
CARACTERIZAÇÃO

DOS CROMOSSOMOS

DE *PACHIRA AQUÁTICA*

AUBL. (MALVACEAE)*

MARJORIE FRANCIS DOBROVOSKI LIMA, DANIEL PEREIRA MIRANDA, ISANE VERA KARSBURG

Resumo: *Pachira aquatica* Aubl., utilizada em alguns países na alimentação e arborização urbana. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a morfologia e identificar a NOR dos cromossomos de *P. aquatica*. As sementes foram germinadas, bloqueadas, maceradas com enzimas e dissociadas. *P. aquatica* com $2n=34$ cromossomos, distribuídos, $4m + 13sm$. Nos pares cromossômicos 1 e 8 foram identificadas as NORs.

Palavras-chave: Cariótipo. Bandeamento NOR. Arbórea.

Pertencente à família Malvaceae, *Pachira aquatica*, também conhecida popularmente como munguba, cacau-falso ou mamorana é uma árvore nativa da América do Sul (LORENZI, 2000), e América Central (SANTOS *et al.*, 2007). Pode atingir de 6 a 14 metros de altura, e ocorrer em toda a região amazônica em terrenos alagadiços espontaneamente, mas também em solo seco, devido a sua alta capacidade de adaptação em condições adversas de clima e solo (LORENZI, 2000). Sua madeira pode ser utilizada em usos internos, caixotaria, fósforos e molduras; suas sementes comestíveis são usadas pelas populações amazônicas das Guianas, sendo consumidas *in natura*, cozidas ou ainda torradas; além de sua utilização em várias cidades brasileiras na arborização urbana (LORENZI, 2000).

Estudos referentes à caracterização taxonômica, botânica, silvicultural e genética são de extrema importância quando se trata da compreensão das espécies, bem como de suas relações de afinidade, auxiliando dessa forma os programas de melhoramento florestal (BARELLA; KARSBURG, 2007). A análise cromossômica sempre foi um dos campos estimulantes da Citologia e da Genética por fornecer dados importantes para o entendimento em outras

áreas da ciência (BRAMMER *et al.*, 2007), e mais tarde do que passou a se chamar citogenética (PEÑALOZA, 2005).

A citogenética é uma ciência voltada para estudos de observação dos cromossomos por meio de técnicas de coloração, de modo a contá-los ou proceder com quaisquer outras análises morfológicas, melhorar o entendimento do processo de divisão celular e de modificações que acontecem na estrutura cromossômica (SODRÉ, 1999). Essas técnicas contribuem na organização, função, replicação, variação ou evolução dos cromossomos e tem ganhado muito mais relevância nos últimos tempos (PEÑALOZA, 2005). Stuessy (1990) citado por Eder-Silva (2007) fala do amplo uso da citogenética em estudos referentes à caracterização taxonômica e de evolução e filogenia.

Guerra (1988) ressalta que para estabelecer relações entre espécies, a análise do cariótipo fornece informações essenciais a respeito da organização dos cromossomos. Nestes estudos podem ser utilizadas técnicas de bandeamento que permitem avaliar detalhadamente as transformações em nível de tecido e também de órgãos, que ocorreram em grupos de espécies (SATO *et al.*, 1980; SUMMER, 1990).

Para Sousa (2006) técnicas de bandeamento como, por exemplo, as que utilizam coloração com nitrato de prata são essenciais para a identificação das regiões organizadoras de nucléolos nos cromossomos. Que podem estar associadas as constrições secundárias ou regiões com sítios responsáveis pela transcrição de RNA ribossomal, também chamadas NOR.

Dentre as espécies pertencentes à família Malvaceae há uma alta diversidade no número de cromossomos (BRUCHER, 1977). Com a relação ao melhoramento, frequentemente se utilizam técnicas de cruzamentos para os mais diversos fins (BORÉM; MIRANDA, 2005) nas quais é preciso conhecer o número cromossômico para evitar ou induzir, por exemplo, se for o caso, a poliploidia nos indivíduos (FREITAS; BERED, 2003).

Considerando a necessidade de estudos referentes à caracterização cromossômica de espécies vegetais, este trabalho teve como objetivo avaliar a morfologia, e identificar a região organizadora de nucleolar nos cromossomos de *Pachira aquatica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para as avaliações citogenéticas deste trabalho foram utilizados meristemas radiculares obtidos de 45 sementes coletadas de cinco pontos distintos no perímetro urbano de Alta Floresta/MT. Os procedimentos metodológicos foram realizados no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Alta Floresta.

