

# **Universidade Federal do ABC**

Edital(PIC/PIBIC/PIBITI)

Localização de marcadores citogenéticos no cariótipo de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae), espécie nativa com potencial medicinal.

**Área de conhecimento do projeto:** Botânica aplicada.

São Bernardo do Campo – SP

2022

## RESUMO

O gênero *Gustavia* L. é o segundo mais numeroso da família *Lecythidaceae*, com cerca de 40 espécies distribuídas pelas regiões de Mata Atlântica e Amazônica. A espécie nativa brasileira *Gustavia augusta* L., popularmente conhecida como jeniparana, destaca-se pela elevada frequência de indivíduos ocorrentes na Mata Atlântica, sendo bastante utilizada no paisagismo urbano. A polpa de seus frutos é comestível, sendo muito apreciada e consumida nos países amazônicos. Estudos têm apresentado potencial medicinal para seus extratos, tais como efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e úteis no tratamento da leishmaniose. Apesar de sua importância ornamental e farmacológica poucos estudos abordando aspectos citogenéticos foram apresentados até hoje para espécies de *Gustavia*, trazendo a literatura apenas o número cromossômico quatroestas espécies, com considerável variação inter e intraespecífica de números cromossômicos. Não há qualquer referência a seus cariótipos e a dados citomoleculares. Para suprir esta lacuna de informações este projeto pretende analisar as características morfométricas dos cromossomos em divisão mitótica de *G. augusta*, bem como acompanhar o comportamento cromossômico durante o processo meiótico nos microsporócitos, visando analisar sua regularidade e aferir a viabilidade polínica da espécie. A metodologia a ser empregada envolverá técnicas de citologia clássica para a análise cariomorfológica, incluindo bandamento diferencial com os fluorocromos CMA e DAPI, e da microsporogênese. A partir destes dados buscaremos também identificar possíveis tendências filogenéticas, como o número cromossômico básico para o gênero *Gustavia*, além de fornecer informações para futuros programas de melhoramento e manejo da espécie *G. augusta*.

**Palavras-chave:** bandamento cromossômico, cariótipo, citogenética, meiose, número cromossômico básico.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Gustavia* L. é o segundo mais numeroso da família *Lecythidaceae*, com cerca de 40 espécies distribuídas pelas regiões de Mata Atlântica e Amazônica (Silva *et al.*, 2014). A espécie arbórea nativa brasileira *Gustavia augusta* L. (Fig.1), popularmente conhecida como jeniparana, destaca-se pela elevada frequência de indivíduos ocorrentes na Mata Atlântica, por suas características botânicas, sua larga distribuição e por seus constituintes químicos (Souza *et al.*, 2001). A polpa de seus frutos é comestível, sendo bastante apreciada nos países amazônicos (García-Torrez *et al.*, 2009). Estudos têm apresentado potencial medicinal para seus extratos, tais como efeitos antioxidantes (García-Torrez *et al.*, 2011), anti-inflamatórios e úteis no tratamento da leishmaniose (Souza *et al.*, 2001).



**Figura 1.** Imagens de *Gustavia augusta* em Campinas-SP. A- indivíduo utilizado no paisagismo urbano; B- detalhe de sua flor; C- ramo com frutos (Fonte: Lombello R.A.).

Em virtude da importância das plantas com potencial medicinal, programas de pesquisa têm sido estabelecidos pelo mundo, como a National Cooperative Natural Products Drug Discovery Groups, sob o amparo do National Cancer Institute dos Estados Unidos e o Programa de Pesquisas com Plantas Medicinais (PPPM), organizado pela Central de

Medicamentos (CEME), visando ampliar os conhecimentos fisiológicos, fitoquímicos e taxonômicos de grupos de plantas medicinais, bem como encontrar novas substâncias com potencial fitoterápico e estabelecer sua eficácia e formas de controle e comercialização (Portela *et al.*, 2010). No Brasil a produção de fitoterápicos está normalizada pela Resolução RDC 14/10 de 2010, que dispõe sobre os seus registros (Brasil, 2010). Levantamentos recentes apontam para um mercado de US\$ 260 milhões anuais apenas no Brasil, e aproximadamente US\$ 27 bilhões no mundo todo (Dutra *et al.*, 2016).

