



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
CAMPUS SÃO JOÃO DO PIAUÍ
CURSO LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RODRIGO FLOR

PROTOCOLO DE CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DA FLOR DE SEDA

SÃO JOÃO DO PIAUÍ - PI

2023

RODRIGO FLOR

PROTOCOLO DE CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DA FLOR DE SEDA

Trabalho de Conclusão de Curso (artigo científico) apresentado como exigência parcial para obtenção do diploma do Curso de Licenciatura Em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus São João do Piauí.

Orientadora: Prof. Dra. Jéssica Rodrigues da Silva.
Coorientadora: Prof. Ma. Simone de Souza Macêdo.

SÃO JOÃO DO PIAUÍ -PI

2023

RODRIGO FLOR

PROTOCOLO DE CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DA FLOR DE SEDA

Trabalho de Conclusão de Curso (artigo científico) apresentado como exigência parcial para obtenção do diploma do Curso de Licenciatura Em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, *Campus* São João do Piauí.

Aprovado em: 03/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Jéssica Rodrigues da Silva (Orientadora)
Instituto Federal do Piauí (IFPI)

Prof. Dra. Danyelle Andrade Mota
Instituto Federal do Piauí (IFPI)

Prof. Dr. Gerffeson Thiago Mota de Almeida
Instituto Federal do Piauí (IFPI)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, ao meu falecido pai por ter sempre acreditado, me apoiado e auxiliado até os seus últimos dias, minha família de forma geral pelo apoio, força e incentivo para a conclusão deste estudo, assim como, o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – *Campus* São João do Piauí pelas contribuições materiais e de espaço para o realizar desta pesquisa, à minha orientadora, professora doutora Jéssica Rodrigues da Silva pela compreensão e esclarecimento ao decorrer deste estudo, bem como, à professora mestra Simone de Souza Macêdo, ao acadêmico de Licenciatura em Ciências Biológicas do IFPI-*Campus* São João do Piauí, João Lucas Rocha da Silva, à ex-acadêmica do mesmo curso, Thaise de Sousa pela cessão do protocolo intitulado, citogenética vegetal observação cromossômica (*Allium cepa* - cebola), auxílios e esclarecimentos em torno de seu uso, e, à professora doutora e bióloga Irlane Cristine de Souza Andrade Lira da Embrapa Semiárido, pelas orientações, auxílios e colaborações para o realizar deste estudo.

PROTOCOLO DE CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DA FLOR DE SEDA

Rodrigo Flor¹
 Prof. Dra. Jéssica Rodrigues da Silva²
 Prof. Ma. Simone de Souza Macêdo³

RESUMO

A Flor de Seda, é uma planta com caráter arbustivo perene que pertence à família Apocynaceae, com nome científico *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton, que pode ser encontrada em diversas regiões do Brasil, como, é o caso do Nordeste, e, possui diversas aplicações em diversas áreas, como, na agricultura, na construção civil, no artesanato e na etnomedicina, entretanto, mesmo com as diversas aplicações, ainda há uma escassez de estudos com base na genética, na citogenética, e na biologia molecular com enfoque nessa espécie, diante disso este estudo objetiva estabelecer um protocolo de caracterização cromossômica para a *C. procera*. A presente pesquisa foi realizada no Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Piauí - *Campus* São João do Piauí, IFPI – *Campus* São João do Piauí, situada no município de São João do Piauí, foram coletadas sementes de dois espécimes de *Calotropis procera*, em seguida submetidas a três protocolos de citogenética vegetal. Um dos três protocolos apresentou efeito satisfatório quanto à presença de células com cromossomos observáveis em relação aos demais, isso pode ser explicado pelo tempo de contato das amostras vegetais com a solução enzimática. Constatou-se ao final do estudo que ainda se fazem necessárias adaptações no protocolo para que possa auxiliar de forma eficiente em atividades citogenéticas, como, montagem de cariótipos e de idiogramas.

Palavras-chave: citogenética; cromossomos; protocolo.

ABSTRACT

Flor de Seda is a perennial bushy plant that belongs to the Apocynaceae family, with the scientific name *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton, which can be found in several regions of Brazil, such as the Northeast, and has several applications in several areas, such as agriculture, civil construction, crafts and ethnomedicine, however, even with the different applications, there is still a lack of studies based on genetics, cytogenetics, and molecular biology focusing on this species, therefore this study aims to establish a chromosomal characterization protocol for *C. procera*. The present research was carried out at the Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - *Campus* São João do Piauí (IFPI – *Campus* - São João do Piauí), located in the municipality of São João do Piauí, seeds were collected from two specimens of *Calotropis procera*, then subjected to three protocols of plant cytogenetics. One of the three protocols had a satisfactory effect regarding the presence of cells

¹ Licenciando de Ciências Biológicas. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – *Campus* São João do Piauí. casjp.20181s02.15.08@aluno.ifpi.edu.br.

