

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**EM CONVÊNIO DE COOPERAÇÃO INSTITUCIONAL COM A  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**

CARACTERIZAÇÃO CROMOSÔMICA DE CUPUAÇU *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. (Sterculiaceae) CULTIVADO NA AMAZÔNIA.

OTÁVIA CUNHA DOS SANTOS

**SÃO CARLOS - SP  
2002**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

EM CONVÊNIO DE COOPERAÇÃO INSTITUCIONAL COM A  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

CARACTERIZAÇÃO CROMOSÔMICA DE CUPUAÇU *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. (Sterculiaceae) CULTIVADO NA AMAZÔNIA.

OTÁVIA CUNHA DOS SANTOS

**Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução (Área de concentração: Genética e Evolução)**

SÃO CARLOS - SP  
2002

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S237cc

Santos, Otávia Cunha.

Caracterização cromossômica do cupuaçu *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum. (Sterculiaceae) cultivado na Amazônia / Otávia Cunha Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2003.  
62 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Genética vegetal. 2. Cupuaçu. 3. Variabilidade genética. 4. Cariótipo. 5. Cupuaçu – recursos de germoplasma. I. Título.

CDD: 581.15 (20<sup>a</sup>)

Orientador:

---

Prof. Doutor Luiz Alberto dos Santos Monjeló

## OFEREÇO

*Aos meus pais Domingos  
Martins dos Santos e Aracy da  
Cunha Santos pelo muito que  
contribuíram para que chegasse  
nesse momento. (in memorian.)*

*Aos meus filhos Soraya,  
Alisson e Francisca; as irmãs,  
Mirtes e Guajarina, a família  
Brandão pelo carinho, incentivo,  
apoio, e pela compreensão nessa  
longa jornada.*

## AGRADECIMENTOS

- A Deus que, em todos os momentos tem me sustentado com a sua infinita graça e me dado a sabedoria para que chegasse até o fim deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Luiz Alberto dos Santos Monjeló, meu orientador, pela amizade e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho e pela apresentação desta dissertação;
- Ao Prof. Dr. José das Neves Falcão;
- Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho;
- Ao Prof. Dr. José Odair Pereira;
- Ao Prof. Dr. Marcelo dos Santos Guerra como relator do Projeto de Dissertação, pela paciência nos ensinamentos, apoio incansável em todo decorrer do desenvolvimento deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Webber em especial por nunca ter medido esforços para colaborar em todo decorrer do Curso;
- À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sonia Sena Alfaia por ter cedido todas as amostras para o desenvolvimento do Trabalho;
- À Dra. Aparecida das Graças Souza Claret;
- Ao Prof. MSc. Altair Fernandes dos Santos pela paciência, dedicação durante todo o decorrer do Curso;
- Aos professores da pós-graduação por terem ampliado meus conhecimentos, pelo incentivo ao meu desenvolvimento científico;
- Ao Instituto de Ciências Biológicas e a todos os seus servidores;
- Às colegas que se tornaram amigas no decorrer do curso, pelo carinho, compreensão, apoio e por que não dizer pelos bons e difíceis momentos em que juntos passamos;
- Aos amigos do Viveiro de Mudas da Universidade Federal do Amazonas, pela paciência, ensinamentos e companheirismo;
- A todos os membros da Igreja Presbiteriana Independente de Manaus;

- Aos amigos dos Laboratórios de Genética e Evolução, Citogenética, Biotecnologia, Ecologia, Micologia, Botânica, Histologia, Farmacologia, Anatomia pelo companheirismo, ajuda, amizade e pelos bons momentos;
- Aos amigos do Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao amigo Reginaldo Carvalho, pela paciência, ensinamentos e companheirismo que nunca deixaram faltar;
- Ao amigo João Bosco Duarte Cintrão e todos os servidores do INPA/ROÇADÃO que não mediram esforços para a realização deste trabalho;
- Ao amigo Eng. João Alberto Rodrigues Torres pela ajuda incansável na coleta dos materiais;
- Ao Prof. Nilton Hitotuzi pela paciência com que se dedicou durante a revisão deste trabalho;
- À Prof<sup>a</sup>. Maria do Perpétuo Socorro Duarte pela paciência com que se dedicou durante a revisão deste trabalho;
- À Dr<sup>a</sup>. Eliana Feldberg pela paciência e dedicação;
- Aos amigos do Laboratório de Botânica da Universidade Federal do Amazonas, pela paciência, ensinamentos e companheirismo que nunca deixaram faltar;
- Ao Prof. MSc. José Enos Rodrigues pela paciência e dedicação com que se dedicou na revisão deste trabalho.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Objetivos .....	04
1.2 Justificativa.....	05
1.3 Revisão da Literatura.....	06
Distribuição geográfica da espécie.....	06
Descrição Botânica.....	07
Ecologia.....	08
Propagação.....	09
Importância Econômica do Gênero.....	10
Citogenética de plantas Tropicais.....	11
Importância e aplicações dos Estudos Citogenéticos	12
Números cromossômicos.....	13
Morfologia cromossômica.....	14
Distribuição e localização da heterocromatina.....	15
Citogenética de <i>Sterculiaceae</i> , Vent.....	16
Morfologia e tamanho cromossômico.....	19
Bandeamento cromossômico.....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
Coleta do material.....	20
Obtenção das células.....	22
Coloração Convencional.....	23
Coloração com Hematoxilina.....	23
Coloração com CMA-DAP.....	23
Bandeamento C.....	24
Caracterização dos Tipos Cromossômicos.....	25
3. RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO.....	39
5. CONCLUSÕES.....	42
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	43
7. REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS	



<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
Figura 01. Frequência de cromossomos em células metafásicas de <i>Theobroma grandiflorum</i> .....	31
Figura 02. Cariótipo de <i>Theobroma grandiflorum</i> submetido a coloração convencional com Giemsa.....	33
Figura 03. A. Idiograma de cromossomos mitóticos Corados convencionalmente com Giemsa. B. Desenho esquemático da relação do tamanho dos braços cromossômicos.....	34
Figura 04. <b>A.</b> Metáfase cariotípica; <b>B.</b> Núcleos arreticulados; <b>C.</b> e <b>D.</b> Cromossomos satelitados; <b>E.</b> Prófase mitótica apresentando condensação Proximal. ....	35
Figura 05. <i>T. grandiflorum</i> . <b>A.</b> Coloração com CMA <sub>3</sub> ; <b>B.</b> Coloração CMA/DAPI; <b>C.</b> Coloração DAPI.....	38

<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>Página</b>
Tabela I - Número cromossômico de <i>Theobroma L.</i> com dados da literatura, bem como os respectivos autores.....	18
Tabela II - Classificação taxonômica de <i>T. grandiflorum</i> .....	20
Tabela III - Número cromossômico de células em disploidia com número modal.....	27
Tabela IV – Números cromossômicos encontrados em <i>Theobroma grandiflorum</i> . Planta 83/Cupuaçu com sementes.....	28
Tabela V – Números cromossômicos encontrados em <i>Theobroma grandiflorum</i> . Planta 157/Cupuaçu com sementes.....	29
Tabela VI – Números cromossômicos encontrados em <i>Theobroma grandiflorum</i> . Planta 13/Cupuaçu com sementes.....	30
Tabela VII – Variação no tamanho cromossômico ( $\mu\text{m}$ ) encontrada em <i>Theobroma grandiflorum</i> .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

ac	Acrocêntrico
AT	Adenina-timina
CB	Bandeamento C, bandas C
CMA <sub>3</sub>	Cromomicina A <sub>3</sub>
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
GC	Guanina-citosina
Hc	Heterocromatina constitutiva, heterocromático
Hf	Heterocromatina facultativa
Int	Banda intercalar ou intersticial
mt	Metacêntrico (a)
per	Banda pericentromérica
RON	Região organizadora de nucléolo
sm	Submetacêntrico (a)
tel	Banda telomérica
t	Telocêntrico
-	Fluorescência negativa
+	Fluorescência positiva
++	Fluorescência positiva mais intensa
n	Fluorescência neutra
8HQ	8-hidroxiquinoleína

## 1. INTRODUÇÃO

### Considerações gerais sobre a família Sterculiaceae

A família Sterculiaceae Vent., ordem Malvales, compreende cerca de 70 gêneros e 1.000 espécies de distribuição tropical e subtropical no mundo. Nos neotrópicos ocorrem 16 gêneros e cerca de 510 espécies. São plantas arbóreas, arbustivas até herbáceas. (BARROSO, 1978; JOLY, 1979; RIBEIRO et al., 1999).

O gênero *Theobroma* é tipicamente neotropical e encontra-se distribuído na floresta tropical úmida no hemisfério ocidental, entre as latitudes 18 ° Norte e 15° Sul, estendendo-se do México até os limites ao sul da floresta amazônica (FALCÃO, 1993; SOUZA et al., 1997).

O gênero *Theobroma* é considerado o mais importante economicamente por ter como um dos seus membros o *T. cacao*.

Segundo VENTURIERI (1993), as 22 espécies do gênero estão restritas à América Tropical. Destas, nove são encontradas na Amazônia brasileira e todas produzem frutos comestíveis, e as sementes, de pelo menos cinco delas, podem ser usadas na produção de chocolate.

As duas espécies mais cultivadas e de maior valor comercial são: o *Theobroma cacao* L. E o *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., tendo o cacau como a base das indústrias de chocolate (CUATRECASAS, 1964).

A espécie *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., ocorre espontaneamente na parte oriental da hiléia amazônica, nas matas de terra firme e várzea alta, na parte sul e leste do estado do Pará, abrangendo as áreas mais elevadas da região do médio Tapajós, rio Tocantins (alcobaça), rio Guamá (entre Ourém e Bragança), rio Xingu (entre Vitória e Altamira) e rio Anapu, alcançando o nordeste do

maranhão, principalmente nos rios Turiaçu e Pindaré. Entretanto as árvores silvestres são bastante raras (CUATRECASAS, 1964).

O cupuaçu é originário da Amazônia brasileira, mais precisamente do estado do Pará, não pode ser descrito exatamente dentro da área de distribuição espontânea da espécie, onde é verdadeiramente seu centro de origem. Deve-se destacar que, por ser um cultivo pré-colombiano, em alguns casos, é difícil determinar com precisão se os indivíduos encontrados nas áreas de selva são verdadeiramente espontâneo ou subespontâneo (CARVALHO, 1999).

Em 1949, nas proximidades de Cametá, região de Tocantins, foi descoberta uma variedade de cupuaçu que não apresentava sementes. O fruto da espécie cultivada sem sementes pesa em média 2.270g, ou seja, 1,5 vezes maior que o peso da variedade com sementes (VENTURIERI, 1985).

O fluxo migratório para a Amazônia muito tem contribuído para a crescente substituição do cultivo da terra por essa agricultura, incentivando novos plantios comerciais, aumentando assim a área plantada. Na Amazônia, a agricultura está concentrada em pequenas produções familiares. Hoje, uma das culturas mais procuradas para os sistemas agroflorestais, levando-se em conta não só os aspectos econômicos, mas também social e ambiental, mas também por ser uma fonte alternativa na suplência de vitaminas e sais minerais à população da região (SOUZA ET AL, 1997).

A origem do gênero *Theobroma* ainda é uma especulação. Considerando sua importância na Amazônia, pouco se sabe sobre a evolução da espécie com relação à ocorrência de variedades no cultivo. A classificação em variedade é baseada na forma do fruto (GATO, 1992).

O estudo citogenético feito com a espécie *T. cacao* L. Apresentou cromossomos de tamanhos pequenos, com variações cromossômicas não representativas e número  $2n = 20$  (BRÜCHER, 1977).

