



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**THOMAZIA DE OLIVEIRA EMILIANO**

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE MÉTODOS DE BANDEAMENTO  
CROMOSSÔMICO EM ESPÉCIES DE *Aristolochia* SEÇÃO *Gymnolobus*  
(ARISTOLOCHIACEAE)**

**AREIA  
2024**

**THOMAZIA DE OLIVEIRA EMILIANO**

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE MÉTODOS DE BANDEAMENTO  
CROMOSSÔMICO EM ESPÉCIES DE *Aristolochia* SEÇÃO *Gymnolobus*  
(ARISTOLOCHIACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação do Curso de Agronomia, do  
Centro de Ciências Agrárias, da Universidade  
Federal da Paraíba, em cumprimento às  
exigências para obtenção do título de  
Engenheira Agrônoma.

**Orientador:** Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix.

**Coorientadora:** Dra. Rosemere dos Santos  
Silva

**AREIA  
2024**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

E53a Emiliano, Thomazia de Oliveira.  
Análise comparativa entre métodos de bandeamento cromossômico em espécies de Aristolochia Seção Gymnolobus (Aristolochiaceae) / Thomazia de Oliveira Emiliano. - Areia, 2024.  
37 f. : il.

Orientação: Leonardo Pessoa Felix.  
Coorientação: Rosemere dos Santos Silva.  
TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Agronomia. 2. Bandeamento-C. 3. heterocromatina constitutiva. 4. fluorocromos CMA/DAPI. 5. marcadores cromossômicos. I. Felix, Leonardo Pessoa. II. Silva, Rosemere dos Santos. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 631/635 (02)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COORDENAÇÃO DE AGRONOMIA  
CAMPUS II – AREIA - PB**

## **DEFESA DO TRABALHO DE GRADUAÇÃO**

Aprovada em 15/05/2024.

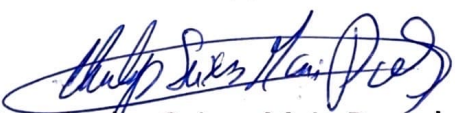
**“ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE MÉTODOS DE  
BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO EM ESPÉCIES DE  
*Aristolochia* SEÇÃO *Gymnolobus* (ARISTOLOCHIACEAE)”**

Autor: Thomazia de Oliveira Emiliano

Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix  
Orientador(a) – UFPB

  
Dr. Felipe Nollet Medeiros de Assis  
Examinador(a) – UFRPE

  
Dr. Charlys Seixas Maia Dornelas  
Examinador(a) – UFPB

A Maria Lucia Galdino Oliveira, minha mãe, que a força e determinação através da luta por seus objetivos, faz com que alcances lugares inimagináveis. A Thomaz Emiliano Cavalcante, meu pai, por mostrar que a agricultura transforma e prolonga a vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradecer a Deus, sem ele não poderia ter chegado até aqui.

À minha família, em especial: aos meus pais, Thomaz Emiliano e Maria Lucia Galdino, a meu irmão, Thomaz Emiliano Filho, a Maria de Lourdes, que sempre esteve ao meu lado, assim como meus pais, apoiando-me no que precisasse, o meu tio, Petrônio Thomaz, e ao tio de consideração, Winston Pessoa Félix, sem vocês tudo teria sido mais difícil.

Ao meu orientador, Prof. Leonardo Pessoa Felix, por toda a paciência, compreensão e conhecimento compartilhado, e por ser inspiração na forma de ensinar e viver.

A Rosemere Silva, Técnica responsável do Laboratório de Citogenética Vegetal, por todo o conhecimento e experiência transpassados. A Felipe Nollet, pelo auxílio ao longo do trabalho realizado.

Aos amigos, Yasmin Rosa, Aline Honório, Ítalo, Jaime, Everton, Cadu, Kaillany, Thaís, Sara Maria, Aldayane, Eduardo, por contribuírem em fases distintas ao longo do curso, mas de suma importância para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao grupo Vingadores – Ultimate, composto por Emanuelle Alícia e Jardel Souza, por sempre acreditarem na verdade, e pelo sentimento de justiça.

As professoras e professores, que contribuíram para minha formação até aqui, por todo o aprendizado e por serem grandes inspirações docentes.

Ao sr. Assis, responsável pela Vila Acadêmica, por sempre nos auxiliar e cuidar de nós como filhos.

A toda equipe do Centro de Assistência Médica, Psicológica e Social, foram parte crucial para a finalização do meu curso.

A Gestão Ocupa DCE, do Diretório Central dos Estudantes-UFPB, nas pessoas de Josielma Leal e Suédson Magno, por todo o trabalho junto, e por cada lição aprendida.

A minha gata, Júpiter, por ser minha companheira de vida desde o início da graduação, e por compartilhar os momentos felizes e tristes ao meu lado.

A equipe de Segurança da UFPB, por todo o apoio e acolhimento durante meses de conturbação.

Aos que não mencionei, resta minhas sinceras desculpas, mas a participação de cada um colaborou para a lapidação do que me tornei.

“Os nossos filhos são do que nós fomos  
Real semelhança  
Que todo adulto traz dentro de si  
Um sonho de criança” Os Nonatos

## RESUMO

A família Aristolochiaceae abrange cerca de oito gêneros e 620 espécies, predominantemente encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, o gênero *Aristolochia* é o único reconhecido, com 83 espécies, das quais 37 são endêmicas. O número cromossômico básico mais provável para *Aristolochia* é  $x = 7$ , com uma ampla variação numérica, incluindo  $2n = 6, 8, 10, 12, 14, 24, 26, 28, 32$  e  $36$ . Esta pesquisa teve como objetivo caracterizar os cariótipos de duas espécies de *Aristolochia* ocorrentes na região Nordeste do Brasil, por meio da comparação do método de bandeamento com a dupla coloração com fluorocromos CMA/DAPI e o bandeamento-C. Para a análise cromossômica, as pontas das raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina a  $10^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, fixadas em Carnoy e as lâminas preparadas por digestão enzimática, pelo método de esmagamento em ácido acético a 60%. As lâminas foram então coradas com fluorocromos CMA/DAPI e posteriormente submetidas ao bandeamento-C e coradas com DAPI. As melhores células foram fotografadas em Fotomicroscópio de epifluorescência Zeiss equipado com câmera de vídeo AxioCam MRC5 com o auxílio do software Axiovision 4.8. *Aristolochia gigantea* e *Aristolochia trilobata* apresentaram  $2n = 14$ , com cariótipos ligeiramente assimétricos, compostos principalmente por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, além de um par de acrocêntricos. A análise pela coloração direta revelou a ocorrência de um par de bandas terminais  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$  em ambas as espécies, e duas bandas proximais  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^0$  em *A. gigantea*. Por outro lado, o bandeamento-C revelou 12 bandas DAPI pericentroméricas em *A. gigantea* e 14 em *A. trilobata*. Embora o gênero *Aristolochia* seja conhecido pela elevada variabilidade cariotípica, a seção *Gymnolobus* apresenta características relativamente estáveis, como o número cromossômico  $2n = 14$  e a presença de um par cromossômico maior com banda CMA terminal na maioria das espécies. Nossos dados sugerem que as bandas C são marcadores cromossômicos úteis para a identificação dos cromossomos homólogos na seção, além de revelar a ocorrência de bandas DAPI pericentroméricas que não foram detectadas por meio da coloração direta com os fluorocromos CMA e DAPI.

**Palavras-Chave:** bandeamento-C; heterocromatina constitutiva; fluorocromos CMA/DAPI; marcadores cromossômicos.

## ABSTRACT

The family Aristolochiaceae comprises about eight genera and 620 species, predominantly found in tropical and subtropical regions worldwide. In Brazil, the genus *Aristolochia* is the only one recognized, with 83 species, of which 37 are endemic. The most likely basic chromosome number for *Aristolochia* is  $x = 7$ , with a wide range of chromosome number variation recorded, including  $2n = 6, 8, 10, 12, 14, 24, 26, 28, 32,$  and  $36$ . This research aimed to characterize the karyotypes of two species of *Aristolochia* occurring in the Northeast region of Brazil, through a comparison of banding methods using double staining with fluorochromes CMA/DAPI and C-banding technique. For chromosome analysis, root tips were pre-treated with 8-hydroxyquinoline at  $10^{\circ}\text{C}$  for 24 hours, fixed in Carnoy solution, and slides prepared by enzymatic digestion using the squashing method with 60% acetic acid. Slides were then stained with fluorochromes CMA/DAPI and subsequently subjected to C-banding. The best cells were Zeiss epifluorescence photomicroscope equipped with AxioCam MRC5 video camera with the aid of Axiovision 4.8 software. *Aristolochia gigantea* and *Aristolochia triloba* exhibited  $2n = 14$  chromosomes, with slightly asymmetrical karyotypes, mainly composed by metacentric and submetacentric chromosomes, along with a pair of acrocentrics. Our analysis revealed the occurrence of a pair of terminal  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$  bands in both species and two proximal  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^0$  bands in *A. gigantea*. Conversely, C-banding revealed 12 pericentromeric bands in *A. gigantea* and 14 in *A. trilobata*. The genus *Aristolochia* is known for its high karyotypic variability. However, the *Gymnolobus* section presents relatively stable characteristics, such as the chromosome number  $2n = 14$  and the presence of a larger chromosome pair in most species. Our data suggest that C-bands are useful chromosome markers for identifying homologous chromosomes in the section. C-banding revealed the occurrence of pericentromeric constitutive heterochromatin that were not detected by double staining with fluorochromes CMA and DAPI.