² Doutora em Fitopatologia pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e professora do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico (EBTT) do Instituto Federal do Piauí – IFPI. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – *Campus* São João do Piauí. jessica.silva@ifpi.edu.br.

³ Mestra em Horticultura Irrigada pela Universidade do Estado da Bahia e professora de biologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – *Campus* São João do Piauí. simone.macedo@ifpi.edu.br.

with observable chromosomes in relation to the others, this can be explained by the contact time of the plant samples with the enzymatic solution. It was found at the end of the study that adaptations are still needed in the protocol used so that it can efficiently assist in cytogenetic activities, such as assembly of karyotypes and idiograms.

Keywords: cytogenetics; chromosomes; protocol.

1 INTRODUÇÃO

A *Calotropis procera* (AITON) W. T. Aiton, é uma planta com caráter arbustivo perene que pertence à família Apocynaceae, e, se encontra distribuída amplamente ao longo do mundo podendo ser encontrada na Ásia, na América e na África (BATOOL *et al.*, 2020). No Brasil, *C. procera*, é conhecida, popularmente, como, flor de seda, e, pode ser encontrada em diversas regiões, como, é o caso do Nordeste, possuindo nomes variáveis de acordo com o estado, ou, região em que se faz presente, algodão da praia, algodão de seda, ciúme, janaúba, leiteira, leiteiro, paininha-de-seda, pé-de-balão, queimadeira, e, saco-de-velho (RIBEIRO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2013).

Ademais, sua comum ocorrência nessa região pode ser explicada pelo fato de ter características comuns às plantas invasoras, como, rápido crescimento, propagação e grande produtividade de sementes que são dispersas pela ação dos ventos (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Assim, como, por ter a capacidade de tolerar uma enorme variedade de condições ambientais (KAUR *et al.*, 2021). Assim sendo, uma planta que pode ser vista como invasora e naturalizada no semiárido do Nordeste (SOUTO *et al.*, 2008).

Acerca das características desta espécie, possui caule cilíndrico com aspecto lenhoso e demasiadamente ramificado em sua base quando se está jovem, ramos com aspectos juvenis, folhas com as faces abaxiais tomentosas com algo similar à um algodão branco, sementes ovadas com um conjunto de pelos de aspectos sedosos (RAHMAN; WILCOCK, 1991). Apresenta reprodução por intermédio de sementes, e, pode atingir cerca de 1 a 2 metros de altura, possui flores brancas com 5 pétalas e extremidades em tom roxo, suas flores possuem odor adocicado (FERDOSI *et al.*, 2021; AL SULAIBI, THIEMANN e THIEMANN, 2020).

Em relação aos diversos potenciais benefícios aos humanos, a *C. procera* pode ser utilizada na agricultura, como, adubo verde, e, fonte de ração para alimentar cabras, ovelhas e vacas (ALMEIDA *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2009). Segundo Al-Rowaily *et al.* (2020), os seus óleos essenciais podem ser promissores bioherbicidas ao meio ambiente servindo para o controle de ervas daninhas. Além disso, na construção civil seu caule pode ser utilizado para a confecção de telhados, no artesanato, suas fibras podem ser utilizadas para a confecção de bolsas, redes, cestos e cordas, na etnomedicina, possui diversas aplicações, como, atua contra a asma brônquica, além disto, o látex da planta pode ser utilizado para o tratamento da epilepsia, dores nas articulações e inchaços (AL SULAIBI, THIEMANN e THIEMANN, 2020; BATOOL *et al.*, 2020; KHARE, 2007).

Todavia, diante das diversas potenciais contribuições para a sociedade humana expostos anteriormente sobre a *C. procera*, vale ressaltar que ainda há uma escassez de conhecimento em relação à diversidade dessa planta, principalmente, estudos com base na genética, na citogenética, e, na biologia molecular com enfoque nessa espécie. Assim tornam-se imprescindíveis estudos com base na citogenética, especificamente, o estabelecimento de protocolo de caracterização cromossômica para esta planta, servindo como um meio de amplificação dos horizontes da biologia acerca da *C. procera* (DIAS *et al.*, 2018; GUERRA, 1988; SINGH, 2017).

