica e Cenozóica, até metade do Pleistoceno, a América do Norte estava conectada ao norte da Ásia e também ao norte da Europa. Essas conexões permitiram o fluxo gênico de espécies da família Pinaceae presentes nessas áreas. Durante o período Cretáceo, os popularmente conhecidos pinheiros eram amplamente distribuídos nas regiões que hoje correspondem ao Canadá e os Estados Unidos. Esses pinheiros foram, então, se diferenciando nas espécies que hoje estão distribuídas nos três subgêneros de *Pinus* (Perry, 1991).

No início do período Terciário, os mares que cobriam a parte oeste-central dos Estados Unidos e do Canadá e a maior parte do México e da Guatemala baixaram, o que permitiu o início da dispersão de espécies de *Pinus* do sul dos EUA em direção ao México e à América Central. A cadeia de montanhas Sierra Madre, que é uma continuação das cadeias de montanhas ocidentais do Alaska, Canadá e Estados Unidos, que se estende para o sul, é tida, por um grande número de botânicos e taxonomistas, como a principal rota de migração dos *Pinus* ocidentais para a América Central (Perry, 1991).

Pinaceae é a maior e economicamente mais importante família entre as gimnospermas, com cerca de 10-11 gêneros. O gênero *Pinus* possui o maior número de espécies, com cerca de 100 espécies, com ampla distribuição (Kozubov & Muratova, 1986). A classificação mais recente do gênero *Pinus* foi feita por Frankis et al. (1999), com base nas características dos cones, sementes e acículas. A classificação segue o método utilizado por Little & Critchfield (1969), com contribuições de Perry (1991) e Richardson (1998).

De acordo com o atual sistema, o gênero *Pinus* divide-se em três subgêneros: *Strobus*, *Ducampopinus* e *Pinus*. O subgênero *Pinus* é dividido em três seções: *Pinus*, *Pinea* e *Trifoliae*. As espécies *Pinus oocarpa* Schiede ex Schldl., *Pinus patula* Schldl. & Cham. e *Pinus tecunumanii* Eguluz & J. P. Perry pertencem à seção *Trifoliae*, subseção *Oocarpae*, que compreende, além dessas, as espécies *Pinus radiata*, *P. attenuata*, *P. muricata*, *P. greggi*, *P. pringlei*, *P. jaliscana*, *P. teocote*, *P. herrerae*, *P. lawsonii* e *P. praetermissa*.

A principal característica das espécies pertencentes ao subgênero *Pinus* é a ocorrência de dois feixes vasculares nas folhas. A ocorrência de cones oblíquos e persistentes, que não abrem suas escamas a um só tempo (serotinos), é a característica marcante dos indivíduos da subseção *Oocarpae* (Frankis et al., 1999).

O gênero *Pinus* apresenta irregularidades em relação à hibridação. Há muitas espécies de *Pinus* que são morfologicamente similares e significativamente próximas, mas que se inter cruzam com dificuldade, enquanto outras, pertencentes a grupos distantes, se inter cruzam livremente e produzem híbridos férteis. As barreiras genéticas em *Pinus* são mais desenvolvidas que na maioria das espécies florestais. Uma causa para o isolamento reprodutivo em *Pinus* seriam mutações que afetam a compatibilidade entre espécies, mais do que alterações cromossômicas que influenciam no pareamento cromossômico e fertilidade de híbridos F1. A abundância de espécies de *Pinus* no México evidencia a importância da hibridação interespecífica no gênero e estabeleceu o México e a América Central como um centro secundário de evolução e especiação do gênero (Mirov, 1967).

No Brasil, o melhoramento genético de *Pinus* é realizado pelo setor privado e também pelo setor público. No programa de melhoramento genético da Embrapa Florestas estão incluídas espécies temperadas e tropicais, dentre as quais: *Pinus caribaea*, *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *Pinus elliottii*, *Pinus*

greggii, *Pinus hondurensis*, *Pinus kesiya*, *Pinus maximinoi*, *Pinus oocarpa*, *Pinus patula*, *Pinus taeda* e *Pinus tecunumanii* (Embrapa, 2008).

A obtenção de populações melhoradas que satisfaçam às exigências da produtividade florestal depende da capacidade de identificar genótipos desejados na população sob seleção. Uma estratégia de eficiência comprovada para seleção desses genótipos é a combinação dos testes de procedências e progênies (Sampaio et al., 2000). Shimizu & Pinto Júnior (1988) relataram que esses ensaios permitem ao melhorista a obtenção simultânea de informações sobre a variação geográfica e diferenças genéticas entre árvores de cada procedência.

Higa (2002), em um recente levantamento, relatou que a capacidade instalada de produção de sementes melhoradas de *Pinus taeda*, no Brasil, é de, aproximadamente, 5.0000 kg/ano. Deste total, metade é produzida em PCS (pomares clonais de sementes) e a outra metade em APS (áreas de produção de sementes). Esse levantamento considerou apenas a produção de sementes das empresas privadas. A seleção das árvores de *Pinus taeda*, nos principais programas de melhoramento atualmente desenvolvidos no Brasil, tem priorizado o volume (diâmetro, altura e conicidade) e a retidão do fuste, a espessura, a distribuição e o ângulo de inserção dos galhos, a densidade básica da madeira e as dimensões das fibras. O objetivo é produzir maior volume madeira em menor tempo, para os diversos usos, como madeira serrada, laminada e produção de celulose.

Entre as espécies economicamente mais importantes do gênero *Pinus*, destacam-se *Pinus taeda* L., *P. elliottii* Engelm. var. *elliottii*, *P. radiata*, *P. pinaster* (Islam-Faridi et al., 2007). Nesse contexto, destaca-se a demanda de madeira, uma vez que é a matéria-prima para diversos produtos, como papel e celulose, móveis, materiais para construção, resina, carvão, produtos de higiene e limpeza, entre outros.

Os diferentes produtos de origem florestal são importantes e imprescindíveis diante do crescimento populacional e econômico do país. A produção proveniente de florestas estabelecidas dentro dos padrões de sustentabilidade, além de ser importante fonte de matéria-prima para diferentes segmentos industriais, auxilia na redução de impactos ambientais, como o desmatamento. É ainda importante ressaltar o papel social, uma vez que essas atividades são enormes geradoras de empregos (Kronka et al., 2005).

Espécies de *Pinus* vêm sendo introduzidos no Brasil há mais de um século, para variadas finalidades. Muitas delas foram trazidas pelos imigrantes europeus como curiosidade, para fins ornamentais e para a produção de madeira. As primeiras introduções de que se tem notícia foram de *Pinus canariensis*, proveniente das Ilhas Canárias, no Rio Grande do Sul, em torno de 1880 (Embrapa, 2008).

Kronka et al. (2005) relatam 16 espécies de *Pinus* que constituem a base da pinocultura brasileira, introduzidas a partir de 1906, dentre as quais *Pinus taeda*, *P. elliottii* e também as espécies tropicais, como *P. oocarpa*, *P. patula*, *P. tecunumanii* e *P. caribaea*.

Uma das razões mais importantes para a introdução do *Pinus* no país foi a necessidade da produção de madeira para abastecimento industrial, para processamento mecânico, na produção de madeira serrada, madeira laminada, na confecção de painéis e na produção de celulose e papel (Kronka et al., 2005).

A indústria brasileira de celulose e papel, oriundos de florestas plantadas de *Pinus* e *Eucalyptus*, encerrou o ano de 2007 com a produção de 11,9 milhões de toneladas de celulose e 8,96 milhões de toneladas de papel. As exportações do setor totalizaram US\$ 4,7 bilhões, um número expressivo para a balança comercial do país (Associação Brasileira de Celulose e Papel - BRACELPA, 2008).

De acordo com a Associação Brasileira de Madeira Processada Mecanicamente (ABIMCI), constituem matéria-prima para a produção do compensado as madeiras tropicais (60%) e as áreas de reflorestamento (40%), especificamente *Pinus* e *Eucalyptus*. Restrições de ordem ambiental ao uso das madeiras tropicais, na ausência de uma política adequada na região Amazônica, associadas ao elevado custo de transporte aos centros consumidores, abrem mais espaço para a produção e a utilização de painéis, oriundos de áreas de reflorestamento. Entre os painéis de madeira, o MDF (do inglês *medium density fiberboard*) tem se destacado, devido à sua ampla utilização na indústria moveleira e na construção civil (pisos, portas, rodapés, etc.). A principal fonte de matéria-prima para o MDF é o *Pinus*, principalmente pela coloração clara que dá aos painéis de maior valor comercial. O Brasil é responsável por 2% da produção mundial de MDF, cujos principais produtores são os EUA (14%) e Alemanha (14%) (Kronka et al., 2005).

O Brasil é o segundo maior exportador de madeira serrada de *Pinus* para os EUA, com o volume de 791.000 m³, em 2003 (Oliveira, 2004). A exportação de móveis também teve um crescimento significativo. Em 1990, os valores não atingiam US\$ 40 milhões; atualmente, os valores de exportação ultrapassam US\$ 500 milhões (Associação Brasileira das Indústrias do Mobiliário - ABIMOVEL, 2006).

Outro importante produto extraído do *Pinus* é a resina. Os principais produtos derivados da resina são a terebentina (parte volátil) e o breu (parte sólida). A terebentina é amplamente utilizada na indústria química como solvente e o breu é utilizado na fabricação de tintas, emulsionantes, colas, adesivos, etc. A previsão da safra 2007/2008 de resina no Brasil é de mais de 100.000 toneladas (Associação dos Resinadores do Brasil - ARESB, 2008).

2.2 Os *Pinus* tropicais

O gênero *Pinus* inclui as espécies florestais mais importantes que ocorrem no México e na América Central, que são considerados centros de origem de suas espécies tropicais. O México possui número de espécies de *Pinus* maior do que qualquer outro país no mundo. Em uma classificação recente, foram listadas 72 espécies (Perry, 1991).

O *Pinus tecunumanii* Eguluz & J. P. Perry, também conhecido como *Pinus* de Tecun Umán, pertence à subseção *Oocarpae*. No entanto, uma grande controvérsia taxonômica envolve esta espécie há mais de 50 anos.

A primeira descrição da espécie ocorreu no final da década de 1940, quando o patologista alemão Fritz Schwerdtfeger, ao investigar os danos causados pelo besouro da casca, *Dendroctonus*, identificou, nas florestas do gênero *Pinus*, diversos taxa nativos da Guatemala, dentre os quais o *Pinus* de Tecun Umán (Styles, 1985). O patologista classificou-o como *Pinus tecunumanii*, em homenagem ao líder indígena Tecun Umán. O binômio foi invalidado, pois foi descrito em espanhol e não em latim, como é recomendado pelo Código... (1978).

A controvérsia em relação à categoria taxonômica desse táxon continuou a ocorrer entre vários autores. Stanley & Steryermark (1958) consideraram *P. tecunumanii* uma forma variante de *P. oocarpa* ou um híbrido entre *P. oocarpa* e *P. pseudostrobus*. Aguilar (1962) e Mittak (1977) sugeriram que se tratava de uma variedade de *P. oocarpa*, *P. oocarpa* var. *tecunumanii*, mas não seguiram as regras de nomenclatura do código.

Ao avaliar características anatômicas, morfológicas e conteúdo de terpenos na resina, Piedra & Perry (1983) concluíram que o *Pinus* de Tecun Umán deveria ter a categoria de espécie, alterando o epíteto específico de acordo com as normas do Código Internacional de Nomenclatura Botânica, denominando-o *Pinus tecunumanii* (Schw.) Eguluz et Perry. Estes autores

consideraram o *Pinus tecunumanii* mais próximo ao *Pinus oocarpa* do que *P. patula*.

