



Determinação do número cromossômico de *Handroanthus chrysotrichus* (Bignoniaceae)

Douglas Machado Leite^{1,*} , Jenifer Fernanda Damasio¹ , Vanessa dos Santos de Mello¹ , Lindisai Fernandes¹ , Isane Vera Karsburg¹ 

¹Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT, Brasil.

*Autor correspondente: douglasmachado_95@hotmail.com

Recebido: 14/11/2016; Aceito: 25/05/2018

Resumo: *Handroanthus chrysotrichus* é uma espécie arbórea da família Bignoniaceae, conhecida como ipê-amarelo ou ipê-tabaco, de grande valor madeireiro, medicinal e amplamente utilizada na arborização urbana. O presente trabalho teve como objetivo determinar o número cromossômico de *Handroanthus chrysotrichus*. Os meristemas radiculares da espécie foram submetidos ao tratamento de bloqueio em solução de 3 µM de amiprofos-metil durante 16 horas a 4°C. Em seguida, as raízes foram lavadas em três trocas em água destilada e fixadas em metanol: ácido acético na proporção 3:1, transferidas para tubos Eppendorf® contendo enzima 200 µL de pectinase, permanecendo a 35°C em banho-maria por 50 minutos. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular. Por meio da citogenética foi possível determinar que a espécie *Handroanthus chrysotrichus* possui células com $2n = 38$ e outras com $2n = 48$ cromossomos, indicando que as sementes dessa espécie apresentam o fenômeno de poliembrião.

Palavras-chave: ipê-amarelo; metáfases mitóticas; euploidia.

Number of chromosomes of *Handroanthus chrysotrichus* (Bignoniaceae)

Abstract: *Handroanthus chrysotrichus* is an arboreal species of the Bignoniaceae family, known as ipe-yellow or ipe-smoking, of great wood and medicinal value and widely used in urban afforestation. The present work had as objective to determine the chromosome number of *Handroanthus chrysotrichus*. The root meristems of the species were subjected to blocking treatment in 3 µM APM solution for 16 hours at 4°C, then the roots were washed in three exchanges in distilled water and fixed in 3:1 methanol: acetic acid, transferred to Eppendorf® tubes containing 200 µL pectinase enzyme, remaining at 35°C in a water bath for 50 minutes. The slides were prepared by the cell dissociation technique. Through cytogenetics it was possible to determine that the species *Handroanthus chrysotrichus* has cells with $2n = 38$ and others with $2n = 48$ chromosomes, indicating that the seeds of this species present the phenomenon of polyembryony.

Keywords: ipe-yellow; mitotic metaphase; euploidy.

1. INTRODUÇÃO

A família Bignoniaceae abrange cerca de 110 gêneros e 800 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, particularmente na América do Sul. Muitos representantes fornecem madeira, são ornamentais e utilizados como plantas medicinais (GENTRY, 1990).

O gênero *Handroanthus* é representado por 24 espécies, em sua maioria arbórea, presentes na Amazônia, na caatinga, no cerrado, na Mata Atlântica e no Pantanal, conhecidas popularmente como ipê ou pau-d'arco. O gênero é bem conhecido pelas suas vistosas flores rosadas, brancas ou amarelas, que aparecem quando as árvores se encontram ainda desprovidas de folhagem, no inverno ou no início da primavera. A sua madeira é utilizada na construção civil; na indústria moveleira; na medicina popular, por meio de infusão feita com o ritidoma de algumas espécies; e empregada na arborização urbana em razão de sua beleza florística e pequeno porte, não danificando, assim, as redes elétricas (FANTINEL et al., 2013).

Handroanthus chrysotrichus (*H. chrysotrichus*), conhecida como ipê-amarelo ou ipê-tabaco, é decídua, ocorre desde o estado da Bahia até Santa Catarina, em floresta pluvial atlântica, sua altura pode variar de 4 a 10 m, com tronco

de 30–40 cm de diâmetro. Sua madeira é considerada moderadamente pesada, resistente, difícil de serrar e de grande durabilidade (LORENZI, 1992; LOHMANN, 2015).