Cuatrecasas (1964), em uma revisão taxonômica do gênero *Theobroma*, diz que a primeira publicação com  $2n=20$  para *T. Cacao* foi feita por davie (1933) através do estudo de mitoses em raízes.

Guerra (1986) apresentou e discutiu o número cromossômico de um grupo de 41 espécies pertencentes a 35 gêneros de angiospermas, coletadas em pernambuco, a partir da análise de sementes germinadas em laboratório, dentre essas espécies *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., apresentou número cromossômico  $2n = 20$ , número de ploidia provável  $2x$ .

Diversos grupos de pesquisas têm tentando esclarecer melhor a genética de várias espécies tropicais dentre elas *T. Leiocarpa*, *T. Angustifolium*, *T. Bicolor*, *T. Speciosum* (Carletto, 1946 citado por BÜCHER, 1977 ), buscando contribuir com a identificação dos cromossomos nos aspectos numéricos e estruturais, com a finalidade de subsidiar os estudos citogenéticos das cultivares selecionadas.

## 1.1 OBJETIVOS

A caracterização cromossômica da espécie vem ao encontro das necessidades de conhecer melhor a diversidade da flora Amazônica, bem como identificar os marcadores de germoplasmas de *Theobroma* e contribuir para o conhecimento citotaxonômico do gênero.

Objetivo Geral:

Caracterizar cariotipicamente a espécie *Theobroma grandiflorum* através de diversos marcadores fluorogênicos (CMA<sub>3</sub>/DAPI).

Objetivos Específicos

Confirmar o número diplóide da espécie.

Caracterizar a morfologia cromossômica da espécie.

Definir especificamente o tamanho cromossômico, posição dos satélites ocorrentes na espécie através de coloração refinada com CMA<sub>3</sub>/DAPI.

Verificar o padrão de distribuição da heterocromatina mediante coloração convencional (Giemsa) e a técnica de bandeamento C, em cupuaçu (germoplasmas) com sementes e sem sementes.

Comparar o padrão de distribuição da heterocromatina em *Theobroma grandiflorum* com as demais conhecidas da literatura para outras espécies dentro da família.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Diante da importância econômica que a cultura de *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. representa para a região, a necessidade da caracterização citogenética dos genótipos em estudos muito colaborará no apoio e na condução de um programa de melhoramento genético, estimulando o cultivo do cupuaçu. Os resultados obtidos através de cromossomos marcados, padrão de bandeamento, a quantidade de G-C usando fluorocromos deverá distinguir essa espécie das demais desse gênero já estudadas, assim, poderemos compreender o grau de parentesco dentro do processo evolutivo.



### 1.3. REVISÃO DE LITERATURA

**DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE *Theobroma grandiflorum*** (Willd. ex Spreng.) Schum.

A família Sterculiaceae Vent., Ordem Malvales, compreende cerca de 70 gêneros e 1000 espécies de distribuição tropical e subtropical no mundo, de acordo com CUATRECASAS (1964), conforme mapa do Anexo I. Nos Neotrópicos, ocorrem 16 gêneros e cerca de 510 espécies. São plantas arbóreas, arbustivas, até herbáceas (BARROSO, 1978; JOLY, 1979; RIBEIRO *et al.* 1999).

Segundo VENTURIERI (1993), o gênero *Theobroma* possui seis secções: **Andropetalum** (*T. mamosum*); **Glossopetalum** (*T. angustifolium*, *T. canumanense*, *T. chocoense*, *T. cirmolinae*, *T. grandiflorum*, *T. hylaeum*, *T. nemorale*, *T. obovatum*, *T. simiarum*, *T. sinuosum*, *T. stipulatum*, *T. subincanum*); **Oreanthes** (*T. bernoillii*, *T. glaucum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. velutium*); **Ritidocarpus** (*T. bicolor*); **Telmatocarpus** (*T. gileri*, *T. microcarpum*) e **Theobroma** (*T. cacao*).

O gênero *Theobroma* possui 22 espécies confinadas à América Tropical (GENTRY, 1993). Destas, 9 são encontradas na Amazônia brasileira: *Theobroma cacao*, *T. camargoanumr*, *T. bicolor*, *T. grandiflorum*, *T. microcarpum*, *T. obovatum*, *T. speciosum*, *T. subincanum*, *T. silvestre*. Todas produzem frutos comestíveis e, pelo menos, de 5 espécies pode-se fazer chocolate. Podemos destacar *T. cacao* L. considerado o cacau de maior valor comercial e constitui a base da indústria de chocolate. Como a origem do gênero *Theobroma* ainda é uma especulação, levando-se em conta sua importância na Amazônia, pouco se sabe sobre a evolução da espécie em estudo, quanto à ocorrência de variedades nas cultivares (CUATRECASAS, 1964).

Segundo CAVALCANTE, (1999) o cupuaçu é originário da Amazônia brasileira, e precisamente do estado do Pará.

*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. (cupuaçu), ocorre naturalmente na parte oriental da Hiléia Amazônica, região que compreende o sul e sudeste do estado do Pará, parte do Maranhão e de Tocantins, nas áreas elevadas da região do médio Tapajós e nos rios Tocantins, Guama, Xingu e Anapu (SMITH *et al.*, 1992). De um modo geral, a espécie é encontrada, espontaneamente, na parte sul e sudoeste do Pará e na Pré-Amazônia maranhense; e, em estado silvestre, somente nas florestas tropicais úmidas de terra firme. (CUATRECASAS, 1964; FALCÃO, 1993; VENTURIERI, 1993).

Atualmente o cupuaçu está disseminado por toda a Bacia Amazônica e norte do Maranhão, chegando a atingir o estado de São Paulo. A ocorrência de alguns indivíduos no Rio de Janeiro - Jardim Botânico do Rio de Janeiro e cidade de Silva Jardim; na Bahia - Escola Média de Agricultura da Região Cacaueira, em Uruçuca, e em vários sítios da região Sul do estado, onde predomina o cacau. No exterior, ocasionalmente é encontrado no Equador, Guiana, Martinica, Costa Rica, São Tomé, Trinidad e Gana, quase sempre cultivado em instituições de pesquisa (CUATRECASAS, 1964; VENTURIERI, 1993).

## **DESCRIÇÃO BOTÂNICA**

O cupuaçuzeiro no estado silvestre apresenta morfologia semelhante a quase todas as espécies do gênero *Theobroma* representadas na Amazônia, com ramificações tricotômicas, com exceção do cacau, cujo padrão de crescimento é quincotômico, alcançando a altura de aproximadamente 20m. Ocorre normalmente como um

componente do estrato intermediário, chegando a atingir o dossel superior, porém não ultrapassando esse.

Conforme FALCÃO (1993) e SOUZA (1998), a árvore tem folhas que medem de 25 a 35cm de comprimento, pecioladas, coriáceas, oblongas a oblongas-obovadas, com ápice abruptamente acuminado. A mudança foliar ocorre quase sempre antes do início da floração, é um processo gradual e lento. Entretanto, em algumas plantas, essa mudança pode ocorrer no período de frutificação. As inflorescências são axilares ou extra-axilares, com uma a cinco flores distribuídas pelos ramos plagiotrópicos; possuem cálice com cinco sépalas triangulares espessas, corolas com cinco pétalas.

Segundo CALZAVARA (1987), em populações nativas, podem ser encontrados diferentes tipos que são agrupados em função do formato do fruto ou da presença ou ausência de sementes.

## **ECOLOGIA**

Segundo SOUZA & SOUSA (1997); CARVALHO (1999), considerando as condições climáticas das áreas onde ocorre a espécie natural de cultivo do cupuaçuzeiro, constataram-se as seguintes variações mensais de temperatura 21,6 °C a 28,2 °C; a umidade relativa média anual fica entre 77 % e 88 % sendo o mês menos úmido de 64% e o mais úmido de 93%, e precipitação pluviométrica total anual de 1.900mm a 3.100mm. O total de horas de luz solar varia de 1.900 a 2.800 horas.

O cupuaçuzeiro é uma espécie predominantemente alógama, embora possua flor hermafrodita, com a descência da antera e a receptibilidade do estigma e estilete iniciando antes da antese, a auto-polinização não se realiza em virtude da hercogamia. A floração ocorre predominantemente no período de menor precipitação, entretanto o

período de chuvas retarda a floração (VENTURIERI, 1993; SOUZA & SOUSA, 1997; CARVALHO, 1999).

Os mais prováveis agentes polinizadores do cupuaçuzeiro são: abelhas sem ferrão Hymenopteros, *Plebeia minima*, *Trigonisca* sp. (grupo *Homalaspis*) e *Ptilotrigona lurida*, podendo também ser visitado por formigas e Coleóptero Curculionídeo, (*Baris* sp.) do tipo Entomofílico (MACHADO *et al.*, 1991).

O cupuaçuzeiro apresenta um razoável desenvolvimento em áreas de solo argilo-humoso onde é cultivado preferencialmente e tendo também um excelente desenvolvimento quando plantado em solo de alta fertilidade, como os Podzólicos Eutróficos e os Latossolos Eutróficos (municípios de Uruçuca – BA, Jaru – RO e Nova California – AC), também apresenta alta produtividade quando plantado na várzea alta, entretanto não suporta longos períodos de cheias (VENTURIERI, 1993).

## **PROPAGAÇÃO**

A obtenção de mudas de boa qualidade do cupuaçuzeiro tem constituído uma barreira na implantação de pomares, por ser uma planta alógama. As mudas normalmente são adquiridas a partir de germinação de sementes, e o número de sementes por fruto é variável, podendo chegar até 45, daí a formação de pomares heterogêneos. O cupuaçu pode ser propagado tanto sexualmente como por processos assexuados (GATO, 1992; CARVALHO, 1999).

A propagação vegetativa por meio de enxertia é comum na fruticultura, com os resultados variando de acordo com a espécie, tempo de vida da planta, exposição luminosa dos ramos, nutrição, relação carboidratos/nitrogênio, sanidade do material, vigor e produtividade das plantas, balanço hormonal e condições ambientais, podendo o

cupuaçuzeiro ser propagado por processos vegetativos, especialmente por enxertia, utilizando-se de porta-enxerto de semente para a própria espécie (DANTAS et al.1996, MÜLLER *et al.*, 1997, SOUZA & SOUSA ,1997, GONDIM *et al.*, 2001).

OLIVEIRA, (1993) lembra que os estudos das sementes de cupuaçu e de seu processo de germinação limita-se a analogias com pesquisas sobre as sementes *de (T. cacao L.)* por falta de dados referentes ao cupuaçu.

A polinização controlada é fator importante na busca de soluções dos problemas levantados, especialmente na elaboração de um programa de hibridação da espécie, de estudos associados ao desenvolvimento do fruto e manejo da cultura, (SOUSA *et al.*, 1996).

### **IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO GÊNERO *Theobroma***

Na família Sterculiaceae, destacam-se duas espécies conhecidas, *T. cacao* e *T. grandiflorum*, comercialmente exploradas para a produção de sementes destinadas ao preparo de derivados e subprodutos do cacau e cupuaçu, sobretudo na sua forma mais popular, o chocolate (CUATRECASAS 1964, SILVA *et al.*,1986).

A Amazônia é considerada como uma das regiões propícias para a fruticultura, tendo em vista, uma enorme variedade de plantas nativas, muitas das quais, ainda conhecidas, e, pouco apreciado o valor nutritivo (MACHADO, 1991).