No entanto, Styles (1985), com base em características morfológicas e anatômicas, descreveu que o *Pinus tecunumanii* é mais relacionado ao *Pinus patula*, conferindo-lhe a categoria subespecífica *Pinus patula* ssp. *tecunumanii*.

Em diversos trabalhos realizados posteriormente, permaneceu a polêmica em torno da categoria taxonômica do *Pinus tecunumanii*, ora considerando-o mais próximo de *P. oocarpa*, ora de *P. patula*. Dvorak (1985), ao realizar testes de progênies em procedências do *Pinus* de Tecun Umán provenientes de altitudes elevadas do México, Guatemala, Honduras e El Salvador, relatou maior semelhança com *Pinus patula*, enquanto as procedências de altitudes inferiores foram mais similares a *Pinus oocarpa*.

Snieszko & Mullin (1987) estudaram a frequência de brotos basais e danos causados por porcos selvagens e geadas. O *Pinus tecunumanii* mostrou-se mais próximo de *P. oocarpa* quanto à análise de danos causados por esses animais. No entanto, procedências do *Pinus tecunumanii* de Honduras e Nicarágua mostraram-se menos suscetíveis ao ataque de porcos e, portanto, mais próximas de *P. patula*. Em relação aos danos causados por geadas e a presença de brotos basais, *Pinus tecunumanii* apresentou características intermediárias entre *Pinus patula* e *Pinus oocarpa*.

Styles & McCarter (1988) avaliaram aspectos botânicos, ecológicos e de distribuição do *Pinus tecunumanii* e discordaram da categoria específica indicada por Eguiluz & Perry (1983), confirmando a categoria subespecífica *Pinus patula* ssp. *tecunumanii*, proposta por Styles (1985).

Comparando características da madeira e das acículas de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e do *Pinus* de Tecun Umán, Davide & Araújo (1993b) relataram maior proximidade do *Pinus tecunumanii* com *Pinus patula* e sugeriram a categoria subespecífica desta. Posteriormente, Leão & Davide (1993)

confirmaram o status subespecífico deste táxon a partir de dados anatômicos e morfológicos de acículas de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e de quatro procedências do *Pinus tecunumanii*.

No entanto, a análise filogenética utilizando marcadores RAPD de procedências de *Pinus tecunumanii* do norte e sul do México, e das espécies *Pinus patula*, *Pinus oocarpa* e *Pinus caribaea*, identificaram variação genética entre procedências de baixa e alta altitude de *Pinus tecunumanii* e que o mesmo não está fortemente relacionado ao *Pinus patula*, apresentando maior proximidade ao *Pinus oocarpa*, seguido pelo *Pinus caribaea* (Furman et al., 1997).

Silva-Mann et al. (1999), também utilizando marcadores RAPD, avaliaram 13 progênies de duas procedências do *Pinus tecunumanii* de altitudes baixas e elevadas. Comparando-se os coeficientes de similaridade entre essas procedências e *Pinus patula*, foi observado um distanciamento entre as procedências do *Pinus tecunumanii* em relação ao *Pinus patula*, confirmando os resultados obtidos anteriormente por Furman et al. (1997).

Avaliações cromossômicas realizadas por Ribeiro (2001) permitiram a identificação de quatro constrições secundárias no complemento haplóide de *Pinus oocarpa*. Em *Pinus patula*, foram observadas sete constrições secundárias, tendo um dos cromossomos apresentado constrições nos dois braços. A autora avaliou três procedências de *Pinus tecunumanii* e todas apresentaram seis constrições secundárias no complemento haplóide. O padrão de distribuição de constrições secundárias, juntamente com análise morfométrica dos cromossomos, evidenciou que o *Pinus tecunumanii* é uma espécie distinta e mais próxima do *Pinus oocarpa*.

QUADRO 1. Caracterização botânica e distribuição geográfica de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*, de acordo com Perry (1991). UFLA, Lavras, MG, 2008.

	<i>Pinus oocarpa</i>	<i>Pinus tecunumanii</i>	<i>Pinus patula</i>
Formato da copa	Arredondada, denso	Estreito, piramidal, denso	Arredondada, aberta
Altura da árvore	30-35 m	Mais de 50 m	30-35 m
Diâmetro	50-70 cm	50-120 cm	50-90 cm
Coloração da casca	Marrom-avermelhado	Marrom-avermelhado	Marrom-avermelhado
Número de acículas	5, ocasionalmente 3 e 4	4-5, ocasionalmente 3	3, ocasionalmente 4
Comprimento	20-25 cm	14-21 cm	15-25 cm
Hábito	Rígido, ereto	Ereto a inclinado	Ligeiramente pendente
Canais resiníferos	4 -8, principalmente septal, 1 ou 2 medianos ou internos	2-5, principalmente 3 medianos, ocasionalmente 1 interno ou septal	1-4, principalmente 3 medianos, 1 a 2 internos
Número de cones	1-4	1-2 ou 3	1-12 ou mais
Tamanho	6-10 cm	4-6 cm	7-10 cm
Forma	Ovóide a globoso	Cônico a ligeiramente ovóide	Alongado-cônico
Coloração	Amarelo-pálido a marrom, ocre	Amarelo-acinzentado	Marrom ao amarelado
Persistência do cone	Serotino e persistente	Não serotino, semipersistente	Serotino e muito persistente
Sementes	7 mm de comprimento,	5 mm de comp.; 3 de largura,	5 mm de comp.; 3 de largura
Coloração	Marrom-escuro	Marrom-pálido	marrom-escuro a preto
Variação de altitudes das regiões	200-2.500 m	1.500-2.600 m	1.500-3.100 m
Distribuição geográfica	México, Guatemala, Belize, El Salvador, Honduras e Nicarágua e sul da América do Norte	Guatemala, El Salvador, Honduras e Chiapas no México	México

2.3 Citogenética do gênero *Pinus*

Os cariótipos das espécies do gênero *Pinus* são muito similares em número cromossômico, comprimento e morfologia. O complemento haplóide possui 12 cromossomos, sendo 10-11 pares maiores e metacêntricos e um ou dois pares menores e submetacêntricos (Sax & Sax, 1933; Mehra & Khoshoo, 1956; Saylor, 1964, 1972). Desse modo, parece que esse gênero, existente há milhões de anos, tem se mantido relativamente conservado quanto a alterações em seu cariótipo (Saylor, 1983).

Sax & Sax (1933) obtiveram as primeiras informações sobre o cariótipo de espécies de *Pinus*, relatando que o complemento cromossômico do gênero é $2n= 24$ cromossomos, sendo 11 pares de cromossomos longos e metacêntricos e 1 par mais curto e submetacêntrico.

Saylor (1964), ao avaliar espécies de *Pinus* do grupo *Laricionες*, verificou a regularidade da característica do décimo primeiro par de cromossomos submetacêntrico em 19 espécies entre as estudadas. Considerando que a evolução no gênero parece ser citologicamente muito estável, com poucas alterações na estrutura dos cromossomos, a principal fonte de modificações evolutivas em direção à especiação deve ter ocorrido por meio de mutações gênicas.

A avaliação de 9 espécies de *Pinus*, dentre as quais *Pinus patula* e *P. greggii*, ambas mexicanas, revelou constrições secundárias no braço curto do terceiro e quinto cromossomos do complemento. Pequenas, porém significativas diferenças encontradas nos comprimentos dos braços de cromossomos correspondentes de certas espécies foram atribuídas a um gradual acúmulo de duplicações (Pederick, 1970).

Em uma detalhada análise cariotípica, Saylor (1972) avaliou 46 espécies do gênero *Pinus*, dentre as quais representantes importantes do gênero, como *Pinus elliottii*, *P. taeda*, *P. echinata* e também algumas espécies tropicais, como

P. caribaea, *P. patula* e *P. oocarpa*. A comparação entre as espécies foi baseada nos cromossomos com maior relação de braços (RB), como também pela variação no comprimento do braço longo (BL), de acordo com a sua posição na seqüência normal descendente. Em *P. oocarpa*, os maiores valores de RB foram dos cromossomos 3, 5 e 8 e, em *P. patula*, foram os cromossomos 2, 3 e 7. Os cromossomos que quebraram a ordem decrescente de tamanho do BL foram 4, 6 e 9, e 4, 6, 8 e 10, em *P. oocarpa* e *P. patula*, respectivamente.

Em um estudo com 87 espécies de *Pinus*, Saylor (1983) verificou que as espécies da subseção *Sylvestris* - de acordo com a classificação de Shaw (1914) - diferenciavam-se pela presença de dois pares de cromossomos submetacêntricos, indicando que essa diferença poderia ter origem em uma inversão pericêntrica.

Davide & Araújo (1993a), 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*.

Muratova (1997a) encontrou algumas anormalidades cromossômicas ao avaliar árvores de *Pinus sylvestres*, de uma região de condições climáticas severas da Eurásia, com fenótipo incomum, como seminatismo, presença de tumores e outros. Algumas árvores avaliadas apresentaram, em seu cariótipo, a presença de cromossomos subacrocêntricos e acrocêntricos, enquanto o homólogo era metacêntrico, evidenciando a ocorrência de uma deleção heterozigota na espécie.

Em um estudo de representantes da família Pinaceae, dentre os quais oito espécies de *Pinus*, duas espécies de *Picea*, cinco representantes do gênero *Larix* e uma espécie do gênero *Abie*, Muratova (1997b) realizou ampla descrição sobre a ocorrência de constrições secundárias nos cariótipos das mesmas. A mesma autora relata que, em Pinaceae, os cromossomos com satélites não apresentam a forma clássica de um pequeno corpo oval. As constrições

secundárias aparecem como sítios não corados nos cromossomos, variando de comprimento. Em *Pinus koraiensis* e *P. pumila*, mais de seis pares apresentam constrições secundárias e um par de cromossomos apresentou quatro constrições secundárias. *Pinus sibirica*, *P. densiflora* e *P. funebris* apresentaram um par cromossômico com três constrições secundárias. O número de nucléolos variou de 1 a 12 por núcleo nessas espécies. Foi observada a presença de cromossomos B entre as espécies do gênero *Picea* e *Larix*, fato pouco comum nas espécies da família Pinaceae.

Indivíduos de quatro populações de *Pinus cretaceae* foram comparados com uma população de *P. sylvestres*. Os indivíduos da primeira espécie apresentaram índices mitóticos significativamente maiores que o de *P. sylvestres*. No entanto, as maiores diferenças entre as duas espécies foram em relação ao número de nucléolos, que foi maior nos núcleos dos indivíduos das populações de *P. cretaceae*. Essa maior atividade metabólica relacionada à presença de um maior número de nucléolos pode ser um mecanismo de adaptação às condições ecológicas, uma vez que as populações de *P. cretaceae* se encontram em regiões de solo mais pobre (Butorina & Mozgalina, 2004).

2.4 Bandeamento cromossômico e localização de seqüências em *Pinus*

Em *Pinus*, devido à similaridade entre os cromossomos do seu cariótipo, a distinção entre os mesmos por meio de técnicas convencionais é bastante dificultada. Assim, as técnicas de bandeamento cromossômico C e com fluorocromos têm sido aplicadas para a distinção dos cromossomos (Hizume et al., 1989).