**Keywords:** C-banding; constitutive heterochromatin; fluorochromes CMA/DAPI; chromosome markers.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Flor em antese de *Aristolochia gigantea* ..... 20
- Figura 2 – Flor em antese de *Aristolochia trilobata* ..... 21
- Figura 3 – Células mitóticas de espécies pertencentes ao gênero *Aristolochia* com  $2n = 14$ , coradas com CMA (A, B), DAPI (C, D), sobreposição das imagens (E, F) e bandeamento C corado com DAPI (G, H). A, C, E, G: *Aristolochia gigantea*. B, D, F, H: *Aristolochia trilobata*. Setas brancas em G indicam cromossomos sem bandas C. Barra em H corresponde a 10  $\mu\text{m}$ ..... 29
- Figura 4 – Ideogramas de *Aristolochia gigantea* e *Aristolochia trilobata*. Os cromossomos estão organizados em ordem decrescente de tamanho e alinhados pelo centrômero. As bandas CMA+/DAPI- estão representadas em amarelo, enquanto as bandas C em azul. Uma escala em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) é fornecida a esquerda. A morfologia cromossômica encontra-se abaixo de cada cromossomo, representando a fórmula cariotípica (FC): MC = metacêntrico; SM = submetacêntrico; AC = acrocêntrico..... 30

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Espécies do gênero *Aristolochia* com números cromossômicos registrados na literatura..... 23
- Tabela 2 – Espécies de *Aristolochia* analisadas por meio da dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, bem como por bandeamento C. As espécies são apresentadas juntamente com seus respectivos vouchers, locais de coleta, números cromossômicos diploides ( $2n$ ), tamanho cromossômico (em micrômetros), fórmula cariotípica e bandas heterocromáticas..... 31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Acrocêntrico
AT	Adenina/Timina
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CMA	Cromomicina A <sub>3</sub>
Cm	Centímetros
DAPI	4',6-diamidino – 2 – fenilindol
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DNA <sub>r</sub>	Ácido Desoxiribonucléico ribossomal
EAN	Escola de Agronomia do Nordeste
FC	Fórmula Cariotípica
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescência
GC	Guanina/Citosina
HC	Heterocromatina Constitutiva
HF	Heterocromatina Facultativa
MC	Metacêntrico
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimoll
RONs	Regiões Organizadoras de Núcleo
SM	Submetacêntrico
SSC	Citrato Salino-Sódico
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
USA	Estados Unidos da América
µg	Micrograma
µm	Micrômetro

## LISTA DE SÍMBOLOS

- ® Marca registrada
- % Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	FAMÍLIA ARISTOLOCHIACEAE JUSS. E O GÊNERO <i>Aristolochia</i> .....	16
2.2	ESPÉCIE <i>Aristolochia gigantea</i> .....	17
2.3	ESPÉCIE <i>Aristolochia trilobata</i> .....	19
2.4	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA .....	20
2.5	CITOGENÉTICA DO GÊNERO .....	20
2.6	BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO .....	22
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	24
3.1	MATERIAL VEGETAL .....	24
3.2	PREPARO DAS LÂMINAS .....	24
3.3	DUPLA COLORAÇÃO COM OS FLUOROCROMOS CMA/DAPI .....	24
3.4	BANDEAMENTO C .....	25
3.5	CARACTERIZAÇÃO CARIOMORFOLÓGICA .....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	26
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	32
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33

## 1 INTRODUÇÃO

A família Aristolochiaceae compreende aproximadamente oito gêneros e 620 espécies de distribuição principalmente pantropical. A família está inserida na ordem Piperales, juntamente com as famílias Saururaceae e Piperaceae (APG IV, 2016). Os gêneros *Aristolochia* L., *Asarum* L., *Saruma* Oliv. e *Thottea* Rottb. apresentam maior riqueza de espécies, embora, *Aristolochia* seja de longe o mais representativo da família, com um total de 550 espécies conhecidas (González, 2012; The Plant List, 2024).

No Brasil, é reconhecido um único gênero, *Aristolochia*, com 83 espécies, das quais 37 são consideradas endêmicas. Algumas espécies se destacam por apresentar características bastante peculiares, como *Aristolochia gigantea* Mart. & Zucc., que possui flores grandes com simetria irregular, reconhecidas como uma das maiores do mundo, podendo atingir 35 centímetros no seu maior diâmetro (Sousa, 2011). Além disso, as flores possuem um método de atração dos polinizadores por meio do odor semelhante a esterco ou carne em putrefação, atraindo principalmente moscas (Hipólito *et al.*, 2012). *A. gigantea* possui distribuição ao longo dos estados de Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, com incidência na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Sousa, 2011; Fernandes *et al.*, 2021; Freitas *et al.*, 2024).

A espécie *Aristolochia trilobata* L. também apresenta flores assimétricas e de morfologia peculiar, além de ser popularmente conhecida como jarrinha-de-cauda, jarrinha-da-praia, cipó-de-cobra, cipó-milhomens-da-praia e milhomes (Freitas *et al.*, 2024). Possui relatos de utilização como bactericida, anti-inflamatória, anti-tripanosomal e antitumoral, devido à presença de compostos como aporfinas, amidas, quinolinas, lignanas, flavonoides e terpenoides (Santos *et al.*, 2014). É encontrada na América Central e do Sul, sendo usada na medicina tradicional para tratar humanos e animais, incluindo o uso no tratamento de picadas de cobras e escorpiões, problemas estomacais, diabetes e facilitação de aborto e remoção de placenta (Lans *et al.*, 2001; Heinrich *et al.*, 2009). No Brasil, possui ocorrências em quase todas as regiões do país, com exceção do Centro-Oeste, além de ser encontrada na Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica (Freitas *et al.*, 2024).

Citogeneticamente, os números cromossômicos são conhecidos para 61 espécies de *Aristocochia* (Rice *et al.*, 2015), representando apenas 11% das espécies do gênero. O número cromossômico é uma característica valiosa para a caracterização dos clados em *Aristolochia*, com  $2n = 6, 12, 14, 16$  para as espécies dos subgêneros *Aristolochia* e *Pararistolochia*, enquanto todas as espécies dos subgêneros *Isotrema* e *Endodeca* possuem  $2n = 32$  (Gonzalez, 1999; Sugawara *et al.*, 2001; Ohi-Toma *et al.*, 2006). De acordo com Grant (1982), o número básico

mais provável em *Aristolochia* é  $x = 7$ , e a variação no número cromossômico registrada para o gênero é bastante ampla, com  $2n = 6, 8, 10, 12, 14, 24, 26, 28, 32$  e  $36$  (Ohi-Toma *et al.*, 2006). Apesar da importância para o gênero, outras informações citogenéticas, como variação da heterocromatina e bandeamento, são escassas na literatura, o que dificulta o entendimento sobre a diversificação do grupo.

A heterocromatina é uma região do genoma caracterizada por apresentar uma compactação mais densa e uma atividade gênica reduzida em comparação com a eucromatina (Grewal & Jia, 2007). Ela pode ser dividida em dois tipos principais: heterocromatina constitutiva (HC) e heterocromatina facultativa (HF). A HC é composta por sequências repetitivas de DNA altamente condensadas, geralmente não codificantes, preferencialmente localizadas na região pericentromérica, mas também observadas nos terminais e regiões intersticiais do cromossomo (Guerra, 1998). O outro tipo, a HF, refere-se a regiões do genoma no núcleo de uma célula eucariótica que podem ser heterocromáticas ou eucromáticas em diferentes contextos locais ou temporais (Trojer & Reinberg, 2007). Muitas vezes, espécies próximas apresentam padrões de bandas heterocromáticas distintos, o que torna a HC de relevante importância para caracterização citogenética e avaliação de parâmetros evolutivos (Silva, 2014).

Atualmente, a técnica mais amplamente empregada na caracterização da HC em plantas utiliza a dupla coloração com os fluorocromos 4',6-diamidino - 2 - fenilindol (DAPI) e Cromomicina A3 (CMA) (Heitkam & Garcia, 2023). O DAPI cora mais intensamente a HC rica em pares de bases AT, enquanto o CMA cora diferenciadamente a HC rica em GC (Barros e Silva & Guerra, 2010). Como resultado, obtém-se a formação de bandas nas regiões heterocromáticas, possibilitando a diferenciação longitudinal dos cromossomos.

O bandeamento com CMA e DAPI pode revelar variações na composição genômica entre espécies relacionadas, podendo gerar marcadores cromossômicos úteis para a identificação de cromossomos homólogos (Guerra *et al.*, 2020). Além disso, a técnica pode ser aplicada como ferramenta citotaxonômica para a delimitação de espécies (Almeida *et al.*, 2016), bem como auxiliar no entendimento da evolução cromossômica em grupos de plantas filogeneticamente relacionadas (Nollet *et al.*, 2022).

