

**CONTRIBUIÇÕES À BIOSISTEMÁTICA DO
GÊNERO *Lippia* L. (Verbenaceae)**

SAULO MARÇAL DE SOUSA

2008

SAULO MARÇAL DE SOUSA

**CONTRIBUIÇÕES À BIOSISTEMÁTICA DO
GÊNERO *Lippia* L. (Verbenaceae)**

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

Orientadora

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Sousa, Saulo Marçal de.

Contribuições à biosistemática do gênero *Lippia* L. (Verbenaceae) /
Saulo Marçal de Sousa. -- Lavras : UFLA, 2008.

131 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Giovana Augusta Torres.

Bibliografia.

1. *Lippia*. 2. Verbenaceae. 3. Cromossomos. 4. Anatomia. 5.
Palinologia. 6. Citometria de fluxo. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 583.880487322

SAULO MARÇAL DE SOUSA

**CONTRIBUIÇÕES À BIOSISTEMÁTICA DO GÊNERO *Lippia* L.
(Verbenaceae)**

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

APROVADA em 20 de junho de 2008

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini UFJF

Profa. Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena UFJF

Profa. Dra. Tatiana Ungaretti Paleo Konno UFRJ

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide UFLA

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A um grande amigo
que me ensinou
que nada resiste
ao trabalho,

OFEREÇO

Aos meus queridos pais, Hermínio (em memória) e Lúcia, por tudo que
representam para mim e aos meus irmãos Flávio, Fernanda, Kátia e
Humberto, pelo apoio, carinho e compreensão;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A meus pais, Hermínio Ferreira de Sousa (em memória) e Lúcia Aparecida Marçal de Sousa, por todo ensinamento, carinho, apoio e compreensão e por todas as oportunidades que me ofereceram e continuam oferecendo.

Aos meus irmãos, Humberto, Kátia, Fernanda e Flávio, pela amizade, carinho e pela presença marcante em minha vida.

À amiga e orientadora Giovana Augusta Torres, pelo auxílio, pela confiança, por todas as oportunidades, pela sinceridade e por todos os ensinamentos.

Ao meu grande amigo e orientador Lyderson Facio Viccini, pela confiança, por todo apoio, pelas boas risadas e conversas infundáveis e pela oportunidade de trabalhar com "*las Lippia*".

À amiga e professora Lisete Chamma Davide, pela paciência, gentileza e atenção.

À amiga e professora Fátima Regina Salimena (a Fatinhaceae), pela atenção, pelo ótimo humor, por toda a sua alegria e simpatia.

Ao professor Eduardo Alves, do Centro de Microscopia da UFLA, pelo auxílio e pela disposição na utilização da microscopia eletrônica.

À amiga Heloísa, técnica do Centro de Microscopia da UFLA, por toda disponibilidade, pelo humor e pelas engraçadas situações durante a realização deste trabalho.

À professora Dulcinéia de Carvalho, do Departamento de Engenharia Florestal da UFLA, pela empolgação e pelos ensinamentos.

Aos professores João Bosco, Magno, César, Elaine, João Cândido, Samuel, Daniel, Wagner e José Eduardo, pelos ensinamentos no decorrer da Pós-Graduação.

Aos grandes amigos que ganhei de presente em Lavras: Kátia Ferreira, Fernanda Bustamante e Leonardo Gerdraite, meu muito obrigado pela sincera amizade.

Aos grandes amigos de outros "carnavais", Patrícia Pierre, Cris, Pâmela, Zé Marcello, Fernanda Sampaio, Priciane (Pricicróides, Priciluda, Pricidalva e etc.), meus sinceros agradecimentos por todo apoio, auxílio, incentivo e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética da UFLA: Soraya, Rose, Juliane, Kátia, Ana Luiza, Amanda, Leo, Rafa, Fernando, Fabíola, Letícia, Jeanne, Iara, Patrícia e Marcel , pelos momentos de alegria e amizade.

Aos amigos do laboratório de genética da UFJF: Aryane (a borboleta), Cássia, Letícia, Priciane, Diego, Aline, Suzana, João, Marcelo, Karina, Shaiany, Lucas, Joice (a Joyce do cavaco), Junya, Ana Paula e Christian.

A Elaine e Patrícia , secretárias da Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e do curso de Biologia, pelo valioso auxílio, pela paciência e amizade.

Aos funcionários da UFLA e do Departamento de Biologia, em especial, Lamartine, Irondina e Rafaela, por todo auxílio e amizade.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	I
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1 Biodiversidade e o gênero <i>Lippia</i> L. (Verbenaceae).....	1
1 Introdução geral.....	2
2 Referencial teórico geral.....	4
2.1 Biodiversidade e conservação no Brasil.....	4
2.2 Campos rupestres, a família Verbenaceae e o gênero <i>Lippia</i> : aspectos taxonômicos.....	5
2.3 O gênero <i>Lippia</i> : distribuição geográfica e sua importância.....	10
2.4 A citogenética como ferramenta para a taxonomia vegetal e a caracterização da biodiversidade: aspectos gerais e situação no gênero <i>Lippia</i>	12
2.5 Tratos palinológicos e suas relações com a citogenética na caracterização do gênero <i>Lippia</i>	17
2.6 Determinação da quantidade de DNA nuclear no estudo taxonômico e no conhecimento da biodiversidade.....	19
3 Referências bibliográficas	22
CAPÍTULO 2 Padrões palinológicos em espécies brasileiras do gênero <i>Lippia</i> L. (Verbenaceae).....	33
1 Resumo.....	34
2 Abstract.....	35
3 Introdução.....	36
4 Material e métodos.....	39

4.1 Material vegetal.....	39
4.2 Palinologia.....	41
4.3 Correlações do diâmetro polínico com a ploidia das espécies de <i>Lippia</i>	43
5 Resultados e discussão.....	44
5.1 Caracterização palinológica.....	44
5.2 Correlações de tratos palinológicos com o número cromossômico.....	54
6 Conclusões.....	59
7 Referências bibliográficas.....	60
CAPÍTULO 3 Caracterização cromossômica de seis espécies de <i>Lippia</i> L. (Verbenaceae).....	63
1 Resumo.....	64
2 Abstract.....	65
3 Introdução.....	66
4 Material e métodos.....	68
4.1 Material vegetal.....	68
4.2 Preparações cromossômicas.....	69
4.3 Bandeamentos cromossômicos.....	70
4.4 Análise cariotípica.....	70
5 Resultados e discussão.....	72
6 Conclusões.....	84
7 Referências bibliográficas.....	85
CAPÍTULO 4 Citogenética, palinologia, anatomia foliar e quantidade de DNA nuclear em <i>Lippia lacunosa</i> , <i>Lippia rotundifolia</i> (Verbenaceae), duas espécies de difícil delimitação taxonômica.....	88
1 Resumo.....	89
2 Abstract.....	90

3 Introdução.....	91
4 Material e métodos.....	93
4.1 Material vegetal.....	93
4.2 Preparações cromossômicas.....	93
4.3 Bandeamentos cromossômicos.....	94
4.4 Análise cariotípica.....	95
4.5 Comportamento meiótico e variabilidade do pólen e das sementes.....	96
4.5.1 Análise meiótica.....	96
4.5.2 Viabilidade do grão de pólen.....	96
4.5.3 Viabilidade de sementes.....	97
4.6 Estimativa da quantidade de DNA nuclear.....	98
4.7 Palinologia.....	98
4.7.1 Microscopia de luz.....	99
4.7.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	99
4.8 Anatomia.....	99
4.8.1 Microscopia de luz.....	99
4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	100
5 Resultados e discussão.....	101
5.1 Cariótipos, bandeamentos cromossômicos e estimativas do conteúdo de DNA por citometria de fluxo.....	101
5.2 Meiose, viabilidade polínica e viabilidade de sementes.....	114
5.3 Palinologia.....	116
5.4 Anatomia.....	119
6 Conclusões.....	125
7 Referências bibliográficas.....	126

RESUMO

SOUSA, Saulo Marçal de. **Contribuições à biosistemática do gênero *Lippia* L. (Verbenaceae)**. 2008. 131 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

A diversidade biológica pode ser entendida como a variação de organismos vivos e suas relações com os diferentes ecossistemas em que vivem, podendo o homem se beneficiar muitíssimo com produtos obtidos dessa diversidade. O gênero *Lippia* L. (Verbenaceae) caracteriza-se por apresentar grande número de espécies com propriedades medicinais comprovadas, sendo também utilizadas na indústria alimentícia e de cosméticos. O Brasil é considerado um dos centros de diversidade de espécies deste gênero, possuindo um grande número de espécies endêmicas, que são pouco conhecidas. Taxonomicamente, o gênero apresenta um grande número de espécies mal delimitadas, havendo a necessidade de novas revisões, com abordagens mais consistentes que permitam uma melhor delimitação dessas espécies. Dentre as diferentes abordagens que podem ser utilizadas para esta finalidade, podem ser destacadas a citogenética, a palinologia, a obtenção do tamanho do genoma pela citometria de fluxo e a anatomia. A utilização de tais ferramentas, assim como suas aplicações e potencialidades em diversos grupos de plantas e no gênero *Lippia*, é abordada neste capítulo.

¹ Comitê de Orientação: Giovana Augusta Torres-UFLA (Orientadora), Lyderson Facio Viccini - UFJF.

ABSTRACT

SOUSA, Saulo Marçal de. **Contributions to the biosystematics of the genus *Lippia* L. (Verbenaceae)**. 2008. 131 p. Thesis (Doctor's degree in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.²

The biological diversity can be understood as the variation of the living organisms and their relation with different ecosystems. The genus *Lippia* L. (Verbenaceae) has a great number of species with medicinal, food and cosmetic properties. Brazil is considered as one of the main diversity centers, with a great number of endemic species. Taxonomically, the genus posses a great number of species poorly delimited, being necessary new revisions using news approaches. Cytogenetics, palinology, estimation of genome size by flow citometry and anatomy constitute excellent auxiliary tools that can be used to help better characterization of species. The utilization of these tools as well as theirs applications and potentialities to study various plants groups, including the genus *Lippia*, are discussed in this chapter.

² Guidance Committee: Giovana Augusta Torres-UFLA (Major Professor), Lyderson Facio Viccini - UFJF.

Capítulo 1

Biodiversidade e o gênero *Lippia* L. (Verbenaceae)

1 INTRODUÇÃO GERAL

O conhecimento e a utilização sustentável dos recursos naturais vegetais constituem importantes temas que vêm sendo discutidos pela comunidade científica nos últimos anos. Nesse sentido, o Brasil, por possuir a maior biodiversidade vegetal do planeta, tem possibilitado a obtenção de inúmeras matérias-primas utilizadas para a geração de novos produtos de interesse para o mundo, seja na indústria farmacêutica, na alimentícia, na de cosméticos ou para a agroindústria. No entanto, muito pouco da flora brasileira é conhecido, havendo a urgente necessidade de trabalhos que possibilitem o seu conhecimento.

Dentre os inúmeros grupos de plantas que vêm sendo estudados pelos pesquisadores na bioprospecção de novas fontes de matéria-prima, pode-se destacar o gênero *Lippia*, com espécies aromáticas utilizadas principalmente para a obtenção de compostos importantes na fabricação de fármacos, cosméticos, herbicidas, inseticidas e outros.

Embora algumas espécies deste gênero sejam bem estudadas, muitas outras, principalmente as espécies brasileiras, ainda são pouco conhecidas, havendo poucos trabalhos sobre as mesmas. Além disso, a taxonomia do grupo é complexa, com muitas espécies apresentando sinonímias intragenéricas e intergenéricas, o que dificulta cada vez mais o conhecimento desse grupo de plantas.

Sendo assim, o estudo biosistemático, utilizando um grande número de técnicas que contribuam para a sistemática desse grupo de plantas, torna-se indispensável, uma vez que as ferramentas clássicas de análises morfológicas utilizadas pela taxonomia são insuficientes para tal fim.

A citogenética, a palinologia, a citometria de fluxo e a anatomia vegetal são áreas que podem, de forma enriquecedora, auxiliar na taxonomia das espécies brasileiras de *Lippia*, possibilitando além do estudo taxonômico, o maior conhecimento do grupo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO GERAL

2.1 Biodiversidade e conservação no Brasil

A biodiversidade pode ser entendida como a variedade de organismos vivos presentes em todos os ecossistemas: terrestres, dulcícolas e marinhos, assim como os complexos ecológicos dos quais fazem parte. Além disso, juntamente com os fatores abióticos, a diversidade biológica é responsável pela manutenção do equilíbrio e da estabilidade dos ecossistemas, bem como é fonte inestimável de recursos econômicos potencialmente exploráveis (Mittermeier et al., 1999).

Um dos valores mais largamente aceitos para a preservação da biodiversidade em larga escala baseia-se nas possibilidades futuras de adaptação das plantas e do uso de organismos em um ambiente incerto e em constante mudança. Este valor da biodiversidade está associado com a variedade de genes que podem expressar nos organismos caracteres fenotípicos potencialmente úteis (diferentes produtos químicos, caracteres morfológicos, etc.). Além disso, o estoque genético de espécies atualmente utilizadas, ou de espécies aparentadas, pode ser de grande importância no futuro. Como não sabemos quais genes serão de importância no futuro, deve-se assegurar, de alguma maneira, a persistência dos mais diferentes genes e caracteres possíveis (Humphries et al., 1995).

Considerado o país da megadiversidade, o Brasil possui a maior diversidade biológica do planeta, com alto índice de espécies endêmicas. Esta diversidade biológica é muito expressiva, tanto em relação às potencialidades genéticas como em relação ao número de espécies e de ecossistemas (Brasil, 1998).

Nos últimos anos, grande número de pesquisadores tem se dedicado ao estudo dos biomas brasileiros (Scarano, 2007), havendo trabalhos relacionados

com as florestas Amazônica (Bush et al., 2007) e Atlântica (Morellato & Haddad 2000), com o Cerrado (Oliveira & Marquis, 2002), com o Pantanal (Pott & Pott, 2005), com a Caatinga (Araújo et al., 2005) e com os Campos Sulinos (Overbeck et al., 2007). A biogeografia, a vegetação e a ecologia vegetal constituem o principal foco destes trabalhos.

Tais estudos, adicionados a inúmeros outros, têm revelado que o Brasil é o detentor da flora mais rica do planeta, com mais de 56.000 espécies, cerca de 19% da flora mundial (Giulietti et al., 2005). Segundo o primeiro relatório para a Convenção sobre Diversidade Biológica, realizado pelo Ministério do Meio Ambiente, em 1998, o Brasil possui entre 55.000 a 60.000 espécies de angiospermas, 3.100 espécies de briófitas, de 1.200 a 1.300 espécies de pteridófitas e cerca de 525 espécies de algas marinhas.

Números como estes são extremamente importantes para o Brasil, uma vez que muitos produtos utilizados pela sociedade contemporânea, como alimentos, fibras, produtos farmacêuticos, químicos, óleos naturais, essenciais, entre outros, são obtidos, principalmente, da biodiversidade da flora brasileira, além de esta ser uma das mais importantes fontes de informação para o desenvolvimento da biotecnologia (Elisabetsky & Wanmmacher, 1993).

