



LÍLIA ROSÁRIO RIBEIRO

**CITOGENÉTICA E EFEITOS
CITOGENOTÓXICOS DE *Annona crassiflora*
Mart. (ANNONACEAE).**

LAVRAS – MG

2013

LÍLIA ROSÁRIO RIBEIRO

**CITOGENÉTICA E EFEITOS CITOGENOTÓXICOS DE *Annona
crassiflora* Mart. (ANNONACEAE)**

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

Orientadora

Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Ribeiro, Lília Rosário.

Citogenética e efeitos citogenotóxicos de *Annona crassiflora*
Mart. (Annonaceae) / Lília Rosário Ribeiro. – Lavras : UFLA, 2013.
91 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. Araticum. 2. Citogenotoxicidade. 3. Conteúdo de DNA. 4.
Meiose. 5. Número cromossômico. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

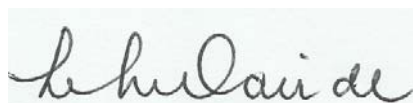
LÍLIA ROSÁRIO RIBEIRO

**CITOGENÉTICA E EFEITOS CITOGENOTÓXICOS DE *Annona
crassiflora* Mart. (ANNONACEAE)**

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

APROVADA em 18 de dezembro de 2012.

Dra.	Giovana Augusta Torres	UFLA
Dr.	José Marcello Salabert Campos	UFJF
Dr.	Sandro Barbosa	UNIFAL-MG
Dra.	Vânia Helena Techio	UFLA



Dra. Lisete Chamma Davide
Orientadora

LAVRAS – MG

2012

A Deus, Criador e Senhor do Universo...

OFEREÇO

Aos meus queridos pais, Luiza e José (in memoriam);

À minha irmã Mirlei;

*Em especial, ao meu esposo Elessandro, amor da minha vida, pela compreensão
e apoio constantes.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus ,pelo dom da vida e pela oportunidade de realizar esse sonho;

Ao meu esposo Elessandro, pelo amor incondicional, compreensão, carinho, força constante e pelo esforço e dedicação na etapa de coleta do material biológico;

Aos meus pais, José (*in memoriam*) e Luiza, pela formação humana e amor verdadeiro;

Aos meus irmãos, pelas orações e desejo de sucesso;

Ao meu querido irmão, Itamar, (*in memoriam*) que teve que partir no meio desse desafio e não pode presenciar esse momento. A eternidade nos espera;

Ao UNIFOR, pela concessão de auxílio financeiro.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de estudo;

À amiga e orientadora, Lisete Chamma Davide, pela confiança, inúmeras contribuições e, acima de tudo, pelo exemplo de humanidade, coerência, ética e sabedoria;

À amiga e professora, Vânia Helena Techio, pelas contribuições, companheirismo e atenção;

À Profa., Vitolina Ferreira Garcia, pelo incentivo, motivação e pela confiança depositada em mim. Eternamente grata eu serei!

Aos colegas do laboratório de Citogenética, pelos momentos de aprendizado e convívio, em especial à Ludmila, pelo apoio, gentileza e inúmeros favores prestados;

Aos meus companheiros de estrada, em especial à minha amiga Tânia pelo incentivo e riscos compartilhados nessa grande ‘aventura’ enfrentada com bravura;

Às minhas orientadas de iniciação científica; Fatinha, Suyanne e Quênia,
pelo convívio e ajuda nos experimentos;

À FAPEMIG e ao UNIFOR, pela concessão das bolsas de iniciação
científica;

A todos que, de algum modo, contribuíram para que eu pudesse chegar
até aqui. Muito obrigada!

“Tudo posso Naquele que me fortalece”
(Filipenses 4:13).

RESUMO GERAL

Annonaceae é uma importante família de plantas superiores que no Brasil, é representada por aproximadamente 26 gêneros e 260 espécies, dentre as quais destacam-se as pertencentes ao gênero *Annona*. Além de espécies de interesse comercial, o gênero apresenta espécies ainda em estado selvagem como *Annona crassiflora*, uma frutífera bastante apreciada pela população da região do cerrado brasileiro, por suas propriedades alimentícias e medicinais. Com relação aos estudos citogenéticos do gênero *Annona*, são encontrados os números cromossômicos $2n = 14, 16, 18, 27, 28$ e 42 , com a prevalência de diploides com o número básico $x=7$. A caracterização da morfometria cromossômica, do núcleo interfásico, do comportamento meiótico e a determinação da quantidade de DNA genômico foram realizadas. A citogenética de *A. crassiflora*, bem como o conteúdo de DNA nuclear foram relatados pela primeira vez. A espécie apresentou $2n=14$ cromossomos relativamente pequenos ($1,62$ a $3,43 \mu\text{m}$), cariótipo simétrico e núcleo interfásico do tipo arreticulado. O comportamento meiótico mostrou-se regular com elevados índice meiótico e viabilidade polínica. Bioensaios vegetais utilizando *Lactuca sativa* também foram conduzidos a fim de se avaliar a citogenotoxicidade dos extratos aquoso e etanólico de folhas e sementes dessa espécie. Este estudo sugere cautela quanto à utilização das folhas e sementes de *A. crassiflora* na medicina popular, uma vez que efeitos citogenotóxicos foram observados.

Palavras-chave: Annonaceae. Araticum. Citogenotoxicidade. Conteúdo de DNA. Meiose. Número cromossômico.

GENERAL ABSTRACT

Annonaceae is an important family of superior plants which, in Brazil, is represented by an average of 26 genera and 269 species, among which are highlighted those of the *Annona* genus. In addition to species of commercial interest, the genus presents species which are still in a wild state, such as *Annona crassiflora*, a fruit tree largely appreciated by the population of the Brazilian cerrado region due to its food and medicinal properties. Regarding the cytogenetic studies of the *Annona* genus, the chromosomal numbers $2n = 14, 16, 18, 27, 28$ and 42 are found, with the prevalence of diploid with the basic number of $x = 7$. The characterization of chromosomal morphometry, of the interphase nucleus, of the meiotic behavior and the determination of the quantity of genomic DNA were performed for three *A. crassiflora* populations. The cytogenetic of the *A. crassiflora*, as well as the content of C DNA were reported for the first time. The species presented $2n = 14$ relatively small chromosomes (1.62 to 3.43 μm), symmetric karyotype and areticate interphase nucleus. The meiotic behavior was irregular with elevated percentages of meiotic index and pollen viability. Plant bioassays were also conducted in order to evaluate the cytogenotoxicity of the this specie's leaf and seed aqueous and ethanol extracts. This study suggests caution in the use of *A. crassiflora* leaves and seeds in popular medicine, since the cytogenotoxic effects were observed.

Keywords: Annonaceae. Araticum. DNA content. Chromosomal number. Cytogenotoxicity. Meiosis.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	<i>Annona crassiflora</i> Mart.	19
----------	--------------------------------------	----

SEGUNDA PARTE - ARTIGO 1

Figura 1	<i>Annona crassiflora</i> Mart. (A) núcleos interfásicos arreticulados; (B). metáfase mitótica (2n=14). (C) kariograma. (D) ideograma.....	38
Figura 2	Núcleos interfásicos de <i>A. crassiflora</i> corados com nitrato de prata.....	42
Figura 3	Meiose em <i>Annona crassiflora</i> Mart.	43
Figura 4	Grãos de pólen maduros de <i>A. crassiflora</i>	44
Figura 5	Histograma de citometria de fluxo em núcleos de <i>A. crassiflora</i>	45

ARTIGO 2

Figure 1.	Regression analysis showing the effects of (A) leaf and (B) seed extracts from <i>Annona crassiflora</i> on the root tips of <i>Lactuca sativa</i>	65
Figure 2.	Chromosome and nuclear abnormalities observed in root meristem cells of <i>Lactuca sativa</i> that had been exposed to ethanolic extracts from leaves and seeds of <i>Annona crassiflora</i> showing: (A) condensed nucleus in interphase cell; (B) C-metaphase; (C) chromosome loss and stickiness in metaphase cell; (D) delay in chromosome alignment in metaphase cell; (E) multiple bridges in anaphase cell; (F) bridge and chromosome fragment in anaphase cell; (G) chromatin bridge in telophase	

cell; and (H) bridge and chromosome loss in telophase cell. (Bar
= 5 μm)..... 68

ARTIGO 3

Figura 1 Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas
da ponta de raiz de *L. sativa* L. expostas aos extratos aquosos da
folha e da semente de *A. crassiflora* Mart..... 85

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

Tabela 1	Localização geográfica dos três pontos de coleta de <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	33
Tabela 2	Relação de braços e índice centromérico dos cromossomos de <i>A. crassiflora</i> Mart. coletada em três localidades de Minas Gerais.....	40
Tabela 3	Morfometria cromossômica de <i>A. crassiflora</i> Mart. coletada em três localidades de Minas Gerais	41
Tabela 4	Índice meiótico (IM) e porcentagem de pólen viáveis (PV) determinada por testes de coloração para três localidades de coleta de <i>A. crassiflora</i> Mart. de Minas Gerais	42
Tabela 5	Médias das quantidades de DNA (pg/2C) obtidas por citometria de fluxo para três localidades de coleta de <i>Annona crassiflora</i> Mart.	44

ARTIGO 2

Table 1.	Percentage germination of seeds of <i>Lactuca sativa</i> exposed for 48 h to ethanolic extracts from leaves and seeds of <i>Annona crassiflora</i>	62
Table 2.	Cytogenetic analyses of root tips of <i>Lactuca sativa</i> exposed to ethanolic extracts from leaves and seeds of <i>Annona crassiflora</i>	66

ARTIGO 3

Tabela 1	Porcentagem média de germinação de sementes de <i>L. sativa</i> após 48 h de exposição aos extratos aquosos de <i>A. crassiflora</i>	80
----------	---	----

Tabela 2	Comprimento médio (cm) das raízes de <i>L. sativa</i> após 96h de exposição aos extratos aquosos de <i>A. crassiflora</i>	81
Tabela 3	Análise citogenética dos extratos aquosos de <i>Annona crassiflora</i> ...	82

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 15
2	REFERENCIAL TEÓRICO 17
2.1	Características botânico-agronômicas e utilização de <i>Annona crassiflora</i> Mart. 17
2.2	Aspectos citogenéticos da família Annonaceae 21
2.3	Conteúdo de DNA no gênero <i>Annona</i> 22
	REFERÊNCIAS 24
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS 28
	ARTIGO 1 Citogenética e conteúdo de DNA nuclear de <i>Annona crassiflora</i> Mart. (Annonaceae) 28
	ARTICLE 2 Cytogenotoxic effects of ethanolic extracts of <i>Annona crassiflora</i> Mart. (Annonaceae) 54
	ARTIGO 3 Efeito dos extratos aquosos de <i>Annona crassiflora</i> Mart. (Annonaceae) sobre o ciclo celular de <i>Lactuca sativa</i> L. 74

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Annonaceae é uma família pantropical de árvores, arbustos e lianas que desempenha um papel ecológico importante em termos de diversidade de espécies, especialmente nos ecossistemas de floresta tropical (COUVREUR et al., 2012). Aproximadamente 108 gêneros e 2400 espécies são reconhecidos atualmente na família (CHATROU et al., 2012). No Brasil, são encontrados 26 gêneros, sendo sete endêmicos, e cerca de 260 espécies (MAAS et al., 2001). O Brasil é o centro de origem e diversidade de várias espécies do gênero *Annona* (*A. xespertonium*, *A. spinescens*, *A. salzmannii*, *A. mutans*, *A. glabra*, *A. furfuracea*, *A. coriacea*, *A. cacans*, *A. aurantiaca*, *A. crassiflora*). Algumas anonáceas exóticas como a pinha ou fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.), a cherimoia (*A. cherimola* Mill.) e a atemoia (*A. cherimola* x *A. squamosa*) se destacam no país pelo ascendente mercado comercial formal (PINTO et al., 2005).

Os estudos citogenéticos sobre o gênero *Annona* são escassos, a maioria descreve o número cromossômico ou a viabilidade polínica de algumas espécies, (BENNETT; LEITCH, 2010; BETTIOL NETO et al., 2009; NAKASONE; PAULL, 1998; SAUER; EHRENDORFER, 1984). Aspectos detalhados da morfologia e morfometria dos cromossomos só foram descritos para *Annona muricata* (FOLORUNSO; OLORODE, 2007).

Dentre as inúmeras frutíferas nativas do cerrado que apresentam potencial de utilização em sistemas tradicionais de produção agrícola, destaca-se *Annona crassiflora* Mart., conhecida popularmente por araticum ou marolo. Esta espécie é considerada de interesse econômico, pois além do consumo *in natura* da polpa, seu aproveitamento é bastante difundido entre os habitantes do cerrado

brasileiro, sendo encontrados inúmeros pratos típicos da região produzidos com essa fruta, com destaque para os doces, geleias, licores, refrescos, sorvetes e sucos (SOARES et al., 2009).

A espécie também é bastante conhecida por suas propriedades terapêuticas. A polpa do fruto maduro é usada como adstringente e tônico, a infusão das folhas e das sementes trituradas auxilia no combate a diarreia, na indução da menstruação, no tratamento de picada de cobra e afecções do couro cabeludo (PEREIRA et al., 2008; SOARES et al., 2009). A espécie também é conhecida por seus efeitos bactericidas, fungicidas e antitumorais (ROESLER et al., 2007a; VILAR et al., 2008).

A. crassiflora é uma frutífera que ainda se encontra em estado selvagem e cuja exploração comercial ocorre de forma extrativista e predatória, sem qualquer grau de domesticação. O conhecimento de seu complemento cromossômico poderá servir de subsídio para o entendimento da biologia da espécie, estudos taxonômicos, de hibridação e para a utilização em programas de melhoramento genético de espécies comerciais do gênero *Annona*. Além do mais, tendo em vista a utilização das folhas e sementes dessa espécie na medicina popular, ensaios citogenotóxicos são necessários de modo a fornecer informações sobre a segurança dessa utilização.

O presente trabalho objetivou caracterizar o padrão cariotípico, o núcleo interfásico, a atividade nucleolar e o comportamento meiótico de *A. crassiflora*; determinar a quantidade de DNA nuclear de *A. crassiflora* por meio da técnica de citometria de fluxo; investigar os efeitos dos extratos aquosos e etanólicos da folha e semente de *A. crassiflora* sobre a germinação, crescimento radicular, ciclo celular e estrutura cromossômica de *Lactuca sativa* L..

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características botânico-agronômicas e utilização de *Annona crassiflora* Mart.

Annona crassiflora Mart. é uma espécie arbórea nativa do cerrado brasileiro, pertencente ao sub-reino Embriophyta, divisão Spermatophyta, subdivisão Angiospermae, classe Dicotyledoneae, ordem Ranales, subordem Magnoliales, família Annonaceae, subfamília Annonoideae e gênero *Annona* (RIBEIRO; PASQUAL, 2005).

Na região central do Brasil, é popularmente conhecida como araticum-do-cerrado, marolo, araticum-do-campo e pinha-do-cerrado (SOARES et al., 2009). Sua distribuição é bastante ampla, ocorrendo nos Estados do Distrito Federal, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Bahia e Tocantins em áreas de cerrados e cerradões, sendo frequente em terrenos arenosos. Os frutos são comestíveis e muito apreciados pelas populações rurais da região do Brasil Central (LORENZI, 2002).

