

**REVISTA TRÓPICA: Ciências Agrárias e Biológicas****Morfometria cromossômica e identificação da região organizadora nucleolar em cromossomos de *Cassia fistula* L.**

Andrey Jeffer Maciel Toledo¹, Ricardo Gallo², Heloisa Rocha do Nascimento¹, Isane Vera Karsburg¹

¹Universidade do Estado de Mato Grosso, Avenida Perimetral Rogério Silva, s/n, Bairro Flamboyant, Caixa Postal 324, CEP 78580-000, Campus de Alta Floresta, Alta Floresta-MT. jeferrsa@hotmail.com, helornasc@gmail.com, isane9@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, CEP 36571-000, Campus de Viçosa, Viçosa-MG. gallo.florestal@yahoo.com.br

Resumo: *Cassia fistula* L. também conhecida como chuva de ouro, pertence à família Fabaceae, e se insere no gênero *Cassia* que possuem numerosas espécies e são amplamente utilizadas para a arborização urbana. Considera-se necessário um estudo mais acentuado sobre esta espécie, principalmente na área da citogenética, pois, podem trazer contribuições no sentido de aumentar a eficiência de estratégias de conservação e no estudo da evolução. Objetivou-se identificar a região organizadora nucleolar (RON) e caracterizar a morfologia dos cromossomos de *Cassia fistula*. As radículas foram bloqueadas em Trifluralin[®] a 3 M e fixadas em solução metanol-ácido acético (PA) na proporção de 3:1 sob a 4 °C, foram transferidas para tubos Eppendorf[®] contendo 200 μ L de enzima Pectinase SIGMA[®] permanecendo por 2 horas a 35 °C em banho-maria e novamente e fixado em solução metanol-ácido acético (3:1) por 12 horas a 4 °C. Na identificação das RONs foi utilizado AgNO₃ 2%. *Cassia fistula* L. apresentou 2n = 26 cromossomos, fórmula cariotípica: 9M + 4SM e o bandamento Ag-NOR evidenciou pela impregnação da prata apenas uma região nucleolar organizadora, sendo esta, no par de cromossomos $\delta 1\delta$. A variabilidade no número de cromossomos está relacionada à variação intra- e interespecífica.

Palavras-chave: AgNOR, bandamento, cariótipo, fabaceae.

Chromosomal morphometry and nucleolar organizer region identification in *Cassia fistula* L. chromosomes

Abstract: *Cassia fistula* L. also known as golden shower tree, belongs to Fabaceae family and *Cassia* genus, that assembly numerous species that are widely used in urban arborization. Deep down cytogenetics studies with this species are necessary, that may contribute to increase conservation strategies efficiency in the evolution assays. This study aimed to identify the nucleolar

organizer region (NOR) and characterize *Cassia fistula* chromosomes morphology. The roots were blocked with Trifluralin[®] 3 M and fixed in methanol-acetic acid (PA) in the ratio of 3:1 at 4 °C, which were transferred to Eppendorf[®] tubes containing 200 µL pectinase enzyme (SIGMA[®]) remained for 2 hours at 35 °C in water bath and again, fixed in methanol-acetic acid solution (3:1) for 12 hours at 4 °C. AgNO₃ 2% was used in the NORs identification. *Cassia fistula* L. presented 2n = 26 chromosomes, karyotype formula: 9M + 4SM banding and Ag-NOR revealed by silver impregnation showed only one NOR in the chromosome pair 11. The chromosomes number variability is related to intra and interspecific variation.

Keywords: AgNOR, banding, karyotype, fabaceae.

Introdução

A família Fabaceae possui distribuição cosmopolita, compreendendo cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies (Souza & Lorenzi, 2008). A *Cassia fistula* L. se insere no gênero *Cassia* que possui numerosas espécies e são amplamente utilizadas para a urbanização urbana, contendo algumas das espécies mais populares e apreciadas dos trópicos (Corrêia, 1984).