Na germinação, as sementes foram desinfetadas com hipoclorito a 1% por 10 minutos e depois lavadas em água destilada por duas vezes. Em seguida, foram colocadas para germinar em caixa gerbox transparente forradas com papel germitest, previamente umedecido com água destilada. Posteriormente as caixas foram acondicionadas em câmara de germinação (BOD) com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e fotoperíodo de 12 horas, por cerca de 5 dias.

Ao atingirem de 1,0 a 1,5 cm de comprimento, as radículas foram submetidas ao tratamento de bloqueio, que tem por finalidade acumular células em metáfase (Karsburg, 2006), utilizando o herbicida Trifluralin na concentração $3\mu\text{M}$, por 17 horas a 4°C . Em seguida, as radículas foram separadas dos restos da semente, e lavadas em água destilada por 3 vezes,

durante 15 minutos para remover o herbicida, fixadas em solução metanol-ácido acético (PA) na concentração 3:1 com 3 trocas a cada 10 minutos, e por fim acondicionadas a 4°C.

Para a maceração enzimática as radículas foram retiradas da solução fixadora, lavadas em água destilada por 15 minutos e transferidas para minitubos do tipo Eppendorf™ contendo 200 µL de enzima Pectinase SIGMA®, onde permaneceram por 2 horas à 35 °C em banho-maria por 2 horas. Realizada a digestão enzimática, o material foi lavado novamente em água destilada realizando-se três trocas com intervalos de 15 minutos e fixado em solução metanol-ácido acético (3:1) por no mínimo 24 horas a 4 °C.

Para a confecção das lâminas foram feitas a dissociação do meristema radicular, as lâminas foram secadas ao ar em movimentos rápidos e em placa aquecedora a 50 °C conforme descreve Carvalho e Saraiva (1993). As mesmas foram coradas com Giemsa 5%, pH 7,0, por 2 minutos, lavadas em água destilada e colocadas para secar.

Para o bandeamento Ag-NOR as lâminas foram submetidas ao envelhecimento por 20 dias segundo Funaki *et al.* (1975) e, sob as lâminas gotejado a solução de nitrato de prata (AgNO₃) 50%, logo após, as lâminas foram cobertas por lamínulas, e expostas em câmara úmida e escura a 35 °C por 18 horas. Decorrido o tempo de incubação, as lamínulas foram removidas com jato de água e as lâminas lavadas em água corrente por 2 minutos e em água destilada por 1 minuto.

As imagens (metáfases) de interesse foram fotografadas com o uso de um microscópio fotômico binocular (Leica® ICC 50) acoplado a um computador e no software LAZ EZ VI. 7.0. As mesmas foram analisadas através do software de domínio público Image/J versão 1.46r (2012) desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde (INS, Bethesda, MD, EUA), juntamente com a linguagem de programação Java versão 1.6.0 (2012) (ABRAMHOFF *et al.*, 2004), ambos podem ser obtido via internet, pelo sítio <http://rsb.info.nih.gov/ij/> para o software ImageJ e <http://www.java.com/> para a linguagem Java.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas cerca de 30 células em metáfase e pró-metáfase, com as quais se obteve o número cromossômico de $2n = 2x = 34$ em *P. aquatica* (Figura 1). Com relação aos estudos citogenéticos da espécie, não foram encontrados quaisquer registros na literatura. O que se relata é que dentre as espécies pertencentes à família Malvaceae o número de cromossomos pode variar de $2n = 16$ a $2n = 96$ cromossomos (BRUCHER, 1977).

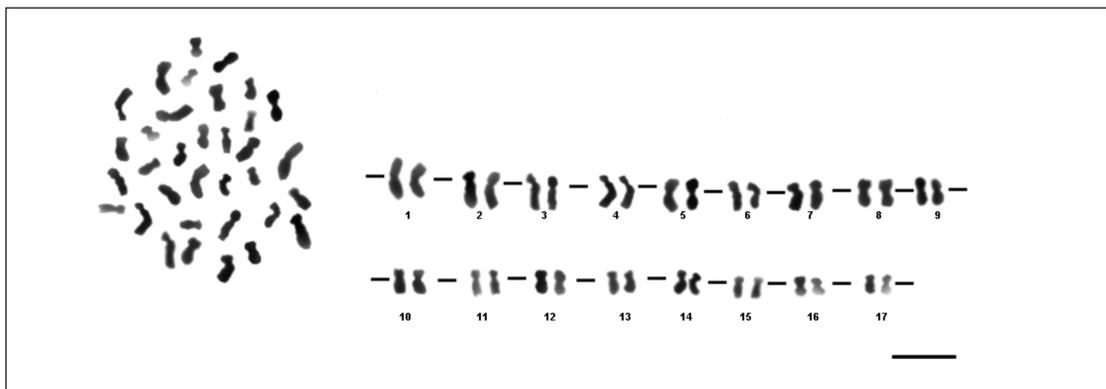


Figura 1: Cariótipo de *Paquira aquatica* $2n = 2x = 34$ cromossomos corados com Giemsa 5%. Barra = 5 µm.