O estabelecimento de protocolo delineado especificamente para a *C. procera* pode contribuir com informações acerca dos cromossomos, em relação à quantidade, estrutura e sua morfologia, tornando-se importante aliado para a elucidação de questões relativas às relações

de parentesco e evolução desta espécie. Logo, tal protocolo permitiria explicar fenômenos associados à herança contribuindo para o esclarecimento de questões associadas à taxonomia dessa planta que por intermédio de outros métodos ou abordagens seriam difíceis de serem explicados (EROĞLU *et al.*, 2013; PAVLOVA e TOSHEVA, 2004; SINGH, 2017).

Assim sendo, com o intuito de gerar subsídios para a compreensão das relações taxonômicas e evolutivas entorno da flor de seda, bem como, para incentivar estudos posteriores relativos à genética, citologia e à biologia molecular sobre esta planta, e, para estimular estudos com enfoque na flora local, nativa e exótica presente, este estudo objetiva estabelecer um protocolo de caracterização cromossômica para a *C. procera* (Aiton) W. T. Aiton.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO E DOS MATERIAIS VEGETAIS

O presente estudo caracterizado como pesquisa aplicada utilizando-se método de coleta de campo, bibliográfico e experimental, foi realizado no período de 01/10/2022 a 01/05/2023. Em relação ao material vegetal foram utilizadas neste estudo raízes de plântulas germinadas a partir de sementes coletadas de dois espécimes de *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton nas dependências do IFPI-Campus São João do Piauí (8°21'40" S 42°15'12" W), figura 1, A e B.

Figura 1 – Flor de seda.



A. Espécime de Flor de Seda da qual foi coletada parte das sementes. B. Algumas das sementes coletadas. Fonte: Autor (2023).

2.2 PROCEDIMENTOS PARA O ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA

Para o estabelecimento de um protocolo específico para a *C. procera*, foram adotados três protocolos. Inicialmente foi usado o protocolo intitulado, citogenética vegetal observação cromossômica (*Allium cepa* - cebola), adaptado de coloração de Giemsa de Guerra e Souza (2002), e, Guerra (1983) com alterações no antimitótico utilizado, bem como, de materiais no procedimento de remoção da lamínula, removida sem uso de nitrogênio e gelo seco, e, no procedimento de montagem de lâminas, montadas sem o secamento através de bomba de ar. Em seguida, foi adotado o protocolo análise da heterocromatina constitutiva através da

coloração com os fluorocromos CMA3/DA/DAPI (tríplice coloração) de Guerra e Souza (2002), somente com o uso do DAPI, e, posteriormente, o protocolo anterior com adaptações.

Em relação à submissão aos procedimentos dos protocolos adotados, inicialmente, as sementes foram coletadas e imersas em álcool 70% durante 30 segundos, em seguida, foram transferidas para o hipoclorito 3:1 durante 1 minuto, e, expostas à três lavagens com água destilada para a sua desinfestação. Após, as sementes foram transferidas para placas de Petri com papel filtro, que foram substituídos durante o primeiro protocolo pela bandeja sementeira com esterco caprino e areia, e, expostas à luminosidade solar e temperatura ambiente no interior do laboratório de biologia do IFPI-*Campus* São João do Piauí e regadas com uma a duas gotas de água com o auxílio de pipeta Pasteur.

2.3 PROTOCOLO 1 (P1):

Após as etapas descritas, as raízes das plântulas foram extraídas e submetidas ao primeiro protocolo sendo pré-tratadas com antimetabólico, solução de colchicina 0,01 a 0,5%, em microtubos tipo Eppendorf com 1,75 ml de solução, durante 60 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, condicionadas à geladeira por 24 horas, e, fixadas em solução de Carnoy 3:1, 3 partes de álcool etílico P.A. para 1 parte de ácido acético glacial, em microtubos tipo Eppendorf com 1,75 ml de solução, seguidamente, lavadas duas vezes em água destilada durante 5 minutos por lavagem, secas em papel filtro, mergulhadas em placas de Petri com HCL 5N por 20 minutos.

Após, foram removidas a coifa e tecidos externos das raízes com o auxílio de microscópio estereoscópio, mediante a presença de ácido acético 45% em lâminas, afim de deixar somente o meristema radical. Adiante, as lâminas foram cobertas com as lamínulas e conduzidas ao freezer por 60 minutos. Depois, as lamínulas foram removidas e as amostras coradas com Giemsa a 2% durante 10-30 minutos, e, em seguida, as lâminas foram montadas em base para unhas e conduzidas para observação no microscópio óptico nas objetivas de 40x e 100x.