Após a aplicação da técnica de bandeamento com fluorocromos CMA e DAPI, alguns autores têm mencionado certas regiões cromossômicas como 'mais fortemente coradas', sem especificá-las como bandas de heterocromatina (Oliveira *et al.*, 2015; Dornelas *et al.*, 2023). Já foi demonstrado o aparecimento de bandas DAPI após bandeamento C e hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que não tinham sido visualizadas após bandeamento CMA/DAPI (Barros e Silva & Guerra, 2010). Esses dados indicam que algumas regiões de HC podem não ser

detectadas com os fluorocromos CMA/DAPI, resultando em uma caracterização parcial da HC. Para superar essa limitação, a técnica de bandeamento C pode ser empregada sequencialmente ao bandeamento CMA/DAPI. O bandeamento C com o corante Giemsa foi amplamente utilizado na citogenética vegetal até a década de 1990 por ser a mais eficiente em caracterizar todos os tipos de HC (Fregonezi *et al.* 2006). Além disso, o bandeamento C com Giemsa apresenta diversas vantagens, como o baixo custo, alta reprodutibilidade e à dispensa do uso de microscópios de epifluorescência.

Esse método envolve a remoção da eucromatina por meio de tratamentos salinos, como hidróxido de bário e SSC, resultando na coloração seletiva das regiões ricas em HC nos cromossomos (Guerra & Souza, 2000; Heitkam & Garcia, 2023). Uma versão mais moderna da técnica permite a coloração das bandas C com DAPI, que cora as bandas C de forma semelhante ao Giemsa, sem distinguir sua composição de bases (Barros e Silva & Guerra, 2010). A combinação dessas técnicas pode proporcionar uma caracterização mais completa da HC em plantas, especialmente em grupos com cromossomos pequenos, cuja morfologia é de difícil visualização, como no caso de *Aristolochia*.

O objetivo deste estudo foi caracterizar os cariótipos de duas espécies de *Aristolochia* ocorrentes na região Nordeste do Brasil, por meio de uma análise comparativa entre os métodos da coloração direta com os fluorocromos CMA/DAPI e bandeamento-C seguido da coloração DAPI.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FAMÍLIA ARISTOLOCHIACEAE JUSS. E O GÊNERO *Aristolochia*

A família Aristolochiaceae Juss. com cerca de 600 espécies, pertence a ordem Piperales, contendo duas subfamílias, a Asaroideae e Aristolochioideae. A subfamília Asaroideae, é composta pelos gêneros *Asarum* L. e *Saruma* Oliv., enquanto a subfamília Aristolochioideae é formada pelos gêneros *Aristolochia* L. e *Thottea* Rottb. O gênero *Aristolochia* L. possui o maior número de espécies, com cerca de 550 espécies identificadas ao redor do mundo (Freitas *et al.*, 2024).

Desde a Antiguidade, espécies da família Aristolochiaceae eram utilizadas para fins medicinais, o que influenciou na etimologia para o nome do gênero tipo da família. O nome do gênero, *Aristolochia*, por exemplo, deriva das palavras gregas “aristos”, que significa “melhor”, e “lochios”, definido como “descarga uterina pós-parto” ou “expulsão da placenta”, pois eram utilizadas com a finalidade de provocar a expulsão da placenta no pós-parto (Fernandez *et al.*, 2019).

Os primeiros registros fósseis de *Aristolochia* datam do cretáceo superior (105 a 66 milhões de anos) para o Estado de Nebraska, USA, embora o registro fóssil mais aceito para o gênero seja bem mais recente, entre 11,6 e 5,3 milhões de anos, descrito como *Aristolochia austriaca* B.Meller para a Áustria, país ao qual o epíteto é dedicado (Meller, 2014).

O gênero *Aristolochia* possui hábito de crescimento variável, podendo ser arbustivo, subarbustivo, trepador ou liânico. Possui raízes espessadas, caule tenros ou suberificados na maturidade, com folhas simples, alternas, comumente pecioladas, lobadas ou inteiras. Apresenta flores monoclamídeas, raramente diclamídeas, axilares, ou caulifloras em algumas espécies, trímeras solitárias ou em reunidas em inflorescências. O perigônio pode ser reto, curvo, fortemente zigomorfo, mais raramente zigomorfo, em formação composta por utrículo, tubo e limbo, este último uni, bilabiado ou trilobado. Seu fruto é uma cápsula sepsida, deiscente pela base, com morfologia variada entre cilíndrica, fusiforme ou subglobulosa, com grande número de sementes, geralmente aladas, planas ou ovoides (Freitas *et al.*, 2024).

O uso de *Aristolochia* para preparados de garrafadas, com a finalidade de utilizar suas propriedades medicinais ainda é relativamente comum, sendo várias espécies amplamente utilizadas na Ásia, Europa e Américas, embora sua utilização seja recomendada com cautela por haver a coleção do seu excesso de espécies de *Aristolochia* com a incidência de nefropatias (Heinrich *et al.*, 2009). Por se tratar, em sua maioria, de plantas trepadeiras, seus caules, depois de descascados, possuíam inúmeras utilizações, até na construção civil, como

corrimãos para pontes, amarração ou ligação de postes, e até de vigas para sustentação de cabanas, construídas por povos indígenas no Peru (Ruiz, 1805).

O mecanismo de polinização deste gênero, em sua maioria, consiste no aprisionamento de seus polinizadores, no primeiro dia de abertura da flor, atraídos pelo odor, onde ficam presos no tubo, e impedidos de sair pela ação das papilas presentes em seu interior, mesmo local onde o néctar é secretado. No segundo dia, não há emissão de odor, e os estigmas impedem o recebimento de pólen, pois ficam unidos, na sequência, as anteras são abertas e liberam o pólen, junto com os insetos que ficaram aprisionados na armadilha (Proctor *et al.* 1996).

## 2.2 ESPÉCIE *Aristolochia gigantea*

O táxon *A. gigantea* é uma planta trepadeira, com caule suberoso, ramos sulcado-estirados, variando de 8,5 a 15,5 cm de comprimento dos entrenós, apresenta pseudoestípulas estreito-ovais, com 1,8-2,2 x 0,8-2,2 cm, pecíolo glabro com 5,4 a 7,1 cm de comprimento. Suas folhas possuem lâmina oval, com variação entre 8,2-11,3 x 7,5-10 cm, com face adaxial e abaxial glabras, base cordada, ápice agudo a levemente acuminado, com venação primária basal, não peltada (Freitas *et al.*, 2024).

Suas flores, não são subtendidas por brácteas, pedúnculo e ovário de 21,5–28,5 cm de comprimento, com perianto glabro, de coloração bege e manchas vináceas, seu utrículo é amplamente obovado, 7,3–8,3 x 4,7–5 cm, de base estreita, abrigando o ginostêmio estipitado, glauco. O limbo é unilabiado, ovalado, com variação de 28–29 x 22–24 cm, plano, com coloração amarelada próximo à entrada do tubo e bege com manchas vináceas no restante, margem não fimbriada levemente revoluta, base cordada, peltada, seu ápice é arredondado, terminando num curto acúmen (Figura 1). Apresenta gimnostêmio estipitado, anteras lineares, cápsula estreito-cilíndrica, com veia média do mericarpo proeminente, de 3 mm de espessura, rostrada. As sementes são ovais, planas com rafe não proeminente, não aladas (Freitas *et al.*, 2024).

Suas flores apresentam um mecanismo adaptado para atração dos polinizadores, entomófilos em sua maioria, exalando um odor desagradável. Contudo, observou-se que indivíduos desta espécie com ocorrência na Caatinga, possuíam forte odor de carne em putrefação, mas quando cultivadas em São Paulo, exalavam odor semelhante ao de erva-cidreira (Capellari-Júnior, 1999). Também se conhecem registros de um forte odor adocicado, próximo ao de frutas em decomposição, mas não sendo tão insuportável como descrito comumente para flores desse gênero (Costa & Hime, 1981).

Apesar do mecanismo de polinização comum para o gênero *Aristolochia*, as flores de *A. gigantea* não apresentam aprisionamento dos polinizadores tão eficaz, sendo muitos deles libertos ainda no primeiro dia da antese. Além disso, foram encontrados indivíduos das Ordens Diptera, Hemiptera, Coleoptera, Hymenoptera e Araneae. Destes, a ordem Diptera apresentou maior representatividade, com mais de 80% presentes nas flores coletadas (Sousa, 2011).

**Figura 1.** Flor em antese de *Aristolochia gigantea*.



**Fonte.** Arquivo pessoal, 2024.

### 2.3 ESPÉCIE *Aristolochia trilobata*

*Aristolochia trilobata* é uma planta trepadeiras, com caule suberoso não presente, possui amos cilíndricos, e entrenós variando entre 5,6 e 18 cm de comprimento. Há presença de pseudoestípulas, orbiculadas, papiráceas, com pecíolo podendo medir entre 3,4–6,5 cm de comprimento, e é glabro. Suas folhas possuem lâmina profundamente trilobada, com dimensões que variam entre 5,3–14 × 6–13,5 cm, é cartácea, com face abaxial glabra e face adaxial pubescente, sua base é levemente cordada, não peltada, com lobo mediano oblongo a levemente rombóide, e ápice acuminado a arredondado, seus lobos laterais são elípticos a oblongos, com ápice obtuso a arredondado e venação primária basal (Freitas *et al.*, 2024).

Suas flores não são subtendidas por brácteas, apresentam pedúnculo e ovário com cerca de 3,9–7,9 cm de comprimento. O perianto é glabro, bege com estrias vermelho-claras, seu utrículo é amplamente obovado, com 6 prolongamentos na base, possui tubo uniforme, limbo unilabiado, filiforme com duas expansões subcordadas na base, é plano a levemente convexo,

com coloração vermelho escuro, glabro, sua base é subcordada, não peltada, com margem levemente revoluta, ápice agudo, e acúmen ausente (Figura 2). Possui ginostêmio estipitado, anteras lineares, cápsula estreito-cilíndrica, com veia média do mericarpo proeminente e rostrada. As sementes são amplamente ovais, planas, com face adaxial levemente verrucosa e face abaxial lisa, não são aladas, e não possuem rafe não proeminente (Freitas *et al.*, 2024).