O gênero *Gossypium*, subfamília Malvoideae, apresenta número cromossômico de $2n = 26$ para 17 espécies e $2n = 52$ para as outras 3 de 20 espécies que compõe o gênero (FERREZ-PEREIRA *et al.*, 2007). Pedrosa *et al.*, (1999) esclarece que as variações no número cromossômico são decorrentes de alterações intraespecíficas e interespecíficas, as quais se manifestam ao longo do processo evolutivo, e que o conhecimento a respeito dessas alterações são imprescindíveis para as determinações taxonômicas e reconhecimento de citótipos em populações de uma mesma espécie. Nesse contexto, Biondo *et al.* (2005), enfatizam a importância de análises com diferentes populações da mesma espécie, visto que existem descrições de variações significativas em relação ao número cromossômico entre as populações de distribuição distinta.

Conforme John (1980) o comprimento de um cromossomo é considerado uma constante e, portanto é uma de suas propriedades características. De acordo com o mesmo autor os cromossomos podem ser classificados como longos ($>10 \mu\text{m}$), médios ($4-8 \mu\text{m}$) ou curtos ($<2 \mu\text{m}$). Dessa forma, *P. aquatica* apresentou alguns cromossomos considerados curtos e outros médios, devido à variação no comprimento que foi de 0,70 a 6,25 μm (Tabela 1). A variação de tamanho nos cromossomos foi relatada por Poelhman (1987) citado por Ferrez-Pereira *et al.*, (2007), que verificou cromossomos pequenos no gênero *Gossypium* para 9 espécies procedentes da Ásia, África e Austrália, e cromossomos longos para as 11 espécies procedentes do novo mundo (América). A variação no tamanho dos cromossomos também foi relatada por Almeida (2008) que evidenciou relativa diferença no tamanho de alguns cromossomos de *Tamarindus indica* quando comparados aos demais. A autora atribui esse fato à possibilidade de fusão cêntrica e de polimorfismo na espécie. Aarestrup (2001) relata que os mecanismos de fusão ocasionam alterações na morfologia e no número de cromossomos, entretanto não há variação na quantidade de DNA (GUERRA, 1988).

Tabela 1: Morfometria dos cromossomos de *Paquiria aquatica*

Cromossomo	<i>Paquiria aquatica</i>				r	Classe
	Total (μm)	Braço (μm)				
		Curto	Longo			
1	6,25	3,08	3,25	1,08	M	
2	4,83	1,58	3,25	2,05	SM	
3	4,39	1,22	3,17	2,60	SM	
4	4,05	1,50	2,55	1,70	SM	
5	3,35	1,32	2,03	1,53	M	
6	3,25	0,90	2,35	2,61	SM	
7	2,70	1,02	1,68	1,64	SM	
8	1,58	0,68	0,90	1,32	M	
9	1,41	0,60	0,81	1,35	M	
10	1,30	0,40	0,90	2,25	SM	

continua...

<i>Paqira aquatica</i>					
Cromossomo	Total (μm)	Braço (μm)		r	Classe
		Curto	Longo		
11	1,20	0,35	0,85	2,42	SM
12	1,03	0,31	0,72	2,32	SM
13	0,92	0,32	0,60	1,87	SM
14	0,92	0,30	0,62	2,06	SM
15	0,90	0,25	0,65	2,60	SM
16	0,86	0,28	0,58	2,07	SM
17	0,70	0,20	0,50	2,50	SM
Total	39,64				

Legenda: r = razão entre os braços longo e curto; M = metacêntrico e SM = submetacêntrico.

O cariótipo de *P. aquatica* apresentou 4 pares de cromossomos metacêntricos (m) e 13 pares de cromossomos submetacêntricos (sm) (Tabela 1), permitindo descrever sua fórmula cariotípica, 4m + 13sm. Essa predominância de cromossomos submetacêntricos também foi observada nas análises de Silva e Karsburg (2009) em *O. pyramidale* e de Pavese e Karsburg (2009) em *T. subincanum* e *T. grandiflorum*.

O bandeamento Ag-NOR demonstrou pela impregnação de prata nas proteínas responsáveis pela transcrição de RNA ribossomal, a presença de NOR ativa na porção mediana dos pares cromossômicos 1 e 8 (Figura 2) com sítios intensamente corados. A presença da NOR ativa nos cromossomos, segundo Mergonar et al. (2010) estas regiões possuem os domínios cromossômicos em torno do qual são organizados nucléolos no final da mitose, quando a transcrição do rDNA é iniciada.