Os estudos taxonômicos são de fundamental importância neste campo, pois a determinação exata das espécies estudadas é necessária para fins de normatização da produção e comercialização, bem como no processo de desenvolvimento de novas cultivares. Além dos estudos taxonômicos, o conhecimento da biologia reprodutiva das espécies estudadas e a definição das características citogenéticas têm também papel fundamental na obtenção de cultivares melhoradas destas espécies, e na definição dos direitos de propriedade intelectual sobre as novas descobertas (Heinrich *et al.*, 2017).

O estudo dos caracteres citogenéticos tem 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 e a morfologia dos cromossomos, aferindo-se o comprimento dos braços cromossômicos e a posição relativa do centrômero, bem como características de bandamento diferencial destes cromossomos. Para as análises de número cromossômico e cariomorfologia são utilizadas técnicas convencionais de coloração, com observação em microscopia de luz. Para a análise de bandas cromossômicas heterocromáticas algumas técnicas têm se mostrado bastante eficientes, como as que utilizam os fluorocromos Cromomicina A<sub>3</sub>(CMA) e DAPI, que evidenciam regiões ricas em bases GC e AT, respectivamente (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2011), e são observadas em microscopia de fluorescência.

Dentre todas as informações obtidas dos estudos citogenéticos, a mais informativa é a contagem de números cromossômicos, tanto na fase diplóide quanto haplóide. Utilizando-se as contagens cromossômicas, diversos estudos ratificaram ou retificaram posicionamentos taxonômicos (Guerra, 2007), bem como inferiram processos evolutivos e delinearam árvores filogenéticas de grupos (García *et al.*, 2016). O refinamento das informações cariotípicas, com a diferenciação vertical dos cromossomos do complemento baseada na morfologia dos cromossomos, tem sido bastante útil na análise da evolução de grupos com baixa ou nenhuma variabilidade cromossômica numérica (Schubert & Vu, 2016). Além destas características citológicas básicas, as técnicas citogenéticas de diferenciação horizontal dos cromossomos, como as de bandamento CMA/DAPI, permitem aprofundar as análises sistemáticas, bem como a inferência dos processos evolutivos envolvidos na derivação dos cariótipos dos grupos (Vaio *et al.*, 2016).

Dentre as quarenta espécies pertencentes ao gênero *Gustavia*, há na literatura registro de contagem de número cromossômico apenas para quatro (Tabela 1), com variações de número básico entre as espécies e ocorrência de poliploidia intraespecífica em *G. augusta*. Não há registro de estudos com bandamento fluorescente e nem mesmo de dados cariomorfológicos para nenhuma das espécies do gênero.

Desta forma, o presente projeto busca apresentar dados cariomorfológicos (número cromossômico diploide e idiograma cromossômico, com localização de bandas CMA/DAPI) e da microsporogênese (análise das fases da meiose, índice meiótico e viabilidade polínica) para *G. augusta*, além de investigar o mais provável número cromossômico básico para o gênero e, baseado nos dados cariomorfológicos obtidos, inferir quais os processos envolvidos na derivação do cariótipo da espécie.

**Tabela 1.** Espécies de *Gustavia* L. com registro de número cromossômico (n e 2n) na literatura, com respectiva referência. Fonte: Chromosome Counts Database (<http://ccdb.tau.ac.il>).

Espécie	n	2n	Referência
<i>Gustavia angustifolia</i> Benth.	17	-	Kowal R.R. 1989.
<i>G. augusta</i> L.	18	36	Sarkar A.K. 1983.
	36	-	Sarkar A.K. et al. 1978.
	-	72	Sarkar A.K., Datta N. 1983.
<i>G. dubia</i> (Kunth) O. Berg	17	-	Kowal R.P., Mori S.A., Kallunki J. 1977.
<i>G. superba</i> (Kunth) O. Berg	34	-	Kowal R.P., Mori S.A., Kallunki J. 1977.

## 2. JUSTIFICATIVA PARA O PROJETO

Os estudos citogenéticos estão entre as ferramentas mais importantes para a determinação taxonômica e para o entendimento dos processos envolvidos na evolução dos grupos. A análise das características cariomorfológicas tem sido bastante útil para a sistemática vegetal, pois o cariótipo é sem dúvida o caractere taxonômico mais conservado de uma espécie e também o menos sujeito às variações ambientais.