Apesar da importância tanto ornamental quanto econômica das arbóreas, o número de espécies sem registros citológicos oriundos dessa área ainda é elevado (GRIFFTHS et al., 2002), principalmente com relação a *Handroanthus*, comparado ao número de espécies que compõem o gênero. A análise cromossômica é uma importante ferramenta para a observação da variabilidade genética, já que o número cromossômico pode variar dentro de um mesmo táxon ou entre táxons, além de ser uma ferramenta de distinção de espécies em gênero, como o caso dos ipês, que apresentam pequenas variações, mas que podem gerar dúvidas em classificações taxonômicas.

Dessa forma, a caracterização cromossômica representa uma fonte de informações utilizada em estudos citotaxonômicos, possibilitando a compreensão das relações de parentesco entre as espécies. Dados citogenéticos básicos, como o número cromossômico, o comportamento meiótico e a estimativa da fertilidade do pólen, são importantes para determinar a variabilidade genética disponível em espécies com potencial econômico, para caracterização do germoplasma e para o estudo da biodiversidade (BOFF & SCHIFINO-WITTMANN, 2002). Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo determinar o número cromossômico de *H. chrysotrichus*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, localizado na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Campus Alta Floresta, Mato Grosso.

Os frutos foram coletados no município de Alta Floresta, localizado na Amazônia meridional, estado de Mato Grosso. Após a completa maturação dos frutos de *H. chrysotrichus*, procedeu-se a remoção manual das sementes. As sementes utilizadas foram selecionadas pela uniformidade, rejeitando-se as sementes enrugadas e mal formadas. Para a germinação, as sementes foram colocadas em placas de Petri forradas com papel germitest e umedecidas em água destilada e levadas à câmara de germinação BOD a uma temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ durante 14 dias. Após esse período, os meristemas radiculares foram submetidos ao procedimento de bloqueio, utilizando amiprofos-metil (APM) na concentração de $3\ \mu\text{M}$ por um período de 14 horas a uma temperatura de 4°C . Posteriormente, as radículas foram cortadas e lavadas em água destilada para a remoção da solução antimitótica. Logo após, foram fixadas em solução de metanol: ácido acético (PA) na proporção de 3:1 a -2°C com três trocas de intervalos de 15 minutos e permaneceram por 24 horas na solução fixadora, estocadas a -5°C até o momento de uso (CARVALHO et al., 2005).

As radículas foram retiradas da solução fixadora, submetidas à lavagem com água destilada com três trocas de 15 minutos. Na sequência, estas foram transferidas para tubos do tipo Eppendorf® com tampa de pressão contendo 200 μL de enzima pectinase SIGMA® e mantidas em banho-maria por 60 minutos a 35°C . Realizada a digestão enzimática, o material foi lavado novamente em água destilada realizando-se três lavagens e colocadas em solução fixadora: ácido acético (3:1) e refrigeradas por 24 horas.

As lâminas foram preparadas conforme metodologia descrita por Carvalho et al. (2005), por meio da dissociação celular do meristema radicular, e secadas ao ar em movimentos rápidos. Após 24 horas, foram coradas com Giemsa 5% por 3 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em água destilada e secas em placa aquecedora.