Tanaka & Hizume (1980) obtiveram o padrão de bandas C para *Pinus densiflora* e outras duas gimnospermas. Todos os 24 cromossomos apresentaram bandas centroméricas e 12 cromossomos apresentaram bandas intersticiais em

um dos braços que, provavelmente, estavam localizadas nas constrições secundárias.

O bandeamento C foi aplicado, por MacPherson & Filion (1981), na avaliação de cinco espécies dos subgêneros *Pinus* e *Strobus*. Os autores concluíram que os dois subgêneros podem ser distinguidos com base nos padrões de distribuição da heterocromatina pericentromérica. Foi observado que os cromossomos II, V, VI, VIII e XII de *Pinus rigida* não apresentaram bandas na região do centrômero e que as bandas intercalares estão associadas com as constrições secundárias.

Com o objetivo de identificar cada cromossomo do complemento, Drewry (1988) utilizou as técnicas de bandeamento G e Q, em *Pinus resinosa*. Foi possível identificar quatro pares de cromossomos com o mesmo padrão de bandas, o que sugeriu que estes eram os pares de homólogos. *Pinus resinosa* foi a primeira espécie vegetal em que o bandeamento G foi aplicado (Drewry, 1982).

A utilização de bandeamentos cromossômicos com fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA), que têm afinidade por regiões ricas em bases C (citosina) e G (guanina) e 4,6-diamino 2-fenilindol (DAPI), com afinidade por regiões ricas em bases A (adenina) e T (timina), tem sido importante na diferenciação dos cromossomos de *Pinus*. Isso porque essas espécies apresentam cariótipos muito conservados e com poucas variações, sendo este um método valioso para avaliar relações interespecíficas e a diferenciação intra-específica de *Pinus* (Hizume et al., 1983).

Os cromossomos de *Pinus nigra* foram claramente identificados por Hizume et al. (1983), utilizando a técnica de bandeamento fluorescente, em que as bandas Cromomicina A₃ (CMA) e 4,6-diamino 2-fenilindol (DAPI) apareceram nas regiões intersticiais e ou proximais da maioria dos cromossomos. Os cromossomos foram divididos em quatro tipos (tipos de A a

D), quanto ao padrão de bandas CMA: cromossomos tipo A (dois pares) apresentaram grande banda na região proximal e intercalar; os do tipo B (seis pares) possuíam somente uma banda CMA intercalar; os do tipo C (dois pares) foram caracterizados pela ausência de bandas e os tipo D (dois pares) caracterizados pelo menor tamanho, por serem submetacêntricos e a presença de uma banda CMA na região proximal. Com a coloração sequencial com o DAPI, foi possível identificar todos os cromossomos de *P. nigra*, uma vez que o padrão de bandas desses dois fluorocromos é reverso. As bandas que são coradas com um fluorocromo são negativas com o outro.

As espécies *Pinus densiflora* e *P. thunbergii* tiveram seu padrão de bandas CMA e DAPI descrito por Hizume et al. (1989). Em ambas as espécies, as bandas CMA foram localizadas nas regiões proximais e/ou intercalares, na maioria dos cromossomos. Em *P. thunbergii*, os pares II, IV e XI não apresentaram bandas CMA. O décimo par de cromossomos apresentou uma banda CMA na região intersticial e uma banda DAPI na região vizinha à banda CMA, nas duas espécies e foram considerados homólogos. Houve similaridade entre os padrões CMA e DAPI do décimo segundo par entre as duas espécies, que também foram considerados homólogos. A maioria das bandas proximais nas duas espécies foi fluorescente com CMA e DAPI. Essas diferenças sugerem uma drástica mudança na composição de bases nas regiões proximais, em decorrência do processo de especiação em *Pinus*.

Hizume et al. (1990) realizaram uma comparação entre o padrão de bandas CMA e DAPI entre as espécies *Pinus densiflora*, *P. thunbergii* e *P. luchuensis*. As três espécies ocorrem naturalmente no Japão e são consideradas muito relacionadas, sendo classificadas na mesma subseção *Sylvestres*, de acordo com Little & Critchfield (1969). As bandas CMA ocorreram na região intersticial e ou centromérica de quase todos os cromossomos. Após o bandeamento com DAPI, as bandas apareceram ora como sinais fortes ora como

pares de pontos nas regiões intercalares e/ou proximais. Os padrões de bandas CMA e DAPI permitiram a identificação de cada par de cromossomos homólogos de *P. luchuensis*. A comparação entre os padrões de bandas das espécies japonesas sugeriu que as três espécies são muito relacionadas e que *P. luchuensis* é mais próxima de *P. thunbergii* do que de *P. densiflora*.

Pinus thunbergii apresentou sete pares de cromossomos com locos de rDNA 18S nas regiões intersticiais. Comparando com o padrão de bandas CMA, todos os sítios de rDNA coincidiram com bandas intersticiais CMA, no entanto, essas ocorreram também em regiões proximais onde nenhum sítio de rDNA foi localizado. A coloração com Feulgen confirmou que as bandas intersticiais coincidiam com as constrições secundárias (Hizume et al., 1992).

Doudrick et al. (1995) identificaram os 12 cromossomos de *Pinus elliottii* utilizando FISH e bandeamento fluorescente CMA e DAPI. Bandas CMA intercalares foram detectadas em dois pares de cromossomos; sítios paracentroméricos foram localizados em três pares e bandas, em ambas as regiões em quatro pares. Muitas bandas CMA ocorreram nos locos de rDNA 18S-25S, mas uma forte banda centromérica ocorreu e não havia o sinal de rDNA. Bandas DAPI ocorreram em quase todos os cromossomos nas regiões intercalares e ou centroméricas. Uma banda dupla ocorreu na região centromérica de um cromossomo.

Uma seqüência de DNA denominada TPE1, componente do retroelemento Ty1-copia, foi isolada do genoma de *Pinus elliottii* e utilizada como sonda na hibridização fluorescente *in situ* nessa espécie. Os resultados mostraram que essa seqüência estava dispersa de forma relativamente uniforme em todos os cromossomos do genoma de *P. elliottii*, não sendo encontrada nos centrômeros e nas regiões intercalares DAPI negativas e nos sítios dos genes de rDNA 18S-5.8S-25S. A análise de Southern blot revelou a ocorrência dessa seqüência em outras 8 espécies de *Pinus* avaliadas, dentre as quais *P. oocarpa* e

P. caribaea. Isso evidenciou que essa seqüência é altamente amplificada e conservada entre as espécies analisadas, mostrando uma organização genômica similar. Dentro de gimnospermas, a divergência de seqüências do retroelemento Ty1-cópia segue os grupos taxonômicos (Kamm et al., 1996).

Jacobs et al. (2000) fizeram uma descrição da heterocromatina e de locos de rDNA em *P. radiata* e *P. taeda*. Fortes bandas DAPI foram observadas nos centrômeros de todo o complemento cromossômico de *P. radiata*, enquanto *P. taeda* não apresentou bandas DAPI. As bandas CMA ocorreram em regiões intercalares, correspondendo às constrições secundárias de *P. radiata* e *P. taeda*, e somente na última estas também ocorreram nas regiões centroméricas. Os padrões de bandamento fluorescente permitiram a identificação de todos os cromossomos homólogos em *P. radiata* e de apenas grupos de cromossomos em *P. taeda*, em que as bandas foram menos consistentes. A hibridização *in situ* produziu padrões similares para ambas as espécies. Foram observados seis sítios de rDNA 18S-25S intersticiais e quatro sítios centroméricos no complemento haplóide das duas espécies. Os sítios intersticiais coincidiram com as constrições secundárias. A ISH utilizando como sonda o rDNA 5S identificou apenas um sítio intersticial em um par de cromossomos e um sítio telomérico em outro par.

A espécie japonesa *Pinus densiflora* possui bandas CMA e DAPI, principalmente nas regiões proximais de quase todos seus cromossomos. Acredita-se que estas regiões sejam ricas em DNA repetitivo. Foram, então, usados, como sondas para FISH, clones com seqüências altamente repetitivas. Um clone denominado PDCD501 (com 52,3% de sua seqüência composta por bases C e G) foi localizado na região proximal de 20 cromossomos. Essa seqüência foi denominada PCSR (*proximal CMA band-specific repeat*). Outro clone, denominado PDCD159 (com 61,7% de sua seqüência composta por A e T), produziu sinais de FISH na região de bandas DAPI proximais dos quatro cromossomos restantes. Os autores relatam que a avaliação da ocorrência dessas

seqüências em outras espécies pode fornecer informações importantes a respeito da diferenciação interespecífica ou troca genética entre diferentes espécies (Hizume et al., 2001).

Foi feita uma comparação entre os complementos cromossômicos de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula*, *Pinus caribaea* var. *hondurensis* e de duas procedências de *Pinus tecunumanii*. Observou-se a presença de bandas CMA centroméricas nos cromossomos V e VII de *Pinus tecunumanii*; VII e XI em *P. oocarpa*; IV e VII em *P. patula* e VII e XI em *P. caribaea*. As bandas intersticiais ocorreram nos cromossomos II, III, IV e VII em *P. tecunumanii*; em *P. oocarpa* nos cromossomos III, IV, V e VII; nos cromossomos IV, V, VII, VIII, IX, X e I, VI, VII, VIII em *P. patula* e, *P. caribaea*, respectivamente. Com a comparação do padrão de bandas e análise de RAPD, concluiu-se maior similaridade entre os genomas de *Pinus tecunumanii* e *Pinus oocarpa* (Silva-Mann et al., 2002).

Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi aplicada em cinco espécies asiáticas de *Pinus* (*P. tabuliformis*, *P. densata*, *P. yunnanensis*, *P. massoniana*, *P. latteri* e *P. merkusii*), utilizando como sondas os rDNA 18S e 5S. Foram localizados 5-10 pares de sítios do rDNA 18S nas cinco espécies. O maior número de sítios (20) foi observado em *P. massoniana*. O número de sítios rDNA 5S foi menos variável, ocorrendo de 1-2 pares de sítios. A diferenciação entre os sítios de rDNA nos cromossomos das cinco espécies está bem correlacionada com as posições filogenéticas das espécies dentro de gênero *Pinus* (Liu et al., 2003).

Bandas DAPI foram visualizadas nas regiões centroméricas de 23 cromossomos em *P. taeda* e em 22 cromossomos de *P. elliottii*. Foram observadas pequenas bandas em regiões intersticiais dos dois braços de alguns cromossomos. A seqüência telomérica de Arabdopsis (*A-type -TTTAGGG*) foi utilizada como sonda na FISH, sendo localizada em 9 a 10 pares de

cromossomos de ambas espécies, na região proximal. Esses sítios de DNA telomérico parecem estar associados com as bandas DAPI (Islam-Faridi et al., 2003).

Shibata et al. (2005) também utilizaram essa mesma seqüência telomérica na FISH em *Pinus densiflora*. Muitos sítios foram localizados nas regiões centroméricas e intersticiais dos cromossomos e alguns nas regiões teloméricas. As regiões intersticiais e centroméricas foram observadas como bandas DAPI positivas, o que mostra que essas regiões são compostas por seqüências altamente repetitivas ricas em bases AT. O mecanismo de geração dessas seqüências ainda é desconhecido. Os autores sugerem que seria possível que elementos móveis poderiam atuar, transferindo e amplificando essas seqüências ricas em bases AT em sítios específicos nos braços cromossômicos.

