

DETERMINAÇÃO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS EM *Amburana cearensis* A. C. SMITH

Tatiane S. Carvalho^{1*}, Eliane M. D. Maffei², Bárbara D. F. Soares³

1. Estudante de IC da Fac. de Engenharia Florestal da UESB

2. Docente vinculada ao Departamento de Ciências Naturais/ UESB

3. Docente do curso de Eng. Florestal - UESB - Departamento de Ciências Naturais / Orientador

Resumo:

Amburana cearensis encontra-se em estado vulnerável devido ao extrativismo predatório sofrido, o que tem ameaçado a sobrevivência desta importante espécie nativa do sertão nordestino. A caracterização cariotípica desta espécie amplia as perspectivas de preservação e possibilita conhecimentos para o melhoramento florestal.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo eficiente na obtenção de cromossomos, a fim de subsidiar estudos direcionados a determinação do número de cromossomos da espécie para futura confecção do cariótipo da mesma.

Como material de estudo, utilizou-se sementes de *A. cearensis* provenientes do município de Anagé, BA. Foram testadas duas técnicas para obtenção de cromossomos mitóticos, a técnica de secagem ao ar, seguida de coloração com Giemsa a 2% e a técnica de esmagamento, empregando-se a coloração com Feugen a 2% e orceína acética a 2%.

Foi possível estabelecer um protocolo para a obtenção dos cromossomos de amburana, bem como uma contagem prévia do número de cromossomos ($2n= 22$ cromossomos). Porém, foram verificadas anormalidades nas células meristemáticas.

Palavras-chave: Citogenética; Cromossomos; Cumarina.

Apoio financeiro: FAPESB.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UESB.

Introdução:

A família Fabaceae compreende aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies. Pertencente à subfamília Papilionoideae, *Amburana cearensis* A.C. Smith, também conhecida como imburana-de-cheiro, cerejeira e cumaru, é uma árvore frondosa, de caule ereto, sendo típica da caatinga, especialmente do Ceará. Embora

nativa do sertão nordestino brasileiro, *A. cearensis* pode ser encontrada em praticamente toda a América do Sul (do Peru à Argentina), sendo característica de floresta estacional (MELLO et al. 2013). Suas raízes, entrecasca e sementes, produzem a cumarina, princípio ativo utilizado pela cultura popular no tratamento de problemas respiratórios e que, em vegetais, podem expressar ação fitotóxica, genotóxica e mutagênica (MELO et al. 2013).

Estudos genéticos são relevantes para a melhor caracterização desta espécie, auxiliando desta forma os programas de conservação e melhoramento florestal. O número, assim como a morfologia dos cromossomos são características amplamente utilizadas na citogenética (Guerra, 2002) e citotaxonomia vegetal e, juntamente com outras características citológicas, auxiliam no entendimento de variações genéticas envolvidas na evolução de um grupo, como também na delimitação taxonômica mais clara de espécies (Pedrosa et al., 1999).

Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo estabelecer um protocolo eficiente na obtenção de cromossomos, a fim de subsidiar estudos direcionados a determinação do número de cromossomos presentes em *A. cearensis* para futura confecção do cariótipo da mesma, dados que serão inéditos e que poderão subvencionar programas de conservação e de melhoramento genético desta importante espécie ameaçada de extinção.

Metodologia:

O experimento foi conduzido no Laboratório de Citogenética do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, entre Agosto/2015 e Julho/2016.

Sementes de *A. cearensis* foram colocadas para germinar em placas de Petri com papel filtro umedecido em água destilada a temperatura ambiente. As radículas com 0,5 a 1,0 cm de comprimento foram submetidas a testes utilizando dois antimitóticos (colchicina e

8-hidroxiquinoleína (8HQ)) em diferentes concentrações, temperaturas e tempos de exposição, que variaram de 2 a 24 horas de duração em temperatura ambiente, em temperatura de geladeira (aproximadamente 5°C) e pela combinação de períodos iniciais de incubação em temperatura ambiente com posterior transferência para geladeira. Após os tratamentos, as radículas foram lavadas em água destilada com três trocas de 5 min cada e fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de álcool etílico P.A. : 1 parte de ácido acético glacial) com 3 trocas a intervalos de 15 min cada e armazenadas em geladeira por 24h. Após este período, transferiram-se as radículas para eppendorf de 2,0 mL contendo etanol 70%, estocando-as em geladeira até o momento de utilização.