A obtenção das imagens e a análise das lâminas foram realizadas em microscópio trinocularfotômico (Leica®TPI 50) com o uso de uma câmera acoplada ao computador com analisador de imagens LAZARUS EZ VI. 7.0 em aumento de 100X (imersão a óleo). Foram analisadas 30 células em estágios de metáfase, sendo as imagens com cromossomos bem distribuídos na lâmina e sem sobreposições, fotografadas para a contagem do número cromossômico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das imagens durante a metáfase evidenciou células com número de $2n = 38$ e $2n = 48$ cromossomos (Figura 1), o que diferem dos números citados na literatura para essa mesma espécie em duas regiões diferentes de ocorrência. Ortolani (2007), na Região Sudeste do Brasil, encontrou número de $2n = 40$ cromossomos nas sementes normais e $2n = 80$ cromossomos nas sementes que apresentaram poliembrião, resultado que evidenciou a presença de raças cromossômicas ou citótipos diferentes dentro dessa espécie. Piazzano (1998), na Argentina, observou nas sementes poliembriônicas $2n = 80$ cromossomos, detectando esse fenômeno pela primeira vez em ipês, especificamente para a espécie *H. chrysotrichus*.

A poliembrião é a ocorrência de mais de um embrião dentro da semente, podendo ser de origem sexuada ou apomítica (MARCOLIN et al., 2013), e pode estar associada com a poliploidia e apomixia (MENDES-RODRIGUES, 2010). Sabe-se que a ocorrência desse fenômeno em *H. chrysotrichus* é associada à apomixia esporofítica, com embriões originados a partir de células da hipóstase (COSTA et al., 2004; MENDES-RODRIGUES, 2010), observando-se

elevadas taxas de sementes poliembriônicas, chegando a mais de 80% de sementes com múltiplos embriões (COSTA et al., 2004; SALOMÃO & ALLEM, 2001). Esse evento também já foi constatado para outras espécies da família Bignoniaceae, são elas: *H. serratifolius*, *Tabebuia roseo-alba*, *Jacaranda cuspidifolia* (MENDES-RODRIGUES, 2010), *Anemopaegma chamberlaynii* (CORREIA et al., 2005) e *Anemopaegma arvense* (PEREIRA et al., 2007).

De acordo com Mendes-Rodrigues (2010), algumas desvantagens são atribuídas a sementes poliembriônicas, como a competição entre os embriões gerados e entre as plântulas, alterações morfológicas e problemas de estabelecimento. Em contrapartida, a poliembrião pode conferir vantagens de compensação reprodutiva no caso de problemas com a formação do embrião sexual, um dos embriões extranumerários pode permitir a formação de sementes com embriões viáveis, aumento do sucesso reprodutivo de indivíduos que crescem em grupo e proporcionar maiores chances de ao menos um dos embriões se tornar uma plântula viável. Além de atribuir capacidade adaptativa a uma maior gama de *habitats* diferentes (CREPET & NIKLAS, 2009).

Para as espécies de Bignoniaceae avaliadas quanto ao número cromossômico, 72,1% apresentam $2n = 40$ (SAMPAIO, 2010). A ocorrência de espécies com $2n = 60$ e 80 cromossomos (FIRETTI-LEGGIERI, 2009) indica que eupoliploidizações ocorreram a partir do número $n = 20$ (SAMPAIO, 2010). Dessa forma, a diversidade de número de cromossomos encontrada para *H. chrysotrichus* pode ser decorrente de alterações numéricas, estruturais e rearranjos cromossômicos, que aconteceram ao longo de seu processo evolutivo.

A variabilidade no número de cromossomos pode estar relacionada às variações intra e interespecífica e seu conhecimento pode contribuir para uma delimitação taxonômica mais natural de subespécies e de espécies, bem como para o reconhecimento de citótipos dentro de populações de uma mesma espécie. De acordo com Guerra (1988), é difícil correlacionar com segurança na natureza uma alteração cromossômica a uma característica adaptativa. No entanto, a simples diferença no número cromossômico de populações de localidades diferentes pode ter ou não valor adaptativo. Diante disso, é de suma importância a realização de avaliações com várias populações de locais com condições ambientais intermediárias para afirmar se a variação está correlacionada à adaptação. Como é o caso da variação encontrada para *H. chrysotrichus*, em que estudos mais detalhados, como o uso de morfometria cromossômica e técnicas mais refinadas, os bandeamentos cromossômicos e a quantificação de DNA, podem ampliar as informações quanto ao parentesco entre as espécies, bem como colaborar para melhor compreensão dos processos evolutivos relacionados a essa espécie florestal.

