

# CARACTERIZAÇÃO DOS CROMOSSOMOS MITÓTICOS E ÍNDICE MEIÓTICO DE *Theobroma speciosum* (L.) WILLD

MICHAELLI YURI YOSHITOME<sup>1</sup>; MARCELO FERNANDO PEREIRA SOUZA<sup>2</sup> E ISANE VERA KARSBURG<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Bióloga, Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT/Alta Floresta. Trabalho de Conclusão de Curso do primeiro autor apresentado a UNEMAT/Alta Floresta.

<sup>2</sup> Biólogo, Agrônomo, Alta Floresta, MT.

<sup>3</sup> Bióloga, Dra. Professora Adjunta UNEMAT/Alta Floresta, Caixa Postal 547, 78580-000, Alta Floresta, MT, e-mail: isane9@yahoo.com.br

---

RESUMO: Neste estudo, foi avaliado o cariótipo e o índice meiótico (IM) de cacauí (*Theobroma speciosum* (L.) Willd.). Para as análises citológicas, as sementes de *T. speciosum* foram colocadas para germinar em ambiente controlado. Após a germinação, os meristemas radiculares foram coletados e submetidos aos procedimentos de bloqueio, com a finalidade de acumular células em metáfases. Em seguida, foram fixados em solução fresca de metanol: ácido acético (3:1), a -5 °C. Para a obtenção do número cromossômico, os meristemas radiculares foram submetidos à hidrólise em HCl 5N, dissociação celular, secagem ao ar e coloração com Giemsa 3%. Para análise de IM e viabilidade pólnica foram coletados botões florais de diferentes tamanhos e fixados em metanol: ácido acético (3:1). Na avaliação do IM foi utilizada orceína acética 2% e na estimativa da viabilidade do pólen, utilizou-se verde metila 1%, fucsina básica 1% e orceína acética 2%. O cacauí apresenta  $2n = 2x = 20$  cromossomos, com os pares 4 e 9 sendo submetacêntricos e os demais pares metacêntricos. Em todas as populações o índice meiótico (IM) é próximo a 80%, variando de 79,33% a 76,33%. Entre os corantes utilizados para análise pólnica, a orceína acética 2% é o mais indicado para estimar a viabilidade do pólen por diferenciar melhor os grãos de pólen viáveis dos inviáveis.

Termos para Indexação: citogenética, Malvaceae, pólen, cacauí.

## CHARACTERIZATION OF MITOTIC CHROMOSOMES AND MEIOTIC INDEX OF *Theobroma speciosum* (L.) WILLD

ABSTRACT: In this study, the karyotype and the meiotic index (MI) of cacauí (*Theobroma speciosum* (L.) Willd.) were evaluated. For cytological analyses, *T. speciosum* seeds were allowed to germinate in a controlled environment. After germination, root meristems were collected and subjected to blocking procedures in order to accumulate cells in metaphase. Then, they were fixed in fresh solution of methanol: acetic acid (3:1), at -5 °C. To obtain the chromosome number, root meristems were subjected to hydrolysis in HCl 5N, cell dissociation, air drying, and staining with Giemsa 3%. For MI and pollen viability analyses, floral buds of different sizes were harvested and fixed in methanol: acetic acid (3:1). For MI analysis, acetic orcein 2% was used, whereas for pollen viability assessment, methyl green 1%, basic fuchsin 1%, and acetic orcein 2% were employed. Cacauí presents  $2n = 2x = 20$  chromosomes; pairs 4 and 9 are submetacentric and the remaining ones are metacentric. For all populations, the meiotic index (MI) is around 80%, ranging from 79.33% to 76.33%. Among the stains used in the pollen analysis, acetic orcein 2% is the most suitable for pollen viability assessment since it better differentiates viable from inviable pollen grains.

Index terms: cytogenetics, Malvaceae, pollen, cacauí.

