

PROJETO DE PESQUISA

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MORFOLÓGICA DE ALGUMAS ESPÉCIES DE PLANAS NATIVAS DA FLORESTA SEMIDECIDUAL NA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DO CAIUÁ, PARANÁ

RELATÓRIO ANUAL

Período 12/2008 a 12/2009

EQUIPE EXECUTORA:

COORDENAÇÃO:

Profa. Dra. Claudicéia Risso Pascotto (**UNIPAR**)

Profa. Dra. Mariza Barion Romagnolo (**UEM**)

PARTICIPANTES:

- Sara Mataroli de Godoy, Mestranda - Unipar

- Andréia Rodrigues Alonso Pereira, Mestranda - Unipar

- Sheila Pires dos Santos, Acadêmica de Ciências Biológicas- Unipar

2010

1- INTRODUÇÃO

Desde o início do século XX, a citogenética vem sendo amplamente utilizada em trabalhos que envolvem caracterização taxonômica e estudos de evolução e filogenia. O destaque principal é a citotaxonomia clássica que se caracteriza pela observação do número e da morfologia dos cromossomos mitóticos e de seu comportamento meiótico.

A estação ecológica do Caiuá é uma Unidade de Conservação que abriga uma rica biodiversidade, dentre elas uma grande diversidade de espécies de plantas nativas que necessitam de estudos botânicos e citogenéticas. A citogenética de caráter investigativo promove a identificação e entendimento do comportamento meiótico da espécie, fornecendo dados como número de cromossomos e nível de ploidia. A análise citogenética do comportamento meiótico esclarece possíveis erros apresentados durante as fases da meiose I e II. Esses erros meióticos causam anormalidades, que, por sua vez, acarretam em disfunções na formação e viabilidade do grão de pólen, que podem esclarecer sobre a qualidade de propagação da espécie e conservação na região.

Neste relatório estão apresentadas as atividades e resultados obtidos no período de um ano, desde dezembro/2008 até dezembro/2009, durante o desenvolvimento do projeto de pesquisas

2- MATERIAL E MÉTODOS

Análise morfológica

O material botânico foi coletado em diferentes períodos do ano na Estação Ecológica do Caiuá. Foram coletadas partes reprodutivas e vegetativas de algumas espécies que estavam em período reprodutivo.

O material coletado foi herborizado de acordo com técnicas usuais (FIDALGO e BONONI, 1989) e incluídos ao acervo do Herbário Educacional da Universidade Paranaense (HEUP). A identificação do material está sendo realizada com base em literatura especializada sobre as famílias, revisões dos gêneros estudados, bem como pela análise de materiais depositados nos herbários HUM e FUEL.

Posteriormente as espécies serão descritas morfológicamente, este procedimento será realizada no laboratório de Botânica da Universidade Paranaense,

através de observações minuciosas do material com auxílio de microscópio estereoscópio (lupa). A nomenclatura utilizada para morfologia foliar será baseada em HICKEY (1974) e RADFORD et al. (1986) e, para inflorescência, em BRIGGS e JOHNSON (1979), e a descrição dos frutos está de acordo com BARROSO et al. (1999).

Observações ecológicas, como hábito e épocas de floração e frutificação, estão sendo obtidas nas expedições de campo e complementadas com dados da literatura.

Caracterização Citogenética

A metodologia a segue os pressupostos de Guerra e Souza (2002). Para análise de meiose, inflorescências jovens foram colhidas e fixadas em etanol e ácido acético (3:1 v/v), por 24 horas. Após este período, o material foi lavado e transferido para álcool a 70%, sendo em seguida, acondicionado sob refrigeração, até o momento de se iniciar as análises meióticas. Os microsporócitos foram preparados pela técnica de esmagamento e corados com carmim propiônico a 1,0%.