Na avaliação de 15 espécies de *Pinus* do subgênero *Strobus*, utilizando FISH, o número de sítios de rDNA 5S e 18S variou de 1 a 4 pares e 7 a 10 pares, respectivamente. Mecanismos como a transposição e amplificação de locos de rDNA através de crossing-over desigual têm sido proposto para explicar a organização genômica do rDNA em angiospermas e fungos. Esses mecanismos podem estar envolvidos na origem da variação da distribuição dos locos de rDNA entre espécies relacionadas de *Pinus*, uma vez que eventos como os rearranjos cromossômicos são raros dentro do gênero (Cai et al., 2006).

Islam-Faridi et al. (2006) identificaram 13 sítios principais (sinal forte) e 17 sítios secundários (sinal fraco) de rDNA 18S-28S e 5S em *Pinus echinata*. Todos os sítios principais e um sítio secundário estão localizados em regiões intercalares e representam sete locos homólogos. Resultados semelhantes foram observados em *Pinus elliottii*, mostrando que os cariótipos das duas espécies são similares. O maior cromossomo de *P. echinata* foi facilmente identificado pelo sinal do sítio principal do rDNA 5S. Um sítio secundário de rDNA 5S foi encontrado na região telomérica de outro cromossomo. Esse mesmo

cromossomo apresentou um sítio intercalar com sinal forte do rDNA 18S-28S, no braço oposto. O cromossomo II de *P. elliotii* apresentou a mesma característica.

Islam-Faridi et al. (2007) observaram padrão similar ao relatado por (Shibata et al., 2005) em *Pinus taeda*, utilizando a seqüência telomérica A-type. Os autores relataram que os doze pares de cromossomos apresentaram sinais A-type positivos nas regiões centroméricas e também na região telomérica, porém, mais fracos com a aparência de dois pequenos pontos. Esse padrão foi correspondente com as bandas DAPI positivas, assim como relatado em *Pinus elliotii* (Islam-Faridi et al., 2003) e *P. densiflora* (Shibata et al., 2005). Os autores propuseram a utilização dos sinais A-type, juntamente com os sítios rDNA 18S-28S e 5S, como marcas para delimitação citomolecular, na construção de mapas físicos e genéticos.

2.5 Conteúdo de DNA em *Pinus*

O gênero *Pinus* tem sido objeto de vários estudos sobre o tamanho do seu genoma. O interesse se deve à importância econômica de diversas espécies do gênero e à observação de variação intra-específica entre diferentes procedências.

Em um estudo de três variedades de *Pinus caribaea*, Berlyn et al. (1987) notaram que embriões embebidos em água apresentaram mais DNA nuclear que plântulas recém-germinadas e esse DNA extra estava distribuído em todos os tipos de classe, de 5C a 7C. No entanto, a partir da germinação, as plântulas rapidamente se reorganizaram na típica distribuição 2C-4C das plantas diplóides. Em *Pinus eldarica*, Wakamiya et al. (1993) relataram variação entre núcleos obtidos do embrião e do megagametófito haplóide. O embrião apresentou apenas 1,7 vezes a quantidade de DNA do megagametófito haplóide. O'Brien et al. (1996) relataram que essas variações intra-específicas podem ser efeito de

amplificações ou deleções de seqüências de DNA em tecidos específicos, duplicações ou deleções cromossômicas, replicação em série de seqüências de DNA e, ainda, devido a diferenças no grau de condensação da cromatina em diferentes tecidos.

Uma pequena, porém significativa, variação foi observada entre a quantidade de DNA de células embriogênicas cultivadas *in vitro* de *Pinus radiata*, com exceção de uma linhagem de células que apresentaram uma quantidade adicional de 2 pg de DNA. A análise citogenética evidenciou que se tratava de uma linhagem trissômica, com $2n=2x + 1 = 25$ cromossomos. Outros relatos de plantas trissômicas já haviam ocorrido em *Pinus radiata* (O'Brien et al., 1996).

Wyman et al. (1997) avaliaram a variação do conteúdo de DNA, usando a citometria de fluxo, em sementes de famílias de meios irmãos de *Pinus banksiana*. As famílias consideradas superiores, com base na altura de crescimento, tiveram significativamente menos DNA por núcleo, tanto dos embriões quanto dos megagametófitos. A hipótese nucleotípica propõe que variações no conteúdo de DNA podem ter importância, tanto no desenvolvimento quanto na adaptação, por meio de seus efeitos em parâmetros como volume nuclear e celular, tempo dos ciclos mitótico e meiótico. Desse modo pode ser possível que o menor volume nuclear resultante do menor conteúdo de DNA observado nas famílias superiores tenha conferido a elas uma ligeira vantagem em relação às famílias inferiores.

Hall et al. (2000) avaliaram 11 espécies de *Pinus*. Para a obtenção de estimativas da variação intra-específica foram avaliadas procedências de três espécies, *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*. Em *Pinus oocarpa* e *Pinus tecunumanii*, ocorreram as maiores diferenças intra-específicas no conteúdo de DNA entre as procedências, 1,27 pg/C e 2,18 pg/C, respectivamente. Em *Pinus patula*, essa variação intra-específica foi menor, mas

diferiu de *Pinus patula* var. *longipedunculata* em 1,02pg/C. Dentro de espécies, o tamanho do genoma tende a diminuir com a colonização de novas regiões, havendo ligeira tendência de genomas maiores ocorrerem em procedências mais antigas. Em *Pinus tecunumanii*, as procedências originárias da Guatemala e de Belize, mais ao norte da América Central, apresentaram maiores quantidades de DNA. Já as procedências originárias da Nicarágua, mais ao sul, tiveram menor quantidade de DNA. Uma comparação com os valores de conteúdo de DNA de 17 espécies avaliadas anteriormente indicou menor variação no tamanho do genoma entre espécies mais próximas (dentro de uma subseção), quando comparadas às espécies menos relacionadas.

Os mesmos autores observaram, ainda, ausência de correlação entre quantidade de DNA e latitude. Esse fato pode ser atribuído ao histórico movimento através das latitudes. As espécies de *Pinus* têm grandes populações e que sofrem hibridação livremente entre espécies relacionadas. Houve extensiva movimentação de espécies temperadas para refúgios tropicais durante mudanças climáticas no Eoceno e Pleistoceno. A classificação contemporânea das espécies como tropicais e temperadas mascara a história dos antigos eventos de deslocamento.

Willians et al. (2002) avaliaram as conseqüências de cruzamentos interespecíficos de *Pinus* na quantidade de DNA dos híbridos. O híbrido entre *Pinus wallichiana* e *Pinus strobus* apresentou leve variação no conteúdo de DNA quando comparado aos parentais. A mesma tendência ocorreu no cruzamento entre *Pinus elliottii* e *Pinus caribaea*. O genoma dos híbridos não aumentou ou diminuiu em conteúdo de DNA, independentemente da distância filogenética dos parentais. Essa ligeira variação na quantidade de DNA dos híbridos pode ser devido a pequenas ampliações ou a deleções de seqüências de DNA nos cromossomos. A hibridação pode alterar o tamanho do genoma sem uma concomitante mudança no número de cromossomos. A amplificação de

seqüências pequenas de DNA é distribuída proporcionalmente, para manter a uniformidade cariotípica.

Bogunic et al. (2003) obtiveram as quantidades de DNA e a composição de bases dos genomas das espécies *Pinus heldreichii*, *Pinus mugo*, *Pinus nigra*, *Pinus peuce* e *Pinus sylvestris*. A composição dos genomas das espécies foi de 39,5% de bases CG. As quantidades de DNA variaram de 42,5 pg a 54,9 pg, entre as espécies. As espécies *P. heldreichii* e *P. peuce* tiveram as quantidades de DNA estimadas pela primeira vez, com 50,01 pg e 54,94 pg, respectivamente. A subespécie *Pinus nigra* var. *dalmatica* e duas populações de *Pinus nigra* var. *nigra* apresentaram significativa variação na quantidade de DNA. Os autores relataram que variação intra-específica em espécies com ampla distribuição que apresentam elevada diferenciação morfológica e incluem diversas subespécies, como ocorre no complexo *P. nigra*, é um fato comum. Um fator que pode ter contribuído para tal variação é a existência de seqüências repetitivas curtas, de baixa complexidade, como os minissatélites e as seqüências teloméricas.

A média de conteúdo de DNA de vinte populações de cinco subespécies de *Pinus nigra* com distribuição na Europa, Noroeste da África e Ásia foi de 23,62 pg/C. Os valores médios de conteúdo de DNA das subespécies de *P. nigra* foram: *damaltica* – 23,79 pg; *mauretanica* – 23,24 pg; *nigra* – 23,63 pg; *pallasiana* – 23,80 pg e *salzmanni* – 23,55 pg. Não houve variação significativa no conteúdo de DNA entre as subespécies avaliadas. Não foram observadas correlações para características da semente e altitude com o tamanho do genoma (DNA- altitude – $r = - 0,246$; DNA- comprimento da semente = $- 0,044$; DNA-massa da semente = $- 0,197$). No entanto, houve correlação positiva com a longitude (DNA- longitude = $0,454$). Essa correlação poderia indicar lentas modificações no tamanho do genoma entre populações enquanto se adaptam a fatores ambientais contrastantes em diferentes longitudes. Na ausência da poliploidia e mudanças no número de cromossomos, menores, mas significantes

variações no tamanho do genoma, podem ocorrer devido a flutuações no DNA altamente repetitivo, como os retrotransposons (Bogunic et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

Foram utilizadas sementes obtidas de povoamentos de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*, como descrito a seguir.

a) *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl.: sementes obtidas em povoamentos estabelecidos em Agudos, SP, pela empresa Aracruz;

b) *Pinus patula* Schltdl. & Cham.: sementes obtidas em povoamentos estabelecidos em Camanducaia, MG, pela empresa Melhoramentos S/A;

c) *Pinus tecunumanii* Eguluz & J. P. Perry: sementes obtidas pela empresa Aracruz.

- Procedência Las Camélias: material originário da Nicarágua, encontrado em altitudes de 950 a 1.060m;

- Procedência Mountain Pine Ridge: material originário de Belize, encontrado em altitudes de 440 a 730m;

- Procedência San Rafael del Norte: material originário da Nicarágua, encontrado em altitudes de 1.080 a 1.330m;

- Procedência Yucul: material originário da Nicarágua, encontrado a 900 m de altitude.

3.2 Bandeamentos cromossômicos

3.2.1 Preparo de lâminas

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Citogenética, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Foi realizada assepsia das sementes em álcool 70%, seguida por uma lavagem em solução de hipoclorito de sódio 30% e dois banhos em água destilada. As sementes foram colocadas para germinar em bandejas com papel

de germinação umedecido à temperatura ambiente. A germinação ocorreu entre 7 a 15 dias.

As raízes com cerca de 0,5 cm foram coletadas e pré-tratadas com colchicina 0,1%, por 6 a 8 horas, em temperatura ambiente. Após os pré-tratamentos, as raízes foram fixadas em metanol:ácido acético (3:1) e armazenadas a -20°C , até o momento de uso.

A preparação das lâminas foi realizada pelo método do esmagamento de células. As raízes foram submetidas à maceração enzimática em solução de celulase 4%/ pectinase 40%, durante 1 hora e 30 minutos, a 37°C .

As lâminas foram analisadas em microscopia de luz, sob contraste de fase e as melhores metáfases foram marcadas em lâmina guia.

3.2.2 Coloração com fluorocromo DAPI e cromomicina (CMA₃)

Foi utilizada a metodologia descrita por Hizume et al. (1983), com algumas modificações.