---

## INTRODUÇÃO

*Theobroma speciosum* (L.) Willd, popularmente conhecida como cacauí pertence à família Malvaceae e possui distribuição predominantemente pantropical, incluindo cerca de 250 gêneros e

4.200 espécies, destes, cerca de 80 gêneros e 400 espécies ocorrem no Brasil (Souza & Lorenzi, 2008). Desta família, pela relevância econômica do cacau (*T. cacao* L.), *Theobroma* L. é um dos gêneros de maior importância, é estritamente neotropical, está distribuído por todas as partes das florestas pluviais do hemisfério ocidental, entre as latitudes 18º norte e 15º sul, e possui aproximadamente 22 espécies, das quais 10 ocorrem na Bacia Amazônica (Cuatrecasas, 1964).

A Amazônia é considerada como uma das regiões propícias para a fruticultura, tendo em vista, uma enorme variedade de plantas nativas (Machado & Retto Junior, 1991). Todas as espécies amazônicas do gênero *Theobroma* (podemos citar: *T. cacao* L., *T. obovatum* Bern., *T. subincanum* Mart., *T. speciosum* (L.) Willd., *T. grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum., *T. bicolor* H. & B.) produzem frutos comestíveis de cujas sementes pode-se produzir chocolate (Cuatrecasas, 1964; Venturieri, 1993). O cacauí é, entre as espécies do gênero, a que possui o teor de gordura mais parecido com o cacau, ou seja, um sucedâneo potencial. Fruteira típica da Região Norte, alcança até 14 metros de altura (Silva et al., 2004).

Do ponto de vista citogenético, pouco se sabe sobre a biodiversidade nativa tropical em especial a neotropical de muitas espécies vegetais (Silva et al., 2004). Avaliações citológicas podem trazer contribuições no sentido de aumentar a eficiência das estratégias de conservação e mesmo de trabalhos de melhoramento com as espécies (Singh, 1993; Auler et al., 2006). Pelas avaliações da morfologia e número cromossômico juntamente com outras características citológicas, a análise da variação cromossômica numérica de um táxon permite reconhecer o número básico do grupo, que auxilia no entendimento de variações genéticas envolvidas na evolução de um grupo, como também na delimitação taxonômica de espécies (Pedrosa et al., 1999).

Sendo que as pesquisas citológicas no gênero *Theobroma* até o momento baseiam-se apenas na determinação de genomas diplóides, não apresentando diferenças citogenéticas importantes para servir de base na diferenciação entre as espécies (Santos, 2002).

As irregularidades cromossômicas refletem diretamente nos processos reprodutivos das espécies com a formação de grãos de pólen inviáveis (Marutani et al., 1993; Corrêa et al., 2005). Os gametas portadores de anormalidades perdem em competitividade com os gametas normais, pois, ocasionam a redução na formação de frutos com ou sem sementes (Pagliarini, 2001).

O comportamento dos grãos de pólen em qualquer espécie vegetal é de fundamental importância para o estudo e detalhamento genético da planta, a fim de estudar o comportamento reprodutivo para melhor entendimento da dispersão dos gametas masculinos da planta (Corrêa et al., 2005), assim como para a aplicação prática na conservação, quanto para algum tipo de melhoramento ou cultivo na agricultura (Guinet, 1989). Além de ser um fator importante na distinção das espécies pela morfologia e viabilidade (Karsburg & Battistin, 2005).

O objetivo deste trabalho foi analisar o cariótipo e o índice meiótico de *Theobroma speciosum* (L.) Willd.

## MATERIAL E MÉTODOS

As sementes e as flores utilizadas para as análises citológicas foram coletadas de sete populações de *Theobroma speciosum*, em Alta Floresta, norte do estado do Mato Grosso (MT), Brasil. As populações foram chamadas consecutivamente de População 1 até População 7, sendo suas coletas georeferenciadas conforme a Tabela 2. As análises citogenéticas foram realizadas no Laboratório de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Mato Grosso (UNEMAT) do Campus de Alta Floresta, MT.

