

ESTUDO DOS CROMOSSOMOS DO MARACUJÁ AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) COM A APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS CITOGENÉTICAS

Praça-Fontes MM¹, Mendonça MAC², Carvalho CR³

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Produção Vegetal, Alto Universitário S/N – CX Postal 16, CEP:29.500.000 – Alegre – ES, Brasil, milenemiranda@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Viçosa/Departamento de Biologia Geral, Av. PH Holfs S/N, CEP: 36570-000, Viçosa-MG, Brasil, mandreiacm@gmail.com

³Universidade Federal de Viçosa/Departamento de Biologia Geral, Av. PH Holfs S/N, CEP: 36570-000, Viçosa-MG, Brasil, ccarvalh@ufv.br

Resumo- *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* é considerada a espécie mais importante do gênero *Passiflora*, principalmente pelo seu interesse botânico, comercial e para programas de melhoramento. Análises citogenéticas desta espécie revelaram número cromossômico de $2n=18$, porém, a caracterização de seus cromossomos tem sido apresentada na literatura com dados conflitantes quanto à posição do centrômero, número e localização de constrições secundárias e de regiões organizadoras de nucléolo (RONs). Neste contexto, o objetivo do trabalho foi adaptar metodologias que ampliassem a resolução das análises cromossômicas em *P. edulis* f. *flavicarpa*. Mais especificamente, aplicar a técnica de secagem ao ar e a citogenética molecular para determinar os aspectos morfológicos dos cromossomos e identificar as RONs.

Palavras-chave: citogenética, FISH, laranja de acridina, maracujá-amarelo

Área do Conhecimento: Genética

Introdução

O gênero *Passiflora* é o maior da família Passifloraceae, sendo formado por aproximadamente 530 espécies tropicais e subtropicais (HANSEN et al., 2006). Originou-se na América tropical e apresenta mais de 150 espécies nativas do Brasil (LIMA et al., 1999). Dentre as principais espécies do gênero, destaca-se o maracujá-amarelo, *P. edulis* f. *flavicarpa*, em virtude de seu interesse botânico, comercial e em programas de melhoramento. Análises citogenéticas desta espécie revelaram número cromossômico de $2n=18$ (SOARES-SCOTT, 1998; COELHO, 2009); entretanto, a caracterização de seus cromossomos ainda não está bem estabelecida. Os relatos disponíveis na literatura são conflitantes quanto à posição do centrômero, ao número e localização de constrições secundárias e de regiões organizadoras de nucléolo (RONs) (OLIVEIRA, 1996; MAYEDA, 1997; SOARES-SCOTT, 1998; CUCO et al., 2003; MELO e GUERRA, 2003; COELHO, 2009).

Segundo Oliveira (1996) e Coelho (2009), o cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa* é simétrico quanto à posição do centrômero. Entretanto, Soares-Scott (1998) apresentou razões de braços com medidas indicando que os cromossomos 1, 2, 3, 5, 6, 8 e 9 são metacêntricos, enquanto o 4 e o 7 são submetacêntricos.

O número e a localização das constrições secundárias presentes no cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa* também têm apresentado discordância

quando relatados por diferentes autores. Oliveira (1996) encontrou apenas uma constrição secundária no braço longo do cromossomo 8. Mayeda (1997) e Cuco et al. (2003) relataram a presença de constrição secundária no braço longo dos cromossomos 8 e 9. Soares-Scott (1998) também encontrou duas constrições, porém, no braço longo dos cromossomos 4 e 7. Coelho (2009) relatou a presença de constrições secundárias no braço longo do cromossomo 7 e 9.

Em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, as RONs têm sido evidenciadas por diferentes metodologias, porém com diferentes resultados. Com o método de bandeamento Ag-NOR, Mayeda (1997) evidenciou RONs nas constrições secundárias dos cromossomos 8 e 9. Aplicando a técnica de FISH, Melo e Guerra (2003) e Coelho (2009) observaram sítios de rDNA 45S no braço longo dos cromossomos 7 e 9, e rDNA 5S localizado no braço longo do cromossomo 5.