A composição química presente nas folhas, tubérculos e raízes de *A. trilobata* são comumente utilizadas por suas propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, até no combate da atividade de fosfolipases presentes em veneno de cobra (Honychurch, 1986; Mors *et al.*, 2000; Ruffa *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004; Lans, 2007). Também há relatos de testes promissores contra bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e fungos. Já em insetos, seus compostos majoritários, na forma de óleo essencial apresentaram atividade eficiente e rápida nas espécies de formigas *Atta sexdens* e *Acromyrmex balzani*, porém, a mistura secundária destes compostos apresentou ação aditiva e sinérgica nas espécies de formigas citadas (Camporese *et al.*, 2003; Fenner *et al.*, 2006; Oliveira, 2014).

**Figura 2.** Flor em antese de *Aristolochia trilobata*



**Fonte:** Arquivo pessoal, 2024.

## 2.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

As plantas da família Aristolochiaceae são cultivadas com diversos fins por praticamente todo os continentes, desde regiões tropicais até temperadas (Fernandes *et al.*, 2021). No Brasil, ocorre apenas o gênero *Aristolochia*, com registro para todas as regiões do país. A maior riqueza em espécies é registrada para a região Sudeste, com cerca de 49 espécies,

embora também seja reportado para os demais estados do país. Na Região Nordeste, são referidas 29 espécies, com maior riqueza no estado da Bahia, com 22 espécies (Freitas & Alves-Araújo, 2017).

Apresentam uma grande adaptação aos diversos climas e fitofisionomias encontrados em território nacional, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa, que possuem tipos de vegetação que abrangem desde a Caatinga, Campo Limpo, Floresta Ciliar, Cerrado, até áreas de Floresta Ombrófila, Savana Amazônica, Restinga e vegetações sobre afloramentos rochosos (Freitas, Lírio & González, 2014). *A. gigantea* tem ocorrências confirmadas nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo, sendo uma planta endêmica do Brasil, ocorrendo na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. *A. trilobata* pode ser encontrada nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina São Paulo e Sergipe (Freitas *et al.*, 2024).

## 2.5 CITOGENÉTICA DO GÊNERO *Aristolochia*

-O número básico para *Aristolochia* é  $x = 7$ , havendo variação no número cromossômico, com registros de  $2n = 6, 8, 10, 12, 14, 20, 24, 26, 28, 32$  e  $36$  (Grant, 1982; Sarma & Tanti, 2015). Espécies do gênero *Aristolochia* possuem cariótipos assimétricos, em sua maioria, com comprimento cromossômico variando de  $0,5 - 2 \mu\text{m}$ , meta ou submetacêntricos (Sugawara *et al.*, 2001). A variação numérica de *Aristolochia* é fortemente relacionada aos clados e grupos infragênicos, com predomínio de  $2n = 12$  e  $14$  para o subgênero *Aristolochia*,  $2n = 12$  para o subgênero *Pararistolochia* e  $2n = 32$  para os subgêneros *Isotrema* e *Endodeca* (Ohi-Toma *et al.*, 2006) Para *A. gigantea* há registro prévio de  $2n = 14$ , cariótipo mais ou menos simétrico, com os menores cromossomos medindo entre  $1,5$  e  $2,2 \mu\text{m}$  e os maiores, entre  $2,5 - 3,9 \mu\text{m}$  (Berjano *et al.*, 2009). Atualmente, são conhecidos os dados citogenéticos quanto ao número cromossômico de 61 espécies do gênero *Aristolochia*, como consta na Tabela 1.

**Tabela 1.** Espécies do gênero *Aristolochia* com números cromossômicos registrados na literatura

<b>Espécie</b>	<b>Número Cromossômico (n)</b>
<i>Aristolochia arcuata</i> Mast.	7
<i>Aristolochia argyroneura</i> Hoehne ex Uribe	7
<i>Aristolochia baetica</i> L.	7
<i>Aristolochia bianorii</i> Sennen & Pau	6
<i>Aristolochia birostris</i> Duch.	7

---

<i>Aristolochia bracteolata</i> Lam.	6
<i>Aristolochia californica</i> Torr.	14
<i>Aristolochia castellanosii</i> Ahumada	5
<i>Aristolochia championii</i> Merr. & Chun	16
<i>Aristolochia clematitis</i> L.	7
<i>Aristolochia clusii</i> Lojac.	6
<i>Aristolochia contorta</i> Bunge	7
<i>Aristolochia cretica</i> Lam.	5
<i>Aristolochia cucurbitifolia</i> Hayata	16
<i>Aristolochia cymbifera</i> Mart.	7
<i>Aristolochia debilis</i> Siebold & Zucc.	7
<i>Aristolochia elongata</i> (Duch.) E. Nardi	5
<i>Aristolochia fimbriata</i> Cham.	7
<i>Aristolochia fontanesii</i> Boiss. & Reut.	12
<i>Aristolochia gibertii</i> Hook.	7
<i>Aristolochia gigantea</i> Mart.	7
<i>Aristolochia grandiflora</i> Sw.	7
<i>Aristolochia guichardii</i> P. H. Davis & M. S. Khan	5
<i>Aristolochia haitiensis</i> Ekman & O. C. Schmidt	7
<i>Aristolochia hians</i> Willd.	7
<i>Aristolochia hirta</i> L.	7
<i>Aristolochia humilis</i> Merr.	7
<i>Aristolochia indica</i> L.	6
<i>Aristolochia kaempferi</i> Willd.	16
<i>Aristolochia kunmingensis</i> C. Y. Cheng & J. S. Ma	16
<i>Aristolochia kwangsiensis</i> Chun & F. C. How ex S. Y. Liang	16
<i>Aristolochia labiata</i> Willd.	7
<i>Aristolochia littoralis</i> Parodi	7
<i>Aristolochia liukuensis</i> Hatus.	16
<i>Aristolochia loefgrenii</i> Hoehne	7
<i>Aristolochia lutea</i> Desf.	4
<i>Aristolochia macrophylla</i> Lam.	14
<i>Aristolochia manshuriensis</i> Kom.	14
<i>Aristolochia microstoma</i> Boiss. & Spruner	5
<i>Aristolochia navicularis</i> E. Nardi	12
<i>Aristolochia pallida</i> Willd.	4
<i>Aristolochia parvifolia</i> Sm.	6
<i>Aristolochia paucinervis</i> Pomel	12
<i>Aristolochia pistolochia</i> L.	7
<i>Aristolochia reticulata</i> Nutt.	14
<i>Aristolochia ridicula</i> N. E. Br.	7
<i>Aristolochia ringens</i> Vahl	7
<i>Aristolochia rotunda</i> L.	6
<i>Aristolochia sempervirens</i> L.	7
<i>Aristolochia serpentaria</i> L.	14
<i>Aristolochia shimadae</i> Hayata	16

---

<i>Aristolochia sicula</i> Tineo	8
<i>Aristolochia tagala</i> Cham.	7
<i>Aristolochia tomentosa</i> Sims	14
<i>Aristolochia trilobata</i> L.	7
<i>Aristolochia tubiflora</i> Dunn	7
<i>Aristolochia tyrrhena</i> E. Nardi & Arrigoni	13
<i>Aristolochia westlandii</i> Hemsl.	16
<i>Aristolochia onoei</i> Franch. & Sav. ex Koidz.	14

**Fonte:** CCDB, chromosome count data base (Rice *et al.* 2015); IAPT/IOPB Chromosome data

## 2.6 BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO

Há diversas técnicas para análises cromossômicas, a exemplo do método de coloração convencional, com diversos tipos de corantes, incluindo a coloração com Giemsa, a mais amplamente utilizada no Brasil, que cora conjuntamente a cromatina e proteínas associadas ao DNA. Essas técnicas permitem uma coloração rápida e barata, dispensa o uso de microscópio de fluorescência identificando número e morfologia dos cromossomos (Guerra & Souza, 2000). A partir da década de 1960, técnicas de coloração diferencial foram desenvolvidas buscando um melhor entendimento e detalhamento dos cariótipos. Estas técnicas permitem a coloração diferenciada de regiões da cromatina com diferenças na composição de bases ou na estrutura dos cromocentros que aparecem formando “bandas” (Guerra & Souza, 2000). Dentre essas técnicas, as mais amplamente utilizadas são o bandeamento-C e a coloração CMA/DAPI. Ambas as técnicas permitem reconhecer no genoma as regiões ricas em heterocromatina (Guerra, 2000). Essas regiões, formadas principalmente por sequências de DNA repetidas em tandem, conhecidas como DNA satélite, são mais comumente encontradas próximas ao centrômero, mas também ocorrem nos terminais e regiões intersticiais dos cromossomos (Brammer, Zanotto & Caverzan, 2007; Garrido-Ramos, 2015).

Ao analisar espécies brasileiras e chilenas de *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae), Buitendijk e Ramanna (1996) observaram que ambas apresentavam número cromossômico de  $2n = 16$ . No entanto, nas espécies chilenas, foram detectados grandes blocos de heterocromatina (bandas C), enquanto nas espécies brasileiras, apenas pequenas bandas-C foram identificadas. Esses achados sugerem que os dois grupos seguiram trajetórias evolutivas distintas.

