

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

PROJETO DE PESQUISA

Edital 04.2022

**Evolução cariotípica em Anacardiaceae Lindl. e
estudos citogenéticos e reprodutivos em duas espécies
do gênero *Schinus* L.**

Área do conhecimento: Botânica aplicada.

São Bernardo do Campo (SP)

2022

Resumo

As espécies *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolia* Raddi pertencem à família Anacardiaceae Lindl., são nativas da América do Sul e popularmente conhecidas em razão de seu uso agrônômico e paisagístico. Ademais, estas espécies são valorizadas pela qualidade de seu lenho, pelo uso de seus frutos na culinária, pelo uso industrial de suas resinas e por seus potenciais medicinais. Entretanto, informações citogenéticas para este gênero são escassas e restritas a contagens de cromossomos. Este projeto propõe caracterizar o perfil citogenético, através de técnicas de citogenética clássica e bandamento com fluorocromos CMA/DAPI, e reprodutivo, com a análise do processo de microsporogênese e de viabilidade polínica, de ambas as espécies, juntamente com uma revisão sistemática de informações kariotípicas da família e do gênero, comparando-as e analisando-as com as mais recentes revisões de sua filogenia.

Palavras-chave: Anacardiaceae; cariótipo; citotaxonomia; microsporogênese; *Schinus*.

Abstract

The species *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolia* Raddi belong to the family Anacardiaceae Lindl., they are native to South America and they are popularly known due to their agronomic and landscaping use. Moreover, these species are valued for the quality of their wood, the use of their fruits in cuisine, the industrial use of their resins and their medicinal potentials. However, cytogenetic information about this genus is scarce and restricted to chromosome counts. This project proposes to feature the cytogenetic, through classical cytogenetic techniques and banding with CMA/DAPI fluorochromes, and reproductive, with the analysis of the microsporogenesis process and pollen viability, profile of both species, along with a systematic review of karyotypic information of their family and genus, comparing and analyzing them to their most recent phylogenetic reviews.

Keywords: Anacardiaceae; cytotaxonomy; karyotype; microsporogenesis; *Schinus*.

1. INTRODUÇÃO

A família Anacardiaceae Lindl. compreende 81 gêneros e cerca de 800 espécies com distribuição pantropical. Trata-se de uma família bem conhecida em razão de seu valor econômico, que inclui o cultivo de muitos frutos, tais como a manga (*Mangifera indica* L.), o cajú (*Anacardium occidentale* L.), o pistache (*Pistacia vera* L.), o cajá (*Spondias mombim* L.), dentre outros (Mitchell et al., 2022). Apesar disso, não há na literatura um estudo de revisão sobre suas características citogenéticas.

O gênero *Schinus* L. é popularmente usado no paisagismo e constitui cerca de 33 espécies, em sua maioria endêmicas da América do Sul. Dentre elas, destacam-se a aroeira-salsa (*Schinus molle* L.) e a aroeira-vermelha ou pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolia* Raddi). A espécie *S. molle* é uma árvore de altura mediana e nativa dos Andes peruanos, atualmente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. A espécie *S. terebinthifolia* é nativa do Brasil, mas com ampla distribuição pela América do Sul, tendo sido também introduzida em diversas partes do mundo. Aliás, a espécie é considerada uma problemática planta invasora em muitos países (Wheeler et al., 2016), incluída entre as espécies invasoras com maior impacto do mundo (ISSG, 2013). Ambas as espécies são dioicas, porém Iponga (2010) constata a ocorrência de flores hermafroditas, com potencial autofecundação em *S. molle*.

Além disso, este gênero também é usado como condimento aromático e na produção de óleos essenciais (Feuereisen et al., 2014). Diversos estudos evidenciam propriedades medicinais para seus extratos, com ações antioxidantes, antibióticas, antifúngicas e anti-inflamatórias (D'Sousa-Costa et al., 2015; Fedel-Miyasato et al., 2014; Rosário-Martins et al., 2014; El-Nashar et al. 2021). Informações citológicas e de biologia reprodutiva são escassas para espécies nativas brasileiras com potencial medicinal, tais informações são fundamentais para a prática de programas de melhoramento de espécies vegetais, bem como para o estabelecimento de Bancos de Germoplasma destas espécies.

Apesar de sua importância econômica, medicinal e ecológica, o gênero *Schinus* conta com poucos estudos citogenéticos. Somente três de suas espécies têm registros de número cromossômico, no entanto estas apresentam variações intra e interespecíficas em número (Tab. 1). Estas contagens indicam um número cromossômico básico de $x = 14$ ou 15 , o que implica na ocorrência de eventos de disploidia/aneuploidia e poliploidia ao longo da história evolutiva do grupo.