A. crassiflora é uma das mais típicas espécies frutíferas nativas do cerrado e tem recebido grande atenção dos pesquisadores, em face do potencial de se tornar uma cultura comercial (PEREIRA et al., 2008). Trata-se de uma planta predominantemente alógama, com altura variando de 6-8 m e diâmetro da copa chegando aos 2-4 m (Figura 1A). As flores (Figura 1B) são geralmente solitárias, axilares, dotadas de pétalas carnosas de coloração verde-amarelada, são hermafroditas e apresentam protoginia e termogênese. Sua floração ocorre predominantemente durante os meses de outubro e novembro (SOARES et al., 2009).

A frutificação inicia-se em novembro, com a maturação dos frutos

concentrada entre os meses de janeiro a abril (SOARES et al., 2009). A produção dos frutos é pequena e irregular, além de toda a planta sofrer intenso ataque de insetos. A associação com grande número de espécies de insetos pode ser responsável, em parte, pela inviabilidade das flores e frutos desta espécie (BRAGA FILHO et al., 2009).

A comercialização dos frutos de *A. crassiflora* tem sido realizada às margens das rodovias, em mercados e feiras regionais (SOARES JÚNIOR et al., 2007). Quando maduros (Figura 1C) apresentam cheiro característico, são desuniformes, com grandes variações de massa, forma e volume. São muito apreciados para o consumo *in natura* ou processados na forma de sorvetes, picolés, geleias e polpa (BRAGA FILHO et al., 2009; PEREIRA et al., 2008; ROSELL; SAÚCO; HERRERO, 2006).

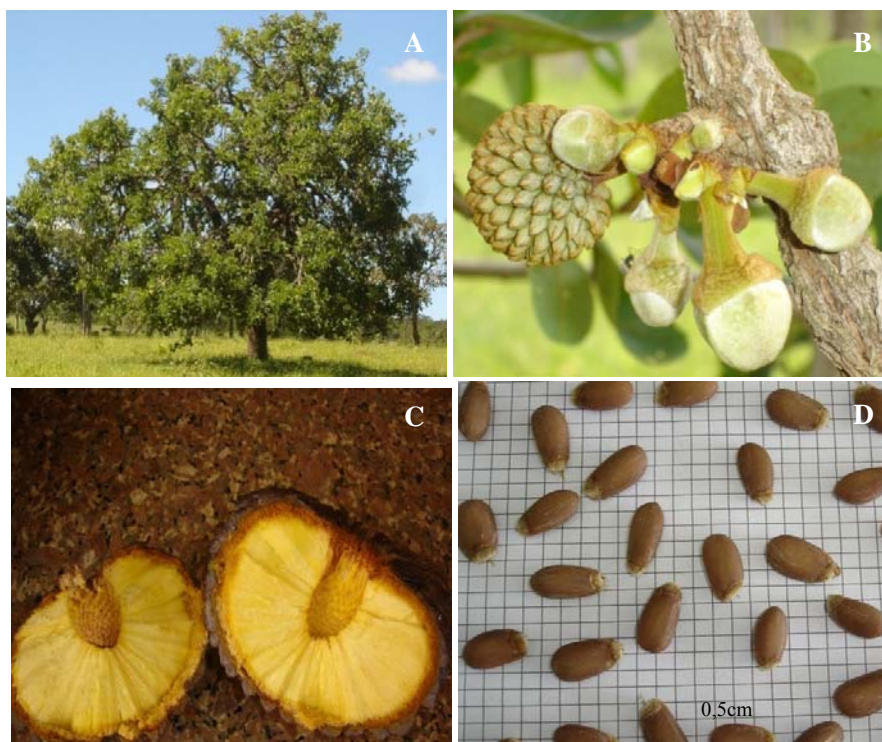


Figura 1 *Annona crassiflora* Mart.

Nota: A- visão geral da árvore; B- flores; C- fruto maduro; D- sementes.

Fonte: arquivo do autor

A sazonalidade é uma característica marcante na produção de frutos dessa espécie. Em média, uma planta adulta produz de 5 a 20 frutos, mas há casos de produzir até 40 frutos que, despolidos, rendem de 50% a 60% de polpa. Esta produção é potencializada quando a árvore é cultivada em regiões quentes, de baixa precipitação pluviométrica e estação seca bem definida (SOARES et al., 2009).

Suas sementes (Figura 1D) são relativamente grandes, formadas basicamente de endosperma; a testa é espessa e rígida, mas o hilo é bem aberto e

permeável ao ar e à água. A dispersão das sementes é realizada por animais durante a estação chuvosa, entre novembro e março (SOARES et al., 2009).

A germinação das sementes de *A. crassiflora* ocorre com dificuldade, em condições de campo levam de 230 a 300 dias, em decorrência da dormência fisiológica. Esse tipo de dormência pode ser quebrado pela ação de giberelinas exógenas, uma vez que o embrião é completamente maduro na época da dispersão das sementes (SILVA et al., 2007).

A casca e as sementes do fruto apresentam compostos que possuem excelente atividade antioxidante; a polpa do fruto maduro é usada como adstringente e tônico, e a infusão de folhas e sementes é também utilizada contra a sífilis, reumatismo, no combate à diarreia e no tratamento de picada de cobra. Em algumas localidades, o uso dessas sementes contra afecções parasitárias do couro cabeludo é comum (PEREIRA et al., 2008; ROESLER et al., 2007a; SOARES et al., 2009).

A ampla utilização de plantas nativas para fins medicinais nos países em desenvolvimento como o Brasil intensifica a necessidade de estudos de toxicidade e mutagenicidade desses vegetais, de forma que sua utilização seja mais cautelosa e segura (LUBINI et al., 2008).

Entretanto, a despeito das muitas possíveis aplicações terapêuticas de *A. crassiflora*, e de sua utilização na medicina popular, existem poucos estudos considerando a citotoxicidade dessa espécie. Vilar et al. (2008) mostraram que o extrato etanólico das folhas de *A. crassiflora* apresentou atividade citotóxica e antimutagênica pelo teste do micronúcleo em camundongos, enquanto Santos et al. (1996) demonstraram que a araticulina, um composto isolado das sementes de *A. crassiflora*, mostrou-se citotóxica frente a diversos tipos de células tumorais humanas. Roesler et al. (2007b) relataram a atividade antioxidante do extrato etanólico da semente e da casca de *A. crassiflora*.

2.2 Aspectos citogenéticos da família Annonaceae

Os estudos citogenéticos no Brasil, especialmente a partir dos anos noventa, passaram a abordar aspectos da evolução cariológica em diversos grupos de plantas. Todavia, em relação às frutíferas nativas, são raros os estudos abordando aspectos de sua variabilidade cromossômica (ÉDER-SILVA; FÉLIX; BRUNO, 2007).

O número cromossômico e os parâmetros cariotípicos, tais como a forma e o tamanho dos cromossomos, entre outros, são de grande importância, fornecendo caracteres para estudos taxonômicos (COSTA; FORNI-MARTINS, 2007). Além de sua utilização taxonômica, dados citogenéticos são ferramentas valiosas para a compreensão das relações de afinidade e dos mecanismos de evolução cariotípica entre as espécies relacionadas (GUERRA, 2000).

Apesar da grande diversidade da família Annonaceae, a citogenética de suas espécies é pouco estudada. A maioria dos trabalhos descreve sobre o número cromossômico ou a viabilidade polínica (BETTIOL NETO et al., 2009; MORAWETZ, 1984; NIETSCHE et al., 2009; ROSELL; SAÚCO; HERRERO, 2006; SAUER; EHRENDORFER, 1984). Estudos sobre a palinologia das espécies também são encontrados (DOYLE; THOMAS, 1997a, 1997b; LORA et al., 2009; LORA; HERRERO; HORMAZA, 2009; TSOU; FU, 2007).

Na família Annonaceae, alguns gêneros são diploides com números básicos de $x=7$, $x=8$, $x=9$ ou $x=13$, enquanto outros apresentam poliploidia (FOLORUNSO; OLORODE, 2007). Ainda assim, considerando a base primitiva e a amplitude de diferenciação evolutiva, a família Annonaceae parece bastante conservada em relação à poliploidização quando comparada a famílias de angiospermas mais recentes (SAUER; EHRENDORFER, 1984).

O gênero *Annona* apresenta uma grande diversidade genética, refletindo os diferentes centros de origem de muitas das espécies. Algumas espécies são

diploides com $2n=14$ cromossomos - *A. cherimola*, *A. cacans*, *A. reticulata*, *A. squamosa*, *A. muricata* e atemoia (*A. cherimola* x *A. squamosa*) - outras são tetraploides com $2n=28$ cromossomos - *A. glabra* e *A. lutescens* - ou ainda, hexaploides com $2n=42$ cromossomos - *A. coriaceae* (BENNETT; LEITCH, 2010; FOLORUNSO; OLORODE, 2007; NAKASONE; PAULL, 1998; SAUER; EHRENDORFER, 1984).

2.3 Conteúdo de DNA no gênero *Annona*

As primeiras tentativas de estimar quantidades de DNA das células (CASPERSSON; SCHULTZ, 1938) precederam a descoberta do papel central do núcleo na hereditariedade. Uma constância de quantidade de DNA por organismo foi estabelecida e o termo “valor C” foi cunhado por Swift (1950), referindo-se ao conteúdo de DNA de um complemento cromossômico haploide não replicado-n (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

A quantidade de DNA nuclear e o tamanho do genoma são importantes caracteres da biodiversidade, cujo estudo fornece um forte elemento de unificação na biologia com utilizações preditivas e práticas (BENNETT; LEITCH, 2005b). A determinação da quantidade de DNA nuclear pode ser realizada por diferentes técnicas, incluindo: extração química, microdensitometria de Feulgen, citometria de fluxo, cinética de reassociação, eletroforese em gel de campo pulsado e sequenciamento completo do genoma. Dessas técnicas, a microdensitometria de Feulgen e a citometria de fluxo, contribuíram para mais de 96% das estimativas em espécies de angiospermas e parece claro que a citometria de fluxo permanecerá como o método dominante para estimar os valores de C DNA (BENNETT; LEITCH, 2011).

A técnica de citometria de fluxo apresenta algumas vantagens que justificam seu uso em plantas. A facilidade e a rapidez no preparo das amostras

permitem que um grande número de núcleos seja analisado automaticamente. Além do mais, como a técnica não requer que as células estejam em divisão, a estimativa do conteúdo de DNA pode ser feita praticamente em qualquer material vegetal (BENNETT; LEITCH, 1995).

A citometria de fluxo representa uma importante ferramenta que, aliada à citogenética clássica traz grandes contribuições ao melhoramento genético, de modo especial, no manejo de grandes coleções de germoplasma e no monitoramento dos níveis de ploidia em resultados de cruzamentos (SCHIFINO-WITTMANN, 2001).

Diversos trabalhos têm atualizado as informações sobre as determinações das quantidades de DNA nuclear em angiospermas (BENNETT; BHANDOL; LEITCH, 2000; BENNETT; LEITCH, 1995, 1997, 2005a, 2011; BENNETT; SMITH, 1976). Nas angiospermas, os valores C são conhecidos para cerca de 6.300 espécies, sendo que esses variam de menos de 0,1pg em *Genlisea margaretae* a 152,23 pg em *Paris japonica* (BENNETT; LEITCH, 2011).

A quantidade de DNA dentro de um mesmo gênero de plantas pode variar devido à presença de cromossomos extranumerários, heterocromatina ou poliploidia (SCHIFINO-WITTMANN, 2001). No gênero *Annona*, poucas espécies já tiveram seus valores C estabelecidos: *A. sericea* (C= 0,68 pg); *A. cacans* (C= 1,0 pg); *A. lutescens* (C= 1,0 pg); *A. squamosa* (C= 1,23 pg); *A. reticulata* (C= 1,33 pg) e *A. glabra* (C= 1,35 pg) (BENNETT; LEITCH, 2010).

REFERÊNCIAS

- BENNETT, M. D.; BHANDOL, P.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses: 807 new estimates. **Annals of Botany**, Oxford, v. 86, n. 4, p. 859-909, 2000.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. **Angiosperm DNA C-values database**. Version 7.0. Oxford: Royal Botanic Society, 2010. Disponível em: <<http://www.kew.org/cvalues/>>. Acesso em: 2 jul. 2012.
- _____. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, Oxford, v. 76, n. 2, p. 113-176, 1995.
- _____. Nuclear DNA amounts in angiosperms: 583 new estimates. **Annals of Botany**, Oxford, v. 80, n. 2, p. 169-196, 1997.
- _____. Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 1, p. 45-90, Jan. 2005a.
- _____. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. **Annals of Botany**, Oxford, v. 107, n. 3, p. 467-590, 2011.
- _____. Plant genome size: a field in focus. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 1, p. 1-6, Jan. 2005b.
- BENNETT, M. D.; SMITH, J. B. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 27, n. 274, p. 227-274, 1976.
- BETTIOL NETO, J. E. et al. Viabilidade e conservação de pólen de três anonas comerciais. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 4, p. 825-837, 2009.
- BRAGA FILHO, J. R. et al. Fruit production and environment characterization of the occurrence of native plants of araticum in the cerrado of Goiás state. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 461-473, 2009.
- CASPERSSON, T.; SCHULTZ, J. Nucleic acid metabolism of the chromosomes in relation to gene reproduction. **Nature**, London, v. 142, p. 294, 1938.

CHATROU, L. W. et al. A new higher-level classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 169, p. 5-40, Jan. 2012.

COSTA, I. R.; FORNI-MARTINS, E. R. Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 155, n. 4, p. 571-580, 2007.

COUVREUR, T. L. P. et al. Keys to the genera of Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 169, p. 74-83, Jan. 2012.

DOLEZZEL, J.; BARTO, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 1, p. 99-110, 2005.

DOYLE, J. A.; LE THOMAS, A. Phylogeny and geographic history of Annonaceae. **Geographie Physique et Quaternaire**, Paris, v. 51, n. 3, p. 353-361, 1997a.

_____. Significance of palynology for phylogeny of Annonaceae: experiments with removal of pollen characters. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 206, n. 1/4, p. 133-159, 1997b.

EDER-SILVA, E.; FÉLIX, L. P.; BRUNO, R. L. A. Citogenética de algumas espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 110-114, 2007.

FOLORUNSO, A. E.; OLORODE, O. Karyotype studies in some species of the family Annonaceae. **Ife Journal of Science**, Nigeria, v. 9, n. 2, p. 161-166, 2007.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, Dec. 2000.

LORA, J. et al. Pollen development in *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae): implications for the evolution of aggregated pollen. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, p. 129-134, Oct. 2009.

LORA, J.; HERRERO, M.; HORMAZA, J. I. The coexistence of bicellular and tricellular pollen in *Annona cherimola* (Annonaceae): implications for pollen evolution. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 96, n. 4, p. 802-808,

2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 2 v.

LUBINI, G. et al. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**, Lahore, v. 63, n. 5, p. 647-651, Oct. 2008.

MAAS, P. J. M. et al. Annonaceae from central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 1, p. 61-94, 2001.

MORAWETZ, W. How stable are genomes of tropical woody plants?: heterozygosity in C-banded karyotypes of *Porcelia* as compared with *Annona* (Annonaceae) and *Drimys* (Winteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 145, p. 29-39, 1984.

NAKASONE, H. Y.; PAULL, R. E. Annonas. In: _____. **Tropical fruits**. London: CAB International, 1998. p. 45-75.

NIETSCHKE, S. et al. Viabilidade dos grãos de pólen de flores de pinheira (*Annona squamosa*) em diferentes horários. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 527-531, mar./abr. 2009.

PEREIRA, M. F. et al. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian cerrado fruit tree species. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 1329-1331, 2008.

PINTO, M. C. R. et al. **Annona species**. Southampton: International Centre for Underutilised Crops, 2005. 268 p.

RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M. **Tecnologia da produção do marolo**. Lavras: UFLA, 2005. Disponível em:
<[HTTP://www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol_104.pdf](http://www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol_104.pdf)>. Acesso em: 5 maio 2012.

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray Ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 3, p. 1048-1054, 2007a.

_____. Antioxidant activity of cerrado fruits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007b.

ROSELL, P.; SAÚCO, V. G.; HERRERO, M. Pollen germination as affected by pollen age in cherimoya. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 97-100, Feb. 2006.

SANTOS, L. P. et al. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 705-707, 1996.

SAUER, W.; EHRENDORFER, F. Notes on the karyosystematics of Annonaceae. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 146, p. 47-55, 1984.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 897-902, set./out. 2001.

SILVA, E. A. A. et al. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of Botany**, Oxford, v. 99, n. 5, p. 823-830, 2007.

SOARES, F. P. et al. **Marolo**: uma frutífera nativa do cerrado. Lavras: UFLA, 2009. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_82.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2012.

SOARES JÚNIOR, M. Filmes plásticos e ácido ascórbico na qualidade de araticum minimamente processado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1779-1785, nov./dez. 2007.

SWIFT, H. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 36, p. 643-654, 1950.

TSOU, C. H.; FU, Y. L. Octad pollen formation in *Cymbopetalum* (Annonaceae): the binding mechanism. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 263, n. 1/2, p. 13-23, 2007.

VILAR, J. B. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart.1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 1, p. 141-147, Mar. 2008.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

**ARTIGO 1 Citogenética e conteúdo de DNA nuclear de *Annona crassiflora*
Mart. (ANNONACEAE)**

RESUMO

A família Annonaceae desempenha um importante papel na composição da vegetação brasileira, destacando-se por apresentar espécies endêmicas como *Annona crassiflora* Mart., bastante apreciada pelos habitantes da região do cerrado por suas utilidades alimentícias e medicinais. Considerando que estudos citogenéticos e de conteúdo de DNA nuclear são inexistentes para a espécie, o presente trabalho objetivou caracterizar o padrão cariotípico, o tipo de núcleo interfásico, a atividade nucleolar, a quantidade de DNA nuclear e o comportamento meiótico de *A. crassiflora*. Os cromossomos metafásicos e os núcleos interfásicos foram obtidos pela técnica de secagem à chama e coloração com Giemsa 1%, para a análise da atividade nucleolar, as lâminas foram coradas com nitrato de prata 50%. Para a análise meiótica as lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com carmim propiônico 2%. A viabilidade polínica foi determinada por testes de coloração com os corantes de Alexander e Carmim propiônico. A determinação da quantidade de DNA foi feita por citometria de fluxo, utilizando o tampão Marie e como padrão interno de comparação, a espécie *Pisum sativum*. Os dados descritos neste trabalho são inéditos para *A. crassiflora*. As análises revelaram que a espécie apresenta $2n=14$ cromossomos, núcleo interfásico arreticulado, cariótipo simétrico e fórmula cariotípica $6m + 1sm$. O tamanho cromossômico variou de 1,62 a 3,43 μm com complemento haploide médio de 17,41 μm . O número máximo de nucléolos observado foi dois, indicando que a espécie apresenta um par de homólogos com regiões organizadoras do nucléolo ativas. A quantidade de DNA nuclear encontrada foi 1,7 pg/2C. A meiose de *A. crassiflora* mostrou-se regular, a espécie apresentou $n=7$ cromossomos, com formação de bivalentes na diacinese e segregação cromossômica regular nas anáfases I e II. Foi observado um bivalente associado ao nucléolo. Os percentuais de índice meiótico e de viabilidade polínica foram superiores a 95%. Os micrósporos de *A. crassiflora* permanecem agrupados em tétrades até o estágio de grãos de pólen maduros. Esses resultados sugerem que do ponto de vista citogenético, *A. crassiflora* é uma espécie basal dentro do gênero *Annona* e que o processo de reprodução sexual da espécie é eficaz.

Palavras-chave: Araticum. Conteúdo de DNA. Meiose. Núcleo interfásico. Número cromossômico. Viabilidade polínica.

ABSTRACT

The Annonaceae family plays an important role in the composition of Brazilian vegetation, being highlighted for presenting endemic species such as *Annona crassiflora* Matr., largely appreciated by the inhabitants of the cerrado region for its feeding and medicinal uses. Considering that cytogenetic and nucleus DNA content studies are inexistent for this species, this work aimed at characterizing the karyotypical pattern, type of interphasic nucleus, nucleolar activity, the quantity of nuclear DNA and *A. crassiflora* meiotic behavior. The metaphasic chromosomes and interphasic nucleus were obtained by means of the flame drying technique and staining with 1% Giemsa and, for the analysis of nucleolar activity, the lamins were stained with 50% silver nitrate. For the meiotic analysis, the lamins were prepared using the squashing technique and stained with 2% propionic carmine. The determination of DNA quantity was done by flow cytometry, using the Marie buffer and, as an internal comparison standard, the *Pisum sativum* species. The data described in this work are unprecedented for *A. crassiflora*. The analyses revealed that the species presents $2n = 14$ chromosomes, arcticate interphasic nucleus, symmetric karyotype and karyotypical formula of $6m+1sm$. Chromosomal size varied from 1.62 to 3.43 μm with an average haploid complement of 17.41 μm . The maximum number observed of nucleoli was two, indicating that the species presents a homologous pair with active nucleolar organizing regions. The quantity of nuclear DNA found was of 1.7 pg/2C. *A. crassiflora* meiosis was regular, the species presented $n=7$ chromosomes, with the formation of bivalents in diakinesis and normal chromosomal segregation in anaphase I and II. A bivalent was observed associated with the nucleolus. The meiotic index and pollen viability percentages were superior to 95%. *A. crassiflora* microspores remained grouped in tetrads until the stage of mature pollen grains. These results suggest that, in the cytogenetic point of view, *A. crassiflora* is a basal species inside the *Annona* genus and that the species' sexual reproduction process is efficient.

Keywords: Araticum. Chromosomal number. DNA content. Interphasic nucleus. Meiosis. Pollen viability.

1 INTRODUÇÃO

Annonaceae é uma família pantropical de árvores, arbustos e lianas que desempenha um papel ecológico importante em termos de diversidade de espécies, especialmente nos ecossistemas de floresta tropical (COUVREUR et al., 2012). Devido à sua posição filogenética entre as angiospermas basais, a família tem sido objeto de considerável interesse de um ponto de vista taxonômico e filogenético (LORA et al., 2009).

Apesar da grande diversidade da família Annonaceae, a citogenética de suas espécies é pouco estudada, a maioria dos trabalhos descreve sobre o número cromossômico (SAUER; EHRENDORFER, 1984) e a viabilidade polínica (BETTIOL NETO et al., 2009; NIETSCHE et al., 2009; ROSELL; SAÚCO; HERRERO, 2006;). Estudos sobre bandeamento cromossômico (MORAWETZ, 1984b; 1986) e palinologia (DOYLE; THOMAS, 1997a, 1997b; LORA et al., 2009; LORA; HERRERO; HORMAZA, 2009; TSOU; FU, 2007) também são encontrados.

Escassos também são os estudos citogenéticos do gênero *Annona*. A descrição do cariótipo de *A. muricata* ($2n=14$), foi realizada por Folorunso e Olorode (2007), entretanto, os demais trabalhos limitam-se à viabilidade dos grãos de pólen (BETTIOL NETO et al., 2009; NIETSCHE et al., 2009; ROSELL, SAÚCO; HERRERO, 2006) e à determinação dos números cromossômicos de algumas espécies como *A. cacans* ($2n=14$); *A. lutescens* ($2n=28$); *A. squamosa* ($2n=14$); *A. reticulata* ($2n=14$) e *A. glabra* ($2n=28$) (BENNETT; LEITCH, 2010; NAKASONE; PAULL, 1998), sem detalhamento da morfologia cromossômica. O conteúdo de DNA nuclear foi descrito para seis espécies do gênero *Annona*, com valores variando de 1,36 a 2,7 pg (BENNETT; LEITCH, 2010).

Dentre as inúmeras espécies da família Annonacea, destaca-se *Annona crassiflora* Mart., uma frutífera endêmica do cerrado brasileiro, muito apreciada pela população local pelo sabor e aroma de seus frutos, e pelo uso medicinal de suas folhas e sementes (BRAGA FILHO et al., 2009; SOARES et al., 2009).

A. crassiflora é uma frutífera que ainda se encontra em estado selvagem e cuja exploração comercial ocorre de forma extrativista e predatória. O extrativismo é lucrativo em função de seus usos múltiplos, mas a exploração descontrolada pode afetar a perpetuação da espécie (RIBEIRO; PASQUAL, 2005). Portanto, *A. crassiflora* tornou-se uma espécie-alvo para pesquisas sobre caracterização genética visando sua conservação. O conhecimento da estrutura das populações nativas é uma forma de orientar as ações futuras, definindo parâmetros de controle adequados (COTA et al., 2011).

Neste sentido, estudos sobre os aspectos citogenéticos de *A. crassiflora* poderão servir de subsídio para o entendimento da biologia da espécie, estudos taxonômicos e de hibridação para a utilização em programas de melhoramento genético de espécies comerciais do gênero *Annona*.

Dessa forma, objetivou-se com o presente trabalho caracterizar o núcleo interfásico, o complemento cromossômico, o comportamento meiótico e determinar o conteúdo de DNA nuclear de *Annona crassiflora* Mart.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Botânico

O material botânico utilizado nesse estudo foi coletado em três localidades da região Centro-Oeste de Minas Gerais (Tab. 1). Exsicatas de *A. crassiflora* foram depositadas no Herbário ESAL da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil e identificadas pelo Dr. Douglas Antônio de Carvalho.

Tabela 1 Localização geográfica dos três pontos de coleta de *Annona crassiflora* Mart.

Localização	Coordenadas geográficas	Altitude (m)	Número exsicata ESAL
Carmo do Cajuru MG	20°11' S 44°46' O	772	16980
Formiga MG (Padre Trindade)	20°27' S 45°25' O	842	16568
Formiga MG (Ponte Vila)	20°33' S 45°36' O	789	16831

2.2 Análise mitótica

Para a análise mitótica sementes de *A. crassiflora* foram imersas em solução de ácido giberélico 500 μ M por seis dias (Silva et al., 2007) e colocadas para germinar sobre areia autoclavada a 23 °C em estufa do tipo BOD.

Para a obtenção das lâminas, raízes com cerca de 5-8 mm foram coletadas e submetidas a tratamento com solução de 8-hidroxiquinoleína, 3 mM

a 8 °C, por 10 horas, fixadas em solução de Carnoy (3 álcool etílico: 1 ácido acético) e armazenadas a -20 °C.

Após a fixação, as raízes foram colocadas em solução enzimática de pectinase e celulase (100/200 U), a 37 °C, por 1 h30 min, para digestão da parede celular. As lâminas foram confeccionadas pelo método de secagem à chama (DONG et al., 2000), coradas com Giemsa 1% por 15 minutos e avaliadas em microscópio de campo claro (Zeiss, modelo Axio Lab), equipado com sistema de captura de imagem (AxioCam ERc5s) para digitalização das imagens.

Para cada local de coleta foram selecionadas cinco metáfases. As imagens digitalizadas foram analisadas utilizando o software Axio Vision 4.8 para a obtenção das medidas do braço curto (c) e longo (l) dos cromossomos. A partir das medidas dos braços foram calculados: comprimento total do cromossomo i ($C_{ti} = l + c$); comprimento total do lote haploide ($CTLH = \sum C_{ti}$); relação de braços ($r = l/c$); índice centromérico ($IC = c/C_{ti} \times 100$) e comprimento relativo de cada cromossomo ($CR = 100 \times C_{ti}/CTLH$). A morfologia cromossômica foi determinada a partir dos valores de relação de braços, conforme Guerra (1986). Os índices obtidos foram também usados para construir o idiograma e o cariograma das populações, bem como para determinar a assimetria cariotípica de acordo com Stebbins (1958) e Zarco (1986).

A classificação da estrutura do núcleo interfásico (1.000 núcleos analisados por população) seguiu a nomenclatura proposta por Guerra (1985).

2.3 Análise da atividade das regiões organizadoras do nucléolo

Para a verificação da atividade das regiões organizadoras do nucléolo (RONs), preparações cromossômicas de células meristemáticas de raízes de *A.*

crassiflora foram submetidas à técnica de coloração com nitrato de prata como descrito por Howell e Black (1980).

2.4 Análise meiótica

Botões florais de *A. crassiflora* foram coletados em vários estádios de desenvolvimento entre 8h30 e 10h, fixados em Carnoy (3 álcool etílico: 1 ácido propiônico) e armazenados a -20 °C.

As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento das anteras, em carmim propiônico 2% e avaliadas em microscópio de campo claro (Zeiss, modelo Axio Lab), equipado com sistema de captura (AxioCam ERc5s) para digitalização das imagens.

A meiose e o índice meiótico foram analisados em 500 meiócitos por população. O índice meiótico (%IM= [número de tétrades normais / total de tétrades] x 100) foi determinado de acordo com Love (1951), sendo consideradas plantas estáveis, aquelas que apresentaram índice meiótico superior a 90%.

2.5 Viabilidade dos grãos de pólen

A viabilidade dos grãos de pólen foi estimada pela capacidade de coloração dos mesmos com Carmim propiônico e com o corante de Alexander (Alexander, 1980). Foram considerados viáveis os pólenes que apresentaram coloração roxa e, inviáveis aqueles com aspecto vazio ou sem coloração. Nas análises de viabilidade de pólen, para cada corante testado, foram avaliadas 10 lâminas e 100 grãos de pólen por lâmina em cada população.

2.6 Quantificação de DNA por meio de citometria de fluxo

A determinação da quantidade de DNA nuclear de *A. crassiflora* foi realizada a partir de tecido foliar de quatro indivíduos por população. Para cada amostra, foram utilizadas de 20-30 mg de folhas jovens, sendo utilizadas como padrão interno de referência, folhas jovens de *Pisum sativum*. As amostras foram trituradas em placa de Petri contendo 1 mL de tampão Marie gelado para a obtenção da suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997), e coradas com 25 µL de iodeto de propídeo (1 mg.L⁻¹). Para cada amostra foram analisados pelo menos 10.000 núcleos. Os histogramas foram obtidos no citômetro FACS Calibur (Becton Dickinson) com o programa Cell Quest (Becton, Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados no software WinMDI 2.8 (2009).

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

2.7 Análise estatística

Os dados de CTLH, índice meiótico, viabilidade polínica e conteúdo de DNA nuclear foram submetidos à análise de variância e teste F utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS

Não foi verificada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os indivíduos das três localidades de coleta de *A. crassiflora* avaliadas neste estudo, dessa forma, os resultados serão apresentados para a espécie.

Os núcleos interfásicos de *A. crassiflora* foram caracterizados como arreticulados, com coloração mais escura dos cromocentros que contrastam com a eucromatina fracamente corada e difusa (Figura 1A). O número cromossômico encontrado foi $2n=14$ (Figura 1B).