A coloração dupla por meio dos fluorocromos CMA (cromomicina A3) DAPI (e 4',6-diamidino-2-fenilindol), permite reconhecer no genoma regiões dos cromossomos com diferentes composições em pares de base. Nesse caso, o CMA, cora preferencialmente regiões ricas em pares de bases GC (guanina e citosina), enquanto o DAPI cora regiões ricas em AT (adenina e timina). Assim, regiões heterocromáticas ricas em AT formam bandas mais

fortemente brilhantes em azul, enquanto regiões ricas em GC, formam bandas mais fortemente brilhantes em amarelo. Essa técnica permite um maior detalhamento do cariótipo, possibilitando diferenciar táxons que apresentem número e morfologia cromossômica similares, mas com número, posição e tipos de bandas diferentes (De Melo, 2004).

Forni-Martins & Guerra (1999) relataram diversos padrões de diferenciação cromossômica em espécies de *Sesbania* com  $2n = 12$ , através do bandeamento-C e da coloração com os fluorocromos CMA/DAPI. Já Röser (1994, 1995), evidenciou a possibilidade de diferenciação em algumas subfamílias de Arecaceae padrões de bandas CMA/DAPI e de condensação profásica distintos. Em *Ameroglossum* Eb.Fisch., S.Vogel & A.V.Lopes (Linderniaceae), um gênero com cariótipos estáveis para número e morfologia cromossômica, os padrões de bandas CMA/DAPI possibilitaram a distinção entre *A. ameroglossum pernambucense* Eb.Fisch., S.Vogel & A.V.Lopes, a única espécie até então reconhecida no gênero da nova espécie *A. manoelfelixii* L.P.Felix & E.M.Almeida (Almeida *et al.*, 2016).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

As plantas foram coletadas em Rio Tinto-PB, enquanto as sementes foram coletadas em Jaguarari-BA, e cultivadas no jardim experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal (UFPB, Areia-Paraíba). Espécimes de todo o material estudado foram herborizados e as exsiccatas depositadas no acervo do Herbário Prof. Jayme Coelho de Moraes (EAN) no Centro de Ciências Agrárias (CCA) - UFPB. A identificação das espécies foi realizada por meio de uma combinação de literatura pertinente, consulta a especialistas e comparações meticolosas com espécimes previamente autenticados. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Citogenética Vegetal do CCA - UFPB. No caso da *A. gigantea*, foram utilizadas pontas de raízes jovens obtidas da germinação de sementes, enquanto para *A. trilobata*, as raízes foram obtidas a partir de mudas cultivadas no Jardim Experimental.

#### 3.2 PREPARO DAS LÂMINAS

Nas análises mitóticas, pontas de raízes jovens foram pré-tratadas com 0,002 M de 8-hidroxiquinoleína por 20-24 horas a 10 °C, fixadas em etanol-ácido acético (3:1, v/v) por 2 horas à temperatura ambiente e armazenadas em um freezer a -20 °C. As raízes foram digeridas enzimaticamente em uma solução contendo 2% de celulase e 20% de pectinase a 37 °C por 30 minutos. As lâminas foram preparadas usando o método tradicional de esmagamento (Guerra & Souza, 2002), posteriormente congeladas em nitrogênio líquido por cinco minutos para a retirada da lamínula. As lâminas foram secas ao ar, coradas com DAPI (1µg mL<sup>-1</sup>)/glicerol (1:1, v/v) e examinadas sob um microscópio de epifluorescência Zeiss para selecionar as melhores lâminas.

#### 3.3 DUPLA COLORAÇÃO COM OS FLUOROCROMOS CMA/DAPI

As lâminas selecionadas foram descoradas em etanol: ácido acético (3:1, v/v) por 30 minutos e em etanol absoluto overnight, coradas novamente com CMA (0,1 mg mL<sup>-1</sup>) por 1 hora e montadas em glicerol: tampão de McIlvaine pH 7,0 (1:1) contendo 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> com DAPI (1µg mL<sup>-1</sup>) (Heitkam e Garcia, 2023). As melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio de epifluorescência Zeiss equipado com câmera de vídeo AxioCam MRC5

com o auxílio do software Axiovision 4.8. As imagens finais foram processadas para brilho, contraste e definição usando o Adobe Photoshop CS5 v. 12.

### 3.4 BANDEAMENTO C

No bandeamento C foram utilizadas as mesmas lâminas fotografadas após a dupla coloração com CMA/DAPI, conforme protocolo proposto por Guerra & Souza (2002). Após a descoloração, as lâminas foram submetidas à hidrólise do material por meio de ácido acético a 45%, em banho-maria a 60 °C por dez minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente por um minuto e secas ao ar. Em seguida, realizou-se a desnaturação em solução saturada de hidróxido de bário à 60 °C por dez minutos. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente até expulsão dos cristais sobrenadantes, banhadas em ácido acético a 45%, e logo após lavadas com água corrente por dois minutos, e enxaguadas com água destilada. Para realização da renaturação e extração diferencial do DNA, as lâminas foram secas ao ar, mergulhadas em solução de 2xSSC à 60 °C por 80 minutos. As lâminas foram novamente montadas em glicerol: tampão de McIlvaine pH 7,0 (1:1) contendo 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> com DAPI (1µg mL<sup>-1</sup>) e fotografadas conforme descrito para a dupla coloração CMA/DAPI.

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO CARIOMORFOLÓGICA

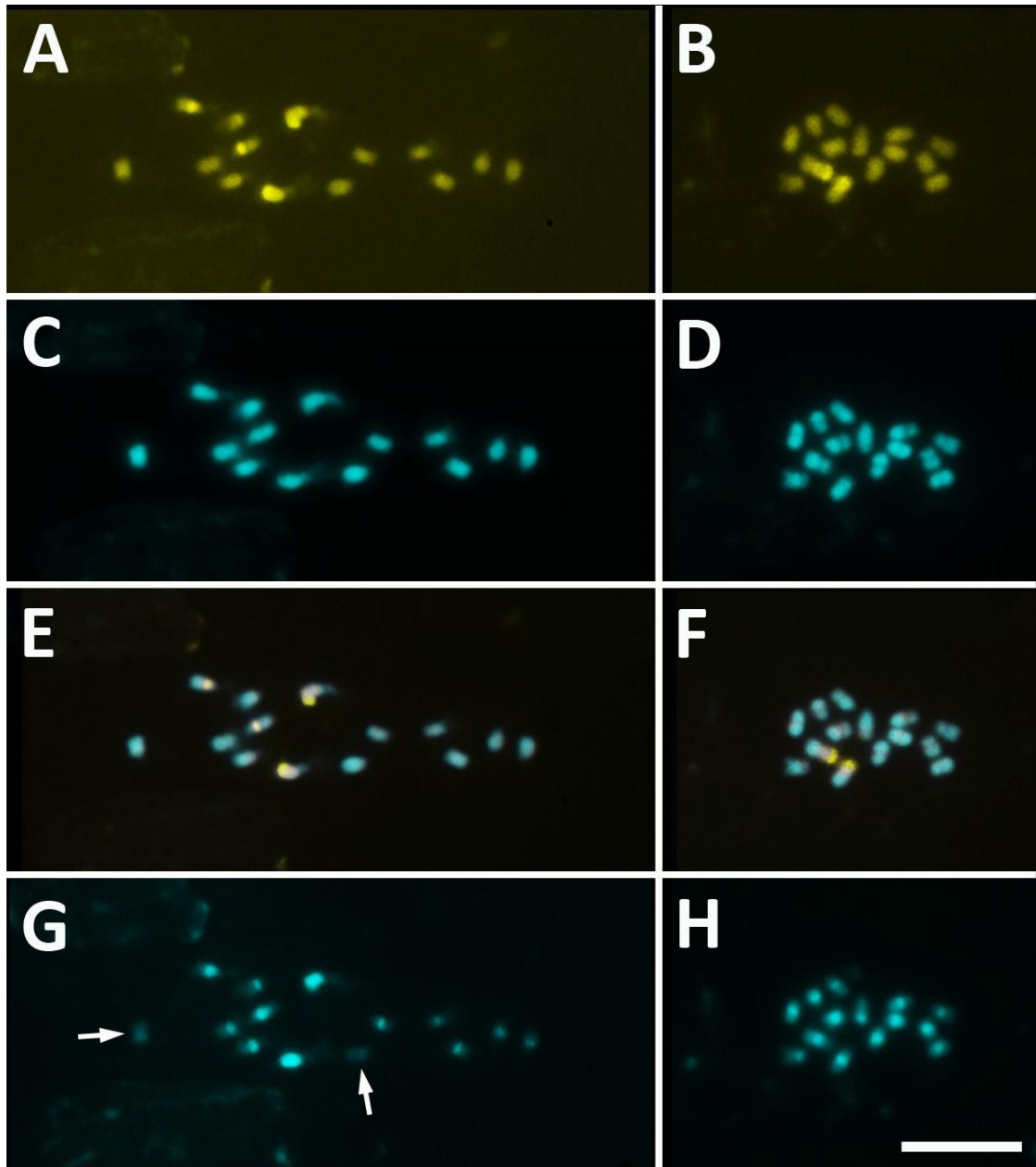
Metáfases com morfologia cromossômica clara foram utilizadas para a caracterização cromossômica e do cariótipo. As medições cromossômicas foram realizadas com o ImageJ® versão 1.46r. A razão entre os braços cromossômicos (comprimento do braço longo/comprimento do braço curto) foi usada para classificar os cromossomos como metacêntricos (1 – 1,4), submetacêntricos (1,5 – 2,9) ou acrocêntricos ( $\geq 3,0$ ), de acordo com Guerra (1986). Os idiogramas foram construídos usando o Photoshop CS3.