Tabela 1: Espécies de *Schinus* com registro de número cromossômico haploide (n) e diploide (2n) na literatura, com respectiva referência.

Espécie	n	2n	Referência
<i>Schinus molle</i> L.		28	Schnack & Covas 1947
		30	Coopland 1959
<i>S. polygama</i> (Cav.) Cabrera		28	Schnack & Covas 1947
<i>S. terebinthifolia</i> Raddi	30		Sarkar et al. 1973
		28	Pedrosa 1999
		60	Sarkar et al. 1973

Fontes: IPCN Chromosome Reports (<http://legacy.tropicos.org/Project/IPCN>) e Chromosome Counts Database (<http://ccdb.tau.ac.il>).

Análises citogenéticas têm contribuído decisivamente para a determinação de hipóteses filogenéticas e para o entendimento da sistemática dos grupos estudados. Nos estudos citogenéticos procura-se definir as características do complemento cromossômico (cariótipo), como o número cromossômico, morfologia dos cromossomos e características de bandamento destes cromossomos. Mais recentemente técnicas de biologia molecular foram introduzidas nos estudos citogenéticos, a fim de se detalhar o máximo possível a constituição dos cromossomos e definir com maior acuidade as variações cariotípicas entre espécies próximas (Cordeiro *et al.*, 2016).

Para as análises de número cromossômico e da morfologia dos cromossomos metafásicos são utilizadas técnicas convencionais de coloração, com observação em microscopia de luz. Técnicas de bandamento com fluorocromos têm se mostrado úteis no refinamento do cariótipo obtido pelas técnicas clássicas de citologia. Dentre os fluorocromos utilizados nestas técnicas de bandamento destacam-se o DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol), que evidencia regiões cromossômicas ricas em bases AT, e o CMA (cromomicina A3), que evidencia regiões ricas em bases GC (Schweizer, 1976; Dash et al., 2017).

Este projeto representa a segunda fase de um projeto de iniciação científica iniciado em 2021. Devido à pandemia de coronavírus foi realizada até o momento apenas o levantamento bibliográfico buscando apresentar o estado da arte da citogenética para toda a família Anacardiaceae. Nesta fase serão buscados para os estudos de cariomorfologia de duas espécies do gênero *Schinus*, *S. molle* e *S. terebinthifolius*, previstos no projeto inicial submetido em 2021, e que somente seria realizado no momento em que os alunos tivessem acesso aos laboratórios de pesquisa. Para estas análises, além da contagem de número cromossômico e do registro da morfologia dos cromossomos metafásicos serão utilizadas técnicas convencionais de coloração, bem como técnicas de bandamento com fluorocromos DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol), que evidencia regiões cromossômicas ricas em bases AT, e o CMA (cromomicina A3), que evidencia regiões ricas em bases GC.

Além de fornecer uma visão geral sobre a citogenética de Anacardiaceae, revisando os dados citológicos para as suas espécies, este projeto visa o treinamento do aluno nas técnicas de citogenética, e a sua introdução no ambiente de pesquisa em laboratório.

2. OBJETIVOS

O projeto tem o intuito de analisar a variação cromossômica numérica ocorrida dentro da família Anacardiaceae, buscando indicar seu número cromossômico básico x , isto é, o número cromossômico haploide observado em um dado táxon que explica parcimoniosamente as variações numéricas observadas neste grupo e em taxa relacionados (Guerra, 2000). Para isso, índices de números cromossômicos em plantas são buscados por meio da internet. Além disso, o projeto também visa analisar e comparar o cariótipo de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolia* Raddi.

A partir deste estudo será possível estabelecer os primeiros registros cariomorfológicos para o gênero *Schinus* L., obtendo-se assim seu perfil citogenético. Os processos citológicos envolvidos na derivação cariotípica da família Anacardiaceae serão investigados, baseados em possíveis variações de regiões heterocromáticas nos cariótipos. Tais variações serão procuradas na literatura e, se houver, durante as próprias observações laboratoriais.

3. METODOLOGIA

3. 1. Revisão bibliográfica

Será feita uma revisão bibliográfica sistematizada de artigos científicos, trabalhos de conclusão de curso, dissertações e teses sobre as características citogenéticas das espécies de Anacardiaceae. Estes trabalhos serão obtidos através da busca de palavras-chaves no Pubmed, Scielo e Google Acadêmico.