As sementes foram colocadas em caixa tipo gerbox contendo vermiculita, mantidas em câmara de germinação, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, por 15 a 25 dias. As raízes (1,0 a 1,5 cm de comprimento) foram imersas em Trifluralin 3 µM, por 14 h, a 4 ± 2°C, conforme Carvalho & Saraiva (1993).

Após serem lavadas em água destilada, as raízes foram fixadas no fixador metanol:ácido acético (3:1), e estocadas a -5°C por pelo menos 24 horas até o momento de ser feita a hidrólise. No procedimento de hidrólise, as raízes foram retiradas do fixador 3:1 e lavadas em água destilada. Em seguida, transferidas para tubos de microcentrífuga Eppendorf de 1,5 mL, contendo ácido clorídrico (HCl) 5N por 15 min a 28°C. Após a hidrólise, as raízes foram lavadas em água destilada por um período de 15 min, com três trocas e fixadas no fixador 3:1 a -5 °C. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação e secagem ao ar, segundo Carvalho & Saraiva (1993), coradas com Giemsa 3% por três minutos e observadas em microscópio óptico LMB-2.

A análise das lâminas contendo as metáfases mitóticas foi realizada com o uso de microscópio Olympus<sup>TM</sup>, iluminação de campo claro, usando a objetiva de 100 X (imersão a óleo). As imagens foram capturadas pelo programa ACDsee e digitalizadas pelo Corel Photo-Paint X3 (versão13). As imagens dos cromossomos foram processadas em um computador Acer 3660-2314. Para a caracterização citogenética dos cromossomos foram utilizadas 30 metáfases. Os braços de cada cromossomo foram medidos em pixels e convertidos em escala de micrômetros. Os cromossomos foram classificados de acordo com o índice centromérico  $IC = BC \times 100 / T$ , sendo: IC=índice centromérico, BC=comprimento do braço curto; T=comprimento cromossômico total e a razão entre os braços (r) que foram determinados segundo os critérios propostos por Levan et al. (1964) e revisados por Guerra (1986<sub>a</sub>)

Para o estudo do índice meiótico (IM) e viabilidade dos grãos de pólen, foram utilizados botões florais em estágio de pré-antese, coletados em diversos estádios de desenvolvimento entre os horários das 10 às 15 horas, fixados em solução de metanol e ácido acético (3:1) por 24 horas a 4± 2°C. O fixador 3:1 foi trocado por três vezes sucessivas e as lâminas foram confeccionadas pela técnica de esmagamento.

Para o IM foi utilizadoorceína acética 2% na coloração das células. Foram analisadas 5 lâminas com cerca de 120 células por lâmina em cada população. O IM foi calculado de acordo com

Love (1949):  $IM = \text{número de tétrades normais} / \text{número total de tétrades} \times 100$ . As células mães de pólen (CMP) com quatro micrósporos foram consideradas tétrades normais e como anormais aquelas com números de micrósporos diferentes de quatro: díades, tríades, políades (Corrêa et al., 2005).

As médias do Índice Meiótico foram comparadas pelo teste Tukey com probabilidade  $\geq 5\%$  pelo programa Sisvar (Ferreira, 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células metafásicas, obtidas na região do meristema radicular de *Theobroma speciosum* (L.) Willd, nas sete populações, confirmam o resultado apresentado por Carlleto (1946), com  $2n = 20$  cromossomos (Figura 1). Outras espécies do gênero *Theobroma*, além de *T. speciosum*, segundo revisão de Cuatrecasas (1964), também apresentavam o número cromossômico diplóide de 20 cromossomos: *T. cacao*, *T. leiocarpa*, *T. pentagona*, *T. bicolor*, *T. microcarpum*, *T. simiarum*, *T. capilliferum*, *T. obovatum*, *T. cirmolinae*, *T. angustifolium* e *T. grandiflorum*. Posteriormente, Guerra, (1986<sub>b</sub>) e Santos (2002) confirmaram o mesmo complemento cromossômico para *T. grandiflorum*.