2.4 PROTOCOLO 2 (P2):

No segundo protocolo os materiais vegetais, foram submetidas ao segundo protocolo de autoria de Guerra e Souza (2002) com DAPI, por intermédio de envio de sementes ao laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido. Vale ressaltar que as sementes foram previamente germinadas em placas de Petri com papel filtro, e, o material foi coletado, pré-tratado com solução de colchicina 0,01 a 0,5%, fixado em Carnoy 3:1, lavadas em água destilada e secas em papel filtro.

Em seguida, colocadas em lâminas com uma gota de solução enzimática, contendo 2% de celulase e 20% de pectinase. Além disso, foram mantidas em câmara úmida a 37 °C durante 90 minutos até as raízes ficarem macias. Seguidamente, lavadas com água destilada, secas em papel filtro, e, transferidas para as lâminas com duas gotas de solução de DAPI (0,5 mg/ml). Posteriormente, foram cobertas com as lamínulas por 30 minutos em temperatura ambiente em caixa fechada, lavadas com água destilada e secas ao ar. Após, as lâminas foram montadas com meio de montagem com glicerol/tampão MacIlvaine/MgCl₂, descoradas, deixadas em repouso durante 3 dias, depois, coradas somente com o DAPI, facilitando a observação na objetiva de 100x, e, examinadas em microscópio de fluorescência.

2.5 PROTOCOLO 3 (P3):

Ademais, os materiais vegetais foram ainda submetidos ao terceiro protocolo, análise da heterocromatina constitutiva através da coloração com os fluorocromos CMA3/DA/DAPI

(tríplice coloração) de Guerra e Souza (2002), com adaptações, e, utilizando somente o DAPI, de forma que sementes foram previamente enviadas ao laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido. Em seguida, as sementes foram germinadas, e, os materiais foram previamente coletados de placas de Petri com papel filtro, pré-tratados com solução de colchicina 0,01 a 0,5%, e, fixados em Carnoy 3:1.

Posteriormente, lavados em água destilada e secos em papel filtro, posto em lâminas com uma gota de solução enzimática, contendo 2% de celulase e 20% de pectinase. Além disso, foram mantidas em câmara úmida a 37 °C durante 2 a 3 horas até as raízes ficarem macias. Em seguida, lavadas com água destilada, secas em papel filtro, e, transferidas para as lâminas com duas gotas de solução de DAPI (0,5 mg/ml), cobertas com as lamínulas por 30 minutos em temperatura ambiente em caixa fechada, em seguida, lavadas com água destilada e secas ao ar, após, as lâminas foram montadas com meio de montagem com glicerol/tampão MacIlvaine/MgCl₂, após, foram descoradas, deixadas em repouso durante 3 dias, depois, coradas somente com o DAPI, e, examinadas em microscópio de fluorescência.

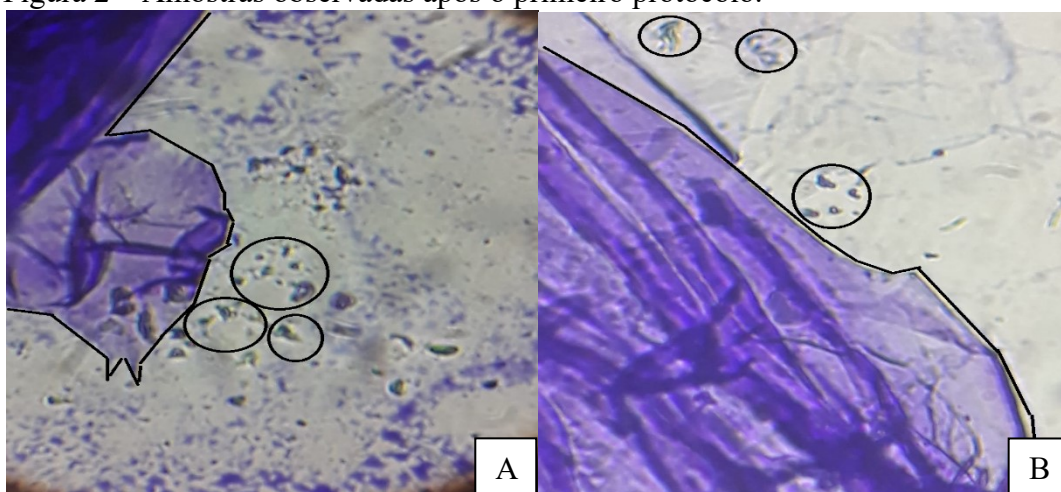
3 RESULTADOS

Considerando a busca de resultados satisfatórios neste estudo, alterações anteriores à submissão aos protocolos foram necessárias em virtude da ocorrência de fungos. O reumedecimento periódico do papel filtro e do vagaroso desenvolvimento das sementes em papel filtro nas placas de Petri, como, alterações no local de germinação, de modo que o papel filtro junto às placas de Petri foram ao longo do estudo substituídas pela bandeja sementeira com esterco caprino em mistura à areia, e embebidas em água por intermédio de pipeta Pasteur.