Cassia fistula L. também conhecida como chuva de ouro, é uma árvore decídua, que atinge dimensões próximas de 30 m de altura e 100 cm de diâmetro. As folhas são compostas, paripinadas, com oito a 20 pares de folíolos oblongos, medindo de 3 a 6 cm de comprimento, finamente pilosos, arredondados ou obtusos no ápice (Carvalho, 2006). Suas flores são amarelas, dispostas em grandes racemos pêndulos, altamente ornamentais. Os frutos são longas vagens indeiscentes (até 40 cm), cilíndricas, pretas quando madura, contendo sementes achatadas enfileiradas, numa polpa escura de sabor adocicado, porém desagradável (Lorenzi et al., 2003). As sementes são duras, oval ou obovóide, aplainada de um lado e carinada do outro, brilhante, coloração castanho-amarelo-claro, com excisão no hilo, medindo até 1 cm de comprimento (Carvalho, 2006).

É uma árvore utilizada com fins ornamentais, devido à beleza de suas flores, mas também utilizada na medicina popular. A polpa, folhas e flores, são usadas, na medicina tradicional, como laxante, cita-se ainda o emprego de suas folhas em tratamentos dermatológicos, e de seus frutos para dores reumáticas (Lorenzi et al., 2003). Suas raízes são tidas, como: purgativas, adstringentes e tônicas, a polpa do fruto maduro é usada para preparação de fitoterápicos de ação laxativa pela indústria farmacêutica (Lorenzi & Matos, 2008). Sua madeira pode ser usada na construção civil, principalmente em acabamentos internos, carpintaria, serraria, desdobra, forro, móveis rústicos, tabuado, vigas, postes, pequenas pontes, embarcações e cabo para ferramenta (Carvalho, 2006).

A família Fabaceae é formada por um grande número de gêneros e estes, por sua vez, formados por inúmeras espécies, que variam quanto ao número de cromossomos que constituem

seus cariótipos. Estas variações são justificáveis devido às forças evolutivas que as espécies sofrem constantemente para manterem um equilíbrio ambiental (Auler & Battistin, 1999). Segundo Guerra (1988), uma caracterização clara e precisa do cariótipo de uma espécie é de fundamental importância quando se quer comparar citogeneticamente espécies diferentes, ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie.

A citogenética é uma ciência voltada para estudos de observação dos cromossomos por meio de técnicas de coloração, de modo a contá-los ou proceder com quaisquer outras análises morfológicas, melhorar o entendimento do processo de divisão celular e de modificações que acontecem na estrutura cromossômica, contribuindo com estudos relacionados com cromossomos, isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução (Brammeret al., 2007; Sodré, 2009).

Dentre várias técnicas citogenéticas, o bandeamento tem sido um valioso instrumento para compreender melhor as alterações que se estabelecem em cada cariótipo, pois possibilita avaliações detalhadas da presença e posição das bandas cromossômicas (Almeida, 2008). Facilitando a identificação e caracterização de cromossomos praticamente idênticos, rearranjos cromossômicos, comparação entre espécies e as transformações que ocorreram em grupos de espécies próximas com cariótipos parecidos (Guerra, 1988). Com o bandeamento Ag-NOR, é possível identificar as regiões organizadoras nucleolares ativas (RON ativa), que é constituída em um ou mais pares cromossômicos, os quais possuem os genes rDNA responsáveis pela formação dos diferentes tipos de rRNA que formam o nucléolo e os ribossomos (Miller et al., 1976; Howell & Black, 1980; Sumner, 1990; Guerra, 1988; Sumner, 2003; Margonar, et al., 2010).

Nesse contexto, considera-se necessário um estudo mais acentuado sobre a *Cassia fistula* L., principalmente na área da citogenética, trazendo contribuições no aumento da eficiência de estratégias de conservação, no estudo da evolução e também nos trabalhos de melhoramento genéticos. Sendo assim, o trabalho teve como objetivo a identificação da região organizadora nucleolar (RON) e caracterização da morfologia dos cromossomos de *Cassia fistula* L.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas cerca de 30 sementes de *Cassia fistula* L., coletadas em pontos diferentes no perímetro de Rondonópolis/MT. As sementes foram germinadas em caixas de gerbox com papel germitest e umedecidas com 5mL de água destilada. As radículas que atingiram o tamanho de 1 cm de comprimento foram submetidas ao tratamento de bloqueio, que consiste na permanência das mesmas em uma solução de Trifluralin[®] na concentração de 3 M por 18 horas a 4 °C. Esse processo permite o acúmulo do maior número possível de células em metáfase. Posteriormente, as

radículas foram lavadas em água destilada para remover o excesso do herbicida e fixadas em solução metanol-ácido acético (PA) na proporção de 3:1 sobre as mesmas condições de temperatura. As radículas foram retiradas da solução fixadora e submetidas à lavagem com água destilada, em seguida, foram transferidas para tubos Eppendorf[®] contendo enzima Pectinase SIGMA[®] na concentração de 3 M permanecendo por 3 horas a 35 °C em banho-maria. Realizado a digestão enzimática, o material foi lavado novamente e fixado em solução metanol ácido acético (3:1) por no mínimo 12 horas a 4°C.