A morfometria dos cromossomos de *T. speciosum* mostrou que apenas os cromossomos 4 e 9 apresentaram IC menor do que 40,0, sendo respectivamente 39,29 e 34,55, conforme a Tabela 1. Desta maneira, os pares cromossômicos 4 e 9 são submetacêntricos e os demais pares são metacêntricos. *T. speciosum* apresenta fórmula cariotípica  $18 m + 2 sm$ , bastante diferente da constatada por Santos (2002) para *T. grandiflorum*, em que os pares 1 a 3 são metacêntricos, os pares 4 a 8 submetacêntricos, o par 9 subteloentrico e o par cromossômico 10 é acrocêntrico. Difere, também, do cariótipo de *T. cacao* que, segundo Davie (1933, citado por Cuatrecasas, 1964), possui poucos metacêntricos.

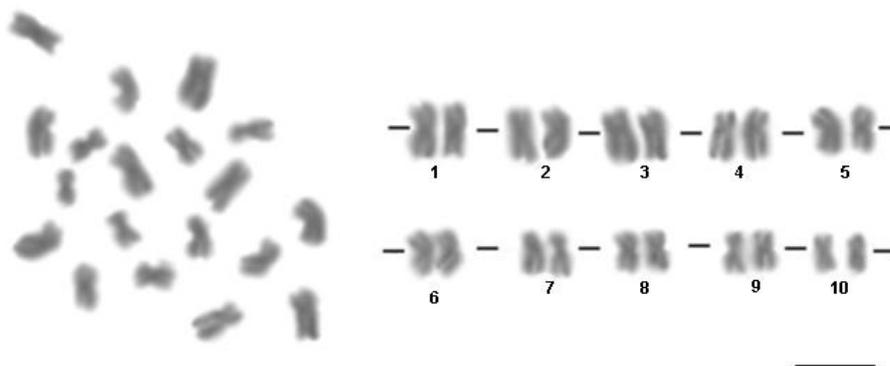


FIGURA 1. Metafase mitótica e cariótipo de *Theobroma speciosum* (L.) Willd (cromossomos de meristema radicular,  $2n = 20$ ). Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

TABELA 1. Medidas e morfologia dos cromossomos de *Theobroma speciosum* (L.) Willd, de acordo com a posição do centrômero.

Cromossomo	Comprimento Total (µm)	Braço (µm)		Razão entre Braços	Índice Centromérico (IC)	Morfologia Cromossômica
		Curto	Longo			
1	1,69	0,76	0,93	1,22	44,97	M
2	1,61	0,68	0,93	1,37	42,24	M
3	1,56	0,63	0,93	1,48	40,38	M
4	1,40	0,55	0,85	1,55	39,29	SM
5	1,35	0,55	0,80	1,45	40,74	M
6	1,27	0,59	0,68	1,15	46,46	M
7	1,27	0,55	0,72	1,31	43,31	M
8	1,23	0,55	0,68	1,24	44,72	M
9	1,10	0,38	0,72	1,89	34,55	SM
10	1,09	0,50	0,59	1,18	45,87	M

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

Os cromossomos de *T. speciosum* variaram de 1,69 µm a 1,09 µm de tamanho (Tabela 1). Cuatrecasas (1964), em sua extensa revisão sobre taxonomia do gênero *Theobroma*, cita que de doze espécies analisadas citogeneticamente até 1964, *T. cacao*, apresentou o par de cromossomos de maior tamanho (2,20 µm) e *T. grandiflorum*, o de menor comprimento (0,50 µm). Já, Santos (2002), encontrou cromossomos de 2,50 µm a 1,00 µm para *T. grandiflorum*.

Ao analisar o IM das populações de *T. speciosum*, somente foram observadas tríades e díades entre as CMP anormais. Somente ocorreram diferenças significativas entre as populações 2 e 3, mostrando desuniformidade entre estas populações quanto ao comportamento meiótico, sendo que, o IM foi próximo a 80% em todas populações (Tabela 2). Segundo Love (1949), uma planta para ser considerada com processo meiótico normal deve ter o IM acima de 85%. Caso ocorra a mesma irregularidade na megasporogênese, estas plantas provavelmente apresentarão problemas na formação de sementes e frutos viáveis.