2.2 Campos rupestres, a família Verbenaceae e o gênero *Lippia*: aspectos taxonômicos

Dentre os diversos biomas presentes no Brasil, os Campos Rupestres, considerados tipos fitofisionômicos do Cerrado, merecem destaque por sua riqueza biológica. Essa fisionomia se caracteriza por apresentar altitudes maiores que 900 m (Menezes & Giulietti, 1986) e vegetação xerófitas formada sobre afloramentos rochosos (Andrade et al., 1986). Apresenta, ainda, um substrato rico em quartizito, com solos ácidos e pobres em nutrientes e água (Ribeiro &

Walter, 1998) e composição florística riquíssima, havendo muitas espécies endêmicas (Joly, 1970; Giullieti et al., 1987).

Entretanto, poucos são os estudos realizados nesta importante fitofisionomia do Cerrado. Para se ter uma idéia, entre os trabalhos sobre campos rupestres encontrados na literatura, os de Menezes (1980), de Sendulsk & Burman (1978, 1980) e de Wanderley (1983) estão mais relacionados à taxonomia, enquanto os de Rizzo (1970), de Andrade et al. (1986), de Alves (1992), de Munhoz & Proença (1998), de Romero & Nakajima (1999), de Proença et al. (2000), de Santos (2003), de Miranda et al. (2004) e de Conceição et al. (2007) estão mais relacionados com o levantamento florístico de várias regiões brasileiras que apresentam este tipo de vegetação.

As Verbenaceae, que ocorrem em praticamente todos os ecossistemas terrestres, é uma das cinco famílias mais importantes entre as dicotiledôneas encontradas nos campos rupestres (Giulietti et al., 1987). A família apresenta, aproximadamente, 36 gêneros e 1.035 espécies. Os gêneros mais representativos em número de espécies são: *Verbena*, *Lippia*, *Citharexylum*, *Stachytarpheta*, *Glandularia* e *Duranta* (Judd, 2002). A família pertence à ordem Lamiales e se encontra, segundo Bremer (2003), no clado das Asterídes, subclado Asterídes I, um grupo de plantas considerado monofilético, possuindo 10 ordens (Figura 1).

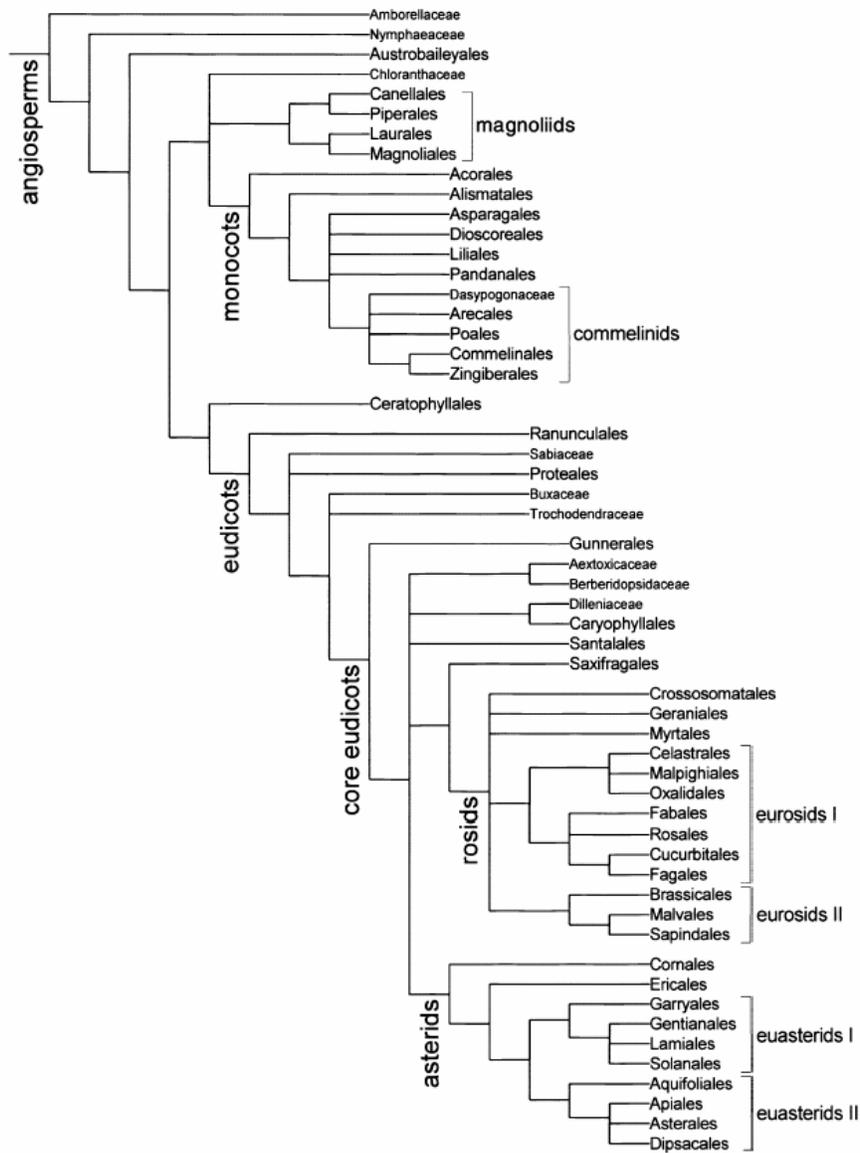


FIGURA 1. Cladograma representando a filogenia das angiospermas, segundo Bremer (2003). A família Verbenaceae pertence à ordem Lamiales, encontrando-se no clado Asterídes e subclado Euasteríde I.

Segundo Moldenke (1973), o gênero *Lippia*, o segundo maior da família Verbenaceae, reúne, aproximadamente, 254 taxa, incluindo espécies e variedades que estão amplamente distribuídas nos neotrópicos na forma de ervas, arbustos ou pequenas árvores. Entretanto, o mesmo autor observou que as descrições dadas por vários autores, entre 1849 a 1969, apontavam para uma estimativa de 400 espécies para o gênero. Por outro lado, esta estimativa incluía espécies de vários outros gêneros que atualmente foram retirados dos domínios de *Lippia*, tais como *Acantholippia*, *Aloysia* e *Phyla*. Para Troncoso (1974) e Salimena (2000), o número de espécies estimado é de 160, estando a maior parte concentrada no Brasil, no México, no Paraguai e na Argentina, com poucas espécies endêmicas na África.

Segundo Terblanché & Kornelius (1996), o grupo apresenta 200 espécies, com cerca de 60 táxons intra-específicos, enquanto Judd (2002) considera que o gênero apresenta cerca de 150 espécies. Estas discordâncias entre os diferentes autores, com relação à estimativa do número de espécies e a classificação das mesmas, refletem o pouco conhecimento que se tem sobre essas plantas (Munir, 1993) e reforçam a necessidade de que novas revisões taxonômicas acrescidas de ferramentas que auxiliem a correta discriminação das espécies sejam realizadas.

A taxonomia do grupo é tão intrigante que muitos autores, devido a problemas taxonômicos (Pascual et al., 2001), não reconhecem algumas espécies, tais como *Lippia affinis aristata* Schau, *Lippia affinis sidoides* Cham., *Lippia palmeri* S. Wats var. *palmeri*, *Lippia gracilis* H.B.K. e *Lippia grandis* Scham.. Outro exemplo é a relação entre *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *Lippia geminata* H. B. K., que alguns autores classificam como sinonímias (Morton, 1981), enquanto outros consideram espécies diferentes (Zamora-Martinez & Nieto de Pascual, 1992). Moldenke (1971) reconhece *L. geminata* H. B. K. como sinonímia de *L. alba* var. *globiflora* (L'Her.) Moldenke.

Problemas taxonômicos envolvem também *L. multiflora* Moldenke, *L. adoënsis* Hochst. e *L. grandifolia* Hochst, que são consideradas ora como sinonímias (Mwangi et al., 1992; Terblanché & Kornelius, 1996) ora como espécies distintas (Moldenke, 1971).

Adicionalmente, no âmbito infragenérico, a literatura indica que o grupo apresenta grande número de espécies mal delimitadas, tanto que o número de seções taxonômicas dentro do gênero é muito variável entre os autores.

Segundo Schauer (1847, 1851), um dos primeiros estudiosos comprometidos com a delimitação do gênero *Lippia*, o grupo deveria ser dividido em cinco seções: *Aloysia* (Ort. & Palau.) Schauer, *Goniostachyum* Schauer, *Dypterocalyx* (Cham.) Schauer e *Zapania* Schauer, sendo esta última dividida em três subseções: *Axilliflorae*, *Paniculatae* e *Corymbosae*. Porém, em contradição à delimitação proposta por Schauer, Bentham (1876) sugeriu que o gênero apresenta apenas duas seções (*Aloysia* e *Zapania*). Entretanto, a divisão do gênero em apenas duas seções era pouco representativa para o gênero que mostrava espécies muito diversas. Tal situação levou Briquet (1895) a rebater a proposta por Bentham (1876), sugerindo, então, a divisão do gênero em cinco seções e o reconhecimento de três subseções: seção *Goniostachyum* Schauer, seção *Acantholippia* (Griseb.) Briq., seção *Dipterocalyx* (Cham.) Schauer, seção *Euzapania* Briq., dividida em três subseções: *Axilliflorae* Schauer, *Paniculatae* Schauer, *Corymbosae* Schauer e seção *Rhodolippia* Schauer.

Passados alguns anos, Moldenke (1965) sugeriu um novo sistema de classificação, muito semelhante ao proposto por Briquet (1895), reconhecendo as espécies colocadas por este autor em *Rhodolippia*, mas subdividindo a mesma em duas subseções, *Mexicanae* e *Brasilianae*, segundo a distribuição das espécies no Brasil e no México. Adicionalmente, este autor propôs, ainda, a adição de uma nova seção, denominada *Spinulosae*, que seria monotípica representada apenas por *L. salsoloides*.

Entretanto, após nove anos das observações feitas por Moldenke (1965), Troncoso (1974) divergiu deste autor na validade da seção *Spinulosae* e nas subseções *Brasilianae* e *Mexicanae*, sistematizando o gênero *Lippia* nas seguintes seções: *Lippia* Schauer, *Dipterocalyx* (Cham.) Schauer, *Goniostachyum* Schauer, *Zapania* Schauer (dividida em três subseções: *Axilliflorae* Schauer, *Paniculatae* Schauer e *Corymbosae* Schauer), *Rhodolippia* Schauer, *Pseudoalloysia* Troncoso e *Dioicollippia* Troncoso. Esta sistematização é uma das mais utilizadas para a delimitação das seções de *Lippia*.

2.3 O gênero *Lippia*: distribuição geográfica e sua importância

Os principais centros de diversidade específica do gênero *Lippia* estão localizados no Brasil e no México (Salimena-Pires, 1998). No Brasil, o maior número de espécies se encontra na Cadeia do Espinhaço, localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás.

Dentre as espécies de *Lippia* presentes na Cadeia do Espinhaço, podem ser citadas: *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., *L. lupulina* Cham., *L. hermannioides* Cham., *L. sidoides* Cham., *L. florida* Cham., *L. rubella*, *L. rosella* Mold., *L. diamantinensis* Glaz., *L. rotundifolia* Cham., *L. pseudothea* (St. Hil.) Schau., *L. martiana* Cham., *L. glandulosa* Cham., *L. corymbosa* Cham. e *L. filifolia* Cham. Com exceção das quatro primeiras, que têm distribuição mais ampla, as demais são todas endêmicas da Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais.

Embora o Brasil possua grande número de espécies de *Lippia*, algumas delas estão ameaçadas de extinção, como *L. elliptica* Schau., que só foi recoletada uma única vez após a coleta do material tipo, na região de Alegres, Goiás, e *L. lindmanii* Briq., provavelmente extinta e só conhecida pela coleção-tipo, procedente de Morro Vermelho, em Mato Grosso do Sul, uma região totalmente descaracterizada floristicamente pela exploração agrícola (Salimena-Pires, 1998).

Uma interessante característica do gênero é que diversas espécies apresentam propriedades medicinais comprovadas. Pessoa et al. (2005) detectaram ação antibacteriana do extrato aquoso de folhas frescas de *Lippia* aff. *gracilis*. O extrato etanólico de *Lippia dulcis* apresentou atividade antiinflamatória em vários modelos animais estudados por Pérez et al. (2005). Com relação aos constituintes dos óleos essenciais da espécie sul-africana *L. javanica*, Viljoen et al. (2005) observaram forte ação antimicrobiana e efeitos contra problemas respiratórios.

Os constituintes químicos de *Lippia alba* (MILL.) N.E. BR. têm ação como sedativo, antiespasmódico e estomáquico (Gomes et al., 1993). *L. alba* é também utilizada para o tratamento de gripe, bronquite, problemas no fígado, infecções cutâneas, diarreia, disenteria e desordens menstruais, além de agir como antipirético e antiinflamatório (Morton, 1981; Girón & Cáceres, 1994; Di Stasi et al., 1994; Tavares et al., 2005). O extrato aquoso de *Lippia sidoides* Cham. é dotado de acentuado efeito antisséptico, antiinflamatório e cicatrizante (Costa et al., 1998). *Lippia multiflora* tem ação eficaz contra malária (Valentin et al., 1995), no tratamento da hipertensão (Noamesi, 1977) e também é eficaz no combate à sarna (Oladimeji et al., 2000). *Lippia dulcis* Trev. é principalmente usada no tratamento da tosse e da bronquite (Compadre et al., 1986).

No caso das espécies que ocorrem no Brasil, estudos farmacológicos vêm sendo realizados, principalmente, em *Lippia alba* (MILL.) N.E. BR e em *Lippia sidoides* Cham, não havendo muitos relatos sobre as demais espécies.

Além de suas propriedades medicinais, as folhas da maioria das espécies são utilizadas na preparação de alimentos (Morton, 1981). Neste aspecto é interessante ressaltar a importância de *Lippia dulcis* Trevir., cujo principal componente é a hernandulcina, uma molécula 1.000 vezes mais doce que a sacarose (Compadre et al., 1986; Kaneda et al., 1992; Pascual et al., 2001).

Algumas espécies de *Lippia* têm sido utilizadas também no reflorestamento de áreas mineradas. Na Venezuela, por exemplo, *Lippia oreganoides* tem sido usada como espécie pioneira em regiões de minério de ferro que foram desativadas ou abandonadas. Essa espécie apresenta-se extremamente adaptada a estas regiões de minério com seus solos ácidos e pedregosos (Guevara et al., 2005).

Apesar de muitas espécies apresentarem tais utilidades, várias outras ainda não foram estudadas e, de acordo com alguns autores (Abade et al., 1995; Pascual et al., 2001; Stashenko et al., 2003), são materiais promissores para o isolamento de novas substâncias químicas com diferentes potenciais, principalmente farmacológicos.

2.4 A citogenética como uma ferramenta para a taxonomia vegetal e a caracterização da biodiversidade: aspectos gerais e situação no gênero *Lippia*

Muitas vezes, a distinção entre plantas morfológicamente similares é contraditória, em função da ausência de caracteres que auxiliem nessa tarefa. A análise citogenética tem sido extensivamente reconhecida como uma ferramenta auxiliar para a taxonomia de plantas, visto que o número cromossômico não é influenciado por fatores ambientais, constituindo, portanto, um bom referencial para a caracterização de espécies, assim como para o entendimento da evolução das mesmas (Sttebins, 1971; Shan et al., 2003). Um bom exemplo disso são os trabalhos realizados por Smarda & Koci (2003) e Smarda et al. (2005), segundo os quais as espécies representantes do subgênero *Festuca* (Poaceae) apresentam grande similaridade morfológica. Apenas por tais caracteres a identificação dos vários taxa tem sido muito problemática e, às vezes, impossível para os taxonomistas. Nesse caso, o nível de ploidia tem sido usado como critério básico

de classificação e descrição destas espécies, sendo possível, inclusive, a separação de sinonímias. Por outro lado, Artelari & Georgiou (2003) sinonimizaram duas espécies do gênero *Limonium* (Plumbaginaceae), uma vez que apresentam o mesmo número cromossômico e diversas similaridades morfológicas.