A cultura do cupuaçuzeiro vem despertando interesse comercial não só na Bacia Amazônica e norte do Maranhão, no Brasil, mas também em vários países do mundo. As sementes do cupuaçuzeiro são consideradas como sucedâneas do cacau, pelo fato de possuírem ótima matéria-prima na fabricação de chocolate branco de excelente qualidade (GARCIA, 1991). É utilizado ao natural, em forma de néctar enlatado ou no

fabrico de licores, vinhos, compotas e geléias (SILVA *et al.*, 1986). Outra espécie nativa da região amazônica, o cupuaçu *Theobroma grandiflorum*, destaca-se como componente da maioria dos sistemas agrofloreais da região, principalmente pela diversidade de aproveitamento do fruto na indústria de alimentos, pelo aroma e sabor agradáveis (SOUZA *et al.*, 1997). Os frutos são utilizados em grande escala na preparação de doces, geléias, cremes, pudins, biscoitos, balas, sorvetes, tortas, licores, bolos, sucos e etc. A casca é utilizada na fabricação de peças artesanais. As amêndoas possuem gorduras de alto coeficiente de digestibilidade e composição típica das manteigas vegetais, semelhantes à manteiga de cacau (CARVALHO *et al.*, 1980). As sementes são utilizadas na confecção de chocolate branco e cosméticos, contém ainda cafeína e teobromina (CLEMENT, 1982).

## **CITOGÉNÉTICA DE PLANTAS TROPICAIS**

Um número representativamente grande de espécies de plantas nativas está concentrado nos trópicos. Como a maioria dos estudos está restrita aos números cromossômicos, há um desconhecimento muito grande no que se refere à flora neotropical. Há uma quantidade razoável de trabalhos na literatura em vista da grande diversidade biológica dessa flora. Citogeneticistas deparam com a escassez de estudos na literatura para determinadas espécies. Precisa ser observada a dificuldade de reconhecer na extensa literatura, números cromossômicos previamente citados incorretamente (GUERRA, 1984).

Através da citogenética, tem sido possível esclarecer melhor os processos responsáveis pela evolução de certas espécies, estabelecendo modelos carioevolutivos em vegetais. Destacam-se amplos estudos predominantemente em vegetais de clima

temperado (STEBBINS, 1971; GUERRA et al. 1996; GUERRA et al., 2000). Conforme MONJELÓ (2001); D'HONT et al. (1996) nos estudos evolutivos para plantas terrestres, há grande dificuldade na aplicação do conceito biológico de espécie, devido à diversidade de formas de reprodução e da hibridização interespecífica entre espécies claramente delimitadas. Assim, conceitos alternativos como o conceito fenético de espécie facilitam os estudos evolutivos de plantas, pois utilizam marcadores alternativos como os marcadores citogenéticos que têm possibilitado a detecção de uma grande variabilidade cariotípica intra e interpopulacional. A explicação para a diversidade cariotípica pode ser baseada nas possibilidades de alterações numéricas, estruturais e rearranjos cromossômicos. Observações citogenéticas têm sido possíveis a vários organismos, tornando-se extremamente úteis no entendimento das relações de parentescos de espécies dentro de seus respectivos grupos.

Trabalhos de melhoramentos genéticos, visando a um melhor conhecimento da variabilidade genética de plantas tropicais, vêm sendo feitos através de análises citogenéticas como alternativa para caracterizar cariotipicamente as mais diversas cultivares. A citogenética assume importante papel na seleção de germoplasmas com o objetivo de selecionar genótipos quanto à produtividade, resistência a doenças e pragas que possam ser incorporadas a sistemas de produção (SOUZA, 1998).

### **IMPORTÂNCIA E APLICAÇÕES DOS ESTUDOS CITOGENÉTICOS**

A utilização das análises citotaxonômicas tem contribuído em grande parte para o estudo da evolução, pelo fato de os cromossomos constituírem o próprio material genético, e, portanto, alterações nos padrões dessa estrutura significa um direcionamento evolutivo das espécies (GUERRA,1985).

Do ponto de vista citogenético, pouco se sabe sobre a biodiversidade nativa tropical, em especial a neotropical. (SILVA, 2001).

O desenvolvimento de técnicas citogenéticas tanto as convencionais quanto as mais refinadas com uso de fluorocromos, possibilitam direta ou indiretamente, compreender a evolução como um fenômeno fundamental aos seres vivos.

Considerando a grande variabilidade genética existente em vegetais, torna-se necessária uma seleção genotípica que apresente produção estável, com menor tendência à instabilidade de produção, selecionando principalmente genótipos com alta qualidade, tendo como destino a agroindústria (SOUZA *et al.*, 1997).

A citogenética contribui com um elevado número de informações que viabilizam a caracterização cromossômica de variedades de espécies dentro de grupos sistemáticos, determinando o número cromossômico, o número de ploidia, o comportamento cromossômico na mitose e meiose, tornando viável os programas de melhoramento genético (SOUZA *et al.*, 1992).

## **NÚMEROS CROMOSSÔMICOS**

A contagem do número cromossômico de espécies de uma determinada flora pode auxiliar em estudos citotaxonômicos de diversos grupos vegetais. Além da contagem de espécies previamente desconhecidas cariotipicamente, a recontagem é igualmente importante devido à possível ocorrência de variações interpopulacionais ou de registros incorretos na literatura (GUERRA, 1984).

Ao analisarmos a variação cromossômica numérica de um táxon, passamos a conhecer o número básico do grupo em virtude de o mesmo constituir o principal instrumento para análise citotaxonômica. (PITREZ *et al.*, 2001).



Vários são os fatores que podem modificar o número básico original dos cromossomos de uma determinada espécie, dentre esses, podemos citar a disploidia com acréscimo ou perda de um determinado número de cromossomos o que pode ser esclarecido através de rearranjos cromossômicos. (SILVA, 2001)

Mesmo com a utilização de várias técnicas citogenéticas, ainda é através da variabilidade cromossômica numérica que podemos detectar alterações no número básico de um táxon, com isso, nos permite reconhecer o número básico do grupo (PITREZ *et al.*, 2001).

O número cromossômico tem sido muito usado em trabalhos citotaxonômicos devido à facilidade de observação, podendo ser convenientemente usado como um caráter junto com outros fatores. O número cromossômico pode variar no decorrer de um processo evolutivo (SILVA, 2001).

## **MORFOLOGIA CROMOSSÔMICA**

A utilização de técnicas com coloração convencional para análise de cariótipos em espécies que apresentam cromossomos pequenos, quase sempre se limita à identificação de seu número, e apresentam poucos caracteres morfológicos (GUERRA *et al.* 1997). O estudo de cromossomos utilizando bandeamento-C, tem sido um importante passo na citogenética de muitos grupos de plantas silvestres e cultivadas MOSCONE (1993). Um exemplo é encontrado em espécies de *Citrus* que apresentam tamanho cromossômico pequeno e usando a técnica de bandeamento C ou coloração com fluorocromos, mostraram diversidades de padrões de bandas (GUERRA *et al.* 1997). Estudos sistemáticos utilizando a técnica de bandeamento C permitem constatar variabilidades que determinados cromossomos apresentam no tamanho, número ou

posição das bandas. Assim, através de idiograma ou cariograma podemos obter importantes dados que irão subsidiar as investigações citotaxonômicas.

## **DISTRIBUIÇÃO E LOCALIZAÇÃO DA HETEROCROMATINA**

### **Núcleos Interfásicos**

Ao se observarem núcleos interfásicos, podemos encontrar, neste estágio cromossomos parcial ou totalmente descondensados cujo material que os constituem é a cromatina difusa. Baseado nessa cromatina, e esta se apresenta em parte condensada, conseguimos reconhecer pelo menos quatro tipos de núcleos interfásicos: eureticulado, reticulado, semi-reticulado e arreticulado. Os padrões básicos dos núcleos interfásicos são normalmente equivalentes dentro de espécies próximas e também ao nível de gênero e família. Quanto ao tamanho do núcleo interfásico é normalmente proporcional ao conteúdo de DNA da célula.

Conforme SILVA (2001), a forma e a quantidade da cromatina condensada em plantas apresenta uma relativa constância dentro do indivíduo, havendo variações entre espécies diferentes referidas em *Comelinaceae* (PITREZ *et al.*, 2001).

## **CITOGENÉTICA DE *STERCULIACEAE*, VENT., DO GÊNERO *THEOBROMA* E DE ALGUNS GÊNEROS CORRELATOS**

### **Número Cromossômico**

A constatação que a maioria das espécies possuem número constante de cromossomos aconteceu há mais de um século. Os primeiros estudos com cromossomos não foram evidentemente ligados à taxonomia, mas foram realizados com a finalidade

de entender a função dos cromossomos na embriologia, desenvolvimento, divisão celular e ciclo de vida.

Uma das mais antigas publicações foi a de Stasburger em 1882 descrevendo o número de cromossomos somáticos igual a 24, em quatro espécies de *Lilium*. Hoje em dia, a descrição do número de cromossomos ainda está em moda, porém três principais características são aparentes. Primeiro, existe uma grande ênfase no acesso a plantas em suas localidades silvestres; segundo, existe a necessidade de se depositar em testemunho em um dado Herbário e terceiro é desejado que as contagens sejam baseadas em várias células e plantas em cada população. Muitas das contagens anormais na literatura são resultante de identificações errôneas, células ou tecidos anormais ou mutantes cultivados. Os três requisitos acima bem como o aprimoramento de técnicas citológicas, seguramente irá reduzir os aspectos dessa ambigüidade (STACE, 2000).

Segundo JOLY, 1979, a família Sterculiaceae Vent. apresenta cerca de 700 gêneros e 1000 espécies e pouco se sabe sobre estudos citogenéticos.

No início do Terciário, o gênero *Theobroma* era pouco diferenciado nas florestas quentes das terras baixas tropicais. Após o soerguimento dos Andes, as barreiras geográficas e o isolamento fizeram com que as atuais espécies vicariantes do Leste e do Oeste se diferenciassem (BRÜCHER, 1977).

Em sua revisão do gênero *Theobroma*, CUATRECASAS (1964) relata através da contribuição de Cope (1939) o número cromossômico  $2n = 20$ , para as seguintes espécies de *Theobroma*: *T. cacao*, *T. "leiocarpa"*, *T. "pentagona"*, *T. bicolor* –, *T. microcarpum* –, *T. speciosum* –, *T. simiarum*, *T. capilliferum*, *T. grandiflorum* –, *T. obovatum* –, *T. cirmolinae*. Davi 1933 citado por BRÜCHER, 1977, foi o primeiro autor a determinar o número cromossômico de *T. cacao*, a partir de tecidos somáticos,

com  $2n = 20$ . Este número foi confirmado na década seguinte por diferentes citologistas que além do *T. cacao*, também encontraram o mesmo número em outras espécies silvestres, tal como *T. grandiflorum*, segundo contribuição de Cope, 1939.

A contagem básica do número de cromossomos no gênero *Theobroma* bem como no gênero aparentado *Cola* é  $n = 10$  (em *C. nitida* foi verificado  $2n = 40$ ). Para *Heranea* com  $2n = 20$  vale o mesmo. Ao contrário, os gêneros filogeneticamente mais distantes são *Byttneria*  $2n = 14$  e *Guazuma*  $2n = 16$ . Pesquisas citológicas em *Theobroma* resultaram até agora apenas na determinação de genomas diplóides, não existem diferenças citogenéticas importantes para servir de base na diferenciação das espécies de *Theobroma*. Poliploidia ou aneuploidia não são conhecidas até o momento. A variedade “*Nana*” forma na meiose não só 10 bivalentes, mas também ocasionalmente podem-se observar, também, 5 quadrivalentes, sendo possível se excluir uma possível origem tetraplóide desse cultivar. Os gêneros *Theobroma* e *Heranea* se desviam morfológicamente da tribo *Byttnerieae* (BRÜCHER, 1977).