3. 2. Análise de dados

Serão reunidas todas as contagens de números cromossômicos registradas para as espécies de Anacardiaceae até o momento, utilizando os registros dos sites Chromosome Counts Database (<http://ccdb.tau.ac.il>) e IPCN Chromosome Reports (<http://legacy.tropicos.org/Project/IPCN>). Estes dados serão compilados em tabelas e gráficos, diferenciando as contagens para cada gênero, clado e para a família toda e identificando os números cromossômicos básicos x em cada táxon. Além disso, serão apontadas as características cariomorfológicas predominantes para as espécies de Anacardiaceae registradas nos trabalhos publicados de citogenética.

3. 3. Coleta de material e pré-tratamento das raízes

As coletas serão realizadas em uma praça pública do Município de Campinas (SP), onde a espécie *S. terebinthifolia* é ocorrente e o acesso é permitido; bem como o de *S. molle* em via pública do Município de Ribeirão Pires (SP), sendo coletadas flores de indivíduos masculinos e frutos de indivíduos femininos de ambas as localidades. Do material vegetal coletado, uma amostra com flores será herbarizada e sua exsiccata será adicionada ao herbário UFABC para futuras identificações e confirmações.

Para análise meiótica, serão coletados botões florais em diferentes estágios de maturação, que serão imediatamente fixados em solução Carnoy (3 partes de álcool absoluto: 1 parte de ácido acético glacial, v/v) por 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida, eles serão transferidos para etanol 70% e estocados no freezer a -20° C.

As análises de cariótipo serão feitas a partir do meristema apical de raízes recém-germinadas, com aproximadamente 1 cm de comprimento, e pré-tratadas com o agente anti-mitótico paradiclorobenzeno (PDB) em solução saturada por 3 a 5 horas a 16° C. A fixação deste material também será feita em solução de Carnoy à temperatura ambiente

por 24 horas. Posteriormente, o material fixado será transferido para uma solução de etanol 70% e acondicionado no freezer a -20° C.

3,4 Preparações citológicas para estudos da meiose e aferição do índice meiótico.

Dos botões florais fixados serão extraídas as anteras imaturas, que ainda não apresentem polens formados. Será utilizada a técnica de esmagamento de anteras no corante Carmim acético 1,2% segundo Medina & Conagin (1964). Será também aferido o índice meiótico, que é representado pela porcentagem de tétrades regulares formadas ao final da divisão meiótica (microsporogênese). As análises serão realizadas em microscópio de luz.

3. 5. Preparação das lâminas para estudos mitóticos

Serão empregados os procedimentos padrões de coloração com as pontas de raízes pré-tratadas, fixadas e hidrolisadas em ácido clorídrico 1N, esmagadas em ácido acético 45% e coradas com Giemsa 2%, visando à contagem de seus números cromossômicos e análise de sua morfologia, segundo Guerra & Souza (2002).

3. 6. Bandeamento com fluorocromos CMA/DAPI

Após o preparo das lâminas para estudos mitóticos, estas serão coradas com os fluorocromos CMA (Cromomicina A3) e DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) segundo os protocolos de Schweizer & Ambros (1994). As lâminas serão então analisadas em fotomicroscópio de fluorescência com sistema de análise de imagens acoplado.

3. 7. Análise e apresentação dos dados

A partir das preparações convencionais a serem observadas em microscopia de luz, serão analisadas, no mínimo, 10 células em condições ideais. Dentre elas, as melhores serão documentadas em Analisador de Imagem. A análise dos materiais será baseada nas imagens resultantes das técnicas convencionais. Através destas imagens, as medidas dos cromossomos e o posicionamento dos sítios marcados possibilitarão a confecção do idiograma cromossômico, com a esquematização das bandas coradas pelos fluorocromos. Calcularemos valores médios das taxas de viabilidade polínica e índice meiótico, e estes serão apresentados juntamente com suas respectivas variâncias e coeficientes de variação.

4. VIABILIDADE DO PROJETO

A equipe de trabalho será composta pelo estudante e seu orientador. A revisão de literatura e a análise dos dados obtidos serão realizadas pelo estudante em sua própria residência ou em sala disponibilizada pela universidade com computador e acesso à Internet. As coletas de material vegetal serão realizadas durante o período de floração e frutificação pelo orientador no Município de Campinas (SP) e pelo estudante no Município de Ribeirão Pires (SP). As técnicas laboratoriais serão realizadas no Laboratório de Evolução e Diversidade do Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH) da Universidade Federal do ABC (UFABC), no campus de São Bernardo do Campo. Este laboratório se encontra suficientemente equipado para a realização de todas as técnicas propostas neste projeto. Para a identificação dos materiais, serão consultados especialistas em taxonomia de Anacardiaceae do Instituto de Botânica de São Paulo e do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo.