Dessa forma, é grande o número de trabalhos que utilizam a citogenética como ferramenta auxiliar a taxonomia. Dentre estes, podem-se citar os estudos realizados por Sanzo (2003), com o gênero *Alstromeria* (Alstromeriaceae); por Smarda & Koci (2003), com o gênero *Festuca* (Poaceae); por Windham (2003), com o gênero *Draba* (Brassicaceae); por Brysting et al. (2004), com o gênero de grama *Dupontia*; por Perny et al. (2005), com espécies do gênero *Cardamine* (Brassicaceae) e por Conterato & Wittmann (2006), com o gênero *Lupinus* (Leguminosae), entre outros.

Dentre as maneiras de estudar a citogenética dos diferentes grupos vegetais, Clark & Wall (1996) relatam que o tamanho dos cromossomos metafásicos mitóticos, assim como sua morfologia, presença de constrições secundárias e padrões de distribuição da heterocromatina, é excelente ferramenta para a taxonomia, para o melhoramento genético e para estudos genéticos com vegetais, uma vez que tais informações podem ser úteis na identificação de espécies e híbridos.

Com o refinamento das técnicas citogenéticas, mais respostas têm sido alcançadas com o estudo dos cromossomos vegetais. Entre essas técnicas, as mais empregadas são o bandeamento C e a coloração com fluorocromos CMA e DAPI, que permitem uma coloração diferencial ao longo dos cromossomos (Sumner, 1990).

A utilização de fluorocromos tem permitido identificar diferentes tipos de heterocromatina com base na propriedade de corarem mais ou menos intensamente os segmentos ricos em determinados pares de bases (Schweizer

1976; Vosa, 1985; Sumner, 1990), destacando-se, entre eles, a cromomicina A₃ (CMA) e a quinacrina, específicos para regiões ricas em GC, assim como o Hoechst 33258 e o DAPI, específicos para regiões ricas em AT (Guerra & Souza, 2002).

Alguns táxons com problemas taxonômicos e com cariótipo estável podem revelar intensa variação estrutural, quando analisados com bandeamento C ou com fluorocromos. É o caso, por exemplo, do gênero *Cycas*, que apresenta espécies e subespécies com número e morfologia cromossômica bastante estáveis, possuindo, no entanto, quantidade e qualidade variáveis de heterocromatina em diferentes espécies. Por meio dessas técnicas, Kokubugata & Kondo (1996) conseguiram delimitar espécies e subespécies neste gênero, a partir de diferenças no padrão heterocromático. Urdampilleta et al. (2005), ao estudarem duas espécies de *Kolreuteria* (Sapindaceae), observaram que, apesar de ambas apresentarem cariótipos muito semelhantes, o padrão de bandeamento C terminal e CMA permitiu diferenciar as espécies.

Técnicas de bandeamento podem auxiliar também na identificação de parentais de híbridos. A partir do padrão de banda C observado em alguns tetraplóides de *Medicago*, por exemplo, foi possível estabelecer que os mesmos são híbridos formados pelo cruzamento de duas subespécies de *Medicago sativa*. Bauchan & Hossain (1997) verificaram que alguns tetraplóides neste gênero apresentam genoma com bandas C centroméricas e outro com bandas C centroméricas e teloméricas, que são os padrões observados nas subespécies diplóides *Medicago sativa caerulea* e *Medicago sativa falcatai*, respectivamente.

As técnicas de bandeamento têm sido amplamente utilizadas para o estudo citotaxonômico e evolutivo da família Orchidaceae. Ao estudar a cariomorfologia e o padrão de heterocromatina no gênero *Ophrysi* (Orchidaceae), D'emerico et al. (2005) observaram que espécies representativas das seções *Araniferae*, *Fuciiflorae* e *Ophrys* exibiram cariótipos assimétricos,

enquanto cromossomos das espécies *O. fusca*, *O. lútea*, *O. tenthredinifera* e *O. bombyliflora*, cuja seção à qual pertencem ainda não foi delimitada, mostraram-se menos assimétricos, podendo representar uma nova seção no gênero. Além disso, em todas as espécies analisadas, foram observadas bandas CMA positivas na região do centrômero, intercarlarmente e nos telômeros dos cromossomos, não sendo observadas bandas positivas para o DAPI em nenhuma das espécies. Com esse resultado, Greilhuber & Ehrendorfer (1975) propuseram que *Ophrys* teria evoluído de *Orchis*, com o gênero *Serapia* sendo um intermediário entre estes. No entanto, espécies do gênero *Orchis*, estudadas por D'emerico et al. (2002), mostraram-se positivas para DAPI e negativas para CMA nestas regiões, apresentando um padrão completamente diferente de *Ophrys*. Adicionalmente, os autores também observaram que o cariótipo e o padrão de bandas C entre estes dois gêneros são muito diferentes, não suportando, com isso, as relações evolutivas propostas anteriormente.

Além das técnicas mencionadas, algumas também possibilitam a observação de regiões cromossômicas que apresentam atividade transcricional, como é o caso da técnica de bandeamento com nitrato de prata, que evidencia as regiões organizadoras de nucléolo (RONS) ativas (Sumner, 1990, 2003). Esta técnica, em conjunto com a técnica de FISH, tem permitido o entendimento de vários eventos relacionados à atividade de genes ribossomais, como a dominância nucleolar em híbridos, por exemplo (Pikaard, 2000).

Na família Verbenaceae, a maioria dos estudos citogenéticos está relacionada com outros gêneros diferentes de *Lippia*. Alguns trabalhos foram realizados no Caribe e na Índia e apresentaram variação de $2n=18$ a $2n=36$ (Choudhary & Roy, 1983; Sanders, 1987). No Brasil, Viccini et al. (2005), ao estudarem, pela primeira vez, 14 espécies do gênero na Cadeia do Espinhaço, observaram que a maioria das espécies apresenta um número haplóide entre 10 e 14. Neste mesmo trabalho foi discutida a relação entre o número cromossômico

dessas espécies e as seções taxonômicas em que cada uma delas se encontra. Nota-se, neste trabalho, que a seção mais complexa é *Zapania*, com uma variação no número cromossômico de $n= 10$ a $n= 28$ cromossomos. Estes resultados, segundo Viccini et al. (2005), estão em conformidade com a variada morfologia da seção, que apresenta diferentes padrões de inflorescências. Os autores sugerem que novas revisões taxonômicas sejam feitas nesta seção.

Trabalhos mais detalhados, relacionados com a citologia das espécies brasileiras de *Lippia* ainda são muito escassos. Pierre (2004), ao estudar três quimiotipos de *Lippia alba*, sugeriu que as variações químicas nesta espécie estavam relacionadas com a variação do número cromossômico, visto que foram encontrados diferentes números para cada um deles em plantas cultivadas sob as mesmas condições. Sousa (2006), ao estudar diferentes acessos de *Lippia alba* com $2n= 30$, observou que o número cromossômico não está relacionado com o quimiotipo, visto que dois dos acessos com $2n=30$ cromossomos e estabelecidos sobre as mesmas condições ambientais foram considerados quimiotipos diferentes, sendo um rico em linalol e outro em citral. Neste trabalho, foi realizada também a caracterização cromossômica destes acessos por técnicas de bandamento, sendo observado, majoritariamente, um padrão de heterocromatina centromérica quando se utilizou a técnica de bandamento C. Foi observado também que a espécie é rica em bases do tipo adenina e timina, devido ao grande número de bandas DAPI positiva e com poucas bases do tipo GC, uma vez que apenas as constrições secundárias mostraram-se positivas para o fluorocromo cromomicina, que tem afinidade por aquelas bases nitrogenadas (Sousa, 2006).

Brandão (2003), ao realizar a técnica de FISH nesta espécie, observou seis marcas para sondas com seqüências dos genes de DNA ribossomal 45S, mostrando que a espécie apresenta seis RONS. Ao contrário, Sousa (2006), ao aplicarem a técnica de bandamento AgNOR nesta espécie, observaram apenas

quatro marcas em metáfases de todos os acessos estudados e um número máximo de 4 nucléolos interfásicos, sugerindo, com isso, que um dos pares de RONS nesta espécie é inativo.

Embora bastante informativos e inovadores para o gênero, os trabalhos até agora realizados por meio de técnicas de bandeamento e FISH foram realizados somente em *L. alba*, não havendo qualquer estudo dessa natureza para as espécies endêmicas da Cadeia do Espinhaço.

2.5 Tratos palinológicos e suas relações com a citogenética na caracterização do gênero *Lippia*

Assim como a citogenética, a palinologia tem sido extensivamente utilizada para a caracterização da biodiversidade vegetal (Edlund, 2004). Segundo Blackmore (2007), a variação na forma, a presença de diferentes ornamentações na exina, a variação do diâmetro polar e equatorial e do número e do tipo de aberturas polínicas entre os diferentes grupos vegetais fazem do grão de pólen um importante elemento utilizado na caracterização de espécies. Além disso, os estudos estratigráficos associados à paleopalinologia, um ramo da palinologia, têm permitido a realização de várias inferências sobre a evolução dos ecossistemas e as modificações climáticas que levam às mudanças da biodiversidade e a um entendimento mais profundo da filogenia de vários grupos vegetais (Doyle, 2005; Judd & Olmstead, 2004; Simpson et al., 2003).

Na taxonomia vegetal, a palinologia tem contribuído imensamente na delimitação de táxons. Um bom exemplo disso têm sido os estudos com espécies da tribo Trifolieae (Fabaceae: Papilionoidea) do Egito. Lashin (2006), ao estudar nove espécies de cinco gêneros desta tribo: *Melilotus*, *Trigonella*, *Medicago*, *Trifolium* e *Ononis*, observou que, apesar de a morfologia polínica entre todos os taxa ser muito semelhante, as espécies de *Ononis* apresentam ornamentações na exina completamente diferentes dos padrões observados nas espécies dos outros

gêneros. Estas observações, juntamente com vários caracteres morfológicos das espécies estudadas, reafirmaram a transferência do gênero *Ononisi* para a subtribo Ononidae, que já havia sido proposta anteriormente por Gupta (1980), ao estudar caracteres morfológicos das espécies do gênero.

Atualmente, com o desenvolvimento da microscopia eletrônica de varredura, de transmissão e a melhoria dos microscópios de luz, inúmeros detalhes das mais diversas características polínicas têm sido obtidos nos estudos. E muitos desses trabalhos têm indicado que vários tratos palinológicos em alguns grupos vegetais apresentam correlações com a ploidia, a morfologia dos cromossomos, o tamanho do genoma das espécies, os hábitos de crescimento, etc. (Tsou & Fu, 2007; Ressayre et al., 2002). Cooper et al. (2000), por exemplo, ao estudarem a morfologia e ultra-estrutura do grão de pólen de espécies do gênero *Callitriche*, um gênero que apresenta plantas aquáticas, semi-aquáticas e terrestres, constataram que as espécies apresentam grãos de pólen com a mesma morfologia, mas com ornamentações da exina particulares para plantas com diferentes hábitos de crescimento. Espécies terrestres apresentaram uma exina bem desenvolvida e ornamentada com perfurações maiores que as plantas semi-aquáticas, enquanto as plantas estritamente aquáticas apresentaram grãos de pólen com a exina pouco desenvolvida e sem perfurações. Além dessas correlações, os autores também observaram que a redução da exina e a perda de suas ornamentações estavam diretamente relacionadas com a diminuição do número de cromossomos entre as espécies.

Em plantas cultivadas, o estudo palinológico também tem sido utilizado na análise de plantas poliplóides. Oselebe (2006), ao estudarem populações de *Musa* spp. com $2n=2x=22$, $2n=3x=33$ e $2n=4x=44$, observaram que plantas tetraplóides apresentaram grãos de pólen maiores que os indivíduos triplóides e diplóides. A espessura da exina e o número de cromossomos e a quantidade de DNA também apresentaram correlações positivas. Neste trabalho, entretanto,

plantas poliplóides instáveis apresentaram grande variação nas medidas da exina e de outros tratos, como o número de aberturas, enquanto poliplóides estáveis apresentaram medidas não tão variáveis.

Embora a variabilidade polínica tenha sido utilizada para a caracterização de muitos grupos vegetais, Ribeiro dos Santos & Pin-Ferreira (2001) ressaltam que muitas espécies apresentam variações polínicas intra-específicas como vários representantes das famílias Acanthaceae, Leguminosae e Rubiaceae. A maioria dos casos de variações deste tipo está relacionada com fatores endógenos, como irregularidades meióticas, poliploidias, hibridação e fatores exógenos, como a umidade e temperatura. Assim, os autores concluíram que estudos citogenéticos são de grande importância para a consolidação de dados palinológicos, sendo de fundamental importância a complementação de dados das duas ciências no estudo taxonômico.

Com relação à palinologia do gênero *Lippia*, até o presente momento poucos são os relatos espécies brasileiras (Pierre, 2008; Silva, 2008), havendo grande necessidade de se ampliar estes estudos para o gênero.

2.6 Determinação da quantidade de DNA nuclear no estudo taxonômico e no conhecimento da biodiversidade

A citometria de fluxo é uma técnica que possibilita a análise simultânea de muitos parâmetros óticos das células e de partículas subcelulares, tendo o potencial de isolar e quantificar populações purificadas de partículas específicas.

As tentativas iniciais para estimar as quantidades de DNA no núcleo celular precedem sua descoberta como material central na hereditariedade (Dolezel et al., 2007). Atualmente, a citometria de fluxo tem sido muito utilizada para estimar o conteúdo de DNA, um dado com ampla aplicação no estudo dos vegetais.

Segundo Dolezel et al. (2007), a citometria de fluxo tem uma importante aplicação na resolução de grupos taxonômicos complexos que apresentam variação na ploidia, ajudando, principalmente, a discriminar espécies de complexos poliplóides com alta plasticidade fenotípica ou que apresentem ausência de bons caracteres morfológicos para distinção taxonômica.

O conhecimento de toda a variação de ploidia ou a detecção de um citótipo raro é muito importante para a construção de robustos tratamentos taxonômicos e para a interpretação evolutiva dos grupos vegetais (Mishiba et al., 2000). Além disso, a ocorrência e a detecção de citótipos raros são muito importantes para o melhoramento de culturas vegetais e de plantas ornamentais, em que raras ploidias podem apresentar alto valor econômico ou ser usadas como fontes de germoplasma (Dolezel et al., 2007).

Nas angiospermas, a quantidade de DNA nuclear varia até duas mil vezes, de 0,065 pg em *Gensilea aurea* e em *G. margaretae* (Lentibulariaceae) a 127,4 pg em *Fritillaria assyriaca* (Liliaceae). Dentro de um mesmo gênero, a quantidade de DNA também pode variar, estando associada, na maioria das vezes, com o nível de ploidia ou, ainda, com a presença de heterocromatina ou de cromossomos extranumerários (Murray, 2005).

Poucos são os trabalhos que estimam a quantidade de DNA para espécies de gêneros da família Verbenaceae, havendo estimativa para as espécies *Lantana camara* (2,75 pg), *Tectona grandis* (0,48 pg), *Vitex negundo* (1,62 pg) e *Vitex pinnata* (1,44 pg) (Mishiba et al., 2000; Murray, 2005; Dolezel et al., 2007), que não são plantas genuinamente brasileiras.