Em virtude desses diferentes relatos, encontrados na caracterização do cariótipo de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, o presente estudo foi conduzido a fim de adaptar metodologias para obtenção de cromossomos de alta qualidade citogenética para análise do cariótipo desta espécie.

Metodologia

Sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* foram colocadas para germinar em placas de Petri com filtro de papel úmido à temperatura controlada

30 °C em estufa, durante uma semana. Raízes com aproximadamente 1 cm de comprimento foram submetidas a testes com pré-tratamentos, utilizando-se bloqueadores do fuso mitótico como Orizalina, Trifluralina e Amiprofos metil (APM), nas concentrações de 2 µM, 2,5 µM e 3 µM, durante períodos de 15, 16 e 17 horas em geladeira (4 °C) e 2, 3 e 4 horas a 28 °C. Em seguida, as raízes foram fixadas em metanol/ácido acético na proporção 3:1 e o material foi armazenado a -20 °C.

As raízes do maracujá foram lavadas em água destilada e, em seguida, digeridas com Flaxzyme® (NOVO) (10 µL da enzima em 300 µL de água destilada) a 34 °C, durante 1 hora e 30 minutos. As lâminas foram preparadas, aplicando-se a técnica de dissociação celular do meristema apical com subsequente secagem ao ar e em placa aquecedora (50 °C) por 20 minutos (CARVALHO e SARAIVA, 1997).

Após o preparo, algumas lâminas foram imediatamente coradas em solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato (pH 6,8) durante 4 minutos, lavadas duas vezes em água destilada e secadas ao ar, para posterior análise da morfologia dos cromossomos.

Para a coloração com o fluorocromo laranja de acridina as preparações citogenéticas foram pré-tratadas, conforme o bandeamento RFA (bandeamento-R por fluorescência com laranja de acridina) descrito por Verma et al. (1977), para cromossomos humanos, e por Almeida e Carvalho (2004) para cromossomos de pimentão e milho.

O procedimento de *hidridização in situ* foi realizado, conforme Osuji et al. (1998), com algumas modificações. Sondas de rDNA 18S com 1100 pb obtidas de milho (*Zea mays*) e clonadas em vetor pGEM®-T Vector foram utilizadas. A sonda foi marcada com Flúor-12-dUTP por meio do método de random primers e com auxílio do kit Prime It™ (Stratagene®), conforme recomendações do fabricante.

Para a análise dos dados a avaliação dos bloqueadores foi feita segundo parâmetros visuais, como a quantidade e qualidade morfológica dos cromossomos nas lâminas. Aproximadamente 150 lâminas foram analisadas, sendo selecionadas aquelas que apresentaram as melhores figuras cromossômicas. Essas figuras foram, então, capturadas com objetiva de 100X, em fotomicroscópio Olympus™ BX60, equipado com sistema de epifluorescência (filtros WB para análises de fluorescência com laranja de acridina e WG para análises de FISH) acoplado a uma vídeo-câmera e com o Kit de análise de imagem Cool SNAP™. As imagens foram processadas em um computador Macintosh™ (G4) e as análises da morfologia dos cromossomos foram realizadas, utilizando-se o Programa Image SXM de domínio

público (BARRETT, 2002). Para montagem dos kariogramas, foram analisadas 10 prometafases e 10 metafases. As medidas de cada cromossomo foram realizadas em pixels e convertidas em escala de micrômetros (CAIXETA, 1998). A razão entre os braços longo/curto foi determinada, segundo o critério de classificação morfológica dos cromossomos, descrito por Levan et al. (1964) e revisado por Guerra (1986).