Segundo GUERRA (1986), embora existam inúmeros trabalhos sobre o número cromossômico de espécies tropicais, devido à grande diversidade da flora, poucas espécies são analisadas. Um dos parâmetros citológicos que tem auxiliado no entendimento das alterações genéticas envolvidas na sua evolução é o número cromossômico (PEDROSA *et al.*, 1999).

GUERRA (1986), analisando o número cromossômico de várias espécies, dentre elas *Theobroma grandiflorum*, evidenciou  $2n = 20$ , o que vem confirmar os números básicos encontrados dentro do gênero, Tabela I.

A espécie mais estudada do grupo é o *T. cacao* devido sua distribuição geográfica e grande importância econômica para o mundo.

**TABELA I - Número cromossômico de *Theobroma* L. com os dados da literatura bem como respectivos autores**

Espécies	2n	Autor
<i>T. leiocarpa</i>	20	Carletto, 1946
<i>T. pentagona</i>	20	Carletto, 1946
<i>T. angustifolium</i> Su. M.	20	Carletto, 1946
<i>T. bicolor</i> Humb. U. Bonpl.	20	Munhoz Ortega, 1948 Simmonds, 1954
<i>T. cacao</i> L.,	20	Davie, 1935 Carletto, 1946 Munhoz Ortega, 1948 Simmonds, 1954
<i>T. capilliferum</i> Cuatr.	20	Carletto, 1946
<i>T. cirmolinae</i> Cuatr.	20	Carletto, 1946
<i>T. grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) Schumann	20	Guerra, 1986; Cope, 1939
<i>T. microcarpum</i> Mart.	20	Carletto, 1946
<i>T. obovatum</i> Klotzsch.	20	Carletto, 1946
<i>T. simiarum</i> D. Smith	20	Carletto, 1946
<i>T. speciosum</i> Willd.	20	Carletto, 1946

### **Morfologia e tamanho cromossômico**

Poucas análises detalhadas de cariótipo do gênero *Theobroma* são encontradas na literatura apesar da importância do gênero. Uma análise detalhada foi encontrada para *T. cacao*, que muito tem contribuído para novas pesquisas do gênero (BRÜCHER, 1997).

Dentre os gêneros analisados, poucas foram as variações observadas quanto ao tamanho dos cromossomos, são uniformemente pequenos apresentando quase sempre entre 0,5  $\mu$  a 2 $\mu$  e os menores sempre

em torno de 0,5  $\mu$ . Os cromossomos do cacau são pequenos de 2,2 $\mu$  até 1,5 $\mu$  e mostram apenas uma pequena diferenciação. Poucos foram os trabalhos feitos com relação à morfologia e tamanho cromossômico (CUATRECASAS, 1964).

### **Bandeamento cromossômico CMA<sub>3</sub> e DAPI**

Em 1968, Casperson e seus colaboradores, à procura de métodos mais sensíveis para a observação de bandas cromossômicas, introduziram o fluorocromo Quinacrina no bandejamento e obtiveram uma grande descoberta (VOSA, 1985). Diferentes fluorocromos têm sido bastante utilizados em citogenética vegetal, permitindo maior caracterização e diferenciação de heterocromatina. Métodos seqüenciais de coloração têm mostrado comparações exatas de regiões heterocromáticas (SCHWARZACHER & SCHEWEIZER, 1982). A heterocromatina é constituída por seqüências altamente repetitivas de DNA e caracteriza-se por não apresentar atividade gênica e por permanecer condensada durante o ciclo celular. Para observar a variabilidade genética existente entre espécies, utilizam-se técnicas de coloração diferencial tais como CMA<sub>3</sub> e DAPI.

Bandeamento cromossômico não foi feito anteriormente para a espécie em estudo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A Tabela II apresenta a posição taxonômica da espécie em estudo.

**TABELA II- Classificação taxonômica de *Theobroma grandiflorum*.**

### **CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA**

**Divisão:** Magnoliophyta

**Subdivisão:** Magnoliophytina

**Classe:** Magnoliopsida

**Subclasse:** Dilleniidae

**Superordem:** Malvanae

**Ordem:** Malvales

**Família:** Sterculiaceae

**Gênero:** *Theobroma* L.

**Espécie:** *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.

### **Coleta do Material**

O material utilizado foi coletado no Campo Experimental-Roçada (mapa no Anexo II), do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA - MANAUS-AM, BR 174 Km 42 e as exsiccatas depositadas nos herbários HUAM da

Universidade Federal do Amazonas e INPA, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Os acessos do cupuaçu na área de coleta do INPA estão distribuídos em uma área de 10.000m<sup>2</sup>, em um espaçamento de 5 x 5m, 10 plantas por parcela, distribuídas em sistema de monocultivo de 5 plantas com sementes e 5 sem sementes.

Para análise do cupuaçu com semente, pontas de raízes foram obtidas a partir de sementes recém germinadas após passar por um tratamento para desinfecção com solução de hipoclorito a 10% por 18 horas aproximadamente, em seguida, retirado o excesso com água corrente e submetida a um segundo tratamento com uma solução de fungicida Benlate (1.000ppm) por trinta minutos, retirado o excesso em água corrente, foram colocadas para germinar em placas de Petri com papel filtro previamente umedecido.

Para análise dos cromossomos mitóticos do cupuaçu sem semente, os brotos foram obtidos através de propagação vegetativa, 63 estacas, nos tamanhos entre 25 e 30cm da região mediana, tendo sido feito um pré-tratamento com fungicida Benlate (1000ppm) por aproximadamente 30min, em seguida colocadas em uma solução de ácido indol butírico (AIB), nas concentrações de 1.000 e 2.000ppm e por 10min e 21 estacas sem tratamento (Testemunha), colocadas em seguida em sacos de polietileno com substrato, areia e terra preta, a partir de então, cultivadas e mantidas na casa de vegetação do laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas. Após doze dias, os brotos foram coletados e utilizados para as análises (GONDIM et al., 2001).



### **Obtenção das Células**

Para obtenção das células, foram utilizadas pontas das raízes do cupuaçu com sementes e brotos do cupuaçu sem sementes. As pontas das raízes e os brotos foram pré-tratados com solução de 8HQ 0,002M por 24h a 6 °C, fixados em Carnoy (etanol/ácido acético, 3:1) por 20h aproximadamente a temperatura ambiente e posteriormente conservados a - 4 °C. Para preparação das lâminas, as pontas das raízes e os brotos foram retirados do fixador, lavados duas vezes em água destilada por 10min cada. Em seguida, hidrolisados em HCl 8N por 20min a temperatura ambiente. Após a hidrólise foram lavados em água destilada. Com o auxílio de um estereomicroscópio foi removida a coifa da raiz para se obter a massa de células do tecido meristemático. A massa de células foi transferida para uma lâmina com uma gota de ácido acético a 45% e coberto por uma lamínula. Nesse estágio, o material foi esmagado cuidadosamente, em seguida o conjunto foi colocado em nitrogênio líquido, a lamínula foi retirada com o auxílio de uma lâmina bisturi, e as lâminas postas para secar à temperatura ambiente. Posteriormente foram coradas convencionalmente com Giemsa a 3% (GUERRA 1983, modificado) e hematoxilina a 1% (GUERRA 1999, modificado).

Para divisão meiótica foram coletados botões florais, tanto do cupuaçu com semente quanto sem semente, com tamanhos próximos à metade do tamanho do botão na antese e fixados em Carnoy por 20h aproximadamente, à temperatura ambiente e conservado a - 4 °C para análises posteriores. O preparo das lâminas seguiu a mesma metodologia para análise mitótica.

### **Coloração Convencional**

As raízes foram lavadas em água destilada duas vezes por cinco minutos cada. Em seguida, o material foi submetido à hidrólise em solução de HCl 8N concentração essa alterada de acordo com o material trabalhado, à temperatura ambiente por aproximadamente 20min. Com o uso de um estereomicroscópio e agulhas histológicas, foi retirada a coifa e as capas mais externas da raiz, deixando apenas tecido meristemático radicular, que em seguida foi cortado em pedaços pequenos, o tanto quanto possível, em ácido acético 45%, coberto em seguida com uma lamínula verificando sempre com auxílio do microscópio. Em seguida, foi feito um esmagamento para obtenção do espalhamento satisfatório. O conjunto de lâmina-lamínula foi colocado em nitrogênio líquido por aproximadamente 3 minutos para que fosse possível a retenção das células na lâmina. Após a retirada da lamínula, a lâmina foi seca à temperatura ambiente. A coloração foi feita colocando as lâminas mergulhadas no corante Giemsa 3% por 3 minutos. Depois de coradas e secas, as lâminas foram montadas em Entellan (Guerra 1983).

### **Coloração com Hematoxilina**

A coloração com hematoxilina acética a 1% foi feita mergulhando a lâmina na solução corante com tempo variando entre 3 a 5 minutos. Após a coloração a lâmina foi seca ao ar e montada com Entellan segundo procedimentos de (GUERRA, 1983).

### **Coloração com Fluorocromos CMA-DAPI**

O pré-tratamento e fixação seguiram como descritos nas técnicas anteriores. Para empregar essa técnica, o material sofreu digestão com solução enzimática contendo 2%

de celulase e 10% pectinase, mantendo a seguir a lâmina em câmara úmida, a 37 °C, por aproximadamente 2 horas. Prosseguindo, foi transferida a ponta da raiz para lâmina e acrescentou-se uma gota de ácido acético 45%. Com o auxílio de um estereomicroscópio retirou-se o meristema e cobriu-se com uma lamínula, colocando-se o conjunto no nitrogênio líquido por alguns minutos. Em seguida, retirada a lamínula, a lâmina foi guardada em local asséptico para envelhecer por três dias à temperatura ambiente. Após esta fase, as lâminas foram coradas com CMA<sub>3</sub> (0,5 mg/ml) por uma hora. Em seguida, foram também coradas com DAPI (2 µg/ml) por 30 minutos e montadas em glicerol, tampão McIlvaine/MgCl<sub>2</sub>. Para análise foi utilizado microscópio com fluorescência (SCHWEIZER, 1976).

### **Bandeamento C**

O processo para preparação da lâmina ocorreu semelhante ao descrito para com os fluorocromos acima. Após o preparo das lâminas, foram mergulhadas em ácido acético 45%, pré-aquecido a 60 °C, em banho-maria durante 10 minutos . Depois foram lavadas em água corrente e em seguida secas ao ar. Prosseguindo, as lâminas foram colocadas em solução saturada de hidróxido de bário a 5% à temperatura ambiente, por 12 minutos.

---

#### **Solução de Hidróxido de Bário 5,0%**

---

Hidróxido de Bário Ba (OH) <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	2,5 g
Água destilada até completar	50,0 ML

---

Alternadamente foi tentada a mesma solução a 60 °C pelo mesmo tempo. Decorrido esse tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram imersas rapidamente em ácido acético 45% utilizado anteriormente, lavadas em água corrente por 2 minutos e enxaguadas com água destilada. Para a renaturação as lâminas foram transferidas para um jarro de Coplin contendo uma solução **2xSSC**, pré-aquecido em banho-maria antecipadamente, durante 60 minutos, em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada, secas e imediatamente coradas com Giemsa a 2% por 3 minutos (Schwarzacher et al. 1882).

Foram escolhidas após minuciosa análise ao microscópio, as melhores células para serem fotografadas com o auxílio de um Fotomicroscópio (Axiôphot). Para a coloração convencional o filme a ser utilizado foi Kodak Imagelink HQ ASA 25 e para as lâminas coradas com fluorocromos, o filme T-MAX da Kodak ASA 400. Os reveladores utilizados foram Dektol e HC-110 da Kodak, respectivamente. O papel fotográfico foi o Kodabromide F3 e/ou Ilford Microspeed da Kodak.