## 4 RESULTADOS

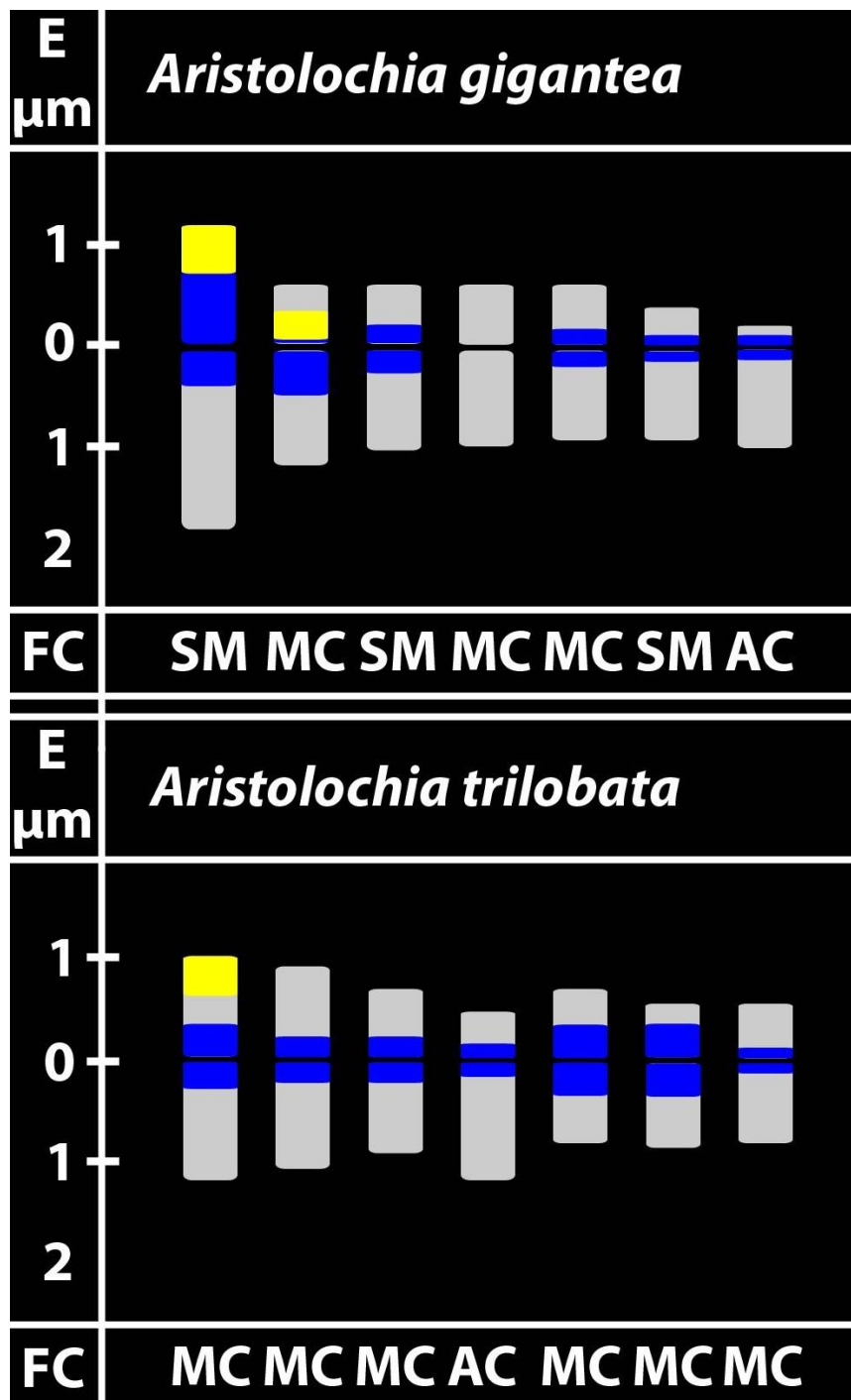
As espécies do gênero *Aristolochia* analisadas, juntamente com seus respectivos números cromossômicos, vouchers, locais de coleta, fórmula cariotípica, maior e menor tamanho cromossômico e bandas heterocromáticas, encontram-se sumarizadas na Tabela 2. Foram cariologicamente estudadas duas espécies, *A. gigantea* e *A. trilobata*, ambas com  $2n = 14$  (Figura 3). As duas espécies apresentam cariótipos ligeiramente assimétricos, e compostos por cromossomos metacêntricos, submetacêntricos com um par de acrocêntricos (Figura 4).

A dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI revelou a ocorrência apenas de bandas CMA+/DAPI-/0 em ambas as espécies (Figuras 3). *A. gigantea* apresentou duas bandas CMA+/DAPI- terminais e duas CMA+/DAPI0 proximais (Figura 3A, C, E), enquanto *A. trilobata* exibiu duas bandas terminais CMA+/DAPI- (Figura 3B, D, F). Contudo, o bandeamento C, seguido da coloração com DAPI, revelou um número muito maior de bandas heterocromáticas em ambas as espécies.

A espécie *A. gigantea* apresentou 12 bandas C-DAPI pericentroméricas, e apenas um par cromossômico sem bandas (Figura 3G), enquanto *A. trilobata* apresentou 14 bandas C pericentroméricas (Figura 3H). Também foi observado que o par de bandas CMA+/DAPI- terminais, provavelmente correspondentes as RONS em ambas as espécies, não coraram com DAPI após o bandeamento C. Por outro lado, o par de bandas CMA+/DAPI0 proximal em *A. gigantea* corou positivamente com DAPI após o bandeamento C (Figura 3G). Além disso, as bandas C coradas com DAPI exibiram elevada semelhança em cada par homólogo, tanto no tamanho quanto na intensidade da fluorescência. A descrição das bandas C foi bastante informativa para a identificação dos homólogos na construção dos idiogramas de ambas as espécies (Figura 4).



**Figura 3.** Células mitóticas de espécies pertencentes ao gênero *Aristolochia* com  $2n = 14$ , coradas com CMA (**A**, **B**), DAPI (**C**, **D**), sobreposição das imagens (**E**, **F**) e bandeamento C corado com DAPI (**G**, **H**). **A**, **C**, **E**, **G**: *Aristolochia gigantea*. **B**, **D**, **F**, **H**: *Aristolochia trilobata*. Setas brancas em **G** indicam cromossomos sem bandas C. Barra em **H** corresponde a  $10\mu\text{m}$ .



**Figura 4.** Ideogramas de *Aristolochia gigantea* e *Aristolochia trilobata*. Os cromossomos estão organizados em ordem decrescente de tamanho e alinhados pelo centrômero. As bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> estão representadas em amarelo, enquanto as bandas C em azul. Uma escala em micrômetros (μm) é fornecida a esquerda. A morfologia cromossômica encontra-se abaixo de cada cromossomo, representando a fórmula cariotípica (FC): MC = metacêntrico; SM = submetacêntrico; AC = acrocêntrico.

**Tabela 2.** Espécies de *Aristolochia* analisadas por meio da dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, bem como por bandeamento C. As espécies são apresentadas juntamente com seus respectivos vouchers, locais de coleta, números cromossômicos diploides ( $2n$ ), tamanho cromossômico (em micrômetros), fórmula cariotípica e bandas heterocromáticas

<b>Espécies</b>	<b><i>Aristolochia gigantea</i></b>	<b><i>Aristolochia trilobata</i></b>
Voucher	L.P.Felix 18814	J. M. P. Cordeiro <i>et al.</i> 620
Local de coleta	Jaguarari-BA	Rio Tinto-PB
Número cromossômico $2n$	14	14
Tamanho cromossômico (maior-menor)	1,36 $\mu$ m – 3,08 $\mu$ m	1,33 $\mu$ m – 2,44 $\mu$ m
Fórmula cariotípica	6MC+6SM+2AC	12MC+2AC
Bandas terminais CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	2	2
Bandas proximais CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>0</sup>	2	-
Bandas C terminais	-	-
Bandas C pericentroméricas	12	14

## 5 DISCUSSÃO

As espécies analisadas exibiram dois tipos principais de bandas, claramente distintas em relação às suas propriedades de coloração nos cromossomos. O primeiro tipo caracteriza-se por ocorrer apenas nas regiões terminais do par cromossômico maior, corando positivamente com CMA e não corando com DAPI, formando bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>. Esta banda não corou positivamente para banda C com DAPI em ambas as espécies. Para *A. gigantea*, verificou-se previamente que esta região corresponde exatamente ao sítio de DNAr 35S, colocalizada com a banda CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (Berjano *et al.*, 2009). Provavelmente é o que ocorre também em *A. trilobata*, que exibe o mesmo padrão de coloração. A ocorrência de bandas terminais CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> é comumente observada em muitos outros grupos de plantas (Fernandes *et al.*, 2009; Las Peñas *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015; Bolsheva *et al.*, 2016; Castro *et al.*, 2016; Ibiapino *et al.*, 2020; Nollet *et al.*, 2022), geralmente correspondendo às regiões preferenciais de ocorrência do DNA ribossomal 35S, que constituem as RONS (Urdampilleta *et al.*, 2013; Bolsheva *et al.*, 2016; Ibiapino *et al.*, 2020).