Resultados

Dos pré-tratamentos aplicados nas raízes, verificou-se que o APM, na concentração de 3 µM, apresentou melhor desempenho em relação aos outros bloqueadores utilizados. O tempo mais adequado foi de 16 horas e 25 minutos, a 4 °C. O herbicida Orizalina também foi eficiente para obtenção de morfologia dos cromossomos quando aplicado na concentração de 3 µM, durante um período de 15 horas, a 3 °C, porém a quantidade encontrada de células em divisão foi inferior à encontrada com o APM. A Trifluralina não proporcionou resultados satisfatórios, em nenhuma das concentrações e tempos testados, observando-se pouca quantidade de metáfase nas lâminas com morfologia inadequada para análises. Visualizaram-se figuras completas com 18 cromossomos individualizados, sem sobreposição, no mesmo plano de foco da lâmina e com constrições primárias e secundárias definidas (Figura 1), facilitando a montagem dos kariogramas e a classificação dos pares cromossômicos. Observou-se seis pares metacêntricos (2 a 7) e três pares submetacêntricos (1, 8 e 9) (Tabela 1) e a presença de constrição secundária na porção subterminal do braço longo dos cromossomos 1 e 8 e porção subterminal do braço curto dos cromossomos 2 e 7, apresentando-se consistente nos dez kariogramas analisados (Figura 2).

A identificação dos cromossomos foi realizada, utilizando-se medidas de comprimento total e razão de braços. Verificou-se que o comprimento médio dos cromossomos metafásicos foi de 3,75 µm (par 1) a 2,20 µm (par 9) (Tabela 1).

A coloração com o fluorocromo laranja de acridina revelou quatro regiões de fluorescência em cromossomos metafásicos pré-tratados com APM, 3 µM, durante 16 horas e 25 minutos, a 4 °C. As regiões fluorescentes foram localizadas na porção terminal do braço curto do cromossomo 7 e na porção terminal do braço longo do cromossomo 8 (Figura 3). Essas marcações coincidiram com a localização de duas das quatro constrições secundárias encontradas nos cromossomos, quando submetidos à coloração com Giemsa.

Com o uso de sondas de rDNA 18S pela técnica de FISH, foi possível identificar essa

seqüência em dois pares cromossômicos de *P. edulis* f. *flavicarpa* (Figura 4).

Como observado na metodologia de coloração com o fluorocromo laranja de acridina, os cromossomos tratados por meio da técnica de FISH permaneceram preservados, facilitando o estudo dos cromossomos. A análise do cariótipo revelou marcações fluorescentes nos mesmos pares cromossômicos evidenciados com o laranja de acridina, apresentando-se na porção terminal do braço curto do cromossomo 7 e porção terminal do braço longo do cromossomo 8 (Figura 3). Assim, das constrições secundárias presentes nos cromossomos 1, 2, 7 e 8, identificadas com a coloração convencional com Giemsa, apenas aquelas localizadas nos cromossomos 7 e 8 foram marcadas com o fluorocromo laranja de acridina e com a sonda de rDNA 18S.



Figura 1 – Cromossomos metafásicos obtidos de células meristemáticas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, pré-tratadas com APM 3 μ M, durante 16 horas e 25 minutos, a 4 $^{\circ}$ C e corados com Giemsa 5%. Barra = 5 μ m.

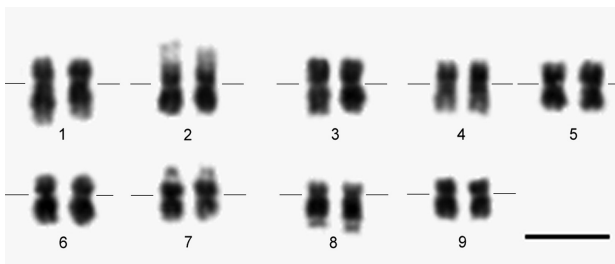


Figura 2 – Cariograma de *P. edulis* f. *flavicarpa*, montado a partir de cromossomos metafásicos tratados com APM 3 μ M, durante 16 horas e 25 minutos, a 4 $^{\circ}$ C e corados com Giemsa 5%. Observar as constrições primárias definidas e as constrições secundárias presentes na porção subterminal do braço longo dos cromossomos 1 e 8 e porção subterminal do braço curto dos cromossomos 2 e 7. Barra = 5 μ m.