As lâminas foram confeccionadas por dissociação do meristema radicular, secadas ao ar em movimentos rápidos e em placa aquecedora a 50°C conforme descreve Carvalho & Saraiva (1993). Foram consideradas para análises 30 metáfases da espécie em estudo, apresentando cromossomos metafásicos suficientemente espalhados e que permitissem medições cromossômicas para elaboração do cariótipo.

Algumas lâminas foram submetidas à solução de nitrato de prata (AgNO₃) 50% segundo Funaki et al. (1975), sendo esta gotejada sobre cada lâmina que posteriormente foi coberta com a lamínula. O material foi mantido em câmara úmida a 34 °C por 19 horas. Finalizado o período de incubação, as lamínulas foram retiradas com jato de água e as lâminas lavadas com água destilada por cerca de 2 minutos.

As imagens (metáfases) de interesse foram fotografadas com o uso de um microscópio fotômico binocular (Leica ICC 50) acoplado a um computador e no software LAZ EZ V1. 7.0. As mesmas foram analisadas através do programa *Image SXM* (Barret, 2002) de domínio público, programa o qual pode ser obtido via internet (<http://reg.ssci.liv.ac.uk>).

Os braços de cada cromossomo foram medidos em pixels e convertidos em escala de micrômetros. A razão entre os braços (*r*) foi determinada segundo critério de classificação morfológico dos cromossomos descrito por Guerra (1988). O comprimento total do lote haplóide de cromossomos (CTLH) foi obtido e os cromossomos numerados em ordem decrescente de tamanho.

Resultados e Discussão

A presente espécie apresenta $2n = 26$ cromossomos (Figura 1). Mehra & Mann (1971), estudando o gênero *Cassia*, encontraram uma variação no número de cromossomos entre as espécies estudadas, de 12 a 14 (*C. fistula* e *C. leptophilla* (Bandel, 1974) com $n = 14$; *C. nodosa*, $n = 12$ e 14 ; *C. occidentalis*, $n = 13$ e 14). Portanto, ocorre uma variação no número de cromossomos somáticos de 24 a 28, dentro deste gênero. Ohriet *al.* (1986) encontraram variações abruptas em conteúdo de DNA em espécies arbóreas de *Cassia* s.p, quando comparadas com espécies arbustivas e herbáceas. Kumari e Bir (1989) observaram predominância de cromossomos metacêntricos em

espécies arbóreas e arbustivas de Caesalpinioideae indianas sem diferenças no número de satélites e cariótipo.

Em relação a família Fabaceae as espécies, *Senna macranthera* e *Peltophorum dubium* (Biondo et al., 2005) também apresentam $2n=26$ cromossomos. *Macroptilium martii* $2n = 22$ cromossomos, *Bauhinia cheilantha* $2n=28$ cromossomos (Bezerra et al., 2008). A variabilidade no número de cromossomos está relacionada à variação intra- e interespecífica e seu conhecimento pode contribuir para uma delimitação taxonômica mais natural de subespécies e de espécies bem como para o reconhecimento de citótipos dentro de populações de uma mesma espécie.



Figura 1. Cariótipo de *Cassia fistula* $2n = 2x = 26$ cromossomos corados com Giemsa 5%. Cromossomos 1, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12 e 13 são metacêntricos e os pares 2, 3, 5 e 9 são submetacêntricos). Barra = 5 μ m.

Durante as avaliações realizadas nas células em metáfase de *Cassia fistula* L. foi evidenciado que os pares cromossômicos apresentam diferenças métricas com variação dos tamanhos entre os pares cromossômicos de 2,06 a 0,67 μ m (Tabela 1). De acordo com John (1980) o comprimento de um cromossomo é considerado uma constante e, portanto é uma de suas propriedades características. Podendo ser classificados como longos ($>10 \mu$ m), médios (4-8 μ m) ou curtos ($<2 \mu$ m). Dessa forma, *Cassia fistula* apresentou cromossomos considerados curtos.