### **Caracterização dos Tipos Cromossômicos**

Os pares de cromossomos homólogos foram caracterizados quanto à posição do centrômero utilizando para isso a relação de braços (**rb**) conforme LEVAN *et al.*, 1964 e SANTOS, 1999. Classificou-se assim os cromossomos metacêntricos (**M**) quando a rb variou entre 1 a 1,7; como sub-metacêntricos (**SM**) quando a rb variou de 1,71 a 3,0; como sub-telocêntricos quando a rb variou de 3,01 a 7,0 e de acrocêntricos com  $rb > 7,0$ . Para a montagem do cariótipo, os cromossomos foram separados em grupos conforme a classificação acima e em ordem decrescente de tamanho em cada grupo na seqüência **M/SM e ST/A**.

### 3. RESULTADOS

O presente trabalho apresenta os resultados da caracterização cromossômica de *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. (Sterculiaceae) cultivado na Amazônia. A contagem feita anteriormente para o cupuaçu com semente citada anteriormente na literatura fica confirmada. O resultado apresentado referente à determinação do número cromossômico para a variedade sem semente é aqui pela primeira vez apresentado.

O número modal foi  $2n=20$ , tanto para variedade de cupuaçu sem semente quanto para a variedade com semente, cujo cariótipo é apresentado na Figura 01, bem como as principais informações sobre o número, o tamanho cromossômico, número de pares satelitados e a morfologia cromossômica:

Na Tabela III e na figura 01, são apresentados os dados de frequência acumulada e média e desvio padrão do número de células com disploidia e com o número  $2n=20$ , analisadas em três indivíduos com sementes, escolhidos ao acaso de um banco de germoplasma homogêneo, através da análise de 30 células metafásicas por indivíduo.

**Tabela III. Número cromossômico de células em disploidia ( $2n=18,2n=19$ ) e com o número modal  $2n=20$  em *Theobroma grandiflorum*.**

Nº Cromossômico	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
Indiv. 083	6	3	21
Indiv. 157	7	5	18
Indiv. 013	3	2	25
Freq. Acumulada	16	10	64
Freq. Média $\pm$ desvio padrão	5,333 $\pm$ 2,082	3,333 $\pm$ 1,527	21,3333 $\pm$ 3,512

Nesta espécie foram analisados três indivíduos e 30 células de cada, obtendo-se o resultado conforme mostra as Tabelas IV, V e VI.

**Tabela IV. - Números cromossômicos encontrados em  
*Theobroma grandiflorum*.**

Planta 83/Cupuaçu com semente			
Nº. de Células	Nº cromossômico por célula		
	18	19	20
1	0	0	1
2	0	1	0
3	1	0	0
4	0	0	1
5	1	0	0
6	0	0	1
7	0	0	1
8	0	0	1
9	0	0	1
10	0	1	0
11	0	0	1
12	0	0	1
13	1	0	0
14	0	0	1
15	0	0	1
16	0	0	1
17	0	1	0
18	1	0	0
19	0	0	1
20	1	0	0
21	1	0	0
22	0	0	1
23	0	0	1
24	0	0	1
25	0	0	1
26	0	0	1
27	0	0	1
28	0	0	1
29	0	0	1
30	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>21</b>

**Tabela V. - Números cromossômicos encontrados em *Theobroma grandiflorum*.**

Planta 157/Cupuaçu com semente			
Nº. de Células	Nº. Cromossômico por célula		
	18	19	20
1	0	0	1
2	0	0	1
3	0	0	1
4	0	0	1
5	0	0	1
6	0	0	1
7	0	0	1
8	0	0	1
9	0	1	0
10	0	0	1
11	0	0	1
12	0	1	0
13	0	0	1
14	1	0	0
15	0	0	1
16	0	0	1
17	1	0	0
18	0	1	0
19	1	0	0
20	1	0	0
21	0	1	0
22	0	1	0
23	0	0	1
24	1	0	0
25	0	0	1
26	1	0	0
27	0	0	1
28	0	0	1
29	0	0	1
30	1	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>18</b>

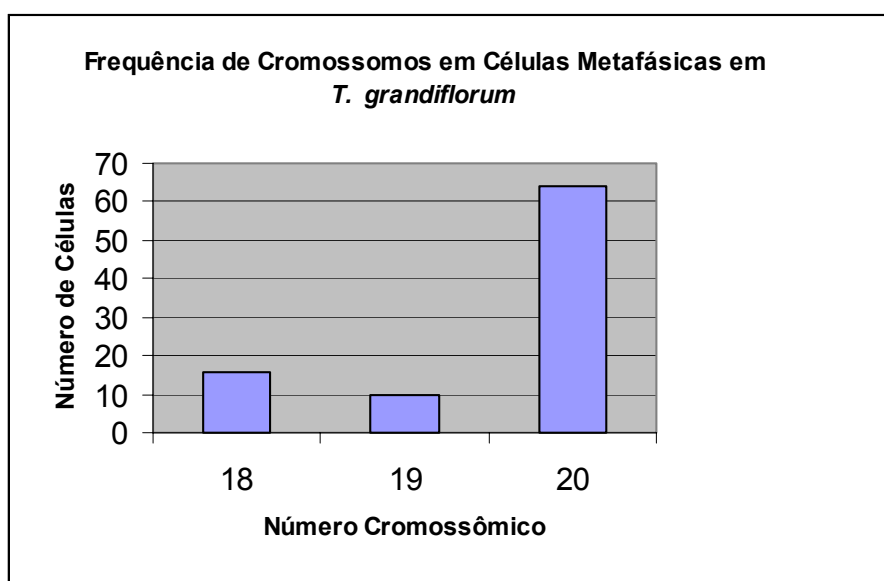


**Tabela VI. - Números cromossômicos encontrados em  
*Theobroma grandiflorum*.**

Planta 13/ Cupuaçu com semente			
Nº. de Células	Nº. cromossômico por célula		
	18	19	20
1	1	0	0
2	0	0	1
3	0	0	1
4	0	0	1
5	1	0	0
6	0	0	1
7	1	0	0
8	0	0	1
9	0	0	1
10	0	0	1
11	0	0	1
12	0	1	0
13	0	0	1
14	0	0	1
15	0	0	1
16	0	1	0
17	0	0	1
18	0	0	1
19	0	0	1
20	0	0	1
21	0	0	1
22	0	0	1
23	0	0	1
24	0	0	1
25	0	0	1
26	0	0	1
27	0	0	1
28	0	0	1
29	0	0	1
30	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>25</b>

A Figura 01 demonstra o número modal  $2n=20$  encontrado em um total de 90 células analisadas de três indivíduos escolhidos ao acaso de *T. grandiflorum*.

**Figura 01.** Frequência de cromossomos em células metafásicas de *T. grandiflorum*.



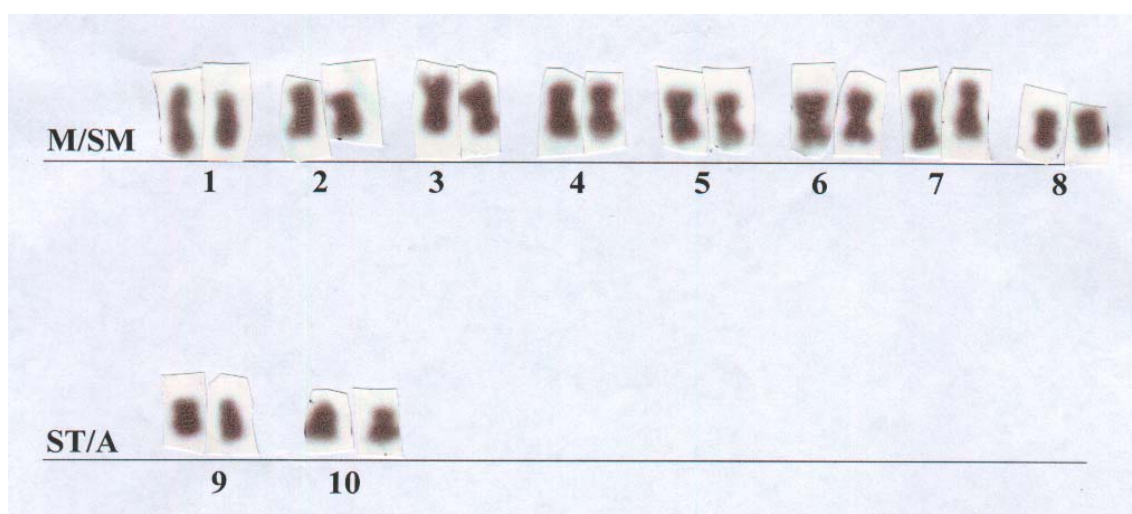
O cariótipo na Figura 02 apresentou cromossomos metacêntricos (pares 1 a 3), uma predominância de submetacêntricos (pares 4 a 8), subtelo-cêntricos (par 9) e acrocêntricos (par 10), conforme a metodologia anteriormente descrita de classificação cromossômica de acordo com a relação obtida do comprimento de braços cromossômicos.

A amplitude de tamanho cromossômico variou entre  $1\mu\text{m}$  a  $2,5\mu\text{m}$ , com média de  $1.575\mu\text{m} \pm 0,467\mu\text{m}$ , Figura 03 e Tabela VII.

-Cromossomos satelitados foram observados na espécie em número de um par (par 9) Figura 04 C,D,E.

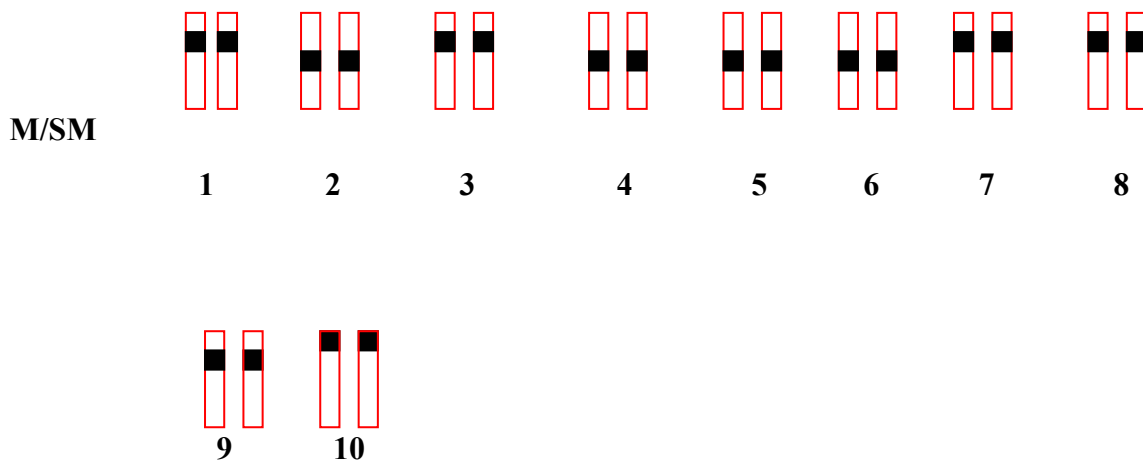
-A espécie estudada apresenta padrão de condensação do tipo proximal durante a prófase e núcleo interfásico do tipo arreticulado com cromocentros de distribuição irregular, Figura 04, B .

-Várias tentativas de aplicação de técnicas de bandeamento C na espécie em estudo foram realizadas, usando-se digestão enzimática com celulase/pectinase citado na metodologia, resultaram em cromossomos homogeneamente corados limitação esta não superada com as repetições feitas, o que não apresentou resultados satisfatórios.