Tabela 1- Morfometria dos cromossomos metafásicos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*

Cromossomo	Total (μ m)	Braço (μ m)		r	Classe	Comprimento relativo(%)
		Curto	Longo			
1	3,75	1,45	2,30	1,59	SM	14,07
2	3,60	1,80	1,80	1,00	M	13,51
3	3,15	1,50	1,65	1,10	M	11,82
4	3,10	1,50	1,60	1,07	M	11,63
5	2,85	1,35	1,50	1,11	M	10,69
6	2,75	1,20	1,55	1,29	M	10,32
7	2,75	1,35	1,40	1,04	M	10,32
8	2,50	0,70	1,80	2,57	SM	9,38
9	2,20	0,80	1,40	1,75	SM	8,26
	26,65					100,00

r – razão entre braços longo e curto
M - metacêntrico
SM – Submetacêntrico

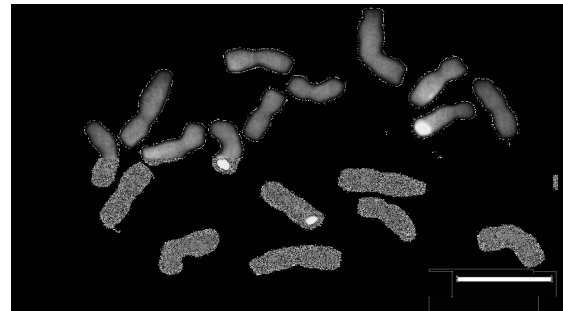


Figura 3 – Cromossomos metafásicos obtidos de células meristemáticas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, corados com laranja de acridina a 0,01%. Observar as marcações de fluorescência evidenciando dois pares de cromossomos com constrição secundária. Barra = 5 μ m.

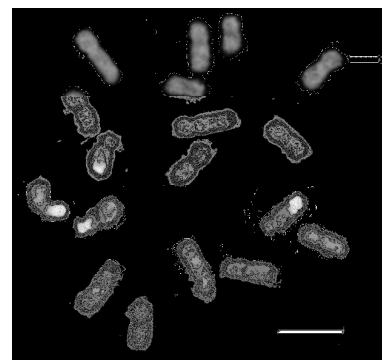


Figura 4 – Cromossomos metafásicos obtidos de células meristemáticas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* submetidos à metodologia de FISH, com o uso de sonda de rDNA 18S. Observar os quatro sítios de marcação fluorescente. Barra = 5 μ m.

Discussão

A análise do cariótipo do maracujá-amarelo revelou número cromossômico de $2n=18$, evidenciando o mesmo resultado obtido em estudos anteriores (OLIVEIRA, 1996; MAYEDA, 1997; SOARES-SCOTT, 1998; SOUZA, 2002; CUCO et al., 2003; MELO e GUERRA, 2001, 2003; COELHO 2009). Quanto à classificação centromérica, os resultados encontrados foram diferentes dos resultados observados por Soares-Scott (1998), que descreveu dois pares de cromossomos submetacêntricos (pares 4 e 7) e sete pares metacêntricos (1, 2, 3, 5, 6, 8, 9). Esta diferença pode ser justificada, em parte, pelo grau de compactação dos cromossomos e por diferenças metodológicas.

O número de constrições secundárias presentes no cariótipo de *P. edulis* f. *flavica* vem sendo descrito com diferentes classificações (OLIVEIRA, 1996; MAYEDA, 1997; SOARES-SCOTT, 1998; CUCO et al., 2003; MELO e GUERRA, 2003; COELHO, 2009). Em todos os relatos os autores utilizaram a técnica de esmagamento nas preparações citogenéticas. No presente trabalho, ao contrário, com o auxílio da técnica de dissociação celular e secagem ao ar, foi possível identificar quatro constrições secundárias, localizadas na porção subterminal do braço longo dos cromossomos 1 e 8 e porção subterminal do braço curto dos cromossomos 2 e 7 (Figura 2). Segundo Mayeda (1997), diferenças como estas podem ocorrer em virtude da qualidade da preparação da amostra, ou por tratar-se de variação genética entre as populações.