Para obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos tecidos meristemáticos (ponta de raiz e anteras jovens) foram coletados e tratados com uma solução de 8-hidroxiquinoleína 2mM por 24 horas, na geladeira. Após esse período, os meristemas foram fixados em 3 partes de álcool etílico: 1 ácido acético, por um período de 12 a 24 horas à temperatura ambiente. Após a etapa de fixação, os meristemas foram estocados em freezer até o momento da confecção da lâmina. Para o preparo das lâminas, as raízes foram lavadas duas vezes em água destilada por cinco minutos, hidrolisadas em ácido clorídrico 5N por 20 minutos, novamente lavadas em água destilada e o meristema esmagado em ácido acético 45%. Em seguida, as lâminas foram congeladas em nitrogênio líquido para remoção das lamínulas, secas ao ar, coradas convencionalmente com Giemsa 2% e montadas em Permount.

As células que apresentarão melhor visualização dos cromossomos em termos de graus de coloração e individualização dos cromossomos foram fotografadas, levando-se ainda em consideração, a presença de cromossomos univalentes e associações cromossômicas multivalentes. As anormalidades meióticas foram fotografadas utilizando câmera digital DCE- 2 Image Driving Soft Ware para registro e análise dos resultados.

3- RESULTADOS PARCIAIS

Várias espécies de diversas famílias foram coletadas e analisadas durante o período de dezembro de 2008 a dezembro de 2009. O quadro 1 apresenta as plantas analisadas.

A espécie *Chrysophyllum gonocarpum* pertence à família Sapotaceae, não possível de ser analisada devido a problemas com a coloração, vários corantes foram testados, porém não se conseguiu observar os cromossomos, apenas o citoplasma era evidenciado com o corante dando a impressão de que as células estavam vazias.

Quadro 1 - Análise das plantas analisadas no ano de 2009.

Família	Espécie	N. de identificação	Resultados
Anonaceae	<i>Unonopsis lindmanii</i>	08/14.03.09	Análise concluída
Bignoniaceae	Não identificada	11/14.03.09	Material muito jovem
Caparaceae	<i>Capparis humilis</i>	16/14.13.09	Análise concluída
Caricaceae	<i>Jaracatia spinosa</i>	12/14.03.09	Análise concluída
Euphorbiaceae	<i>Cróton floribundus</i>	27/03.08.09	Grão de pólen
Euphorbiaceae	<i>Actinostemom conceptionis</i>	30/03.08.09	Grão de pólen
Euphorbiaceae	<i>Actinostemom concolor</i>	02/19.05.09	Grão de pólen
Phytolacaceae	<i>Galesia integrifolia</i>	09/19.05.09	Grão de pólen
Meliaceae	<i>Cabralea canjerana</i>	02/18.08.09	Grão de pólen
Meliaceae	<i>Trichilia elegans</i>	04/18.08.09	Grão de pólen
Myrtaceae	<i>Camponanesia xantocarpa</i>	18/19.05.09	Grão de pólen
Rutaceae	<i>Esebeckia grandiflora</i>	09/18.08.09	Material muito jovem
Rutaceae	<i>Metrodorea nigra</i> A. St. – Hil.	13/19.05.09	Grão de pólen
Rubiaceae	Não identificada	14/19.05.09	Grão de pólen
Rubiaceae	<i>Psychotria pubigera</i> Schldl.	32/19.05.09	Grão de pólen
Rubiaceae	<i>Psychotria subtrifolia</i> Mul Arg.	35/19.05.09	Grão de pólen
Rubiaceae	<i>Caussarea hydrangeifolia</i>	36/19.05.09	Análise concluída
Rubiaceae	<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	37/19.05.09	Grão de pólen
Rubiaceae	<i>Psychotria leiocarpa</i>	42/19.05.09	Grão de pólen

Rubiaceae	Não identificada	43/19.05.09	Grão de pólen
Sapotaceae	<i>Chrysophyllum gonocarpum</i>	02/14.03.09	Problemas com a coloração
Ulmaceae	<i>Trema micrantha</i>	23/14.03.09	Análise concluída

