



**MORFOLOGIA E ASPECTOS EVOLUTIVOS
DOS CROMOSSOMOS MITÓTICOS DE
BARU (*Dipteryx alata* Vog.)**

GIOVANA AUGUSTA TORRES

2001

GIOVANA AUGUSTA TORRES

**MORFOLOGIA E ASPECTOS EVOLUTIVOS DOS
CROMOSSOMOS MITÓTICOS DE BARU (*Dipteryx
alata Vog.*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia/Genética e Melhoramento de
Plantas, para obtenção do título de "Doutor".

Orientadora

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide



LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2001

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Torres, Giovana Augusta

Morfologia e aspectos evolutivos dos cromossomos mitóticos de baru (*Dipteryx alata* Vog) / Giovana Augusta Torres. -- Lavras : UFLA, 2001.

97 p. : il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Baru. 2. *Dipteryx alata*. 3. Cariótipo. 4. Evolução cariotípica. 5. Cromossomos. 6. Fabaceae. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-583.322

-634.973322

GIOVANA AUGUSTA TORRES

**MORFOLOGIA E ASPECTOS EVOLUTIVOS DOS
CROMOSSOMOS MITÓTICOS DE BARU (*Dipteryx
alata Vog.*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia/Genética e Melhoramento de
Plantas, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em sexta-feira, 9 de novembro de 2001

Prof. Dr. Carlos Roberto de Carvalho	UFV
Prof. Dr. Luiz Sérgio Saraiva	UFV
Prof. Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto	UFLA
Profa. Dra. Dulcinéia de Carvalho	UFLA



Profa. Dra. Lisete Chamma Davide - UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Dedico este trabalho ao Cerrado

O Cerrado que nos brinda

com sua beleza única

A beleza da multiplicidade

A beleza da luta e da resistência

A beleza da conquista

A beleza da vida

Apesar de tudo

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Edilson Paiva, pela orientação valiosa nos dois primeiros anos do meu curso e à sua equipe, pelo apoio constante que sempre recebi.

À professora Lisete, que me recebeu como colega e orientada, sempre me acompanhando na superação dos obstáculos, com seu apoio incondicional e confiança em meu trabalho.

Ao comitê orientador, profa. Dulcinéia de Carvalho e prof. Carlos Roberto de Carvalho, que participaram ativamente de minha orientação, disponibilizando sementes, laboratórios e principalmente o tempo para discussões fundamentais para a qualidade do trabalho.

Aos professores do deste programa de pós-graduação, pelos ensinamentos, exemplos e pela confiança depositada em mim.

Ao Departamento de Biologia da UFLA, em especial aos meus colegas do setor de Biologia Celular Iara Alvarenga M. Pereira, Lisete Chamma Davide e Delacyr Brandão, por tudo que fizeram para viabilizar a concretização do curso.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da EMBRAPA e à Universidade Federal de Viçosa que, juntamente com a UFLA, ofereceram sua estrutura e recursos humanos.

A todos os amigos e colegas que afortunadamente são muitos e contribuíram das mais diversas formas na finalização desta etapa tão importante de minha vida.

Ao Eduardo, por tudo.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 O cerrado	4
2.1.1 Características gerais.....	4
2.1.2 A flora e suas potencialidades	7
2.2 O baru	10
2.2.1 Taxonomia, descrição e ocorrência	10
2.2.2 Potencialidades e manejo	15
2.3 A citogenética de espécies vegetais do cerrado.....	18
2.4 Avanços metodológicos na citogenética vegetal	22
2.5 Aspectos da evolução cariotípica em plantas	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Material genético.....	31
3.2 Desenvolvimento da metodologia citogenética.....	32
3.2.1 Pré-tratamentos com antimitóticos	32
3.2.2 Sincronização do ciclo celular por bloqueio da síntese de DNA	34
3.2.3 Método de preparo das lâminas.....	37
3.2.3.1 Esmagamento	38
3.2.3.2 Dissociação celular e secagem ao ar	38
3.2.3.3 Avaliação.....	39
3.3 Análise cariotípica e bandeamento cromossômico.....	40
3.3.1 Coloração para análise cariotípica.....	40
3.3.2 Técnica rápida de bandeamento C.....	40
3.3.3 Técnica de bandeamento DAPI	41

3.3.4 Técnica de bandeamento CMA	42
3.3.5 Técnica de bandeamento Q	42
3.3.6 Metodologia de avaliação e análise de imagem	42
4 RESULTADOS	45
4.1 Desenvolvimento da metodologia citogenética.....	45
4.1.1 Pré-tratamentos.....	45
4.1.2 Sincronização do ciclo celular.....	47
4.1.3 Comparação dos métodos de preparo das lâminas	57
4.2 Análise cariotípica.....	59
4.3 Padrão de compactação da cromatina	64
4.4 Distribuição da heterocromatina	67
5 DISCUSSÃO.....	71
5.1 Aspectos metodológicos.....	71
5.2 Caracterização morfológica dos cromossomos	75
5.3 Distribuição da heterocromatina	78
5.4 Aspectos evolutivos.....	80
6 CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

RESUMO

TORRES, Giovana Augusta. **Morfologia e aspectos evolutivos dos cromossomos mitóticos de baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. 2001. 97 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento e Plantas). Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O estudo dos cromossomos de espécies vegetais do cerrado, tanto em seus aspectos numéricos como estruturais, apresenta grande potencial para o entendimento dos mecanismos evolutivos que ocorrem em espécies tropicais, bem como para o subsídio de programas de conservação e melhoramento genético. O baru (*Dipteryx alata* Vog.) é uma espécie de destaque, visto que o seu uso como fonte de alimentos e produção de madeira é reconhecido. Além disso, constitui um modelo interessante para estudos de evolução cariotípica, uma vez que é a única espécie de seu gênero que ocorre no cerrado, enquanto as outras ocorrem em Florestas. Este trabalho teve como objetivos a otimização de técnicas citogenéticas para a obtenção de metáfases de alta qualidade em células mitóticas de baru, descrever o cariótipo da espécie e avaliá-lo no que diz respeito a seus aspectos evolutivos. Para o acúmulo de metáfases de alta qualidade foram otimizados os parâmetros para sincronização do ciclo celular com uso de hidroxiuréia (HU) e de diferentes inibidores do fuso mitótico, em condições variadas de temperatura, tempo e concentração dos agentes. Para o preparo das lâminas foram adaptadas as técnicas de esmagamento e dissociação/secagem ao ar, ambas com uso de maceração enzimática. O cariótipo foi obtido da análise de imagens de metáfases coradas com solução de Giemsa 5% e diamidinofenilindole (DAPI) 0,5 µg/mL. Os cromossomos foram submetidos às técnicas de bandeamento C e coloração com os fluorocromos quinacrina, 4'-6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) e cromomicina B₃ (CMA). A exposição das radículas à solução de HU 3,5 mM por 20 h, seguida de recuperação do ciclo por 3 h e posterior bloqueio do fuso mitótico com solução de miprofosmetil (APM) 5 µM, por 3:40 h a 30°C ou de orizalina 5 µM, por 22 h a 4°C, propiciou índices metafásicos de cerca de 30% e metáfases com cromossomos alongados. A fórmula cariotípica obtida foi $2n=16 (3M + 4SM + 1SM^{sat})$. A técnica de banda C permitiu a diferenciação de regiões heterocromáticas, mas não produziu um padrão de bandas característico. A ausência de bandas DAPI+ e Q+ indicou a distribuição homogênea das sequências A + T ao longo do genoma. A identificação de bandas CMA+ nas regiões teloméricas de dois cromossomos revelaram a concentração de G + C, provavelmente associada à Região Organizadora do Nucléolo (RON). A possibilidade de ocorrência de fusão não cêntrica ao longo da evolução da espécie é vantajada com base nas características morfológicas, especialmente na existência de diversas constrições terciárias na maioria dos cromossomos.

Comitê Orientador: Lisete Chamma Davide - UFLA (Orientador), Carlos Roberto de Carvalho – UFV, Dulcinéia de Carvalho – UFLA.

ABSTRACT

TORRES, Giovana Augusta. **Morphology and evolutionary aspects of mitotic chromosomes of baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. 2001. 97p. Thesis (Doctoral degree in Genetics and Plant Breeding). Federal University of Lavras, Lavras.

Chromosome studies of Cerrado flora, with regard to their numerical and structural aspects, show great potential to unravel evolutionary pathways occurring in tropical species, as well as to assist genetic conservation and breeding programs. The baru tree (*Dipteryx alata* Vog. - Leguminosae) is a remarkable species, since it is the only one of the genus which occurs in Cerrado, while the others are found in rain forests; furthermore, its nutritional and woody usefulness is well recognized. The aims of this work were to develop cytogenetic techniques suitable to obtain high quality metaphases from baru root tip meristems, to describe the species karyotype and to investigate some karyotypic evolutionary aspects based on chromosome morphology. Accumulation of high quality metaphases was approached by optimization of cell cycle synchronization conditions by applying inhibiting agents to temporarily block DNA synthesis (hydroxyurea) and spindle assemblage (Amiprophos-methyl - APM, hydroxyquinolein, oryzalin, trifluralin, ethidium bromide and colchicine), submitted to different conditions of temperature, substances concentration and period of exposure. Slides were made by two methods, squashing and cellular dissociation / air drying, both with enzymatic digestion. The karyotype was obtained by image analysis of chromosomes dyed with Giemsa or fluorochrome 4'-6-diamidino-2phenylindole (DAPI) solutions. Chromosomes were also submitted to C, Q (quinacrina), DAPI and CMA (Chromomycina A₃) banding techniques. Metaphasic indexes of at least 30% and stretched chromosomes were obtained by the incubation of seedlings in 3.5 mM HU solution during 20 h, followed by 3h incubation in HU-free solution, and treating with spindle inhibiting agent (22h in 5µM oryzalin solution (4° C) or 3:40 h in 5µM oryzalin solution (30° C)). The karyotypic formula, described for the first time, was 2n = 16 (3M + 4 SM + 1SM^{sat}). C- banding technique differentiated heterocromatic regions, but was not able to produce a typical banding pattern. Absence of DAPI+ and Q+ bands indicated a homogeneous distribution of A+T rich sequences throughout the genome. Identification of CMA+ bands on telomeric regions of two chromosome pairs revealed a G+C concentration, probably associated to the nucleolar organizer region (NOR). A probable occurrence of non centric fusion in the evolutionary course of the species is discussed, based on chromosomes morphological characteristics, specially on the existence of tertiary constrictions in most of chromosomes.

Guidance Committee: Lisete Chamma Davide - UFLA (Major Professor), Carlos Roberto de Carvalho - UFV, Dulcinéia de Carvalho - UFLA.

termocicladores) e ao desenvolvimento de técnicas de análise de alta resolução como a hibridização *in situ* (fluorescente- FISH ou genômica – GISH), a técnica de reação em cadeia da polimerase *in situ* (PRINS), a micromanipulação dos cromossomos, citometria de fluxo e análise de imagens (MacGregor, 1993).

Juntamente com as técnicas citogenéticas convencionais, as mais recentes trariam informações valiosas para o entendimento da evolução cariotípica das espécies vegetais do cerrado. Considerando as condições ambientais extremas às quais estas espécies se adaptaram, vários mecanismos de evolução cromossômica desconhecidos, ou ainda não entendidos completamente, devem ser revelados.

Uma das principais teorias sobre a evolução das espécies do cerrado (Morawetz, 1990) defende a formação as mesmas a partir de espécies das florestas adjacentes, por meio de aumento do número de cromossomos. No entanto, esta teoria está fundamentada em informações de números cromossômicos de uma quantidade relativamente pequena de famílias incidentes em ambos os biomas e, ainda, com pouco conhecimento da relação filogenética existente entre elas. Dados mais recentes indicam um fluxo genético bidirecional entre o cerrado e as florestas (Forni-Martins e Martins, 2000). Portanto, é imprescindível a geração de informações cariotípicas mais detalhadas, em um número maior de espécies, que auxiliem na elucidação dos processos evolutivos, provavelmente complexos, pelos quais passaram as espécies tropicais.

O baru (*Dipteryx alata* Vog.) é uma das espécies do cerrado, pertencente à família Fabaceae, bastante promissora para estudos citogenéticos. Do ponto de vista aplicado, estas informações seriam subsídios importantes para programas de melhoramento e conservação genética. Isto porque o baru possui excelente potencial econômico, graças à sua madeira pesada e fruto com alto valor nutricional. Do ponto de vista citogenético, é um excelente objeto de estudo de evolução cariotípica. É a única espécie do gênero que ocorre no bioma cerrado,

enquanto todas as outras, também arbóreas, ocorrem em florestas úmidas, especialmente na Amazônia. Além disso, apresenta grande proximidade taxonômica com o cumaru (*D. odorata*), uma espécie da Amazônia brasileira fornecedora de cumarina, o que leva a crer que se tratam de espécies vicariantes (Rizzini, 1963).

Assim, os objetivos deste trabalho foram desenvolver metodologia citogenética para obtenção de cromossomos de baru com qualidade adequada para análise morfológica; descrever o cariótipo da espécie e reunir subsídios a respeito de aspectos evolutivos da espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O cerrado

2.1.1 Características gerais

O cerrado está localizado, em sua maior área, no planalto central do Brasil e é o segundo maior bioma do país em área, superado apenas pela floresta amazônica. Ocupa cerca de 2.000.000 km², ou seja, cerca de 200 milhões de hectares, o que representa 23% do território brasileiro. Abrange como área contínua os estados de Goiás, Tocantins e o Distrito Federal, parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo. Ocorre também em áreas disjuntas ao norte nos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Roraima e, ao sul, em áreas do Paraná. (Goedert, 1985).

O clima predominante no Cerrado é o tropical chuvoso, classificado como Aw de Koppen, caracterizado pela presença de invernos secos e verões chuvosos. Ao sul do bioma e em locais da região central com mais de 1.200 metros de altitude, predomina um clima mais ameno (Cwa de Koppen). A precipitação média varia de 750 a 2.000 mm/ano, sendo que na maior parte do bioma a variação está entre 1.100 a 1.600 mm. A duração da estação seca é de aproximadamente cinco meses, de meados de maio até meados de outubro. O mês mais seco tem até 30 mm de chuva em média, podendo chegar a zero.

O cerrado compreende regiões com altitudes contrastantes, desde as inferiores a 300m até as longas chapadas entre 900 e 1600 m. Esta condição, associada à extensa latitude, confere ao bioma uma diversificação térmica

bastante grande, sendo que a temperatura média do mês mais frio é superior a 18°C. (Ribeiro e Walter, 1998; Eiten, 1990).

O cerrado apresenta uma grande diversidade de solos, em função dos diferentes tipos de rochas de origem (ferromagnesianas, arenitas e quartzíticas, crostas ferruginosas e calcáreas) e dos diferentes ambientes em que foram formados. São identificadas oito classes principais de solo, com as respectivas áreas ocupadas: Latossolos (45,7%), Areias quartzosas (15,2%), Podzólicos (15,1%), Terra Roxa Estruturada (1,7%), Cambissolos (3,1%), Plintossolos (9%), Litossolos (7,3%), Hidromórfico cinzento, Glei Pouco Húmico e Glei Húmico (2,3%) (Reatto, Correia e Spera, 1998).

De maneira geral, os solos do Cerrado são altamente intemperizados, profundos e com boa drenagem, mesmo com altos teores de argila devido à estruturação desta porção. Quimicamente, são solos com baixa fertilidade, predominando solos distróficos, ou seja, com saturação por bases (riqueza do solo em bases trocáveis Ca^{++} , Mg^{++} e K^+) menor que 50% e/ou álicos, com saturação por alumínio superior a 50% (Goedert, 1985).

Esta grande amplitude de variação no clima e nos solos confere ao cerrado uma ampla diversidade de espécies vegetais, distribuídas em fisionomias que podem ser divididas em formações florestais, savânicas e campestres. Em sentido fisionômico, a formação floresta representa áreas com predominância de espécies arbóreas, onde há formação de dossel, contínuo ou descontínuo. O termo savana refere-se a áreas com árvores e arbustos espalhados sobre um estrato gramíneo, sem a formação de dossel contínuo. Já o campo representa áreas com predomínio de espécies herbáceas e algumas arbustivas, faltando árvores na paisagem (Ribeiro e Walter, 1998; Eiten 1990). Dentro das três fisionomias ocorre uma variabilidade suficiente para identificar pelo menos onze tipos fitofisionômicos, com 22 subtipos, os quais estão descritos na Tabela 1.

TABELA 2 Distribuição da flora nativa do bioma Cerrado nos diferentes níveis taxonômicos.

Grupo	Famílias	Gêneros	Espécies	Varied./subesp.	Nº taxa
Pteridófitas	19	51	267	26	282
Gimnospermas	1	1	2	0	2
Angiospermas	150	1092	6060	425	6387
Total	170	1144	6329	451	6671

Fonte: Mendonça et al., 1998.

No grupo das fanerógamas, dez famílias (7% do total) são responsáveis por 51% da riqueza florística, sendo que as 4 mais ricas são Leguminosae, Compositae, Orchidaceae e Gramineae, com 859, 559, 493 e 373 *taxa*, respectivamente. O número de *taxa* por formação existente no cerrado corresponde a 2.055 nos campos, 2.540 nas florestas e 2.880 nas savanas, indicando uma elevada contribuição das matas para a biodiversidade, visto que ocupa uma área relativamente pequena.

Segundo os autores, estes dados podem ainda ser considerados modestos, em função dos reduzidos trabalhos de coleta e amostragens nas diferentes fisionomias, especialmente quando se trata do grupo das pteridófitas. Se forem consideradas as espécies invasoras ou ruderais, existem 6.960 *taxa* ocorrendo espontaneamente no bioma cerrado.

Várias pesquisas têm mostrado que grande parte das espécies nativas do cerrado apresenta elevado potencial para aproveitamento econômico, abrindo uma nova perspectiva para a racionalização da ocupação da região (Silva et al., 1994).

Almeida et al. (1998) descrevem 110 espécies vegetais com os mais diversos usos, incluindo informações sobre o cultivo das mesmas. No estudo é interessante notar que grande parte das espécies apresenta pelo menos três potencialidades distintas.

As regiões de formações florestais possuem várias espécies arbóreas fornecedoras de madeira com propriedades distintas no que diz respeito à dureza, resistência e durabilidade e, portanto, com grande multiplicidade de uso. (Almeida et al., 1998).

Outro importante potencial para as espécies do cerrado é o ornamental. Várias espécies arbóreas são indicadas para o plantio em urbanizações, devido ao caráter perenifólio e à bela folhagem (Lorenzi, 1992). Muitas flores do cerrado também apresentam uma beleza bastante exótica, se domesticadas, provavelmente teriam muita aceitação no mercado. Uma outra fonte, já bastante utilizada, é a coleta de plantas secas, as quais são intensivamente comercializadas em feiras, principalmente na forma de arranjos (Almeida *et al.*, 1998).

Inúmeras espécies do cerrado são utilizadas na medicina popular, especialmente por raizeiros. Eles desenvolvem técnicas de manipulação de diferentes partes das plantas e comercializam-nas principalmente em feiras. Alguns trabalhos científicos têm demonstrado tais propriedades farmacológicas, mas esses estudos ainda são escassos (Almeida *et al.*, 1998). Rodrigues e Carvalho (2001) apresentaram 164 espécies levantadas em cinco municípios da região do Alto do Rio Grande utilizadas na medicina caseira, acompanhadas das indicações, parte(s) usada(s), modo de preparo e dosagem para cada uma delas. Gavilanes e Brandão (1992) descrevem o uso de diferentes partes de 23 espécies, veiculadas através da cachaça como medicamentos.

Alguns produtos extraídos de espécies do cerrado são usados pelas populações regionais e apresentam grande potencial para a indústria, tais como o tanino (Brandão, 1992), fibras (Laca-Buendia, 1992), óleos (Macedo, 1992) e matéria tintorial (Silva Filho, 1992).

O potencial mais explorado do cerrado é o seu aproveitamento alimentar. Várias frutas têm sido consumidas desde a ocupação do cerrado, *in natura*, ou na

forma de sucos, licores, sorvetes, geléias e pratos salgados. Tais frutos apresentam sabor “*sui generis*” e elevados teores de açúcares, proteínas, vitaminas e sais minerais, muitas vezes superando os alimentos típicos da dieta alimentar (Almeida, 1998).

Vários autores têm se preocupado com a divulgação do potencial alimentar das espécies nativas, visando ao resgate da cultura popular e a contribuição para uma utilização mais racional do ecossistema, visando principalmente pelos pequenos produtores. Almeida (1998) descreveu cerca de duzentas receitas populares produzidas com base em 26 espécies nativas. Silva *et al.* (1994) reuniram informações sobre os frutos, receitas, sobre germinação e produção de mudas para 35 das espécies frutíferas mais conhecidas.