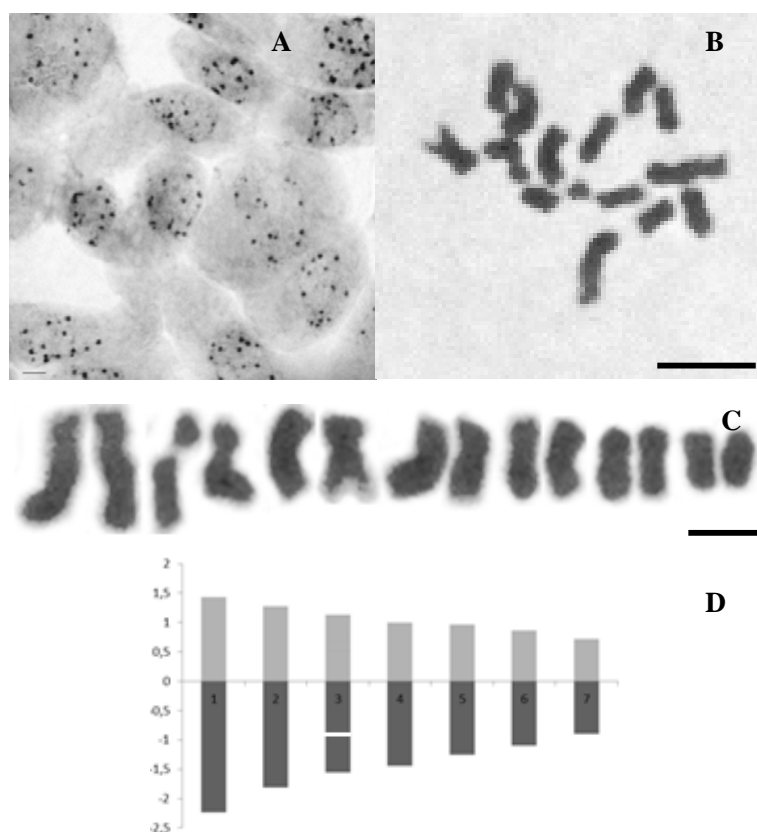


Figura 1 *Annona crassiflora* Mart. (A) núcleos interfásicos arreticulados; (B). metáfase mitótica ($2n=14$). (C) cariograma. (D) ideograma

Nota: Barra=5 µm.

Annona crassiflora apresenta cromossomos metacêntricos e submetacêntricos com fórmula cariotípica $1\text{ sm} + 6\text{ m}$ (Tabela 2). A presença de constrição secundária foi observada no braço curto do terceiro par cromossômico (Figura 1B e C). Com relação à média dos comprimentos cromossômicos, o menor valor obtido foi 1,62 µm e o maior valor 3,43 µm.

Os índices de assimetria quanto à posição do centrômero (A1) e ao tamanho dos cromossomos (A2) apresentaram valores médios de 0,26 e de 0,1,

respectivamente (Tabela 3), revelando um cariótipo predominantemente simétrico, com diminuição gradual de tamanho (Figura 1C e D). A classificação segundo Stebbins (1958) também sugere simetria cariotípica (Tabela 3), uma vez que *A. crassiflora* foi classificada na categoria 1a (inexistência de cromossomos com razão de braços (BL/BC) maior que 2 e razão entre o maior e o menor cromossomo menor que 2).

A coloração com nitrato de prata, utilizada para inferir sobre a atividade nucleolar de genes ribossomais encontrados nas regiões organizadoras dos nucléolos (RONs) e para a demonstração do número máximo de nucléolos (SUMNER, 2003), indicou que o número máximo de nucléolos observados em *A. crassiflora* é dois, sendo possível verificar diferenças no número e tamanho dessas estruturas (Figura 2).

Tabela 2 Relação de braços e índice centromérico dos cromossomos de *A. crassiflora* Mart. coletada em três localidades de Minas Gerais

Cromossomo	Comprimento relativo médio			Relação de braços (classificação cromossômica)			Índice centromérico (classificação cromossômica)		
	Cajuru	P.Trindade	P. Vila	Cajuru	P.Trindade	Ponte Vila	Cajuru	P.Trindade	P. Vila
1	20,27	18,32	20,87	1,58 (sm)	1,51 (sm)	1,58 (sm)	38,70(sm)	34,73(sm)	38,79(sm)
2	17,23	17,63	17,51	1,35 (m)	1,42 (m)	1,49 (m)	42,39(m)	41,34(m)	40,20(m)
3	15,22*	15,48*	15,76*	1,34 (m)	1,29 (m)	1,49 (m)	42,82(m)	43,61(m)	40,10(m)
4	13,91	14,63	13,46	1,42 (m)	1,48 (m)	1,41 (m)	41,23(m)	40,30(m)	41,33(m)
5	12,70	13,27	12,17	1,17 (m)	1,46 (m)	1,26 (m)	45,93(m)	40,61(m)	44,27(m)
6	11,36	11,40	11,17	1,28 (m)	1,18 (m)	1,35 (m)	43,69(m)	45,80(m)	42,52(m)
7	9,31	9,27	9,05	1,21 (m)	1,35 (m)	1,20 (m)	45,21(m)	42,50(m)	45,56(m)

Nota: . m= metacêntrico; sm= submetacêntrico

*Presença de constrição secundária

Tabela 3 Morfometria cromossômica de *A. crassiflora* Mart. coletada em três localidades de Minas Gerais

Localidade	2n	Ct		FC	CTLH	A ₁	A ₂	St.
		Intervalo	ma ± s _m					
Carmo do Cajuru	14	3,40-1,63	2,42±0,18	1sm + 6m	16,93	0,24	0,1	1a
Padre Trindade	14	3,43-1,73	2,67±0,27	1sm + 6m	18,70	0,28	0,1	1a
Ponte Vila	14	3,46-1,50	2,37±0,22	1sm + 6m	16,60	0,28	0,1	1a

Nota: . Comprimento total do cromossomo (Ct); fórmula cariotípica (FC); comprimento total do lote haploide (CTLH); índice de assimetria intracromossômica (A₁) e índice de assimetria intercromossômica (A₂) segundo Zarco (1986); assimetria cariotípica segundo Stebbins – St. (1958); ma = média aritmética e s_m= desvio padrão da média em µm; sm = submetacêntrico e m = metacêntrico.

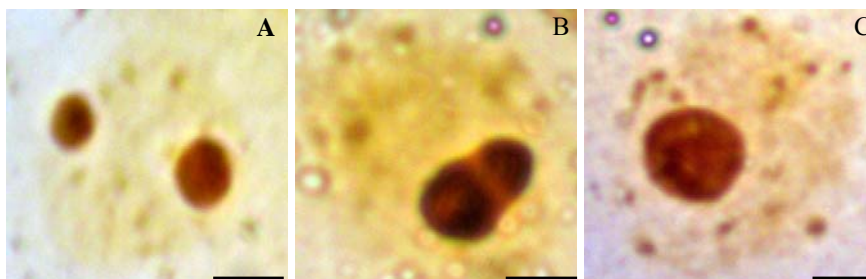


Figura 2 Núcleos interfásicos de *A. crassiflora* corados com nitrato de prata

Nota: (A) núcleo interfásico com dois nucléolos; (B) fusão de nucléolos; (C) núcleo interfásico com um nucléolo grande. Barra=5 μ m.

O tamanho ideal dos botões florais para a análise meiótica variou de 3 a 4 mm. O comportamento meiótico dessa anonácea mostrou-se regular e foi descrito pela primeira vez.

A espécie apresentou $n=7$ bivalentes nas diacineses e segregação regular nas anáfases I e II (Figura 3). Foram observados alto índice meiótico (95,93%) e altas porcentagens de viabilidade polínica nos testes realizados com os corantes de Alexander (96,72%) e Carmim propiônico (96,48%) (Tabela 4). Os micrósporos de *A. crassiflora* permanecem agrupados em tétrades até o estágio de grãos de pólen maduros (Figura 4).

Tabela 4 Índice meiótico (IM) e porcentagem de pólen viáveis (PV) determinada por testes de coloração para três localidades de coleta de *A. crassiflora* Mart. de Minas Gerais

Localidade	IM (%)	PV (%)	
		Alexander	Carmim propiônico
Carmo do Cajuru	95,79	95,79	96,69
Padre Trindade	96,79	97,13	96,46
Ponte Vila	95,20	97,25	96,28
Médias	95,93	96,72	96,48

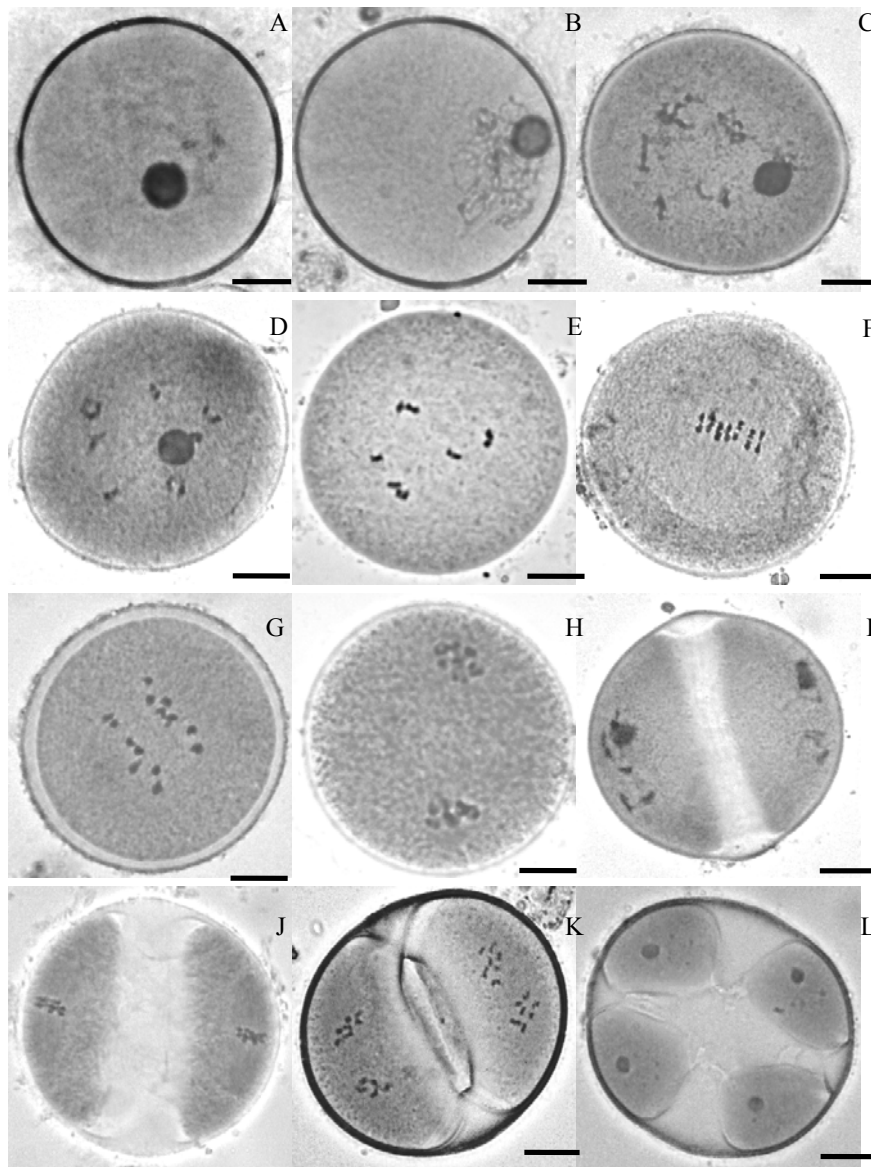


Figura 3 Meiose em *Annona crassiflora* Mart.

Nota: (A) leptóteno; (B) zigóteno; (C) paquíteno; (D) Diplóteno; (E) diacinese (n=7); (F) metáfase I (n=7); (G) anáfase I; (H) telófase I; (I) prófase II; (J) metáfase II; (K) anáfase II; (L) jovens micrósporos. Barra 10 μm .

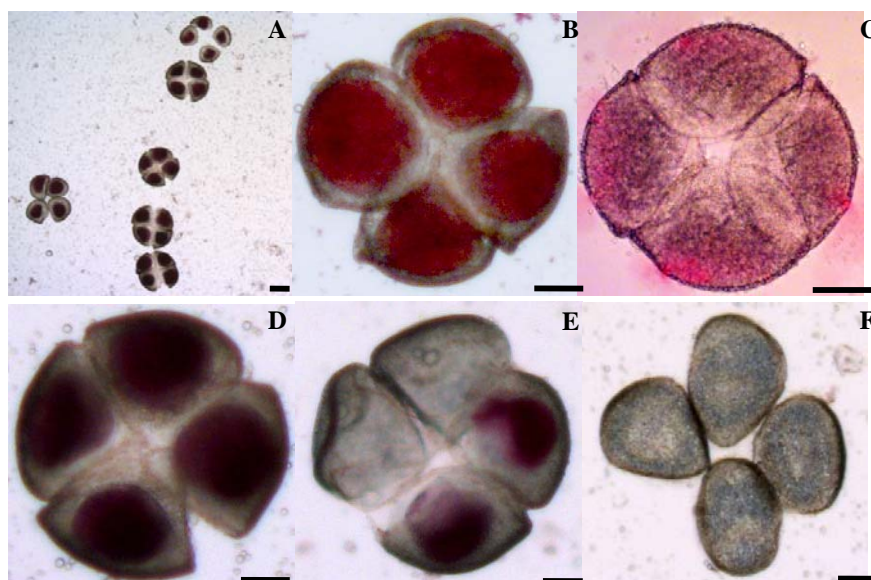


Figura 4 Grãos de pólen maduros de *A. crassiflora*.

Nota: (A) Visão geral; (B) grãos de pólen viáveis corados com Carmim; (C) grãos de pólen inviáveis corados com Carmim; (D) grãos de pólen viáveis corados com Alexander; (E-F) grãos de pólen inviáveis corados com Alexander. Barra=50 μ m.

A quantidade média de DNA (pg/2C) encontrada para *A. crassiflora* (Tabela 5) foi de 1,7 pg. Foram avaliados cerca de 10.000 núcleos por localidade, sendo que picos bem definidos foram observados (Figura 5).

Tabela 5 Médias das quantidades de DNA (pg/2C) obtidas por citometria de fluxo para três localidades de coleta de *Annona crassiflora* Mart.

População	Quantidade de DNA (pg/2C)	CV (%)
Carmo do Cajuru	1,69	0,59
Padre Trindade	1,72	1,74
Ponte Vila	1,72	1,12

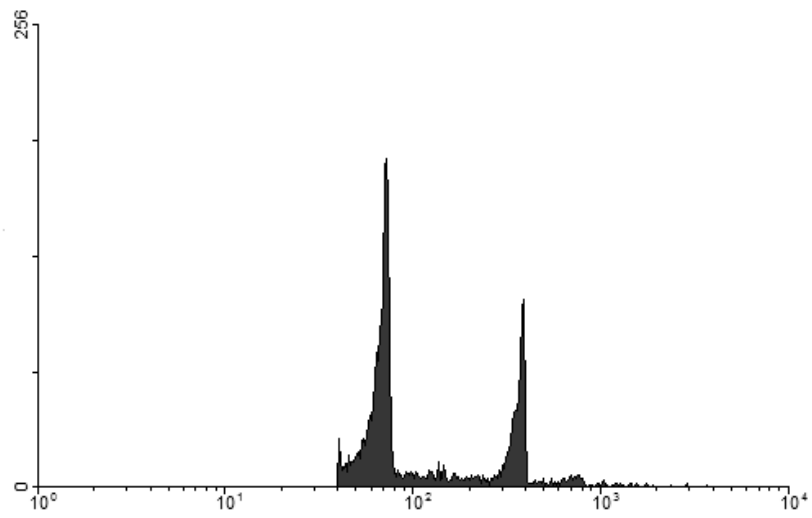


Figura 5 Histograma de citometria de fluxo em núcleos de *A. crassiflora*

Nota: O primeiro pico do histograma refere-se ao pico G1 de *A. crassiflora* e o segundo pico refere-se ao pico G1 do padrão (*Pisum sativum*).