Família Anonaceae - Espécie *Unonopsis lindmanii*

O tamanho das inflorescências em fase de meiose variou de 0,4 e 0,5 mm de comprimento e as anteras tinham cerca de 0,1mm. O comportamento durante a microsporogênese foi considerada normal, uma vez que ao final apenas 3,57 dos micrósporos eram anormais. As poucas irregularidades encontradas foram, 2,17% cromossomos retardatários em anáfase I, 9,25% telófase II em T, 4,83% de díades e, 11,29% de tríades. A presença de cromossomos retardatários afetou 2,17% das células observadas em anáfase I. Segundo Guerra (1999), isso ocorre devido à terminalização tardia dos quiasmas, ou seja, bivalentes unidos por quiasmas intersticiais demoram mais para se soltarem, isso faz com cromossomos retardatários apareçam na fase de anáfase I. Telófase em T não é considerada uma irregularidade, é a forma de orientação dos fusos para a formação da tétrade de micrósporos, já a formação de díades e tríades ocorre por falha da citocinese e restituição de núcleos diplóides e é uma das formas de surgimento dos gametas 2n (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2001). Segundo os mesmos autores gametas não reduzidos ocorrem de forma espontânea em praticamente todas as populações naturais de plantas, mas, em geral, em percentagens muito baixas, em torno de 1%. De acordo com Ramsey; Schemske (1998) há muitas evidências de que a formação de gametas 2n está sob controle genético, e populações de plantas, frequentemente, possuem variação genética herdável para produzir gametas não reduzidos. As anormalidades encontradas neste estudo comprometem a sua viabilidade, já que a frequência de irregularidade é considerada baixa. Isso é importante, pois garante a formação de grãos de pólen férteis, contribuindo para a preservação da espécie.

Família Capparaceae - Espécie *Capparis humilis*

O número cromossômico encontrado para espécie foi $2n = 22$. Em metáfase I e II pôde-se observar a presença de cromossomos não congressados, 3,38% e 8,7% respectivamente, assim como 3,8% em metáfase I e 7,24% em metáfase II de cromossomos em ascensão precoce. Em anáfase I foi observado 4,54% de pontes cromossômicas, já em anáfase II nenhuma irregularidade foi encontrada. Tanto a

telófase I (1,85%) quanto a telófase II (15,87%) apresentaram micronúcleos. Em telófase II, foi ainda observada a presença de restituição nuclear em um pólo em 4,76% das células. Díades e tríades foram encontradas numa proporção de 6,41% e 3,85% respectivamente. Os micrósporos e grãos de pólen avaliados para esta planta tiveram um percentual de anormalidade de 3,45% para micrósporos sendo eles $2n$, e 6,78% para os grãos de pólen, onde destes 4,52% eram desbalanceados e 2,26% $2n$.

Não há relatos na literatura para o número cromossômico da espécie. No entanto o número para uma das espécies do gênero, *Capparis spinosa*, foi descrito por Al-Turki et al. (2000), sendo este $2n = 38$. Os cromossomos não congressados e em ascensão precoce são provenientes da não orientação dos fusos, e de acordo com Risso-Pascotto et al. (2003), levaram à formação de micronúcleos, o que resulta em tétrades geneticamente desbalanceadas. De acordo com Cao et al. (2003) a formação de pontes cromossômicas se deve ao agrupamento dos cromossomos em metáfase e anáfase. A presença de micrósporos e grãos de pólen $2n$ pode estar relacionada à formação de núcleo de restituição em telófase II. Devido o baixo percentual de irregularidades meióticas e de grãos de pólen estéreis, o processo meiótico da planta pode ser considerado normal e seus grãos de pólen viáveis.