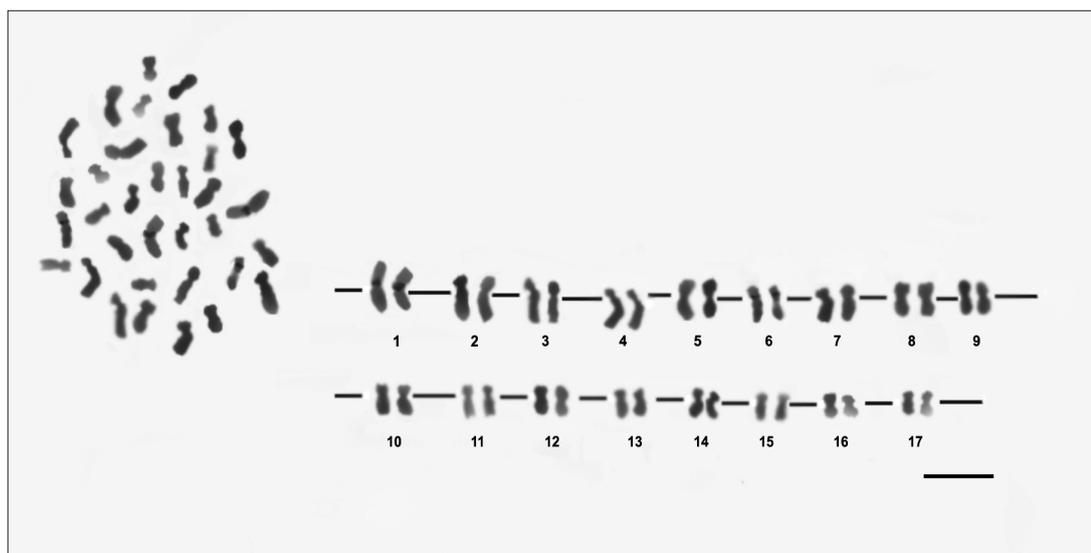


Figura 2: Cromossomos prometafásicos de *P. aquatica*, pré-tratados com Trifluralin 3 μM durante 17 horas a 4° C e corados com AgNO_3

Nota: observar a presença de NOR na porção mediana dos pares cromossômicos 1 e 8. Barra = 5 μm .

O número dessas regiões é constante em cada espécie e poucas vezes são superiores a dois (Guerra, 1988). Os cromossomos de *P. aquatica* se enquadram nessa inferência, pois apresentaram 2 NORs. O tamanho e a intensidade dos sítios corados com prata estão relacionados com a atividade de transcrição (GOLCZYK; JOACHIMIAK, 2003).

CONCLUSÃO

P. aquatica apresenta $2n = 34$ cromossomos (4 m+13 sm) com tamanho variando de 6,25 a 0,70 μm . E a ocorrência da NOR ativa nos pares de cromossomos 1 e 8.

CHARACTERIZATION OF CHROMOSOMES OF *Pachira aquatica* Aubl. (MALVACEAE)

Abstract: used the Pachira aquatica Aubl., in some countries as food and urban forestry. The aim of this study was to characterize the morphology and identify the NOR chromosome of P. aquatica. The seeds were germinated, blocked, macerated and dissociated with enzymes. P. aquatica with 2n = 34 chromosomes, distributed, 4m + 13sm. In chromosome pairs 1 and 8 were identified NORs.

Keywords: Karyotype. Banding NOR. Arborea.

Referências

- AARESTRUP, J.R. Análise morfológica dos cromossomos de pimentão (*Capsicum annuum* L.). 2001. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- ABRAMHOFF, M.D., MAGELHAES, P.J., RAM, S.J. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*. v. 11, p. 36-42, 2004.
- ALMEIDA, C.B. Citogenética de *Tamarindus indica*. 2008. 35p. Monografia (Ciências Biológicas) Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, 2009.
- BARELLA, A.P.W., KARSBURG, I.V. Caracterização morfológica dos cromossomos mitóticos de *Parkia pendula* (WILLD.) Benth ex Walp. e *Dinizia excelsa* DUCKE (FABACEAE, Mimosoideae). *Revista de Ciências Agro-ambientais, Alta Floresta*, v. 5, p.85-93, 2007.
- BIONDO, E., BATTISTIN, A. Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) G. Don e *Rhynchosia* Lour. (Leguminosae - Faboideae), nativas na região Sul do Brasil. *Bioikos, Campinas*, v. 15, n. 1, p. 39-44, 2001.
- BORÉM, A., MIRANDA, G.V. 2005. Melhoramento de plantas. 5.ed. Viçosa: UFV, 525p.
- BRAMMER, S.P., ZANOTTO, M., CAVERZAN, A. Citogenética vegetal: da era clássica à molecular. EMBRAPA: Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Cereais de Inverno - Área de Citogenética e Genética Molecular, 2007. Disponível em: < http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CNPT-2009/25490/1/p_do85.pdf>. Acesso em: 03 mar, 2010.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotechnic & Histochemistry*, v. 68, p. 142-145, 1993.
- CARVALHO, C.R., SARAIVA, L.S. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. *Journal of Plant Reserch*, v. 110, p. 417-420, 1997.