TABELA 2. Índice meiótico (IM) das populações de *Theobroma speciosum* (L.) Willd, avaliado através do método de coloração de tétrades (T) com orceína acética 2%.

Populações de <i>Theobroma speciosum</i>	Pontos de coleta em Alta Floresta, MT	IM = n° T normais/n° T total x 100 (%)
Pop. 1	S 09° 51' 41''; W 056° 04' 31''	78,33 <sup>ab</sup>
Pop.2	S 09° 53' 23''; W 056°	76,33 <sup>c</sup>
Pop.3	S 09° 52' 31''; W 056°	79,33 <sup>a</sup>
Pop.4	S 09° 51' 29''; W 056°	77,67 <sup>ab</sup>
Pop.5	S 09° 52' 23''; W 056°	78,67 <sup>ab</sup>
Pop.6	S 09° 51' 25''; W 056° 04' 30''	78,67 <sup>ab</sup>
Pop.7	S 09° 54' 23''; W 056°	78,67 <sup>ab</sup>
		Valor de F 8,57*
		DMS (5%) 1,61

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. \* significativo pelo teste F a 5%. DMS: Diferença mínima significativa.

A determinação da viabilidade do pólen é fundamental na investigação das causas de infertilidade das plantas e dos problemas de fertilidade que possam ocorrer (Peñaloza, 1995). Não foi possível diferenciar a intina da exina com os três corantes utilizados: verde metila 1%, fucsina básica 1% e orceína acética 2%. A diferença observada entre os grãos de pólen foi somente quanto à intensidade de coloração. Nos três corantes, os grãos de pólen viáveis apresentaram uma coloração mais escura em relação aos inviáveis (Figura 2). A orceína acética 2%, foi a mais indicativa para estimar a viabilidade dos grãos de pólen do cacauí, pois permitiu distinguir com maior segurança os pólenes viáveis (Figura 2F) dos inviáveis (Figura 2E) pela maior intensidade de coloração.

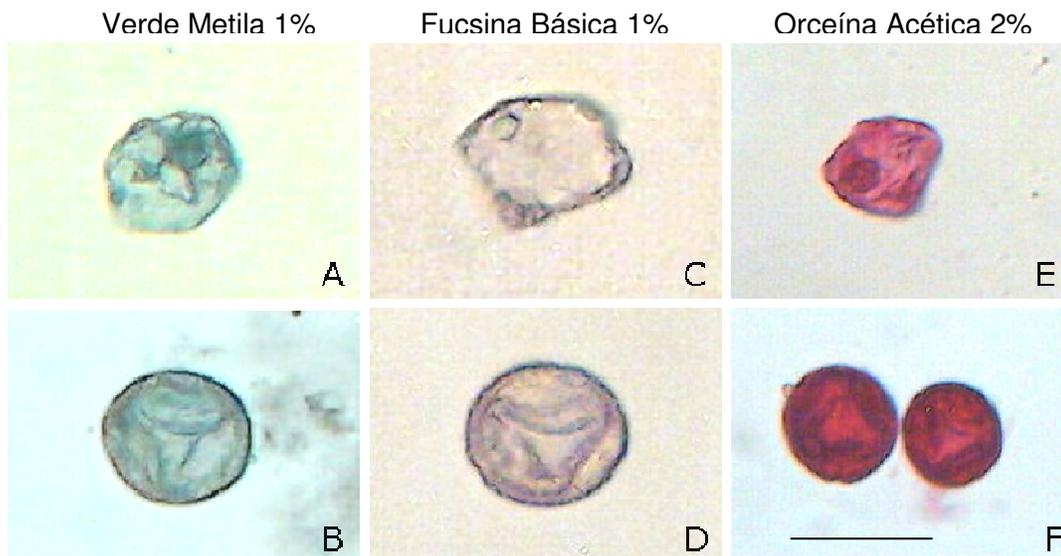


FIGURA 2. Grãos de pólen de cacauí (*Theobroma speciosum* (L.) Willd) com diferentes corantes. Pólenes colocados na linha superior (A, C e E), são pólenes inviáveis, com morfologia anômala. Pólenes colocados na linha inferior são pólenes viáveis (B, D e F). Barra = 10  $\mu$ m.

