

Notas Científicas

Número cromossômico e conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Amaranthus* (Amaranthaceae)

Carolina Queiroz Samartini⁽¹⁾, Luciane Vilela Resende⁽¹⁾, Vânia Helena Techio⁽²⁾, Guilherme Tomaz Braz⁽²⁾, Luis Felipe Lima e Silva⁽¹⁾ e Kátia Ferreira Marques de Resende⁽²⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras (Ufla), Departamento de Agricultura, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 372000-000 Lavras, MG, Brasil. E-mail: carolinasamartini@yahoo.com.br, luciane.vilela@dag.ufla.br, luisufla@hotmail.com ⁽²⁾Ufla, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 372000-000 Lavras, MG, Brasil. E-mail: vhtechio@gmail.com, guilbraz@hotmail.com, katia.ufla@gmail.com

Resumo – O objetivo deste trabalho foi determinar o número de cromossomos e o conteúdo de DNA nuclear em cinco espécies do gênero *Amaranthus*, de ocorrência comum no Brasil. Cromossomos metafásicos foram obtidos pela técnica de secagem à chama e corados com Giemsa 5%, e o conteúdo de DNA foi determinado por citometria de fluxo. Observou-se $2n=32$ cromossomos em *A. hybridus* e $2n=34$ nas demais espécies estudadas, o que é indicativo de ocorrência de disploidia descendente. O conteúdo de DNA nuclear variou de 1,28 a 1,79 pg, e *A. deflexus* apresentou o maior valor.

Termos para indexação: caruru, citogenética, disploidia, variabilidade genética.

Chromosome number and nuclear DNA content of species of the genus *Amaranthus* (Amaranthaceae)

Abstract – The objective of this work was to determine the chromosome number and nuclear DNA content of five species of the genus *Amaranthus*, which commonly occur in Brazil. Metaphase chromosomes were obtained through the flame drying technique and stained with 5% Giemsa, and DNA content was determined by flow cytometry. $2n=32$ chromosomes were observed in *A. hybridus* and $2n=34$ in the other studied species, indicating the occurrence of descendant dysploidy. The nuclear DNA content ranged from 1.28 to 1.79 pg, and *A. deflexus* had the highest value.

Index terms: caruru, cytogenetics, dysploidy, genetic variability.

Em torno de 60 espécies são classificadas botanicamente como *Amaranthus* (Tourn.) L., das quais 10 são de ocorrência comum nas lavouras brasileiras, onde são consideradas plantas invasoras com o nome comum de caruru. Essas espécies têm como centro de origem a América Tropical, mas são empregadas na alimentação humana e animal em várias partes do mundo (Kissman & Groth 1999, Carvalho et al. 2008). No Brasil, o consumo pela população se restringe a alguns grupos étnicos e a populações rurais, uma vez que essas plantas são tidas como hortaliças não convencionais, embora apresentem alto valor nutritivo, com destaque para proteínas, vitaminas e minerais (Amaya-Farfan et al., 2005).

A delimitação das espécies de *Amaranthus* é considerada taxonomicamente difícil, em razão das semelhanças morfológicas inter e intraespecíficas.

Além disso, a ocorrência de híbridos naturais e as variações cromossômicas tornam ainda mais complexo o processo de identificação (Jeschke et al., 2003). As contagens cromossômicas e a estimativa do conteúdo de DNA podem ser alternativas para auxiliar na discriminação das espécies; no entanto, ainda são escassos os trabalhos que analisam essas características (Pratt et al., 2008).

Em pesquisa realizada no Irã, com dez espécies de *Amaranthus*, Sheidai & Mohammadzadeh (2008) observaram variação no número de cromossomos entre as espécies, de $2n=32$ e $2n=34$, o que também foi constatado por Song et al. (2002), em pesquisa realizada na China, com 14 espécies do gênero.

A determinação do conteúdo de DNA, associada à contagem cromossômica, complementa as informações sobre as variações no genoma das espécies. Contudo,

em *Amaranthus*, poucas espécies têm o conteúdo de DNA determinado. Pratt et al. (2008), por exemplo, mensuraram o conteúdo de DNA por citometria de fluxo, em 12 espécies do gênero, e obtiveram valores que variaram de 0,89 pg, em *A. viridis*, a 2,73 pg, em *A. tricolor*.

O objetivo deste trabalho foi determinar o número de cromossomos e o conteúdo de DNA nuclear em cinco espécies do gênero *Amaranthus*, de ocorrência comum no Brasil.