- ÉDER-SILVA, E., FELIX, L.P., BRUNO, R.L.A. Citogenética de algumas espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 29, n.1, p. 110-114, abril. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v29n1/a24v29n1.pdf>>. Acesso em: 01 mar, 2010.
- FERREZ-PEREIRA, H.E., NATERA, J.R.M., GUERRA, N.C.A. Longitudes cromosômicas dos cultivares de *Gossypium hirsutum* L. y dos ecotipos de *Gossypium barbadense* L. *Revista Acta Biológica Paranaense*, v.36, p. 151-173, 2007. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/acta/article/viewFile>>. Acesso em: 17 mar, 2010.
- FREITAS, L.B., BERED, F. 2003. *Genética e evolução vegetal*. Porto Alegre: UFRGS, 464p.
- FUNAKI, K., MATSUI, S., SASAKI, M. Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. *Chromosoma*, v. 49, p. 357-370, 1975.
- GUERRA, M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco I. *Revista Brasileira de Genética*. CCB/UFPE, Recife, v.9, n.1, p.21-40, 1986.
- GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v. 9, n.4, p. 741-743, 1986.
- GUERRA, M.S. *Introdução à Citogenética Geral. Guanabara Koogan*: Rio de Janeiro, 1988.
- GOLCZYK, H., JOACHIMIAK, A. NORs in *Rhoeo* (Commelinaceae) revisited. *Caryologia, Firenze*, v. 56, p. 31-35, 2003.
- JOHN, B. Citogenética de populações, Universidade de São Paulo USP. Editora Pedagógica e Universitária Ltda. São Paulo – SP, 1980. 84p.
- KARSBURG, I.V. Morfologia floral, citometria de fluxo e citogenética de *Lycopersicon esculentum* Mill. Acesso BGH 160. 87p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) Universidade federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2006.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Nova Odessa - SP: Ed. Plantarum Ltda, 1992. 373p.
- MERGONAR, M.A. dos S.; KARSBURG, I.V.; BONA, D.A.O.de. Identificação da região organizadora nucleolar de *Jatropha curcas* L. *Estudos*. v. 37, p. 755-766, 2010.
- PAVESE, F., KARSBURG, I.V. Caracterização morfológica dos cromossomos de quatro espécies do gênero *Theobroma* L. *Resumos Congresso Interno de Iniciação Científica*, 2009, Cáceres. Anais Cáceres: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2009.
- PEDROSA, A. et al. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. *Acta Botanica Brasilica*. p. 49-60, 1999.
- PEÑALOZA, A.P.S. et al. II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF, 2005, 89p.
- SANTOS, R. B. dos., *et. al.* Propriedades Físico-Químicas da Mistura Biodiesel de Munguba (*Pachira aquatica* Aubl.) / Diesel de Petróleo. Departamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2007. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/producao/58.pdf>>. Acesso em: 02 mar. 2010.
- SILVA, A.A. Caracterização morfológica dos cromossomos mitóticos de *Ochroma pyramidale* (Pau-de-balsa) (Malvaceae). 2009. 6p. Monografia (Bacharelado em Engenharia Florestal) Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta floresta, 2009.
- SODRÉ, L.M. K, et al. *Práticas de Genética*. Paraná: Editora UEL, 1999, 101p.

* Recebido em: 05.07.2012.
Aprovado em: 15.07.2012.

MARJORIE FRANCIS DOBROVOSKI LIMA, .
Graduada em Engenharia Florestal pela Universidade do Estado de Mato Grosso.

DANIEL PEREIRA MIRANDA
Graduando em Agronomia na Universidade do Estado do Mato Grosso. E-mail: danielmiranda08@hotmail.com

ISANE VERA KARSBURG
Doutora em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Vicosa. Mestrado em Agronomia pela Universidade Federal de Santa Maria. Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Maria.