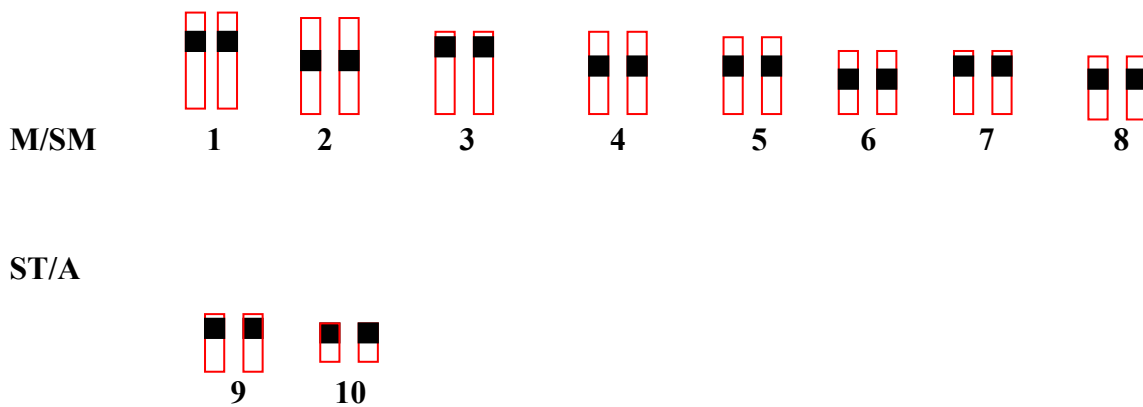
**FIGURA 02:** Cariótipo de *Theobroma grandiflorum* submetido à coloração convencional com Giemsa.

A



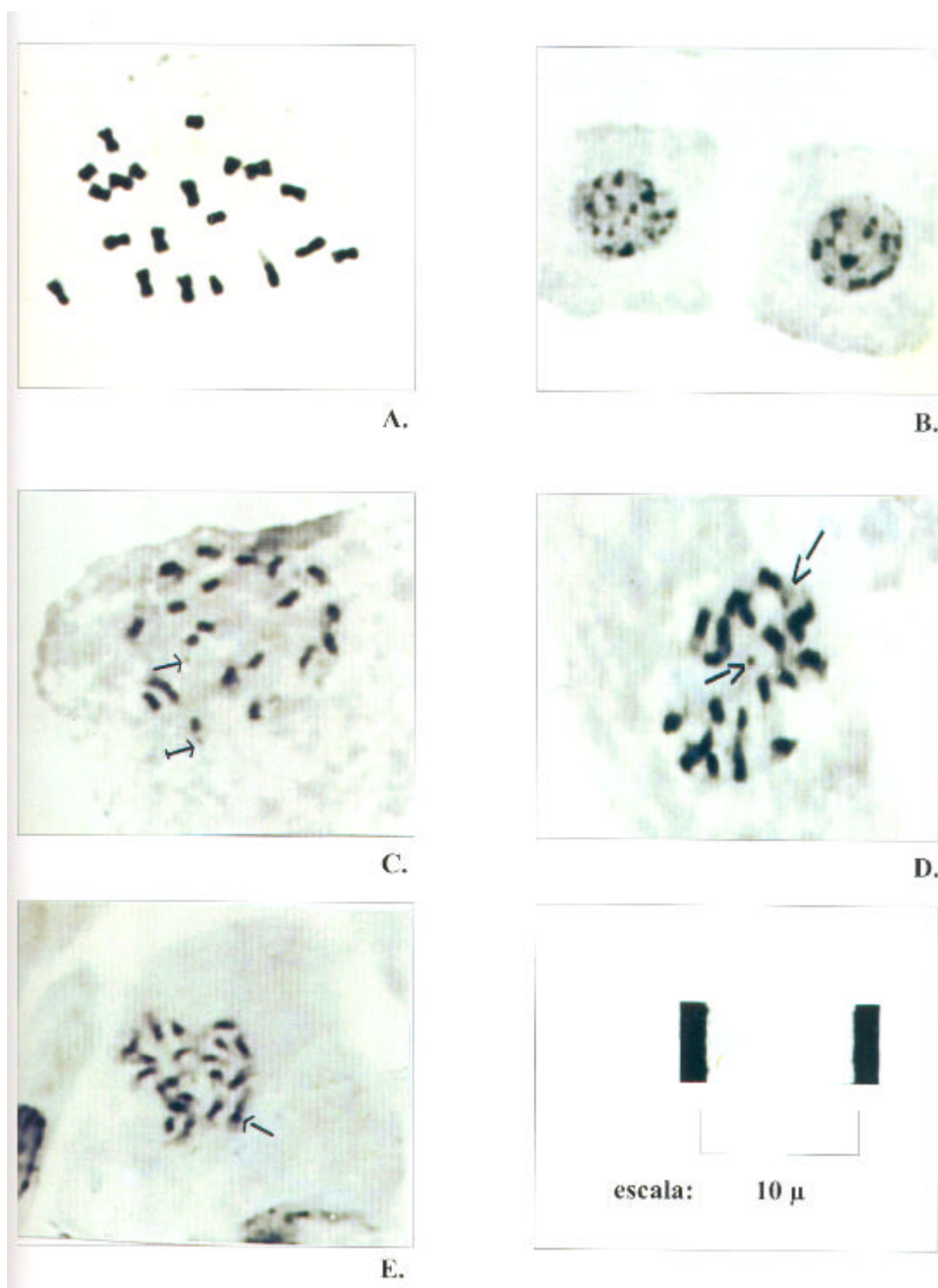
ST/A

B



ST/A

**Figura 03:** A. Idiograma de cromossomos mitóticos corados convencionalmente com Giemsa de *Theobroma grandiflorum*. B. Desenho esquemático da relação do tamanho dos braços cromossômicos.



**Figura 04** – **A.** Metáfese cariotípica; **B.** Núcleos arreticulados; **C.** e **D.** Cromossomos satelitados; **E.** Prófase mitótica apresentando condensação Proximal.

**Tabela VII. - Variação no tamanho cromossômico (mm) encontrada em *Theobroma grandiflorum*.**

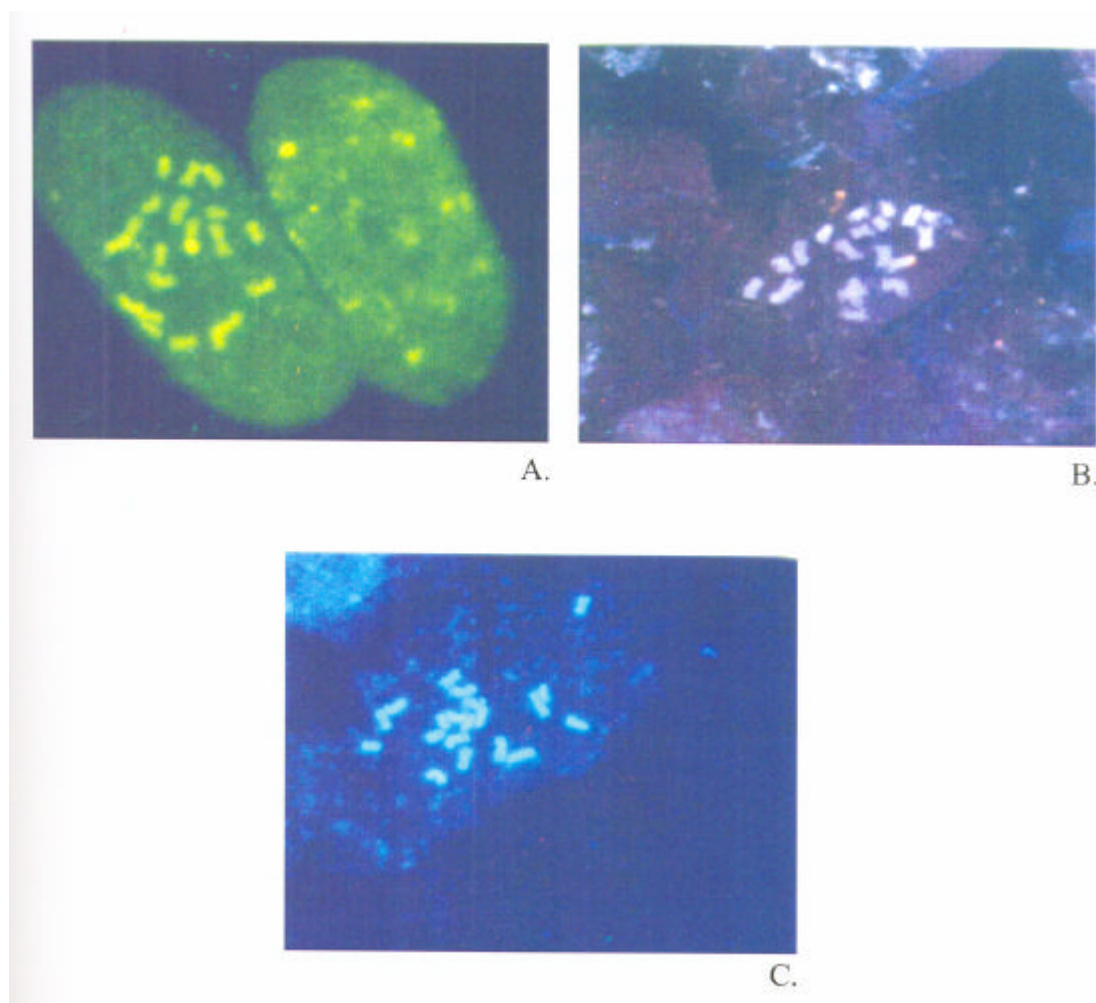
Nº dos Cromossomos	Variação no Tamanho dos Cromossomos
1	2,0
2	2,5
3	1,5
4	1,0
5	2,0
6	2,0
7	2,0
8	1,5
9	1,5
10	1,0
11	2,0
12	1,5
13	1,5
14	1,0
15	1,0
16	1,0
17	2,0
18	1,5
19	2,0
20	1,0

- A análise citogenética da espécie em estudo foi complementada através de técnicas de bandeamento cromossômico mais refinadas com marcadores fluorogênicos. Fluorocromos do tipo CMA<sub>3</sub>/DAPI permitiram a identificação de bandas de diversas intensidades e composições dependendo do fluorocromo observado. A coloração com CMA<sub>3</sub>, mostrou uma resposta positiva na heterocromatina associada às regiões organizadoras do nucléolo (RON), as quais se localizam na porção distal, em um par cromossômico, Figura 05-A , podendo ser observadas também na coloração convencional, Figura 04-E. Não foram evidenciadas outras regiões heterocromáticas nos cromossomos utilizando CMA<sub>3</sub>.

- A Coloração com DAPI, Figura.05-C não mostrou resposta positiva, observando-se uma coloração uniforme em todos os cromossomos.

- No geral, foi observada uma predominância de bandas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> , Figura 04-B, não tendo sido detectadas bandas CMA<sub>3</sub><sup>n</sup>/DAPI<sup>+</sup>.





**Figura 05:** *Theobroma grandiflorum*. **A.** Coloração com CMA<sub>3</sub> **B.** Coloração CMA/DAPI; **C.** Coloração DAPI.

#### 4. DISCUSSÃO

O número cromossômico  $2n=20$  na presente análise não difere do apresentado por (GUERRA 1986) para a espécie com semente confirmado (Tabela 1). É relatado aqui pela primeira vez para a variedade sem semente. Associando a espécie estudada às citogeneticamente analisadas levando-se em conta a (Tabela 1) verificou-se a frequência de  $2n=20$  para todas as espécies citadas.