Grande parte dos autores citados chama a atenção para o fato de que grande parte do aproveitamento das espécies nativas implica na eliminação do indivíduo como um todo, ou de suas partes reprodutivas. Isso significa que este tipo de utilização extrativista e predatória pode levar à extinção destas espécies. Assim, é de suma importância o estudo delas com os objetivos de conservação, cultivo e melhoramento genético.

2.2 O baru

2.2.1 Taxonomia, descrição e ocorrência

O gênero *Dipteryx* Schreb., pertencente à família Fabaceae – Faboideae, contém 25 espécies distribuídas na América do Sul e Central. Quinze delas ocorrem no Brasil, dentre elas o baru ou *D. alata* Vog.

Este gênero é resultado da união de outros dois gêneros, ambos de Aublet, o *Taralea* e *Coumarouna*. Esta junção foi proposta por Schreber, em 1791, com base nas semelhanças das flores, sem levar em conta a diversidade

acentuada dos frutos. Apesar da insuficiência de evidências e da divergência de Aublet, a nomenclatura *Dipteryx* Schreb. foi consagrada. No entanto, o gênero *Taralea* é ainda considerado por alguns nomenclaturistas como um gênero autônomo (Ducke, 1948). Este autor sugere que esta questão seja revisada para adequar a classificação.

Segundo a base de dados do Missouri Botanical Garden (www.mobot.org) e Kew Royal Botanical Garden (www.rbgekew.org), existem 25 espécies de *Dipteryx* Schreb. Destas, dezesseis são oriundas do grupo do gênero *Coumarouna* (*D. alata*, *D. charapilla*, *D. coreacea*, *D. ferrea*, *D. lacunifera*, *D. magnifica*, *D. mircantha*, *D. odorata*, *D. oleifera*, *D. panamensis*, *D. polyphylla*, *D. punctata*, *D. rosea*, *D. speciosa*, *D. tetraphylla*, *D. trifoliolata*), 2 do grupo do gênero *Taralea* (*D. cordata*, *D. rigida*), quatro foram simultaneamente classificadas como pertencentes aos gêneros *Taralea* e *Coumarouna* (*D. crassifolia*, *D. nudipes*, *D. oppositifolia*, *D. reticulata*), uma espécie apresenta sinonímia com o gênero *Pterodon* (*D. emarginata*) e duas espécies foram classificadas diretamente no gênero *Dipteryx* (*D. phaeophylla* e *D. pteropus*). Estes dados mostram que a questão taxonômica proposta por Ducke, em 1948, ainda persiste sem alteração, provavelmente devido à falta de estudo, uma vez que nenhum outro relato foi encontrado na literatura.

A espécie *D. alata* Vog. é a única do gênero que ocorre no bioma cerrado, enquanto as outras ocorrem em matas, especialmente na Floresta Amazônica (Ducke, 1948; Melhem, 1975b). Segundo Rizzini (1963), o baru é provavelmente uma espécie vicariante de *D. odorata*, devido à grande afinidade taxonômica entre eles.

O baru (Figura 1) é também conhecido pelos nomes populares de barujo, coco-feijão, cumbaru, emburena brava, feijão-coco, pau-cumaru, cumaru, cumaru-rana ou fruta de macaco. É uma árvore perenifólia a levemente caducifólia, que comumente apresenta de 5 a 10 m de altura e 15 a 40 cm de

diâmetro à altura do peito (DAP), podendo alcançar até 25 m de altura e 70 cm de DAP. As folhas são compostas, imparipinadas, com quatro a sete folíolos alado-pecioladas e glabros. Apresenta inflorescência do tipo panícula, contendo cerca de duzentas a mil flores hermafroditas, as quais medem aproximadamente 8mm cada, possuem cinco pétalas de coloração alva a amarelada, dez estames e ovário súpero unilocular. A floração ocorre nos períodos de outubro a abril e a frutificação de julho a outubro (Lorenzi, 1992; Carvalho, 1994)

O fruto é uma drupa elipsóide ligeiramente comprimida, com cerca de 5 cm de comprimento e coloração que vai de amarela a marrom. O pericarpo é dividido em três camadas: epicarpo coriáceo (casca), mesocarpo de polpa escura esponjosa (polpa) e o endocarpo (caroço) formado de fibras lignificadas, que o torna duro e resistente. A semente, que é única por fruto e envolvida pelo endocarpo, apresenta coloração marrom-clara a preta e mede cerca de 2 cm (Figura 1). Apresenta embrião grande e é classificada como exalbuminosa (sem endosperma), ficando as reservas presentes nos cotilédones (Melhem, 1974 a).

Melhem (1974b) mostrou que, ao contrário do que acontece na maioria das espécies da família Fabaceae, a semente do baru não apresenta tegumento impermeável. Este é o principal local de entrada de água, seguido do hilo e da micrópila. A entrada é ainda mais facilitada pela presença de fendas micro e macroscópicas no tegumento.

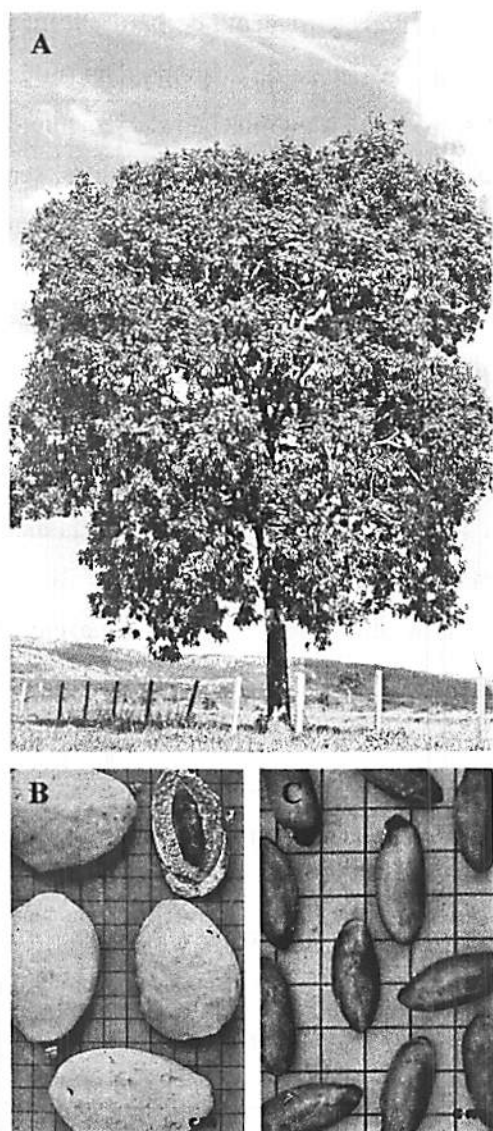


FIGURA 1 A árvore do baru (*Dipteryx alata* Vog.)(A); o fruto do baru inteiro e em corte longitudinal mostrando as três camadas; a semente de baru (C). Extraído de Lorenzi (1992)

Em condições naturais, a semente de baru germina dentro do fruto, na superfície do solo, o que leva cerca de quarenta dias (Filgueiras e Silva, 1975). Melhem (1975a) observou que a germinação da semente dentro do fruto não é afetada pelo tipo de solo ou pela intensidade luminosa, sendo que a plântula se desenvolve rapidamente, com destaque para o sistema radicular, que chega a possuir o dobro do tamanho da parte aérea. Apesar de não influenciar a germinação, a luz teve grande efeito sobre a sobrevivência e o desenvolvimento das plântulas, afetando a morfologia das folhas.

Em função do longo período de germinação, a extração da semente do fruto para produção de mudas é recomendada por Lorenzi (1992). Quando extraída do fruto, a semente germina em quatro a seis dias, com alto índice de sobrevivência (90% a 100%), a temperatura de 30° a 36° C. Apresenta viabilidade de três a quatro anos, quando armazenada em local seco a temperatura ambiente. A semente passa por um período de cerca de dois meses de pós-maturação, provável mecanismo de adaptação ao período de seca que o fruto enfrenta no final de sua maturação até a chegada das chuvas. Não foi identificada presença de cumarina, composto inibidor da germinação típico do gênero (Melhem, 1975b)

A espécie apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nos estados de Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Maranhão, Piauí e Tocantins (Carvalho, 1994 e Lorenzi, 1992).

Os tipos fisionômicos em que a espécie ocorre são bastante variados, de acordo com dados da literatura, indicando que o baru tem uma grande amplitude de adaptação. Sua ocorrência é descrita em áreas de campo sujo, savanas (cerrado sentido restrito e parque de cerrado) e em áreas de floresta (cerradão e mata) (Almeida *et al.* 1998; Carvalho, 1994; Lorenzi, 1992). Filgueiras e Silva

(1975) verificaram que no estado de Goiás a espécie apresentou preferência por solos ácidos, de fertilidade média e areno-argilosos.

2.2.2 Potencialidades e manejo

O baru é uma espécie bastante utilizada pelas populações locais nas regiões onde ocorre. Em relação a outras espécies nativas do cerrado, ela vem sendo bem estudada, no que diz respeito às suas diversas potencialidades.

A madeira do baru é considerada muito pesada, com densidade de 0,85 a 1,10 g/cm³ e apresenta alta resistência ao apodrecimento e ao ataque de organismo xilófagos, mesmo em condições adversas. Devido a essas características, é considerada própria para construção de estruturas externas, como postes e dormentes e para construção naval e civil, como vigas, portas e janelas (Lorenzi, 1992; Carvalho, 1994).

Em um ensaio de avaliação, por oito anos, de nove espécies do cerrado para fins silviculturais e de arborização, Toledo Filho (1988) mostrou que o baru é uma espécie bastante promissora, destacando-se em todas as características avaliadas. Apresentou altura total de 6,3 m, com incremento anual de 0,79 m; sobrevivência de 97% e fuste ótimo (retilíneo, ramificação monopodial, derrama natural).

Andrade e Carvalho (1996) avaliaram o potencial da madeira de baru para produção de celulose e papel kraft. Comparada à madeira de eucalipto, a madeira do baru forneceu papel de qualidade inferior, com exceção da resistência à tração e esticamento. Os autores recomendam a utilização da celulose do baru, de forma isolada ou consorciada com a de eucalipto, para confecção de papéis de impressão rápida e para produção de papéis de embrulho e embalagens.

O fruto do baru vem sendo utilizado como fonte de alimento, tanto na nutrição humana (amêndoa na forma de doces) quanto animal (polpa). Esta aceitação do fruto levou alguns pesquisadores a estudarem sua composição química, tanto da polpa como da semente. As sementes apresentaram alto valor calórico, 476 cal/100g, e altos teores de proteína e óleo. No que diz respeito ao valor protéico, as amêndoas apresentaram teores de 21,1% a 29,6%, valores próximos ou superiores aos de outras leguminosas consumidas normalmente, como a ervilha (22%), feijão-comum (20%), feijão de corda (22%) e grão de bico (16%), e inferior ao da soja (38% a 44%). A amêndoa apresentou também altos teores de óleos, 31,97% a 41,65%, com predominância de ácidos graxos monoinsaturados (cerca de 80%), especialmente oléico e linoléico. Este valor é comparável ao da soja e, qualitativamente, o óleo foi equiparado aos óleos de amendoim e oliva (Togashi e Sgarbieri, 1994; Filgueiras e Silva, 1975; Vallilo, Tavares e Aued, 1990; Almeida, Silva e Ribeiro, 1990).

A polpa apresentou alto valor calórico médio (276 cal/100g) e fonte potencial de carboidratos digeríveis (30,8%) e de fibras (29,5%). Este teor de fibra classifica a polpa como produto com teor de fibras intermediário.

A qualidade do valor nutricional do óleo e da proteína das amêndoas do baru foi avaliada por Togashi e Sgarbieri (1995), por meio de ensaios biológicos com ratos. Tanto as sementes cruas como as torradas apresentaram proteína com baixo quociente protéico e menor capacidade de promover ganho de peso. Os autores atribuíram esta baixa qualidade ao baixo teor de aminoácidos sulfurados, especialmente metionina e cisteína. O óleo, por sua vez, apresentou valor nutritivo semelhante ao da soja.

Togashi (1993) avaliou a presença de fatores antinutricionais e depreciadores do sabor do fruto. A polpa apresentou alto teor de taninos (3%), o qual foi associado ao estágio inicial de maturação do fruto. A semente apresentou atividade antitripsina média a baixa, que foi inativada pela

temperatura quando as sementes foram torradas. Kalume, Sousa e Morhy (1995) isolaram, purificaram e seqüenciaram um inibidor de tripsina (DATI – *Dipterix alata* tripsin inhibitor). O inibidor apresentou homologia com os inibidores da família Bowman-Birk, típico de leguminosas e apresentou seis isoformas distintas.

O baruzeiro é ainda usado para compor projetos paisagísticos devido à beleza de sua folhagem e capacidade de propiciar sombra (Lorenzi, 1992) o óleo é empregado de forma medicinal como anti-reumático, tendo ainda propriedades sudoríferas, tônicas e reguladoras de menstruação (Almeida, 1998).

A variabilidade genética existente em diversas procedências no país tem sido avaliada por alguns pesquisadores, visando subsidiar programas de conservação e melhoramento genético. Em função do risco de extinção da espécie no estado de São Paulo, o Instituto Florestal daquele estado iniciou um programa de conservação *ex situ* para garantir a sobrevivência da espécie. Para tanto, Siqueira *et al.* (1993) realizaram testes de progênies de cinco procedências, avaliando altura e DAP em seis idades diferentes (5 a 13 anos). O material apresentou desenvolvimento lento, sendo indicado para produção de madeira a longo prazo e plantios para conservação genética. Os autores destacam a necessidade de avaliação do material em idades mais avançadas e de estudo da estrutura genética destas populações.

Oliveira (1998) avaliou três procedências do estado de Minas Gerais e verificou que o material apresentou desenvolvimento moderado, com índice de sobrevivência de 100%. Os valores de herdabilidade foram de médio a alto, indicando perspectivas de sucesso com a seleção para altura e DAP. No entanto, como a avaliação foi feita em árvores de dezenove meses, torna-se necessária a avaliação das progênies em idades mais avançadas, já que não se tem informação sobre a correlação para seleção precoce.

Sano, Vivaldi e Spehar (1999) avaliaram 58 matrizes oriundas de seis localidades (cinco de Goiás e uma de Minas Gerais) quanto à cor do tegumento, peso e largura do fruto e peso das sementes, nos anos de 1994 e 1995. Com o uso de análise multivariada, foi possível formar cinco grupos distintos, evidenciando existência de variabilidade entre e dentro das procedências para todas as características avaliadas e, ainda, a presença de interação com o ano de coleta.

Alguns trabalhos já têm sido feitos com objetivo de se estabelecer um sistema de produção eficiente para cultivo comercial, tais como profundidade de semeadura para produção das mudas, condições para cultivo das mudas, espaçamento de plantio e tratos culturais (Aguiar *et al.*, 1992; Fonseca *et al.*, 1994).

2.3 Citogenética de espécies vegetais do cerrado

Grande parte dos princípios citotaxonômicos e modelos de evolução desenvolvidos para espécies vegetais é oriunda de estudos das floras norte-americanas e européias. Isto porque os estudos citogenéticos das mesmas são muito mais intensos, quando comparados aos das espécies tropicais (Guerra, 1986). Esta relativa escassez de informações sobre o complemento cromossômico de espécies tropicais leva a controvérsias sobre os padrões de diferenciação cariológica das mesmas (Morawetz, 1986).

Do ponto de vista evolutivo, Ehrendorfer, citado por Guerra (1986), chama a atenção para a importância de estudos cariossistemáticos de espécies tropicais, especialmente as lenhosas, considerando que: 1) as angiospermas primitivas foram provavelmente lenhosas e tropicais; 2) os dados sobre lenhosas

tropicais sugerem que o espectro de mecanismos citogenéticos nessas plantas difere das lenhosas temperadas; 3) a maior estabilidade dos trópicos, tanto sazonal quanto geológica, contribuiria para a manutenção de padrões evolutivos primitivos; 4) a grande diversidade dos trópicos poderia conter grupos com evolução intensa ao lado de grupos especialmente conservadores.

A determinação do número cromossômico de várias espécies tropicais, em trabalhos como os de Tjio (1948), Atchison (1951), Coleman (1982), Mehra e Bawa (1986), Guerra (1986), Beltrão e Guerra (1990), e a geração de dados cariomorfológicos e de padrões de bandeamento (Morawetz, 1986) têm fornecido subsídios importantes para o entendimento dos eventos envolvidos na evolução de unidades taxonômicas, bem como auxiliado na sistemática dos grupos estudados. No entanto, dada a grande diversidade da flora tropical, a porcentagem de espécies analisadas é pequena e as informações, na maioria das vezes, se restringem à determinação do número cromossômico.

Assim como em todas as áreas tropicais, no cerrado os estudos citogenéticos são escassos. Considerando a estimativa de ocorrência de cerca de 6.400 espécies de angiospermas, apenas cerca duzentas, ou seja, 3% tiveram seu número cromossômico determinado. Informações sobre a morfologia dos cromossomos foram raramente encontradas e o comportamento meiótico foi descrito em alguns trabalhos, como será mostrado a seguir.

Bandel (1974) determinou o número de cromossomos de 42 espécies de leguminosas brasileiras, pertencentes às subfamílias Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae, das quais 25 ocorrem no cerrado. Juntamente com os dados existentes na literatura, o autor mostrou que tanto a poliploidia como a aneuploidia foram eventos de variação numérica importantes para a evolução da família. As subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae, apresentaram, respectivamente, números básicos mais frequentes de $n = 14$, $n = 13$ e $n = 8$ e frequência de poliplóides de 30,18%, 82,71% e 30,18%. Com base

nestas diferenças marcantes nos complementos cromossômicos, o autor defende a independência botânica das subfamílias.

Forni-Martins, Pinto-Maglio e Cruz (1995) apresentaram números cromossômicos de vinte espécies de doze famílias diferentes. O número variou de $2n = 16$ em *Syrax ferrugineus* a $2n = \text{ca.}270$ em *Eriotheca pubescens*. Os números altos indicaram também a importância da poliploidia na evolução de espécies tropicais. No entanto, não concordaram com a hipótese de correlação entre poliploidia e condições de altas latitude e altitude.

Oliveira (1998) avaliou o número cromossômico de quinze espécies vegetais, partindo de células em mitose e meiose, das quais nove foram avaliadas pela primeira vez. Os números obtidos indicaram a ocorrência de poliploidia e aneuploidia ao longo da evolução dos grupos taxonômicos estudados, inclusive na família Leguminosae, confirmando os resultados de Bandel (1974). A microsporogênese foi avaliada em onze das quinze espécies, havendo uma série de irregularidades no processo meiótico em dez delas, tais como pareamento irregular, cromossomos retardatários e formação de pontes na anáfase, presença de micronúcleos e grãos de pólen estéreis. O autor atribui isso a prováveis processos evolutivos de natureza citogenética em andamento nas populações naturais, ou ao fato de o processo reprodutivo sexuado ter sido substituído por um processo assexuado eficiente.

No entanto, Forni-Martins, Pinto-Maglio e Cruz (1992) observaram irregularidades meióticas em apenas três espécies entre as dezoito avaliadas. As irregularidades constatadas foram a ocorrência de citomixia, número variado de cromossomos em nas células-mãe dos grãos de pólen, micronúcleos nas tétrades, disjunção cromossômica irregular, ocorrência de trivalentes e alta porcentagem de pólenes inviáveis. Esta tendência de predominância de processo meiótico regular foi confirmada por Forni-Martins e Martins (2000), que observaram anormalidades meióticas em quatro das dezessete espécies avaliadas.

Considerando os dois trabalhos, 80% das espécies apresentaram meiose normal. Esses resultados indicam que a reprodução sexuada é tão importante quanto os mecanismos de reprodução assexuada por estruturas vegetativas, muito comum em espécies do Cerrado.

O estudo citogenético de dezoito espécies do gênero *Lychnophora*, que ocorrem de forma endêmica em campos rupestres, forneceu informações importantes para solucionar questões taxonômicas do gênero. Foram encontrados três números haplóides, $n = 17, 18$ e 19 , e uma população poliplóide em uma das espécies (*L. staavioides*). O estudo meiótico e da viabilidade de grãos de pólen mostrou grande regularidade, confirmando a importância da reprodução sexuada para as espécies do cerrado (Mansanares, 2000).