Dados da literatura relatam número básico para a família Bignoniaceae de $n = x = 20$ cromossomos, com casos de euploidia e espécies poliploides. As espécies dessa família apresentam predominantemente o número cromossômico $2n = 40$, no entanto, dentro do gênero *Handroanthus*, há eventos de poliploidização, com registros de $2n = 60$, 80 e 120 cromossomos (SAMPAIO, 2010). Dessa forma, a recontagem do número de cromossomos para as espécies é muito significativa, principalmente quando se leva em consideração que, para a maioria das espécies anteriormente estudadas, existe apenas uma contagem cromossômica realizada (SANTOS, 2002), que pode ter sido previamente citada incorretamente ou determinada apenas com base em um indivíduo, o que é insuficiente para avaliar a variabilidade cariotípica que pode existir dentro de uma família e gênero, e especificamente no caso dos ipês, afirmar se a ocorrência de poliembrião é um processo frequentemente observado para as espécies.

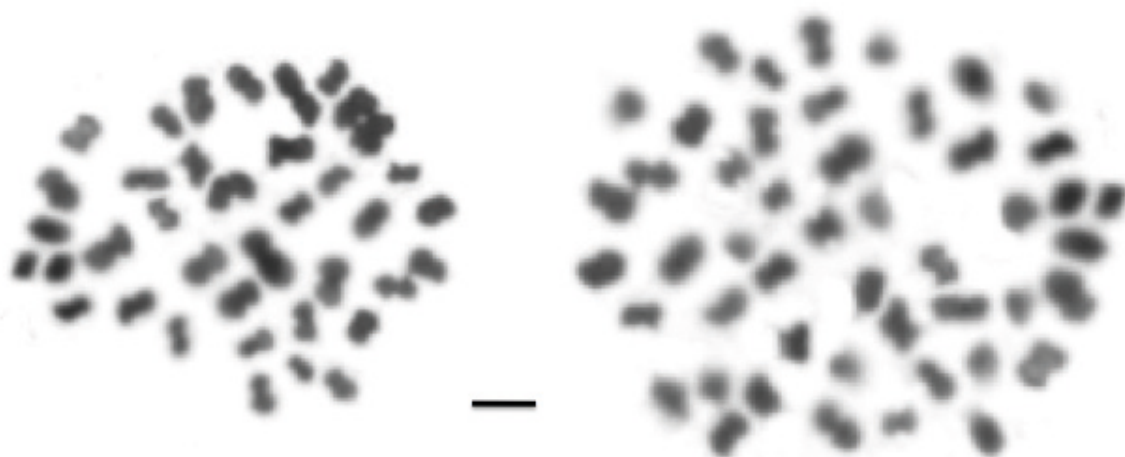


Figura 1. Cromossomos metafásicos de *Handroanthus chrysotrichus* $2n = 38$ (esquerda) e $2n = 48$ (direita), obtidos do bloqueio de 14 horas com $3 \mu\text{M}$ de amipfos-metil (APM). Barra = $10 \mu\text{m}$.

4. CONCLUSÕES

Por meio da citogenética foi possível determinar que a espécie *H. chrysotrichus* possui células com $2n = 38$ e outras com $2n = 48$ cromossomos, indicando que as sementes dessa espécie apresentam o fenômeno de poliembrionia.