Essas alterações sucederam em um desenvolvimento mais acelerado das sementes que antes ocasionavam em parte das sementes sem processos germinativos, ou, germinação de maneira demasiadamente vagarosa levando em torno de 8 à 12 dias, após, as mudanças, as sementes levaram em torno de 5 à 8 dias para germinar e apresentar desenvolvimento satisfatório das raízes.

Em relação aos protocolos aos quais as amostras vegetais foram submetidas pode-se observar que durante o primeiro protocolo intitulado de citogenética vegetal observação cromossômica (*Allium cepa* - cebola), as lâminas preparadas apresentaram elementos observáveis na figura 2, A e B.

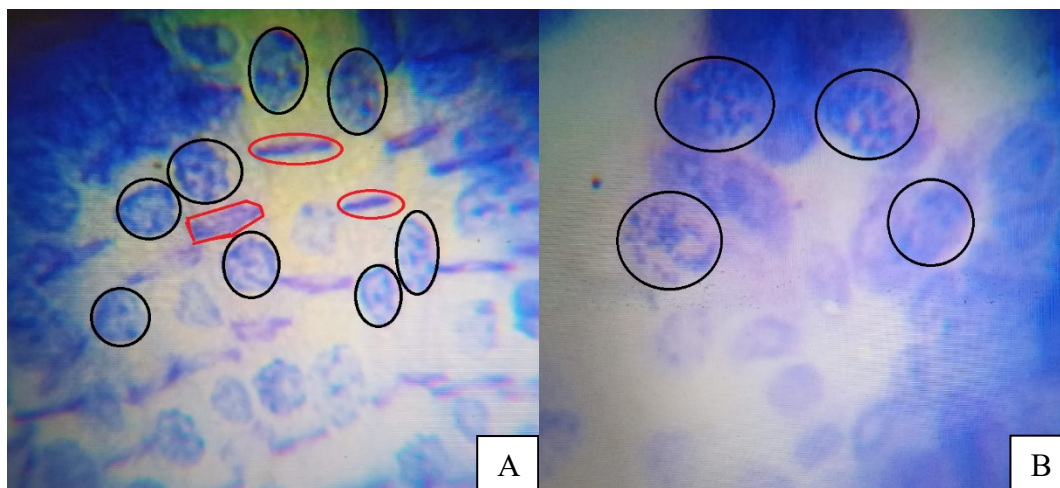
Figura 2 – Amostras observadas após o primeiro protocolo.



A e B. presença elevada de elementos residuais das raízes, marcações em preto. Fonte: Autor (2022).

No que diz respeito ao segundo protocolo, análise da heterocromatina constitutiva através da coloração com os fluorocromos CMA3/DA/DAPI (tríplice coloração) de Guerra e Souza (2002), somente com o uso do DAPI, as lâminas ao final do protocolo denotavam similarmente alguns aspectos dos resultados do primeiro protocolo que podem ser vistas na figura 3, A e B.

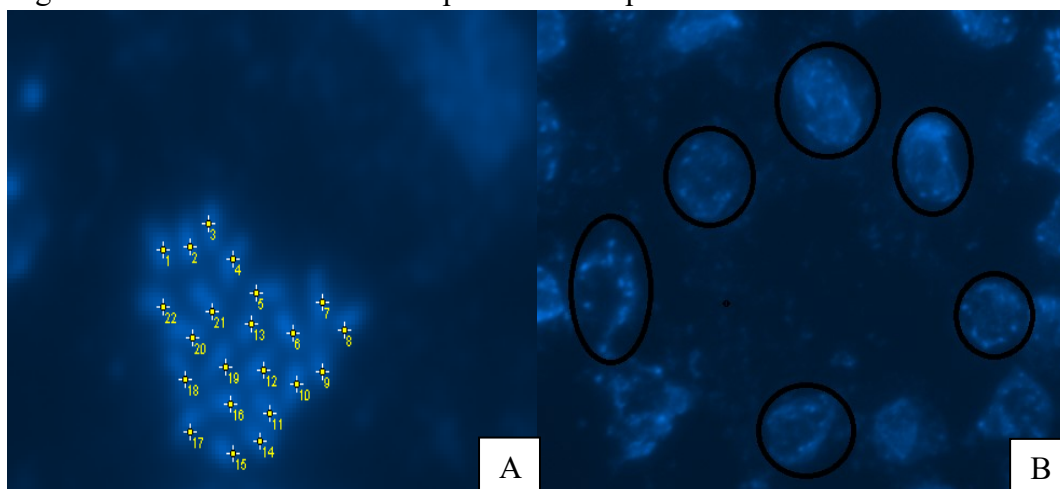
Figura 3 – Amostras observadas após o segundo protocolo.