A coloração com laranja de acridina em cromossomos de *P. edulis* f. *flavica*, de acordo com o protocolo utilizado por Almeida e Carvalho (2004), revelou padrão de marcação semelhante ao observado pelos autores em cromossomos de pimentão e milho. Segundo esses autores as regiões evidenciadas pelo fluorocromo laranja de acridina são pontos de heterocromatina associada a regiões organizadoras nucleolares. No caso do maracujá, essas regiões foram associadas a dois cromossomos apenas (cromossomos 7 e 8) (Figura 3), concordando, em quantidade, com o relato de vários autores que aplicaram outras técnicas para detectar RONS (MAYEDA, 1997; CUCO et al., 2003; MELO e GUERRA, 2003; COELHO 2009).

Outros fluorocromos têm sido utilizados para identificar heterocromatina associada à RON em cromossomos de *P. edulis* f. *flavica*. Com os fluorocromos base-específicos Cromomicina A3 e Distamicina, Cuco et al. (2002) identificaram sinais fluorescentes nos cromossomos 8 e 9, afirmando que as RONS devem ser

preferencialmente ricas em GC. Esses resultados concordam, em parte, com os encontrados no presente trabalho, em que a fluorescência verde-amarelada foi identificada nos cromossomos 7 e 8.

Dentre as quatro constrições secundárias encontradas no cariótipo de *P. edulis* f. *flavica*, apenas duas apresentaram marcação por FISH (Figura 4). Estes resultados estão de acordo com trabalhos realizados anteriormente por diferentes autores. No entanto, todos os relatos disponíveis na literatura envolvem o uso de sondas de rDNA 45S e 5S, ao invés da sonda de rDNA 18S, utilizada no presente estudo.

As RONS estão em pontos cromossômicos de seqüências de DNA repetidas que codificam para rRNA 18S, 5.8S e 26S (18S-26S) (BESENDORFER et al., 2002), sendo que, citologicamente, estas regiões estão localizadas em constrições secundárias nos cromossomos metafásicos (SATO et al., 1980; LANGER e KOUL, 1983). Segundo Sumner (2003), tais genes são transcritos como uma única unidade (45S). Portanto, a utilização de apenas uma dessas seqüências, como a de rDNA 18S utilizada como sonda no presente trabalho, não impossibilitou a identificação das constrições secundárias que contêm os genes. Outra seqüência que codifica para rRNA é a 5S, porém não está localizada em estruturas distintas, encontrando-se espalhadas pelo genoma (SUMNER, 2003).

Segundo Battistin et al. (1999), todas as RONS estão localizadas em constrições secundárias, mas nem todas as constrições secundárias são sítios de RON. Pelo menos três dessas constrições foram encontradas, nos cromossomos do maracujá, por Soares-Scott (1999), citada por Souza (2002), e um ou dois sítios de RON foram relatados por diferentes autores (OLIVEIRA, 1996, CUCO et al., 2003, MELO e GUERRA, 2003). No presente trabalho, entretanto, com auxílio das técnicas utilizadas, foi possível identificar quatro constrições secundárias e dois sítios de RONS no cariótipo de *P. edulis* f. *flavica*. Com a coloração com Giemsa, foram identificados o número e a posição dessas constrições (porção subterminal do braço longo dos cromossomos 1 e 8 e porção subterminal do braço curto dos cromossomos 2 e 7). Com a aplicação da coloração com laranja de acridina e da técnica de FISH, pode-se observar que apenas as constrições dos cromossomos 7 e 8 estão associadas à RONS.

Conclusão

Considerando que diferenças intraespecíficas não estejam envolvidas nas diferenças morfológicas pesquisadas, as

metodologias aplicadas corroboraram a ampliação da resolução do cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Evidenciou-se, portanto, diferenças na posição do centrômero, número e localização das constrições secundárias e das RONS, em comparação com os resultados encontrados na literatura.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a FAPES – Fundação de Apoio a Pesquisa no Espírito Santo, pelo suporte financeiro.