Tabela 1. Morfometria dos cromossomos de *Cassia fistula* L.

Cromossomo	Total (μm)	Braço (μm)		Razão entre braços	IC	Classe
		Curto	Longo			
1	2,06	0,90	1,16	1,28	43,69	M
2	1,89	0,60	1,29	2,15	31,75	SM
3	1,62	0,63	0,99	1,57	38,88	SM
4	1,26	0,63	0,63	1,00	50,00	M
5	1,19	0,45	0,74	1,64	37,82	SM
6	1,19	0,49	0,70	1,42	41,18	M
7	1,16	0,48	0,68	1,42	41,38	M
8	1,16	0,50	0,60	1,20	43,10	M
9	1,11	0,38	0,73	1,92	34,23	SM
10	0,94	0,47	0,47	1,00	50,00	M
11	0,87	0,38	0,49	1,29	43,68	M
12	0,86	0,36	0,50	1,38	41,86	M
13	0,67	0,27	0,40	1,48	40,30	M
Total	15,98					

Legenda: Razão entre braços = Braço longo/Braço curto; IC = Braço curto/comprimento total x 100; M = metacêntrico; SM = submetacêntrico.

O cariótipo de *Cassia fistula* apresentou 9 pares de cromossomos metacêntricos (M) e 4 pares de cromossomos submetacêntricos (SM), permitindo descrever sua fórmula cariotípica sendo esta 9M + 4SM. A análise de indivíduos de diferentes populações da mesma espécie é muito importante, já que variações significativas de números cromossômicos entre populações são encontradas em literatura (Forni-Martins & Martins, 2000). Na literatura, são encontrados poucos trabalhos que relacionam altos números cromossômicos com o hábito em Fabaceae. Ohriet al. (1986) encontraram variações abruptas em conteúdo de DNA em espécies arbóreas de *Cassia* s.l., quando comparadas com espécies arbustivas e herbáceas.

O bandeamento Ag-NOR em *Cassia fistula* evidenciou pela impregnação da prata as regiões organizadoras nucleolares ativas (RON ativa), na porção centromérica do par de cromossomos $\delta 1\delta$ (Figura 2). Segundo Sumner (2003), a impregnação da prata é utilizada para evidenciar os locais em que ocorrem os processos de síntese dos RNAs ribossomais, que participam da formação e composição das proteínas celulares. O número dessas regiões é constante em cada espécie e raramente superior a dois. Como nem sempre todas as constrições secundárias de uma célula se encontram claramente distendidas, desta forma é considerado apenas o número máximo que se tenha observado (Guerra, 1988).

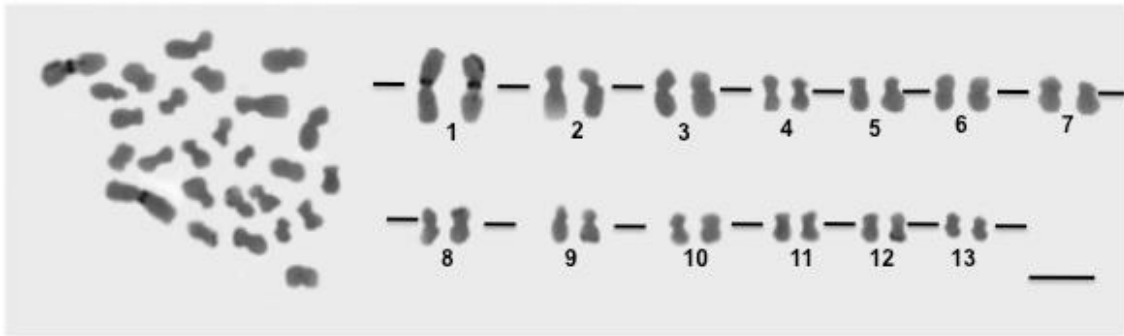


Figura 2. Região organizadora nucleolar (RON) de *Cassia fistula* no par cromossômico 1, cromossomos corados com nitrato de prata 2% Barra = 5 μ m.