As lâminas foram pré-incubadas por 15 minutos em solução tampão McIlvaine pH 7,0 e tratadas com actinomicina 0,25 mg/mL, por 10 minutos. Foram lavadas rapidamente com tampão McIlvaine e tratadas com solução de 4,6-diamidino-2-phenilindole (DAPI) 2 µg/mL, à temperatura ambiente, em câmara úmida, no escuro, por 30 minutos. Após a coloração, a preparação foi lavada com o mesmo tampão e seca ao ar. Em seguida, foram tratadas com distamicina 0,2 mg/mL, por 10 minutos, lavadas rapidamente com tampão McIlvaine e tratadas com cromomicina (CMA₃) 0,1 mg/mL, à temperatura ambiente, em câmara úmida, no escuro, por 1 hora e 30 minutos. Após a coloração, a preparação foi lavada com o mesmo tampão e seca ao ar.

A lâmina semipermanente foi montada com uma solução 1:1 (glicerol:tampãoMcIlvaine), contendo 2% de Dabco. O material foi imediatamente observado em microscópio Olympus BX-60 equipado com acessório de fluorescência,

utilizando-se comprimento de onda entre 360 e 390 nm para o DAPI e 430 e 480 nm para o CMA₃.

3.2.3 Bandeamento com nitrato de prata

As metodologias utilizadas foram descritas por Tanaka & Hizume (1980) e Sousa (2006), com algumas modificações.

Foi preparada uma solução coloidal com gelatina incolor, em que 2g de gelatina foram dissolvidas em 100 mL de água deionizada. Foram acrescentados à solução 2 mL de ácido fórmico. Foi utilizada uma solução de nitrato de prata a 50%.

Para coloração das RONS e nucléolos, duas gotas da solução coloidal foram colocadas sob a lâmina e, em seguida, mais quatro gotas de nitrato de prata a 50%. As lâminas foram cobertas com lamínula e colocadas em câmara úmida a 60°C, por 4 a 6 horas.

As lâminas foram lavadas por 30 minutos em água corrente e 10 minutos em água destilada acrescida de 4 mL de etanol.

3.3 Obtenção de imagens

As metáfases e os núcleos interfásicos corados com fluorocromos DAPI e CMA₃ foram capturados por uma câmara digital acoplada ao microscópio Olympus Bx 60 e analisados pelo programa Image Pro-Plus versão 4.5 (Media Cybernetics). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Em cada espécie, foram avaliadas 5 metáfases. Obtiveram-se os valores de comprimento do braço longo (Bl), comprimento do braço curto (Bc) por meio do software de análise de imagem Sigma Scan Pro versão 3.0. Foram calculados valores de comprimento total do cromossomo ($C_{ti} = Bl + Bc$), comprimento total do lote haplóide ($CTLH = \sum C_{ti}/2$) e comprimento relativo ($CR = C_{ti}/CTLH \times 100$) de acordo com Saylor (1961).

As lâminas tratadas com nitrato de prata foram capturadas por câmera digital Nikon DS-Fi1 acoplada ao microscópio Leica DMLS e analisadas pelo programa NIS-Elements F2.20 no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Lavras.

3.4 Citometria de fluxo

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram realizados nos Laboratórios de Genética e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Em *Pinus tecunumanii*, foram avaliadas três amostras, de cinco árvores, em quatro procedências, Las Camélias, Mountain Pine Ridge, San Rafael del Norte e Yucul, para a verificação da existência de variação intra-específica no conteúdo de DNA. Em *Pinus oocarpa*, também foram avaliadas três amostras, de cinco árvores e, em *Pinus patula*, como não havia disponibilidade de sementes de árvores diferentes, foram avaliadas apenas três amostras. Foram utilizados, para a determinação da quantidade de DNA, aproximadamente 20 -30 mg de embriões para cada amostra, juntamente com a mesma quantidade de tecido foliar jovem de *Pisum sativum* (padrão interno de referência).

As amostras das espécies foram trituradas em placa de Petri contendo 1mL de tampão LB01 gelado para a obtenção de suspensão nuclear (Dolezel, 1997). O tecido triturado foi aspirado por meio de duas camadas de gaze e a suspensão nuclear posteriormente filtrada em uma malha de 50 µm. À suspensão nuclear foram adicionados 25 µL de iodeto de propídio e 2,5 µL de RNase. Para cada amostra, foram analisados, pelo menos, 10 mil núcleos.

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson) e os histogramas foram obtidos no software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.8 (disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo

de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado por comparação, com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*Pisum sativum*).

Foi realizada análise de variância para verificar a existência de variação da quantidade de DNA entre as espécies. A comparação entre as espécies foi feita utilizando-se o teste de médias Tukey (1949), a 5% de significância. As análises foram realizadas no programa R (R Development Core Team, 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As metáfases avaliadas dos três taxa aqui estudados, *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*, apresentaram $2n=24$ cromossomos, sendo 11 pares metacêntricos e um par menor e submetacêntrico. Os cariótipos observados estão em conformidade com os descritos para estas espécies e outras do gênero *Pinus* (Saylor, 1964, 1972, 1983; Pederick, 1970; Davide & Araújo, 1993a; Ribeiro, 2001; Silva-Mann, 2002). O complemento cromossômico das espécies do gênero *Pinus* apresenta notável grau de similaridade quanto ao tamanho, ao número e à morfologia. Isso demonstra que esse gênero, existente há milhões de anos, sujeito a uma variedade de pressões de seleção, tem se mantido conservado quanto a grandes mudanças nas características cariotípicas (Saylor, 1983).

Os valores de comprimento relativo (CR) do primeiro e do último par de cromossomos de *Pinus patula*, *Pinus tecunumanii* e *Pinus oocarpa* também estão de acordo com os observados em trabalhos anteriores (Tabela 1).

TABELA 1. Valores médios de comprimento relativo, em porcentagem, de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*. UFLA. Lavras, MG, 2008.

Espécies	Comprimento relativo dos cromossomos I e XII em %			
	Davide & Araújo (1993a)	Silva (1996)	Ribeiro (2001)	Trabalho atual
<i>Pinus oocarpa</i>	9,62 e 6,17	9,47 e 5,58	9,92 e 5,97	9,8 e 5,84
<i>P. patula</i>	9,67 e 6,07	9,43 e 6,14	9,71 e 5,95	11,17 e 5,95
<i>P. tecunumanii</i>	9,69 e 6,11	9,31 e 6,32	9,96 e 5,93	10,91 e 5,54

Nas Figuras 1, 2 e 3 observam-se as metáfases coradas com os fluorocromos CMA₃ e DAPI de *P. oocarpa*, *P. patula* e *P. tecunumanii*, respectivamente. O padrão de bandas construído para as três espécies baseou-se somente no CMA₃.

O bandeamento cromossômico utilizando DAPI produziu bandas nas três espécies, mas essas não tiveram repetibilidade suficiente para a obtenção de um padrão. No entanto, a coloração uniforme produzida pelo DAPI auxiliou na localização das constrições secundárias.

Em *Pinus oocarpa*, foram observadas doze constrições secundárias intersticiais (CS). Todas apresentaram coloração CMA₃ positivo (Figura 1A) e DAPI negativo (Figura 1B). Este fato demonstrou que essas regiões são ricas em bases C e G e que, provavelmente, contêm os genes de RNA ribossomal. A Figura 2A apresenta uma metáfase de *Pinus patula* com doze constrições secundárias intersticiais. Assim como em *Pinus oocarpa*, todas as CS foram CMA₃ positivas e DAPI negativo. Foram observados, ainda, quatro cromossomos com bandas centroméricas CMA₃ positivas. Em *Pinus tecunumanii*, as doze CS identificadas apresentaram bandas CMA₃ positivas e DAPI negativo (Figuras 3A e 3B).

As três espécies aqui avaliadas apresentaram doze bandas intersticiais CMA₃ positivas e coincidentes com as CS, no entanto, *Pinus patula* apresentou quatro bandas centroméricas CMA₃ positivas que não ocorreram nas outras duas espécies. Portanto, *Pinus tecunumanii* mostrou maior proximidade de *Pinus oocarpa* em relação ao padrão de bandas CMA₃. No entanto, como já relatado anteriormente por Silva-Mann et al. (2002), constatou-se que não existe grande distância entre essas duas taxa e *Pinus patula*.

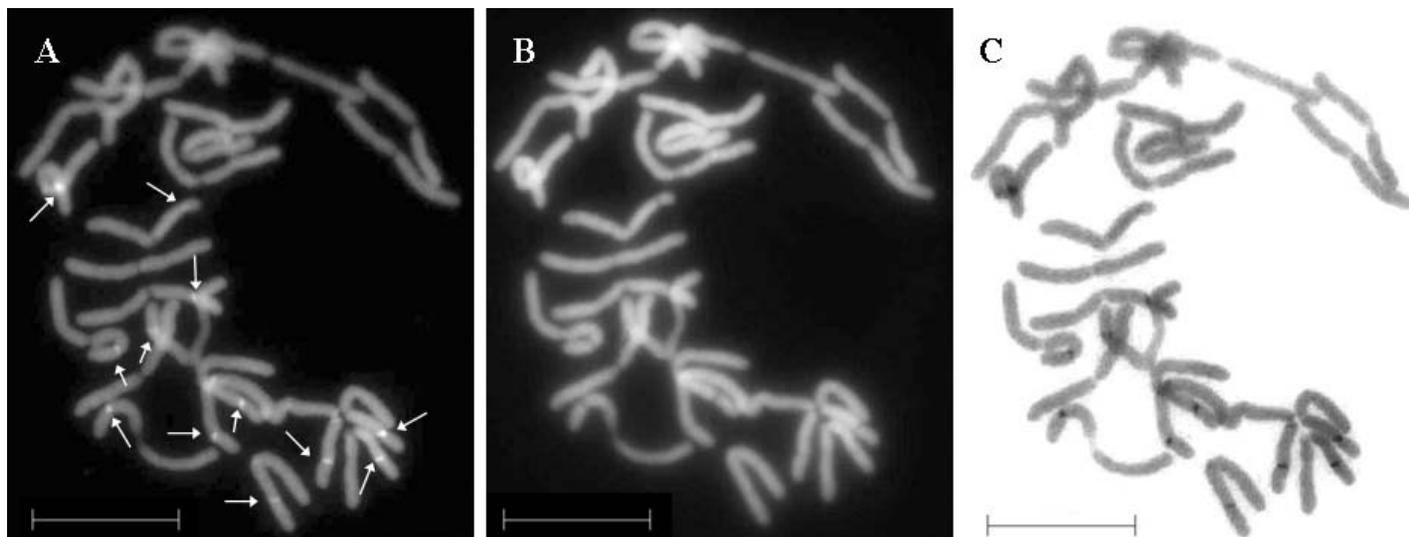


FIGURA 1. Metáfases com $2n=24$ cromossomos de *Pinus oocarpa*. (A) Bandeamento fluorescente CMA₃; (B) Bandeamento fluorescente DAPI; (C) Padrão CMA₃ por inversão. Setas brancas indicam as bandas intersticiais. Barra= 10 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2008.