Forni-Martins e Martins (2000) apresentaram o número cromossômico de vinte espécies de treze famílias, coletadas nos estados de São Paulo, Goiás e Minas Gerais. Os números cromossômicos variaram de $2n = 18$ a $2n = \text{ca.}104$, sendo baixos ($20 < 2n < 30$) na maioria das espécies. Reunindo os dados de números cromossômicos de espécies do cerrado e de floresta, os autores consideram que a hipótese de derivação da flora do cerrado a partir das Florestas fronteiriças, por aumento do número cromossômico (Morawetz, 1990) não pode ainda ser corroborada. Isto porque a porcentagem de espécies do Cerrado estudadas é muito pequena, o conhecimento da relação filogenética entre espécies do cerrado e de floresta é escasso, espécies florestais também possuem números elevados de cromossomos e números elevados de cromossomos não indicam necessariamente derivação, já que a disploidia também deve ser considerada. Ao contrário, os dados sugerem um fluxo genético bidirecional, com especiação em cada ambiente em função da influência da ocorrência alternada de expansão e contração de ambas as formações.

2.4 Avanços metodológicos na citogenética vegetal

O conhecimento dos componentes estruturais, funcionais e comportamentais dos cromossomos é de suma importância para o entendimento da biodiversidade e dos processos evolutivos e para manipulação genética em programas de melhoramento (Sharma e Sharma, 1999).

A citogenética é uma ciência cujo progresso sempre esteve intimamente ligado aos avanços de equipamentos e técnicas. As primeiras contribuições da citogenética vegetal foram, principalmente, a contagem de número cromossômico e o estudo do comportamento meiótico em cortes histológicos. O desenvolvimento da técnica de esmagamento, associada a metodologias de pré-tratamentos com inibidores do fuso mitótico e clareamento do citoplasma, permitiu o estudo da morfologia dos cromossomos, ampliando o conhecimento sobre o cariótipo de inúmeras espécies (Fukui e Nakayama, 1996).

Os pré-tratamentos para inibição do fuso mitótico propiciaram a obtenção de cromossomos com morfologia bem definida, especialmente as constrições, bem como o acúmulo de células em metáfase. Este efeito pode ser produzido por tratamento com baixa temperatura ou com substâncias químicas, tais como colchicina, hidroxiquinoleína, bromonaftaleno e paradiclorobenzeno, em condições diversas de concentração e temperatura, dependendo do tipo de cromossomo a ser estudado (Singh, 1993; Sharma e Sharma, 1999). Estes pré-tratamentos causam distúrbios diretos ou indiretos nas tubulinas formadoras dos microtúbulos, impedindo a formação do fuso mitótico. A substância mais amplamente usada e cujo mecanismo de ação é conhecido é a colchicina. Ela se liga estequiometricamente à tubulina, em um sítio específico, formando um complexo tubulina-colchicina, o qual pode se ligar a tubulinas livres. Provoca então a despolimerização dos microtúbulos já organizador e ainda inibe a sua polimerização ligando-se às suas extremidades (Morejohn et al., 1987).

Recentemente, algumas substâncias de ação herbicida, como orizalina, trifluralina e amiprofosmetil (APM), têm sido usadas com sucesso no estudo de cromossomos de plantas (Pan, Houben e Schlegel, 1993; Gualberti *et al.*, 1996; Aarestrup, 2001). A ação destes compostos na célula não é ainda totalmente conhecida. No caso da trifluralina e orizalina provavelmente ocorre interferência na síntese e manutenção das subunidades microtubulares, levando à desorganização do fuso mitótico (Bartels e Hilton, 1973). O APM, por outro lado, apresenta um mecanismo semelhante ao da colchicina, no entanto, com ligação em um sítio distinto com afinidade bem superior ao da colchicina em células vegetais (Morejohn e Fosket, 1984). Trabalhos com estes três herbicidas antimitóticos têm mostrado uma alta afinidade por tubulinas de células vegetais e um efeito bastante diferenciado na desorganização do fuso mitótico, dependendo da concentração em que são usados e o tempo que as células ficam expostas (Bartels e Hilton, 1973; Morejohn e Fosket, 1984; Hansen, et al., 1998; Binsfield, Peters e Schnabel, 2000)

Outra estratégia de acúmulo de células em metáfase, que vem sendo usada em técnicas que exigem grande quantidade de cromossomos de alta qualidade, como a citometria de fluxo, é a sincronização do ciclo celular por meio de bloqueio reversível da fase S da intérfase. Este bloqueio pode ser atingido por meio de agentes químico, como a hidroxiuréia (HU) ou afidilcolina (APH). A hidroxiuréia é a mais utilizada e atua inibindo a enzima ribonucleotideo redutase, que é responsável pela produção de desoxiribonucleotídeos, partindo de ribonucleotídeos. Ao ser removida, o ciclo é reiniciado, com grande parte das células no mesmo estágio (Heslop-Harrison e Schwarzacher, 1996; Pan, Houben e Schlegel, 1993).

Considerando que a duração do ciclo celular, bem como de suas fases, varia bastante de uma espécie para outra (Clark e Wall, 1996), e entre células do mesmo tecido meristemático (Clain e Brulfert, 1980), é importante que para

cada espécie sejam ajustadas às condições ótimas de sincronização, especialmente a concentração do agente bloqueador, o tempo de bloqueio e o tempo de recuperação do ciclo (Lee *et al.*, 1997).

Além dos avanços nas técnicas de preparo das células para obtenção de metáfases em quantidade e com qualidade, as técnicas de preparo de lâminas também foram aperfeiçoadas. A possibilidade de uso das enzimas capazes de degradar a parede celular, a partir da década de 1940, permitiu não somente a melhoria da qualidade das preparações pelo método do esmagamento, como também viabilizou o uso da técnica de secagem ao ar, amplamente usada em animais (Fukui e Nakayama, 1996).

O desenvolvimento da técnica de secagem ao ar para células vegetais eliminou alguns problemas inerentes da técnica de esmagamento, como possíveis alterações da morfologia do cromossomo, baixa resolução de cromossomos pequenos (1 a 3 μ m), dificuldade de espalhamento no mesmo plano focal e persistência de restos citoplasmáticos envolvendo os cromossomos (Murata, 1983; Carvalho e Saraiva, 1993a; Carvalho, 1995). As lâminas obtidas por secagem ao ar apresentam metáfases de alta qualidade, com resolução dos detalhes mais finos da estrutura dos cromossomos (Fukui e Nakayama, 1996) e apropriadas para qualquer tipo de abordagem citogenética, incluindo as técnicas de hibridização *in situ* (Heslop-Harrison e Schwarzacher, 2000).

A diferenciação das regiões heterocromáticas ao longo das cromátides, a partir de técnicas de bandeamento capazes de produzir padrões característicos, representou um grande avanço para a ampliação das informações sobre o complemento cromossômico de várias espécies. Os padrões de bandeamento obtidos por diferentes métodos permitiram o estudo detalhado de cada par de homólogos, propiciando o pareamento correto e a identificação de rearranjos cromossômicos (Pieczarka e Mattevi, 1998).

As regiões heterocromáticas são reveladas, de forma inespecífica, por técnicas de banda C. O uso de fluorocromos (quinacrina, cromomicina A₃ e diamidinofenilindole) e enzimas de restrição permitem a identificação de porções específicas da heterocromatina, em função da composição de bases que apresentam (para descrição detalhada dos métodos e aplicações consultar Sumner, 1990).

A citogenética molecular representa um dos grandes avanços recentes no estudo dos cromossomos, permitindo a identificação de seqüências específicas nos cromossomos, por meio de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), ou até mesmo de genomas inteiros, por meio de hibridização fluorescente *in situ* (GISH). Estas técnicas têm tido grande impacto no estudo de caracteres de interesse econômico (Gill, 1995), bem como no estudo da diversidade para fins evolutivos e taxonômicos (Bennett, 1995).

Associada a todas estas metodologias de preparo de lâminas de qualidade e diferenciação de regiões cromossômicas de diferentes naturezas, a implantação de sistemas de análise de imagens contribuiu de forma decisiva para aumentar o valor informativo das observações microscópicas. As imagens digitalizadas podem ser analisadas de forma a melhorar sua qualidade, intensificar sinais, bem como para obter dados quantitativos diversos (contagens, medidas de área e comprimento) com precisão muito maior (Bradbury, 1989). As diversas ferramentas disponíveis nos programas permitem o estudo dos perfis de bandas (Carvalho, 1995), a criação de parâmetros de imagem para diferenciação de cromossomos de morfologia muito semelhante (Fukui e Mukai, 1988), construção de mapas cromossômicos quantitativos (Fukui *et al.*, 1998) e o estudo detalhado de cromossomos pequenos e, portanto, de difícil análise (Bauchan e Campbell, 1994).

2.5 Aspectos da evolução cariotípica em plantas

Os cromossomos, bem como o DNA, são capazes de mudar seus arranjos lineares sem que ocorra perda de função. Eles são geralmente estáveis no que diz respeito à hereditariedade, mas sua mutabilidade inerente produz um pequeno, mas incessante, nível de mudanças estruturais que fornece variação necessária para a evolução cromossômica (Jones, 1978).

O processo evolutivo, do ponto de vista citogenético, se baseia em dois tipos de alterações, as numéricas e as estruturais. As primeiras podem ser do tipo poliploidia, muito freqüente em plantas e raras em animais, ou aneuploidia. As alterações estruturais envolvem a perda ou ganho de DNA e rearranjos estruturais dos cromossomos como as inversões, translocações, fusões, fissões e duplicações (Clark e Wall, 1996).

As fusões Robertsonianas, fusões cêntricas ou fusões cromossômicas formam o tipo de rearranjo estrutural mais comum encontrado entre espécies ou raças cromossômicas, especialmente no reino animal e com menos frequência em plantas superiores (King, 1993).

Segundo John e Freeman (1975), a fusão ocorre em decorrência da quebra no centrômero, ou em suas proximidades, em dois cromossomos acro-telocêntricos, geralmente não homólogos, seguida da união entre os segmentos mais longos para formar um cromossomo metacêntrico e os mais curtos para formar um fragmento que geralmente é perdido. Estes fenômenos consecutivos de quebra e fusão podem ocorrer de formas variadas, já documentadas em diferentes espécies e que estão apresentadas no Quadro 1.

QUADRO 1 Resumo dos diferentes tipos possíveis de fusão Robertsoniana, considerando a ocorrência prévia de quebra. Setas indicam pontos de quebra e os blocos pretos a heterocromatina pericentromérica (Adaptado de John e Freeman (1975); King (1993)).

Tipo	Rearranjo	Fragmento perdido
1		
2		
3		
4		
5		
6		

A manutenção dos cromossomos formados após a fusão depende do tipo de cromossomo formado, ou seja, se possui centrômero, se contém informação genética significativa, e se apresenta comprimento suficiente para formar quiasmas e segregar de forma bem sucedida (Jones, 1998). Esta segregação do heterozigoto para fusão ocorre quando o cromossomo metacêntrico parecia com os acro ou telocêntricos homólogos, formando o quiasma tipo V e a migração se dá de forma balanceada. Metade dos gametas apresentará o cromossomo metacêntrico e metade os homólogos não fundidos; assim, a mutação pode ser rapidamente fixada (King, 1993).

As conseqüências evolutivas das fusões são a produção de barreiras reprodutivas que impedem a troca gênica e, conseqüentemente, progressivo isolamento de populações e espécies incipientes (King, 1993) e, ainda, influências na recombinação gênica e segregação decorrentes da mudança do número e natureza dos grupos de ligação (modificação intercromossômica) e das alterações de frequência e distribuição dos quiasmas (Bidau, 1990 e 1993).

Em plantas superiores, apesar de poucos gêneros apresentarem evidências de ocorrência de fusão, Jones (1978) acredita que ela deva representar um papel igualmente importante. A baixa incidência não estaria relacionada à não ocorrência, mas sim à dificuldade de detecção, em função do reduzido tamanho dos cromossomos da maioria das espécies vegetais ou ainda à perda das características indicadoras, devido à combinação de variações cromossômicas adicionais, tanto numéricas quanto estruturais.

Jones (1998) descreve a identificação de ocorrência de fusão e fissão em pelo menos oito gêneros de diferentes famílias. As abordagens usadas para detectar as evidências de ocorrência destes arranjos, nos diferentes trabalhos, foram o estudo do número cromossômico, bandeamento e comportamento meiótico.

A técnica de FISH, especialmente com uso de sondas teloméricas, tem contribuído muito para o entendimento dos tipos e conseqüências das fusões cêntricas. Meyne *et al.* (1990) estudaram a localização de seqüências teloméricas em mais de cem espécies de vertebrados e verificaram que quase metade delas revelou repetições teloméricas não somente na extremidade do cromossomo, mas também em vários locos intersticiais e, mais freqüentemente, nas regiões centroméricas. Tais resultados podem ser tomados como evidência para possíveis fusões entre extremidades em pontos distantes do(s) centrômero(s) (Schubert *et al.* 1992), um modelo até então não considerado para fusões do tipo Robertsoniana.

Slijepcevic (1998) discute o papel do telômero nos possíveis mecanismos determinantes da formação de diferentes tipos de fusão. Os sítios de seqüências teloméricas encontrados em regiões pericentroméricas em cromossomos de vertebrados sugere a ocorrência de fusão Robertsoniana sem perda de telômero, mas sim com sua inativação. A perda do telômero também é considerada, como conseqüência, tanto do encurtamento induzido pela deleção de genes de RNA envolvidos na ação da telomerase, levando à perda do telômero, como da ocorrência de quebras na região centromérica de cromossomos acrocêntricos. Esta última, resultado do antagonismo entre telômero e centrômero, dada a proximidade entre eles no braço curto, é a única claramente demonstrada.

Em plantas, Fuchs, Brandes e Schubert (1995) encontraram seqüências teloméricas intersticiais em nove das 44 espécies estudadas. Estes resultados indicam ser este evento menos freqüente do que em cromossomos de vertebrados, especialmente na região centromérica.

Em *Vicia faba*, as sondas hibridaram somente nas extremidades, não mostrando evidências de que a hipótese de fusão/fissão, sem ocorrência prévia de quebra, esteja correta. Mas, os autores consideram que as seqüências

teloméricas remanescentes podem ter sido encurtadas a tal ponto que não são detectáveis via hibridização *in situ*. Assim, o modelo de fusão/fissão sem perda ou ganho de cromatina é uma hipótese que não deve ser descartada, mas verificada por meio de sequenciamento das regiões centroméricas e estudo de progênies de *V. faba*, para identificar a reversibilidade da fusão/fissão (Schubert *et al.*, 1992).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

O estudo citogenético do baru (*Dipteryx alata* Vog.) foi feito em amostras de sementes obtidas de três procedências do estado de Minas Gerais: Brasilândia (noroeste), Jequitaiá (norte) e Capinópolis (triângulo mineiro) cedidas pela Dra. Dulcinéia de Carvalho, do Departamento de Ciências Florestais/Universidade Federal de Lavras e em amostras da procedência de Formosa, no estado de Goiás, cedidas pela Dra. Sueli Satiko Sano, do Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrado/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

As células em divisão foram obtidas em tecido meristemático radicular. Para tanto, as sementes de baru foram tratadas com os fungicidas Benomil/Thiram (100g/kg semente) e colocadas para germinar em placas de Petri contendo papel de germinação (GERMILAB) constantemente umedecido com água destilada, a cerca de 29°C, em estufa. Ao atingirem cerca de 1 cm, as radículas eram submetidas aos tratamentos necessários para a análise citogenética. Os procedimentos citogenéticos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Citogenética da Universidade Federal de Lavras e da Universidade Federal de Viçosa.

3.2 Desenvolvimento da metodologia citogenética

A caracterização morfológica dos cromossomos, a obtenção de padrões de bandeamento e, especialmente, a aplicação de técnicas de citogenética molecular requerem uma metodologia capaz de fornecer lâminas de alta qualidade. Assim, a primeira etapa do trabalho compreendeu a adequação de metodologias com objetivo de obter cromossomos espalhados, alongados e com morfologia bem definida, bem como preparações com altos índices metafásicos. Tais ajustes envolveram a manipulação do ciclo celular por meio de inibidores do fuso mitótico e/ou da síntese de DNA e adequação do método de preparo das lâminas. Para todos estes ajustes, foram usadas sementes da população de Jequitai – MG.

3.2.1 Pré-tratamentos com antimitóticos

Foram testados diferentes tipos de substâncias químicas com ação sobre o fuso mitótico, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, conforme a Tabela 3. Todas as substâncias e as diferentes concentrações foram preparadas em água destilada e em solução de ciclohexamida 0,35 mM, para verificar o efeito da combinação entre este composto e os demais.

Após o pré-tratamento, as raízes foram lavadas durante 15 minutos em água corrente e 5 minutos em água destilada. Após, foram secas e cortadas longitudinalmente com auxílio de bisturi, a fim de aumentar a eficiência de penetração do fixador. A fixação foi feita em solução gelada de metanol:ácido acético na proporção 3:1, por uma hora, a -20°C , com trocas em intervalos de 15 min. Após a última troca, as raízes foram armazenadas em solução fixadora, a -20°C , até o momento do uso.

TABELA 3 Pré-tratamentos (substâncias químicas e condições de uso) testados para obtenção de cromossomos espalhados e com morfologia definida em células meristemáticas de radículas de baru (*Dipteryx alata* Vog.).

Substância*	Concentração**	Condições
Colchicina	0,5 mM	4h a 29°C e 22h a 4°C
Hidroxiquinoleína	2 mM	22h a 4°C
Brometo de etídeo	10; 15 e 20 µM	22h a 4°C
Amiprofos metila (APM)	1,5; 3,0 e 5,0 µM	4h a 29°C e 22h a 4°C
Orizalina	5,0 µM	18, 20 e 22h a 4°C
Trifluralina	1,0 e 3,0 µM	4h a 29°C e 22h a 4°C

* As soluções foram preparadas tanto em água destilada, como em ciclohexamida 0,35 mM.

** Em todas as soluções foi adicionada 1 gota de DMSO (Dimetilsulfoxide) 10% para cada 10 mL de solução.

As lâminas foram preparadas pelo método de dissociação celular e secagem ao ar, segundo Carvalho (1995) (descrito a seguir, no item 3.2.3.2).

As lâminas foram coradas em solução de Giemsa 5% (tampão fosfato pH 6,8), por 5 minutos, à temperatura ambiente, lavadas duas vezes em água destilada e secas ao ar e em placa aquecedora a 50°C.

A observação e análise das lâminas foram feitas com uso de microscópio Olympus BX 60, sob iluminação de campo claro, usando objetivas de aumentos de 20, 40 e 100 vezes (imersão a óleo). As figuras de interesse foram capturadas diretamente, por meio de microcâmara acoplada ao microscópio e a um microcomputador MacintoshTM (modelo G3) equipado com placa digitalizadora.

A análise do efeito das diferentes substâncias e condições de uso foi feita em pelo menos três lâminas por tratamento, levando em conta o acúmulo de metáfases, o espalhamento e a morfologia dos cromossomos.

3.2.2 Sincronização do ciclo celular por bloqueio da síntese de DNA

Visando o incremento do número de metáfases por lâmina preparada foi realizado um experimento para determinar as condições ótimas para sincronização do ciclo celular para o baru, utilizando a hidroxiuréia como inibidor reversível da síntese de DNA.

As raízes com cerca de 1 cm foram colocadas em placas de Petri contendo hidroxiuréia nas concentrações 0; 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 mM. Para cada concentração, as raízes foram submetidas aos períodos de exposição de 10, 15 e 20 horas. Após os diferentes períodos de exposição, as raízes foram lavadas em água corrente por 15 minutos, em água destilada por 5 minutos e transferidas para placa de Petri contendo um filme de água destilada, para recuperação do ciclo celular por 5 ou 10 horas.

Ao fim da recuperação, as raízes foram fixadas em solução gelada de metanol:ácido acético na proporção 3:1 por duas horas, a -20°C , com uma troca após os primeiros 30 minutos de fixação. Após a última troca, as raízes foram armazenadas em solução fixadora, a -20°C , até o momento do uso. Para cada um dos tratamentos foram usadas duas raízes.

As lâminas foram feitas pelo método de esmagamento (descrito no item 3.2.3.1). A coloração, observação e análise microscópica das lâminas, bem como o registro das figuras de interesse, foram feitos conforme descrito no item 3.2.1.

A análise estatística foi realizada definindo os tratamentos conforme uma estrutura fatorial 4 concentrações × 3 tempos de exposição × 2 tempos de recuperação. Um tratamento adicional foi considerado, correspondente a uma testemunha não submetida à hidroxiuréia. Estes 25 tratamentos foram dispostos em um delineamento inteiramente ao acaso com duas repetições, sendo que cada parcela correspondeu a uma lâmina contendo tecido meristemático de uma ponta de raiz diferente. Em cada lâmina eram tomadas duzentas células aleatoriamente, contando-se o número de células em metáfase e o número de células em divisão celular (independentemente da fase).