Para a determinação do tempo de exposição ideal ao HCl 1N a 60°C, para a realização da hidrólise, foram testados tempos variando de 8 a 20 minutos. As radículas fixadas passaram por duas lavagens em água destilada com intervalo de 5 min cada e, na sequência, transferidas para eppendorf contendo ácido clorídrico (HCL) 1N pelo tempo e temperatura citados. Após este período, as radículas foram submetidas a choque térmico em água destilada gelada para interromper a hidrólise.

Com relação ao preparo das lâminas foram testadas duas técnicas. A primeira, conhecida como “técnica de secagem ao ar” e adaptada para plantas por Carvalho & Saraiva (1993). Nesta etapa, realizou-se a dissociação celular do meristema radicular em solução fixadora, secagem ao ar em movimentos rápidos, e em placa aquecedora a 50°C. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa a 2% em uma cubeta por 5 min a temperatura ambiente, lavadas duas vezes em água destilada e secas ao ar e em placa aquecedora a 50°C.

A segunda a ser testada foi a técnica de esmagamento, com coloração em Feugen a 2% como também em orceína acética a 2% (Guerra, 2002). Neste último, as raízes foram retiradas do fixador e postas ligeiramente em papel filtro, em seguida, foram transferidas para o vidro relógio com orceína acética (corante específico para DNA) por 20 min. Após este período, realizou-se o esmagamento entre lâmina e laminula da ponta da raiz em uma gota de ácido acético 45% (squash).

A observação das lâminas foi realizada em microscópio com iluminação de campo claro. As imagens de interesse foram capturadas por câmera digital.

Resultados e Discussão:

Determinação de protocolo para obtenção de cromossomos de amburana

As investigações realizadas permitiram determinar que o antimetabólico mais adequado para a espécie foi o 8-hidroxiquinoleína a uma concentração de 0,002 M, acrescido de 15 gotas de DMSO em 100 ml do antimetabólico, com um tempo de exposição de 4:30 h e em temperatura ambiente.

O tempo mais apropriado para hidrólise das células, possibilitando um amolecimento adequado das radículas e um esmagamento mais uniforme das mesmas, foi de 20 min a 60°C em HCl 1N.

Com relação às técnicas de preparação das lâminas, a técnica de esmagamento foi a que permitiu a obtenção de um maior número de células meristemáticas nas lâminas, embora a técnica de secagem ao ar tenha permitido um maior espalhamento das mesmas.

Quanto à coloração, embora o Feulgen tenha possibilitado uma coloração mais adequada e nítida do DNA nuclear, a limitação de recursos para a obtenção de reagentes necessários para o preparo do mesmo gerou a necessidade de realizar testes utilizando giemsa 2% e orceína acética 2%, os quais também permitiram uma boa coloração diferencial do DNA, embora com qualidade inferior ao observado com o corante Feulgen a 2% por 2 horas.

Análises citogenéticas

Para as análises citogenéticas, as lâminas contendo as células meristemáticas de *A. cearensis* submetidas à técnica de esmagamento e coradas em orceína acética a 2% por 20 min foram vasculhadas pelo método de varredura ao microscópio óptico.

O protocolo estabelecido possibilitou a obtenção de metáfases mitóticas (Figura 1 A), estima-se aproximadamente 22 cromossomos. A observação de células metafásicas, com ou sem bloqueio, mostrou-se um evento muito raro, bem como a presença de células em outras fases da divisão. Porém, de modo inesperado, foram observadas um grande número de cromossomos pegajosos (1B) e núcleos pegajosos, anormais que sugerem perda de proteínas (Figura 1C a 1G).