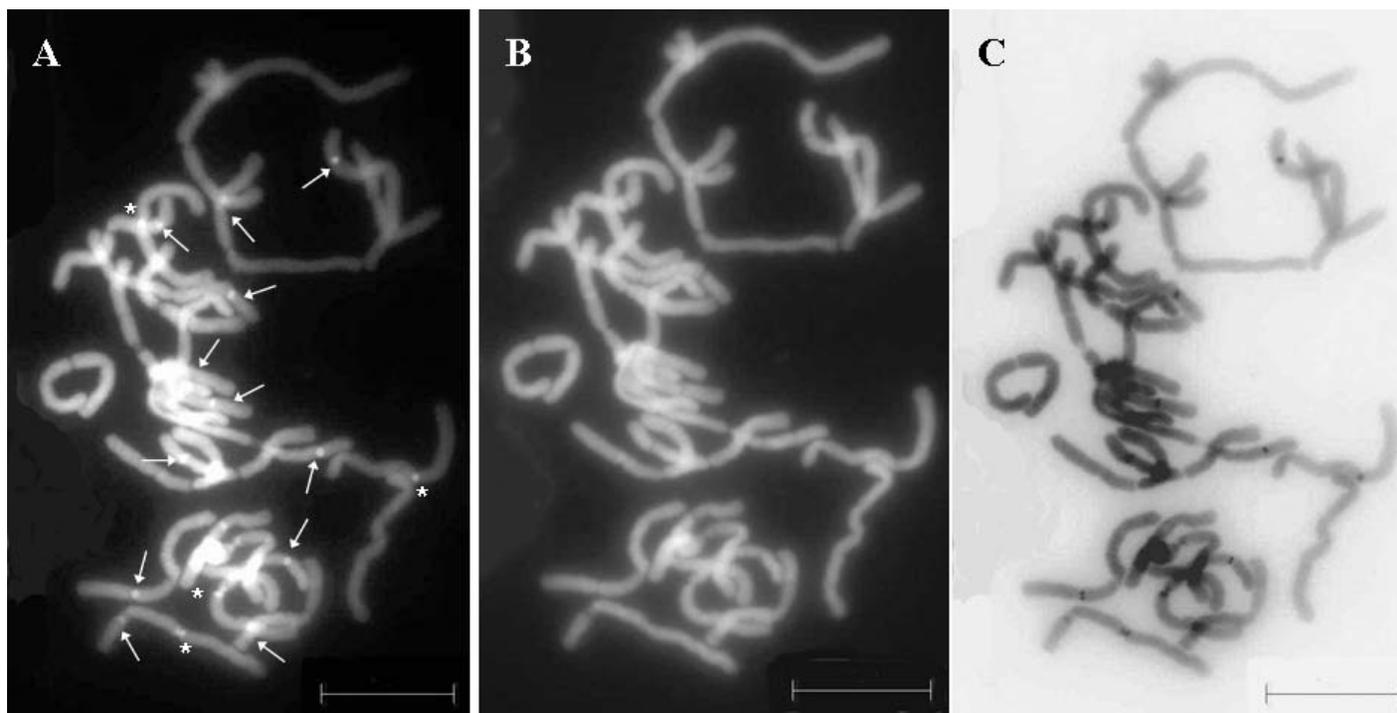


FIGURA 2. Metáfases com $2n=24$ cromossomos de *Pinus patula*. (A) Bandejamento fluorescente CMA₃; (B) Bandejamento fluorescente DAPI; (C) Padrão CMA₃ por inversão. Setas brancas indicam as bandas intersticiais; (*) indicam as bandas centroméricas. Barra= 10µm. UFLA, Lavras, MG, 2008.

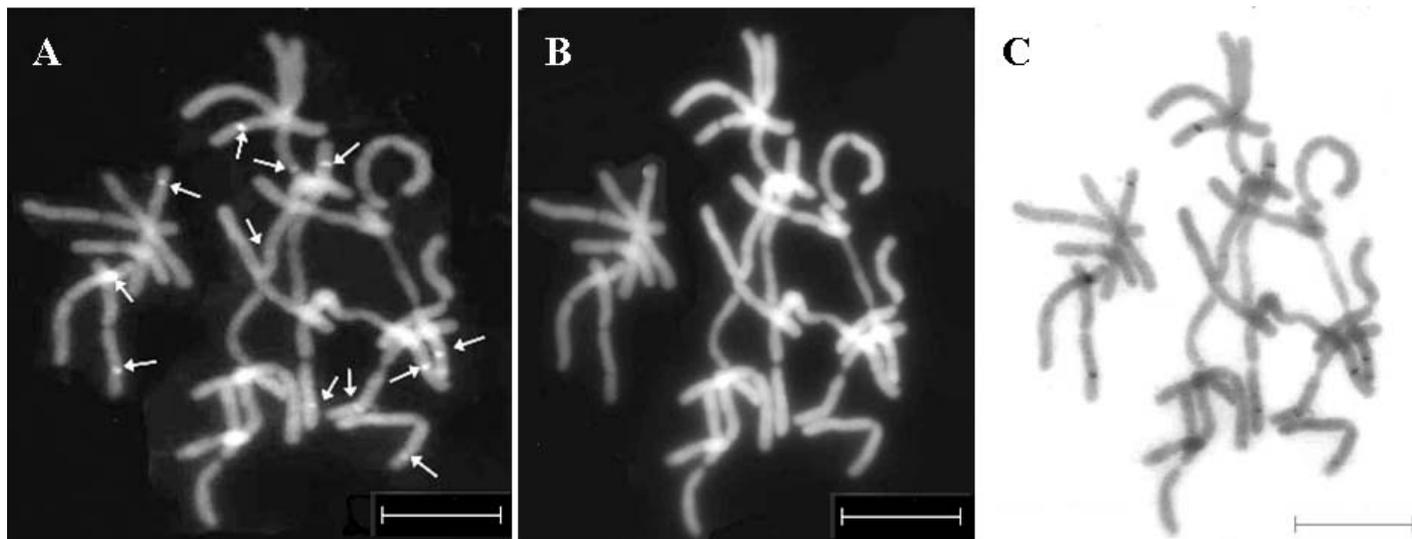


FIGURA 3. Metáfases com $2n=24$ cromossomos de *Pinus tecunumanii*. (A) Bandejamento fluorescente CMA₃; (B) Bandejamento fluorescente DAPI; (C) Padrão CMA₃ por inversão. Setas brancas indicam as bandas intersticiais. Barra= 10µm. UFLA, Lavras, MG, 2008.

No Quadro 2, pode-se observar que o número de bandas CMA₃ positivas, observadas na presente avaliação e o número de bandas relatadas por Silva-Mann et al. (2002) para as três espécies de *Pinus* são coincidentes. Em relação ao padrão de distribuição de CS, a relação do número de CS observada neste estudo e relatada anteriormente por Davide & Araújo (1993a) e Ribeiro (2001) foi de 12:8 em *Pinus oocarpa*, 12:14 e 12:12 em *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii*, respectivamente.

Houve a identificação de muitas bandas CMA₃ e DAPI centroméricas, intersticiais e teloméricas, sem repetibilidade e que, portanto, não puderam ser incluídas no padrão. Jacobs et al. (2000) relataram a inconsistência de algumas bandas CMA₃ e DAPI intersticiais e centroméricas em *Pinus radiata* e *P. taeda*, inferindo que poderiam estar relacionadas ao tamanho do sítio, à composição de bases desses sítios e à estrutura cromossômica.

Vários autores observaram bandas positivas para o fluorocromo CMA₃ nas constrições secundárias e regiões centroméricas em diversas espécies de *Pinus* (Hizume et al., 1983, 1989, 1992; Doudrick et al., 1995; Davies et al., 1997), sendo considerada uma importante ferramenta para diferenciação intra e interespecífica.

Diversas variações metodológicas de bandeamento com nitrato de prata (Tanaka & Hizume, 1980; Sousa, 2006) foram empregadas, mas não se obtiveram metáfases com as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) coradas pelo nitrato de prata. Apenas os nucléolos em núcleos interfásicos foram visualizados (Figura 4).

A coloração com nitrato de prata revelou a presença de 4 a 10, 4 a 9 e 4 a 8 nucléolos por núcleo em *P. oocarpa*, *P. patula* e *P. tecunumanii*, respectivamente. A técnica evidenciou uma possível inativação e ou fusão de alguns nucléolos, uma vez que o número de nucléolos observados foi menor que o número de CS, nas três espécies. No entanto, para a obtenção do número

preciso de RONS ativas, é necessária a detecção do bandejamento AgNor nas metáfases.

QUADRO 2. Número de bandas CMA₃ e constrições secundárias de *Pinus oocarpa*, *P. patula* e *P. tecunumanii* (N= n⁰ de bandas CMA₃ positivas, classificação das bandas: C-centroméricas, I-intersticiais; Nc= n⁰ de constrições secundárias. UFLA. Lavras, MG, 2008.

Espécie	CMA ₃	Constrições 2 ^a	Autores
<i>Pinus oocarpa</i>	-----	Nc= 8	Davide & Araújo (1993a)
	-----	Nc= 8	Ribeiro (2001)
	N= 4 bandas C e 8 bandas I	-----	Silva-Mann et al. (2002)
	N= 12 bandas I	Nc= 12	Trabalho atual
<i>Pinus patula</i>	-----	Nc= 14	Davide & Araújo (1993a)
	-----	Nc= 14	Ribeiro (2001)
	N= 4 bandas C e 12 bandas I	-----	Silva-Mann et al. (2002)
	N= 4 bandas C e 12 bandas I	Nc= 12	Trabalho atual
<i>Pinus tecunumanii</i> Procedências: Las Camélias Jócon Yoro San Rafael Mountain Pine Ridge	-----		Ribeiro (2001)
		Nc= 12	
		Nc= 12	
	N= 4 bandas C e 8 bandas I	-----	Silva-Mann et al. (2002)
<i>Pinus tecunumanii</i>	N= 12 bandas I	Nc= 12	Trabalho atual

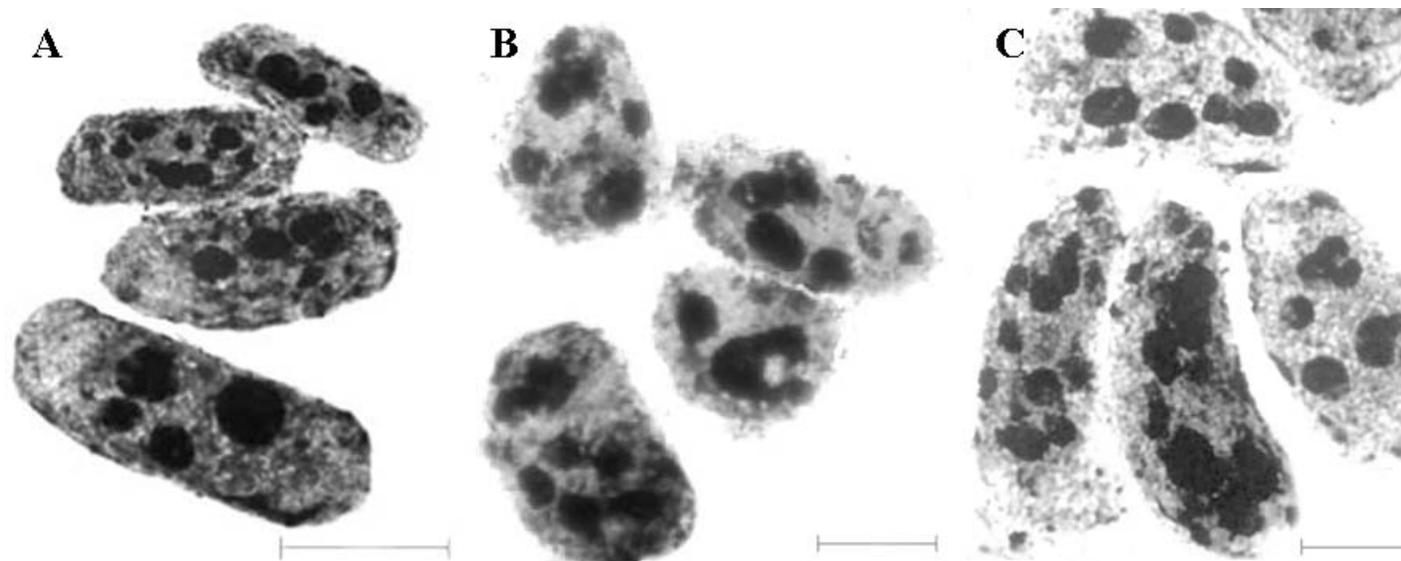


FIGURA 4. Núcleos interfásicos corados com nitrato de prata. (A) *Pinus oocarpa*, (B) *Pinus patula* e (C) *Pinus tecunumanii*. Barra= 10 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2008.