REFERÊNCIAS

- BOFF, T.; SCHIFINO-WITTMAN, M.T. Pollen fertility and meiotic behaviour in accessions and species of *Leucaena*. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v.36, n.1, p.54-58, 2002.
- CARVALHO, J.F.R.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. In vitro induction of polyploidy. In *annatto (Bixaorellana)*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v.80, n.1, p.69-75, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-004-8833-5>
- CORREIA, M.C.R.; PINHEIRO, M.C.B.; LIMA, H.A. Produção de frutos e germinação das sementes de *Anemopaegma chambelaynii* Bur. & K. Schum. (Bignoniaceae) – Um registro de poliembrionia. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v.5, p.68-71, 2005.
- COSTA, M.E.; SAMPAIO, D.S.; PAOLI, A.A.S.; LEITE, S.C.A.L. Poliembrionia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.27, n.2, p.395-406, 2004.
- CREPET, W.L.; NIKLAS, K.J. Darwin's second 'abominable mystery': Why are there so many angiosperm species? **American Journal of Botany**, Columbus, v.96, n.1, p.366-381, 2009. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800126>
- FANTINEL, V.S.; OLIVEIRA, L.M.; MUNIZ, M.F.B.; ROCHA, E.C. Detecção de fungos e transmissão de *Alternaria alternata* via sementes de ipê-amarelo, *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. exdc) Mattos. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v.7, n.2, 2013. <http://dx.doi.org/10.18316/1095>
- FIRETTI-LEGGIERI, F. **Biosistemática das espécies do complex Anemopaegma arvense (Vell.) Stellf. Ex De Souza (Bignoniaceae, Bignoniaceae): aspectos anatômicos, citológicos, moleculares, morfológicos e reprodutivos**. 2009. Campinas-SP: Universidade Estadual de Campinas, 2009. 422p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- GENTRY, A.H. Evolutionary patterns in Neotropical Bignoniaceae. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, Nova York, v.55, p.118-129, 1990. <http://dx.doi.org/10.1043/0363-6445-28.2.468>
- GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução à Genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- GUERRA, M. **Introdução à Citogenética geral**. São Paulo: Guanabara. 1988. 132p.
- LOHMANN, L.G. **Bignoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB114068>>. Acesso em: 2 fev. 2017.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368p.
- MARCOLIN, G.; NAGAOKA, R.E.; PERES, F.S.B. Germinação e poliembrionia em sementes de Ipê-Dourado armazenadas. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.9, n.17, p.1539-1547, 2013.
- MENDES-RODRIGUES, C.M. **Ecologia de espécies poliembriônicas com ênfase no bioma cerrado**. 2010. Uberlândia-MG: Universidade Federal de Uberlândia, 2010. 248f. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- ORTOLANI, F.A. **Morfo-anatomia, citogenética e palinologia em espécies de ipês (Bignoniaceae)**. 2007. Jaboticabal-SP: Universidade Estadual Paulista, 2007. 106f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2007.
- PEREIRA, A.M.S.; SALOMÃO, A.N.; JANUÁRIO, A.H.; BERTONI, B.W.; AMUI, S.F.; FRANÇA, S.C.; CERDEIRA, A.L.; MORAES, R.M. Seed germination and triterpenoid content of *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld varieties. **Genetic Resource Crop Evolution**, Dordrecht, v.54, n.4, p.849-854, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10722-006-9161-x>

- PIAZZANO, M. Chromosome numbers of Bignoniaceae from Argentina. **Kurtziana**, Córdoba, v.26, p.179-189, 1998.
- SALOMÃO, A.N.; ALLEM, A.C. Polyembryony in angiosperm types of the Brazilian cerrado and caatinga vegetation. **Acta Botânica Brasílica**, Belo Horizonte, v.15, p.369-378, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062001000300007>
- SAMPAIO, D.S. **Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade**. 2010. Uberlândia-MG: Universidade Federal de Uberlândia, 2010. 232f. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- SANTOS, O.C. **Caracterização cromossômica de Cupuaçu** *Theobroma grandiflorum* (WilldExSpreng) Schum (Sterculiaceae) cultivado na Amazônia. 2002. São Carlos-SP: Universidade Federal de São Carlos, 2002. 63p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.