5. CRONOGRAMA

Fases	1º trim	2º trim	3º trim	4º trim
Levantamento bibliográfico	X			
Coleta de materiais	X	X		
Germinação de sementes	X	X		
Preparo de lâminas	X	X	X	
Observação dos materiais		X	X	X
Preparo do relatório			X	X
Preparo do artigo				X

6. REFERÊNCIAS

- Alexander M.P. 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology* 55: 13-18.
- Ariyathne M., Yakandawala D., Barfuss M., Heckenhauer J., Samuel R. 2020. Molecular phylogeny and chromosomal evolution of endemic species of Sri Lankan Anacardiaceae. *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka* 48(3): 289-303. DOI: 10.4038/jnsfsr.v48i3.9368..
- Barkley F.A. 1957. A study of *Schinus* L. *Lilloa*, 4-110.
- Barroso M.S.T., Villanueva G., Lucas A.M., Pérez G.P., Vargas R.M.F., Brun G.W., Cassel E. 2011. Supercritical fluid extraction of volatile and non-volatile compounds from *Schinus molle* L. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28: 305-312.
- Dash C.K., Afroz M., Sultana S S., Alam S.S. 2017. Conventional and fluorescent karyotype analysis of *Ocimum* spp. *Cytologia*, 82(4): 429-434.
- D'Sousa'Costa C.O., Ribeiro P.R., Loureiro M.B., Simões R.C., de Castro R.D., Fernandez L. G. 2015. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. *Pharmacognosy Magazine*, 11(43): 607.
- El-Nashar H.A., Mostafa N.M., Abd El-Ghffar E.A., Eldahshan O.A., Singab A.N.B. 2021. The genus *Schinus* (Anacardiaceae): a review on phytochemicals and biological aspects. *Natural Product Research*: 1-19.
- Fedel-Miyasato L.E., Kassuya C.A., Auharek S.A., Formagio A.S., Cardoso C.A., Mauro M. O., Oliveira R.J. 2014. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24: 565-575.
- Feuereisen M.M., Hoppe J., Zimmermann B.F., Weber F., Schulze-Kaysers N., Schieber A. 2014. Characterization of phenolic compounds in Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) Exocarp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(26): 6219-6226.
- Guerra M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and molecular biology*, 23: 1029-1041.

- Guerra M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome research*, 120(3-4): 339-350.
- Guerra M., Souza M.J. 2002. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto. FUNPEC.
- Guimarães R., Forni-Martins E.R. 2021. Chromosome numbers and their evolutionary meaning in the Sapindales order: an overview. *Brazilian Journal of Botany*: 1-15.
- Iponga, D. M. 2010. Seed set of the invasive tree *Schinus molle* (Anacardiaceae) in semi-arid savanna, South Africa: The role of pollinators and selfing. *Journal of Arid Environments*, 74(3): 414-416.
- ISSG, 2013. Disponível em <<http://issg.org/database/reference/countries.asp>>.
- Medina D.M., Conagin C.H.T.M. 1964. Técnica citológica. Publicação 2610. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 107 pp.
- Mitchell J.D., Pell S.K., Bachelier J.B., Warschefsky E.J., Joyce E.M., Canadell L.C., Coiffard C. 2022. Neotropical Anacardiaceae (cashew family). *Brazilian Journal of Botany*: 1-42.
- Pell S.K. 2004. Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae). Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College.
- Pell S.K., Mitchell J.D., Miller A.J., Lobova T.A. 2010. Anacardiaceae. In *Flowering Plants. Eudicots* (pp. 7-50). Springer, Berlin, Heidelberg.
- do Rosário Martins, M., Arantes, S., Candeias, F., Tinoco, M. T., & Cruz-Morais, J. (2014). Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1): 485-492.
- Schweizer D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with Cromomicin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307-354.
- Schweizer D., Ambros P.F. 1994. Chromosome banding. In *Chromosome analysis protocols* (pp. 97-112). Humana Press.
- Weeks A., Zapata F., Pell S.K., Daly D.C., Mitchell J.D., Fine P.V. 2014. To move or to evolve: contrasting patterns of intercontinental connectivity and climatic niche evolution in “Terebinthaceae” (Anacardiaceae and Burseraceae). *Frontiers in Genetics*, 5, 409.
- Wheeler G.S., Mc Kay F., Vitorino M.D., Manrique V., Diaz, R., Overholt W.A. 2016. Biological control of the invasive weed *Schinus terebinthifolia* (Brazilian Peppertree): a review of the project with an update on the proposed agents. *Southeastern Naturalist*, 15(8): 15-34.