



Artigo

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

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

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

* Autor Correspondente: douglasmachado_95@hotmail.com

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 3µM de APM durante 16 h 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 min. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular. Através 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 desta espécie apresentam o fenômeno de poliembrionia.

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

Number of chromosome *Handroanthus chrysotrichus* (Bignoniaceae)

Abstract: *Handroanthus chrysotrichus* is an arboreal species of the family Bignoniaceae, 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 h 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 min. 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.

Key-words: 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, estando presentes na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e 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 início da primavera. A sua madeira é utilizada na construção civil, indústria moveleira, na medicina popular por meio de infusão feita com o ritidoma de algumas

espécies e empregada na arborização urbana devido a sua beleza florística e pequeno porte, não danificando assim as redes elétricas (FANTINEL et al., 2013).

Handroanthus 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 - 10m, com tronco de 30-40 cm de diâmetro. Sua madeira é considerada como 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 (GRIFFITHS 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, comportamento meiótico e 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 *Handroanthus chrysotrichus*.

2. MATERIAL 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- MT.

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 placa de petri forradas com papel germitest e umedecidas em água destilada e levadas a 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 min e permaneceram por 24 h 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 min. 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 min à 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 h.

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 h foram coradas com

Giemsa 5% por 3 min, em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em água destilada e secas em placa aquecedora.

A obtenção das imagens e análise das lâminas foi realizada em microscópio trinocular fotômico (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 poliembriõnia, resultado que evidenciou a presença de raças cromossômicas ou citótipos diferentes dentro desta espécie. Piazzano (1998) na Argentina, observou nas sementes poliembriônicas $2n=80$ cromossomos, a qual detectou este fenômeno pela primeira vez em ipês, especificamente para a espécie *H. chrysotrichus*.

A poliembriõnia 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 associado 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). Este 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 poliembriõnia 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 à variação 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 a

adaptação. Como é o caso da variação encontrada para *H. chrysotrichus*. Onde estudos mais detalhados como, o uso de morfometria cromossômica e técnicas mais refinadas, como os bandeamentos cromossômicos e quantificação de DNA, podem ampliar as informações quanto ao parentesco entre as espécies, bem como colaborar para uma melhor compreensão dos processos evolutivos relacionados a essa espécie florestal.

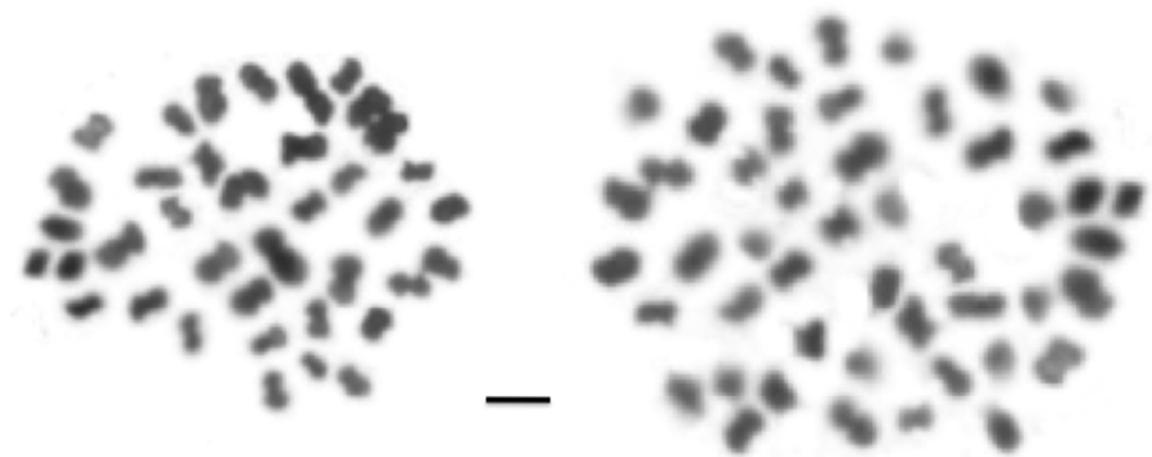


Figura 1 – Cromossomos metafásicos de *Handroanthus chrysotrichus* $2n=38$ (esquerda) e $2n=48$ (direita), obtidos do bloqueio de 14 horas com $3\mu\text{M}$ de APM. Barra = $10\mu\text{m}$.

Dados da literatura relatam número básico para a família Bignoniaceae de $n=x=20$ cromossomos, com casos de euploidia e espécies poliplóides. 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 poliembrionia é um processo frequentemente observado para as espécies.

4. CONCLUSÕES

Através 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 desta espécie apresentam o fenômeno de poliembrionia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOFF, T.; SCHIFINO-WITTMAN, M.T. Pollen fertility and meiotic behaviour in accessions and species of *Leucaena*. **Tropical Grasslands**, Brisbane v.36, p.54-8, 2002.
- CARVALHO, J.F.R.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. In vitro induction of polyploidy. In *annatto (Bixa orellana)*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 80, n.1, p. 69-75, 2005. DOI: 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. Poliembriõnia 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, 2009 v.96, p.366-381, 2009.
- 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. ex dc) Mattos. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 7, n. 2, 2013.
- FIRETTI-LEGGIERI, F. **Biossistemática das espécies do complex *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. Ex De Souza (Bignoniaceae, Bignoniaceae): aspectos anatômicos, citológicos, moleculares, morfológicos e reprodutivos**. Campinas-SP: Universidade Estadual de Campinas, 2009. 422p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Universidade Estadual de Campinas, 2009.
- GENTRY, A.H. Evolutionary patterns in Neotropical Bignoniaceae. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, New York, v.55, p. 118-129, 1990. DOI: 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 a Genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- GUERRA, M. **Introdução a Citogenética geral**. São Paulo: Guanabara. 1988. 132p.
- LOHMANN, L.G. 2015. **Bignoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB114068>>. Acesso em: 02 de Fevereiro de 2017.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo e de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368p.
- MARCOLIN, G.; NAGAOKA, R.E.; PERES, F.S.B. Germinação e poliembriõnia 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**. Uberlândia-MG: Universidade Federal de Uberlândia, 2010. 248p. 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)**. Jaboticabal-SP: Universidade Estadual Paulista, 2007. 106p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Estadual Paulista, 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, p.849-854, 2007.
- 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.
- SAMPAIO, D.S. **Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade**. Uberlândia-MG: Universidade Federal de Uberlândia, 2010. 232p. Tese (Doutorado em Ecologia E Conservação de Recursos Naturais), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- SANTOS, O.C. **Caracterização cromossômica de Cupuaçu *Theobroma grandiflorum* (Willd Ex Spreng) Schum (Sterculiaceae) cultivado na Amazônia**. São Carlos-SP: Universidade Federal de São Carlos, 2002. 63p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.