A e B. Elementos residuais das raízes em quantidade baixa, marcações em vermelho, e, células com parede celular em quantidade elevada, marcações em preto. Fonte: Irlane Cristine de Souza Andrade Lira (2022).

Por fim, no que concerne ao terceiro protocolo, análise da heterocromatina constitutiva através da coloração com os fluorocromos CMA3/DA/DAPI (tríplice coloração) de Guerra e Souza (2002), com adaptações, e, utilizando somente o DAPI, e, com adaptações no procedimento de digestão enzimática de modo que as lâminas com amostras vegetais foram mantidas em câmara úmida a 37 °C durante 2 a 3 horas, após, houve a exposição à uma gota de solução enzimática. Além disso, houve notável redução da quantidade de elementos teciduais das raízes, contudo, a presença destes elementos em quantidade expressiva, podendo ser citado ainda quantia significativa de células com cromossomos inobserváveis e células com cromossomos que podem até mesmo serem quantificados, conforme figura 4, A e B. Ademais, os principais resultados obtidos também podem ser vistos agrupados no quadro 1 abaixo.

Figura 4 – Amostras observadas após o terceiro protocolo.



A. Célula com cromossomos observáveis e que podem ser quantificados, foram contados 22 cromossomos. B. Células com cromossomos observáveis que não podem ser quantificados e nem identificados, marcações em preto. Fonte: Irlane Cristine de Souza Andrade Lira (2022).

Quadro 1 – Principais dados obtidos de amostras submetidas a 3 protocolos que correspondem respectivamente ao protocolo citogenética vegetal observação cromossômica (*Allium cepa* - cebola) adaptado de coloração de Giemsa de Guerra e Souza (2002), e, Guerra (1983) – P1, protocolo análise da heterocromatina constitutiva através da coloração com os fluorocromos CMA3/DA/DAPI (tríplice coloração) de Guerra e Souza (2002), somente com o uso do DAPI – P2 e protocolo análise da heterocromatina constitutiva através da coloração com os fluorocromos CMA3/DA/DAPI (tríplice coloração) de Guerra e Souza (2002), somente com o uso do DAPI com adaptações – P3.

	P1	P2	P3
Ausência	Coifa, região meristemática do ápice radicular e células com cromossomos	Células sem parede celular com cromossomos observáveis	
Presença baixa		Elementos teciduais das raízes, como, a epiderme da raiz	Elementos teciduais das raízes e células com cromossomos que podem ser quantificados e identificados quanto à sua morfologia
Presença elevada	Elementos teciduais das raízes, como, a epiderme da raiz	Células com parede celular com cromossomos observáveis que não podem ser quantificados e nem identificados	Células com cromossomos observáveis que não podem ser quantificados e nem identificados

Fonte: Autor (2023).

4 DISCUSSÕES

No que tange ao local de germinação que foi alterado de placa de Petri com papel filtro para a bandeja sementeira e esterco, esta alteração se fez necessária e condiz com o trabalho de Figliolia e Piña-Rodrigues (1995), que mencionam que dentre as principais desvantagens do uso do papel filtro para a germinação de sementes, estão a necessidade do umedecimento com frequência, e, a ocorrência de fungos aeróbicos, assim, estas desvantagens conduziram a alteração citada anteriormente, bem como, o tempo de germinação das sementes que se contrapõe ao mencionado pelos autores anteriores que alegam que sementes em papel filtro apresentam processo germinativo acelerado, contudo, as sementes de *C. procera* postas para germinar em papel filtro apresentaram desenvolvimento lento.

Ademais, em estudo realizado por Silva *et al.* (2022), acerca do uso de substratos à base de esterco caprino na germinação e emergência do feijão lablab denotam o composto de esterco caprino e areia, como, o composto que obteve o segundo melhor resultado na emergência do espécime estudado. Quanto a isto Alves *et al.* (2015), afirmam que a capacidade de retenção de água de uma mistura de substratos pode favorecer significativamente a germinação e emergência de plantas em desenvolvimento inicial, o que pode também explicar o desenvolvimento significativo de sementes de *C. procera* neste estudo.