Os números apresentados na literatura não relatam disploidias, mas em análises mais detalhadas da espécie em estudo, essas foram observadas sem que significassem alteração no número  $2n$  para a espécie. (CORREIA DA SILVA 2001). O número de espécies com resultados diferentes, após recontagem é muito significativa principalmente quando se tem em mente que, para a maioria das espécies anteriormente estudadas, existe apenas uma contagem. Com isso, fica evidenciada a importância de recontagens cromossômicas da espécie.

Análises da morfologia e do tamanho cromossômico em *T. grandiflorum* não foram até o momento efetuadas, devido provavelmente ao tamanho muito pequeno dos cromossomos variando dentro das espécies estudadas entre  $0,5\mu$  a  $2,0\mu$  de tamanho (CUATRECASA 1964). No presente trabalho, a variação do tamanho cromossômico ( $1\mu$  a  $2.5\mu$ ) está próxima àquela referida por CUATRECASAS (1964) e o número modal  $2n=20$  confirmado.

Poucos são os trabalhos desenvolvidos com Sterculiaceae envolvendo análises cariomorfológicas detalhadas. No presente estudo com espécies Amazônicas pouco ou quase nada foi feito segundo (CUATRECASAS 1964, GUERRA 1986).

As RONS ou regiões organizadoras de nucléolo são usualmente identificadas em cromossomos metafásicos mitóticos através de técnicas de coloração com Nitrato de

Prata ( $\text{Ag NO}_3$ ), que na realidade envolve a coloração de proteínas acíclicas localizadas amoxial com a estrutura fibrilar dessas regiões ANJUM e JANKUN (1998) entretanto essa coloração demonstra a presença de genes de rRNA transcricionalmente ativos.

Corantes com fluorocromos específicos como a Cromomicina  $A_3$  para seqüências GC repetitivas de genes r-RNA, coram portanto genes para RONS ativos e inativos (ANJUM e JANKUM, 1998) como já comprovado em peixes e anfíbios Amemiya e Gold, 1986, Pendas *et al.*, 1993 citados por ANJUM e JANKUM, 1998 .

Após a coloração convencional, verificou-se em um par cromossômico, a região satélite que corresponde à região proximal do cromossomo evidenciada pela utilização da técnica de fluorocromo  $\text{CMA}_3$  correspondendo, portanto, a uma RON.

Em nossos estudos, somente a espécie com semente foi analisada do ponto de vista da existência de bandas marcadas com  $\text{CMA}_3$  e DAPI, tendo sido observada a presença de bandas  $\text{CMA}_3^+$  e  $\text{CMA}_3^{++}$  para os quais os cromossomos satelitados foram observados na coloração convencional, provavelmente correspondendo às “RONS”.

As seqüências GC altamente repetitivas presentes na heterocromatina foram detectadas com o uso de fluorocromos  $\text{CMA}_3$ . Conforme a literatura, a coloração por  $\text{CMA}_3$  ou DAPI, devido à sua especificidade por regiões ricas em pares de bases caracterizam seqüências repetitivas de GC ou AT, respectivamente, identificando-se, portanto, dois tipos de regiões heterocromáticas quando na coloração com estes fluorocromos, (ZHENG, 1993).

A heterocromatina pericentromérica não respondeu a nenhum dos tratamentos usados. Estas regiões provavelmente possuem uma posição equivalente de pares de bases GC ou AT, ou ainda, estas bases estariam distribuídas de forma alternativa. Já a heterocromatina associada às regiões organizadoras do nucléolo reagiu positivamente ao

tratamento com CMA<sub>3</sub> sugerindo a riqueza relativa em pares de bases GC destas regiões em *T. grandiflorum*, que confirma um fenômeno de ocorrência comum, tanto nos animais como em plantas (LEITCH, 1998).

### **Inferências sobre a Espécie *Theobroma grandiflorum***

- a) A espécie *T. grandiflorum* apresentou núcleos interfásicos do tipo semi-reticulado.
- b) Dentro do gênero *Theobroma*, as espécies estudadas apresentam  $2n=20$ . Com o resultado do presente estudo, fica comprovado  $2n=20$  para a espécie *T. grandiflorum* com semente e sem semente sendo este último descrito pela primeira vez.
- c) O número cromossômico modal foi igual a  $2n = 20$ , embora tenham sido observadas disploidias.
- d) Quanto à morfologia cromossômica, observa-se na espécie estudada uma predominância de cromossomos submetacêntricos similar a *T.cacao*.
- e) O tamanho cromossômico observado no cariótipo, variou de  $1\mu\text{m}$  a  $2,5\mu\text{m}$  com o tamanho médio equivalente a  $1,575\mu\text{m} \pm 0,467\mu\text{m}$ , também muito similar à variação de tamanho encontrada em uma espécie próxima *T. cacao*.

## 5. CONCLUSÕES

A espécie estudada apresenta  $2n=20$ . Associando os resultados do presente trabalho aos da literatura, observa-se a confirmação de  $2n=20$  para a espécie, incluindo a variedade sem sementes.

O gênero apresenta até o momento número diplóide, com cromossomos metacêntricos, submetacêntricos que ocorreram com predominância, subtelocêntricos e acrocêntricos.

A disploidia constitui-se em mecanismo evolutivo do gênero como foi verificada nas análises efetuadas na amostra da espécie estudada.

Um par de cromossomos acrocêntricos (nucleolares) apresentam satélites onde devem estar as RONS. Os dados aqui apresentados, embora preliminares, permitem sugerir a utilização dos cromossomos nucleolares acrocêntricos como marcadores desta espécie.

O tamanho cromossômico não apresenta variações significativas na espécie dentro do gênero.

O estudo de várias populações e análises cariotípicas detalhadas se fazem necessários para melhor entendimento evolutivo das relações filogenéticas entre espécies de *Theobroma*.

A técnica de Bandeamento C e as técnicas de coloração diferenciada utilizando fluorocromos permitirão melhorar a análise e as caracterizações morfológica, cromossômica e genotípica das cultivares.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- **Estudar citogeneticamente plantas nativas da Amazônia foi um grande desafio, enfrentando variações ambientais que direta ou indiretamente contribuem para resultados inesperados.**
- **De acordo com os resultados apresentados, muitas foram as dúvidas levantadas que devem ser esclarecidas em futuros trabalhos.**
- **Variações no comportamento funcional da espécie em estudo necessitam de estudos com técnicas citogenéticas mais refinadas para melhores esclarecimentos que ainda deixaram a desejar.**
- **Estudos meióticos e mitóticos com a variedade de cupuaçu sem sementes se fazem necessários para melhor explicar determinadas respostas obtidas com este trabalho.**
- **Estudos citotaxonômicos complementares e detalhados, utilizando técnicas mais especializadas, são necessários para um melhor entendimento das relações filogenéticas entre espécies de *Theobroma*.**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJUM, R.; JANKUN, M. NOR-bearing chromosomal associations revealed through silver and sequential chromomycin A<sub>3</sub> staining in the mirror carp, *Cyprinus carpio* **Caryologia** v. 51, n. 2, p. 167-171, 1998.

ARAGÃO, C.G. **Mudanças físicas e químicas da semente do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. durante o processo fermentativo.** 1992. 115 p. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil. 1.** Editora Universidade de São Paulo. São Paulo, 1978. 255 p.

BRÜCHER, H. Sterculiaceae. In: **Tropische Nutzpflanzen: Ursprung, Evolution und Domestikation.** Berlin: Springer - Verlag 1977 p. 470-481.

CALZAVARA, B.B.G. **Cupuaçuzeiro. Recomendações Básicas 1.** Belém: EMBRAPA/CPATU, 1987. 5p.

CARVALHO, J. E. U. COPOASSU (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.): CULTIVO Y UTILIZACION. **Manual Técnico - Tratado de Cooperacion Amazonica** Ed. Secretaria Pro Tempore Caracas, 1999. 152p.

CARVALHO, J. R.; ROCHA FILHO, G. N.; SERRUYA, H.. Análise dos óleos de três frutos comestíveis da região amazônica - cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. Sterculiaceae), mari (*Paraqueiba paraensis*, Icacinaceae) e uxi (*Endopleura uxi*, Humisiaceae). In: **I Encontro de profissionais de química da Amazônia**, Anais Belém: UFPA, 1980. p.187-196.

CLEMENT, C. R.; MÜLLER, C. H.; FLORES, W. B. C. Recursos Genéticos de Espécies Frutíferas Nativas da Amazônia Brasileira. **Acta Amazonica**. V. 12, n. 4, p. 677-695, 1982.

CORREIA-DA-SILVA, M. **Citogenética e Citotaxonomia em espécies de *Philodendron* Scott (Araceae Juss.) da Amazônia Brasileira.** 2001. 79p. Dissertação

de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

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

DANTAS, S. C.; SOUZA, V. F.; ARAÚJO FILHO, O. S. Efeito do volume do recipiente no crescimento de mudas de cupuaçu. In: **I WORKSHOP SOBRE AS CULTURAS DE CUPUAÇU E PUPUNHA NA AMAZÔNIA**, Anais Manaus: EMBRAPA/CPAA, 1996. p. 156-157.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; RAO, P. F. S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J. C. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Mol. Gen. Genet.** v. 250 p. 405-413, 1996.

FALCÃO, M. A.. **Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade de algumas fruteiras cultivadas na Amazônia** Vol. 2. 2ª. ed. Manaus: Imprensa Universitária, Universidade Federal do Amazonas, 1993. 97 p.

GARCIA, C. L. **Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes e no vigor de plântulas de cupuaçuzeiro *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.**. 1991. 62p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do Convênio INPA/FUA., Manaus.

GATO, A. M. G. **Conservação de sementes de *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.** 1992. p. 4-10. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do Convênio INPA/FUA , Manaus.

GENTRY, A.. H. **A field guide to the families and genera of woody plants of woody plants of Northwest South America**. Washington, DC: Conservation International, 1993. 895 p.



GONDIM, T. M. S.; LEDO, F. J. S.; CAVALCANTE, M. J. B.; SOUZA, A. .G. C. Efeitos da porção do ramo e comprimentos de estacas na propagação vegetativa de plantas de cupuaçu. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 203-205, 2001.

GUERRA, M.. O uso de giemsa na citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandeamento. **Ciência e Cultura**, v. 35 n. 2, p. 190-193, 1983.

GUERRA, M.. New Chromosome Numbers in Rutaceae. **Plant Systematics and Evolution** v. 146, p. 13-30, 1984.

GUERRA, M. **Introdução a Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1985. 142p.

GUERRA, M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. I **Rev. Brasil. Genet.** v. 9, n.1, p. 21 - 40, 1986.

GUERRA, M.; KENTON, A. AND BENNETT M.D. RDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. And *Phaseolus coccineu* L. Reveled by in situ hibridization. **Annals of Botany** v. 78, p. 157 - 161, 1996.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; BARROS E SILVA, A.E.; CORNÉLIO, M.T.M.; SANTOS, K. & FILHO, W.S.S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *Citrus* germplasm bank. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, p. 489-496, 1997.

GUERRA, M.. Hematoxylin: A Simple, Multiple-Use Dye for Chromosome Analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 1, p. 77-80, 1999.

GUERRA, M.; SANTOS, K.; BARROS E SILVA, A.. E.; EHRENDORFER, F. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - A case of parallel chromosomal evolution. **American Journal of Botany**, v. 87, n.5, p. 735-747, 2000.

JOLY, A. B. **BOTÂNICA INTRODUÇÃO À TAXONOMIA VEGETAL**. 5ª ED. SÃO PAULO: ED. NACIONAL, 1979. 777 P.