Cinco espécies de *Amaranthus* foram avaliadas: *A. spinosus* L., *A. viridis* L., *A. deflexus* L., *A. retroflexus* L. e *A. hybridus* L. As plantas pertencem à coleção de germoplasma de hortaliças não convencionais, localizada na horta experimental da Universidade Federal de Lavras, no Município de Lavras, em Minas Gerais (21°14'S, 45°00'W, a 918 m de altitude).

Para a obtenção das metáfases mitóticas, foram utilizadas pontas de raízes, obtidas de sementes germinadas em câmara de germinação, a 28°C, e pré-tratadas com paradiclorobenzeno (PDB) por 3 horas e 15 min, a 20°C. Após o tratamento, as raízes foram fixadas em Carnoy (3 álcool etílico : 1 ácido acético) e mantidas a -20°C.

Realizou-se a excisão dos meristemas por meio da digestão enzimática em solução de pectinase/celulase (100/200 U, pH 7,5) e pectoliase 5%, na proporção 3:1, por 30 min, a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram preparadas pela técnica de secagem à chama (Dong et al., 2000) e coradas com Giemsa 5%. O número de cromossomos foi obtido pela contagem de dez metáfases de cada espécie analisada.

As imagens foram capturadas em microscópio de campo claro, Axio Lab.A1, equipado com microcâmera Axiocam Erc 5s (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha), e foram processadas no Adobe Photoshop CS3.

Para a determinação do conteúdo de DNA, foram analisadas três amostras de cada espécie de *Amaranthus*, com aproximadamente 20 mg de tecido foliar jovem e a mesma quantidade de tecido foliar jovem de *Pisum sativum* L., espécie usada como padrão interno de referência. As amostras foram fragmentadas em placa de Petri com 1 mL de tampão LB01 gelado, para obtenção da suspensão nuclear. À solução de núcleos interfásicos, obtida após filtragem, foram adicionados

25 µL de iodeto de propídeo (1 mg mL⁻¹) e 2,5 µL de RNase (50 µg mL⁻¹) (Dolezel, 1997).

No citômetro de fluxo BD FACS Calibur (BD Biosciences, São Paulo, SP), analisaram-se, pelo menos, 10.000 núcleos por amostra, o que permitiu a obtenção de histogramas pelo programa Cell Quest (BD Biosciences, São Paulo, SP), com posterior análise no programa WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA).

O conteúdo de DNA nuclear das amostras foi estimado pela comparação com a posição do pico G₀/G₁ do padrão interno de referência (*P. sativum*), com uso da relação $Q = (E/S) \times R$, em que Q é a quantidade de DNA da amostra (pg/2C); E é a posição do pico G₀/G₁ da amostra; S é a posição do pico G₀/G₁ do padrão de referência; e R é o conteúdo de DNA do padrão de referência (2C=9,09 pg).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste F, e as médias, quando significativas, foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Para as análises estatísticas, utilizou-se o programa Sisvar (Ferreira, 2011).

Os valores do conteúdo de DNA variaram de 1,28 pg, em *A. spinosus*, a 1,79 pg, em *A. deflexus* (Tabela 1), e não houve diferença significativa entre as espécies *A. spinosus*, *A. viridis*, *A. retroflexus* e *A. hybridus*. O maior conteúdo de DNA (1,79 pg) foi registrado em *A. deflexus*, tendo diferido do das demais espécies. A variação no conteúdo de DNA pode ser decorrente do maior acúmulo de DNA repetitivo (Mehrotra & Goyal, 2014) ou de regiões ou genes duplicados com maior quantidade de DNA. Os valores do coeficiente de variação (CV) das análises de citometria de fluxo foram inferiores a 5% e, portanto, são considerados

Tabela 1. Conteúdo de DNA nuclear e número cromossômico de cinco espécies de *Amaranthus*⁽¹⁾.

Nome científico	Conteúdo de DNA nuclear (pg)	Número de cromossomos (2n)	Coefficiente de variação (%)
<i>Amaranthus spinosus</i>	1,28b	34	0,88
<i>Amaranthus viridis</i>	1,38b	34	1,01
<i>Amaranthus deflexus</i>	1,79a	34	0,88
<i>Amaranthus retroflexus</i>	1,44b	34	1,07
<i>Amaranthus hybridus</i>	1,50b	32	0,93

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

confiáveis e difíceis de serem obtidos para algumas plantas (Dolezel & Bartos, 2005).