Família Rubiaceae – Espécie *Caussarea hydrangeifolia*

Foram observadas 1382 células em todas as fases da meiose I e II. Dessas, 0,77% era de cromossomo não congressado, 4,65% de ponte e 0,78% de fusão citoplasmática em metáfase I; 0,74% de ponte cromossômica e 2,96% de ascensão precoce em anáfase I; 3,27% de ponte citoplasmática e 0,82% de citomixia em telófase I; 6,62% de ponte citoplasmática em prófase II; 2,36% de ponte citoplasmática em telófase II; 0,50% de mônode, 9,04% de díade, 7,54% de tríade, 1% de tríade com micrócito, 2,51% de tétrade com micrócito, 1% de restituição de 2 núcleos e 1,5% de ponte citoplasmática em tétrades; e micrósporos e grãos de pólen (12,15% e 4,72%) desbalanceados e (2,78% e 0,79%) binucleados, respectivamente.

De acordo com Corrêa (2007) a espécie apresenta $2n=22$, sendo a única espécie do gênero *Coussarea* com o número cromossômico descrito e as anormalidades encontradas são características da ploidia desenvolvida durante sua evolução. Guerra (1998) relata que a poliploidia é uma variação no número cromossômico que surge através da multiplicação do número básico de cromossomos da espécie. Mendes- Bonato (2000) diz que os cromossomos que migram

precocemente para os pólos ou ficam atrasados, podem não ser incluídos nos núcleos telofásicos, formando então micronúcleos, e causando desbalanço gênico que afeta a fertilidade do grão de pólen. As irregularidades observadas neste estudo, com exceção da citomixia são consideradas comuns à poliploidia (GUERRA, 1998). Apesar da variedade de irregularidades encontradas verificou-se uma baixa frequência nas células analisadas, entre micrósporos, grãos de pólen e as fases da meiose I e II, portanto essas não comprometem a viabilidade do grão de pólen da espécie, já que a maioria se comportaram normalmente.

Família Caricaceae - Espécie *Jaracatia spinosa* (Aubl.)

A análise do comportamento meiótico da espécie *Jaracatia spinosa* revelou poucas as irregularidades. Em metáfase I foi verificado ascensão precoce e fuso irregular em 3,75% das células analisadas, 10% das telófases II apresentaram-se em forma de T, e 9,67% das tétrades apresentaram com micrócito. O número de cromossomos encontrado foi $2n = 18$. A contagem do número de cromossomos para a espécie *Jaracatia spinosa* coincide com a maioria dos registros na literatura. De acordo com Lorenzi (2002) é uma espécie colocada em sinonímia com *J. spinosa*. Portanto, a espécie *J. spinosa* uma planta diplóide ($2n=18$).

Fuso tripolar têm sido relatados por várias espécies de plantas em ambas as divisões meióticas e mitóticas (PAGLIARINI, 1990). Neste estudo a presença de fuso triplolar ocorreu tanto em meiose I, como em meiose II. Porém, durante a meiose I, não foi observado irregularidade na segregação dos cromossomos, já ao final da meiose II, 9,67% das tétrades apresentaram micrócitos. Os micrócitos são resultantes da segregação irregular dos cromossomos durante a divisão (PAGLIARINI, 1990). As anormalidades encontradas na espécie *Jaracatia spinosa* não comprometem a sua viabilidade, já que a frequência de irregularidade é considerada baixa. Isso é importante, pois micrósporos normais levam a formação de grãos de pólen viáveis, que garantirá a produção de sementes férteis contribuindo para a preservação da espécie.

Família Ulmaceae - Espécie *Trema micrantha*

Foi observado cromossomo não congressado em metáfase II (1,08%), cromossomo retardatário em anáfase II (2%), restituição de 2 núcleos em telófase II (0,9%) e em diacinese foi possível contar 10 cromossomos em associação bivalente

$2n=20$. O número básico da espécie foi relatado por Torres, 1996, como $n=10$. Muitos fatores contribuem para o aparecimento de alterações do processo meiótico em plantas, entre estes, podemos citar a influência ambiental e o nível de ploidia. As espécies poliplóides apresentam, caracteristicamente, configurações meióticas irregulares, como cromossomos não congressados e retardatários; esses cromossomos podem ter diferentes fins, entre eles se reintegrar a placa metafásica; e dessa forma não afeta a fertilidade do grão de pólen (MENDES-BONATO, 2000). De acordo com a análise citogenética da espécie *Trema micrantha* foi observado que os grãos de pólen permaneceram normais e desbalanceados não foram encontrados, confirmando assim que os retardatários e não congressados retornaram e concluíram a meiose. Devido à falta de anormalidades a espécie apresenta 100% de grãos de pólen férteis e pode ser incluída em futuros programas de melhoramento genético, além de garantir a conservação da espécie na região.