O nitrato de prata possui afinidade por proteínas nucleolares e RNAr. Segundo Sumner (1990), o componente granular do nucléolo é desfeito após a prófase e se dispersa pelos cromossomos durante a mitose. Caso em uma RON ativa não fiquem resquícios deste material, ela pode não ser corada, levando a uma interpretação de inativação da mesma. Esta técnica, ao contrário da FISH, que identifica todos os sítios de genes rRNA, permite a observação apenas de RONS que foram ativas na intérfase precedente.

RONS são regiões que apresentam genes para a transcrição de rRNA 18S, 5.8S e 28 S, independente do local onde se encontram nos cromossomos. Muitas constrições secundárias não contêm estes sítios, apresentando apenas heterocromatina inativa que se descondensa, formando esta estrutura. Os sítios transcripcionais dos genes de RNA ribossomal possuem regiões ricas em bases do tipo GC e, por essa razão, são CMA₃ positivas (Sumner, 1990).

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os padrões de sítios de RONS estabelecidos por FISH em diversas espécies de *Pinus*. Em *Pinus elliottii*, foram observados sítios intersticiais de genes de rRNA 18S-5.8S-25S em sete pares de cromossomos e um sítio paracentromérico em um par de cromossomos (Doudrick et al., 1995). Muitas bandas CMA₃ coincidiram com os sítios dos genes de rRNA. Hizume et al. (1992) observaram, em *Pinus thunbergii* e *Pinus densiflora*, a coincidência entre sítios rDNA 18S-25S e as bandas intersticiais nas CS, CMA₃ positivas. Foram relatados 12 sítios em seis pares de cromossomos em *P. thunbergii* e 14 sítios em sete pares de cromossomos de *P. densiflora*.

Butorina et al. (2004, 2005) observaram diferenças significativas quanto à atividade nucleolar em *Pinus sylvestris* e *Pinus cretacea*, indicando diferenças nas taxas metabólicas das duas espécies. Essas diferenças podem ser decorrentes de mecanismos de adaptação a condições ecológicas específicas, em resposta a fatores de estresse, como variações drásticas de temperatura e umidade, que

podem ter intensificado a atividade nucleolar e, conseqüentemente, geraram um maior número de nucléolos.

Na análise da quantidade de DNA, foram avaliadas as espécies *Pinus patula* e *Pinus oocarpa*, além de quatro procedências do *Pinus tecunumanii*. Pelos dados da Tabela 2, observa-se que houve variação significativa entre a quantidade de DNA dos genótipos avaliados.

Os valores de quantidade de DNA para as espécies de *Pinus* aqui avaliadas estão de acordo com Hall et al. (2000), que obtiveram valores de quantidade de DNA de 21,92 pg, 21,74 pg e 20,49 pg, em células haplóides, para *P. patula*, *P. oocarpa* e *P. tecunumanii*, respectivamente, que correspondem a, aproximadamente, 43,84 pg, 43,48 pg e 40,98 pg. Os autores relataram que, entre as espécies avaliadas, a variação na quantidade de DNA foi menor entre espécies mais relacionadas taxonomicamente, ou seja, dentro de uma subseção.

Na Tabela 3 e na Figura 5 observa-se que os menores valores médios de quantidade de DNA foram os das procedências de *Pinus tecunumanii*, Mountain Pine Ridge e Yucul. *Pinus oocarpa* apresentou valor médio de quantidade de DNA de 42,71 pg, estatisticamente igual à procedência Las Camélias de *Pinus tecunumanii*. *Pinus patula* apresentou o maior valor médio de conteúdo de DNA 43,36 pg, sendo estatisticamente igual à procedência San Rafael del Norte do *Pinus tecunumanii*.

TABELA 2. Resumo da análise de variância para a quantidade de DNA entre *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e das quatro procedências de *Pinus tecunumanii*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

FV	GL	QM	F	Pr (>F)
Genótipos	5	18,471	158,26	2,216**
Erro	72	0,117		

* significativo a 1% de probabilidade

TABELA 3. Médias da quantidade de DNA em picogramas (pg), das espécies *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* e das quatro procedências de *Pinus tecunumanii*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Espécies	Média (pg)
<i>Pinus patula</i>	43,36 a
<i>Pinus tecunumanii</i> – San Rafael del Norte	42,98 ab
<i>Pinus oocarpa</i>	42,71 bc
<i>Pinus tecunumanii</i> -Las Camélias	42,51 c
<i>Pinus tecunumanii</i> –Yucul	40,66 d
<i>Pinus tecunumanii</i> - Mountain Pine Ridge	40,48 d

* médias diferem estatisticamente, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

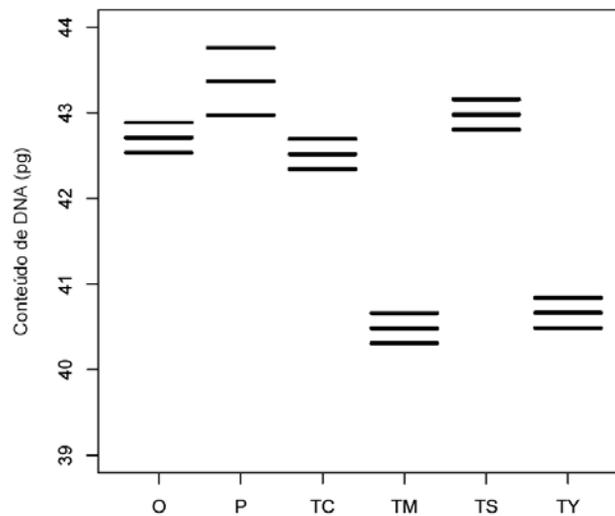


FIGURA 5 - Médias da quantidade de DNA em picogramas e os dois limites (superior e inferior) dos genótipos de *Pinus*. Os que se sobrepõem não são significativamente diferentes. Em que: P – *Pinus patula*; O – *Pinus oocarpa*; TC – procedência Las Camélias; TM – proc. Mountain Pine Ridge; TS – proc. San Rafael del Norte e TY – proc. Yucul de *Pinus tecunumanii*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

A diferença entre o conteúdo de DNA da procedência Mountain Pine Ridge e da procedência San Rafael del Norte foi de 2,5 pg (Tabela 3). Hall et al. (2000) também relataram uma grande diferença intra-específica de 2,18 pg, em *Pinus tecunumanii*. Ao contrário do que foi relatado por esses autores, onde as procedências de *Pinus tecunumanii* originárias de regiões primitivamente ocupadas apresentaram maiores quantidades de DNA, nas procedências avaliadas no presente trabalho, não houve relação entre a diminuição da quantidade de DNA e a origem e a latitude das mesmas. As procedências Yucul, Las Camélias e San Rafael são originárias da Nicarágua, região secundariamente ocupada na América Central, com latitudes mais baixas, entre 12°55' e 13°46', e apresentaram 40,66 pg, 42,51 pg e 42,98 pg, respectivamente. Já a procedência Mountain Pine Ridge, que é originária de Belize, com latitudes mais elevadas em relação às outras três procedências, 16°58', apresentou a menor quantidade de DNA.

Pode-se verificar que a variação na quantidade de DNA nuclear não foi uma característica que possibilitou uma distinta separação entre os taxa avaliados. O *Pinus tecunumanii*, representado por quatro procedências, ora se agrupou ao *Pinus patula*, no caso da procedência San Rafael del Norte, formando um grupo com as maiores médias de quantidade de DNA, ora se agrupou ao *Pinus oocarpa*, no caso da procedência Las Camélias, apresentando valores intermediários de DNA nuclear. Somente as procedências Mountain Pine Ridge e Yucul formaram um grupo exclusivamente de *Pinus tecunumanii*, com as menores quantidades de DNA entre os genótipos avaliados.

Bogunic et al. (2003) observaram variação intra-específica significativa na quantidade de DNA em *Pinus nigra* var *nigra* e *Pinus nigra* var. *dalmatica*. Os autores relataram que variação intra-específica em espécies com ampla distribuição que apresentam elevada diferenciação morfológica e incluem diversas subespécies, como ocorre no complexo *P. nigra*, é um fato comum. Um

fator que pode ter contribuído para tal variação é a existência de seqüências repetitivas curtas, de baixa complexidade, como os minissatélites e as seqüências teloméricas. Tais fenômenos podem também ter atuado na geração da variação observada nos taxa aqui avaliados. A introgressão, a hibridação e a especiação em andamento no México, um centro primário de diversidade de espécies, também podem ser a causa de variação intra-específica no tamanho do genoma (Perry, 1991).

5 CONCLUSÕES

As três espécies apresentaram o mesmo número de constrictões secundárias. O padrão de bandas das CMA₃ indicou que as constrictões secundárias são regiões ricas em GC e que o *Pinus tecunumanii* é mais próximo de *Pinus oocarpa* que de *Pinus patula*, no que diz respeito a essa característica.

A citometria de fluxo evidenciou a existência de variação intra-específica em *Pinus tecunumanii*, mas não possibilitou a distinção entre os três taxa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, J. I. **Pinus de Guatemala**. Guatemala: Ministério da Agricultura, 1962. 33 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO MOBILIÁRIO – ABIMÓVEL. **Panorama do setor moveleiro no Brasil**. Disponível em: <<http://www.abimovel.org.br>>. Acesso em: 14 maio 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL – BRACELPA. **Estatísticas básicas**. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br>>. Acesso em: 14 maio 2008.
- ASSOCIAÇÃO DOS RESINADORES DO BRASIL – ARESB. **Breu no mundo**. Disponível em: <<http://www.aresb.com.br>>. Acesso em: 14 maio 2008.
- BERLYN, G. P.; ANORUO, A. O.; BECK, R. C.; CHENG, J. Dna content polymorphism and tissue culture regeneration in Caribbean Pine. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 65, p. 954-961, 1987.
- BOGUNIC, F.; MURATOVIC, E.; BROWN, S. C.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Genome size and base composition of five *Pinus* species from the Balkan region. **Plant Cell Report**, Washington, v. 22, p. 59-63, 2003.
- BOGUNIC, F.; MURATOVIC, E.; BALLIAN, D.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S. C. Genome size stability among five subspecies of *Pinus nigra* Arnold s. l. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 354-360, 2007.
- BUTORINA, A. K.; CHERKASHINA, O. N.; CHERNODUBOV, A. I.; AVDEEVA, I. A. Variability os cytological parameters of *Pinus sylvestris* L. seeds from unique Hrenovskoy Pine Forest. **Russian Journal of Genetics**, Russian, v. 41, n. 6, p. 630-634, 2005.
- BUTORINA, A. K.; MOZGALINA, I. G. Specific cytogenetic characteristics of *Pinus cretaceae* and *Pinus sylvestris*. **Russian Journal of Ecology**, Russian, v. 35, n. 3, p. 156-160, 2004.