Com relação às espécies brasileiras, Silva (2008) estimou a quantidade de DNA de 17 espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais, por meio da citometria de fluxo. Neste trabalho, além dos gêneros *Aloysia*, *Bouchea*, *Lantana*, *Starchytapheta* e *Vitex*, foram estimadas também a quantidade de DNA

de duas espécies de *Lippia*, sendo estas *L. martiana*, com 2,36 pg e *L. aff. Microphylla*, com 2,37 pg.

Além deste trabalho, Pierre (2008) também estimou a quantidade de DNA de três quimiotipos de *Lippia alba*, confirmando a presença de mixoploidia observada anteriormente (Pierre, 2004) para o quimiotipo carvona.

A ampliação de estudos desta natureza, em conjunto com outras abordagens, para o gênero *Lippia* é de grande importância, uma vez que várias delimitações taxonômicas dentro do gênero ainda não estão bem resolvidas.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADE, M. J.; SÁNCHEZ, S.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of some medicinal plants. **Methods and Findings**, v. 17 (Suppl. A), p. 108, 1995.

ALVES, R. J. **The flora and vegetation of the Serra the São José in Minas Gerais, Brasil**. 1992. 114 p. Thesis (Doctor's degree in Botany) – Botanical Institute, Czechoslovak Academy of Sciences, Czechoslovak.

ANDRADE, P. M.; GONTIJO, T. A.; GRANDI, T. S. M. Composição florística e aspectos estruturais de uma área de Campos Rupestres do Morro do Chapéu, Nova Lima, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, n. 9, p. 13-21, 1986.

ARAÚJO, F. S.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V. **Análise das variações da biodiversidade do bioma caatinga**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 210 p.

ARTELARI, R.; GEORGIU, O. Biosystematic study of the genus *Limonium* (Plumbaginaceae) in the Aegean area, Greece. III. *Limonium* on the Islands Kithira and Antikithira and the surrounding islets. **Nordic Journal of Botany**, v. 22, n. 3, p. 483-501, 2003.

BAUCHAN, G. R.; HOSSAIN, M. A. Karyotypic analysis of C-Banded Chromosomes of diploid alfalfa: *Medicago sativa* ssp. *caerulea* and ssp. *Falcate* and Their Hybrid. **The Journal of Heredity**, v. 88, n. 1, p. 533-537, 1997.

BENTHAM, G. Verbenaceae. In: BENTHAM, G.; HOOKER, W. J. (Ed.). **Genera Plantarum 2**. London: Reeve & Co., 1876. 1160 p.

BLACKMORE, S. Pollen and spores: microscopic keys to understanding the earth's biodiversity. **Plant Systematics and Evolution**, v. 263, n. 2, p. 3-12, 2007.

BRANDÃO, A. D. **Citogenética comparativa dos gêneros *Lippia*, *Lantana* e *Aloysia* (Lamiales)**. 2003. 101 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos da Amazônia Legal. **Relatório nacional para a conservação sobre a diversidade biológica**. Brasília, 1998.

BREMER, B. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. The angiosperm phylogeny group. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 3, p. 399-436, 2003.

BRIQUET, I. Verbenaceae. **Natural Pflanzenfam**, v. 4, n. 3, p.132-182, 1895.

BRYSTING, A. K.; FAY, M. F.; LEITCH, I. J.; AIKEN, S. G. One or more species in the arctic grass genus *DuPontia*? – a contribution to the Panartic Flora project. **Taxon**, v. 53, n. 2, p. 365-382, 2004.

BUSH, M. B.; CRISCI, J.; WHITTAKER, R. J. Special issue conservation and biogeography of Amazonia. **Journal of Biogeography**, v. 34, n. 3, p. 1289-1289, 2007.

CHOUDHARY, S. S.; ROY, R. P. Karyological studies and trend of speciation in some members of Verbenaceae. **Cytologia**, v. 48, n. 1, p. 735-740, 1983.

CLARK, M. S.; WALL, W. J. **Chromosomes the complex code**. London: Chapman and Hall, 1996. 334 p.

COMPADRE, C. M.; ROBBINS, E. F.; KINGHORN, A. D. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquiries, and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, n. 1, p. 89-106, 1986.

CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R.; MEIRELES, S. T. Floristics, structure and soil of insular vegetation four quartzite-sandstone outcrops of "Chapada Diamantina", Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 4, p. 641-656, 2007.

CONTERATO, I. F.; WITTMANN, M. T. S. New chromosome numbers, meiotic behaviour and pollen fertility in American taxa of *Lupinus* (Leguminosae): contributions to taxonomic and evolutionary studies. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 150, n. 4, p. 229-240, 2006.

COOPER, R. L.; OSBORN, J. M.; PHILBRICK, C. T. Comparative pollen morphology and ultrastructure of the Callitrichaceae. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 2, p. 161-175, 2000.

- COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; MATOS, F. J. A. Quinona dimérica (tectol) de *Lippia sidóides* (Verbenaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., Águas de Lindóia, 1998. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais, 1998. p. 132.
- D'EMERICO, S.; COZZOLINO, S.; PELLEGRINO, G.; PIGNONE, D.; SCRUGLI, A. Heterochromatin distribution in selected taxa of the 42-chromosomes *Orchis s* (Orchidaceae). **Caryologia**, v. 55, n. 3, p. 55-62, 2002.
- D'EMERICO, S.; PIGNONE, D.; BARTOLO, G.; PULVIRENTI, S.; TERRASI, C.; STUTO, S.; SCRUGLI, A. Karyomorphology, heterochromatin patterns and evolution in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 148, n. 1, p. 87-99, 2005.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA, C. A.; GUIMARAES, E. M.; SANTOS, C. M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v. 65, n. 4, p. 529- 540, 1994.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**. Weinheim, Czech Republic: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, 2007. 454 p.
- DOYLE, J. A. Early evolution of angiosperm pollen as inferred from molecular and morphological phylogenetic analyses. **Grana**, v. 44, n. 2, p. 227-251, 2005.
- EDLUND, A. F.; SWANSON, R.; PREUSS, D. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. **The Plant Cell**, v. 16, n. 1, p. 84-97, 2004.
- ELISABETSKY, E.; WANMMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 137-143, 1993.
- GIRÓN, L. M.; CÁCERES, A. **Técnicas básicas para el cultivo y procesamiento de plantas medicinales**. Guatemala: CEMAT, 1994. 265 p.
- GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, C. van den. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-60, 2005.

GIULIETTI, A. M.; MENEZES, N. L.; PIRANI, J. R.; MEGURO, M.; WANDERLEY, M. G. L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista das espécies. **Boletim de Botânica**, v. 9, n. 1, p. 1-115, 1987.

GOMES, E. C.; MING, L. C.; MOREIRA, E. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; KERBER, V. A.; CONTI, A.; WASHER FILHO, A. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 60, n. 2, p. 103-108, 1993.

GREILHUBER, J.; EHRENDRER, F. Chromosome numbers and evolution in *Ophrys* (Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 124, n. 3, p. 125-138, 1975.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131 p.

GUEVARA, R.; ROSALES, J.; SANOJA, E. Vegetación pionera sobre rocas, un potencial biológico para la revegetación de áreas degradadas por la minería de hierro. **Interciencia**, v. 30, n. 10, p. 644-651, 2005.

GUPTA, M. Anatomy of the flowers of *Ononis repens* and *Ononis & Ononis spinosa*. **Journal of Indian Botany Society**, v. 59, n. 3, p. 366-369, 1980.

HUMPHRIES, C. J.; WILLIAMS, P. H.; VANE-WRIGHT, R. I. Measuring biodiversity value for conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 26, n. 1, p. 93-111, 1995.

JOLY, A. B. **Conheça a vegetação brasileira**. São Paulo: Ed. Polígono, 1970. 181 p.

JUDD, W. S.; OLMSTEAD, R. G. A survey of tricolpate (Eudicot) phylogenetic relationships. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 10, p. 1627-1644, 2004.

JUDD, W. S. **Plant systematics: A phylogenetic approach**. 2. ed. Sunderland, UK: Sinauer Associates, 2002. 419 p.

KANEDA, N.; LEE, I. S.; GUPTA, M. P.; SOERJATO, D. D.; KINGHORN, A. D. (+) – Beta- hydroxyhernandulcin, a new sweet sesquiterpene flowers of *Lippia dulcis*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 8, p. 1136-1141, 1992.

KOKUBUGATA, G.; KONDO, K. Differential fluorescent-banding patterns in chromosome of four species do *Cycas* (Cycadaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 120, n. 1, p. 51-55, 1996.

LASHIN, G. M. A. Comparative morphology of pollen grains of some taxa of tribe Trifolieae (Fabaceae: Papilionoideae) from Egypt. **International Journal of Botany**, v. 2, n. 3, p. 270-277, 2006.

MENEZES, N. L.; GIULIETTI, A. M. Campos rupestres. **Revista Ciência Hoje**, v. 5, n. 25, p. 38-44, 1986.

MENEZES, N. L. Restabelecimento do gênero *Plererostima* (Velloziaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 3, n. 1, p. 37-47, 1980.

MIRANDA, S. C.; BATISTA, M. A.; CARVALHO, P. S.; SANTOS, M. L. Levantamento florístico em áreas de campo e cerrado rupestre no Parque Estadual da Serra dos Pireneus, Goiás. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 55., 2004, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Botânica, 2004. p. 73-74.

MISHIBA, K. C.; ANDO, T.; MII, M.; WATANABE, H.; KOKUBUN, H.; HASHIMOTO, G.; MARCHESI, E. Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). **Annals of Botany**, v. 85, n. 5, p. 665-673, 2000.

MITTERMEIER, R. A.; MYERS, N.; GIL, P. R.; MITTERMEIER, C. G. **Hotspots**: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecorregions. Mexico: Cemex/Conservation International, 1999. 125 p.

MOLDENKE, H. N. A new species of *Aegiphila* from Venezuela. **Acta Botanica Venezuelica**, v. 6, n. 1/4, p. 93-94, 1971.

MOLDENKE, H. N. Flora of Panama (Verbenaceae). **Acta Missouri Botanical Garden**, n. 60, p. 41-148, 1973.

MOLDENKE, H. N. Materials towards a monograph of the genus *Lippia* I. **Phytologia**, v. 12, n. 1, p. 6-71, 1965.

MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, n. 6, p. 786-792, 2000.

- MORTON, C. **Atlas of medicinal plants of middle america**. Mincis. USA. 1981. Vol 1. 833p.
- MUNHOZ, C. B. R.; PROENÇA, C. E. B. Composição florística do município de Alto Paraíso de Goiás na Chapada dos Veadeiros. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, v. 3, n. 2, p. 102-150, 1998.
- MUNIR, A. A. A taxonomic revision of the genus *Lippia* (Houst. Ex) Linn.(Verbenaceae) in Australia. **Journal of Adelaide Botanic Garden**, v. 15, n. 3, p. 129-145, 1993.
- MURRAY, B. G. When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? **Annals of Botany**, v. 95, n. 2, p. 119-125, 2005.
- MWANGI, J. W.; ADDAE-MENSAH, J.; MURIUKI, G.; MUNAVU, R.; LWABDE, W.; HASSANALI, A. Essential oils of *Lippia* species in Kenya. IV. Maize weevil (*Sitophilus zeamais*) repellancy and larvicidal activity. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 30, n. 1, p. 9-16, 1992.
- NOAMESI, B. K. Power tea (*Lippia multiflora*) a potent hypertensive therapy. **Western Africa Journal of Pharmacology Drug Research**, v. 4, n. 1, p. 33-36, 1977.
- OLADIMEJI, F. A.; ORAFIDIYA, O. O.; OGUNNIYI, T. A.; ADEWUNMI, T. A. Pediculocidal and scabicial properties of *Lippia multiflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1/2, p. 305-11, 2000.
- OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. **The cerrados of Brazil**. New York: Columbia University, 2002. 218 p.
- OSELEB, A.; GUEVARA, R.; ROSALES, J. *Musa* and poliploidy. **Interciencia**, v. 30, n. 10, p. 644-651, 2005.
- OVERBECK, G. E.; MÜLLER, S. C.; FIDELIS, A.; PFADENHAUER, J.; PILLAR, V. D.; BLANCO, C. C.; BOLDRINI, I. I.; BOTH, R.; FORNECK, E. D. Brazil's neglected Biome: the South Brazilian Campos. Perspectives in Plant Ecology. **Evolution and Systematics**. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/14338319>>. Acesso em: 20 out. 2007.
- PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ-MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

- PÉREZ, S.; MECKES, M.; PÉREZ, C.; SUSUNAGA, A.; ZAVALA, M. A. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 1-4, 2005.
- PERNY, M.; TRIBSCH, A.; STUESSY, T. F.; MARHOLD, K. Allopolyploid origin of *Cardamine silana* (Brassicaceae) from Calabria (southern Italy): karyological, morphological and molecular evidence. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 148, n. 1, p. 101-116, 2005.
- PESSOA, O. D. L.; CARVALHO, C. B. M.; SILVESTRE, J. O. V. L. ; LIMA, M. C. L.; MONTES NETO, M. R.; MATOS, F. J. A.; LEMOS, T. L. G. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia* aff. *gracillis*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 712-714, 2005.
- PIERRE, P. M. O. **Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br (Verbenaceae)**. 2004. 80 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PIERRE, P. M. O. **Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. BR. (Verbenaceae)**. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PIKAARD, C. S. The epigenetics of nucleolar dominance. **TIG**, v. 16, n. 11, p. 495-500, 2000.
- POTT, A.; POTT, V. Features and conservation of the Brazilian Pantanal wetland. **Wetlands Ecology and Management**, v. 12, n. 6, p. 547-552, 2005.
- PROENÇA, C.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, A. P. **Flores e frutos do cerrado**. Brasília: Editora da Universidade de Brasília, 2000. 320 p.
- RESSAYRE, A.; RAQUIN, C.; MIGNOT, A.; GODELLE, B.; GOUYON, P. H. Correlated variation in microtubule distribution, callose deposition during male post-meiotic cytokinesis, and pollen aperture number across *Nicotiana* species (Solanaceae). **American Journal of Botany**, v. 89, n. 3, p. 393-400, 2002.
- RIBEIRO DOS SANTOS, F. A.; PIN-FERREIRA, A. B. Variabilidade polínica de *Opuntia brasiliensis* (Willd.) Haw. (Cactaceae). **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 1, n. 2, p. 95-98, 2001.

- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. **Fitofisionomias do bioma cerrado**. Planaltina: EMBRAPA, 1998. 137 p.
- RIZZO, J. A. **Contribuição ao conhecimento da flora de Goiás: área na Serra Dourada**. 1970. 91 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.
- ROMERO, R.; NAKAJIMA, J. N. Espécies endêmicas do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22 (2-suplemento), p. 259-265, 1999.
- SALIMENA, F. R. G. **Revisão taxonômica de *Lippia alba* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae)**. 2000. 208 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- SALIMENA-PIRES, F. R. *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer, (Verbenaceae) do Brasil. In: VII CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BOTÂNICA, 1998, Cidade do México. México, 1998. p. 299. Resumos. Sociedade Latinoamericana de Botânica.
- SANDERS, R. S. Taxonomic significance of chromosome observations in caribbean species of *Lantana* (Verbenaceae). **American Journal of Botany**, v. 74, n. 6, p. 914-920, 1987.
- SANTOS, M. L. **Florística e biologia reprodutiva de espécies de Melastomataceae no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas e Parque Estadual da Serra dos Pireneus, Goiás**. 2003. 159 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- SANZO, A. M. Chromosome studies in Andean taxa of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 138, n. 3, p. 451-459, 2003.
- SCARANO, F. R. Rock outcrop vegetation in Brazil: a brief overview. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 4, p. 561-568, 2007.
- SCHAUER, J. C. Verbenaceae. In: DE CANDOLLE, A. (Ed.). **Prodomus systema naturalis Reni Vegetalis**. Paris: Victor Mason, 1847. 700 p.
- SCHAUER, J. C. Verbenaceae. **Flora Brasiliensis**, v. 9, n. 10, p. 169-308, 1851.
- SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, v. 58, n. 2, p. 307-324, 1976.