Definidas dessa maneira, as variáveis de resposta (células em divisão ou em metáfase) possuíam uma distribuição de probabilidade binomial. Assim, optou-se por utilizar a teoria de modelos lineares generalizados (McCullagh e Nelder, 1989), que possibilita levar em conta diferentes distribuições de probabilidade. A função ligadora selecionada foi a função logística:

$$p_{ijk} = \frac{\exp(\eta_{ijk})}{1 + \exp(\eta_{ijk})}$$

na qual “exp” é a função exponencial e η_{ijk} corresponde ao preditor linear, por sua vez dado por:

$$\eta_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk}$$

sendo:

μ : constante comum a todas as observações;

α_i : efeito da concentração i de hidroxiuréia;

β_j : efeito do tempo j de exposição à hidroxiuréia;

γ_k : efeito do período de recuperação k;

$(\alpha\beta)_{ij}$: efeito da interação dupla entre a concentração i de hidroxiuréia e o tempo de exposição j;

$(\alpha\gamma)_{ik}$: efeito da interação dupla entre a concentração i de hidroxiuréia e o período de recuperação k;

$(\beta\gamma)_{jk}$: efeito da interação dupla entre o tempo de exposição j e o período de recuperação k;

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$: efeito da interação tripla entre a concentração i de hidroxiuréia, o tempo de exposição j e o período de recuperação k.

A significância de tais efeitos foi testada utilizando a chamada “Análise de Deviance” (McCullagh e Nelder, 1989). A estimação dos efeitos e a Análise de Deviance foram feitas utilizando o procedimento “genmod” do software SAS® (SAS Institute, 1996). Verificada a significância de alguns dos termos da estrutura fatorial (fatores principais ou interações), o modelo era reparametrizado, construindo-se novos preditores. Para tanto, foi utilizado um procedimento de construção por etapas do tipo “backward”, comumente utilizado em regressão múltipla (Draper e Smith, 1981). O preditor linear inicial submetido ao processo de “backward” foi dado por:

$$\begin{aligned} \eta_i = & (\alpha_0 + \beta_0 Z_i) + (\alpha_1 X_i + \beta_1 X_i Z_i) + (\alpha_2 W_i + \beta_2 W_i Z_i) + (\alpha_3 X_i^2 + \beta_3 X_i^2 Z_i) + \\ & + (\alpha_4 W_i^2 + \beta_4 W_i^2 Z_i) + (\alpha_5 X_i W_i + \beta_5 X_i W_i Z_i) + (\alpha_6 X_i^3 + \beta_6 X_i^3 Z_i) + \\ & + (\alpha_7 X_i^2 W_i + \beta_7 X_i^2 W_i Z_i) + (\alpha_8 X_i W_i^2 + \beta_8 X_i W_i^2 Z_i) \end{aligned}$$

no qual α_j e β_j ($j = 1, 2 \dots 8$) são parâmetros a serem estimados em cada etapa; X_i é a concentração de hidroxiuréia referente à observação i; W_i é o tempo de exposição à hidroxiuréia referente à observação i e Z_i é uma variável indicadora,

assumindo valor 0 caso a observação i correspondesse ao período de recuperação de 5 horas e o valor 1 caso a observação i correspondesse ao período de recuperação de 10 horas.

Substituindo o preditor na função ligadora logística, foi possível obter uma superfície de resposta da frequência esperada de células em metáfase (ou em divisão), em função da concentração de hidroxauréia e do tempo de exposição.

No tocante ao tratamento correspondente à testemunha, um intervalo de confiança exato para a probabilidade de sucesso da distribuição binomial (Blyth, 1986) era construído para eventualmente comparar a frequência esperada de células em divisão do tratamento testemunha com os demais.

Visando o máximo incremento do índice metafásico, a manipulação do ciclo celular em dois estágios foi feita usando a combinação selecionada conforme o procedimento acima, seguida do uso dos melhores tratamentos com inibidores do fuso mitótico selecionados no item 3.2.2. O melhor momento para aplicação da substância inibidora, após o início da recuperação do ciclo foi determinada, variando o tempo de recuperação do ciclo celular em torno do valor selecionado.

3.2.3 Método de preparo das lâminas

O método clássico para obtenção de preparações de cromossomos metafásicos de plantas é o esmagamento de células, em solução de ácido acético 45%, sob laminula. No entanto, alguns autores vêm utilizando a técnica de “secagem ao ar”, após maceração enzimática da parede celular, com sucesso na obtenção de cromossomos de alta qualidade.

Em função da dificuldade de se obter lâminas de qualidade adequada em espécies nativas do cerrado, provavelmente devido à composição do citoplasma e da parede celular, foram testados o método clássico de esmagamento e o método de dissociação celular/secagem ao ar proposto por Carvalho (1995).

3.2.3.1 Esmagamento

As raízes fixadas foram lavadas em água destilada por 10 minutos e submetidas a maceração enzimática em solução de celulase 2% / pectinase 20%, em câmara úmida, por cerca de 2 horas, a 37°C. As raízes foram lavadas por 10 minutos em água corrente, 5 minutos em água destilada e hidrolisadas em solução de HCl 1N, a 60° C, por 10 minutos. Após a lavagem com água destilada, a raiz foi colocada em lâmina limpa, com uma gota de ácido acético 45% e, sob microscópio estereoscópio, o meristema foi isolado. O meristema foi coberto com lamínula e as células espalhadas com a pressão de uma ponta rombuda. Após o espalhamento das células, foi feito o esmagamento, sob três folhas de papel filtro, para o espalhamento dos cromossomos. A lamínula foi retirada com o uso de nitrogênio líquido.

3.2.3.2 Dissociação celular e secagem ao ar

As raízes fixadas foram lavadas durante 15 minutos em água corrente e 5 minutos em água destilada para retirada da solução fixadora. Foi feita a digestão enzimática da parede celular com solução aquosa do composto enzimático Flaxzyme™ (NOVO FERMENT) na proporção 1:10 (v/v), por 1 hora e 45 minutos, a 34°C. As raízes digeridas foram lavadas em dois banhos de dez minutos em água destilada e fixadas, a - 20°C, em solução metanol:ácido

acético (3:1), com três trocas em intervalos de 15 minutos. As raízes foram armazenadas a -20°C , por, pelo menos, 24 horas.

A raiz digerida e fixada foi transferida para placa escavada contendo solução fixadora metanol:ácido acético (3:1) e, sob microscópio estereoscópio, o meristema foi isolado. Cada fragmento de tecido meristemático foi transferido, com pipeta de Pasteur, para o topo de uma lâmina de vidro inclinada cerca de 45° . Com um bisturi, foi feita a dissociação celular, enquanto eram gotejadas de 3 a 5 gotas de solução fixadora gelada para espalhar as células ao longo da lâmina, bem como propiciar a expulsão de núcleos e cromossomos. Em seguida, as lâminas foram secas, em movimentos rápidos contra o ar, para propiciar o espalhamento das placas metafásicas e, finalmente, em placa aquecedora a 50°C .

3.2.3.3 Avaliação

A coloração, observação e análise microscópica das lâminas, bem como o registro das figuras de interesse foram feitos conforme descrito no item 3.2.1.

A avaliação da qualidade das lâminas preparadas pelos dois diferentes métodos foi feita utilizando-se os seguintes critérios: espalhamento das células na lâmina, presença de citoplasma circundando os cromossomos, definição dos núcleos interfásicos, espalhamento e definição dos cromossomos.

3.3 Análise cariotípica e bandeamento cromossômico

Lâminas preparadas com base na metodologia padronizada no item 3.2, foram submetidas a diferentes tipos de colorações, visando estudar o cariótipo e o padrão heterocromático dos cromossomos do baru. A determinação do número cromossômico foi feita para as quatro procedências (Brasilândia, Capinópolis, Jequitai e Formosa) enquanto a caracterização morfológica e o bandeamento cromossômico foram feitos apenas para a procedência Jequitai.

3.3.1 Coloração para análise cariotípica

As lâminas foram coradas com solução de Giemsa, conforme item 3.2.4 e com o fluorocromo 4-6 diamidino-2-fenilindole (DAPI). A coloração DAPI foi feita com solução 0,5µg/mL, em tampão McIlvaine pH 7,0, por 5 minutos em câmara úmida, a temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas ao ar e montadas de forma semipermanente, em tampão McIlvaine pH 7,0. As lâminas foram guardadas a 4°C e observadas 24 horas após a coloração.

3.3.2 Técnica rápida de bandeamento C (adaptada de Carvalho e Saraiva, 1993 b)

Foram usadas lâminas envelhecidas por pelo menos quinze dias, a 30°C. As lâminas foram aquecidas a 50°C por 30 minutos e hidrolisadas em solução aquosa de HCl 0,1N. Após banho de 5 minutos em água destilada, as lâminas foram imersas em solução saturada (5%) de hidróxido de bário, a 56°C, por 50 segundos, com agitação contínua. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução 70% de álcool etílico, em etanol absoluto e, por último, em solução

fixadora metanol:ácido acético na proporção 8:1 (v/v). A secagem das lâminas se deu em placa aquecedora, a 50°C. A coloração foi realizada com Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH 6,8, por 8 minutos à temperatura ambiente. O excesso de corante foi retirado com dois banhos de água destilada e, por último, as lâminas foram secadas em placa aquecedora a 50°C.

3.3.3 Técnica de bandeamento DAPI

Para obtenção de padrão de bandeamento DAPI, lâminas envelhecidas por dois dias foram coradas com soluções com concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5, 1 e 2 µg/mL em tampão McIlvaine pH 7,0. O tempo de coloração variou de 5 a 20 minutos, em câmara úmida à temperatura ambiente. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água destilada e secas ao ar. As lâminas foram montadas de forma semipermanente, tendo como meio de montagem soluções de tampão McIlvaine com pH 5,0 e 7,0 e tampão borato pH 8,5. As lâminas foram observadas no dia do preparo e depois de 24 horas, após armazenamento a 4°C.

Além deste procedimento padrão, descrito para plantas, foi adotada a metodologia proposta por Heng e Tsui (1993) para obtenção de diferentes padrões de bandeamento DAPI em cromossomos humanos, por meio de processos capazes de desnaturar o DNA em diferentes intensidades. A desnaturação foi obtida com duas estratégias diferentes: (1) uso de formamida 70%, em SSC (“saline sodium citrate”) 2x, por 60 s, a 70°C, seguida por coloração com DAPI 0,2 µg/mL e montagem em pH 8,5; (2) coloração da preparação com DAPI 0,2 µg/mL, montagem em pH 8,5 e aquecimento em placa a temperatura de cerca de 85°C de 10 segundos a 2 minutos.

3.3.4 Técnica de bandeamento CMA

A coloração com o fluorocromo cromomicina A₃ (CMA) foi feita em câmara úmida, na concentração de 0,1 mg/mL, por 20 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada, a lâmina foi montada de forma semipermanente, tendo como meio de montagem solução tampão de McIlvaine, pH 7,0 contendo 2,5 mM de MgCl₂.

3.3.5 Técnica de bandeamento Q

A coloração se deu em câmara úmida, à temperatura ambiente, usando soluções aquosas de quinacrina nas concentrações de 0,05%; 0,1% e 0,2%, por 5 minutos. Após este período, as lâminas foram lavadas por 3 minutos em água acidificada, secas ao ar e montadas de forma semi-permanente com soluções tampão com pH 4,5; 7,0 e 8,5.

3.3.6 Metodologia de avaliação e análise de imagem

A observação e análise das lâminas foram feitas com uso de microscópio Olympus BX 60, equipado com acessórios de iluminação de campo claro e fluorescência. Foram utilizadas objetivas de aumentos de 20, 40 e 100 vezes (imersão).

As análises microscópicas das lâminas submetidas a coloração com fluorocromos foram realizadas com uso de filtros Olympus adequados para emissão de fluorescência. Para o fluorocromo DAPI foi usado o filtro WU com emissão de comprimento de onda 330 a 385 nm e bloqueio de 420nm; para o fluorocromo CMA, o filtro WB com emissão de comprimento de onda 450 a 480

nm e bloqueio de 515 nm e para a quinacrina, o filtro WG com emissão de comprimento de onda 510 a 550 nm e bloqueio de 590 nm.

As figuras de interesse foram capturadas diretamente, por meio de microcâmara acoplada ao microscópio e a um microcomputador Macintosh™ (modelo G3) equipado com placa digitalizadora.

As imagens capturadas e armazenadas foram submetidas à análise de imagens utilizando os softwares Adobe PhotoShop v.5.0 e NIH image program, de domínio público, escrito por Wayne Rasband do U.S. National Institutes of Health, acessado no página www.nihm.nih.gov. Tais processamentos envolveram a aplicação de filtros, pseudocolorização e medições.

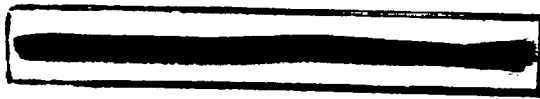
Os cariogramas de interesse foram construídos primeiramente levando-se em conta as semelhanças morfológicas entre os prováveis homólogos e, posteriormente, confirmados com base em medições feitas por recursos computacionais.

Foram obtidas as medidas do comprimento total dos cromossomos, do comprimento do braço curto (c) e do comprimento do braço longo (l). A partir destas medidas foram obtidos o comprimento total do lote haplóide (CTLH), o comprimento relativo (CR%), o índice centromérico (ic) e a relação de braços (r), onde:

$$ic = \frac{c \times 100}{c + l} \quad e \quad r = \frac{l}{c}$$

Estes dados foram usados para classificar os cromossomos do complemento de acordo com a nomenclatura proposta por Guerra (1986).

A assimetria do cariótipo foi quantificada de acordo com a metodologia de Zarco (1986), a qual leva em conta a assimetria devido às relações entre os



braços cromossômicos, ou intracromossomal, dada pelo índice A_1 e devido às relações entre o tamanho dos diferentes cromossomos, ou intercromossomal, dada pelo índice A_2 , obtidos da seguinte forma :

$$A_1 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n \frac{b_i}{B_i}}{n} \quad \text{e} \quad A_2 = \frac{S}{\bar{x}}$$

Em que n_i é o número de pares de homólogos, b_i é o comprimento médio dos braços curtos de cada par de homólogos, B_i é o comprimento médio dos braços longos, \bar{x} é a média do comprimento total dos cromossomos e S o desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento da metodologia citogenética

4.1.1 Pré-tratamentos

O acúmulo de metáfases no tecido meristemático foi bastante diferenciado entre os diferentes tratamentos testados, sendo afetado pelo tipo e concentração da substância usada, bem como pelo tempo e temperatura de exposição. As substâncias mais eficientes foram hidroxiquinoleína, APM, orizalina e trifluralina. No entanto, a quantidade de figuras metafásicas foi ainda pequena, variando de 0 a 14 células por lâmina, ou seja, apresentando grande heterogeneidade entre tecidos submetidos ao mesmo pré-tratamento.

Com relação ao espalhamento, a hidroxiquinoleína 2 mM, combinada com ciclohexamida 0,35 mM em geladeira por 22 horas, o APM 5 μ M em estufa por 3:40 a 4:00 horas e a orizalina 5 μ M em geladeira por 22 horas foram os pré-tratamentos que possibilitaram a obtenção de metáfases com cromossomos bastante individualizados, praticamente sem sobreposições, mesmo quando se apresentavam mais alongados. Já a trifluralina, apesar de ter sido um dos mais eficientes para o acúmulo de metáfases, favoreceu o agrupamento dos cromossomos, inviabilizando a análise dos mesmos.

Analisando-se a morfologia dos cromossomos, o pré-tratamento APM 5 μ M por 4 h, em estufa, forneceu cromossomos bastante condensados e, portanto, de tamanho muito reduzido (Figura 2A).

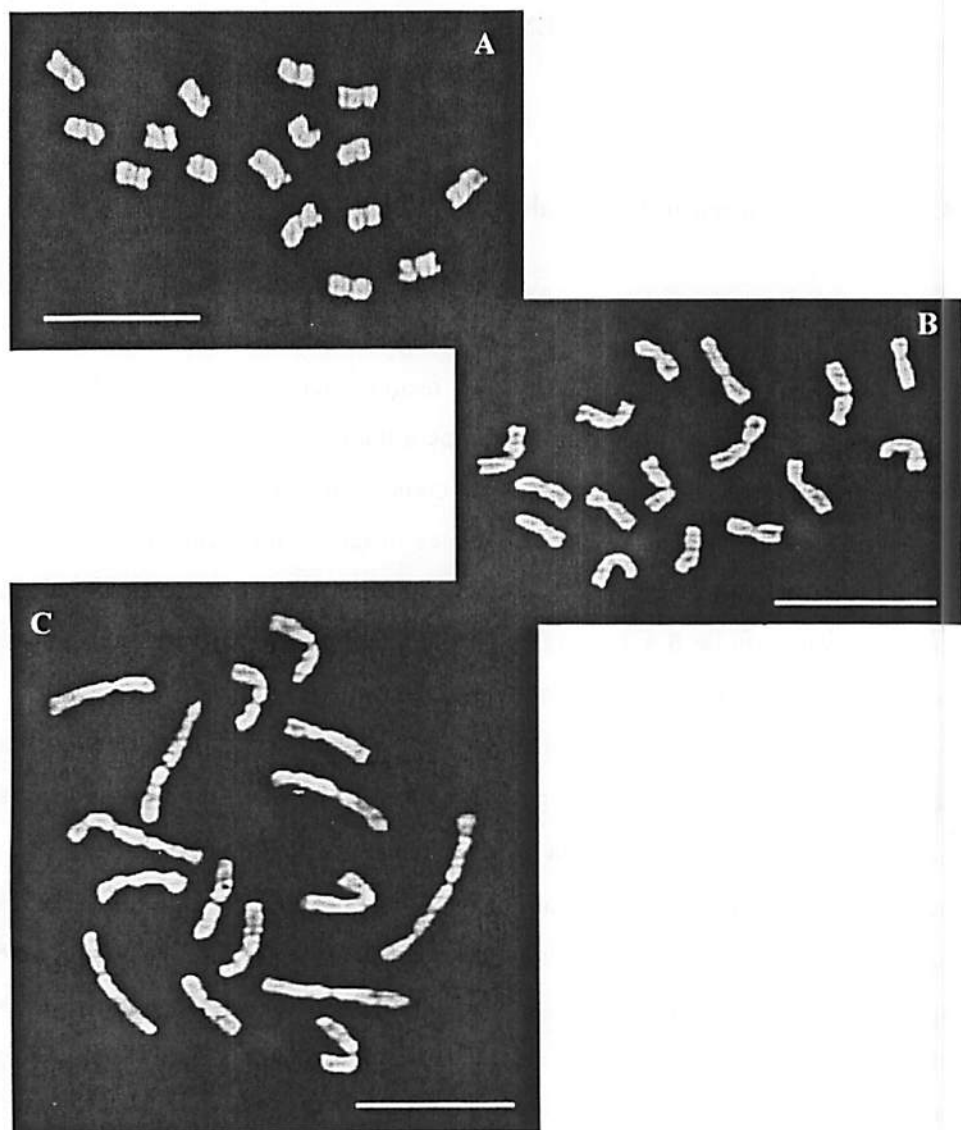


FIGURA 2 Figuras representativas de cromossomos metafásicos em diferentes graus de compactação obtidos por tratamento com APM $5\mu\text{M}$, 4 horas em estufa (A); APM $5\mu\text{M}$ por 3:40 h em estufa (B) e com orizalina 22 horas em geladeira (C). (Barra = $10\mu\text{m}$)

Utilizando o próprio APM, mas com exposição das raízes a um tempo menor (3:40 h) foram obtidas metáfases com cromossomos bem mais alongados, pelo menos duas vezes maiores (Figura 2B). O uso de hidroxiquinoleína 2 mM /ciclohexamida 0,35 mM e orizalina 5 μ M, por 22 horas em geladira também forneceu cromossomos metafásicos alongados e com morgologia bastante semelhante aos da Figura 2B.

O tratamento com orizalina forneceu, em algumas lâminas, figuras com cromossomos muito alongados, ou de alta resolução (Figura 2C), de grande valor para evidenciar características morfológicas não reveladas nos cromossomos muito condensados, como pode ser visto, comparando-se as pranchas A e C da Figura 2.

O uso da ciclohexamida só foi efetivo quando combinado com hidroxiquinoleína, tendo como principal efeito um melhor espalhamento dos cromossomos e, conseqüentemente, impedindo as sobreposições.

4.1.2 Sincronização do ciclo celular

O experimento realizado propiciou a determinação das condições ótimas de concentração de HU, tempo de exposição e de recuperação para a sincronização eficiente do ciclo celular no tecido meristemático de raízes de baru.