À despeito dos achados relativos ao primeiro protocolo em que as amostras vegetais foram submetidas, Wee-Hiang, Wei-Seng e Kwong-Hung (2021), relatam que cromossomos em tamanho reduzido, assim como, cromossomos bem próximos, poderiam explicar a dificuldade na contagem de cromossomos, contudo, é possível pontuar que não explicaria somente isto, mas, que o fato de cromossomos serem bem pequenos poderiam também explicar as dificuldades na observação dos cromossomos da *C. procera*, após, o primeiro protocolo.

Além do que, corrobora com a dificuldade de observação dos cromossomos, após, o primeiro protocolo, Guerra e Souza (2002), os quais afirmam que o uso da colchicina é altamente recomendável para cromossomos maiores, pois, permitem a condensação dos cromossomos de forma mais ativa o que contribui para atividades de identificação da morfologia dos cromossomos, assim como, o horário de tratamento com a colchicina e antimitóticos de forma geral durante às 10:00 h da manhã, em virtude de que neste horário a maior parte das espécies apresentam quantidade significativa de células em prófase que vão, logo após, o tratamento, resultar em quantidade satisfatória de células com metáfases interrompidas.

Além disso, os autores mencionados anteriormente, indicam também a necessidade de digestão enzimática antes do tratamento com HCL 5N em raízes duras, pois, o tratamento com digestão enzimática contribui para a remoção da parede celular o que facilita a preparação de lâminas com presença de cromossomos observáveis, o que também pode ser associado junto aos argumentos apresentados previamente para explicar a inobservância dos cromossomos da amostra vegetal de *C. procera* ao final do primeiro protocolo.

No que diz respeito ao segundo protocolo o surgimento de células com parede celular em quantidade elevada, bem como, a presença de células com cromossomos observáveis pode também ser explicada por Guerra e Souza (2002), aos quais alegam que o tempo de digestão enzimática muda de espécie a espécie. Assim, o tempo de 90 minutos aplicado neste protocolo favoreceu a degradação da parede celular de algumas células, contribuindo para a observação de alguns cromossomos.

No que concerne aos resultados do segundo e terceiro protocolo, segundo ainda Guerra e Souza (2002), o uso inadequado da colchicina em cromossomos pequenos, e, o horário adequado de tratamento com esse antimitótico, como, arguidos previamente, podem também esclarecer a presença de poucas células com cromossomos observáveis, ou seja, de células em

metáfases interrompidas em quantia expressiva, e, de células com cromossomos inobserváveis em valor significativo, depois de serem tratadas no segundo e terceiro protocolo.

Além do mais quanto ao terceiro protocolo o aumento da expressão de células com cromossomos observáveis pode ser relacionado ao maior tempo de contato da amostra vegetal com a solução enzimática, podendo ser explicado com base na arguição previamente mencionada dos autores supracitados Guerra e Souza (2002), que esse aspecto está intrínseco à variação no tempo de espécies para espécies no procedimento de digestão enzimática, ou seja, com a solução enzimática. Assim, contribuindo para a degradação da parede celular de um número maior de células, neste sentido, facilitando a observação, contagem e identificação de cromossomos.