SENDULSKY, T.; BURMAN, A. G. *Paspalum* species of the Serra do Cipó (I): contribution to the study of Brazilian Poaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 1, n. 1, p. 1-15, 1978.

SENDULSKY, T.; BURMAN, A. G. *Paspalum* species of the Serra do Cipó (II): contribution to the study of Brazilian Poaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 1980.

SHAN, F.; YAN, G.; PLUMMER J. A. Karyotype evolution in the genus *Boronia* (Rutaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 142, n. 2, p. 309-320, 2003.

SILVA, P. S. **Verbenaceae da Serra do Cipó: aspectos biosistemáticos, químicos e farmacológico**. 2008. 206 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

SIMPSON, D. A.; FURNESS, C. A.; HODKINSON, T. R.; MUASYA, A. M.; CHASE, M. W. Phylogenetic relationships in Cyperaceae subfamily Mapanioideae inferred from pollen and plastid DNA sequence data. **American Journal of Botany**, v. 90, n. 7, p. 1071-1086, 2003.

SMARDA, P.; KOČI, K. Chromosome number variability in Central European members of the *Festuca ovina* and *F. pallens* groups (sec. *Festuca*). **Folia Geobotanica**, v. 38, n. 2, p. 65-95, 2003.

SMARDA, P.; MÜLLER, J.; VRÁNA, J.; KOČI, K. Ploidy level variability of some Central European fescues (*Festuca* subg. *Festuca*, Poaceae). **Biologia**, Bratislava, v. 60, n. 1, p. 25-36, 2005.

SOUSA, S. M. **Bandeamento cromossômico em *Lippia alba* (Verbenaceae)**. 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Comparación de la composición química y la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundários volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. **Revista Académica Colombiana de Ciencias**, v. 27, n. 6, p. 579-597, 2003.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Bristol: J. W. Arrowsmith, 1971. 216 p.

SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. London: Unwin. Human, 1990. 434 p.

- SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. New York, Blacwell Science, 2003. 287 p.
- TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.
- TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae): a literature review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 5, p. 471-485, 1996.
- TRONCOSO, N. S. Los generos de Verbenaceas de sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolívia, Paraguai, Uruguai y sur de Brasil). **Darwiniana**, v. 18, n. 3/4, p. 295-412, 1974.
- TSOU, C. H.; FU, Y. L. Octad pollen formation in *Cymbopetalum* (Annonaceae) the binding mechanism. **Plant Systematics and Evolution**, v. 263, n. 1, p. 13-23, 2007.
- URDAMPILLETA, J. D.; FERRUCCI, M. S.; VANZELA, A. L. L. Karyotype differentiation between *Koelreuteria bipinnata* and *K. elegans* ssp. Formosana (Sapindaceae) based on chromosome banding patterns. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 149, n. 5, p. 451-455, 2005.
- VALENTIN, A.; PÉLISSIER, Y.; BENOIT, F.; MARION, C.; KONE, D.; MALLIE, M.; BASTIDE, J. M.; BESSIÈRE, J. M. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 51, p. 1439-1442, 1995.
- VICCINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; COSTA, D. C. S.; ROMANEL, E. C.; SOUSA, S. M.; PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R.G. Chromosome numbers in *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 2, p. 171-178, 2005.
- VILJOEN, A. M.; SUBRAMONEY, S.; VUUREN, S. F.; BAŞER, K. H. C.; DEMIRCI, B. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1/2, p. 271-277, 2005.
- VOSA, C. G. Heterochromatin recognition with fluorochromes. **Chromosoma**, v. 30, n. 4, p. 366-372, 1985.

WANDERLEY, M. G. L. *Xyris* da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil: duas novas espécies. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 6, n. 1, p. 11-14, 1983.

WINDHAM, M. Chromosome counts and taxonomic notes on *Draba* (Brassicaceae) of the intermountain west. 2: IDAHO, NEVADA, and VICINITY. **Madroño**, v. 50, n. 4, p. 221-231, 2003.

ZAMORA-MARTINEZ, M. C.; NIETO DE PASCUAL, C. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca. Puebla and Veracruz Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 3, p. 229-257, 1992.

Capítulo 2

Padrões palinológicos em espécies brasileiras do gênero *Lippia* L. (Verbenaceae)

1 RESUMO

SOUSA, Saulo Marçal de. Padrões palinológicos em espécies brasileiras do gênero *Lippia* L. (Verbenaceae). In: **Contribuições à biosistemática do gênero *Lippia* L. (Verbenaceae)**. 2008. cap. 2, 131 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.³

O tamanho do grão de pólen, em muitos gêneros de plantas, é positivamente correlacionado com o número cromossômico. Este trabalho foi realizado com os objetivos de ampliar as informações palinológicas de quatro seções do gênero *Lippia* (Verbenaceae) e averiguar se neste gênero o tamanho do grão de pólen está correlacionado com o número cromossômico das espécies. Para isso, os grãos de pólen de 14 espécies pertencentes às Seções *Zapania* Schauer, *Rhodolippia* Schauer, *Goniostachyum* Schauer e *Dipterocalyx* Troncoso foram estudados por microscopia de luz e por microscopia eletrônica de varredura. As medidas obtidas para o diâmetro polar e para o diâmetro equatorial apresentaram correlação positiva com a ploidia das espécies. *L. rubella* ($2n = 20$) apresentou o menor tamanho e *L. rotundifolia* ($2n = 56$), o maior tamanho. Adicionalmente, observou-se o aumento do número de aberturas polínicas com o aumento da ploidia para as espécies, tendo *L. rubella* se apresentado tricolporada e *L. rotundifolia*, tetracolporada. Características palinológicas sobre ornamentações dos grãos e suas relações com a taxonomia do gênero e de cada seção foram discutidas no texto.

³ Comitê de Orientação: Giovana Augusta Torres-UFLA (Orientadora), Lyderson Facio Viccini-UFJF.

2 ABSTRACT

SOUSA, Saulo Marçal de. Palinologicals Patterns in Brazilian Species of the genus *Lippia* L. (Verbenaceae). In: **Contributions to the biosystematics of the genus *Lippia* L. (Verbenaceae)**. 2008. cap. 2, 131 p. Thesis (Doctor's degree in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.⁴

Pollen grain size in many genera is positively correlated with chromosome number. The aim of this work was to enlarge palinological information about four sections of the genus *Lippia* (Verbenaceae) and to verify if in this genus the size of the pollen grains is correlated with the chromosome number. The pollen grains of 14 species of sections *Zapania* Schauer, *Rhodolippia* Schauer, *Goniostachyum* Schauer and *Dipterocalyx* were studied by light microscopy and scanning electron microscopy. The measurements of polar diameter (P) and equatorial diameter (E) showed a positive correlation with the species ploidy. *L. rubella* ($2n = 20$) showed the shorter size and *L. rotundifolia* ($2n=56$) the bigger size. Additionally, the enlarging of the pollen aperture number increased with the increase of the chromosome number, since *L. rubella* is tricolporated and *L. rotundifolia* tetracolporated. Palinological characteristics about pollen grains ornamentations and their relation with the genus and each section were discussed in the text.

⁴ Guidance Committee: Giovana Augusta Torres-UFLA (Major Professor), Lyderson Facio Viccini-UFJF.

3 INTRODUÇÃO

Vários são os atributos que tornam o grão de pólen uma importante fonte de informação para a sistemática vegetal. É possível destacar, entre eles, variações no tamanho dos grãos, na pigmentação, no aroma, no conteúdo nutricional para os polinizadores, no número de grãos produzidos e no padrão de ornamentação da exina, sua parede externa (Dobson & Bergstrom, 2000; Lunau, 2000; Roulston & Cane, 2000; Edlund, 2004; Blackmore, 2007).

Nesse sentido, a obtenção de dados palinológicos tem auxiliado imensamente a filogenia e a delimitação de várias famílias, gêneros e seções, havendo vasta literatura sobre a palinologia dos mais diversos grupos de plantas (Cooper et al., 2000; Schols et al., 2001; Luna-Cavazos & García-Moya, 2002; Simpson et al., 2003; Judd & Olmstead, 2004; Wu et al., 2005; Sarwar et al., 2006; Sampson, 2007; Chassot & Hagen, 2008). Além disso, juntamente com os estudos taxonômicos, inferências sobre muitas relações importantes com a ecologia e a evolução dos vegetais, principalmente relacionando a morfologia polínica com a síndrome de polinização dos diferentes grupos vegetais, têm sido realizadas (Bernhardt, 2000; Dobson & Bergstrom, 2000; Stroo, 2000).

No gênero *Lippia* L. (Verbenaceae), escassos são os trabalhos que se preocupam com a descrição e a utilização de dados palinológicos para melhor delimitação e entendimento do gênero. O principal trabalho com a família Verbenaceae, no sentido apenas descritivo, é muito antigo (Raj, 1983), havendo a abordagem de tratos palinológicos para somente quatro espécies do gênero *Lippia*. Tais informações, somadas ao estudo de mais quatro espécies, realizados por Silva (2008) e em três citótipos de *L. Alba*, por Pierre (2008), constituem as principais informações sobre a palinologia de espécies pertencentes ao gênero. Portanto, este número acaba sendo insignificante perto das cerca de 200 espécies

descritas até o momento, havendo grande necessidade de aumentar as informações palinológicas para o grupo.

Das espécies estudadas, grande variação tem sido observada nos tratos palinológicos de *L. alba*. Segundo Pierre (2008), esta espécie apresenta grande variação no número cromossômico, assim como no número de aberturas e na forma dos grãos de pólen. Este autor constatou que o número cromossômico dos diferentes citótipos parece estar relacionado com a morfologia do grão de pólen, uma vez que indivíduos diplóides com $2n=30$ apresentam, exclusivamente, três aberturas e âmbito triangular, e o citótipo poliplóide com $2n = 60$ apresenta número de aberturas variando de três a quatro e âmbitos triangulares ou quadrangulares.

Muitos trabalhos mostram que, em alguns grupos de plantas, essa relação entre ploidia e morfologia polínica é positiva. Ying et al. (2006), por exemplo, observaram este comportamento em melão. Os autores relataram que plantas tetraplóides e diplóides apresentam pólenes com diâmetros diferentes, tendo os indivíduos tetraplóides medidas mais elevadas que os diplóides. Almada et al. (2006), ao estudarem 18 populações de oito espécies de *Crotalaria*, também observaram grande influência da ploidia no tamanho do grão de pólen destas espécies. Eles relataram a existência de indivíduos octaplóides nas populações e observaram que, com o aumento da ploidia nessas populações, ocorria aumento no diâmetro do pólen, considerando este comportamento como um resultado da poliploidia, de efeito "Gigas", também descrito por Stebbins (1971).

Além de trabalhos que revelaram variações no tamanho do grão, outros mostraram também que o tamanho pode não variar com a ploidia, mas o número de aberturas (Cuadrado, 2003), a espessura da parede e a sua ornamentação podem também estar relacionadas com a ploidia. Cooper et al. (2000), ao estudarem a morfologia e a ultra-estrutura do grão de pólen de espécies do

gênero *Callitriche*, que apresenta plantas aquáticas, semi-aquáticas e terrestres, constataram que as espécies apresentam grãos de pólen com a mesma morfologia, mas com ornamentações da exina particulares para plantas com diferentes hábitos de crescimento. Espécies terrestres apresentaram exina bem desenvolvida e ornamentada, com perfurações maiores que as plantas semi-aquáticas, enquanto as plantas estritamente aquáticas apresentaram grãos de pólen com a exina pouco desenvolvida e sem perfurações. Além destas relações, os autores também observaram que a redução da exina e a perda de suas ornamentações estavam diretamente relacionadas com a diminuição do número de cromossomos entre as espécies.

Estudos sobre a ploidia de espécies brasileiras de *Lippia* foram realizados por Viccini et al. (2005). Estes autores relataram a ploidia de 14 espécies, mostrando que o gênero apresenta grande variação no número cromossômico, tendo *Lippia rubella* o menor número, $2n = 20$ e *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* (possivelmente poliplóides), os maiores números, $2n = 56$, sugerindo que o gênero apresente um número básico (x) menor que 10. Entretanto, nenhum tipo de estudo avaliando a relação da ploidia com tratamentos palinológicos foi realizado em *Lippia*, até o momento.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de aumentar as informações sobre a palinologia do gênero *Lippia*, por meio de estudos com microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, ainda escassos na literatura, além de verificar a existência de relações do número cromossômico com a morfologia dos grãos de pólen neste gênero.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas 14 espécies de *Lippia* (Verbenaceae) provenientes do banco de germoplasma da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Os Vouchers das espécies estudadas foram depositados no Herbário CESJ da UFJF. Na Tabela 1, além dos registros de herbário, se encontram o local de origem das espécies e o número cromossômico.

TABELA 1. Nome, cidade de origem no estado de Minas Gerais, número de registro (NR) e número cromossômico de 14 espécies de *Lippia*.

Espécies	NR	Origem	Ploidia 2n (autor)
<i>Lippia alba</i> *	33.721	Juiz de Fora	30 (Moldenk)
<i>Lippia corymbosa</i> Cham.*	34.741	Diamantina	28 (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia diamantinensis</i> Glaz.*	34.734	Diamantina	52 (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia filifolia</i> Mart. & Schauer ex Schauer****	34.740	Diamantina	24 (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia lacunosa</i> Mart. & Schauer*	42.706	Diamantina	56 (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia lupulina</i> Cham.**	34.742	Diamantina	28 (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia pohliana</i> Schauer***	39.360	Diamantina	24 (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia pseudothea</i> (St. Hil.) Schauer**	34.340	Diamantina	26 (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia rosella</i> Moldenk**	34.746	Diamantina	28 (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia rotundifolia</i> Cham.*	34.338	Diamantina	56 (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia rubella</i> Moldenke*	42.706	Diamantina	20 (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia florida</i> Cham.**	34.738	Serra do Cipó	24 (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia hermanioides</i> Cham.*	34.739	Serra do Cipó	26 (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia sidoides</i> Cham.***	34.737	Serra do Cipó	24 (Viccini et al., 2005)

* Seção *Zapania* Schauer; ** Seção *Rhodolippia* Schauer; *** Seção *Goniostachyum* Schauer; **** Seção *Dipterocalyx* Troncoso

4.2 Palinologia

O preparo das amostras e as análises, por microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), dos grãos de pólen das 14 espécies de *Lippia*, foram conduzidos nos Laboratórios de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Para ML, as inflorescências coletadas foram fixadas em ácido acético glacial por, no mínimo, 24 horas. Foram selecionados os maiores tamanhos de flores, sem que estivessem abertas e, com o auxílio de um microscópio estereoscópico e de agulhas, cada botão floral umedecido em ácido acético 45% foi aberto e as anteras isoladas.