A Tabela 4 apresenta a análise de deviance referente à proporção de células em divisão, considerando as parametrizações: modelo fatorial e regressão múltipla. O valor da deviance do modelo completo (resíduo) foi relativamente elevado (41,7350) e seria considerado significativo a 5% de probabilidade. Altas deviances podem ser indicativo de que a pressuposição quanto à distribuição de probabilidade (no presente caso, a binomial) não está perfeitamente atendida, resultando no fenômeno da superdispersão (Hinde e Demétrio, 1998). No

entanto, uma vez que o teste de qui-quadrado correspondente é assintótico (aproximado), em geral este aspecto só é relevado em face de valores muito elevados de deviance, acima de duas vezes o número de graus de liberdade. Uma vez que isso não foi observado, os modelos ajustados foram tidos como satisfatórios.

Pode-se observar na Tabela 4 que a interação envolvendo todos os três fatores do modelo fatorial foi significativa, sugerindo que os níveis de cada fator só devam ser comparados fixando-se níveis dos dois outros fatores.

Na mesma Tabela 4 pode-se ver que, após ajustado o modelo de regressão múltipla, a causa de variação “falta de ajustamento” (por vezes chamada “desvios de regressão”), foi claramente não significativa. Isto é um indicativo de que o modelo ajustado é adequado e que as variações em relação a este podem ser tidas como casuais.

TABELA 4 Análise de deviance referente à proporção de células em divisão, considerando duas parametrizações, correspondentes aos modelos fatorial e de regressão múltipla¹.

CAUSAS DE VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUI-QUADRADO (χ^2)	PROBABILIDADE ($> \chi^2$)
<i>(modelo fatorial)</i>			
Concentração	03	399,5279	0,0001
Exposição	2	11,7286	0,0028
Recuperação	1	0,4043	0,5249
Conc x expo	6	84,0188	0,0001
Conc x recup	3	1,6264	0,6534
Expo x recup	2	2,9462	0,2292
Conc x expo x recup	6	15,9244	0,0142
<i>(modelo de regressão)</i>			
Regressão	11	521,8020	0,0001
Falta de ajustamento	12	9,8890	0,6257
Deviance (resíduo)	24	41,7350	0,0138

1. Testes de qui-quadrado são do tipo III (parciais) no modelo fatorial e do tipo I (seqüenciais) no modelo de regressão.

A Tabela 5 apresenta as estimativas dos parâmetros do modelo de regressão múltipla selecionado pelo método de backward. Pode-se notar que todas foram significativas, o que é uma característica deste método. Considerando-se os parâmetros retidos no modelo, observa-se uma coerência em relação à significância da interação tripla (Tabela 4), uma vez que há termos envolvendo produtos entre a concentração e o tempo de exposição à hidroxiuréia, bem como vários termos contendo a variável indicadora Z. Este último aspecto faz com que duas superfícies de resposta não paralelas sejam necessárias para descrever a proporção de células em divisão, conforme o período de recuperação.

TABELA 5 Estimativas dos parâmetros retidos no modelo de regressão múltipla após o processo de backward, referente à característica proporção de células em divisão¹.

PARÂMETRO	ESTIMATIVA	QUI-QUADRADO	PROBABILIDADE
Intercepto	-6,5517	319,3261	0,0001
Z	2,7956	23,5262	0,0001
X	3,0143	219,9689	0,0001
X * Z	-1,1893	26,3288	0,0001
X ²	-0,5364	154,9997	0,0001
X ² * Z	0,0914	23,7480	0,0001
X ³	0,0295	126,9116	0,0001
W	0,1260	60,6230	0,0001
W * Z	-0,1797	25,7814	0,0001
X * W	-0,0202	47,7225	0,0001
X * W * Z	0,0757	28,6430	0,0001
X ² * W * Z	-0,0057	24,5199	0,0001

1. X: concentração de hidroxiuréia; W: tempo de exposição à hidroxiuréia; Z: variável indicadora para discriminar os períodos de recuperação (valor 0: 5 horas; valor 1: 10 horas).

A Tabela 6 apresenta a análise de deviance correspondente ao número de células em metáfase. A deviance do modelo completo (resíduo) foi não significativa, indicando que os modelos ajustados podem ser considerados satisfatórios.

Houve interação significativa apenas entre os fatores concentração e tempo de exposição à hidroxiuréia (Tabela 6), sugerindo que os níveis de cada um desses fatores só devam ser comparados fixando-se níveis do outro fator. O fato de a interação tripla não ter sido significativa indica que as superfícies com períodos de recuperação 5 e 10 horas são semelhantes ou, se diferentes, pelo menos são paralelas. Em virtude desta última possibilidade, optou-se por também utilizar a variável indicadora "Z" no modelo de regressão múltipla, à semelhança do que foi feito para a característica células em divisão. Assim, cada superfície poderia ser claramente caracterizada em cada período de recuperação.

TABELA 6 Análise de deviance referente à proporção de células em metáfase, considerando duas parametrizações, correspondentes aos modelos fatorial e de regressão múltipla¹.

CAUSAS DE VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUI-QUADRADO (χ^2)	PROBABILIDADE ($> \chi^2$)
<i>(modelo fatorial)</i>			
Concentração	3	290,9741	0,0001
Exposição	2	4,9608	0,0837
Recuperação	1	15,2288	0,0001
Conc x expo	6	18,3250	0,0055
Conc x recup	3	5,7730	0,1232
Expo x recup	2	1,6648	0,4350
Conc x expo x recup	6	5,7287	0,4543
<i>(modelo de regressão)</i>			
Regressão	11	340,7390	0,0001
Falta de ajustamento	12	9,9657	0,6190
Deviance (resíduo)	24	35,0653	0,0674

1. Testes de qui-quadrado são do tipo III (parciais) no modelo fatorial e do tipo I (seqüenciais) no modelo de regressão.

O método de backward resultou em um modelo de regressão também com falta de ajustamento não significativa (Tabela 6), evidenciando a qualidade do modelo resultante. O número de parâmetros de regressão retidos também aqui foi igual a 11 e suas estimativas estão apresentadas na Tabela 7. Uma dessas estimativas apresentou uma probabilidade apenas um pouco maior que o valor crítico de 5%, tendo-se optado por manter o parâmetro correspondente no modelo.

Comparando as Tabelas 5 e 7, observa-se que a maioria dos parâmetros retidos são comuns aos dois modelos. Esta semelhança é compreensível, dado que parte das células em divisão são células em metáfase.

TABELA 7 Estimativas dos parâmetros retidos no modelo de regressão múltipla após o processo de backward, referente à característica proporção de células em metáfase¹.

PARÂMETRO	ESTIMATIVA	QUI-QUADRADO	PROBABILIDADE
Intercepto	-6,7029	223,9861	0,0001
Z	2,1414	8,1540	0,0043
X	2,6665	93,1507	0,0001
X Z	-0,7191	5,6926	0,0170
X ²	-0,4975	68,5690	0,0001
X ² * Z	0,0531	4,2125	0,0401
X ³	0,0274	57,4157	0,0001
W	0,0677	17,3495	0,0001
W * Z	-0,1308	8,0508	0,0045
X * W * Z	0,0463	6,3695	0,0116
X ² * W	-0,0012	7,8046	0,0052
X ² * W * Z	-0,0031	3,7573	0,0526

I. X: concentração de hidroxuréia; W: tempo de exposição à hidroxuréia; Z: variável indicadora para discriminar os períodos de recuperação (valor 0: 5 horas; valor 1: 10 horas).

Na Tabela 7 também há termos envolvendo o produto entre a concentração e o tempo de exposição à hidroxiuréia, em coerência com a significância observada da interação entre esses dois fatores (Tabela 6). Por outro lado, existem quatro parâmetros retidos que contêm produtos de, pelo menos, um dos fatores acima com a variável indicadora Z, ao contrário do que seria de se esperar, a julgar pela não-significância da interação tripla (Tabela 6).

A resposta máxima esperada quanto à porcentagem de células em metáfase ocorreu com o tempo de exposição à hidroxiuréia igual a 20 horas. No tocante à estimativa da concentração que confere resposta máxima, observou-se, para o período de recuperação de 5 horas (Figura 4A), o valor igual a 3,55 mM, ao qual correspondeu uma porcentagem de células em metáfase igual a 22,6%. Com o período de recuperação de 10 horas (Figura 4B), as grandezas acima foram respectivamente iguais a 3,87 mM e 25,7%.

Considerando que o índice metafásico apresentado pela testemunha foi de 2,5%, compreendido no intervalo de confiança IC($\gamma=0,95$): [0,0121;0,0455], verifica-se que o uso da hidroxiuréia para sincronização do ciclo foi bastante eficiente para o acúmulo de metáfases para análise citogenética.

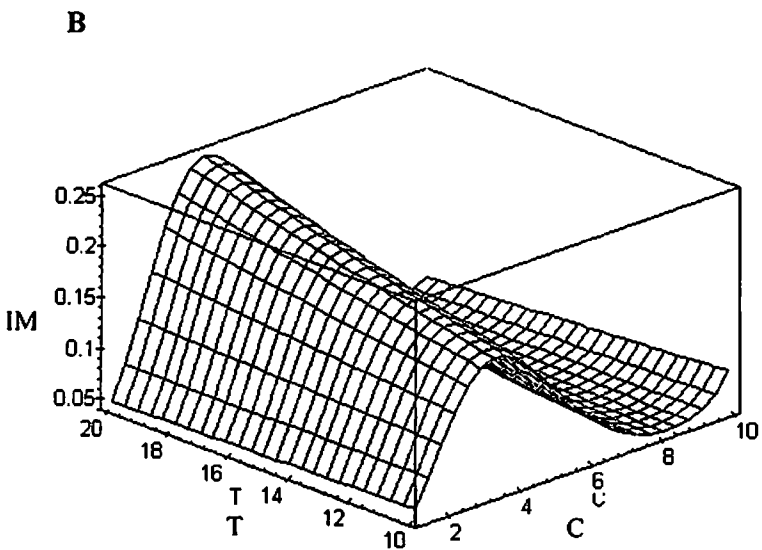
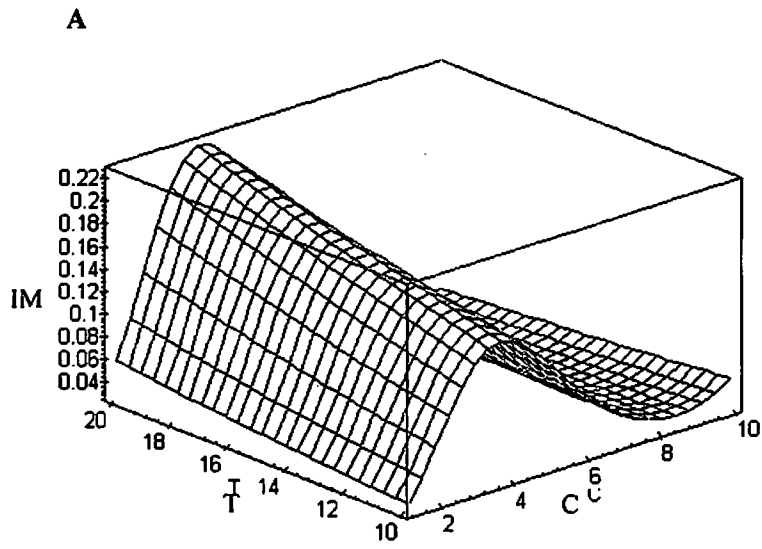


FIGURA 4 Superfícies de resposta da proporção de células em metáfase (IM) em função da concentração (C) e tempo de exposição (T) à hidroxiuréia, para os períodos de recuperação de 5 horas (A) e 10 horas (B).

Além de promover a sincronização do ciclo, por inibição da síntese de DNA, a hidroxiuréia provocou também algum distúrbio no fuso mitótico, e portanto o espalhamento de cromossomos em várias lâminas. Em alguns casos, a metáfase estava totalmente espalhada, até mesmo sem sobreposições (Figura 5). Nesta figura é possível observar que a morfologia dos cromossomos é típica de material que não sofreu pré-tratamento, sem definição clara das constrições e com certa deformação dos braços.

Este distúrbio do fuso pode estar associado ao fato de a tubulina ser dependente de associação com o nucleotídeo GTP (guanosina trifosfato) para ser polimerizada durante a formação dos microtúbulos do fuso. Isso porque a ação da hidroxiuréia é a inibição da enzima ribonucleotídeo redutase que participa da síntese dos desorribonucleotídeo a partir de ribonucleotídeos.

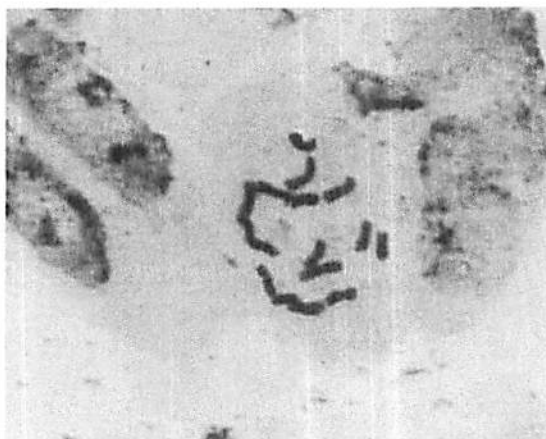


FIGURA 5 Metáfase obtida após sincronização do ciclo celular com hidroxiuréia 2,5 mM, por 15 horas e recuperação de 5 horas, em lâmina preparada pelo método de esmagamento e corada com giemsa.

Uma vez determinadas as condições ótimas de manipulação do ciclo por bloqueio reversível na fase S, e para inibição do fuso mitótico, as duas estratégias foram combinadas, para maximizar o índice metafásico. Os inibidores selecionados foram a orizalina 5 μ M, por 22 horas em geladeira e APM 5 μ M, por 3:40 horas a 30°C, devido à melhor qualidade morfológica dos cromossomos.

A variação do período de recuperação do ciclo entre 3, 4, 5, 6 e 7 horas após remoção da hidroxiuréia, antes da introdução do pré-tratamento mostrou que a recuperação de 3 horas é a mais adequada para o tratamento subsequente com orizalina e APM. Os índices chegaram a 60% em algumas regiões das lâminas, sendo que grande parte apresentou pelo menos 30% de suas células no estágio prómetafásico ou metafásico.

4.1.3 Comparação dos métodos de preparo das lâminas

Tanto o método de esmagamento como o de dissociação celular/secagem ao ar permitiram a obtenção de lâminas com células espalhadas e com cromossomos individualizados. No entanto, a qualidade das figuras obtidas foi bem superior no segundo método.

Nas lâminas obtidas por esmagamento, a resolução dos cromossomos e núcleo corados foi relativamente baixa, provavelmente devido à persistência de citoplasma envolvendo os cromossomos. Em muitos casos, este material citoplasmático dificultou a reação do corante, levando à obtenção de cromossomos com pouco contraste e baixa resolução para análise. Um dos componentes citoplasmáticos detectados em grande quantidade, inclusive circundando os cromossomos, foi o amido, por meio de coloração específica com lugol.

O método de esmagamento foi eficiente para preparação de lâminas para contagens, como foi o caso da otimização de condições para sincronização do ciclo com hidroxauréia. Neste caso, a qualidade das lâminas foi adequada e a maior proximidade das células, devido ao menor espalhamento, facilitou as contagens diretas no microscópio.

Por outro lado, as lâminas feitas por dissociação celular apresentaram figuras mitóticas com excelente espalhamento e totalmente desprovidas de citoplasma e membranas, como pode ser observado na Figura 2. Esta situação favoreceu enormemente a reação dos cromossomos com corantes, permitindo uma ótima definição. Além disso, foi possível observar menor heterogeneidade de qualidade, tanto dentro como entre lâminas, quando comparada com as feitas por esmagamento. Outro fator de incremento de qualidade proveniente deste método foi a pequena profundidade de campo das preparações. As células se espalharam praticamente no mesmo plano de foco, característica difícil de ser obtida pelo método de esmagamento devido à presença dos fragmentos celulares que envolvem os núcleos e figuras mitóticas.

A resistência da parede celular é um ponto crítico para a qualidade das lâminas, uma vez que influencia diretamente o espalhamento das células. Em ambos os métodos, o espalhamento das células e, conseqüentemente, do seu conteúdo foi satisfatório. Isto se deveu principalmente à eficiência da maceração enzimática em desestruturar a parede celular. Isto indica que a espécie não apresenta parede com depósito de substâncias como sílica ou lignina, as quais dificultam a obtenção de preparações de qualidade.

4.2 Análise cariotípica

A contagem do número cromossômico, realizada em pelo menos vinte metáfases por procedência, identificou, pela primeira vez, que o número diplóide da espécie é $2n = 16$. Não foi detectada variação numérica entre as procedências Jequitai, Brasilândia, Capinópolis e Formosa.

A avaliação da morfologia dos cromossomos foi feita apenas para a procedência Jequitai. Na Figura 6 está apresentado o kariograma da espécie, com base em cromossomos metafásicos com alto grau de compactação. É possível observar que neste estágio os cromossomos são muito semelhantes, dificultando a identificação dos pares de homólogos e também as medições. Assim, foi determinado apenas o comprimento total dos cromossomos, o qual variou de $1,91\mu\text{m}$ (cromossomo 1) a $1,41\mu\text{m}$ (cromossomo 8). Fica evidente também a dificuldade de se detectar características morfológicas que não a constrição primária, ou centrômero.

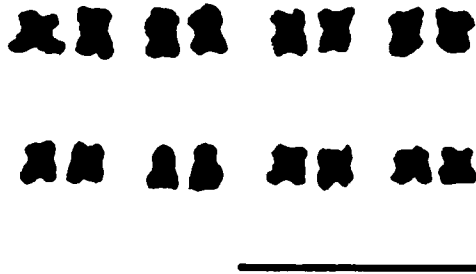


FIGURA 6 Cariograma de metafase de baru ($2n = 16$), com alto grau de compactação dos cromossomos. Bloqueio com APM $5\mu\text{M}$, por 4h, a 30°C e corada com Giemsa. (barra= $10\mu\text{m}$).

Na Figura 7 estão apresentados o cariograma e idiograma de cromossomos metafásicos da espécie. A determinação das constrições e o ordenamento dos cromossomos foram feitos após análise de quatro figuras metafásicas apresentando grau de compactação semelhante e ainda figuras em início de anáfase, em que o ponto de tração das cromátides era bastante individualizado (Figura 8). O uso das figuras anafásicas foi importante pois alguns cromossomos apresentaram mais de uma constrição que se assemelham muito à região centromérica, como pode ser observado nos cromossomos 2, 3 e 6 da Figura 7A.

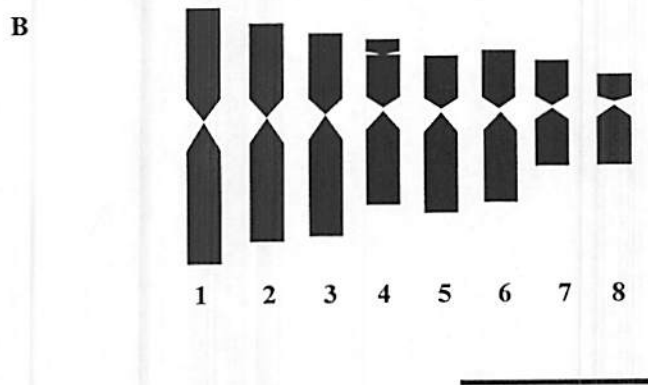


FIGURA 7 (A) Cariograma de metáfase de baru bloqueada com orizalina $5\mu\text{M}$, por 22 horas, a 4°C e corada com Giemsa (barra = $10\ \mu\text{m}$). (B) Idiograma correspondente (barra = $5\ \mu\text{m}$)

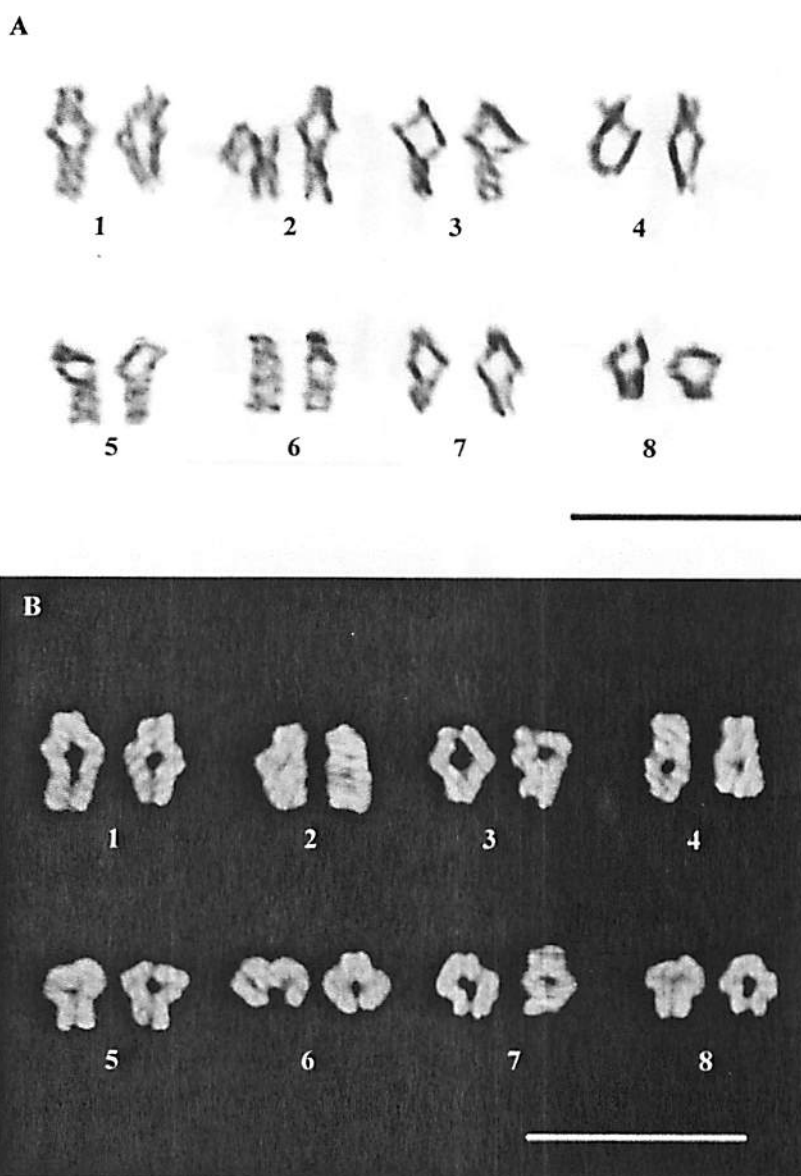


FIGURA 8 Cariogramas com cromossomos em início de anáfase mostrando os pontos de tração. (A) coloração com giemsa; (B) coloração com DAPI. (barra= 10 μ m).