Referências

- ALMEIDA, P.M.; CARVALHO, C.R. NOR-associated heterochromatin of pepper chromosomes stained with acridine orange. *Caryologia*, 57: 172-176, 2004.
- BARRETT, S.D. Software for scanning microscopy. *Proceedings of the Royal Microscopy Society*, 37: 7-14, 2002.
- BATTISTIN, A.; BIONDO, E.; COELHO, L.G.M. Chromosomal characterization of three native and one cultivated species of *Lathyrus* L. in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 22(4): 557-563, 1999.
- BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M.E.; PAPES, D. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 139: 99-108, 2002.
- CAIXETA, E.T. Estudo citogenético dos cromômeros de cromossomos meióticos de milho (*Zea mays*). Viçosa, MG: UFV, 1998. 96p. (Dissertação M.S.).
- CARVALHO, C.R., SARAIVA, L.S. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. *Journal of Plant Research*, 110: 417-420, 1997.
- COELHO, M.S.E. Caracterização citogenética de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEG. *P. cincinnata* MAST. e seu híbrido interespecífico. Areia-PB: UFP, 2009. 67p. (Dissertação M.S.).
- CUCO, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). *Acta Botanica Brasilica*, 17(3): 1-7, 2003.
- GUERRA, M. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética*, 9: 741-743, 1986.
- HANSEN, A. K.; GILBERT, L. E.; SIMPSON, B. B.; CERVI, A. C.; JANSEN, R. K. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Systematic Botany*, v.31, p.138-150, 2006.
- LANGER, A.; KOUL, A.K. Studies on nucleolus and nucleolar chromosomes in angiosperms IX. *Lilium* Linn. *Cytologia*, 48: 519-526, 1983.
- LEVAN, A., FREDGA, A., SANDERBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position in chromosome. *Hereditas*, 52: 201-220, 1964.
- LIMA, A.A.; BORGES, A.L.; CARDOSO, C.E.L.; BARBOSA, C.J.; COSTA, D.C.; FILHO, H.P.S.; FANCELLI, M.; SANCHES, N.F. Coleção Plantar-Maracujá. Embrapa, 1999. 109p.
- MAYEDA, L.Y. Estudo citogenético em dez táxons do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae). Piracicaba-SP: ESALQ, 1997. 89p. (Dissertação M.S.).
- MELO, N.F.; GUERRA, M. Variability of 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany*, 92: 309-316, 2003.
- OLIVEIRA, A.M.A. Reprodução e citogenética de espécies de *Passiflora*. São José do Rio Preto-SP: UNESP, 1996. 148p. (Tese D.S.).
- OSUJI, J.O.; CROUCH, J.; HARRISON, G.; HESLOP-HARRISON, J.S. Molecular cytogenetics of *Musa* species, cultivars and hybrids: location of 18S-5.8S-25S and 5S and telomere-like sequences. *Annals of Botany*, 82: 243-248, 1998.
- SATO, S.; HIMUZE, M.; KAWAMURA, S. Relationship between secondary constrictions and nucleolus organizing regions in *Allium sativum* chromosomes. *Protoplasma*, 105: 77-85, 1980.
- SOARES-SCOTT, M.D. Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora*. Campinas-SP: UNICAMP, 1998, 89p. (Dissertação M.S.).
- SOUZA, M.M. Estudos genômico e reprodutivo em espécies de *Passiflora*. Campos dos Goytacazes-RJ: UENF, 2002. 162p. (Tese D.S.).

XVINIC

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

XI EPG

Encontro Latino Americano
de Pós Graduação

VINIC Jr

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior

SUMNER, A.T. Chromosomes Organization and Function. [S. l]: BlackWell Publising, 2003. 287p.

VERMA, R.S; DOSIK, H.; LUBS, H.A. Demonstration of color and size polymorphisms in human acrocentric chromosomes by acridine orange reverse banding. The Journal of Heredity, 68: 262-263, 1977.