Em seguida, para cada espécie, as anteras foram transferidas para um microtubo contendo ácido acético glacial. Após, aproximadamente, 10 minutos, as anteras foram maceradas com auxílio de um bastão de aço e centrifugadas, a 2.500 rpm, por 10 minutos, com posterior remoção do sobrenadante. O material polínico concentrado no fundo do microtubo (*pellet*) foi acetolizado de acordo com o método de Erdtman (1960), no qual 1 mL de solução acetolítica (anidrido acético:ácido sulfúrico 9:1 (v/v)) recém-preparada foi adicionado à amostra polínica contida no microtubo, seguida por homogenização do material com auxílio do bastão de aço.

Posteriormente, o microtubo contendo a amostra foi colocado em banho-maria, a 85°C, por 2 minutos. Decorrido este período, o microtubo foi novamente centrifugado, por 10 minutos, a 2.500 rpm. O sobrenadante foi removido do microtubo com auxílio de pipetas de *Pasteur* e o volume foi completado com água destilada, seguido por homogenização do material com auxílio do bastão. O material foi centrifugado, por 10 minutos, a 2.500 rpm e o sobrenadante foi removido. Ao *pellet* resultante foi acrescentado 1 mL de água glicerinada 50% e ele foi, novamente, homogenizados. O material resultante foi

deixado em repouso durante 30 minutos e, posteriormente, centrifugado, por 10 minutos, a 2.500 rpm. Todo o sobrenadante foi retirado com auxílio de pipetas de *Pasteur* e pequenas faixas de papel absorvente. Com o auxílio de um bisturi, foram cortados pequenos pedaços (1mm x 1mm) de gelatina glicerinada (100mL de água destilada; 100 mL de glicerina; 17g de gelatina incolor; 1g de fenol). Em seguida, com o auxílio de uma agulha, um fragmento de gelatina foi encostado no fundo do microtubo, absorvendo parte do material polínico e, em seguida, transferido para uma lâmina limpa e coberto com uma lamínula. Esta foi colocada em placa de aquecimento (aproximadamente 50°C) até completa fusão da gelatina e espalhamento sob a lâmina. Foram montadas cinco lâminas de cada espécie e examinadas no microscópio óptico Olympus BX 51. As imagens dos grãos de pólen foram digitalizadas utilizando-se uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio Olympus BX 51 e analisadas por meio do programa de imagem Image-ProPlus (Media Cybernetics). As medidas dos eixos polar (P) e equatorial (E) foram obtidas em 25 grãos de pólen de cada uma das cinco lâminas preparadas para cada espécie, totalizando 125 grãos de pólen mensurados para cada espécie. Já para as medidas da exina (ectoexina e endoexina), foram realizadas mensurações em 10 grãos de pólen de cada uma das cinco lâminas, com um total de 50 grãos de pólen mensurados por espécie. As classificações foram feitas de acordo com Erdtman (1960) e Punt (1994). Além das medidas, foram obtidos também o desvio padrão e a amplitude das medidas.

Para a análise detalhada da ornamentação da parede polínica, as amostras polínicas de cada uma das 14 espécies foram analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, em cada espécie, foram selecionados botões florais maduros e fechados. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico e de agulhas, cada botão floral umedecido em ácido acético 45% foi aberto. Após este processo, as anteras foram transferidas para

microtubos adaptados com os lados superior e inferior cobertos com tela de poliéster (malha 60 µm). Os microtubos adaptados foram fechados e transferidos para microtubos de maior capacidade e cobertos com fixador Karnovisk, até a etapa subsequente. As anteras foram retiradas do fixador com auxílio de pipetas de *Pasteur* e o material polínico contido no interior dos microtubos adaptados foi lavado, três vezes consecutivas, com tampão cacodilato, por 10 minutos cada vez. Após a lavagem, foram acrescentadas três gotas de tetróxido de ósmio 0,05 M, seguindo-se repouso de 4 horas. Decorrido este período, foram realizadas duas lavagens do material, durante 10 minutos cada, seguida por desidratação em uma série crescente de concentração de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%), por 10 minutos em cada concentração, repetindo-se o processo por três vezes, na maior concentração (100%). Em seguida, o material polínico de cada espécie foi seco em aparelho de ponto crítico (CPD 030, Bal-Tec) e os grãos de pólen espalhados sobre *stubs* montados com fita adesiva com dupla face, contendo carbono. Os grãos de pólen foram espalhados sobre o *stub* com auxílio de seringas usando o microscópio esteroscópico Meiji, Tecno Rz, Japão. Em seguida, os *stubs* foram cobertos com partículas de ouro, por 15 minutos, em aparelho SCD 050, Bal-Tec e as amostras analisadas e fotografadas em microscópio de varredura LEO Evo 40 XVP.

4.3 Correlações do diâmetro polínico com a ploidia das espécies de *Lippia*

Para a verificação da relação do tamanho dos grãos de pólen com a ploidia das espécies, foram calculados os coeficiente de correlação (r), ($p < 0,001$), tanto do diâmetro polar (P) como do diâmetro do eixo equatorial (E) com o número cromossômico das espécies, utilizando-se os dados relacionados ao número cromossômico das espécies previamente descrito na literatura (Tabela 1).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização palinológica

A seguir, apresenta-se a descrição palinológica, realizada para 14 espécies de *Lippia*, representantes de quatro seções do gênero.

Seção *Zapania* Schauer

Lippia corymbosa

L. corymbosa possui pólen tricolporados, com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 29,67 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 29,67 μm (Tabela 2); possui exina com ornamentação levemente escabrada a perfurada, com espessura média de 1,55 μm e âmbito, observado na visão polar, triangular (Tabelas 3 e 4; Figura 1 A e B).

Lippia diamantinensis

L. diamantinensis possui pólen tricolporados e tetracolporados (em menor frequência), com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 30,56 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 34,46 μm (Tabela 2). Possui exina psilada (lisa), com espessura média de 1,67 μm e âmbitos, observados na visão polar, triangular (mais frequente) e quadrangular (Tabelas 3 e 4; Figura 1 C).

Lippia hermanioides

L. hermanioides possui pólen tricolporados, com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 26,23 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 26,02 μm (Tabela 2).

Possui exina com ornamentação do tipo perfurada, com espessura média de 1,55 μm e âmbito, observado na visão polar, triangular (Tabelas 3 e 4; Figura 1 D, E e F).

Lippia lacunosa

L. lacunosa possui pólen tricolporados e tetracolporados (em maior frequência), com diâmetro médio, do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 37,3 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 38,41 μm (Tabela 2). Possui exina psilada (lisa), com espessura média de 1,94 μm e âmbitos, observados na visão polar, triangular e quadrangular (mais freqüente) (Tabelas 3 e 4; Figura 1 G e H).

Lippia rotundifolia

L. rotundifolia possui pólen tetracolporados, com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 40,21 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 40,32 μm (Tabela 2). Possui exina com ornamentação do tipo perfurada, com espessura média de 1,67 μm e âmbito, observado na visão polar, quadrangular (Tabelas 3 e 4; Figura 1 I).

Lippia rubella

L. rubella possui pólen tricolporados, com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtidos na visão equatorial, igual a 17,27 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 17,45 μm (Tabela 2). Possui exina psilada (lisa), com espessura média de 1,69 μm e âmbito, observado na visão polar, triangular (Tabelas 3 e 4; Figura 1 J e K).

Lippia alba

L. alba possui pólen tricolporados, com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 33,72 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 34,34 μm (Tabela 2). Possui exina com ornamentação do tipo psilada, com espessura média de 2,04 μm e âmbito, observado na visão polar, triangular (Tabelas 3 e 4; Figura 1 L).

Seção *Rhodolippia* Shauer

Lippia florida

L. florida possui pólen tricolporados, com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 28,69 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 31,81 μm (Tabela 2). Possui exina com ornamentação do tipo perfurada, com espessura média de 2,03 μm e âmbito, observado na visão polar, (Tabelas 3 e 4; Figura 1 M).

Lippia lupulina

L. lupulina possui pólen tricolporados, com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 32,27 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 31,8 μm (Tabela 2). Possui exina com ornamentação do tipo perfurada, com espessura média de 2,13 μm e âmbito, observado na visão polar, triangular (Tabelas 3 e 4; Figura 1 N, O e P).

Lippia pseudothea

L. pseudothea possui pólen tricolporados, com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 24,46 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 26,34 μm (Tabela 2). Possui exina com ornamentação do tipo perfurada, com espessura média de 1,66 μm e âmbito, observado na visão polar, triangular (Tabelas 3 e 4; Figura 1 Q, R e S).

Lippia rosella

L. rosella possui pólen tricolporados, com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 30,01 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 28,9 μm (Tabela 2). Possui exina com ornamentação do tipo perfurada, com espessura média de 1,96 μm e âmbito, observado na visão polar, triangular (Tabelas 3 e 4; Figura 1 T).

Seção *Goniostachium* Shauer

Lippia pohliana

L. pohliana possui pólen tricolporados, com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 22,23 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 23,23 μm (Tabela 2). Possui exina com ornamentação do tipo psilada a escabrada, com espessura média de 1,29 μm e âmbito, observado na visão polar, triangular (Tabelas 3 e 4; Figura 1 U).

Lippia sidoides

L. sidoides possui pólen tricolporados, com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 20,68 e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 20,63 μm . Possui exina com ornamentação do tipo psilada a escabrada, com espessura média de 1,55 μm e âmbito, observado na visão polar, triangular (Tabelas 3 e 4; Figura 1 V).

Seção *Dioicolippia* Troncoso

Lippia filifolia

L. filifolia possui pólen tricolporados, com diâmetro médio do eixo equatorial (E), obtido na visão equatorial, igual a 25,59 μm e diâmetro médio do eixo polar (P), obtido na visão equatorial, igual a 26,67 μm (Tabela 2). Possui

exina com ornamentação do tipo perfurada, com espessura média de 1,54 μm e âmbito, observado na visão polar, triangular (Tabelas 3 e 4; Figura 1 X, Z e W).

TABELA 2. Dados morfométricos obtidos com o estudo palinológico de 14 espécies do gênero *Lippia*. P = média do diâmetro polar; E = média do diâmetro equatorial; $\pm dp$ = desvio padrão; (AP) = amplitude.

Espécies	P $\pm dp$ (AP) μm	E $\pm dp$ (AP) μm	P/E $\pm dp$ (AP) μm
<i>L. alba</i>	33,72 \pm 1,99 (26,77-38,6)	34,34 \pm 1,97 (25,8-36,7)	0,97 \pm 0,04 (0,86-0,98)
<i>L. corymbosa</i>	29,67 \pm 1,59 (26,46-32,37)	29,67 \pm 1,97 (23,96-32,39)	1,02 \pm 0,03 (0,98-1,1)
<i>L. diamantinensis</i>	34,46 \pm 3,24 (30,51-42,59)	30,56 \pm 1,9 (28,44-35,83)	1,12 \pm 0,05 (1,05-1,29)
<i>L. filifolia</i>	26,67 \pm 1,86 (21,89-29,47)	25,59 \pm 1,18 (23,14-27,2)	0,96 \pm 0,04 (0,89-1,05)
<i>L. florida</i>	31,81 \pm 2,45 (24,59-32,46)	28,69 \pm 3,17 (25,6-37,81)	1,1 \pm 0,04 (1,01-1,18)
<i>L. hermanioides</i>	26,02 \pm 1,82 (23,12-29,15)	26,23 \pm 2,06 (22,85-29,8)	0,99 \pm 0,03 (0,91-1,04)
<i>L. lacunosa</i>	38,41 \pm 4,13 (17,89-40,1)	37,3 \pm 3,98 (17,2 – 39,3)	1,13 \pm 0,06 (1,02-1,25)
<i>L. lupulina</i>	31,80 \pm 2,08 (28,47-35,57)	32,27 \pm 2,48 (28,13-35,49)	0,98 \pm 0,05 (0,92-1,12)
<i>L. pohliana</i>	23,23 \pm 1,85 (19,32-25,6)	22,23 \pm 2,04 (17,15-25,02)	1,04 \pm 0,03 (1,0-1,15)
<i>L. pseudothea</i>	26,34 \pm 1,18 (24,83-28,63)	24,46 \pm 0,87 (23,41-25,65)	1,07 \pm 0,05 (1,0-1,21)
<i>L. rosella</i>	30,00 \pm 1,62 (24,83-28,63)	28,99 \pm 1,3 (26,38-30,67)	1,03 \pm 0,02 (0,99-1,07)
<i>L. rotundifolia</i>	40,32 \pm 3,43 (25,73-44,36)	40,21 \pm 2,87 (26,8-42,1)	1,1 \pm 0, 03 (1,04-1,21)
<i>L. rubella</i>	17,45 \pm 1,45 (14,85-19,95)	17,27 \pm 1,39 (15,41-21,13)	1,01 \pm 0,04 (0,92-1,1)
<i>L. sidoides</i>	20,63 \pm 2,02 (17,34-25,05)	20,68 \pm 2,12 (17,14-25,88)	0,99 \pm 0,13 (0,67-1,1)

TABELA 3. Dados morfométricos médios da exina (endoexina + ectoexina) polínica de 14 espécies do gênero *Lippia*. \pm = desvio padrão; (AP) amplitude.

Espécies	Endoexina \pm dp (AP) μm	Ectoexina \pm dp (AP) μm	Ornamentação
<i>L. alba</i>	1,00 \pm 0,11 (0,85-1,04)	1,04 \pm 0,13 (0,92-1,08)	Psilada
<i>L. corymbosa</i>	0,70 \pm 0,21 (0,85-1,67)	0,85 \pm 0,25 (0,78-1,77)	escabrada-psilada
<i>L.diamantinensis</i>	0,74 \pm 0,13 (0,49-1,04)	0,93 \pm 0,17 (0,65-1,35)	Psilada
<i>L. filifolia</i>	0,62 \pm 0,13 (0,34-0,88)	0,92 \pm 0,17 (0,64-1,34)	Perfurada
<i>L. florida</i>	1,12 \pm 0,15 (0,92-1,43)	0,91 \pm 0,13 (0,71-1,22)	Perfurada
<i>L. hermanioides</i>	0,76 \pm 0,13 (0,61-1,05)	0,79 \pm 0,15 (0,6-1,06)	Perfurada
<i>L. lacunosa</i>	0,94 \pm 0,15 (0,23-1,08)	1,00 \pm 0,17 (0,34-1,12)	Psilada
<i>L. lupulina</i>	1,05 \pm 0,18 (0,74-1,34)	1,08 \pm 0,23 (0,56-1,55)	perfurada
<i>L. pohliana</i>	0,69 \pm 0,12 (0,5-0,88)	0,60 \pm 0,11 (0,44-0,82)	psilada-escabrada
<i>L. pseudothea</i>	0,83 \pm 0,2 (0,52-1,34)	0,83 \pm 0,21 (0,57-1,42)	perfurada
<i>L. rosella</i>	1,09 \pm 0,18 (0,79-1,45)	0,87 \pm 0,1 (0,65-1,05)	perfurada
<i>L. rotundifolia</i>	0,87 \pm 0, 11 (0,64-1,01)	0,80 \pm 0,13 (0,71-0,98)	perfurada
<i>L. rubella</i>	0,88 \pm 0,15 (0,68-1,13)	0,81 \pm 0,16 (0,41-1,15)	Psilada
<i>L. sidoides</i>	0,70 \pm 0,16 (0,46-1,04)	0,85 \pm 0,13 (0,55-1,13)	psilada-escabrada

TABELA 4. Forma (âmbito), número e tipo de aberturas polínicas de 14 espécies do gênero *Lippia*.