Em virtude da falta de informações da biologia reprodutiva e da cariomorfologia da espécie ornamental e com potencial medicinal *Gustavia augusta*, o acompanhamento dos processos envolvidos na reprodução, como a viabilidade dos polens, a regularidade do processo de microsporogênese, além da caracterização citogenética, com dados de número e morfologia cromossômica, tornam-se fundamentais para situá-la taxonomicamente de forma precisa e para a compreensão dos eventos cariológicos envolvidos na derivação das espécies do grupo.

Além de fornecer dados citológicos e reprodutivos da espécie coletada, este projeto visa o treinamento da aluna nas técnicas de citogenética vegetal, além de prepará-la para realizar o acompanhamento do início do processo reprodutivo, analisando as fases da meiose nas anteras das espécies coletadas.

### 3. OBJETIVOS DO PROJETO

- Caracterizar citogeneticamente a população de *Gustavia augusta* localizada na cidade de Campinas-SP;
- Acompanhar o processo de divisão meiótica, viabilidade polínica e capacidade de germinação de sementes nos indivíduos desta população.
- Realizar ensaios de diferenciação horizontal entre os cromossomos de *G. augusta*.
- Treinar uma aluna do Curso de Graduação em Ciências Biológicas nas técnicas de citogenética vegetal clássica e molecular.

### 4. MATERIAIS EMÉTODOS

#### 4.1 *Material vegetal e preparação das lâminas*

O material será coletado de indivíduos de *G. augusta* encontrados no município de Campinas-SP. Materiais vegetais com estruturas reprodutivas serão coletados dos indivíduos analisados, sendo este material prensado e seco em câmara de secagem, para a posterior introdução no Herbário da UFABC. Para os estudos dos processos envolvidos na formação dos polens botões florais em diferentes estádios de maturação serão coletados e fixados em solução Carnoy (álcool/ácido acético 3:1; v/v). Para a análise do cariótipo em metáfases somáticas serão coletadas sementes maduras dos indivíduos, que serão germinadas em placas de petri com água destilada. As radículas recém-emergidas serão pré-tratadas com solução anti-mitótica de paradiclorobenzeno (PDB) em solução saturada por 3-5 horas a temperatura de 14-16° C. Após este tratamento as radículas serão fixadas em solução Carnoy e estocadas a – 20° C.

#### 4.2 *Preparação do idiograma cromossômico*

Os idiogramas cromossômicos serão confeccionados a partir das medidas de 10 células em metáfase mitótica, sendo aferidos os comprimentos médios dos pares cromossômicos,

comprimento total cromatínico (CTC), posição relativa dos centrômeros e índice centromérico (i.c.). Estas medidas serão aferidas através de imagens capturadas no fotomicroscópio de fluorescência com sistema de captura e análise de imagens pertencente ao Laboratório de Evolução e Diversidade da UFABC.

#### ***4.3 Preparação das lâminas para estudos mitóticos.***

A princípio serão realizados os procedimentos de coloração padrão, com pontas de raízes pré-tratadas, fixadas e hidrolisadas em HCl1M, esmagadas em ácido acético 45% e coradas com Giemsa 2%, segundo Guerra & Souza (2002), visando a contagem de seu número cromossômicos e análise da morfologia dos cromossomos.

#### ***4.4 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.

#### ***4.5 Teste de viabilidade dos polens.***

De botões florais frescos em estágio de pré-antese serão extraídas anteras que apresentem polens já formados. Para a observação da viabilidade dos polens será utilizada técnica de coloração específica segundo Alexander (1980). Serão contados os polens viáveis e inviáveis de 10 campos aleatórios de cinco lâminas, em objetiva de magnitude 25x, sendo destes dados extraídas as taxas de viabilidade dos polens para cada espécie.



#### **4.6 Bandamento com fluorocromos CMA/DAPI**

Serão utilizadas as lâminas preparadas para estudos mitóticos. Estas serão coradas com os fluorocromos CMA (Cromomicina A<sub>3</sub>) e DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) segundo os protocolos de Shweizer (1976). As lâminas serão analisadas em fotomicroscópio de fluorescência com sistema de análise de imagens acoplado.