4- CONSIDERAÇÕES

Os materiais coletados até o momento e que foram possíveis de serem analisados, mostraram bons resultados. Entretanto um grande número de espécies não foram encontradas em fase ideal para análise citogenética, necessitando de novas coletas.

5- DISSEMINAÇÃO OCORRIDA NO PERÍODO

Os resultados obtidos foram apresentados no 8º ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E 8º FÓRUM DE PESQUISA DA UNIPAR, nos dias 22 e 23 de outubro de 2009.

ANÁLISE CITOGÊNÉTICA E VIABILIDADE DO GRÃO DE PÓLEN DE *Capparis humilis* (CAPARACEAE). Sara Mataroli de Godoy, Andréia Rodrigues Alonso Pereira, Mariza Barion Romagnolo, Claudicéia Riso Pascotto

CARACTERIZAÇÃO MEIÓTICA DE *Jaracatia spinosa* (Aubl.). Lidiani dos Santos de Souza, 2Mariza Barion Romagnolo, 3Claudicéia Riso Pascotto.

CARACTERIZAÇÃO CITOGÊNÉTICA DA ESPÉCIE *Trema micrantha* (CANNABACEAE). Andréia Rodrigues Alonso Pereira, Sara Mataroli de Godoy, Mariza Barion Romagnolo, Claudicéia Riso Pascotto.

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MEIÓTICO DA ESPÉCIE *Coussarea hydrangeifolia* (RUBIACEAE) ATRAVÉS DA MICROSPOROGÊNESE. Andréia

Rodrigues Alonso Pereira, Sara Mataroli de Godoy, Mariza Barion Romagnolo, Claudicéia Risso Pascotto.

ASPECTO DA MICROSPOROGÊNESE DA *Unonopsis lindmanii*. Sheila Pires dos Santos, Mariza Barion Ronagnolo, Claudicéia Risso-Pascotto.

6- REFERÊNCIAS

AL-TURKI, T. A; FILFILAN, S. A; MEHMOOD, S. F. A cytological study of flowering plants from Saudi Arabia. **Willdenowia**, V. 30, p. 339-358, 2000.

CAO, M., BUGHRARA, S.S., SLEPER, D.A. Cytogenetic analysis of *Festuca* species and amphiploids between *Festuca mairei* and *Lolium perenne*. **Crop Science**, v.43, p.1659–1662, 2003.

GUERRA, M. S. **Introdução a Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa: Plantarum, 2002, p. 93.

MENDES-BONATO, A. B. **Caracterização Citogenética de Acessos de *Brachiaria brizanta* (Gramineae)**. 59p. Dissertação (Pós-graduação). Departamento de Agronomia. Maringá. 2000.

PAGLIARINI, M. S. Instabilidade meiótica em *thunbergia mysorensis* (Acanthaceae). **Ciência e Cultura**. v. 42, p. 83-87, 1990.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.29, p.467-501, 1998.

RISSO-PASCOTTO, C; MENDES-BONATO, A.B; PAGLIARINI, M. S; VALLE, C. B. Comportamento citológico atípico durante a microsporogênese em *Brachiaria ruziziensis* e *B. decumbens*. **Boletim de Desenvolvimento e Pesquisa**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2003. 29 p.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, v.31, n.1, p.169-175, 2001.

TORRES, R. B. **Biologia da reprodução de *Trema micrantha* (L.) Blume (ULMACEAE)**. 1996. 1