Espécies	Âmbito	Número de aberturas	Tipo de abertura
<i>L. alba</i>	Triangular	3	Cólporo
<i>L. corymbosa</i>	Triangular	3	Cólporo
<i>L. diamantinensis</i>	Triangular*-quadrangular	3*-4	Cólporo
<i>L. filifolia</i>	Triangular	3	Cólporo
<i>L. florida</i>	Triangular	3	Cólporo
<i>L. hermanioides</i>	Triangular	3	Cólporo
<i>L. lacunosa</i>	Triangular-quadrangular*	3-4*	Cólporo
<i>L. lupulina</i>	Triangular	3	Cólporo
<i>L. pohliana</i>	Triangular	3	Cólporo
<i>L. pseudothea</i>	Triangular	3	Cólporo
<i>L. rosella</i>	Triangular	3	Cólporo
<i>L. rotundifolia</i>	Quadrangular	4	Cólporo
<i>L. rubella</i>	Triangular	3	Cólporo
<i>L. sidoides</i>	Triangular	3	Cólporo

* forma do pólen e número de aberturas mais frequentes

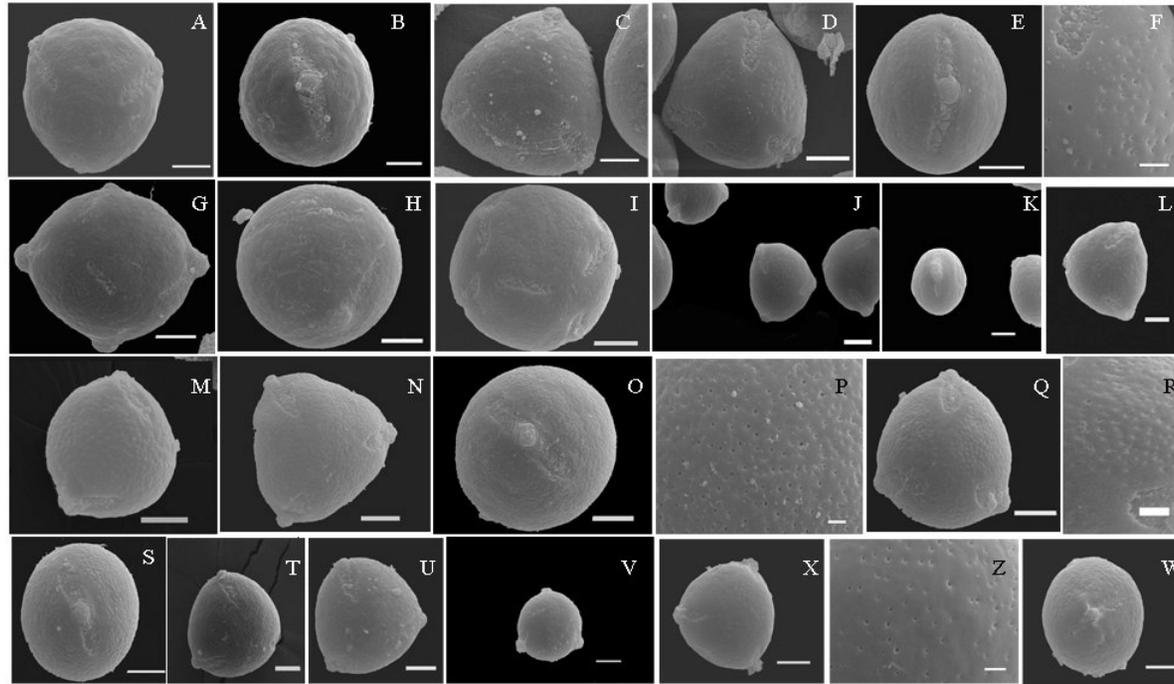


FIGURA 3. Fotomicrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, mostrando visões polar **-VP-** e equatorial **-VE-** do pólen de *L.corymbosa* (A e B); **-VP-** *L.diamantinensis* (C); **-VP-**, **-VE-** e detalhe da exina **-DE-** de *L.hermanioides* (D, E e F); **-VP-** e **-VE-** de *L.lacunosa* (G e H); **-VP-** *L.rotundifolia* (I); **-VP-** e **-VE-** de *L.rubella* (J e K); **-VP-** de *L.alba* (L); **-VP-** de *L.florida* (M); **-VP-**, **-VE-** de *L.lupulina* (N, O e P); **-VP-**, **-DE-** e **-VE-** de *L.pseudothea* (Q, R e S); **-VP-** de *L.rosela* (T); **-VP-** de *L.pohliana* (U); **-VP-** de *L.sidoides* (V); **-VP-**, **-DE-** e **-VE-** de *L.filifolia* (X, Z e W). Barra = 10 μ m.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a seção *Zapania* Schauer foi a que apresentou maior diversidade palinológica, seja no tamanho dos grãos, possuindo os menores e os maiores tamanhos polínicos, no número de aberturas (3-4), assim como na ornamentação da exina polínica. As espécies desta seção podem ser separadas em três grupos, segundo o tipo de exina (psilada, escabrada ou perfurada). Variações na seção também estão presentes nos tipos de inflorescência das espécies, assim como no número cromossômico.

Viccini et al. (2005), ao estudarem o número cromossômico de várias espécies brasileiras do gênero *Lippia*, encontraram diferentes números cromossômicos para as espécies da seção *Zapania*, desde $2n = 20$ (*L. rubella*) até números considerados altos para o gênero, como os números observados em *L. diamantinensis* ($2n=52$), *L. lacunosa* ($2n=56$) e *L. rotundifolia* ($2n=56$). Estas observações, adicionadas à ampla variação morfológica da seção *Zapania*, reforçam o fato de que a mesma é uma seção muito inconsistente e de que novas revisões devem ser realizadas, com o máximo de caracteres possível, para melhor delimitação dessas espécies.

Diferentemente do que foi observado em *Zapania*, as espécies da Seção *Rhodolippia* Schauer mostraram-se bastante homogêneas, no que diz respeito ao tamanho do pólen, ao número de aberturas (todas tricolporadas) e à ornamentação da exina (todas com exina perfurada), reforçando os argumentos de Salimena (2000) e de Viccini et al. (2005) sobre a consistência e o estado monofilético da seção.

Com relação às Seções *Goniostachyum* Schauer e *Dioicolippia* Troncoso, as espécies representantes apresentaram valores muito semelhantes para o tamanho de pólen, diferindo apenas na ornamentação da exina. As espécies de *Goniostachyum* Schauer apresentaram exina psilada a escabrada, enquanto a única espécie de *Dioicolippia* Troncoso (*L. filifolia*) estudada neste

trabalho apresentou uma exina perfurada, se aproximando muito do que foi observado na seção *Zapania* Schauer.

Os resultados indicaram que, no gênero *Lippia*, existem dois padrões principais de ornamentações da exina (perfurada e psilada) e que as espécies apresentam, na grande maioria, pólenes triangulares, com três aberturas, sendo muito semelhantes aos dados obtidos por Raj (1983), Pierre (2008) e Silva (2008).

Além disso, os dados obtidos, juntamente com dados morfológicos e moleculares, serão, posteriormente, fundamentais para uma delimitação mais apropriada das seções genéricas e do grupo como um todo.

5.2 Correlações de tratos palinológicos com o número cromossômico

Paralelamente às observações taxonômicas, foi possível inferir que o tamanho do grão de pólen e o número de aberturas em *Lippia* estão diretamente relacionados com o nível de ploidia das espécies. As 14 espécies estudadas apresentaram este comportamento, tendo *L. rubella* o menor número cromossômico e o menor grão de pólen, e *L. rotundifolia* ($2n=56$) e *L. lacunosa* ($2n=56$) os maiores números cromossômicos e tamanhos dos grãos (Tabela 5).

Tais observações foram confirmadas com a obtenção dos coeficientes de correlação (r) entre o diâmetro do eixo equatorial (E) e o diâmetro do eixo polar (P) com a ploidia das espécies, que foram significativos para os tratos estudados. A correlação entre o nível de ploidia e o diâmetro do eixo equatorial (E) foi de $r = 0,74$ (Figura 2), enquanto a do nível de ploidia com o diâmetro polar (P) foi de $r = 0,84$ (Figura 3).

TABELA 5. Número cromossômico (2n), diâmetros (P) polar e (E) equatorial e número de aberturas para 14 espécies do gênero *Lippia*.

Espécies	(P) µm	(E) µm	2n	A
<i>L. rubella</i>	17,45	17,27	20	3
<i>L. sidoides</i>	20,64	20,68	24	3
<i>L. pohliana</i>	23,23	22,23	24	3
<i>L. hermanioides</i>	26,02	26,23	26	3
<i>L. pseudothea</i>	26,34	26,46	26	3
<i>L. filifolia</i>	26,67	25,59	24	3
<i>L. florida</i>	28,69	31,81	24	3
<i>L. corymbosa</i>	29,67	29,04	28	3
<i>L. rosella</i>	30,01	28,99	28	3
<i>L. lupulina</i>	31,8	32,27	28	3
<i>L. Alba</i>	33,72	34,34	30	3
<i>L. diamantinensis</i>	34,46	30,56	52	3*-4
<i>L. lacunosa</i>	38,41	37,3	56	3-4*
<i>L. rotundifolia</i>	40,32	40,21	56	4

* número de aberturas mais frequentes

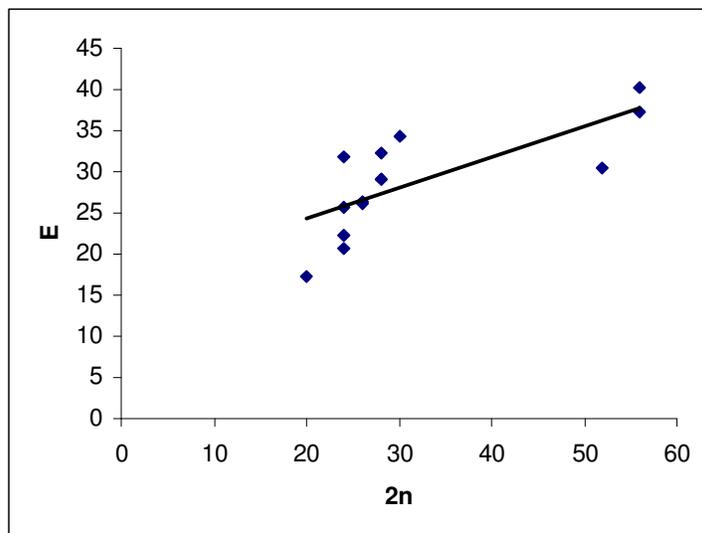


FIGURA 2. Correlação entre número cromossômico ($2n$) e diâmetro do eixo equatorial (E) de 14 espécies do gênero *Lippia*. $r = 0,74$

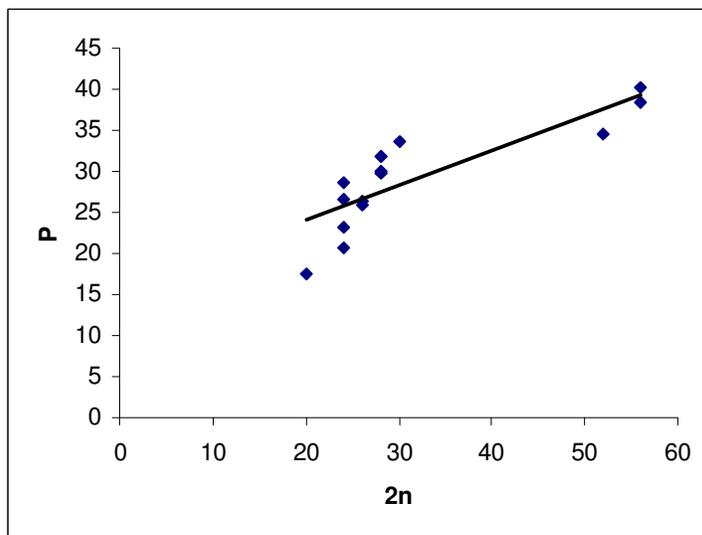


FIGURA 3. Correlação entre número cromossômico ($2n$) e diâmetro do eixo polar (P) de 14 espécies do gênero *Lippia*. $r = 0,84$

Além disso, foi possível observar que o número de aberturas aumentou com a ploidia. A maioria das espécies apresentou três aberturas, enquanto *L. diamantinensis* e *L. lacunosa* apresentaram pólen com três e quatro aberturas e *L. rotundifolia*, pólen com somente quatro aberturas (Tabela 5 e Figura 4).

Tais resultados mostram que, no gênero *Lippia*, a poliploidia tem um importante papel na modificação dos caracteres palinológicos. Stebbins (1971) mostrou que o efeito "gigas", causado pela poliploidia, ocorre especialmente em órgãos vegetais que apresentam crescimento determinado, devido, principalmente, ao aumento do tamanho das células nas espécies poliplóides.

A correlação entre poliploidia e aumento nos caracteres polínicos tem sido amplamente estudada e a maioria dos trabalhos mostra que a análise da morfologia polínica pode ser uma importante ferramenta utilizada para o estudo evolutivo dos vegetais e para o isolamento de cultivares ou de citótipos poliplóides que possam ser utilizados para os mais diversos fins, como ocorre em aveia (Katsiotis & Forsberg, 1995) e em melancia (Jaskani et al., 2005), por exemplo. Nestes trabalhos, os autores conseguiram selecionar os indivíduos poliplóides, de populações a serem melhoradas, por meio de análises do tamanho do grão de pólen seguidas de estudos citogenéticos para a determinação correta da ploidia.

Embora o presente estudo seja bastante inovador para o gênero *Lippia*, mais estudos desta natureza seriam de grande importância para corroborar as informações obtidas.

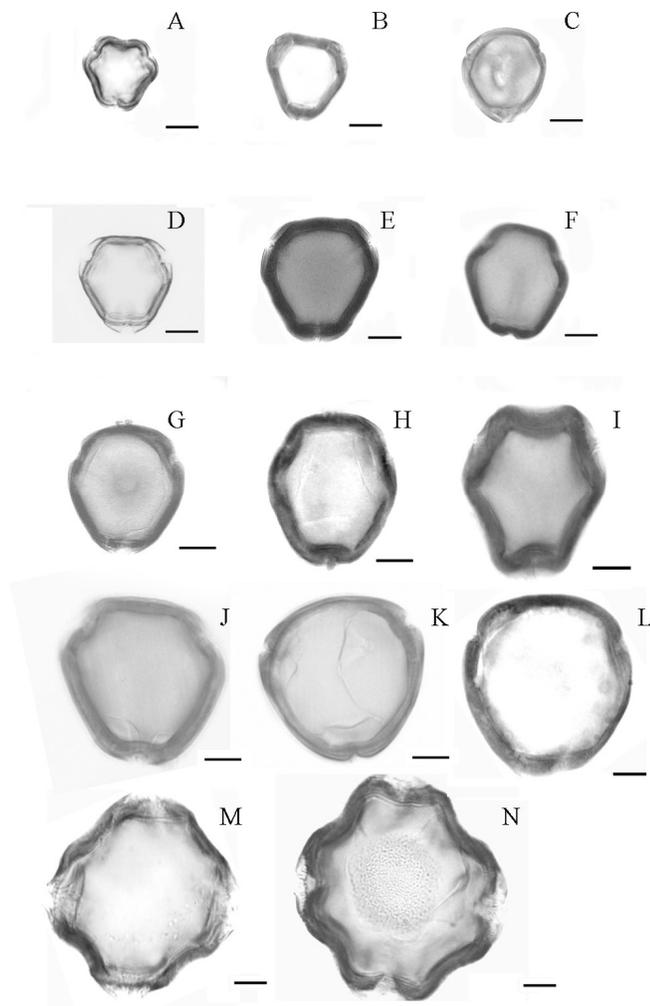


FIGURA 4. Aumento do tamanho polínico com o aumento do número cromossômico em: A- *L. rubella* ($2n=20$), B- *L. sidoides* ($2n=24$), C- *L. pohliana* ($2n=24$), D- *L. hermanioides* ($2n=26$), E- *L. pseudothea* ($2n=26$), F- *L. filifolia* ($2n=24$), G- *L. florida* ($2n=24$), H- *L. corymbosa* ($2n = 28$), I- *L. rosella* ($2n=28$), J- *L. lupulina* ($2n=28$), K- *L. alba* ($2n=30$), L- *L. diamantinensis* ($2n=52$), M- *L. lacunosa* ($2n =56$), *L. rotundifolia* ($2n=56$). Barra = 5 μ m.