4 DISCUSSÃO

A família Annonaceae é uma das maiores entre as angiospermas basais e de apreciável importância econômica como fonte de frutos comestíveis tanto em relação a espécies nativas como *Annona crassiflora* Mart. quanto a espécies introduzidas, como a fruta do conde (*Annona squamosa* L.), a graviola (*A. muricata* L.), a fruta da condessa (*A. reticulata* L.) e a cherimoia (*A. cherimola* Mill.) que são amplamente cultivadas e comercializadas (LORENZI; MATOS, 2008). Apesar da reconhecida importância, estudos sobre a citogenética do gênero *Annona* são incipientes, sobretudo no Brasil.

O número cromossômico $2n=14$ descrito neste trabalho para *A. crassiflora* é inédito e corrobora os resultados encontrados para outras espécies do gênero *Annona* (BENNETT; LEITCH, 2010; FOLORUNSO; OLORODE, 2007; SAUER; EHRENDORFER, 1984), confirmando $x=7$ como número cromossômico básico do gênero.

Os dados de morfometria cromossômica de *A. crassiflora* (1sm+6m) diferem daqueles obtidos por Folorunso e Olorode (2007) para *A. muricata* ($2n=14$) que aplicando a metodologia de Guerra (1986), apresenta três cromossomos metacêntricos e quatro submetacêntricos. A diferença na morfologia cromossômica observada entre *A. crassiflora* e *A. muricata* pode ser justificada pela provável ocorrência de alterações cromossômicas estruturais.

Para o presente trabalho, o número máximo de nucléolos observado foi dois, o que permite inferir que *A. crassiflora* apresenta um par de RONS ativas. Foi possível observar que alguns núcleos mostraram uma variação quanto ao número e ao tamanho dos nucléolos, sugerindo a ocorrência de fusão nucleolar (Figura 2), fato corroborado por Shaw e Brown (2012), que afirmaram que em plantas, nucléolos pequenos muitas vezes se fundem em um nucléolo único

conforme a intérfase avança. Esses resultados corroboram a existência de um par de cromossomos com constrição secundária para *A. crassiflora*.

O núcleo interfásico de *A. crassiflora*, classificado como arreticulado com cromocentros bem definidos, também foi descrito por Sauer e Ehrendorfer (1984) para *Annona coriacea* ($2n=42$). Os resultados do presente estudo concordam com os relatados por Guerra (2000) sobre o tamanho dos cromossomos. Segundo o autor, as espécies que apresentam cromossomos pequenos, geralmente possuem núcleos arreticulados.

Além do tamanho do cromossomo, outros fatores podem interferir na organização da cromatina no núcleo interfásico, incluindo a distribuição de seqüências repetitivas, a quantidade e a distribuição de heterocromatina, o padrão de condensação na prófase e o conteúdo de DNA nuclear (Guerra, 1987).

De acordo com Guerra (1988) espécies com núcleo interfásico arreticulado geralmente apresentam pouca quantidade de DNA. O valor C médio obtido para *A. crassiflora* ($C=0,85$) é concordante com os limites observados para outras espécies do gênero *Annona*, cujos valores mínimo e máximo foram 0,68 e 1,35 pg, respectivamente. As médias dos coeficientes de variação (CV) obtidas foram próximas de 1,15%, o que demonstra a qualidade dos resultados obtidos e a confiabilidade nas estimativas de quantificação de DNA, uma vez que valores de até 2% são considerados de alta qualidade (MARIE; BROW, 1993).

Este estudo também valida a utilização de *A. crassiflora* em processos de hibridação e em programas de melhoramento genético de cultivares comerciais do gênero *Annona*, pois, considerando que o índice meiótico é um complemento para a análise meiótica e um indicador de regularidade (LOVE, 1951), pode-se afirmar que *A. crassiflora* é uma espécie meioticamente estável com produção de gametas masculinos balanceados. A observação de sete

bivalentes nas três populações avaliadas neste estudo confirma $x=7$ como número básico de *A. crassiflora*.

O elevado percentual de pólenes funcionais observados (96,6%) está associado à regularidade meiótica de *A. crassiflora*. Resultados semelhantes foram encontrados por Bettiol-Neto et al. (2009) que também observaram altos índices de viabilidade polínica para as anonas comerciais *Annona cherimola* Mill. (99,23%), *Annona squamosa* L. (94,32%) e o híbrido *Annona cherimola* x *Annona squamosa* (86%). A alta frequência de regularidade meiótica na flora de uma formação como o cerrado, pode indicar que a maioria das alterações numéricas e hibridações que poderiam ter ocorrido já se estabilizaram, o que implica que o processo de reprodução sexual da espécie é eficaz (FORNI-MARTINS et al., 1992).

Um dos motivos que podem contribuir para a eficácia da reprodução sexual de *A. crassiflora* é o fato dos micrósporos permanecerem agrupados em tétrades até o estágio de grãos de pólen maduros. Embora a maioria dos gêneros de Annonaceae produza pólen solitário na maturidade, no gênero *Annona*, 26 espécies liberam pólen agregado em grupos de quatro (COPENHAVER, 2005). Esse tipo de formação parece ter implicação biológica uma vez que as tétrades podem estar relacionadas com polinizadores específicos como os besouros, pois o pólen das anonáceas em geral é pesado e pegajoso (BETTIOL-NETO et al., 2009).

O comportamento meiótico regular e os percentuais elevados de índice meiótico e de viabilidade polínica indicam que o processo reprodutivo de *A. crassiflora* é eficaz, garantindo a conservação da espécie em habitat natural.

5 CONCLUSÕES

A. crassiflora apresenta cariótipo simétrico com $2n=14$ cromossomos, núcleo interfásico arreticulado e meiose regular com 7 bivalentes e alta viabilidade polínica. A análise da atividade nucleolar mostrou que *A. crassiflora* possui um par de cromossomos com RONS ativas.

O padrão cariotípico observado neste trabalho sugere que, do ponto de vista citogenético, *A. crassiflora* é uma espécie primitiva dentro do gênero *Annona* e que rearranjos cromossômicos provavelmente ocorreram nesse gênero uma vez que outras espécies apresentam cariótipos mais assimétricos.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v. 55, p. 13-18, 1980.
- BENNETT, M.D.; LEITCH, I. J. Angiosperm DNA C-values database (release 7.0, Dec. 2010). Disponível em: <http://www.kew.org/cvalues/> acesso em 02 de julho de 2012.
- BETTIOL NETO, J. E. et al. Viabilidade e conservação de pólen de três anonas comerciais. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 4, p. 825-837, 2009.
- BRAGA FILHO, J. R. et al. Fruit production and environment characterization of the occurrence of native plants of araticum in the cerrado of Goiás state. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 461-473, 2009.
- COPENHAVER, G.P. A compendium of plant species producing pollen tetrads. **Journal of the North Carolina Academy of Science**, v. 121, p. 17-35, 2005.
- COTA, L. G. et al. Genetic diversity of *Annona crassiflora* (Annonaceae) in northern Minas Gerais State. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 3, p. 2172-2180, 2011.
- COUVREUR, T. L. P. et al. Keys to the genera of Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, p. 74-83, 2012.
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plants genomes. **Journal of Applied Genetics**, Olomouc, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.
- DONG, F., et al. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, 1001-1007, 2000.
- DOYLE, J. A.; LE THOMAS, A. Phylogeny and geographic history of Annonaceae. **Geographie physique et quaternaire**, v. 51, n. 3, p. 353-361, 1997a.
- _____. Significance of palynology for phylogeny of Annonaceae: Experiments with removal of pollen characters. **Plant Systematics and Evolution**, v. 206, n. 1-4, p. 133-159, 1997b.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FOLORUNSO, A.E.; OLORODE, O. Karyotype studies in some species of the family Annonaceae. **Ife Journal of Science**, v. 9, n. 2, p. 161-166, 2007.

FORNI-MARTINS, E. R., PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. Biologia da reprodução em plantas de cerrado: microsporogênese. In: VIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 1., 1992, Campinas. **Anais...** Campinas: SBSP, 1992. p. 77-82.

GUERRA, M. S. Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas. In: COLÓQUIO SOBRE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO DE PLANTAS, 1., 1985, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Genética, 1985. p. 137-153.

_____. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 4, p. 741-743, 1986.

_____. Cytogenetics of rutaceae: IV., structure and systematic significance of interphase nuclei. **Cytologia**, Tokyo, v. 52, p. 213-222, 1987.

_____. Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae) **Plant Systematics and Evolution**, v. 158, p. 107- 115, 1988.

_____. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.4, p.1029-1041, 2000.

HOWELL, W.M., BLACK, D. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 30, n. 9, p. 1014-1015, 1980.

LORA, J.; HERRERO, M.; HORMAZA, J. I. The coexistence of bicellular and tricellular pollen in *Annona cherimola* (Annonaceae): implications for pollen evolution. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 4, p. 802-808, 2009.

LORA, J. et al. Pollen development in *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). Implications for the evolution of aggregated pollen. **BMC Plant Biology**, v. 9, 2009.

LORENZI, H., MATOS, F. J.. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

LÖVE, R.M. Varietal differences in meiotic chromosomes behaviour of brazilian wheats. **Agronomy Journal**, v.43, n.1, p.72-76, 1951.

MARIE, D.; BROWN, S. A. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, v. 78, n. 1-2, p. 41-51, 1993.

MORAWETZ, W. How stable are genomes of tropical woody plants? Heterozygosity in C-banded karyotypes of *Porcelia* as compared with *Annona* (Annonaceae) and *Drimys* (Winteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 145, p. 29-39, 1984.

_____. Remarks on karyological differentiation pattern in tropical woody plants. **Plant Systematics and Evolution**, v. 152, p. 49-100, 1986.

NAKASONE, H. Y.; PAULL, R. E. Annonas. In: **Tropical Fruits**. NAKASONE, H.Y.; PAULL R. E. (Ed.) CAB International, London.UK. p. 45-75, 1998.

NIETSCHKE, L, S. et al. Viabilidade dos grãos de pólen de flores de pinheira (*Annona squamosa*) em diferentes horários. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 527-531, 2009.

RIBEIRO, M. N. O; PASQUAL, M. **Tecnologia da produção do marolo**. Lavras, n. 129, 2005. Disponível em: www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol_104.pdf . Acesso em: 05 maio 2012

ROSELL, P.; SAÚCO, V.G.; HERRERO, M. Pollen germination as affected by pollen age in cherimoya. **Scientia Horticulturae**, v. 109, p. 97–100, 2006.

SAUER, W.; EHRENDORFER, F. Notes on the karyosystematics of Annonaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 146, p. 47-55, 1984.

SHAW, P.; BROWN, J. Nucleoli: Composition, Function, and Dynamics. **Plant Physiology**, v. 158, p. 44–51, 2012.

SILVA, E. A. A. et al. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of Botany**, v. 99, n. 5, p. 823-830, 2007.

SOARES, F. P. et al. **Marolo**: uma frutífera nativa do cerrado. Lavras-MG, n. 82, p. 1-17. 2009. Disponível em:
http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_82.pdf.

STEBBINS, G. L. Longevity, habitat, and release of genetic variability in the higher plants. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**, New York, v. 23, p. 365-378, 1958.

SUMNER, A. T. **Chromosomes**: organization and function. New York: Blacwell Science, 2003, 287p.

TSOU, C. H.; FU, Y. L. Octad pollen formation in *Cymbopetalum* (Annonaceae): the binding mechanism. **Plant Systematics and Evolution**, v. 263, n. 1-2, p. 13-23, 2007.

ZARCO, C. R. A new method for estimating karyotype asymetry. **Taxonomy**, London, v. 35, n. 3, p. 526-530, 1986.

ARTICLE 2 Cytogenotoxic effects of ethanolic extracts of *Annona crassiflora* Mart. (ANNONACEAE)

ARTIGO 2 em português o título

Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Biologia*

**Cytogenotoxic effects of ethanolic extracts of *Annona crassiflora* Mart.
(Annonaceae)**

Lília R. RIBEIRO^{1,2*1}, Maria F. SANTOS¹, Quênia M. SILVA¹, Marcel J. PALMIERI², Larissa F. ANDRADE-VIEIRA³ & Lisete C. DAVIDE²

¹ *Departamento de Ciências Biológicas, Centro Universitário de Formiga, Água Vermelha, 35570-000, Formiga, MG, Brazil; e-mail: lilia@uniformg.edu.br (L. R. Ribeiro)*

² *Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil*

³ *Departamento de Produção Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 29500-000, Espírito Santo, Brazil*

Running title: Cytogenotoxic properties of *Annona crassiflora*

¹ Corresponding author.

Address for correspondence - Departamento de Ciências Biológicas, Centro Universitário de Formiga, Água Vermelha, 35570-000, Formiga, MG, Brazil.
Tel.: +55 37 33291416

Abstract: Infusions of the leaves and seeds of *Annona crassiflora* Mart. (a fruit tree that is native to the Brazilian cerrado) are commonly employed in the treatment of diarrhoea, snakebites, tumours and disorders of the hair and scalp. The aim of the study was to investigate the cytotoxic and genotoxic properties of ethanolic extracts of *A. crassiflora* by evaluating their effects on germination, root elongation, chromosome structure and the cell cycle of *Lactuca sativa*. The experiment followed a randomized design involving the treatment of *L. sativa* seeds with ethanolic extracts from leaves and seeds of *A. crassiflora* applied at ten concentrations (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, and 1.2 mg.L⁻¹) and with five repetitions per treatment. Seeds of *L. sativa* that had been exposed for 48 h to *A. crassiflora* leaf extracts at concentrations ≥ 0.1 mg.L⁻¹, or to seed extracts at concentrations ≥ 0.2 mg.L⁻¹, showed germination percentages that were significantly ($p < 0.05$) lower than those of seeds exposed to aqueous ethanol control. Exposure of *L. sativa* seedlings to leaf (but not seed) extracts of *A. crassiflora* produced significant ($p < 0.05$) reductions in the mitotic indices of root meristem cells of lettuce and induced chromosome and nuclear abnormalities in the root cells. The presence of chromosome stickiness, bridges, fragments, laggard chromosomes and nuclear condensation were also observed. The cytogenetic effects observed suggest that folkloric medicines prepared with extracts of the leaves or seeds of *A. Crassiflora* should be employed with caution.

Keywords: *Annona crassiflora*; araticum; *Lactuca sativa*; germination; root-tip test; chromosomal abnormalities

Resumo:

Palavras-chave:

1 Introduction

The World Health Organization (WHO) asserts that approximately 80% of the population in developing countries rely on traditional practices for basic health care, and that 85% of folklore medicines employed in the treatment of domestic and community ailments are prepared using plant materials (Ministério da Saúde do Brasil 2006). However, medicinal plants may synthesize toxic compounds as part of their natural defence mechanisms against phytopathogens, insects and herbivores (Negrelle & Gomes 2007). On this basis, studies relating to toxicity and mutagenesis are indispensable in order to ensure that plant resources are employed in a safe manner (Lubini et al. 2008).