O idiograma apresentado na Figura 7B foi construído com base nas medidas e índices apresentados na Tabela 8. O comprimento do lote haplóide (CTLH) foi 34,83 μ m, sendo que os três maiores cromossomos representam 50% do complemento. O satélite foi identificado no braço curto do cromossomo 4 e mediu 0,41 μ m.

A posição do centrômero foi mediana, com três cromossomos metacêntricos (1, 2 e 7) e cinco submetacêntricos (3, 4, 5, 6 e 8), sendo que os cromossomos 3 e 6 apresentaram valores de índice centromérico e relação de braços bem no limite de separação desta classe com a classe de metacêntrico.

Os parâmetros numéricos propostos por Zarco (1986) evidenciaram o caráter simétrico do complemento cromossômico do baru. O valor calculado do índice A_1 foi 0,35, um valor que pode ser interpretado como indicador da tendência de os cromossomos serem metacêntricos. Do ponto de vista das diferenças entre os tamanhos cromossômicos, o valor calculado para o índice A_2 foi 0,34, mostrando também o caráter simétrico do cariótipo.

TABELA 8 Medidas e índices obtidos em cromossomos metafásicos de baru (*Dipteryx alata* Vog) procedente de Jequitaiá.

Cromossomo	Comprimento (μ m)			r	ic	Classe	Comprimento relativo (%)
	c	l	Total				
1	2,98	3,75	6,73	1,26	44,30	M	19,3
2	2,47	3,29	5,76	1,33	42,88	M	16,5
3	2,14	3,21	5,35	1,50	40,00	SM	15,4
4 ^{Sat}	1,39	2,50	3,89(0,41)	1,80	35,73	SM	11,2
5	1,41	2,67	4,08	1,89	34,56	SM	11,7
6	1,54	2,40	3,94	1,56	39,09	SM	11,3
7	1,20	1,55	2,75	1,29	43,64	M	7,9
8	0,75	1,58	2,33	2,11	32,19	SM	6,7

tendência de os cromossomos serem metacêntricos. Do ponto de vista das diferenças entre os tamanhos cromossômicos, o valor calculado para o índice A_2 foi 0,34, mostrando também o caráter simétrico do cariótipo.

4.3 Padrão de compactação da cromatina

Em várias lâminas coradas com solução de Giemsa 3%, foi observada a existência de cromossomos prometafásicos com regiões mais compactadas que as demais. Tal fato foi confirmado com a coloração DAPI (Figura 9) que, devido à sua alta especificidade pelo DNA, permite descartar a idéia de problema de coloração. Na Figura 9 é possível observar que uma região de um par de homólogos encontra-se já compactada na metáfase, enquanto outras regiões, em alguns casos um braço inteiro, apresentam baixo grau de condensação, aparecendo como um rastro de cromatina. O padrão de cada par de homólogos é bastante regular, sendo possível identificar cada um deles (Figura 10).

Este comportamento provavelmente não se deve à influência de substâncias usadas para sincronização ou bloqueio do ciclo celular, uma vez que foi observado na grande maioria das lâminas avaliadas. A diferença de tamanho dos cromossomos observada entre as duas imagens apresentadas na Figura 9, provavelmente se deve ao efeito do inibidor do fuso, já que na primeira (cromossomos menores) foi utilizado o APM e na segunda a orizalina. Isto reforça a idéia de um fenômeno programado, que sofreu variação por uma interferência externa, mas sem perder suas características, já que podemos ver que o padrão é conservado de uma figura para outra.

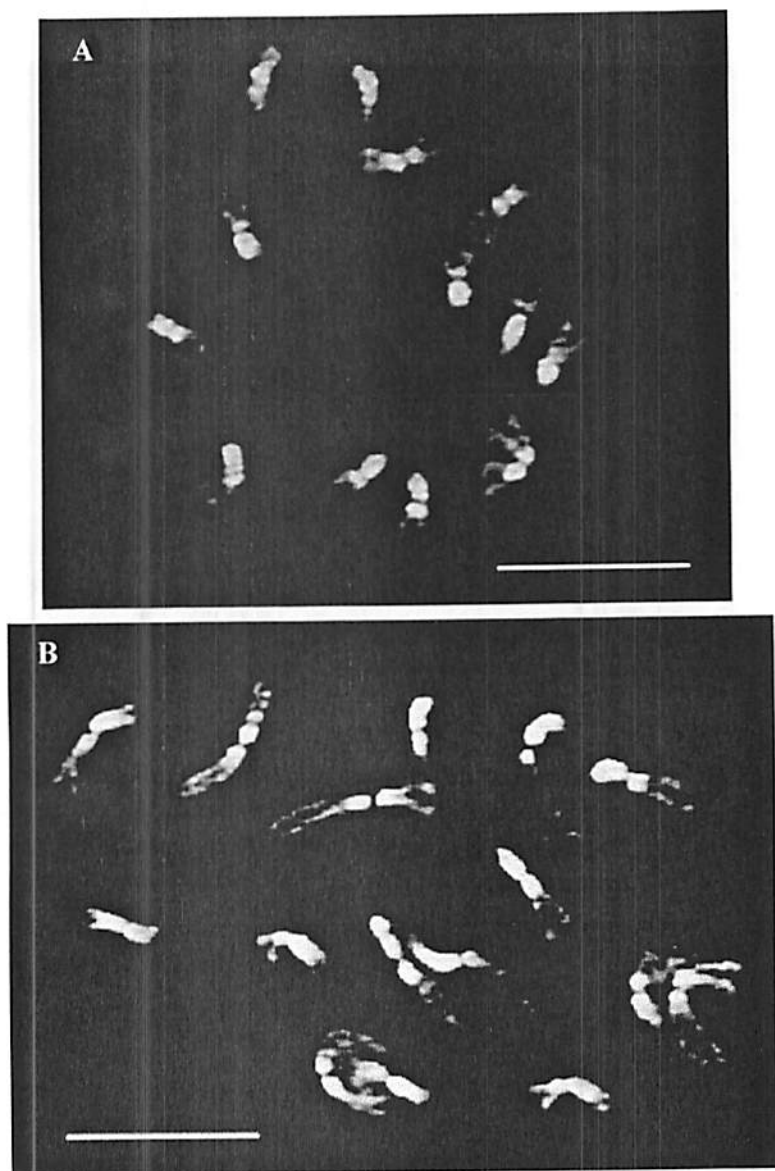


FIGURA 9 Cromossomos prometafásicos corados com DAPI apresentando padrão de condensação desuniforme ao longo de seu comprimento (A) Pré-tratamento com APM $5\mu\text{M}$ por 3:40 horas a 30°C ; (B) Pré-tratamento com orizalina $5\mu\text{M}$ por 22 horas a 4°C .,(barra = $10\mu\text{m}$).

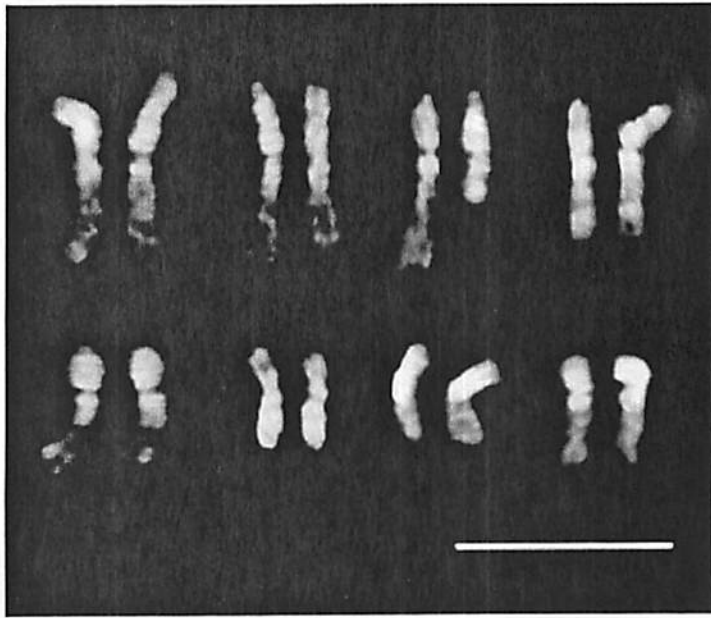


FIGURA 10 Cariograma de cromossomos prometafásicos mostrando a consistência do padrão de condensação em cada par de homólogos (barra = 10 μ m). A diferença de tamanho do terceiro par se deveu à perda do segmento mais descondensado.

4.4 Distribuição da heterocromatina

As técnicas de bandeamento C e Q permitiram a diferenciação de regiões heterocromáticas, sem, contudo, revelar padrões característicos destes procedimentos.

Na Figura 11 está apresentado o cariógrama de cromossomos metafásicos que apresentaram coloração diferencial após técnica rápida de bandeamento C. Em todos os cromossomos foram revelados grandes blocos heterocromáticos com padrão consistente entre os homólogos. Os cromossomos 2, 4 e 5 apresentaram um braço totalmente heterocromatinizado, enquanto nos demais os blocos ficaram evidenciados principalmente na região pericentromérica. Os cromossomos 1, 7 e 8 apresentaram bandas intersticiais e centroméricas. No entanto, a consistência entre as lâminas não foi satisfatória e tampouco corresponde ao padrão esperado para cromossomos pequenos, ou seja, padrão simples, com a presença de poucas bandas teloméricas e/ou centroméricas (Fukui e Nakayama, 1996).



FIGURA 11 Cariograma de cromossomos metafásicos de baru ($2n = 16$) submetidos à técnica rápida de bandeamento C. (barra = $10\mu\text{m}$).

A técnica mais eficiente para coloração dos cromossomos de baru com quinacrina foi o uso de solução com concentração de 0,05% e meio de montagem com pH 4,5. As concentrações superiores (0,1% e 0,2%), recomendadas na literatura (Sumner, 1990), provocaram uma coloração excessiva, impossibilitando a revelação de diferenças morfológicas. O pH do meio de montagem é um fator crítico para a emissão e manutenção da fluorescência pelo fluorocromó (Sumner, 1990) e para a produção de bandas (Heng e Tsui, 1993). Neste caso, o pH 4,5 foi o mais adequado para a qualidade da fluorescência, mantendo-a estável por tempo suficiente para as observações e registro, enquanto nos meios mais básicos a fluorescência era perdida rapidamente.

Na Figura 12 é possível observar que os cromossomos de baru não apresentam padrão típico de banda Q, mas sim regiões Q positivas e regiões Q negativas. Assim como no caso do bandejamento C, alguns cromossomos apresentaram regiões centroméricas mais intensamente coradas (Q positivas) e outros apresentaram um braço Q positivo e outro Q negativo.

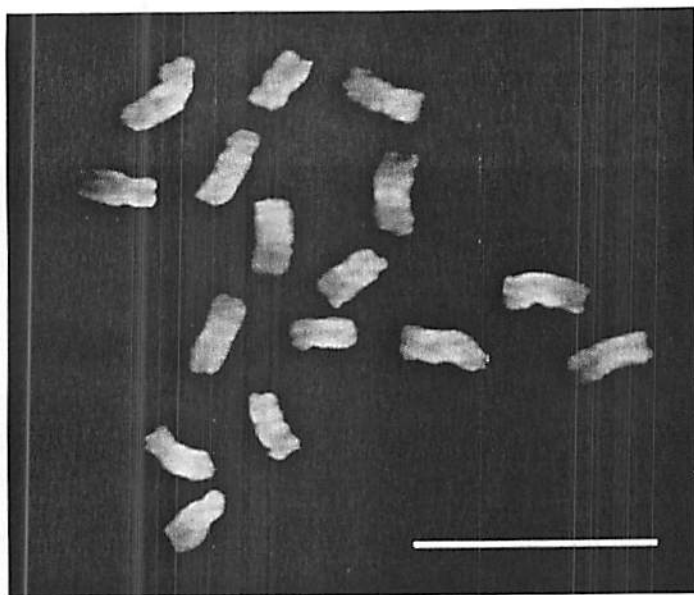


FIGURA 12 Cromossomos metafásicos de baru ($2n = 16$) submetidos à técnica de bandejamento Q (barra = $10\mu\text{m}$).

Nenhum dos procedimentos testados para obtenção de bandas DAPI foi bem sucedido. Em todos os casos, a coloração do cromossomo foi uniforme, sem nenhum tipo de diferenciação longitudinal, com padrão de coloração igual ao dos cromossomos apresentados na Figura 2.

As diferentes técnicas de coloração mostraram que as preparações apresentaram alta corabilidade, apresentando excelente contraste em condições de concentração (0,05 $\mu\text{g/mL}$) e tempo (5 minutos) bem inferiores às descritas na literatura.

A coloração com o fluorocromo CMA revelou quatro bandas teloméricas, de tamanho similar, em dois pares de cromossomos (Figura 12). As bandas foram observadas em várias figuras, apesar de o registro ter sido dificultado pelo decréscimo rápido da fluorescência.

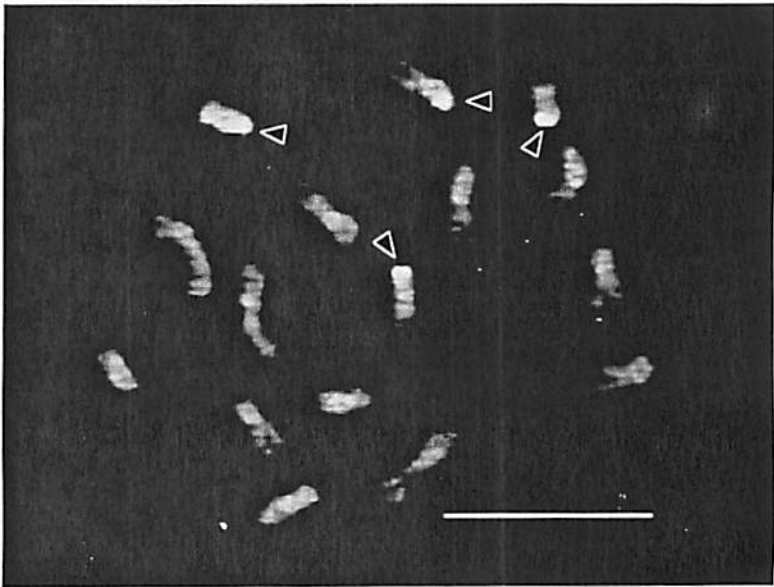


FIGURA 13 Padrão de bandeamento CMA em cromossomos prometafásicos de baru ($2n = 16$). Bandas teloméricas indicadas pela seta (barra = $10\mu\text{m}$).

5 DISCUSSÃO

5.1 Aspectos metodológicos

A falta de metodologias adequadas para a preparação de lâminas com metafases de alta qualidade é um grande obstáculo para a análise citogenética de espécies vegetais do cerrado. Isso faz com que os estudos, que são bastante escassos, na maioria das vezes se limitem à determinação do número cromossômico. A sofisticação das técnicas citogenéticas que vêm sendo aplicadas, principalmente nas espécies cultivadas, tem exigido preparações com qualidade cada vez maior, fornecendo ao citogeneticista uma gama de ferramentas valiosas para o estudo detalhado dos cromossomos.

Neste trabalho, o uso de algumas destas ferramentas propiciou a adequação de uma metodologia de alta eficiência para análise dos cromossomos de baru (*Dipteryx alata* Vog.).

Uma estratégia importante foi a sincronização do ciclo celular, por meio de inibição reversível da síntese de DNA pela hidroxiuréia, para obtenção de índices metafásicos mais elevados. O uso da hidroxiuréia tem sido bem sucedido para várias espécies, no entanto, as condições e parâmetros ótimos descritos são bastante diferentes, sendo necessário a determinação das condições ótimas para cada espécie (Lee et al., 1996).

As células meristemáticas do baru não bloqueadas apresentaram índice metafásico de cerca de 2,5%, enquanto que o bloqueio com hidroxiuréia 3,5 mM por 20 horas, seguido de 5 horas de recuperação, pôde fornecer um índice de 23% de células em metáfase. Houve uma interação forte entre a concentração da hidroxiuréia e seu poder bloqueador. Concentrações entre 2,5 e 5 mM propiciaram os melhores índices. Esta interação já foi descrita em trabalhos nos

quais o ciclo celular foi criteriosamente avaliado por citometria de fluxo, após exposição a diferentes concentrações de HU. Em *Pisum sativum*, Gualberti et al. (1996) verificaram que as concentrações de 5 e 10 mM inibiam completamente a síntese de DNA, enquanto nas concentrações de 1,25 e 2,5 mM um grupo grande de células tendia a escapar conjuntamente do bloqueio, propiciando uma sincronização eficiente. Na sincronização de células de milho (Lee et al., 1996), as concentrações de 1,25 e 2,5 mM foram ineficientes, enquanto a de 10 mM reteve as células no estágio G₁ por um período muito longo de tempo, atrasando a transição para a fase S. Já para o trigo, a concentração de 2,5 mM foi alta demais, dificultando a reversibilidade do bloqueio (Lee et al., 1997).

Tempo de exposição à hidroxiuréia máximo, ou seja, 20 horas, foi o que propiciou os maiores índices. O prolongamento deste período poderia trazer incremento nestes índices, no entanto, exposições prolongadas (>24h) podem causar aberrações devido a quebras cromossômicas, acompanhadas por uma troca irreversível de cromátides irmãs, ou distúrbio do mecanismo de reparo do DNA (Anderson, 1983).

Apesar da variabilidade de metodologias, as condições ótimas ajustadas para o baru estão dentro dos padrões descritos na literatura para outras espécies (Gualberti, et al., 1996; Lee, et al., 1996; Lee, et al., 1997) e considerados apropriados para fornecer preparações cromossômicas de qualidade adequada para estudos refinados, como a citometria de fluxo, isolamento de cromossomos e hibridização *in situ*.

Outra estratégia foi o bloqueio do ciclo celular na metáfase, por meio de agentes químicos. Algumas substâncias têm sido muito usadas em citogenética vegetal, tais como a colchicina, a hidroxiquinoleína, bromonaftaleno e paradiclorobenzeno (Sharma e Sharma, 1999; Fukui e Nakayama, 1996). Recentemente, substâncias inibidoras de ação herbicida (APM, orizalina e trifluralina) e, portanto com alta especificidade para célula vegetal, têm sido

usadas com sucesso em diferentes espécies vegetais, como *Pisum sativum* (Dolezel et al., 1992), cevada, centeio, trigo e *Melandrium album* (Pan, Houben e Schlegel, 1993), milho (Lee et al., 1996) e pimentão (Aarestrup, 2001).