LEITCH, A. R.; LIM, K. Y.; LEITCH, I. J.; O'NEILL, M.; CHYE, M.; LOW, F. MOLECULAR CYTOGENETIC STUDIES IN RUBBER, *HEVEA BRASILIENSIS* MUELL. ARG. (EUPHORBIACEAE) **GENOME**, V. 41, P. 464-467, 1998.

LEVAN, A.; FREDGA, K. AND SANDBERG, H.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v.52, p.201-220, 1964.

MACHADO, G. M. E.; RETTO JUNIOR, A. S. Estudo Preliminar Sobre a Biologia Floral do Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng. ) Shum.). Rev. U.A. Série Ciências Agrárias, v.1, p.11-14, 1991.

MONJELÓ, L.A.S. (2001) **Genética de Populações**. Cap. 2. p. 20-42. Ed.UA. [www.fua.br/genpop](http://www.fua.br/genpop).

MOSCONI, E. A. ; LEMBROU, M.; HUNZIKER, A. T. GIEMSA C-BANDED KARYOTYPES IN *CAPSICUM* (SOLANACEAE). **PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION**, V. 186, P. 213-229, 1993.

MÜLLER, C. H.; CARVALHO, J. E. U. **I Seminário Internacional sobre Pimenta do Reino e Cupuaçu**, Belém, EMBRAPA/Amazônia Oriental/JICA.. 1997. p. 57-75.

OLIVEIRA, M. C. C. **Descrição morfológica do processo de germinação das sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Wild. ex Spreng.) Schum.)**. 1993. 44 p. Monografia apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade do Amazonas, para obtenção do grau de Engenheira Agrônoma, Manaus.

PEDROSA, A.; GITAF, J.; BARROS E SILVA, A.E.; FELIX, L.P.& GUERRA, M. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco - V **Acta Botanica Brasilica**, v. 13 n. 1, p. 49-60, 1999.

PITREZ, S. R.; FELIX, L. P.; BARRETO, R.; GUERRA, M. Números Cromossômicos de Espécies de Commelinaceae R. Br. Ocorrentes no Nordeste do Brasil. **Bol. Bot. Univ. São Paulo** v. 19. p. 7-14, 2001.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C., **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta e Terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 1999. 800p.

SANTOS, A. S. **Estudos Citogenéticos em peixes dos gêneros *Bryconops* e *Moenkhausia* (Teleostei, Characidae, Tetragonopterinae)**. 1999. 122p. Dissertação de Mestrado, Universidade federal de São Carlos/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus.

SCHWARZACHER, T.; SCHWEIZER, W. Karyotype Analyses and Heterochromatin Differentiation with Giemsa C-Banding and Fluorescent Counterstaining in *Cephalanthera* (Orchidaceae) **Plant Systematics and Evolution**, v.141, p. 91-113, 1982.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma** (Berl.) v. 58 p. 307-324, 1976.

SILVA, A. Q.; SILVA, H. Teores de Nutrientes em Cupuaçu (*Theobroma Grandiflorum*). **Nota Técnica**, v.2, p. 269-271, 1986.

SMITH, N. J. H.; WILLIAMS, J. T.; PLUCKNETT, D. L.; TALBLOT, J. P. **Tropical forests and thier crops** *Ithaca*: Cornell University Press, 1992. 568p.

SOUSA, N. R.; ANTONIO, I. C.; NUNES, C. D. M. **Estratégias reprodutivas e polinização artificial em cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann)** REVISTA DA UNIVERSIDADE DO AMAZONAS. **Manaus** v.4/5 n.1/2 1996 p.1-118,

SOUZA, A. G. C.; GUIMARÃES, R. R.; NUNES, C. D. M. Melhoramento genético do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.). Manaus: EMBRAPA - CPAA,. **Pesquisa em Andamento**, n.12. 1992. 3p.

SOUZA, A. G. C.; SOUSA, N. R. Banco Ativo de Germoplasma de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Wild. ex Spreng.) Schum.).In FERREIRA, F. R. (Org.) **Recursos genéticos de espécies frutíferas no Brasil**. Manaus: Embrapa/CPAA-, p.107-113, 1997.

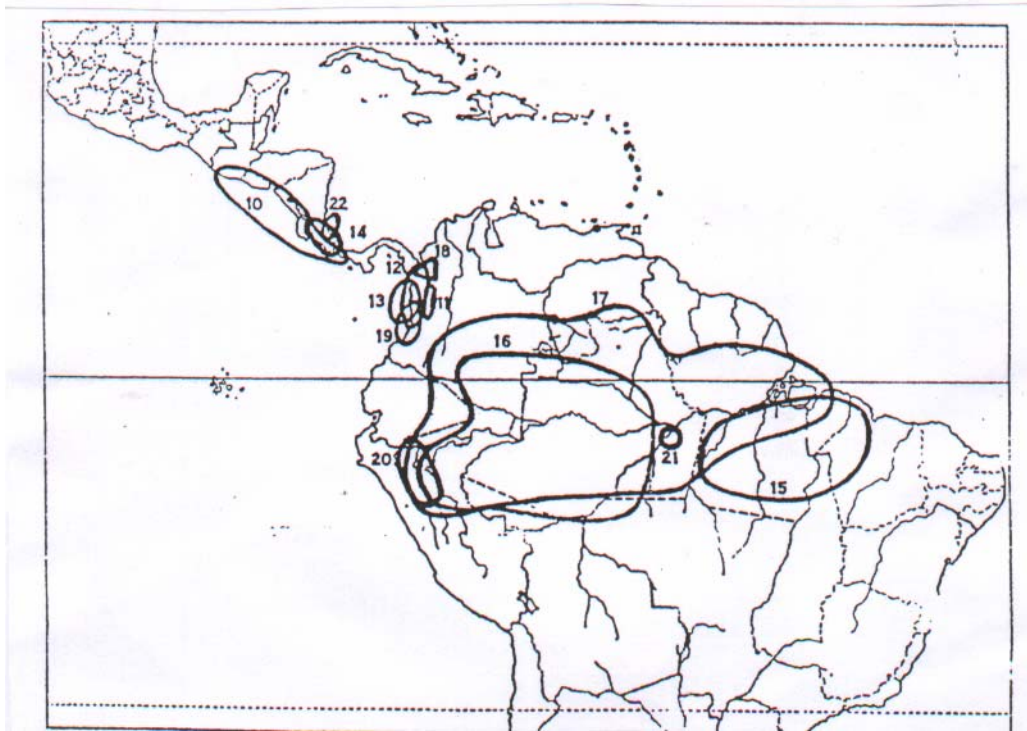
STACE, C.A.. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> centuries In STUESSY, T. F.; HORANDL, E.; MAYER, V. **Plant Systematics A Half - Century of Progress (1950 - 2000) and Future Challenges** 2000. p. 451-477 .

VENTURIERI. G. A.; MENDONÇA, J. L. CUPUAÇU SEM SEMENTES HISTÓRICO DO APARECIMENTO DA CULTIVAR. INFORMATIVO SBF V. 4 N. 4, P. 12-13, 1985.

VENTURIERI, G. A. **CUPUAÇU: a espécie, sua cultura, usos, e processamento**. Belém: Ed. Governo do Estado do Pará 1993.108 p.

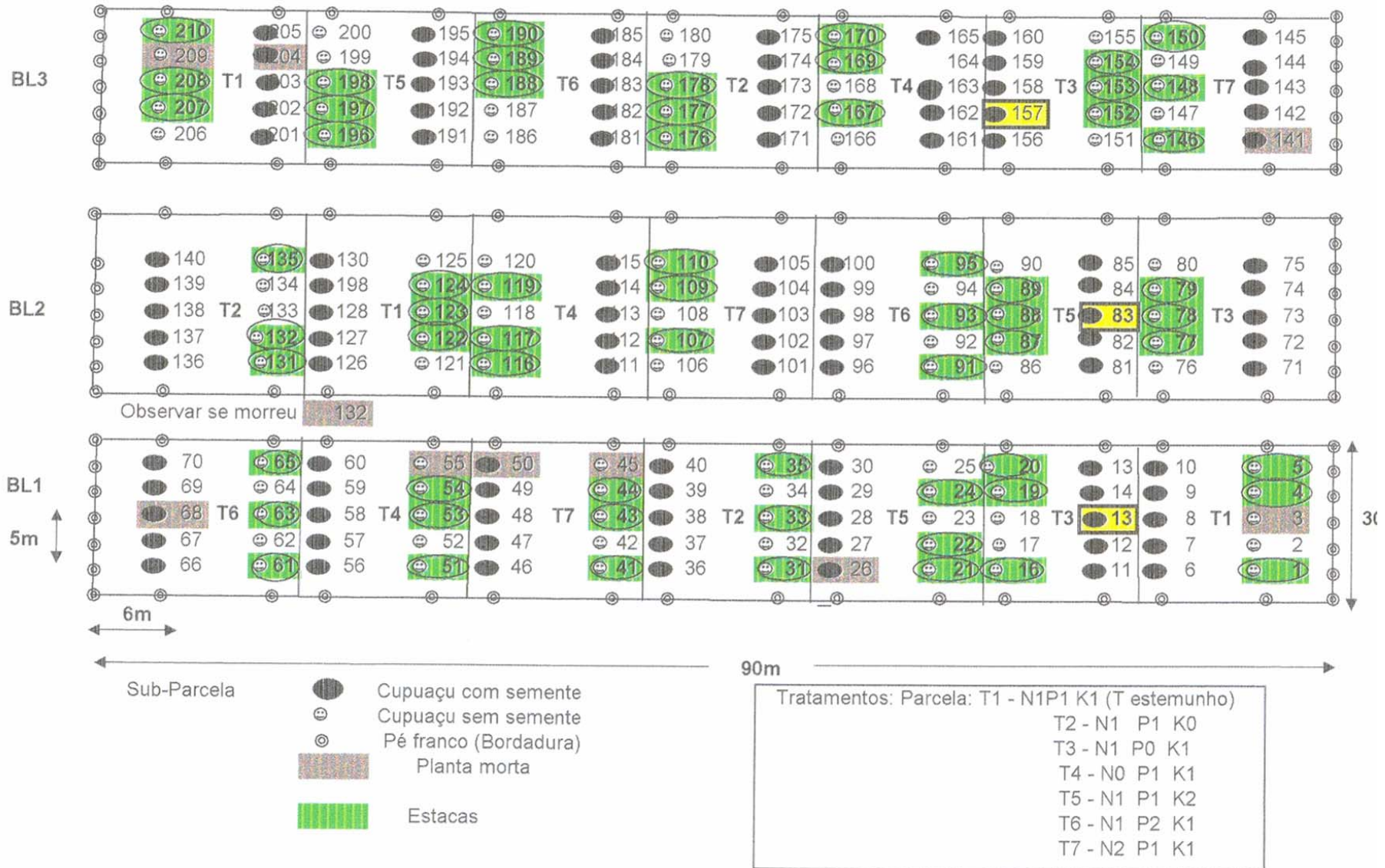
VOSA, C. G. Chromosome Banding in Plants. In: **Chromosome and Cell Searches**. New York: Gorgon and Breuch Science Publ., 1985. p.81-104.

ZHENG, J.Y.; NAKATA, M.; IRIFUNE, R.,ORIKAWA, MORIKAWA, H. Fluorescent banding pattern analysis of eight taxa of Phaseolus and Vigna in relation to their phylogenetic relationships. **Theor Appl Genet** v. 87, p. 38-43, 1993.



# ANEXO II

## Mapa da Cultivar de Cupuaçu no Roçadão do INPA Coleta das estacas do cupuaçu sem sementes



**Mapa da Cultivar de Cupuaçu no Roçadão do INPA**  
Coleta dos brotos cupuaçu sem semente