Although numerous plants from the native Brazilian flora are ingested as food or for medicinal purposes, scientific evidence relating to their pharmacological or toxicological properties is generally scarce or non-existent, a situation that constitutes a serious public health problem (Veiga Júnior et al. 2005). In this context, many species of the family Annonaceae possess important biological properties, including cytotoxic, antitumour, abortive, immunosuppressant, antiemetic, vermifugal, antimicrobial, antimalarial and appetite suppressant activities, and some are employed as natural pesticides (Nascimento et al. 2003). In the case of *Annona crassiflora* Mart., a plant that is endemic to the Brazilian cerrado where it is known as “araticum” or “marolo”, the fruit is edible and much appreciated by the local population. Moreover, the pulp of the ripe fruit is employed as an astringent and a tonic, while infusions of the leaves and triturated seeds are used in the treatment of diarrhoea, snakebites, tumours and disorders of the hair and scalp, and as emmenagogue agents (Pereira et al. 2008; Soares et al. 2009). Despite the numerous potential therapeutic applications of the species and its common use in traditional medicine, few studies have been performed regarding its cytotoxicity. However,

Vilar et al. (2008) demonstrated that ethanolic extracts of leaves from *A. crassiflora* presented cytotoxic and antimutagenic activities, while Santos et al. (1996) showed that araticulin, a compound isolated from *A. crassiflora* seeds, was cytotoxic to human tumour cells.

The cytotoxic effects of plant extracts and essential oils can be evaluated through various cytogenetic assays, including the straightforward and relatively inexpensive root-tip assays (Sobita & Bhagirath 2005; Kuraś et al. 2006; Akinboro & Bakare 2007; Çelik & Äslanturk 2007; Sousa et al. 2009; Sousa & Viccini 2011). Application of plant-based genotoxicity assays is justifiable since the results attained using such systems generally correlate well with those obtained from analogous mammal-based tests (Çelik & Äslanturk 2007). In this context, *Lactuca sativa* L. (lettuce) is widely used in the detection of mutagens and genotoxic compounds in extracts derived from medicinal plants because it exhibits elevated sensitivity to exogenous agents. Furthermore, the *L. sativa* test enables various genetic endpoints to be verified, and allows the determination of mechanism of action of such agents against the DNA of the exposed organisms (Sousa & Viccini 2011).

The objectives of the present study were to evaluate the effects of ethanolic extracts of leaves and seeds of *A. crassiflora* on the germination of seeds of *L. Sativa*, on the elongation of seedling roots, and on the structure and dynamics of chromosomes and nuclei of root meristem cells.

2 Material and methods

2.1 Origin of plant material and preparation of extracts

Mature leaves and seeds of *A. crassiflora* were collected in March 2011 in the municipality of Formiga, Minas Gerais (MG), Brazil. Plant material was authenticated by Dr. D. A. Carvalho (Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil) and voucher specimens (reference

numbers 16568, 16629, 16632, 16646 and 16682) were deposited in the herbarium of the Universidade Federal de Lavras. Leaves were heated in an oven at 40°C until they became brittle, following which they were manually fragmented. Seeds were air-dried at room temperature and subsequently ground to a powder. Extracts were prepared by steeping macerated plant material in absolute ethanol for 7 days, followed by filtration and concentration under reduced pressure at the rotary evaporator. Qualitative chemical analysis of extracts was carried out according to the method described by Matos (1997), while total polyphenolic content was determined using the Folin-Denis method (Association of Official Analytical Chemists 1995) with tannic acid as the reference standard.

2.2 Germination and growth of *L. sativa*

The toxicities of ethanolic extracts of *A. crassiflora* were evaluated by examining their effects on the germination of seeds of *L. sativa* cv. Salad Bowl and on the subsequent growth of the root tips. For each assay, 30 lettuce seeds were transferred to a Petri dish (9 cm diameter) lined with germination paper that had been moistened with 5 mL of the test sample. Incubation was carried out in a biochemical oxygen demand (BOD) incubator at 24°C in the dark, and percentage germination was evaluated every 8 h over a 48 h period. Seeds were considered to have germinated when the radicle protruded through the tegument. After 96 h of incubation, root elongation in the germinated seeds was evaluated using a digital pachymeter. The experiment followed a randomized design involving treatments with ten concentrations (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, and 1.2 mg.L⁻¹) of ethanolic extract in water or with aqueous ethanol (0.03% by volume) as control, and five repetitions were performed for each treatment. Based on the data collected, growth curves were constructed and the concentrations of extracts required for 50% inhibition (IC₅₀) of root-tip elongation were calculated.

2.3 Cytogenetic analysis

Analyses were carried out on roots from seedlings of *L. sativa* that had been treated for 48 h with leaf and seed extracts of *A. crassiflora* at concentrations equivalent to 0.5, 1.0 and 1.5-times the respective IC₅₀ values or with aqueous ethanol as control. The roots were fixed with ethanol/glacial acetic acid (3:1, v/v) for 24 h, washed with distilled water and hydrolysed in 1M hydrochloric acid at 60°C for 10 min. For each treatment, five slides were prepared using the aceto-orcein (2%) squash method (Guerra & Souza 2002) and ten fields were evaluated (totalling 1000 cells/slide) under an Axio Lab.A1 reflected-light microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with an AxioCam ERc5s image capture system. Mitotic indices and frequencies of chromosome and nuclear abnormalities were assessed.

2.4 Statistical analysis

Data were analyzed using R software (R Development Core Team 2009) and the results were expressed as means ± standard deviation (SD) of three independent experiments. Kruskal-Wallis and Dunn post hoc tests were applied to evaluate the significances ($\alpha < 0.05$) of between-treatment differences in percentage germination, root length, mitotic index and frequency of chromosome and nuclear abnormalities. Regression analysis was employed in the determination of IC₅₀ values.

3 Results

Chemical analyses of ethanolic extracts from *A. crassiflora* revealed the presence of various classes of compounds with potential cytotoxic activities. Thus, the leaf extract contained alkaloids, catechins, depsides, depsidones, tannins, steroids and triterpenoids, while alkaloids, coumarin derivatives, depsides and depsidones were detected in the seed extract. Quantitative analyses

revealed that the mean concentrations (\pm SD) of total polyphenols in leaf and seed extracts were 8.7 ± 0.37 and 11.7 ± 3.73 g.100 g⁻¹, respectively.

Seeds of *L. sativa* that had been exposed for 48 h to *A. crassiflora* leaf extracts at concentrations ≥ 0.1 mg.L⁻¹ showed germination percentages that were significantly ($p < 0.05$) lower than those of seeds exposed to aqueous ethanol control. Similar effects were observed with seeds of *L. sativa* that had been exposed to *A. crassiflora* seed extracts at concentrations ≥ 0.2 mg.L⁻¹ (Table 1). In comparison with the control, the largest inhibition of germination (85.81%) was observed following treatment with *A. crassiflora* seed extract at a concentration of 1.2 mg.L⁻¹.

Table 1. Percentage germination of seeds of *Lactuca sativa* exposed for 48 h to ethanolic extracts from leaves and seeds of *Annona crassiflora*

Concentration of extract (mg.L ⁻¹)	Percentage germination after exposure to:	
	Leaf extract (mean \pm	Seed extract (mean \pm SD)
Control (aqueous)	95.33 \pm 1.15	95.56 \pm 1.67
0.0125	93.11 \pm 0.76	95.33 \pm 1.76
0.025	91.78 \pm 2.14	94.44 \pm 1.38
0.05	90.44 \pm 2.34	93.56 \pm 3.08
0.1	80.00 \pm 1.54*	93.26 \pm 3.53
0.2	79.56 \pm 1.7*	88.89 \pm 0.77*
0.4	64.67 \pm 3.02*	88.89 \pm 1.39*
0.6	64.44 \pm 3.16*	85.78 \pm 2.19*
0.8	59.78 \pm 2.52*	66.22 \pm 2.81*
1.0	60.22 \pm 2.69*	45.78 \pm 1.01*
1.2	49.33 \pm 3.90*	13.56 \pm 1.92*

Note: Within each column, values bearing an asterisk are significantly different from those of the corresponding control (Kruskal-Wallis and Dunn post hoc tests; $p < 0.05$).

Leaf and seed extracts from *A. crassiflora* inhibited the elongation of *L. sativa* root tips significantly ($p < 0.05$), and the observed decrease in growth was proportional to the increase in concentration of the extract (Figura 1). The concentrations of leaf and seed extracts required for 50% inhibition (IC_{50}) of root-tip elongation in lettuce were, respectively, 0.1 and 0.6 mg.L⁻¹.

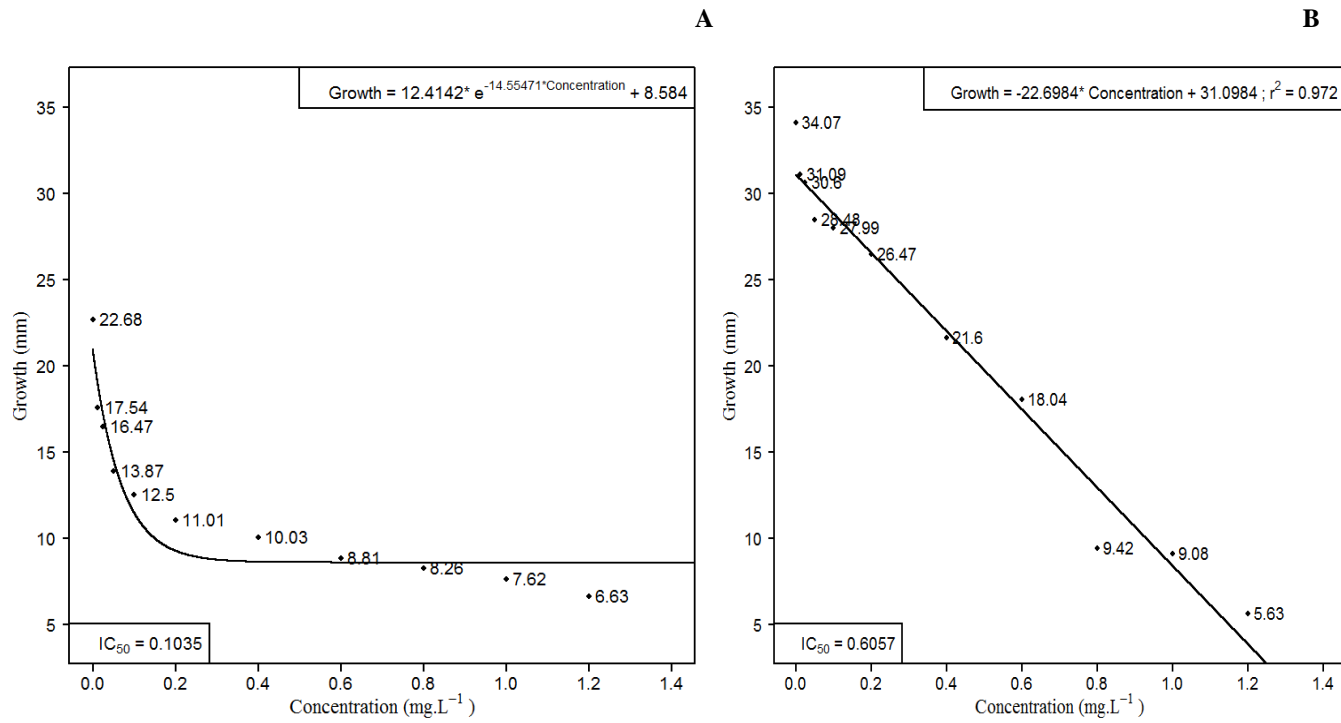


Figure 1. Regression analysis showing the effects of (A) leaf and (B) seed extracts from *Annona crassiflora* on the root tips of *Lactuca sativa*

Cytogenetic analysis revealed that, in comparison with controls, exposure of *L. sativa* seedlings to leaf (but not seed) extracts of *A. crassiflora* at concentrations between 0.5 and 1.5-times IC_{50} , produced significant ($p < 0.05$) reductions in the mitotic indices of root meristem cells (Table 2). In contrast, both leaf and seed extracts induced chromosomal and nuclear abnormalities in lettuce root cells, and these included chromatin bridge formation, delayed chromosome segregation, chromosome loss and stickiness, and nuclear condensation. Such abnormalities may have contributed to the diminution in root growth and the restricted development observed (Figure 2).

Table 2. Cytogenetic analyses of root tips of *Lactuca sativa* exposed to ethanolic extracts from leaves and seeds of *Annona crassiflora*

Treatment	Number of cells in division	Mitotic index	Chromosome abnormalities					Chromosome abnormalities (%)	Nuclear abnormalities (%)
			Chromosome loss	Chromosome retardation	Stickiness	C-metaphase	Bridge formation		
Leaf extract									
0.5 x IC ₅₀	159	3.18±1.19*	1.82±0.76	0	5.37±0.77	1.64±0.71	2.51±0.79	11.34 ± 1.18*	10.6±1.06*
IC ₅₀	229	4.58 ± 1.93*	2.00±0.44	3.28±0.92	4.37±0.33	0.29±0.66	6.68±0.58	16.62 ± 2.67*	7.6±1.58*
1.5 x IC ₅₀	244	4.87 ± 1.45*	1.88±0.87	0.28±0.28	1.57±0.57	1.80±0.81	7.55±0.55	13.08 ± 2.13*	15.4±1.11*
Control	503	10.06 ± 1.32	0	0	0	0	0	0	0
Seed extract									
0.5 x IC ₅₀	437	8.74 ± 1.84	1.67±0.74	1.72±0.45	10.1±1.19	2.06±0.24	3.05±0.60	18.6 ± 1.13*	1.4±1.67*
IC ₅₀	465	9.30 ± 1.2	3.44±0.65	1.79±0.63	7.83±0.35	7.47±0.67	2.67±0.71	23.2 ± 2.98*	2.6±0.97*
1.5 x IC ₅₀	399	7.98 ± 1.4	1.39±0.46	1.42±0.61	4.83±0.9	1.99±0.91	1.97±0.06	11.6 ± 4.72*	14.4±1.57*
Control	544	10.88 ± 1.54	0	0	0	0	0	0	0

Note: Values shown are mean ± SD. For each treatment, and within the same row, values bearing an asterisk are significantly different from those of the corresponding control (Kruskal-Wallis and Dunn post hoc tests; $p < 0.05$).

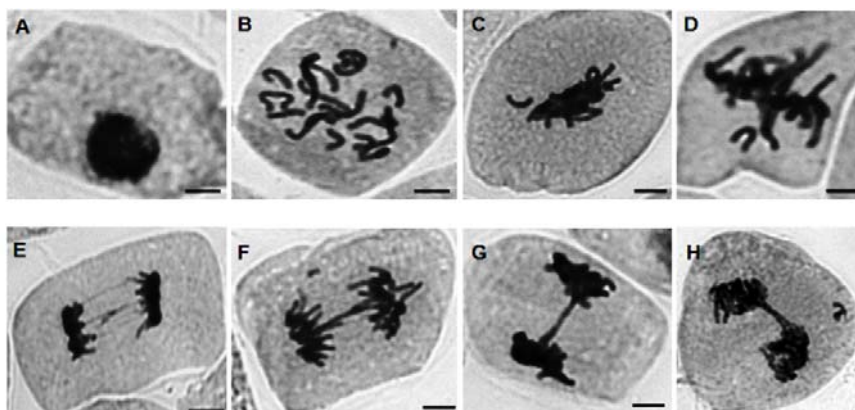


Figure 2. Chromosome and nuclear abnormalities observed in root meristem cells of *Lactuca sativa* that had been exposed to ethanolic extracts from leaves and seeds of *Annona crassiflora* showing: (A) condensed nucleus in interphase cell; (B) C-metaphase; (C) chromosome loss and stickiness in metaphase cell; (D) delay in chromosome alignment in metaphase cell; (E) multiple bridges in anaphase cell; (F) bridge and chromosome fragment in anaphase cell; (G) chromatin bridge in telophase cell; and (H) bridge and chromosome loss in telophase cell. (Bar = 5 μ m).