O uso da orizalina e do APM no bloqueio das células meristemáticas do baru, além de incrementar o índice metafásico, propiciou a obtenção de cromossomos com morfologia ótima para análise citogenética, com tamanho variando de muito pequeno (1,2 μm) a cromossomos de alta resolução (10 μm) (Figura 2). A obtenção de cromossomos alongados representa um avanço metodológico grande para o estudo de espécies com cromossomos pequenos, abrindo perspectivas de estudos mais aprofundados, por meio de bandeamentos e hibridização *in situ*.

Os resultados obtidos mostraram que a metodologia mais adequada para a obtenção de altos índices metafásicos (pelo menos 30%) e cromossomos com boa morfologia foi a exposição de raízes com tamanho uniforme de 1 cm a solução aquosa de HU, em temperatura ambiente, por 20 horas, com posterior recuperação do ciclo por 3 horas, após a remoção da HU e bloqueio do fuso com orizalina 5 μM , por 22 horas a 4°C, ou com APM 5 μM , por 3:40 horas a 30°C.

A qualidade do material biológico para análise citogenética foi revelada pelo método de preparo de lâminas por dissociação celular e secagem ao ar. Este tipo de preparo, recomendado por Fukui e Nakayama (1996) para espécies de cromossomos pequenos, é ainda pouco difundido entre os citogeneticistas vegetais, apesar de vários autores discutirem suas vantagens em relação ao esmagamento (Sumner, 1990; Carvalho e Saraiva, 1993a; Carvalho, 1995).

No caso do baru, o método propiciou a obtenção de preparações de excelente qualidade, em que a morfologia dos cromossomos foi altamente preservada e a resolução final permitiu a detecção de características morfológicas geralmente desconfiguradas pelo esmagamento. Isto é válido para o satélite, para constrições terciárias observadas ao longo dos cromossomos e

para as regiões de baixa condensação, ou FUSC. Devido à ausência de material citoplasmático, o contraste com os diferentes corantes usados foi intenso, aumentando muito a resolução da observação. Além disso, o material apresentou alta corabilidade, uma vez que nas colorações com DAPI e quinacrina as concentrações usadas foram bem inferiores às citadas na literatura.

Dois pontos importantes para o sucesso da técnica foram: (1) a otimização da digestão, para uma total destruição da parede, sem, contudo, afetar a morfologia dos núcleos e cromossomos; (2) o uso do fixador metanol:acético (3:1), tanto nas etapas de tratamento da raiz quanto na confecção das lâminas, pois permitiu um alto grau de preservação da cromatina.

O uso da análise de imagens é um recurso que vem sendo amplamente utilizado em citogenética, ampliando as possibilidades de análise e muitas vezes viabilizando-a (Bauchan e Campbell, 1994; Carvalho, 1995; Aarestrup, 2001). Neste trabalho, constituiu uma ferramenta que trouxe um incremento considerável de qualidade para a resolução e precisão da interpretação das figuras obtidas. As ferramentas disponíveis permitiram intensificar os contrastes e eliminar “backgrounds” sem nenhum tipo de alteração das características dos cromossomos, bem como obter dados quantitativos com maior precisão. Considerando o tamanho reduzido dos cromossomos, foi um recurso que teve grande impacto para o sucesso do trabalho.

5.2 Caracterização morfológica dos cromossomos

O conhecimento do número cromossômico de diferentes espécies dentro de um gênero e de grupos taxonômicos superiores é de fundamental importância para o entendimento dos eventos de alterações cromossômicas numéricas (poliploidia ou aneuploidia) envolvidos na especiação (Forni-Martins e Martins, 2000).

No gênero *Dipteryx*, a única espécie em que se conhece o número cromossômico é o cumaru, *D. odorata*, que possui $2n = 32$ (Fedorov, 1969). O número cromossômico do baru ($2n = 16$) foi determinado pela primeira vez e é um número freqüente na subfamília Faboideae, à qual ele é atribuído. Como o número básico mais provável nesta subfamília é $x = 8$ (Bandel, 1974), provavelmente *D. alata* seja uma espécie diplóide e *D. odorata* um espécie poliplóide.

A análise de indivíduos de diferentes populações da mesma espécie tem revelado a existência de raças cromossômicas. Na vegetação do Cerrado, Morawetz (1984) identificou três populações de *Duguetia furfuracea* com diferentes números cromossômicos ($2n = 16, 24$ e 32), apesar da uniformidade fenotípica. Considerando as hipóteses de alteração numérica e estrutural dos cromossomos estarem associadas a condições ambientais divergentes e extremas (Stebbins, 1971), é plausível imaginar que, no Cerrado, onde a amplitude ambiental é muito grande, tal fenômeno pode estar ocorrendo com maior frequência do que se imagina. Neste estudo, não foi encontrada variação numérica interpopulacional. No entanto, não é prudente afirmar a constância deste número, uma vez que o baru é uma espécie de ampla distribuição e outras populações devem ser analisadas para que a amostragem tenha maior representatividade.

Os cromossomos no estágio metafásico (Figura 6) apresentaram alto grau de compactação e portanto tamanho muito reduzido, com o maior cromossomo medindo 1,9µm. Portanto, a análise morfológica só foi possível graças à obtenção de cromossomos metafásicos alongados e à presença de figuras em início de anáfase bastante claras (Figuras 7 e 8).

O cariótipo, cuja fórmula é $3M + 4SM + 1SM^{sal}$, se mostrou bastante simétrico, com diferença pequena entre o comprimento do maior e menor cromossomo, bem como a predominância da posição mediana do centrômero. Como apenas uma procedência foi avaliada (Jequitai), não foi possível fazer a comparação entre as procedências.

O satélite foi observado apenas no braço curto do cromossomo 4. A confirmação da presença da RON (região organizadora do nucléolo), ou sua detecção em outro cromossomo onde a constrição não estivesse visível, não foi possível pela coloração com prata, pois não houve marcação da heterocromatina associada à RON. Por outro lado, as quatro bandas detectadas na extremidade de dois pares de cromossomos, após coloração com o fluorocromo CMA (Figura 13), podem corresponder à heterocromatina RON. Segundo Guerra (2000), este tipo de heterocromatina quase sempre é CMA positiva e em muitas espécies está situada na RON, a despeito da inexistência de constrição secundária. Neste caso, é possível que o complemento apresente dois cromossomos com RON, o que deverá ser verificado com outras técnicas específicas para este tipo de heterocromatina.

A qualidade das preparações pelo método de secagem ao ar permitiu a observação de aspectos da estrutura fina dos cromossomos, como a presença de extremidades, até mesmo braços inteiros, distendidos, enquanto o restante já se encontrava compactado (Figura 9). As regiões mais condensadas provavelmente apresentam grande quantidade de heterocromatina.

Este padrão de condensação foi descrito em cromossomos da espécie *Artiplex rosea* (Fukui e Mukai, 1988) e em arroz (Fukui e Iijima, 1991). Os autores associam esta característica a espécies de cromossomos metafásicos pequenos (1 a 3 μm), como é o caso do baru. Fukui e Nakayama (1996) se referem à região proximal, que se apresenta condensada, como “condensações primárias”, enquanto as regiões intersticiais ou terminais, mais descondensadas, são chamadas de FUSC (faint, unstable, small condensation).

Fukui e Iijima (1991) e Kamisugi et al. (1993) utilizaram esta condensação desuniforme como um parâmetro de imagem capaz de diferenciar os cromossomos de tamanho reduzido e morfologia semelhante, na construção do cariótipo de arroz. O estudo do perfil de condensação da cromatina ao longo do cromossomo, utilizando programas de análise de imagens, gerou dados quantitativos que possibilitaram a construção de mapas cromossômicos detalhados. Fukui e Iijima (1991) ressaltam que o mapa de padrão de condensação do arroz tem grande impacto para pesquisas citológicas, genéticas e bioquímicas.

Tal estratégia pode ser usada nos cromossomos de baru, já que o padrão observado foi bastante estável e, portanto, com boa reprodutibilidade (Figura 10). A análise deste padrão de condensação por meio de instrumentos de maior resolução (microscopia confocal ou eletrônica) pode revelar diferenças estruturais entre os diferentes estágios de compactação simultâneos e contribuir para o melhor conhecimento do processo de compactação da cromatina durante o ciclo mitótico.

5.3 Distribuição da heterocromatina

A heterocromatina constitutiva é um segmento do cromossomo que se apresenta permanentemente condensado, é composto por DNA altamente repetitivo, não apresenta atividade gênica e sua replicação é tardia na fase S da intérfase (Pieczarci e Mattevi, 1998). A variabilidade da heterocromatina, no que diz respeito à composição e organização, tem sido explorada por diversas técnicas de bandeamento, as quais propiciam a diferenciação longitudinal dos cromossomos, apesar de, em muitos casos, não se conhecer exatamente os mecanismos envolvidos nesta diferenciação (Sumner, 1990). Na citogenética vegetal, estas técnicas têm contribuído grandemente para a caracterização mais detalhada dos cariótipos e, conseqüentemente, para o melhor entendimento da organização genômica e evolução cariotípica (Vosa, 1989).

Em cromossomos pequenos, como é o caso do baru, espera-se um padrão de bandeamento simples, ou seja, com um número reduzido de bandas, localizadas preferencialmente nas regiões proximais e terminais, ou até mesmo a ausência de bandas (Fukui e Nakayama, 1996; Guerra, 2000).

Entre as quatro técnicas de bandeamento utilizadas para caracterizar o padrão heterocromático dos cromossomos do baru, apenas o bandeamento fluorescente com CMA (cromomicina A₃) apresentou o padrão típico da técnica (Figura 13). As quatro bandas intensamente coradas indicam a presença de regiões teloméricas ricas em guanina (G) e citosina (C), já que este fluorocromo é específico para tais regiões (Sumner, 1990). Conforme discutido acima, estas bandas podem estar relacionadas com a heterocromatina da RON. Esta hipótese é corroborada pelo fato de a técnica de bandeamento C ter mostrado que o braço curto do cromossomo 4, que contém o satélite, apresentar-se totalmente heterocromatinizado. Isso também ocorre nos cromossomos 2 e o 5, enquanto os demais não apresentam heterocromatina nas extremidades.

A ligação dos fluorocromos quinacrina e DAPI à molécula de DNA é determinada preferencialmente pela composição de bases, correspondendo a regiões ricas em adenina (A) e timina (T) (Sumner, 1990). Como não houve formação de bandas com nenhum dos dois fluorocromos (Figuras 2 e 12), estas bases devem estar mais uniformemente distribuídas ao longo do genoma ou, pelo menos, não estão repetidas o suficiente para formarem bandas.

A possibilidade de dificuldades metodológicas pode se considerada pequena, pois os dois tipos de bandeamento são altamente específicos, e não apresentam nenhuma variável crítica para a revelação do padrão de bandas. Além disso, todas as variações descritas na literatura, referentes a valor de pH, concentração do fluorocromo, uso de contracorantes (Distamicina A) e desnaturação do DNA, foram adotadas na tentativa de revelar as regiões ricas em AT. Comportamento semelhante foi observado em *Capsicum annuum* L. (Moscone, Lambrou e Ehrendorfer, 1996; Bertão, 1993; Aarestrup, 2001) e os autores atribuíram a ausência de bandas à possível distribuição homogênea destas bases ao longo do genoma da espécie.

A técnica de bandeamento C não foi bem sucedida para revelar um padrão de bandeamento informativo, apesar de ter diferenciado regiões heterocromáticas que se coraram mais intensamente (Figura 11). Ao contrário dos fluorocromos DAPI e Q, neste caso a limitação metodológica deve ser considerada como principal causa da dificuldade de obtenção de bandas.

O mecanismo de diferenciação das bandas é baseado na extração de DNA das regiões eucromáticas, por meio de hidrólise e tratamentos fortemente alcalinos, enquanto nas regiões heterocromáticas o DNA é preservado, em função da sua forte ligação com proteínas não histônicas (Pieczarca e Mattevi, 1998). Assim, a organização da cromatina é de fundamental importância para este bandeamento e varia bastante entre as espécies estudadas. A diversidade de técnicas descritas na literatura realça a heterogeneidade da heterocromatina das

bandas C e a necessidade de adaptação para cada material estudado (Sumner, 1990). A falta de referência, em função do desconhecimento citogenético desta espécie ou de espécies relacionadas, dificultou o ajuste da técnica, que foi, na maioria das vezes, muito destrutiva. Esta dificuldade foi maior na medida em que grande parte das metodologias descritas para plantas foi desenvolvida em cromossomos preparados por esmagamento, que apresentam características bem diversas, já que, pelo método de dissociação celular, os cromossomos ficam totalmente expostos aos tratamentos. Assim, dado o valor informativo da banda C e o potencial do padrão apresentado no trabalho, é importante que novos protocolos sejam testados para a obtenção do padrão C.

5.4 Aspectos evolutivos

A análise de várias figuras prometafásicas e metafásicas, submetidas às diferentes colorações ao longo do trabalho, permitiu a identificação de características morfológicas que podem fornecer evidências a respeito de arranjos cromossômicos envolvidos na evolução da espécie.

Na Figura 14 é apresentado um kariograma em que estas características estão bastante evidenciadas. Analisando-se os cromossomos 1, 2, 3, 6 e 7 dos kariogramas A e B (pseudocolorizado), verifica-se que pelo menos um dos braços apresenta uma constrição terciária, bastante semelhante à região centromérica. Em algumas metafases, tal aspecto pode levar o observador a inferir que se trata de dois cromossomos que estão encostados pela região telomérica, podendo até mesmo induzir a um erro de contagem, sendo considerados como dois, dado este aspecto morfológico diferenciado.

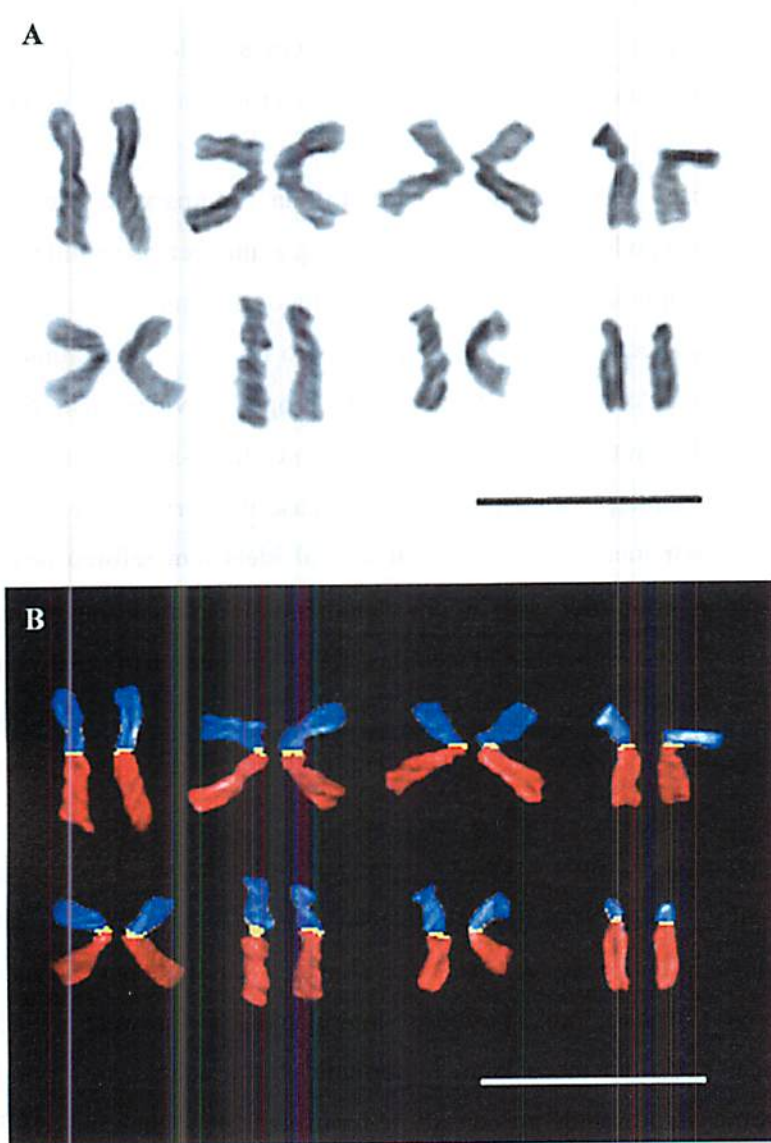


FIGURA 14 Cariograma de cromossomos metafásicos de baru ($2n = 16$) corados com giemsa (A). Cariograma pseudocolorizado enfatizando as diferentes constrições ao longo de alguns cromossomos do complemento. Em azul estão os braços curtos, em vermelho os braços longos e em amarelo o centrômero (B) (barra = $10\mu\text{m}$).

Uma das hipóteses consideradas para explicar a existência de tais constrições é a ocorrência de fusão de cromossomos ao longo da evolução da espécie, levando a uma diminuição do número cromossômico e aumento da simetria.

A análise desta hipótese partindo da comparação do número cromossômico não pode ser conclusiva. Isto porque uma vez que a única espécie do gênero que apresenta número cromossômico determinado é o cumaru (*Dipteryx odorata*) com $2n = 32$, ou seja, o dobro do número de cromossomos do baru. No entanto, como Rizzini (1963) propôs a vicariância das duas espécies, a relação direta entre os dois complementos torna-se bastante plausível.

A primeira relação a ser proposta neste caso é a derivação do cumaru, a partir do baru, por meio de poliploidização. Tal idéia tem reforço quando se considera que a poliploidização é um fenômeno de grande importância na evolução das plantas superiores (Stebbins, 1971) e que, particularmente na família *Leguminosae*, cerca de 70% das espécies é poliplóide. Na subfamília *Faboideae*, à qual pertence o gênero *Dipteryx*, o número básico mais provável é $x = 8$ (Bandel, 1974).

No entanto, o fluxo proposto para a poliploidização, é o inverso do sugerido neste caso, ou seja, a diversificação de *taxa* nas regiões de cerrado, partindo da poliploidização de *taxa* das florestas úmidas, por ocasião das contrações das últimas, nos períodos interglaciais (Morawetz, 1986). A poliploidização seria um mecanismo importante para a adaptação a condições extremas, como as presentes no cerrado (Morawetz, 1986; Stebbins, 1971). A hipótese de poliploidização, neste caso, contraria este modelo de fluxo genético da floresta úmida para o Cerrado. Forni-Martins e Martins (2000) contestaram este modelo, considerando principalmente que altos números cromossômicos são encontrados em ambos os biomas. Ao contrário, os autores propõem a origem concomitante dos dois tipos de vegetação, com um fluxo genético bi-

direcional entre as florestas (Amazônica e Atlântica) e o cerrado. Portanto, é corroborada na literatura a possibilidade de que *D. odorata* seja um poliplóide derivado de *D. alata*.

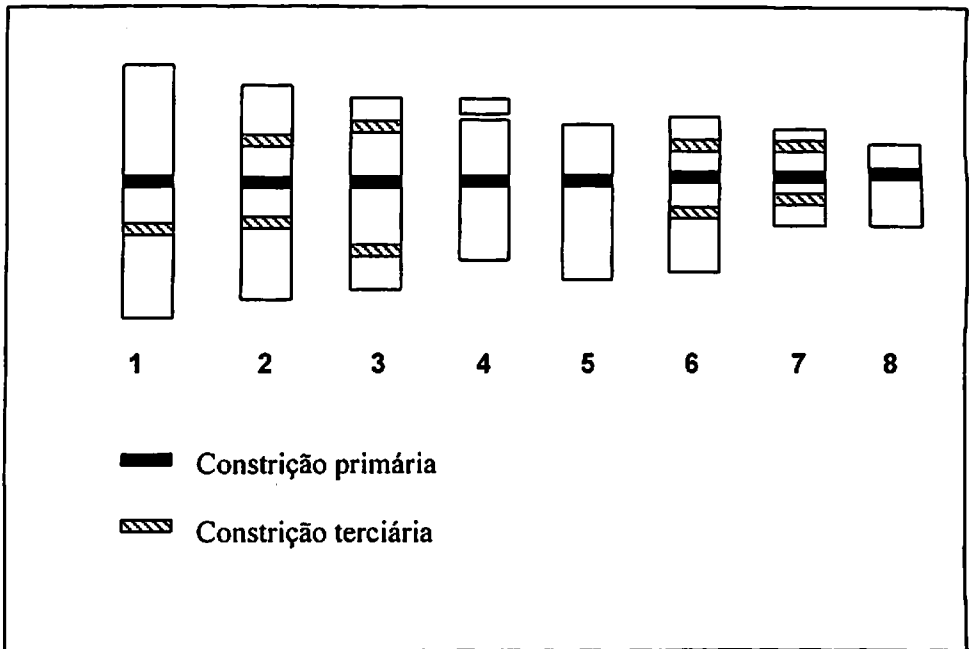
Por outro lado, do ponto de vista ecológico, a hipótese mais viável é a de que o baru tenha derivado de espécies da Floresta Amazônica, já que é o único representante do bioma cerrado, enquanto as outras quatorze espécies ocorrem na floresta.