As estimativas do conteúdo de DNA nuclear nas espécies *A. viridis*, *A. retroflexus* e *A. spinosus* (Tabela 1) divergem das obtidas por Pratt et al. (2008), que foram de 0,89, 1,70 e 1,90 pg, respectivamente. Para a espécie *A. hybridus*, verificou-se, no presente trabalho, $2C=1,50$ pg, valor diferente do observado por Jeschke et al. (2003), que foi de $2C=1,04$ pg. Com relação à espécie *A. deflexus*, com $2C=1,79$ pg, não há relatos na literatura para fins de comparação. Além de serem influenciados pelas possíveis variações intraespecíficas no conteúdo de DNA nuclear nos vegetais, os métodos para a quantificação do genoma nuclear por citometria de fluxo também dependem de diversos outros fatores, como diferentes métodos e protocolos disponíveis para a obtenção e o isolamento dos núcleos celulares, equipamentos, programas e técnicas, bem como substâncias químicas utilizadas em todos os processos, como tampões, enzimas e corantes (Silva et al., 2014).

O número de cromossomos encontrado nas cinco espécies analisadas variou entre $2n=32$, em *A. hybridus*, e $2n=34$, em *A. spinosus*, *A. viridis*, *A. deflexus* e *A. retroflexus* (Tabela 1), o que caracterizou estas espécies como diploides. Entretanto, há relatos de espécies com $2n=28$, tais como *A. tenuifolius* Willd. (Pal et al., 2000) e *A. blitum* L. (Srivastava & Roy, 2014). A partir destes estudos, sugere-se que o gênero *Amaranthus* é tribásico ($x=14$, $x=16$ e $x=17$). Segundo Srivastava & Roy (2014), o número básico $x=14$ é um número secundário derivado de $x=16$ ou $x=17$, e esta alteração numérica deve ter ocorrido por displóidia.

A displóidia se caracteriza pela variação – aumento ou redução – no número cromossômico (Guerra, 2008). De acordo com este autor, em alguns casos, a displóidia é consequência da fissão ou da fusão cêntrica, também chamada de translocação robertsoniana. Em muitos outros gêneros, os mecanismos relacionados à displóidia não foram esclarecidos, ou porque as alterações estruturais subsequentes às fusões ou às fissões alteraram a posição relativa dos centrômeros, o que dificulta a evidência da translocação, ou porque outros rearranjos estruturais ocorreram (Guerra, 2008). Em *Amaranthus*, conforme Srivastava & Roy (2014), a redução por displóidia, a partir do maior número de cromossomos ($2n=34$), pode ser atribuída a repetidas manipulações cromossômicas durante as hibridações

entre raças, ou, ainda, estar associada à morfologia ou às condições ecológicas. Esses eventos podem estar correlacionados ao avanço filogenético da família Amaranthaceae.

Ao se comparar as espécies com $2n=34$, ou seja, *A. spinosus*, *A. viridis*, *A. deflexus* e *A. retroflexus*, observou-se que *A. deflexus* apresenta maior quantidade de DNA nuclear e difere estatisticamente das demais (Tabela 1 e Figura 1). Esta é uma evidência de que o número de cromossomos não tem relação direta com o conteúdo de DNA nuclear.