5 CONCLUSÃO

Para tanto, os resultados obtidos ao decorrer do estudo demonstraram que foi possível estabelecer um protocolo de caracterização cromossômica para a *Calotropis procera*, contudo, ainda se fazem necessárias alterações pontuais no protocolo, especificamente, no tempo de tratamento e no tipo de antimitótico utilizado, visando o aperfeiçoamento dos resultados para que ao final o protocolo possa contribuir de forma eficiente para a realização de atividades citogenéticas posteriores, como, montagem de cariótipos e de idiogramas, assim como, contagem cromossômica, performando melhor expressão de células com cromossomos em ótimas condições de observação com a *Calotropis procera*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Antonio Ewerton Da Silva, *et al.* “EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DO CONSÓRCIO ALFACE-RÚCULA FERTILIZADO COM FLOR-DE-SEDA. **Caatinga**, [S. l], v. 28, n. 3, p. 79–85. 2015
- AL-ROWAILY, Saud L. *et al.* Essential Oil of *Calotropis Procera*: Comparative Chemical Profiles, Antimicrobial Activity, and Allelopathic Potential on Weeds. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 25, n. 21, p. 1-19, 2020.
- AL SULAIBI, Mazen A. M; THIEMANN, Carolin; THIEMANN, Thies. Chemical Constituents and Uses of *Calotropis Procera* and *Calotropis Gigantea* – A Review (Part I – The Plants as Material and Energy Resources). **Open Chemistry Journal**. [S. l], v. 7, p. 1-15, 2020.
- ALVES, José, *et al.* Taxa e índice de velocidade de emergência de paricá em diferentes substratos e frequência de irrigação. **Enciclopédia Biosfera**, [S. l], v. 11, n. 21, 2015.
- BATOOL, Hina, *et al.* A review on *Calotropis procera* its phytochemistry and traditional uses. **Big Data In Agriculture**, [S. l], v. 2, n. 2, p. 56–58, 2020.
- COSTA, Roberto Germano, *et al.* PERSPECTIVAS DE UTILIZAÇÃO DA FLOR-DE-SEDA (*Calotropis Procera*) NA PRODUÇÃO ANIMAL. **Caatinga**, [S. l], v. 22, n. 1, p. 1–9, 2009.
- DIAS, Cibelle Santos, *et al.* Comparação De Protocolos Para Extração De DNA Genômico De *Calotropis Procera* Ait. R. Br. (Apocynaceae: Asclepiadoideae). **Multi-Science Journal**, [S. l], v. 1, n. 13, p. 277–281, 2018.
- EROĞLU, H.E, *et al.* Karyotype analysis of some *Minuartia* L. (Caryophyllaceae) taxa. **Plant Syst Evol**, [S. l], v. 299, 67–73, 2013.
- FERDOSI, Malik Fiaz Hussain, *et al.* BIOCHEMICAL PROFILE OF *Calotropis Procera* FLOWERS. **Pakistan Journal of Weed Science Research**, [S. l], v. 27, n. 3, p. 341–349, 2021.
- FIGLIOLIA, M.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. Considerações práticas sobre o teste de germinação. In: Manual técnico de sementes florestais. **IF Série Registros**, São Paulo, n.14, p. 45-59, 1995.
- GUERRA, M. O uso do corante Giemsa na citogenética vegetal: comparação entre a coloração simples e o bandeamento. **Ciênc. Cult.** [S. l], v.35, p. 190-193. 1983.
- GUERRA, M. dos S. **Introdução à citogenética geral**. [S. l]. Guanabara Koogan, 1988.
- GUERRA, Marcelo; SOUZAS, MJ de. **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.
- KAUR, Amarpreet, *et al.* An Overview of the Characteristics and Potential of *Calotropis Procera* From Botanical, Ecological, and Economic Perspectives. **Frontiers in Plant Science**, [S. l], v. 12, p. 1-13, 2021

KHARE, C. P. **Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary**. 1. ed. New York: Springer, 2007.

OLIVEIRA, Silvia H. F. de, *et al.* Seedling Growth of the Invader *Calotropis Procera* in Ironstone Rupestrian Field and Seasonally Dry Forest Soils. **Neotropical Biology and Conservation**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 69–76, 2009.

PAVLOVA, Dolja; TOSHEVA, Anita. Notes on karyomorphology of *Melilotus officinalis* populations in Bulgaria, **Caryologia**, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 151-157, 2004.

RAHMAN, M.A.; WILCOCK, C.C. A taxonomic revision of *Calotropis* (Asclepiadaceae). **Nordic Journal of Botany**, [S. l.], v. 11, p. 301-308, 1991.

RIBEIRO, João Everthon da Silva, *et al.* Morphophysiological aspects of young *Calotropis procera* plants submitted to different shading levels. **Scientia Plena**, [S. l.], v. 15, n. 11, 2019.

SILVA, Esmeraldo Dias da, *et al.* Esterco caprino na composição de substratos para germinação e emergência de *Lablab purpureus*. **Scientific Electronic Archives**, [S. l.], v. 15, n. 1, 2022.

SILVA, Maiele Leandro da et al. Produção de cenoura fertilizada com flor-de-seda (*Calotropis procera* (Ait.) R.Br.). **Revista Ciência Agronômica**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 732–740, out. 2013.

SINGH, Ram J. **Plant Cythogenetics**. 3. ed. [S. l.]. Taylor & Francis, 2017.

SOUTO, Patrícia Carneiro et al. FRUITS BIOMETRY AND NUMBER OF SEEDS OF *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. IN THE SEMIARID OF PARAIBA. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 108–113, 2008.

WEE-HIANG, Eng; WEI-SENG, Ho; KWONG-HUNG, Ling. Cytogenetic, chromosome count optimization and automation of *Neolamarckia cadamba* (Rubiaceae) root tips derived from in vitro mutagenesis. **Notulae Scientia Biologicae**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 10995-10995. 2021.