4 Discussion

The present study has revealed that ethanolic extracts of leaves and seeds from *A. crassiflora* exhibit cytogenotoxic effects, with the activity of the latter being reported here for the first time. Toxicities were established through bioassays involving germination and root elongation of *L. sativa*, as well as by cytogenetic analyses. The results demonstrate that, in comparison with controls, treatment of *L. sativa* seeds with extracts from *A. crassiflora* led to reductions in both germination and root growth, effects that may be associated with the inhibition of mitosis and/or alterations in chromosome and nuclear structures and dynamics.

The mitotic index represents a valuable parameter through which to assess the cytotoxicity of agents in general (Leme & Marin-Morales 2009). In the present

study, leaf extracts of *A. crassiflora* exerted pronounced mitodepressive effects on *L. sativa* root cells when applied at concentrations in the range 0.5 to 1.5-times the IC₅₀ value, giving rise to reductions in mitotic indices of more than 50%. Indeed, treatment of lettuce seeds with *A. crassiflora* leaf extract at a concentration of 0.05 mg.L⁻¹ (0.5-times IC₅₀) led to a reduction in the mitotic index of the root meristem cells by 68.49% (Table 2). This phenomenon may be explained by the impairment of nuclear division in interphase cells and by the demise of such nuclei, thus disrupting the initiation of the prophase and of cell division (Solomon et al. 1999). The present findings corroborate this hypothesis since both leaf and seed extracts of *A. crassiflora* induced nuclear condensation in lettuce root cells, a morphological aspect that is commonly associated with programmed cell death in plants (Solomon et al. 1999).

The toxicity of *A. crassiflora* extracts is most likely due to the presence of alkaloids, phenols and coumarin-type secondary metabolites. It is known, for example, that alkaloids are selective and specific inhibitors of checkpoints in the cell cycle (Pinto et al. 2002), while phenolics can inhibit root development and cell division causing growth retardation and, eventually, plant death (Li et al. 2010). Moreover, coumarins have been shown to initiate dose-dependent inhibition of photosynthesis and glycolysis leading to an overall reduction in cell activity and root elongation (Li et al. 1993). In the present study, the dose-dependent reduction in root growth was clearly evident in *L. sativa* seeds that had been treated with *A. crassiflora* extracts.

Leaf and seed extracts of *A. crassiflora* can also be considered genotoxic since they induced significant ($p < 0.05$) alterations in chromosomes and nuclei of lettuce root meristem cells. The presence of bridges and broken chromosomes are indications of a clastogenic effect, while chromosome loss, delayed alignment/rearrangement and sticky or C-metaphases result from aneugenic effects (Leme & Marin-Morales 2009). In the present study, chromosome

stickiness was frequently observed, particularly in metaphase cells, suggesting that extracts of *A. crassiflora* interfere with the organization of chromatin through an imbalance in the proportion of structural proteins such as the histones (Kuraś et al. 2006). Chromatin bridges were regularly detected in anaphase and telophase cells, and their formation may be attributed to chromosome breakage, stickiness and breakage-fusion-bridge cycles (El Ghamery et al. 2003). Additionally, losses and delayed alignment/rearrangement of chromosomes were observed in metaphase, anaphase and telophase cells that had been exposed to leaf or seed extracts from *A. crassiflora*. Such disruption in cell division results in the unbalanced segregation of chromosomes and gives rise to the formation of daughter cells with irregular interphase nuclei of different sizes (El Ghamery et al. 2003). Since the presence of micronuclei was not observed in the present study, it is possible that missing chromosomes and chromosomal fragments disintegrated in the cytoplasm.

The results of the present investigation corroborate those of Vilar et al. (2008) even though these authors used a different biological system and bioassay (micronucleus test in mice). In contrast, Vilar et al. (2011) were unable to detect genotoxic or mutagenic activities of ethanolic extract of leaves of *A. crassiflora* using prophage λ induction (SOS-Inductest) and bacterial mutagenicity (Ames test) assays. This divergence may have resulted from the type of organisms employed in the tests, in that our study involved eukaryotes while that of Vilar et al. (2011) employed prokaryotes.

Even though *A. crassiflora* is employed extensively in Brazilian folk medicine, the findings of the present study suggest that use of the leaves and seeds from this plant may result in significant negative genotoxic effects. Further detailed analyses of the ethanolic extracts of *A. crassiflora*, involving different organs at various stages of maturation and collected in different seasons, would not only improve our knowledge of the possible benefits of the active principles

and their mechanisms of action, but would also increase awareness regarding their potential harmful effects.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais for a scholarship awarded to one of us (M.F.S.)

References

- Akinboro A. & Bakare A.A. 2007. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa*. Linn. J. Ethnopharmacol. **112**: 470-475.
- Association of Official Analytical Chemists. 1995. Official Methods of Analysis, 16th Edn. AOAC, Washington, USA, 1995 pp.
- Çelik T.A. & Ąslanturk Ö.S. 2007. Cytotoxic and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. Biologia **62**: 292-296.
- El-Ghamery A.A.& Abou El-Yousser M.A. 2003. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum*.L. Mutat. Res. **537**: 29–41.
- Guerra M. & Souza M.J. 2002. Como Observar Cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana. Editora Funpec, Ribeirão Preto, Brazil, 132 pp.

- Kuraś M., Nowakowska J., Sliwińska E., Pilarski R., Iłaz R., Tykarska T., Zobel A. & Gulewicz K. 2006. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J. Ethnopharmacol.* **107**: 211-221.
- Leme D.M. & Marin-Morales M.A. 2009. *Allium cepa* test and environmental monitoring: A review on its application. *Mutat. Res.* **682**: 71-81.
- Li H.H., Inoue M., Nishimura H., Mizutani J. & Tsuzuki E. 1993. Interactions of trans-cinnamic acid, its related phenolic allelochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. *J. Chem. Ecol.* **19**: 1775-1787.
- Li Z.H., Wang Q., Ruan X., Pan C.D. & Jiang, D.A. 2010. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules* **15**: 8933-8952.
- Lubini G., Fachineto J.M., Laughinghouse H. D., Paranhos J. T., Silva A.C.F. & Tedesco S.B. 2008. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. *Biologia* **63**: 647-651.
- Matos F.J. 1997. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil, 141 pp.
- Ministério da Saúde do Brasil. 2006. *Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos*. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica, Brasília, Brazil. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf (accessed 23.04. 2012).
- Nascimento F.C., Boaventura M.A.D., Assunção A.C.S. & Pimenta, L.P.S. 2003. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifoli*. *Quim. Nova* **26**: 319-322.

- Negrelle R.R.B. & Gomes E.C. 2007. *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf: chemical composition and biological activities. *Rev. Bras. Plantas Med.* **9**: 80-92.
- Pereira M.F., Bandeira L.F., Blanco A.J.V., Ciampi A.Y. & Coelho A.S.G. 2008. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian cerrado fruit tree species. *Mol. Ecol. Resour.* **8**: 1329-1331.
- Pinto A.C., Silva, D.H.S.S., Bolzani V.S., Lopes, N.P. & Epifanio, R.A. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova* **25**: 45-61.
- R Development Core Team. 2009. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 409 pp.
- Santos L.P., Boaventura M., Sun N.J., Cassady M.J. & Oliveira A.B. 1996. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. *Phytochemistry* **42**: 705-707.
- Soares F.P., Paiva R., Nogueira R.C., Stein V.C. & Santana J. 2009. Marolo: Uma frutífera nativa do cerrado. *Buletim Technico No. 82*, 1-17. Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brazil.
http://www.editora.ufla.br/_adm/upload/boletim/bol_82.pdf (accessed 23.04.2012).
- Sobita K. & Bhagirath T. 2005. Effects of some medicinal plant extracts on *Vicia faba* root tip chromosomes. *Caryologia* **58**: 255-261.
- Solomon M., Belenghi B., Delledonne M., Menachem E. & Levine A. 1999. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell.* **11**: 431-443.

- Sousa S.M., Silva P.S., Campos J.M.S. & Viccini L.F., 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. *Caryologia* **62**: 326-333.
- Sousa S.M. & Viccini L.F. 2011. Cytotoxic and genotoxic activity of *Achillea millefolium* aqueous extracts. *Braz. J. Pharmacog.* **21**: 98-104.
- Veiga Júnior V.F., Pinto A.C. & Maciel M.A.M. 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Quím. Nova* **28**: 519-528.
- Vilar J.B., Ferreira F.L., Ferri P.H., Guillo L.A. & Chen-Chen L. 2008. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Braz. J. Biol.* **68**: 141-147.
- Vilar J.B., Ferri P.H. & Chen-Chen L. 2011. Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. *Braz. J. Biol.* **71**: 197-202.

VERSÃO PRELIMINAR

**ARTIGO 3 Efeito dos extratos aquosos de *Annona crassiflora* Mart.
(ANNONACEAE) sobre o ciclo celular de *Lactuca sativa* L.**

RESUMO

Annona crassiflora Mart. é uma espécie frutífera endêmica do cerrado brasileiro pertencente à família Annonaceae. Além da utilização alimentícia dos frutos, as folhas e sementes dessa espécie são empregadas na medicina popular para tratar diversas patologias humanas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos extratos aquosos de folhas e de sementes de *A. crassiflora* sobre o ciclo celular de *Lactuca sativa* L. (alface). Sementes de *L. sativa* foram tratadas com cinco concentrações (0,1; 0,08; 0,06; 0,04 e 0,02 g.mL⁻¹) dos extratos aquosos. A taxa de germinação, o crescimento radicular e o comportamento celular foram avaliados. Os extratos de *A. crassiflora* inibiram a germinação e o crescimento das raízes de *L. sativa*, possivelmente devido a alterações na maquinaria que controla o ciclo celular. As análises citogenéticas mostraram que os extratos apresentaram atividade citotóxica, reduzindo significativamente ($p < 0,05$) os valores do índice mitótico de *L. sativa* em comparação com o grupo controle. Efeitos clastogênicos como pontes cromossômicas e aneugênicos como perdas cromossômicas e cromossomos pegajosos também foram observados em células meristemáticas de raízes de *L. sativa*. Esses resultados demonstram que os extratos aquosos de folhas e de sementes de *A. crassiflora* possuem atividade citogenotóxica sobre *L. sativa*.

Palavras-chave: Alterações cromossômicas. Araticum. Citotoxicidade. Índice mitótico.

ABSTRACT

Annona crassiflora Mart. is a fruit tree species endemic to the Brazilian cerrado region, and belongs to the Annonaceae family. In addition to the food use of the fruits, the leaves and seeds of this species are used in popular medicine to treat various human pathologies. The objective of this study was to evaluate the effects of the aqueous extracts of *A. crassiflora* leaf and seed on *Lactuca sativa* L. (lettuce) the cell cycle. *L. sativa* seeds were treated with five concentrations (0.1, 0.08, 0.06, 0.04 and 0.02 g.mL⁻¹) of the aqueous extracts. The germination rate, root growth and the cellular behavior were evaluated. *A. crassiflora* extracts inhibited *L. sativa* germination and root growth, possibly due to the alterations in the mechanics which controls the cellular cycle. The cytogenic analyses showed that the extracts presented cytotoxic activity, reducing significantly ($p < 0,05$) the mitotic index values of *L. sativa* in comparison to the control group. Clastogenic effects, such as chromosomal bridges, and aneugenic, such as chromosomal losses and stickiness, were also observed in meristematic cells of *L. sativa* roots. These results demonstrated that the aqueous extracts of *A. crassiflora* leaves and seeds present cytogenotoxic activity on *L. sativa*.

Keywords: Chromosomal alterations. Araticum. Cytotoxicity. Mitotic index.

1 INTRODUÇÃO

Annonaceae é uma importante família de angiospermas basais cujas espécies são encontradas predominantemente nos trópicos (LORA; HERRERO; HORMAZA, 2009). Diversos representantes dessa família apresentaram uma gama de importantes atividades biológicas tais como: citotóxica, antitumoral, pesticida, vermífida, abortiva, antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite e antimalárica (NASCIMENTO et al., 2003).

Annona crassiflora Mart. é uma espécie arbórea endêmica do cerrado brasileiro conhecida como araticum ou marolo, cujos frutos são consumidos *in natura* ou na forma de doces, bolos, geleias e sorvetes (ROESLER et al., 2007; SOARES et al., 2009). O óleo das sementes é utilizado contra afecções do couro cabeludo e, na medicina popular, a infusão das folhas e de suas sementes auxilia no combate a diarreia e induz a menstruação; o extrato da semente de *A. crassiflora* também é utilizado no tratamento contra picada de cobra (SOARES et al., 2009).

Embora os extratos vegetais tenham sido utilizados no tratamento de doenças de acordo com o conhecimento popular, pesquisas científicas tem mostrado que algumas substâncias presentes nas plantas medicinais possuem potencial tóxico e carcinogênico (DE SA FERREIRA; FERRARO, 1999).

Os bioensaios com células vegetais são utilizados para monitorar a genotoxicidade de compostos e extratos em função do baixo custo, facilidade de manuseio, tamanho adequado dos cromossomos e acima de tudo, uma boa correlação com outros sistemas de testes (GRANT, 1994).

Alguns trabalhos já demonstraram o potencial citotóxico dos extratos da folha e da semente de *A. crassiflora*, entretanto, nenhum deles foi realizado com o extrato aquoso, que é a forma utilizada pela população para fins medicinais. Ribeiro et al. (2012) demonstraram por meio de bioensaios vegetais que o

extrato etanólico da folha de *A. crassiflora* apresentou atividade citogenotóxica sobre células meristemáticas de pontas de raiz de *L. sativa* e que o extrato etanólico da semente apresentou atividade genotóxica sobre esse mesmo material. Vilar et al. (2008) demonstraram que o extrato etanólico da folha apresentou atividade citotóxica sobre células de mamíferos, pelo teste do micronúcleo em camundongos. Santos et al. (1996) utilizando extração com éter de petróleo purificaram um composto das sementes de *A. crassiflora*, denominado araticulina, que induziu citotoxicidade *in vitro* contra células de melanoma e de carcinoma do pulmão humano.

Considerando o uso potencial dos extratos aquosos de folhas e de sementes de *A. crassiflora* e a ausência de dados sobre seus efeitos, o objetivo deste trabalho foi descrever os efeitos desses extratos sobre a germinação, crescimento radicular e ciclo celular de *Lactuca sativa* L.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material botânico e preparo dos extratos

Folhas e sementes de *A. crassiflora* foram coletadas em formações vegetais de cerrado do município de Formiga, MG, Brasil. As exsicatas foram depositadas no Herbário ESAL da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil.

Folhas adultas foram dessecadas em estufa a 40 °C por sete dias e as sementes foram trituradas. Cinco concentrações dos extratos aquosos foram preparadas (0,1; 0,08; 0,06; 0,04 e 0,02 g.mL⁻¹). Após 24 h de imersão em água destilada, os extratos foram filtrados e utilizados nos bioensaios. Como grupo controle foi utilizado água destilada.

2.2 Germinação e crescimento radicular de *Lactuca sativa* L.

Sementes de alface (*L. sativa* L. cv. Salad Bowl) foram colocadas sobre papel de germinação com 5 mL de extrato numa placa de Petri (90 mm) e acondicionadas em estufa BOD a 24 °C no escuro. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições de 30 sementes por placa. O percentual de germinação foi avaliado após 48 h. As sementes foram consideradas germinadas quando a protrusão da radícula se tornou visível através do tegumento. Após 96 h de experimento, o crescimento da raiz foi aferido com o auxílio de um paquímetro digital.