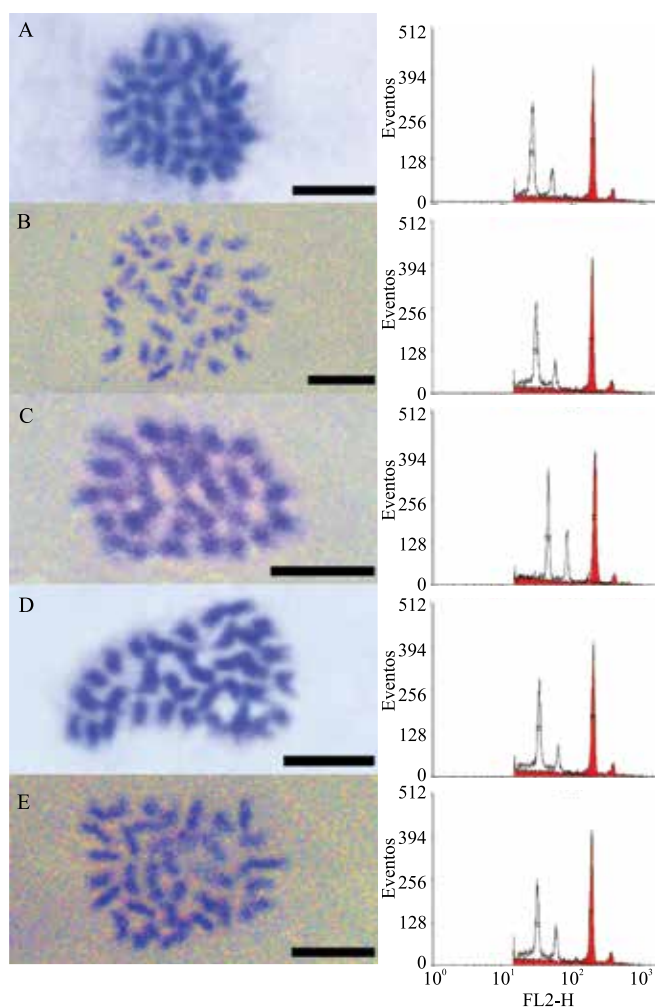


Figura 1. Pró-metáfases e metáfases mitóticas das espécies de *Amaranthus*, com respectivos histogramas que mostram a quantidade de DNA nuclear: picos brancos representam as espécies de *Amaranthus* e picos vermelhos, a espécie *Pisum sativum*. A, *Amaranthus spinosus*; B, *Amaranthus viridis*; C, *Amaranthus deflexus*; D, *Amaranthus retroflexus*, todas com $2n=2x=34$ cromossomos; e E, *Amaranthus hybridus*, com $2n=2x=32$. Barra igual a 5 μ m.

Os resultados obtidos contribuíram para o conhecimento do germoplasma e da diversidade genética/cromossômica existente em espécies de *Amaranthus* coletadas no Brasil. Essas informações são importantes para a conservação e para os programas de melhoramento genético de hortaliças não convencionais, ainda incipientes no País.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro.

Referências

- AMAYA-FARFAN, J.; MARCÍLIO, R.; SPEHAR, C.R. Deveria o Brasil investir em novos grãos para sua alimentação? A proposta do amaranto (*Amaranthus* sp.). **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.12, p.47-56, 2005.
- CARVALHO, S.J.P. de; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Crescimento e desenvolvimento de cinco espécies de plantas daninhas do gênero *Amaranthus*. **Bragantia**, v.67, p.317-326, 2008. DOI: 10.1590/S0006-87052008000200007.
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v.38, p.285-302, 1997.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v.95, p.99-110, 2005. DOI: 10.1093/aob/mci005.
- DONG, F.; SONG, J.; NAESS, S.K.; HELGESON, J.P.; GEBHARDT, C.; JIANG, J. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.1001-1007, 2000. DOI: 10.1007/s001220051573.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.
- GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytogenetics: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, v.120, p.339-350, 2008. DOI: 10.1159/000121083.
- JESCHKE, M.R.; TRANEL, P.J.; RAYBURN, A.L. DNA content analysis of smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) and tall waterhemp (*A. tuberculatus*): implications for hybrid detection. **Weed Science**, v.51, p.1-3, 2003. DOI: 10.1614/0043-1745(2003)051[0001:DCAOSP]2.0.CO;2.
- KISSMAN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Paulo: Basf, 1999. 798p.
- MEHROTRA, S.; GOYAL, V. Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v.12, p.164-171, 2014. DOI: 10.1016/j.gpb.2014.07.003.
- PAL, M.; OHRI, D.; SUBRAHMANYAM, G.V. A new basic chromosome number for *Amaranthus* (Amaranthaceae). **Cytologia**, v.65, p.13-16, 2000. DOI: 10.1508/cytologia.65.13.
- PRATT, D.B.; JHANGIANI, S.N.; WIGGERS, R.J. 2C DNA content values in *Amaranthus* (Amaranthaceae). **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, v.2, p.1219-1223, 2008.
- SHEIDAI, M.; MOHAMMADZADEH, Z. Cytogenetic study of *Amaranthus* L. species in Iran. **Cytologia**, v.73, p.1-7, 2008. DOI: 10.1508/cytologia.73.1.
- SILVA, R.A.L.; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M.; OLIVEIRA, A.C.L. de; RODRIGUES, F.A.; SILVA, S. de O. e. An assessment of software for flow cytometry analysis in banana plants. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, p.775-780, 2014. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n2p775.
- SONG, B.-H.; ZHANG, X.-J.; LI, F.-Z.; WAN, P. Chromosome numbers of 14 species in *Amaranthus* from China. **Acta Phytotaxonomica Sinica**, v.40, p.428-432, 2002.
- SRIVASTAVA, R.; ROY, B.K. A new chromosome number for *Amaranthus blitum*. **Journal on New Biological Reports**, v.3, p.111-114, 2014.

Recebido em 19 de janeiro de 2016 e aprovado em 31 de maio de 2016