CAI, Q.; ZHANG, D.; LIU, Z. L.; WANG, X. R. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobos* and their implications for genome evolution. **Annals of Botany**, London, v. 97, p. 715-722, 2006.

CÓDIGO internacional de nomenclatura botânica. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE BOTÂNICA, 12., 1975, Leningrado. **Anais...** Leningrado, 1978.

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 de *Pinus* de Tecun Umán. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 17, n. 3, p. 358-368, 1993b.

DAVIES, B. J.; O'BRIEN, W. O.; MURRAY, B. G. Karyotypes, chromosome bands and genome size variation in New Zealand endemic gymnosperms. **Plant Systematics and Evolution**, v. 208, p. 169-185, 1997.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, New York, v. 38, p. 285-302, 1997.

DOUDRICK, R. L.; HESLOP-HARRISON, J. S.; NELSON, C. D.; SCNHIDT, T.; NANCE, W. L.; SCHARZACHER, T. Karyotype of Slash Pine (*Pinus elliotti* var *elliotti*) using patterns of fluorescence in situ hybridization and fluorochrome banding. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v. 86, p. 289-296, 1995.

DREWRY, A. The G-banded chromosomes in *Pinus resinosa* Ait. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v. 73, p. 305-306, 1982.

DREWRY, A. The G-banded karyotype of *Pinus resinosa* Ait. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 37, p. 218-221, 1988.

DVORAK, D. W. One year provenance/progeny test results of *Pinus tecunumanii* from Guatemala established in Brazil and Colombia. **Commonwealth Forestry Review**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 57-65, 1985.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Genética e melhoramento florestal**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 20 out. 2008.

- FRANKIS, M.; PERRY, J. P.; RUSHFORTH, K.; VIDA KOVIC, M.
Classification of the geuns Pinus. 1999. Disponível em: <<http://www.lovet-pinetum.org>>. Acesso em: 20 abr. 2008.
- FURMAN, B.J.; GRATTAPAGLIA, D.; DVORAK, W.S.; O'MALLEY, D.M.
 Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. **Molecular Ecology**, v.6, p.321-331, 1997.
- HALL, S. E.; DVORAK, W. S.; JOHNSTON, J. S.; PRICE, H. J.; WILLIAMS, C. G.
 Flow Cytometric analysis of DNA content for tropical and temperate New World Pines. **Annals of Botany**, London, v. 86, p. 1081-1086, 2000.
- HIGA, R. A. Melhoramento. **Revista da Madeira**, ano 12, n. 68, 2002.
 Disponível em: <<http://www.remade.com.br>>. Acesso em: 10 jul. 2008.
- HIZUME, M.; ARAI, M.; TANAKA, A. Chromosome banding in the genus Pinus III: fluorescent banding pattern of *P. luchensis* and its relationships among the japanese diploxylon pines. **Botanical Magazine of Tokyo**, Tokyo, v. 103, p. 103-111, 1990.
- HIZUME, M.; ISHIDA, F.; MURATA, M. Multiple locations of the rRNA genes in chromosomes of pines, *Pinus densiflora* and *P. thunbergii*. **Japanese Journal Genetic**, Tokyo, v. 67, p. 389-396, 1992.
- HIZUME, M.; OHGIKU, A.; TANAKA, A. Chromosome banding in the genus Pinus I: indetification of chromosomes 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* and *P. thunbergii*. **Botanical Magazine of Tokyo**, Tokyo, v. 102, p. 25-36, 1989.
- HIZUME, M.; SHIBATA, F.; MARUYAMA, Y.; KONDO, T. Cloning of DNA sequences localized on proximal fluorescent chromosome bands by microdissection in *Pinus densiflora* Sieb. & Zucc. **Chromosoma**, Berlin, v. 110, p. 345-351, 2001.
- ISLAM-FARIDI, N.; MAJID, M. A.; NELSON, C. D. Chromosomal locations of the ribosomal dna genes in shortleaf pine. **Genome**, Ottawa, v. 46, p. 99-101, 2006.

ISLAM-FARIDI, M. N.; NELSON, C. D.; KUBISIAK, T. L. Reference karyotype and cytomolecular map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **Genome**, Ottawa, v. 50, p. 241-251, 2007.

ISLAM-FARIDI, M. N.; NELSON, C. D.; KUBISIAK, T. L.; GULLIRMO, M. V.; MCNAMARA, V. H.; RAMAKRISHNAN, S. Developing standard karyotypes for loblolly and slash pines with fluorescent *in situ* hybridization and A-T rich banding. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE. OKLAHOMA UNIVERSITY, 27., 2003, Oklahoma. **Proceedings...** Oklahoma, 2003. p. 184-188.

JACOBS, M. D.; GARDNER, R. C.; MURRAY, B. G. Cytological characterization of heterochromatin and rDNA in *Pinus radiata* and *P. taeda*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 223, p. 71-79, 2000.

KAMM, A.; DOUDRICK, R. L.; HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHMIDT, T. The genomic and physical organization of Ty1-copia-like sequences as a component of large genomes in *Pinus elliotti* var *elliottii* and others gymnosperms. **Proceeding Natl. Academy Science**, v. 93, p. 2708-2713, 1996.

KOSUBOV, G. M.; MURATOVA, E. N. **Contemporary gymnosperms: morphologosystematic review and karyology**. Leningrad: Nauka, 1986. 192 p.

KRONKA, F. J. N.; BERTOLANI, F.; PONCE, R. H. **A cultura do *Pinus* no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2005. 156 p.

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, E. L.; CRITCHFIELD, W. B. **Subdivisions of the genus *Pinus* (Pines)**. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, 1969. 51 p. (Miscellaneous publication, 1144).

LIU, Z. L.; ZHANG, D.; HONG, D. Y.; WANG, X. R. Chromosomal localization of 5S and 18S-5.8S-25S ribosomal DNA sites in five Asian pines using fluorescence *in situ* hybridization. **Theoretical Applied Genetic**, New York, v. 106, p. 198-204, 2003.

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

MEHRA, P. N.; KHOSHOO, T. N. Cytology of conifers. **International Journal Genetic**, v. 54, p. 165-181, 1956.

MIROV, N. T. **The genus *Pinus***. Berkeley: University of California, 1967. 602 p.

MITTAK, W. L. **Fortalecimento al sector forestal**: estudos para la reforestacion nacional. Guatemala: FAO, 1977. 64 p.

MURATOVA, E. N. Cytogenetical study on Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) in the Central Yakutia, cytogenetic studies of forest tree and shrub species. In: IUFRO CYTOGENETIC WORKING PARTY 2.04-08 SYMPOSIUM, 1., 1997, Zagreb. **Proceedings...** Zagreb, 1997a. p. 157-177.

MURATOVA, E. N. Studies on nucleolar chromosomes in representatives of Pinaceae Lindl. cytogenetic studies of forest tree and shrub species: In: IUFRO CYTOGENETIC WORKING PARTY 2.04-08 SYMPOSIUM, 1., 1997, Zagreb. **Proceedings...** Zagreb, 1997b. p. 45-72.

O'BRIEN, I. E. W.; SMITH, D. R.; GARDNER, R. C.; MURRAY, B. G. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus*. **Plant Science**, Shannon, v. 115, p. 91-99, 1996.

OLIVEIRA, J. C. M. Mercado brasileiro de madeira de *Pinus*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE *PINUS*, 1., 2004, Joinvile. **Anais...** Joinvile, 2004.

PEDERICK, L. A. Chromosome relationships between *Pinus* species. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 19, p. 171-180, 1970.

PERRY, J. P. **The Pines of Mexico and Central América**. Portland: Timber, 1991. 231 p.

PIEDRA, T. E.; PERRY, J. P. *Pinus tecunumanii*: una espécie nueva de Guatemala. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 8, n. 41, p. 3-22, 1983.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, 2007. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 2 maio 2008.

RIBEIRO, L. R. **Morfometria cromossômica em espécies tropicais de *Pinus***. 2001. 41 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RICHARDSON, D. M. **Ecology and biogeography of *Pinus***. Cambridge: Cambridge University, 1998. 527 p.

SAMPAIO, P. de T. B.; RESENDE, M. D. V. de; ARAÚJO, A. J. Estimativas de Parâmetros genéticos e métodos de seleção para o melhoramento genético de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 11, p. 2243-2253, 2000.

SAX, K.; SAX, H. J. Chromosome number and morphology in conifers. **Journal Arnold Arboretum**, v. 14, p. 356-375, 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. 194-204, 1972.

SAYLOR, L. C. Karyotype analysis of *Pinus* subgenus *Strobus*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 32, p. 119-124, 1983.

SCHWERDTFERGER, F. Informe ao gobierno de Guatemala sobre la entomologia florestal de Guatemala: los Pinus de Guatemala. **Informe FAO/ETAP**, Rome, v. 1, n. 202, p. 1-58, 1953.

SHAW, G. R. The genus *Pinus*. **Journal Arnold Arboretum**, v. 5, p. 1-96, 1914.

SHIBATA, F.; YUKARI, M.; HIZUME, M. AT-rich sequences containing Arabidopsis-type telomere sequence and their chromosomal distribution in *Pinus densiflora*. **Theoretical Applied Genetic**, New York, v. 110, p. 1253-1258, 2005.

SHIMIZU, J. Y.; PINTO JÚNIOR, J. E. **Diretrizes para credenciamento de fontes de material genético melhorado para reflorestamento**. Curitiba: Embrapa-CNPq, 1988. 15 p. (Documentos, 18).

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

SILVA-MANN, R.; DAVIDE, L. C.; REIS, M. de A. Fluorescent banding in tropical Chromosomes. **Scientia Florestalis**, n. 61, p. 59-63, 2002.

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

SNIEZKO, R. A.; MULLIN, L. J. Taxonomic implication of bush pig damage and basal shoots in *Pinus tecunumanii*. **Commonwealth Forestry Review**, Oxford, v. 66, n. 4, p. 303-313, 1987.

SOUSA, S. M. de. **Bandeamento cromossômico em *Lippia alba***. 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

STANLEY, B. T.; STERYERMARK, J. A. Flora de Guatemala Fieldiana. **Botany**, Chicago, v. 24, n. 1, p. 40-56, 1958.

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

STYLES, B. T.; McCARTER, P. S. The botany, ecology, distribution and conservation status of *Pinus patula* ssp. *tecunumanii* in the Replublic of Honduras. **Ceiba**, Tegucigalpa, v. 29, n. 1, p. 3-30, 1988.

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

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

TUKEY, J. W. One degree of freedon for non-additivity. **Biometrics**, Raleigh, v. 5, p. 232-242, 1949.

WAKAMIYA, I.; NEWTON, R.; JOHNSTON, J. S.; PRICE, H. J. Genome size and environmental factors in the genus *Pinus*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 80, p. 1235-1241, 1993.

WILLIAMS, C. G.; JOYNER, K. L.; AUCKLAND, L. D.; JOHNSTON, S.; PRICE, H. J. Genomic consequences of interspecific *Pinus* spp. Hybridization. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 75, p. 503-508, 2002.

WYMAN, J.; LALIBERTÉ, S.; TREMBLAY, F. M. Nuclear DNA content variation in seeds from 22 half-sib families of jack pine (*Pinus banksiana*, Pinaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 84, n. 10, p. 1351-1361, 1997.