Conclusão

Cassia fistula L. apresentou $2n = 26$ cromossomos e fórmula cariótica $9M + 4SM$. Já bandejamento Ag-NOR evidenciou pela impregnação da prata apenas uma região nucleolar organizadora, sendo esta, no par de cromossomos $\delta 1\delta$. É relevante, através do exposto, ressaltar que existem lacunas a serem preenchidas, no que diz respeito aos estudos citogenéticos das espécies arbóreas, sendo que novas contribuições podem em longo prazo aumentar a eficácia das estratégias de conservação do germoplasma nativo, bem como realizar melhoramento genético das espécies medicinais de interesse comercial.

Referências

- ALMEIDA, C.B. **Citogenética de *Tamarindus indica* L.** 2008. 31f. Monografia (Especialização em Biologia) ó Universidade do Estado do Mato Grosso, Alta Floresta.
- AULER, N.M.F.; BATTISTIN, A. Análise do cariótipo de *Apuleialeiocarpa* (Vog.) Macbr. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.1, p.167-169, 1999.
- BANDEL, G. Chromosome numbers and evolution in the Leguminosae. **Caryologia** v. 27, n. 1, p.17-32. 1974.
- BARRET, S.D. Software for scanning microscopy. **Proceedings of the Royal Microscopy Society**, v.37, p.7-14, 2002.
- BEZERRA, P. N.; SILVA, E.B.C.; SILVA, MGS.; SANTOS, M.V.F.; LIRA, M. A.; JUNIOR, J. C. D.; VIDAL, A.C.B. Caracterização cromossômica de *Macropitiliummartii*benth e *Bauhiniacheilantha* (fabaceae) através de coloração convencional e bandejamento CMA. **Anais Zootec.** V.1,n.1,p. 1-4, 2008.

- BIONDO, E.; MIOTTO, S.T.S.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae das Leguminosae do sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 241-248. 2005.
- BRAMMER, S.P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. **Citogenética vegetal: da era clássica à molecular**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 9p.
- CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic & Histochemistry**, v.68, p.142-145, 1993.
- CARVALHO, P.E.R. *Cassia rosea*. Circular técnica, 117. **Embrapa Floresta**, 2006. 8p.
- CORRÊIA, M.P.; **Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: MA/IBDF, 1984. 747p.
- FORNI-MARTINS, E.R.; MARTINS, F.R. Chromosomes studies on Brazilian cerrado plants. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.4, p.947-955, 2000.
- FUNAKI, K.; MATSUI, S.; SASAKI, M. Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. **Chromosoma**, v.49, p.357-370, 1975.
- GUERRA, M.S. **Introdução a citogenética geral**. São Paulo: Guanabara, 1988. 135p.
- KUMARI, S.; BIR, S.S. Karyomorphological evolution in Caesalpinaceae. **Journal of Cytology e Genetics** n.24, p. 149-1963, 1989.
- HOWELL, W.M.; BLACK, B.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developed: a 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014, 1980.
- JOHN, B. **Citogenética de populações**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária e EDUSP, 1980. 84p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil:** nativas e exóticas cultivadas. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; TORRES, M.A.V.; BACHER, L.B. **Árvores exóticas no Brasil:** madeiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. 384p.

MARGONAR, M.A.S.; KARSBURG, I.V.; BONA, D.A.O. de. Identificação da região organizadora nucleolar de *Jatropha curcas* L. **Estudos**, Goiânia, v.37, n.9/10, p.755-766, 2010.

MEHRA, P.N., MANN, S.X. Cytological observations on arborescent leguminosae of eastern Himalayas. **Nucleus**, v. 14, p. 144-152, 1971.

MILLER, D.A. et al. Supresin of human nucleolus organizer activity in mouse human somatic hybrid cells. **Experimental Cell Research**, v.101, p.235-243, 1976.

OHRI, D.; KUMAR, A.; PAL, M. Correlations between 2C DNA values in habit in *Cassia* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Plant Systematics and Evolution**, v.153, p. 223-227, 1986.

SODRÉ, L.M.K, et al. **Práticas de Genética**. Paraná: Editora UEL, 1999. 101p.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática:** guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 704p.

SUMNER, A.T. **Chromosomes:** organization and function. Blackwell, 2003. 286p.

SUMNER, A.T. **Chromosome banding**. Londo: Unwin Hyman, 1990.