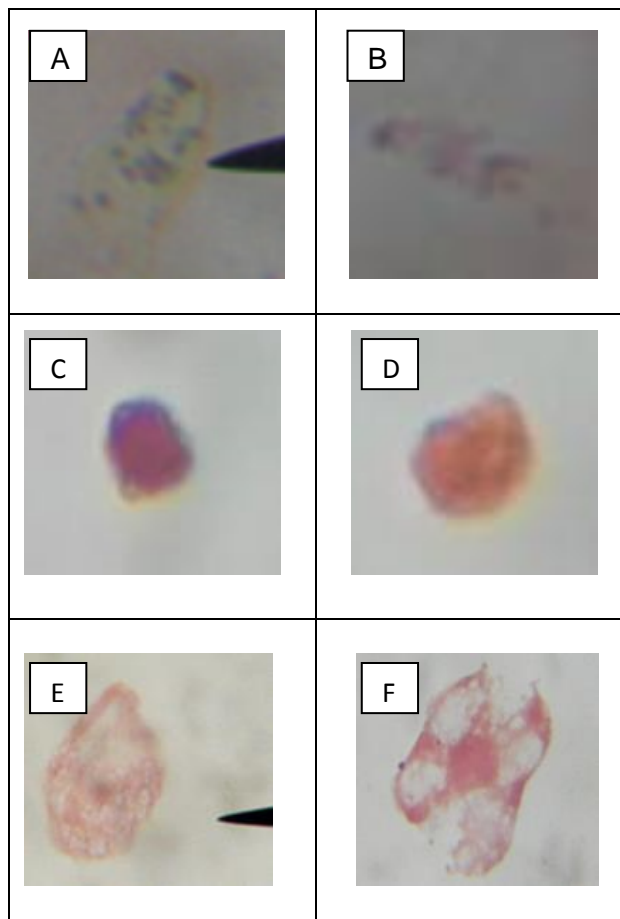


Figura 1. Microfotografias das células meristemáticas das raízes de *Amburana cearensis*. 1A – Metáfase mitótica apresentando uma estimativa de 22 cromossomos; 1B - Presença de cromossomos pegajosos; (1C e 1D) - Núcleos meristemáticos pegajosos e de morfologia anormal e (1E e 1F) - Núcleos meristemáticos de morfologia e aspecto anormal, sugerindo perda de proteínas.

Pelo exposto até o momento, podemos pressupor, baseados em relatos científicos, que as alterações observadas neste estudo quanto à aparente diminuição da divisão celular da amburana, refletida por uma maior concentração de núcleos interfásicos, sejam decorrentes da ação alelopática de seus compostos fenólicos, como a cumarina, e que a ruptura de um sistema de funcionamento celular equilibrado, pela excisão da radícula sob este controle, possa ter levado às suas células a um colapso, o que poderia envolver o rompimento dos vacúolos (que armazenam estes compostos) e extravasamento intracelular dessas substâncias fitotóxicas, ocasionando, assim, uma autotoxicidade de suas células, o que poderia acarretar uma inibição de sua proliferação celular e a verificação de anormalidades nas mesmas. Estas dificuldades em obter células em divisão talvez expliquem a ausência de dados relacionados a estudos citogenéticos da espécie na literatura.

Dias et al. (2014) observaram inibição da divisão celular, indicando atividade anti proliferativa, bem como a produção de aberrações cromossômicas em *A. cepa* pela exposição a extratos aquosos de *Mikania cordifolia*, a qual apresenta a produção de cumarina, além de outros produtos tóxicos. Resultados semelhantes foram observados por Dalla Nora et al. (2010) em extratos aquosos de *Mikania glomerata* Spreng nas concentrações de 4g/L e 16g/L em *A. cepa*, devido à grande quantidade de cumarina e outros compostos fenólicos.

Conclusões:

Foi possível estabelecer um protocolo para obtenção de cromossomos somáticos em amburana, sendo que, após um refinamento da técnica, será possível sua utilização como método padrão para a caracterização citogenética da espécie.

A técnica permitiu uma estimativa do número somático de 22 cromossomos.

Foram observadas anormalidades nos núcleos meristemáticos, bem como uma aparente inibição da atividade mitótica, fenômenos que precisam ser investigados e que podem estar relacionados à presença de cumarina nas radículas da amburana.

Referências bibliográficas

CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotechnic & Histochemistry*, Los Angeles, n.68, p.142-145, 1993.

DALLA NORA, G. et al. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). *Biocell*, v.34, n.3, dic. 2010.

DIAS, M.G.; Canto-Dorow, T.S.; Coelho, A.P.D.; Tedesco, S.B. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. *Rev. bras. plantas med.* vol.16 no.2 Botucatu, 2014.

GUERRA, M. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal, e humana / Marcelo Guerra, Maria José de Souza. -- Ribeirão Preto, SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002.

MELLO, V. S.; VIEIRA, A.; MIRANDA, D. P.; TEIXEIRA, A. D.; KARSBURG, I. V. Genotoxicidade da Infusão de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. Pelo Sistema Teste *Allium cepa*. In: I SEMINÁRIO DE

BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS
AMAZÔNICOS, 2013, Alta Floresta. Genética
e melhoramento, 2013.

PEDROSA, A.; GITAÍ, J.; SILVA, A.E.B.;
FELIX, L.P.; GUERRA, M. Citogenética de
angiospermas coletadas em Pernambuco.
Acta Táxonotry Brasília, São Paulo, n.13,
p.49-60, 1999.