### CONCLUSÃO

O cacauí apresenta  $2n = 2x = 20$  cromossomos, com os pares 4 e 9 sendo submetacêntricos e os demais pares metacêntricos. Em todas as populações, o índice meiótico (IM) é próximo a 80%, variando de 79,33% a 76,33%. Entre os corantes utilizados para análise polínica, a orceína acética 2% é o mais indicado para estimar a viabilidade do pólen por diferenciar melhor os grãos de pólen viáveis dos inviáveis.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AULER, N.M.F.; BATTISTIN, A.; REIS, M.S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.2, p.55-63, 2006.

CARLLETO, G.M. O número de cromossomos em cacaueiros, **Boletim Técnico do Instituto de Cacao da Bahia**, Salvador, n.6, p.35-39, julho, 1946.

CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic & Histochemistry**, v.68, p.142-145, 1993.

CORRÊA, M.G.S; VIEGAS, J.; SILVA, J.B; AVILA, P.F.V; BUSATO, G.R.; LMES, J.S. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.19 n.2, p. 295-303, 2005.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United States National Herbarium**, Washington, v.35; n.6, p.379-614, 1964.

FERREIRA, D.F. **Programa Sisvar**. Programa 5.0. UFLA. 2003.

GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 4, p. 741-743, 1986<sub>a</sub>.

GUERRA, M.S. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. I. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.9, n.1, p.21-40, 1986<sub>b</sub>.

GUINET, P.H. **Advances in legume biology: struture evolution, and biology of pollen in Leguminosae**. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1989, 842p.

KARSBURG, I.V.; BATTISTIN, A. Estimativa da viabilidade do pólen com diferentes corantes, em cinco espécies de Urticaceae do Rio Grande do Sul. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.10, n.2, p.23-29, 2005.

LEVAN, A., FREDGA, A.; SANDERBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position in chromosome. **Hereditas**, Lund, Sweden, v.52, p.201–220, 1964.

LOVE, R.A. **Estudos citológicos preliminares de trigos Riograndenses**. Circular n. 74. Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1949, 14p.

MACHADO, G.M.E.; RETTO JUNIOR, A.S. Estudo preliminar sobre a biologia floral do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Shum) Ver. U. A. **Série Ciências Agrárias**, Évora, v.1, p.11-14, 1991.

MARUTANI, N.; SHEFFER, R.O.; KAMEMOTO, H. Cytological analysis of *Anthurium andraeanum* (Araceae) its related taxa and their hybrids. **American Journal of Botany**, Columbus, v.80, n.2, p.93-103, 1993.

PAGLIARINI, M.S. Citogenética aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos Melhoramento Plantas**, Rondonópolis: Pallotti, 2001, 872-910p.

PEDROSA, A., GITAÍ, J., SILVA, A.E.B., FELIX, L.P.; GUERRA, M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – V. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.13, n.1, p.49-60, 1999.

PEÑALOZA, A.D.P.S. Germinação de sementes de *Arachis pintoi* obtidas em condições distintas de multiplicação. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., Brasília, DF. **Anais...** Brasília: SBT, 1995. p.78-79.

SANTOS, O.C. **Caracterização Cromossômica do cupuaçu *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex. Spreng) Schum (*Sterculiaceae*) cultivado na Amazônia**. 2002. 64p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba.

SILVA, C.R.; VENTURIERI, G.A.; FIGUEIRA, A. Description of Amazonian *Theobroma* L. collections species identification and characterization of interspecific hybrids. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.18, n.2, p.333-341, 2004.

SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC, 1993, 391p.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2.ed. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, 2008, 674p.

★★★★★