O segundo tipo de banda, observado apenas em *A. gigantea*, foi caracterizado por corar positivamente com CMA e corar de forma neutra com DAPI, formando um par de bandas proximais CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>0</sup>. Curiosamente, esta banda corou positivamente com DAPI após o

tratamento para banda C, diferindo da banda CMA por ocorrer em ambos os lados do centrômero, sendo, portanto, definida como uma banda C pericentromérica. Este mesmo padrão de bandas DAPI foi observado em outras espécies de *Aristolochia* após FISH (Berjano *et al.*, 2009). Bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>0</sup> também já foram observadas em outros grupos de plantas, correspondendo à banda C com Giemsa, como em *Rhynchospora ciliata* (Vanzela & Guerra, 2000). Contudo, a composição molecular dessas bandas ainda não está completamente esclarecida (Barros e Silva & Guerra, 2010).

O bandeamento C corado com DAPI revelou um padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (HC) nas regiões pericentroméricas em ambas as espécies. Sabe-se que as bandas C coradas com DAPI não necessariamente correspondem a regiões heterocromáticas ricas em AT (Besendorfer *et al.*, 2002). De fato, em outras espécies de *Aristolochia* da seção *Gymnolobus* (que inclui *A. gigantea*), bandas pericentroméricas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> foram observadas em quase todos os cromossomos (Berjano *et al.*, 2009). Apesar de não termos detectado bandas pericentroméricas CMA<sup>+</sup> em *A. gigantea*, nossos dados de bandeamento C correspondem exatamente às 12 regiões pericentroméricas registradas para essa espécie por Berjano *et al.* (2009), bem como para todos os 14 cromossomos de *Aristolochia trilobata*. Regiões cromossômicas pericentroméricas são sítios preferenciais para a ocorrência de heterocromatina constitutiva em plantas (Simon *et al.*, 2015), mas nem sempre são visualizadas bandas com fluorocromos (Barros e Silva *et al.*, 2010) ou mesmo bandeamento C com Giemsa (Guerra, 1985). No caso das espécies de *Aristolochia* analisadas aqui, as bandas C coradas com DAPI demonstraram elevada similaridade em cada par homólogo, sugerindo ser um marcador cromossômico promissor para a identificação dos pares homólogos no gênero.

O gênero *Aristolochia* é cariologicamente bastante diversificado, apresentando variação tanto em números cromossômicos quanto em relação à heterocromatina e sítios de DNAr (Berjano *et al.*, 2009). Contudo, para a seção *Gymnolobus*, algumas características parecem ser relativamente estáveis, como o número  $2n = 14$ , cariótipos com cromossomos pequenos e uma tendência para a bimodalidade, especialmente devido à presença de um par cromossômico maior na maioria das espécies (Berjano *et al.*, 2009). Em *A. gigantea*, esse mesmo par cromossômico é o que exhibe a maior quantidade de heterocromatina detectável, bem como os sítios de DNAr 35S. Essa característica é semelhante à formação do cariótipo bimodal em *Eleutherine* (Báez *et al.*, 2019), o que torna o gênero *Aristolochia* um grupo promissor para pesquisas futuras mais aprofundadas sobre a dinâmica evolutiva do DNA repetitivo na seção *Gymnolobus*.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, observamos que as espécies *Aristolochia gigantea* e *Aristolochia trilobata* apresentam  $2n = 14$  cromossomos, com cariótipos ligeiramente assimétricos, compostos principalmente por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, além de um par de acrocêntricos. Por meio do bandeamento com fluorocromos, verificamos a ocorrência de um par de bandas terminais  $CMA^+/DAPI^-$  em ambas as espécies, além de um par de bandas proximais  $CMA^+/DAPI^0$  em *A. gigantea*.

Por outro lado, o bandeamento C corado com DAPI revelou 12 bandas pericentroméricas em *A. gigantea* e 14 em *A. trilobata*. Esses dados foram úteis para a construção de idiogramas para ambas as espécies, com destaque para as bandas C por possibilitarem mais eficientemente a identificação de cada par homólogo.

Portanto, concluímos que o bandeamento-C possibilitou a visualização de bandas de heterocromatina constitutiva que não foram evidenciadas pela coloração com fluorocromos CMA/DAPI.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. M.; WANDERLEY, A. M.; NOLLET, F.; COSTA, F. R.; SOUZA, L. G. R. & FELIX, L. P. A New Species of *Ameroglossum* (Scrophulariaceae) Growing on Inselbergs in Northeastern Brazil. **Systematic Botany**, 41(2): 423–429 (2016).
- BÁEZ, M.; VAIO, M.; DREISSIG, S.; SCHUBERT, V.; HOUBEN, A.; PEDROSA-HARAND, A. Together But Different: The Subgenomes of the Bimodal *Eleutherine* Karyotypes Are Differentially Organized. **Plant Sci.** 10:1170 (2019).
- BARROS E SILVA, A.; GUERRA, M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. **Biotech. Histochem.** 1–11 (2010).
- BARROS E SILVA, A. E.; MARQUES, A.; DOS SANTOS, K. G. B.; GUERRA, M. The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. **Chromosom. Res.** 18, 503–514 (2010).
- BERJANO, R.; ROA, F.; TALAVERA, S. et al. Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. **Plant Syst Evol**, 280: 219–227 (2009).
- BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M. E.; PAPES, D. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 139: 99-108 (2002).
- BOLSHEVA, N. L.; DYACHENKO, O. V.; SAMATADZE, T. E.; RACHINSKAYA, O. A.; ZAKHARCHENKO, N. S.; SHEVCHUK, T. V.; AMOSOVA, A. V.; MURAVENKO, O. V.; ZELENIN, A. V.; Karyotype of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae) studied by chromosome banding, FISH with rDNA probes and immunofluorescence detection of DNA methylation. **Plant Biosyst.** 150, 916–922 (2016).
- BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. Citogenética vegetal: da era clássica à molecular. EMBRAPA. **ISSN 1518-6512** Dezembro (2007).
- BUITENDIJK, J. H.; RAMANNA, M. S. Giemsa C-banded karyotypes of eight species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. **Annals of Botany**, 78: 449-457 (1996).
- CAMPORESE, A.; BALICK, M.J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R.G.; MORSELLINO, N.; SIMONA, F.; TUBAZO, A. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from **Ethnopharmacology**, 87: 103-107 (2003)
- CAPELLARI-JUNIOR, L. Espécies de *Aristolochia* L. (Aristolochiaceae) ocorrentes no estado de São Paulo. **Master dissertation**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, (1991).
- CASTRO, J. P.; MEDEIROS-NETO, E.; SOUZA, G.; ALVES, L. I. F.; BATISTA, F. R. C.; FELIX, L. P. CMA band variability and physical mapping of 5S and 45S rDNA sites in Brazilian Cactaceae: Pereskioideae and Opuntioideae. **Braz. J. Bot** 39(2): 613–620 (2016).

COSTA, E.L.; HIME, N. Biologia floral de *Aristolochia gigantea* Mart & Zucc (Aristolochiaceae). **Rodriguésia**, 56: 23-32 (1981).

CCDB. **Chromosome Counts Database**. Disponível em: < <http://ccdb.tau.ac.il/home/>>. Acesso: 06 de maio de 2024.

DE MELO, N. F. Citogenética vegetal aplicada à taxonomia e ao melhoramento. XXVII **Reunião Nordestina de Botânica**. Petrolina, 3-5 (2004).

DORNELAS, C. S. M.; NOLLET, F.; SILVA, R. S.; BURIL, M. T.; FELIX, L. P. Chromosome number, genome size and heterochromatin evolution in diploid species of *Ipomoea* and related genera (Convolvulaceae: Convolvuloideae). **Acta Botanica Brasilica**, 2023, 37: e20230152 (2023).

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42(3): 369-394 (2006).

FERNANDES, T.; DE ALMEIDA REGO, L. do N. A.; NARDY, M.; YUYAMA, P. M.; VANZELA, A. L. L. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) revealed by fluorescent chromosome banding and FISH. **Genet. Mol. Biol.** 32, 320–327 (2009).

FERNANDES, J. M.; SILVA, D. F.; LOPES, C. R. A. S.; DE ALMEIDA, A. A. S. D.; BRAGA, J. M. A.; FREITAS, J.; GONZÁLEZ, F. Contribuição à taxonomia do gênero *Aristolochia* (Aristolochiaceae) no Estado de Mato Grosso, com uma nova ocorrência para o Brasil. **Research, Society and Development**, 10(10): e518101018676-e518101018676 (2021).

FERNANDEZ, E.; FERRERAS, I.; FARRELL, B. D.; MEDEIROS, B. A. S.; ROMEROGONZALEZ, G. A. Studies in *Aristolochia* (Aristolochiaceae) of Hispaniola. **Phytotaxa**, 420(1): 1-20 (2019).

FORNI-MARTINS, E. R.; GUERRA, M. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. species (Fabaceae). **Caryologia**, 52: 97-103 (1999).

FREGONEZI, J. N.; TOREZAN, J. M. D.; VIEIRA, A. O.; VANZELA, A. L. L. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on physical mapping of repetitive DNA. **Gen Mol Biol** 29, 1, 97-104 (2006).

FREITAS, J., LÍRIO, E.J. & GONZALÉZ, F. *Aristolochia assisii*, a new neotenic species of Aristolochiaceae from Espírito Santo and Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, 163: 262–268 (2014).