### **5. FORMA DE ANÁLISE E APRESENTAÇÃO DOS DADOS**

As preparações convencionais serão observadas em microscopia de luz. Analisaremos no mínimo 10 células em condições ideais. As melhores células serão documentadas via Sistema de Análise de Imagens associado ao microscópio. A análise dos materiais será baseada nas imagens resultantes das técnicas convencionais. As medidas dos cromossomos e o posicionamento dos sítios marcados obtidos através destas imagens possibilitarão a confecção de idiogramas cromossômicos da espécie analisada, com a esquematização das regiões marcadas relativas às bandas formadas pela utilização dos fluorocromos. Para a apresentação das taxas de viabilidade de polens e o índice meiótico calcularemos valores médios para os dados obtidos, que serão apresentados juntamente com suas respectivas variâncias e coeficientes de variação.

### **6. PLANO DE TRABALHO**

As coletas serão realizadas em indivíduos de *Gustavia augusta* de localização conhecida na cidade de Campinas-SP. O desenvolvimento das técnicas laboratoriais se dará no Laboratório de Evolução e Diversidade, CCNH/UFABC, Campus São Bernardo do Campo. Este laboratório encontra-se devidamente equipado para a realização de todas as técnicas propostas. A equipe de trabalho será composta pelo professor orientador e pelo estudante candidato. Para a confirmação da identificação dos materiais analisados serão consultados

especialistas em taxonomia do Instituto de Botânica de São Paulo e do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo.

## 7. CRONOGRAMA

Fases	1º tri.	2º tri.	3º tri.	4º tri.
Levantamento bibliográfico	X	X		
Coleta de Materiais	X	X	X	
Germinação de sementes	X	X	X	
Preparação das lâminas	X	X	X	X
Aplicação de FISH com sondas de rDNA		X	X	
Observação dos materiais		X	X	X
Preparação de relatórios		X		X
Preparação do Artigo				X

## 8. REFERÊNCIAS

- Alexander M.P. 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology* 55: 13-18.
- Brasil. 2010. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC no. 14, de 30 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*. Brasília, 5 abr. 2010b. Seção 1: 85-87.
- Dutra R.C., Campos M.M., Santos A.R., Calixto J.B. 2016. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, 112, 4-29.
- García D., Sotero V., Mancini D., Pavan Torres R., Mancini Filho J. 2011. Evaluación de la actividad antioxidante" In vivo" de tres frutos de la Amazonía: *Gustavia augusta* L.,

- Grias neuberthii* Macbr y *Theobroma bicolor*. Revista de la Sociedad Química del Perú, 77(1), 44-55.
- Guerra M. 2007. 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.
- Heinrich M., Williamson E.M., Gibbons S., Barnes J., Prieto-Garcia J. 2017. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. 3 Ed. E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Heslop-Harrison J.S., Schwarzacher T. 2011. Organization of the plant genome in chromosomes. The Plant Journal 66: 18–33.
- Medina D.M., Conagin C.H.T.M. 1964. Técnica citológica. Publicação 2610. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 107 pp.
- Portela A.D.S., Leal A.A.F., Werner R.P.B., Simões M.O.S., Medeiros A.C.D. 2010. Políticas públicas de medicamentos: trajetória e desafios. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 31(1).
- Schubert I., Vu, G.T. 2016. Genome stability and evolution: attempting a holistic view. Trends in Plant Science, 21(9): 749-757.
- Schweizer D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with Cromomycin and DAPI. Chromosoma 58: 307-354.
- Silva R.M., Ribeiro R.T., Coutinho D.J., Silva S.I., Gallão M.I. 2014. Caracterização de frutos, sementes, plântulas e germinação de Jeniparana. Revista Ceres 61 (5): 746-751.
- Souza A.D., Rocha A.F., Pinheiro M.L., Andrade C.H., Galotta A.L., Santos M.P. 2001. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). Química Nova 24 (4): 439-442.

Vaio M., Gardner A., Speranza P., Emshwiller E., Guerra, M. 2016. Phylogenetic and cytogenetic relationships among species of *Oxalis* section *Articulatae* (Oxalidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 302 (9): 1253-1265.