Assumindo que exista uma relação estreita entre *D. alata* e *D. odorata* no processo de especiação e considerando estes dois tipos de fluxo genético prováveis, a ocorrência de fusão sugerida pelas características morfológicas dos cromossomos do baru pode ser analisada de duas formas: (1) a ocorrência de fusão, partindo de um ancestral com número superior de cromossomos, dando origem a *D. alata*, o qual por poliploidização originou *D. odorata* e (2) a ocorrência de fusões múltiplas no complemento cromossômico *D. odorata*, sem descartar a possibilidade de ocorrência de outros tipos de rearranjos, originando *D. alata*. A primeira hipótese encontra bastante suporte na literatura e, parece, pelo menos à primeira vista mais plausível, dada a multiplicidade exata dos dois complementos. Quanto à segunda hipótese, os relatos de uma espécie diplóide derivar de outra poliplóide devido à ocorrência de múltiplas fusões é bastante rara (Jones, 1998). O caso mais documentado é o do gênero *Lycoris*, em que Inariyama, citado por Jones (1998), propôs que partindo de um ancestral com cariótipo $2n = 22t$, foi originada a espécie $2n = 12 (10M + 2t)$ por meio de sucessivas fusões homozigóticas.

Dada a viabilidade da hipótese de ocorrência de fusão, alguns aspectos morfológicos merecem destaque. O esquema apresentado no Quadro 2, construído com base no kariograma apresentado na Figura 14, detalha a localização das constrições terciárias nos cromossomos 1, 2, 3, 6 e 7,

possivelmente envolvidos no fenômeno de fusão, evidenciando as características morfológicas a serem consideradas nesta discussão.

QUADRO 2 Representação esquemática do complemento cromossômico haplóide de baru, *Dipteyx alata* Vog. ($2n = 16$), evidenciando as constrições terciárias dos cromossomos possivelmente envolvidos em fenômeno de fusão.



O modelo mais adequado para explicar a morfologia observada é a ocorrência de fusão de dois cromossomos por uma das extremidades, ou telômeros, permanecendo então os dois centrômeros, um de cada cromossomo envolvido. Pela posição dos pontos de tração, definida de forma precisa, com o auxílio das figuras em início de anáfase (Figura 8), a região centromérica corresponderia aos prováveis pontos de fusão.

A existência de cromossomos dicêntricos oriundos de fusão já foi detectada e descrita na literatura. Neste caso, ou os dois centrômeros devem segregar conjuntamente para o mesmo polo ou um dos centrômeros deve ser inativado, para garantir a estabilidade meiótica do mesmo (John e Freeman, 1975; King, 1993). No entanto, este tipo de fusão, assim como todos os outros descritos, envolve cromossomos acro e/ou telocêntricos, com quebras na região centromérica. Estas características não contemplam o modelo proposto, já que os cromossomos provavelmente fundidos aparentam ser de sub a metacêntrico, com união pelos telômeros. No entanto, estudos mais recentes envolvendo citogenética molecular têm mostrado algumas alternativas aos modelos de fusão até então aceitos, que vêm ao encontro da hipótese de fusão telomérica.

A distribuição de seqüências teloméricas ao longo do genoma de espécies de rato, de plantas e do homem foi estudada por meio de FISH (hidridização *in situ* fluorescente). Em várias espécies foram detectadas seqüências em regiões intersticiais e pericentroméricas (Fuchs, Brandes e Schubert, 1995; Slijepcevic, 1998; Meyne et al., 1990). Isso indica que as regiões teloméricas podem estar intimamente ligadas aos fenômenos de fusão. Schubert et al. (1992) tomam estes resultados como evidências para possíveis fusões entre extremidades cromossômicas em pontos distantes do(s) centrômero(s), com subsequente inativação ou perda de um dos centrômeros.

Considerando que no presente modelo os centrômeros dos dois cromossomos foram provavelmente inativados, e que o provável ponto de fusão

corresponde à região centromérica ativa, ainda existe uma lacuna a ser preenchida. Uma provável explicação é a de que não tenha havido inativação, mas sim os dois centrômeros participariam da migração durante a anáfase, desde que centrômeros pertencentes a uma mesma cromátide se orientem para o mesmo polo (John e Freeman, 1975; Guerra, 1988). Outra hipótese seria o fato de os pontos de fusão apresentarem um tipo de heterocromatina de natureza semelhante à heterocromatina centromérica e, portanto, se adaptando a este papel conjuntamente com a inativação dos outros centrômeros.

Apesar da escassez de informações sobre o complemento cromossômico das espécies envolvidas num provável evento de fusão, as evidências mostradas dão estímulo a um estudo mais detalhado de ambas. O uso de técnicas de bandeamento, que revelam diferentes tipos de heterocromatina, o estudo do comportamento meiótico e o uso de hibridização *in situ*, para estudar a distribuição de seqüências telomérica e centromérica ao longo do genoma, produziriam as informações relevantes para testar tal modelo de fusão e evidenciar outros eventos importantes para a evolução da espécie.

6 CONCLUSÕES

A metodologia citogenética desenvolvida para o baru (*Dipteryx alata* Vog.), envolvendo a manipulação do ciclo celular por meio de inibição reversível da síntese de DNA, combinada com inibição do fuso mitótico, e ainda o preparo de lâminas pelo método de dissociação celular/secagem ao ar, é bastante adequada para obtenção de cromossomos de alta qualidade destinados à análise cariotípica detalhada. Constitui, ainda, uma referência importante para outras espécies do cerrado que apresentam baixa sincronia do ciclo celular e cromossomos pequenos.

A espécie *Dipteryx alata* Vog. possui número cromossômico $2n = 16$, com um cromossomo (número 4) apresentando satélite e cariótipo bastante simétrico, tanto no que diz respeito à posição do centrômero quanto às diferenças de tamanho. Os cromossomos prometafásicos apresentam condensação desigual (padrões de condensação), típica de cromossomos pequenos.

A heterocromatina está concentrada predominantemente na região centromérica, sendo que as porções ricas em A + T não estão suficientemente agrupadas para serem detectadas. As regiões teloméricas de dois cromossomos, provavelmente o 4 (RON) e 2 ou 5, apresentam blocos heterocromáticos ricos em G + C.

O modelo de fusão não cêntrica, mas sim entre extremidades dos cromossomos de baru, mostrou-se uma hipótese plausível que deve ser considerada e testada por meio de outras abordagens, como a análise meiótica e hibridização *in situ* e, ainda, por análise comparativa com cariótipos de outras espécies do gênero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, J.R. **Análise morfológica dos cromossomos de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 2001. 130 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- AGUIAR, I.B.; VALERI, S.V.; ISMAEL, J.J.; ALHO, D.R. Efeitos do espaçamento no desenvolvimento de *Dipteryx alata* Vog. em Jaboticabal, SP, até a idade de 20 anos. **Revista do Instituto Florestal**, v.4, n.2, p.570-572, 1992.
- ALMEIDA, S.P. **Cerrado: aproveitamento alimentar**. Planaltina: EMBRAPA - CPAC, 1998a. 188p.
- ALMEIDA, S.P. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S.M; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, 1998b. p. 89-168.
- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA - CPAC, 1998. 464 p.
- ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A.; RIBEIRO, J.F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1990. 83 p.
- ANDERSON, H.D. Hydroxyurea induces sister chromatid exchanges in G2: implications for the formation of chromosomal aberrations. **Hereditas**, v.98, p.61-64, 1983.
- ANDRADE, A. M.; CARVALHO, C. J. Produção de celulose e de papel kraft da madeira de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, n.3, p.28-35, 1996.
- ATCHISON, A. Studies in the Leguminosae. VI. Chromosome numbers among tropical woody species. **American Journal of Botany**, v.38, p.538-546, 1951.
- BANDEL, G. Chromosome numbers and evolution in the Leguminosae. **Caryologia**, v.27, n.1, p.17-32, 1974.
- BARTELS, P.G.; HILTON, J.L. Comparison of trifluralin, oryzalin, pronamide, propham and colchicine treatments on microtubules. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.3, n.4, Dec. 1973.

BAUCHAN, G.R.; CAMPBELL, T.A. Use of image analysis system to karyotype diploid alfafa (*Medicago sativa* L.). **Journal of Heredity**, v.85, p.18-22, 1994.

BELTRÃO, G.T.A.; GUERRA, M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – III. **Ciência e Cultura**, v.42, n.10, p.839-845, 1990.

BENNETT, M.D. The development and use of genomic in situ hybridization (GISH) as a new tool in plant biosystematics. KEW CHROMOSOME CONFERENCE,4, 1995, Kew. **Proceedings...** Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. p. 167-183.

BERTÃO, M.R. **Evolução cariotípica no gênero *Capsicum* (Solanaceae)**. Piracicaba: 1993. 148 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

. BIDAU, C.J. The complex Robertsonian system of *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae). II. Effects of the fusion polymorphisms on chiasma frequency and distribution. **Heredity**, v.64, p.145-159, 1990

BIDAU, C.J. Causes of chiasma repatterning due to centric fusions. **Brazil Journal Genetics**, v.16, n.2, p.283-296, 1993.

BINSFIELD, P.C.; PETERS, J.A.; SCHNABEL, H. Efeito de herbicidas sobre a polimerização dos microtúbulos e indução de micronúcleos em protoplastos de *Helianthus maximiliani*. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.12, n.3, p.263-272, set./dez. 2000.

BLYTH, C.R. Approximate binomial confidence limits. **Journal of the American Statistical Association**. v.81, n.395, p.843-855, 1986.

BRADBURY, S.J. Micrometry and image analysis. In: LACEY, A.J. **Light microscopy in biology: a practical approach**. Oxford, 1989. p. 187-220.

BRANDÃO, M. Plantas Produtoras de Tanino nos Cerrados Mineiros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.173, p.33-35, 1992.

CARVALHO, C.R. **Desenvolvimento de Tecnologia Citogenética em Milho (*Zea mays* L.)**. 1995. 127 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

- CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic & Histochemistry**, v.68, n.3, p.142-145, 1993a.
- CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. A new heterocromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique in maize chromosomes. **Heredity**, v.70, p.515-519, 1993b.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA – CNPF, 1994. 640 p.
- CLAIN, E.; BRULFERT, A. Hydroxyurea-induced mitotic synchronization in *Allium sativum* root meristems. **Planta**, v. 150, p. 26-31, 1980.
- CLARK, M.S.; WALL, W.J. **Chromosomes: the complex code**. London: Chapman & Hall, 1996. 345p.
- COLEMAN, J.R. Chromosome numbers of angiosperms collected in the state of São Paulo. **Brazilian Journal Genetic**, v.3, p.533-549, 1982.
- DIAS, B.F.S. A conservação da natureza. In: PINTO, M.N. (Org). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília: UnB, 1990. p. 583-640.
- DOLEZEL, J.; CIHALIKOVA, J.; LUCRETTI, S. A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosome from root tips of *Vicia faba* L. **Planta**, v.188, p.93-98, 1992.
- DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: J. Wiley, 1981. 709 p.
- DUCKE, A. As espécies brasileiras do gênero “*Coumarouna*” Aubl. ou “*Dipteryx*” Schreb. (Família “*Leguminosae Papilionatae Dalbergieae*”). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 20, n.1, mar. 1948.
- EITEN, G. Vegetação. In: PINTO, M.N. (Org). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília: UnB, 1990. p. 9-66.
- FEDOROV, AN.A. (Ed.). **Chromosome numbers of plants**. Leningrad: Academy of Sciences of the URSS. Komarov Botanical Institute. 1969. 962p.
- FILGUEIRAS, T. S.; SILVA, E. Estudo preliminar do baru (Leg. Faboideae). **Brasil Florestal**, v.22, n.6, p.33-39, 1975.

FONSECA, C.E.L.; CONDÉ, R.C.C.; SILVA, J.A. Influência da profundidade de semeadura e da luminosidade na germinação de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gom.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.4, p.661-666, 1994.

FORNI-MARTINS, E.R.; MARTINS, F.R. Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.4, p. 947-956, 2000.

FORNI-MARTINS, E.R.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; CRUZ, N.D. Biologia da reprodução em plantas de cerrado: microsporogênese. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 8, Campinas, 1992. **Anais...** Campinas: SBSP, 1992. p.77-82.

FORNI-MARTINS, E.R.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; CRUZ, N.D. Chromosome numbers in Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal Genetic** v.18, n.2, p.281-288, 1995.

FUCHS, J.; BRANDES, A.; SCHUBERT, I. Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. **Plant Systematics and Evolution**, v.196, p.227-241, 1995.

FUKUI, K.; IJIMA, K. Somatic chromosome map of rice by imaging methods. **Theoretical and Applied Genetics**, v.81, p.589-596, 1991.

FUKUI, K.; MUKAI, Y. Condensation pattern as a new image parameter for identification of small chromosomes in plants. **Japanese Journal of Genetics**, v.63, p.359-366, 1988.

FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. **Plant chromosomes: laboratory methods**. Boca Raton: CRC, 1996. 274 p.

FUKUI, K.; NAKAYAMA, S.; OHMID2O, N.; YOSHIKI, H.; YAMABE, M. Quantitative karyotyping of three diploid *Brassica* species by imaging methods and localization of 45s rDNA loci on the identified chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.325-330, 1998.

GAVILANES, M.L.; BRANDÃO, M. Frutos, Folhas e Raízes de Plantas do Cerrado, suas propriedades medicinais, tendo como veículo a cahaça. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.173, p.40-44, 1992.

- GILL, B.S. The molecular cytogenetic analysis of economically important traits in plants. In: KEW CHROMOSOME CONFERENCE 4, 1995, Kew. **Proceedings...** Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. p. 47-53.
- GOEDERT, W.J.(Ed.). **Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo.** São Paulo: Nobel; Brasília: EMBRAPA/CPAC. 1985. 422p.
- GUALBERTI, G.; DOLEZEL, J.; MACAS, J.; LUCRETTI, S. Preparation of pea (*Pisum sativum* L.) chromosomes and nucleus suspensions from single root tips. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.744-751, 1996.
- GUERRA, M. Patterns of heterocromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**. v.23, n.4, p. 947-956, 2000.
- GUERRA, M.S. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. I. **Brazilian Journal Genetics**, v.9, n.1, p.21-40, 1986.
- GUERRA, M.S. **Introdução à citogenética geral.** Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142p.
- GUERRA, M.S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Brazilian Journal Genetics**, v.9, n.4, p.741-743, 1986.
- HANSEN, A.L.; GERTZ, A. ; JOERSBO, M.; ANDERSEN, S.B. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosomes doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. **Euphytica**, Wagenigen, v.101, n.2, p.231-237, 1998.
- HENG, H.H.Q.; TSUI, L.C. Modes of DAPI banding and simultaneous *in situ* hybridization. **Chromosoma**, v.102, p.325-332, 1993.
- HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T. Flow Cytometry and Chromosome Sorting. In: FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. **Plant chromosomes: laboratory methods.** Boca Raton: CRC , 1996. p. 85-106.
- HESLOP-HARRISON, P.; SCHWARZACHER, T. **Practical *in situ* hybridization.** Oxford: Bios Sciecntific, 2000. 203 p.
- HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. **Overdispersion: models and estimation.** São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, 1998. 73 p.
- JOHN, B.; FREEMAN, M. Causes and Consequences of Robertsonian Exchange. **Chromosoma**, Berlin, v.52,p.123-136, 1975.

JONES, K. Aspects of Chromosome Evolution in Higher Plants. **Adv. Bot. Res.**, v.6, p.120-194, 1978.

JONES, K Robertsonian Fusion and Centric Fission in Karyotype Evolution of Higher Plants. **The Botanical Review**, v.64,n.3,p.273-289, 1998.

KALUME, D.E.; SOUSA, M.V.; MORHY, L. Purification, Characterization, Sequence Determination, and Mass Spectrometric Analysis of a Tripsin Inhibitor from Seeds of the Brazilian Tree *Dipteryx alata* (Leguminosae). **Journal of Protein Chemistry**, v.14, n.8, p.685-693, 1995.

KAMISUGI, Y.; FURUYA, N.; IJIMA, K.; FUKUI, K. Computer-aided automatic identification of rice chromosomes by image parameters. **Chromosome Research**, v.1, p.189-196, 1993.

KING, M. **Species evolution: the role of chromosome change**. Cambridge: Cambridge University, 1993. 336p.

LACA -BUENDIA, J.P. Plantas Produtoras de Fibras no Cerrado. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.173, p.17-20, 1992.

LEE, J.; ARUMUGANATHAN, K.; KAEPLER, S.M.; KAEPLER, H.F.; PAPA, C.M. Cell synchronization and isolation of metaphase chromosomes from maize (*Zea mays* L.) root tips for flow cytometric analysis and sorting. **Genome**, v.39, p.697-703, 1996.

LEE, J.; ARUMUGANATHAN, K.; YEN, Y.; KAEPLER, S.M.; KAEPLER, H.F.; BAENZIGER, P.S. Root tip cell synchronization and metaphase-chromosome isolation suitable for flow sorting in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genome**, v.40, p.633-638, 1997.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

MACEDO, J.F. As Plantas Oleaginosas do Cerrado. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.173, p.21-26, 1992.

MACGREGOR, H.C. Chromosome research - look forward to 2001. **Chromosome Research**, v.1, n.1, p. 5-7, 1993.

REATTO, A.; CORREIA, J.R; SPERA, S.T. Solos do bioma Cerrado: aspectos pedológicos. In: SANO, S.M; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, 1998. p. 47-88.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S.M; AMLEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, 1998. p. 89-168.

RIZZINI, C.T. A flora do cerrado - análise florística das savanas centrais. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO. São Paulo: EDUSP, 1963. p.125-177.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001.

SANO, S. M.; VIVALDI, L. J.; SPEHAR, R. C. Diversidade morfológica de frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v..34, n.4, p.513-518, abr. 1999.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT[®]: user's guide. v.6.4. Cary: SAS Institute Inc. 1993.

SCHUBERT, I.; SCHRIEVER-SCHWEMMER, G.; WERNER, T.; ALDER, I.-D. Telomeric signals in Robertsonian fusion and fission chromosomes: implications for the origin of pseudoaneuploidy. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.59,p.6-9, 1992.

SHARMA, A.K.; SHARMA, A. **Plant chromosomes: analysis, manipulation and engineering**. Amsterdam: Hardwood Academic, 1999. 371 p.

SILVA, J.A.da; SILVA, D.B. DA; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. de. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília, EMBRAPA - CPAC, EMBRAPA - SPI, 1994. 166 p.

SILVA FILHO, P.V. Plantas do cerrado produtoras de matéria tintorial. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.173, p.27-32, 1992.

SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC, 1993. 390p.

SIQUEIRA, A. C. M. de F.; NOGUEIRA, J.C.B.; KAGEYAMA, P.Y. Conservação dos recursos genéticos *ex situ* do cumbaru (*Dipteryx alata*) Vog. – Leguminosae. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.5, n.2, p.231-243, 1993.

- SLIJEPCEVIC, P. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chromosoma**, v.107, p.136-140, 1998.
- STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: Addison-Wesley, 1971. 216p.
- SUMNER, A.T. **Chromosome banding**. London: Uniwin Hyman, 1990. 434p.
- TJIO, J.H. The somatic chromosomes of some tropical plants. **Hereditas**, v.34, p.135-146, 1948.
- TOGASHI, M. **Composição e caracterização química e nutricional do fruto de baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. 1993. 108 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)-Universidade de Campinas, Campinas.
- TOGASHI, M.; SGARBIERI, V.C. Caracterização química parcial do fruto do baru (*Dipteryx alata*, Vog.). **Ciência Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.14, n.1, p. 85-95, jan./jun. 1994.
- TOGASHI, M.; SGARBIERI, V.C. Avaliação nutricional da proteína e do óleo de sementes de baru (*Dipteryx alata*, Vog.). **Ciência Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.15, n.1, p.66-69, 1995.
- TOLEDO FILHO, D. V. Competição de espécies arbóreas do cerrado. **Boletim Técnico IF**, São Paulo, v.42, p.61-70, maio 1988.
- VALLILO, M.I.; TAVARES, M.; AUED, S. Composição química da polpa e da semente do fruto de cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.). Caracterização do óleo da semente. **Revista do Instituto Florestal**, v.2, p.115-125, 1990.
- VOSA, C.G. Chromosome banding: plants. **Genome**, v.31, p.474-475, 1989.
- ZARCO, C.R. A new method for estimating karyotype asymetry. **Taxonomy**, v.35, n.3, p.526-530, 1986.