2.3 Análise citogenética

Para os ensaios citogenéticos, raízes de *L. sativa* L. tratadas por 72h com os extratos aquosos de folhas e de sementes de *A. crassiflora* foram fixadas em solução de Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético), por um período mínimo de 24 h. Após a fixação, as raízes foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em HCl 1N a 60 °C, durante 10 minutos. As lâminas foram preparadas pela técnica do esmagamento, utilizando orceína acética 2%.

Para cada tratamento foram analisadas cinco lâminas, avaliando-se 10 campos, totalizando 1000 células/lâmina. As lâminas foram observadas em microscópio de campo claro Zeiss, modelo Axio Lab, equipado com sistema de captura AxioCam ERc5s para digitalização das imagens. O índice mitótico (total de células em divisão/total de células observadas x 100) foi determinado para cada tratamento. A presença de anormalidades no ciclo celular também foi avaliada.

2.4 Análise estatística

Os dados de porcentagem de germinação, comprimento das raízes, índice mitótico e anormalidades no ciclo celular foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as comparações entre as médias de cada tratamento com a média do grupo controle foram feitas utilizando o teste de Tukey ($p < 0,05$). Para todas as análises, utilizou-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS

O percentual de germinação das sementes de *L. sativa* decresceu com o aumento da concentração dos extratos da folha e da semente de *A. crassiflora* (Tabela 1). Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas para as concentrações de 0,08 e 0,1 g.mL⁻¹ do extrato aquoso da folha e a partir da concentração de 0,04 g.mL⁻¹ do extrato da semente. Após 48 h, foi observada uma inibição de 38,15% na germinação das sementes de *L. sativa* tratadas com a concentração de 0,1 g.mL⁻¹ do extrato da semente de *A. crassiflora*.

Tabela 1 Porcentagem média de germinação de sementes de *L. sativa* após 48 h de exposição aos extratos aquosos de *A. crassiflora*.

Tratamento (g.mL ⁻¹)	Extrato da folha	Extrato da semente
Controle	94,06±0,64	94,07±0,64
0,02	86,63±2,93	85,55±5,09
0,04	85,90±5,77	83,33±4,00*
0,06	85,53±2,31	79,26±3,39*
0,08	83,30±4,00*	63,15±2,79*
0,1	79,23±3,39*	61,85±1,69*

Nota: Valores referentes às médias ± SD. Para cada tratamento os valores com asterisco são significativamente diferentes do grupo controle, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Resultado semelhante foi observado para o crescimento das raízes de *L. sativa* (Tabela 2). Todas as concentrações do extrato foliar avaliadas diferiram estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$), sendo que na maior concentração testada, houve um decréscimo de 68% no comprimento da raiz. Para o extrato da semente, diferenças significativas foram observadas nas concentrações de 0,06, 0,08 e 0,1 g.mL⁻¹.

Tabela 2 Comprimento médio (cm) das raízes de *L. sativa* após 96h de exposição aos extratos aquosos de *A. crassiflora*

Tratamento (g.mL⁻¹)	Extrato da folha	Extrato da semente
Controle	24,11±5,07	28,07±4,83
0,02	21,19±7,57*	28,32±5,03
0,04	18,68±6,23*	30,06±6,24
0,06	13,17±4,4*	24,52±4,71*
0,08	9,72±4,54*	21,93±3,92*
0,1	7,69*±3,19*	18,00±3,16*

Nota: Valores referentes às médias ± SD. Para cada tratamento os valores com asterisco são significativamente diferentes do grupo controle, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A tabela 3 apresenta os dados de índice mitótico e os tipos de alterações cromossômicas induzidas pelos extratos aquosos de *A. crassiflora*.

Os índices mitóticos observados nas células das raízes de *L. sativa* tratadas com os extratos aquosos de folhas e de sementes de *A. crassiflora* foram significativamente menores que os dos respectivos grupos controles ($p < 0.05$), sendo que a redução foi dose dependente.

Cromossomos perdidos, cromossomos pegajosos e pontes cromossômicas foram os tipos de alterações predominantes ($p < 0,05$). Cromossomos atrasados e metáfases C também foram observados (Figura 1).

Tabela 3 Análise citogenética dos extratos aquosos de *Annona crassiflora*

Tratamento (g.mL ⁻¹)	Número de células em divisão	Índice mitótico	Alterações cromossômicas					Alterações cromossômicas (%)
			Cromossomo perdido	Cromossomo atrasado	Cromossomos pegajosos	Metáfase -C	Ponte	
Extrato da folha								
Controle	632	12,64±1,80	0	0	0	0	0	0
0,02	444	8,87±0,89*	0,08±0,02	0,02±0,004	0,12±0,03	0,12±0,009	0,22±0,05*	0,56±0,26*
0,04	442	8,85±0,80*	0,28±0,07*	0,06±0,02	0,08±0,04	0,12±0,04	0,20±0,02*	0,74±0,39*
0,06	413	8,27±0,97*	0,22±0,06	0,02±0,04	0,24±0,09*	0,06±0,001	0,22±0,09*	0,76±0,20*
0,08	411	8,23±1,58*	0,30±0,07*	0,02±0,004	0,26±0,02*	0,12±0,06	0,14±0,03	0,84±0,25*
0,1	322	6,44±1,20*	0,08±0,01	0,01±0,001	0,12±0,07	0,20±0,01	0,16±0,01	0,58±0,21*
Extrato da semente								
Controle	792	15,85±1,26	0	0	0	0	0	0
0,02	454	9,08±0,88*	0,02±0,01	0	0,02±0,01	0,04±0,01	0,16±0,01	0,24±0,15
0,04	439	8,79±0,35*	0,06±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,06±0,02	0,18±0,08	0,34±0,09*

“Tabela 3, conclusão”

Tratamento (g.mL ⁻¹)	Número de células em divisão	Índice mitótico	Alterações cromossômicas					Alterações cromossômicas (%)
			Cromossomo perdido	Cromossomo atrasado	Cromossomos pegajosos	Metáfase -C	Ponte	
0,06	438	8,76±0,15*	0,14±0,07	0,02±0,01	0,02±0,01	0,06±0,03	0,18±0,09	0,42±0,18*
0,08	408	8,17±0,67*	0,08±0,03	0	0	0,12±0,04	0,20±0,04*	0,40±0,16*
0,1	407	8,15±0,51*	0,18±0,04	0,02±0,01	0,28±0,03*	0	0,06±0,01	0,54±0,21*

Nota: Valores referentes às médias ± SD. Para cada tratamento os valores com asterisco são significativamente diferentes do grupo controle (Teste de Tukey; $p < 0.05$).

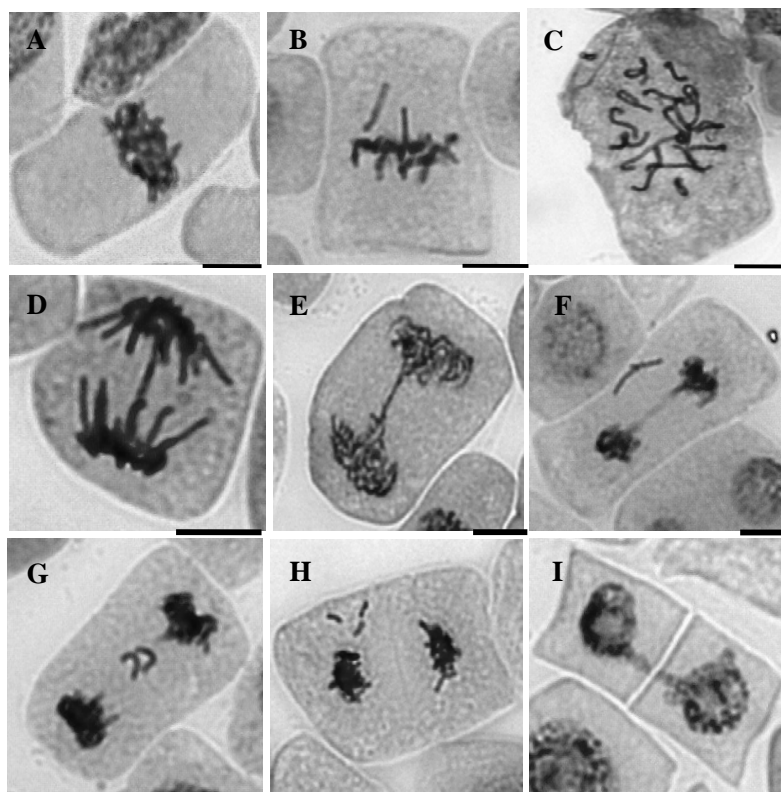


Figura 1 Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas da ponta de raiz de *L. sativa* L. expostas aos extratos aquosos da folha e da semente de *A. crassiflora* Mart

Nota.: (A) métáfase com cromossomos pegajosos; (B) métáfase com cromossomo atrasado; (C) métáfase-C; (D) anáfase com ponte; (E) telófase com ponte; (F) telófase com ponte e cromossomo perdido; (G e H) telófase com cromossomos perdidos; (I) citocinese com ponte. Barra=10 µm.

4 DISCUSSÃO

Para o presente estudo, os ensaios citogenéticos dos extratos aquosos da folha e da semente de *A. crassiflora* foram realizados porque infusões dessas partes são amplamente utilizadas na medicina popular (ALMEIDA, 1994; LORENZI, 2009; PEREIRA et al., 2008; SOARES et al., 2009).

Os bioensaios de germinação das sementes de *L. sativa* realizados com os extratos aquosos de *A. crassiflora* reforçam a ideia de que a germinação não é o processo principal para as interações alelopáticas (INDERJIT; DAKSHINI, 1995), visto que foram constatadas alterações brandas em relação ao controle quanto ao processo de germinação dos aquênios tratados. Muitas vezes o efeito de um extrato vegetal ocorre não sobre a germinação, mas sobre a velocidade de germinação ou outro parâmetro do processo. O efeito alelopático pode provocar alterações resultantes de efeitos sobre a permeabilidade de membranas, a transcrição e tradução do DNA, o funcionamento dos mensageiros secundários, a respiração por sequestro de oxigênio, a conformação de enzimas e de receptores, ou ainda pela combinação destes fatores (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

Índices mitóticos significativamente menores que os do controle negativo podem indicar alterações decorrentes da ação de químicos no crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). A redução no número de divisões celulares nas concentrações testadas sugere que os extratos aquosos da folha e da semente de *A. crassiflora* possuem efeito citotóxico sobre células meristemáticas de *L. sativa*. Resultados semelhantes foram obtidos por Ribeiro et al. (2012) para o extrato etanólico da folha de *A. crassiflora*. Segundo Costa, Aguiar e Nascimento (2004), o potencial citotóxico é dependente do tipo de solvente utilizado e das concentrações administradas. A redução na atividade mitótica

também pode indicar que os extratos foram suficientes para inibir ou bloquear a formação de metabólitos necessários para uma sequência normal de mitose (EL-GHAMERY; EL-KHOLY; EL-YOISSER, 2003).

Além de citotóxicos, os extratos aquosos da folha e da semente de *A. crassiflora* também mostraram atividade genotóxica, uma vez que alterações cromossômicas como pontes, cromossomos perdidos e cromossomos pegajosos foram observadas. As alterações cromossômicas são caracterizadas por mudanças na estrutura cromossômica ou no número total de cromossomos, que podem ocorrer espontaneamente ou como resultado da exposição a agentes químicos e físicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

As aderências cromossômicas observadas principalmente em metáfases indicam o efeito tóxico dos extratos sobre a organização da cromatina, que pode estar relacionado a um desequilíbrio da quantidade de histonas ou outras proteínas responsáveis pelo controle da estrutura da cromatina (KURAŚ et al., 2006).

A ocorrência de pontes pode ser atribuída a rupturas cromossômicas, aderências e ruptura seguida de união das extremidades quebradas (EL-GHAMERY; EL-KHOLY; EL-YOISSER, 2003). A indução de perturbações do fuso em células de *L. sativa* pode levar a aneuploidias nas fases seguintes da divisão celular. Isto normalmente decorre da separação irregular dos cromossomos na anáfase, fazendo com que alguns alcancem os polos e outros fiquem perdidos (AKINBORO; BAKARE, 2007). Estas anomalias cromossômicas (atrasos, perdas e pontes cromossômicas em anáfases e telófases) indicam o potencial clastogênico extratos testados.

Embora um único sistema de teste não seja suficiente para se chegar a uma conclusão sobre a toxicidade ou não de um determinado composto, os extratos aquosos da folha e da semente de *A. crassiflora* são utilizados internamente para o tratamento de diversas patologias, dessa forma, esse estudo

sugere cautela em relação ao uso contínuo desses extratos na medicina popular, uma vez que danos severos foram observados sobre o ciclo celular e a estrutura cromossômica de *L. sativa* L..

5 CONCLUSÕES

Os extratos aquosos de folhas e de sementes de *Annona crassiflora* possuem efeito inibitório sobre a germinação e o crescimento das raízes e efeito citogenotóxico sobre o ciclo celular de *Lactuca sativa*.

Embora *A. crassiflora* possa ter efeitos benéficos como planta medicinal, danos severos foram observados nos testes com células vegetais.

REFERÊNCIAS

- AKINBORO, A.; BAKARE, A.A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa*. Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 470-475, 2007.
- ALMEIDA, S. P. et al. **cerrado**: espécies vegetais úteis. Brasil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA). 464 p. 1994.
- COSTA, M. C. C. D.; AGUIAR, J. S.; NASIMENTO, S. C. Atividade citotóxica de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown (Verbenaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 349-352, 2004.
- DE SA FERREIRA, I. C. F.; FERRARO VARGAS, V. M. Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/microsome assay. **Phytotherapy research**, v. 13, p. 397-400, 1999.
- EL-GHAMERY, A. A.; ABOU EL-YOUSER, M.A. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum*.L. **Mutation Research**, v.537, p. 29-41, 2003.
- FERREIRA, A.F.; ÁQUILA, M.E.A.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p. 175-185. 1994.
- INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 61, n. 1, p. 28-44, 1995.
- KURASÍ, M. et al. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p. 211-221, 2006.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test and environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.

LORA, J.; HERRERO, M.; HORMAZA, J. I. The coexistence of bicellular and tricellular pollen in *Annona cherimola* (Annonaceae): implications for pollen evolution. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 4, p. 802-808, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3 ed. Nova Odessa-SP: Plantarum. v. 2, 2009, 384 p.
NASCIMENTO, F. C. et al. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, v.26, n.3, p. 319-322, 2003.

PEREIRA, M. F. et al. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian cerrado fruit tree species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 6, p. 1329-1331, 2008.

RIBEIRO, L. R. et al. Cytogenotoxic effects of ethanolic extracts of *Annona crassiflora* Mart. (Anonaceae). In: RIBEIRO, L. R.. Caracterização citogenética e efeitos citogenotóxicos de extratos de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae): uma importante frutífera endêmica do cerrado brasileiro. 2012. 90p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012. p. 59-75. No prelo.

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1048–1054, 2007

SANTOS, L. P. et al. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. **Phytochemistry**, v.42, p. 705–707, 1996.

SOARES, F. P. et al. **Marolo**: uma frutífera nativa do cerrado. Lavras-MG, n. 82, p. 1-17. Disponível em:
http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_82.pdf. 2009.

SOUSA, S. M.; VICCINI, L. F. Cytotoxic and genotoxic activity of *Achillea millefolium* aqueous extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 98-104, 2011.

VILAR, J.B. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart.1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 141-147, 2008.