FREITAS, J. & ALVES-ARAÚJO, A. Flora do Espírito Santo: Aristolochiaceae. **Rodriguésia**, 68(5): 1505-1539 (2017).

FREITAS, J.; LÍRIO, E.J.; BARROS, F.; GONZÁLEZ, F. Aristolochiaceae in **Flora e Funga**

- do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at:<<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB15756>>. Acesso em 30 de janeiro de 2024.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in plants: more than just rubbish. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 2, p. 153-170 (2015).
- GONZÁLEZ, F. Inflorescence morphology and the systematics of Aristolochiaceae. **Systematics and Geography of Plants**, 68: 159–172 (1999).
- GONZÁLEZ, F. **Florística y sistemática filogenética innecesariamente disyuntas:** el caso de *Aristolochia*, *Euglypha* y *Holostylis*. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, 36: 193-202 (2012).
- GRANT, V. Periodicities in the chromosome numbers of the angiosperms. **Botanical Gazette**, 143: 379–389 (1982).
- GREWAL, S. I.; JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nat Rev Genet**. 8(1):35-46 (2007).
- GUERRA, M. S. Cytogenetics of Rutaceae. III. Heterochromatin Patterns, Caryologia:**International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, 38:3-4, 335-346 (1985).
- GUERRA, M. D. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Brazilian J. Genet**, (1986).
- GUERRA, M. Introdução À Citogenética Geral. **Guanabara** – RJ. 142 (1998).
- GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, 23(4): 1029-1041 (2000).
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos:** Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Recife: Funpec, 131 (2002).
- GUERRA, S.; GUERRA, M.; MENDES, S.; SOARES FILHO, W. S.; PEDROSA-HARAND, A. Karyotype variability of sour orange (*Citrus aurantium* L.) and the origin of its heteromorphic karyotypes. **Tree Genetics & Genomes**. 16: 78 (2020).
- HEINRICH, M.; CHANA, J.; WANKE, S.; NEINHUIS, C.; SIMMONDS, M.S.J. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2—A global assessment based on bibliographic sources. **Journal of Ethnopharmacology**, 125: 108–144 (2009).
- HEITKAM, T.; GARCIA, S. Plant Cytogenetics and Cytogenomics. **Humana Press**, XVIII: 568 (2023).
- HIPÓLITO, J.; VIANA, B. F.; SELBACH-SCHNADELBACH, A.; GALETTO, L.; KEVAN, P. G. Pollination biology and genetic variability of a giant perfumed flower (*Aristolochia*

*gigantea* Mart. and Zucc., Aristolochiaceae) visited mainly by small Diptera. **Botany**, 90(9): 815-829 (2012).

HONYCHURCH, P.N. Caribbean Wild Plants and Their Uses: An Illustrated Guide to Some Medicinal and Wild Ornamental Plants of the West Indies. **Macmillan**, London (1986).

IBIAPINO, A.; GARCÍA, M. Á.; COSTEA, M.; STEFANOVI, S.; GUERRA, M.; Intense proliferation of rDNA sites and heterochromatic bands in two distantly related cuscutea species (Convolvulaceae) with very large genomes and symmetric karyotypes. **Genet. Mol. Biol.** 43, 1–9 (2020)

LANS, C.; HARPER, T.; GEORGES, K.; BRIDGWATER, E.; **BMC Complementary Altern. Med.** 1, 10 (2001).

LANS, C. Comparison of plants used for skin and stomach problems in Trinidad and Tobago with Asian ethnomedicine. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 3: 3 (2007).

LAS PEÑAS, M. L.; URDAMPILLETA, J. D.; LÓPEZ-CARRO, B.; SANTIÑAQUE, F.; KIESLING, R.; BERNARDELLO, G. Classical and molecular cytogenetics and DNA content in *Maihuenia* and *Pereskia* (Cactaceae). **Plant Syst. Evol.** 300, 549–558 (2014).

MELLER, B. The first fossil *Aristolochia* (Aristolochiaceae, Piperales) leaves from Austria. **Palaeontologia Electronica**, 17(Issue 1;21A):17 (2014).

MORENO, N. C.; AMARILLA, L. D.; LAS PEÑAS, M. L.; BERNARDELLO, G.; Molecular cytogenetic insights into the evolution of the epiphytic genus *Lepismium* (Cactaceae) and related genera. **Bot. J. Linn. Soc.** 177, 263–277 (2015).

MORS, W.B.; NASCIMENTO, M.C.; PEREIRA, B.M.R.; PEREIRA, N.A. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**, 55: 627- 642 (2000).

NOLLET, F.; MEDEIROS NETO, E.; CORDEIRO, J. M. P.; BURIL, M. T.; CHASE, M. W.; FELIX, L. P. Chromosome numbers and heterochromatin variation in introgressed and non- introgressed populations of *Epidendrum* (Orchidaceae: Epidendroideae): interspecific transfers of heterochromatin lead to divergent variable karyotypes in the parental populations. **Bot. J. Linn. Soc.** 199, 694–705 (2022).

OHI-TOMA, T.; SUGAWARA, T.; MURATA, H.; WANKE, S.; NEINHUIS, C.; MURATA, J. Molecular phylogeny of *Aristolochia* sensu lato (Aristolochiaceae) based on sequences of *rbcl*, *matK*, and *phyA* genes, with special reference to differentiation of chromosome numbers. **Systematic Botany**, 31: 481–492 (2006).

OLIVEIRA, I. G.; MORAES, A. P.; DE ALMEIDA, E. M.; DE ASSIS, F. N. M.; CABRAL, J. S.; DE BARROS, F.; FELIX, L. P. Chromosomal evolution in pleurothallidinae (Orchidaceae: Epidendroideae) with an emphasis on the genus *Acianthera*: Chromosome numbers and heterochromatin. **Bot. J. Linn. Soc.** 178, 102–120 (2015).

- OLIVEIRA, B. M. S. **Atividade formicida do óleo essencial de *Aristolochia trilobata* L.(Aristolochiaceae) sobre formigas cortadeiras**. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão – SE, 66 (2014).
- PROCTOR, M.; YÉO, P.; LACK, A. The natural history of pollination. **The Bath Press**, London, United Kingdom (1996).
- RICE, A.; GLICK, L.; ABADI, S.; EINHORN, M.; KOPELMAN, N. M.; SALMAN-MINKOV, A.; MAYZEL, J.; CHAY, O.; MAYROSE, I. The Chromosome Counts Database (CCDB) – a community resource of plant chromosome numbers. **New Phytologist**. 206(1): 19-26 (2015).
- RÖSER, M. Pathways of karyological differentiation in palms (Arecaceae). **Plant Systematics and Evolution**, 189: 83-122 (1994)
- RÖSER, M. Trends in the karyo-evolution of palms. In: Brandham PE, Bennett MD (eds.). **Kew Chromosome Conference IV**, pp. 249-265. Royal Botanic Gardens, Kew, (1995).
- RUFFA, M.J.; FERRARO, G.; WAGNER, M.L.; CALCAGNO, M.L.; CAMPOS, R.H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepato cellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, 79: 335–339 (2002).
- RUIZ, H. **Memoria sobre las virtudes y usos de las planta llamada en el Perú bejuco de la estrella**. Madrid, Imprenta de D. José Del Collado, 58 (1805).
- SANTOS, D. de A. et al. Volatile constituents of *Aristolochia trilobata* L. (Aristolochiaceae): a rich source of sulcatyl acetate. **Química Nova**, 37: 977-981 (2014).
- SARMA, B.; TANTI, B. Karyomorphology of three species of *Aristolochia*–rare and endemic medicinal plants of Assam, India. **Caryologia**, v. 68, n. 2, p. 154-158 (2015).
- SILVA, M. L. da. **Citogenética de espécies do gênero *Eichhornia* Kunth (Pontederiaceae Kunth)**. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Botânica, UFRPE, Recife (2014).
- SIMON, L.; VOISIN, M.; TATOUT, C.; PROBST, A. V. Structure and Function of Centromeric and Pericentromeric Heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Sci**. 6:1049 (2015).
- SOUSA, J. H. **Ecologia e Biologia da Polinização de *Aristolochia gigantea* (Aristolochiaceae) Mart. e Zucc.** 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Biomonitoramento) - Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador (2011).
- SUGAWARA, T.; MURATA, J.; WU, S.; OHI, T.; NAKANISHI, T.; MURATA, H. A cytological analysis of 24 taxa in *Aristolochia* subgenera *Siphisia* and *Aristolochia* (Aristolochiaceae). **Acta Phytotaxonomica et Geobotanica**, 52: 149–158 (2001).
- THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny

Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV, **Botanical Journal of the Linnean Society**. 181: (1) 1–20 (2016).

THE PLANT LIST. **A working list of all plant species**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso: 30 de janeiro de 2024.

TROJER, P. & REINBERG, D. **Facultative Heterochromatin**: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Molecular Cell* 28: 1-13 (2007).

URDAMPILLETA, J. D.; COULLERI, J. P.; FERRUCCI, M. S.; FORNI-MARTINS, E. R. Karyotype evolution and phylogenetic analyses in the genus *Cardiospermum* L. (Paullinieae, Sapindaceae). **Plant Biol.** 15, 868–881 (2013).

VANZELA, A. L. L.; GUERRA, M. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Genet. Mol. Biol.** 23: 453-456 (2000).

WU, T-S.; DAMU, A.G.; SU, C-R.; KUO, P-C. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. **Natural Product Reports**, 21:594-624 (2004).