6 CONCLUSÕES

- O número cromossômico das espécies do gênero *Lippia* aqui estudadas está relacionado direta e positivamente com o tamanho e o número de aberturas dos grãos de pólen.
- A seção *Rhodolippia* apresenta as espécies com padrões palinológicos mais homogêneos dentre as quatro seções estudadas, enquanto a seção *Zapania* apresenta maior variação entre as espécies.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMADA, R. D.; DAVINA, J. R.; SEIJO, J. G. Karyotype analysis and chromosome evolution in southernmost South America species of *Crotalaria* (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 150, n. 3, p. 329-341, 2006.

BERNHARDT, P. Convergent evolution and adaptive radiation of beetle-pollinated angiosperms. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, n. 3, p. 293-320, 2000.

BLACKMORE, S. Pollen and spores: microscopic keys to understanding the earth's biodiversity. **Plant Systematics and Evolution**, v. 263, n. 1, p. 3-12, 2007.

CHASSOT, P.; HAGEN, K. B. V. Pollen morphology of the Swertiinae (Gentianaceae): phylogenetic implications. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 157, n. 3, p. 323-341, 2008.

COOPER, R. L.; OSBORN, J. M.; PHILBRICK, C. T. Comparative pollen morphology and ultrastructure of the Callitrichaceae. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 2, p. 161-175, 2000.

CUADRADO, G. A. Palinologia de los géneros *Modiola*, *Modiolastrum* e *Tropidococcus* (Malvaceae). **Universidade Nacional del Nordeste- Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, v. 14, n. 1, p. 120-130, 2003.

DOBSON, H. E. M.; BERGSTROM, G. The ecology and evolution of the pollen odors. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, n. 1, p. 63-87, 2000.

EDLUND, A. F.; SWANSON, R.; PREUSS, D. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. **The Plant Cell**, v. 16, n. 1, p. 84-97, 2004.

ERDTMAN, G. The acetolysis method, a revised description. **Svensk Botanisk Tidskr**, v. 54, p. 561-564, 1960.

- JASKANI, M. J.; KWON, S. W.; KIN, D. H. Flow cytometry of DNA contents of colchicine treated watermelon as a ploidy screening method at M1 stage. **Pakistan Journal of Botany**, v. 37, n. 3, p. 685-696, 2005.
- JUDD, W. S.; OLMSTEAD, R. G. A survey of tricolpate (Eudicot) phylogenetic relationships. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 10, p. 1627-1644, 2004.
- KATSIOTIS, A.; FORSBERG, R. A. Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*. **Euphytica**, v. 83, n. 2, p. 103-108, 1995.
- LUNA-CAVAZOS, M.; GARCÍA-MOYA, E. Morphological and pollen differentiation in *Solanum cardiophyllum* and *S. cardiophyllum* ssp. *Ehrenbergii*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, n. 5, p. 415-426, 2002.
- LUNAU, K. The ecology and evolution of visual pollen signals. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, n. 1, p. 89-111, 2000.
- PIERRE, P. M. O. **Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. BR. (Verbenaceae)**. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PUNT, W.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. **Glossary of pollen and spore terminology**. 1994. Disponível em: <<http://www.bio.uu.nl/~palaeo/glossary/glosint.htm>>. Acesso em: 25 jun. 2007.
- RAJ, B. A contribution to the pollen morphology of Verbenaceae. **Review of Paleobotany and Palynology**, v. 39, n. 3, p. 343-422, 1983.
- ROULSTON, T. H.; CANE, J. H. Pollen nutritional content and digestibility for animals. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, n. 2, p. 187-209, 2000.
- SALIMENA, F. R. G. **Revisão taxonômica de *Lippia alba* L. sect. *Rhodolippia Schauer* (Verbenaceae)**. 2000. 208 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- SAMPSON, F. B. Variation and similarities in pollen features in some basal angiosperms, with some taxonomic implications. **Plant Systematics and Evolution**, v. 263, n.1, p. 59-75, 2007.

SARWAR, A. K. M. G.; ITO, T.; TAKAHASHI, H. Pollen of *Cerastotema* (Ericaceae, Vaccinieae): tetrads without septa. **Journal of Plant Research**, v. 119, n. 7, p. 685-688, 2006.

SCHOLS, P.; FURNESS, C. A.; WILKIN, P.; HUYSMANS, S.; SMETS, E. Morphology of pollen and orbicules in some *Dioscorea* species and its systematic implications. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 136, n. 3, p. 295-311, 2001.

SILVA, P. S. **Verbenaceae da Serra do Cipó**: aspectos biosistemáticos, químicos e farmacológico. 2008. 206 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

SIMPSON, D. A.; FURNESS, C. A.; HODKINSON, T. R.; MUASYA, A. M.; CHASE, M. W. Phylogenetic relationships in Cyperaceae subfamily Mapanioideae inferred from pollen and plastid DNA sequence data. **American Journal of Botany**, v. 90, n. 7, p. 1071-1086, 2003.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Bristol: J. W. Arrowsmith, 1971. 216 p.

STROO, A. Pollen morphological evolution in bat pollinated plants. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, n. 3, p. 225-242, 2000.

VICCINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; COSTA, D. C. S.; ROMANEL, E. C.; SOUSA, S. M.; PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 4, p. 171-179, 2005.

WU, D.; WANG, H.; LI, D.; BLACKMORE, S. Pollen morphology of *Parnassia* L. (Parnassiaceae) and its systematic implications. **Journal of Integrative Plant Biology Formerly Acta Botanica Sinica**, v. 47, n. 1, p. 2-12, 2005.

YING, T. S.; WENGE, L.; HONG, Y. Z.; JIE, Z. S.; NAN, H.; WU, M. S.; MING, W. J. Studies on watermelon ploidy revertant. **Acta Horticulturae Sinica**, v. 33, n. 3, p. 632-634, 2006.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE SEIS ESPÉCIES DE *Lippia* L. (Verbenaceae)

1 RESUMO

SOUSA, Saulo Marçal de. Caracterização cromossômica de seis espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae). In: **Contribuições à biosistemática do Gênero *Lippia* (Verbenaceae)**. 2008. cap. 3, 131 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.⁵

O presente estudo foi realizado com o objetivo de realizar a caracterização cromossômica de seis espécies brasileiras do gênero *Lippia*. As seguintes espécies foram coletadas em campos rupestres do estado de Minas Gerais, uma das regiões brasileiras que possuem o maior número de espécies do gênero: *L. hermanioides*, *L. lupulina*, *L. pohliana*, *L. pseudothea*, *L. rubella* e *L. sidoides*. Para isso, foram realizadas medidas morfométricas dos cromossomos, assim como a obtenção do padrão de bandeamentos com fluorocromo DAPI e CMA₃, para todas as espécies. Observou-se relação positiva entre o número cromossômico e o grau de assimetria e de heterogeneidade dos cromossomos, assim como entre a assimetria e o grau de heterogeneidade dos cromossomos. Todas as espécies apresentaram grandes regiões de heterocromatina constitutiva positivas para o DAPI nas regiões centroméricas e positivas para o CMA₃ nas regiões organizadoras de nucléolo.

⁵ Comitê de Orientação: Giovana Augusta Torres-UFLA (Orientadora), Lyderson Facio Viccini-UFJF.

2 ABSTRACT

SOUSA, Saulo Marçal de. Chromosomal characterization of six species of the genus *Lippia* (Verbenaceae). In: **Contributions to the biosystematics of the genus *Lippia* (Verbenaceae)**. 2008. chap. 3, 131 p. Thesis (Doctor's Degree in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, MG.⁶

The aim of this work was to characterize the chromosomes of six Brazilian species of *Lippia* (Verbenaceae). The species were collected at “campos rupestres” of Minas Gerais State, one of the richest regions of *Lippia* species in Brazil. The species studied were: *L. hermanioides*, *L. lupulina*, *L. pohliana*, *L. pseudothea*, *L. rubella* e *L. sidoides*. Morphometric data and fluorochrome chromosome banding pattern (DAPI and CMA₃) were obtained for each species. The species showed a positive correlation among the ploidy level and the asymmetry index and the chromosome heterogeneity index. Similar results were observed among asymmetry index and chromosome heterogeneity index. All species showed DAPI positive heterochromatin in the centromeric region and CMA₃ positive in the nucleolar organizer regions.

⁶ Guidance Committee: Giovana Augusta Torres (Major Professor), Lyderson Facio Viccini-UFJF.

3 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos mais importantes centros de diversidade do gênero *Lippia* (Verbenaceae) com, aproximadamente, 75% das cerca de 160 a 200 espécies conhecidas, concentrando inúmeras espécies endêmicas que crescem, principalmente, em meio a rochas de campos rupestres (Salimena, 2000; Viccini et al., 2005).

A cariólogia do gênero é muito pouco estudada, havendo pequeno número de estudos citogenéticos relacionados com a determinação do número cromossômico por meio de células meióticas (Bose & Choudhury, 1960; Smith, 1966; Navaneethan, 1982; Coleman, 1982; Filipa, 1984; Kumar & Dutt, 1989; Brandão et al., 2005; Viccini et al., 2005).

O número cromossômico haplóide descrito para o gênero, até o momento, varia de $n = 10$ em *L. rubella* (Viccini et al., 2005) a $n = 30$ em um citótipo de *L. alba* (Pierre, 2008) e nas espécies *L. turbinata* e *L. fissicalyx* (Pastoriza & Andrada, 2006), sendo $x = 5$ o número básico proposto por Sanders (2001). Entretanto, outros números básicos, como $x = 6$, $x = 7$, $x = 8$ e $x = 9$, oriundos de disploidia são também hipotetizados por outros autores (Viccini et al., 2005; Brandão et al., 2007).

A relevância de estudos citogenéticos para o conhecimento dos grupos vegetais tem sido, desde muito cedo, reconhecida por vários autores e o acúmulo de informações desta natureza tem possibilitado inúmeras inferências evolutivas, filogenéticas e taxonômicas em vários gêneros e famílias de plantas. Para isso, um grande número de técnicas tem sido utilizado, permitindo a obtenção das mais variadas informações (Stebbins, 1971; Sumner, 2003; Pellicer et al., 2007).

Alguns estudos utilizando cromossomos somáticos têm sido realizados em algumas espécies do gênero em questão, como em *L. turbinata* e em *L.*

fissicalyx (Pastoriza & Andrada, 2006) e em *Lippia alba* (Brandão, 2003; Pierre, 2004; Sousa, 2006; Brandão et al., 2007; Pierre, 2008).

Mais recentemente, técnicas de bandeamento cromossômico e hibridização *in situ* também vêm sendo aplicadas em *L. alba*, sendo esta a única espécie do gênero que possui a cariomorfologia bem estudada (Sousa, 2006; Brandão et al., 2007; Pierre, 2008).

Estudos com bandeamento C em *L. alba* (Sousa, 2006; Brandão et al., 2007; Pierre, 2008) têm mostrado que esta espécie apresenta grande quantidade de heterocromatina constitutiva, estando distribuída, principalmente, nas regiões centroméricas e pericentroméricas. Bandeamentos com fluorocromos também têm sido realizados nesta espécie e os resultados indicam que grande parte da heterocromatina constitutiva de *L. alba* é rica em bases nitrogenadas do tipo AT, uma vez que muitas marcas DAPI⁺ foram observadas. Por outro lado, com o fluorocromo CMA₃, poucas bandas podem ser observadas, sendo a maioria delas coincidentes com as constrições secundárias, tanto nos citótipos diplóides (2n = 30), como mostrado por Sousa (2006), quanto no citótipo poliplóide (2n = 60), observado por Pierre (2008).

Os relatos encontrados na literatura ainda são escassos para o grande número de espécies que compõem o gênero. Sendo assim, a ampliação de estudos cariológicos em outras espécies do gênero *Lippia* é de fundamental importância para uma maior compreensão dos padrões cromossômicos e heterocromáticos deste gênero. Tais informações são importantes não somente para entender padrões evolutivos como também podem auxiliar na taxonomia do grupo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

L. hermanioides, *L. lupulina*, *L. pohliana*, *L. pseudothea*, *L. rubella* e *L. sidoides* foram coletadas no banco de germoplasma da Universidade Federal de Juiz de Fora. Na Tabela 1 encontram-se os números de registros no herbário CESJ da mesma Universidade, assim como o local de origem de cada uma delas.

TABELA 1. Número de registro e local de origem das seis espécies de *Lippia*.

Espécies	Local de origem	Número de registro
<i>Lippia hermanioides</i> Cham.	Serra do Cipó, MG	34.739
<i>Lippia lupulina</i> Cham.	Diamantina, MG	34.742
<i>Lippia pohliana</i> Schauer	Diamantina, MG	39.360
<i>Lippia pseudothea</i> (St. Hil) Schauer	Diamantina, MG	34.340
<i>Lippia rubella</i> Moldenke	Diamantina, MG	42.706
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Serra do Cipó, MG	34.737

4.2 Preparações cromossômicas

Meristemas radiculares obtidos de sementes e estacas, assim como meristemas apicais de ramos aéreos foram pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína

(2mM) por períodos que variaram de 6-14 horas (Tabela 2), a 4°C e, posteriormente, fixados em metanol: ácido acético (3:1), por, no mínimo, 24 horas antes da preparação das lâminas. Subsequentemente, os meristemas radiculares foram macerados em uma solução enzimática {4% celulase (Sigma) mais 40% de pectinase (Sigma) diluída em tampão citrato-fosfato pH 4,8}, a 37°C, por 4 horas. As lâminas foram preparadas posteriormente por dissociação celular, como descrito por Carvalho & Saraiva (1993, 1997) e coradas com Giemsa 10%.

TABELA 2. Tipos de meristemas utilizados e tempo de bloqueio mitótico para seis espécies de *Lippia*. MR = meristemas radiculares; MRE = meristemas radiculares de raízes obtidas em estacas; MRA = meristemas apicais de ramos aéreos.

Espécies	Tempo (horas)	MR	MRE	MRA
<i>Lippia hermanioides</i> Cham.	6	X	x	
<i>Lippia lupulina</i> Cham.	8; 14	X		X
<i>Lippia pohliana</i> Schauer	13:30			X
<i>Lippia pseudothea</i> (St. Hil) Schauer	6	X	x	
<i>Lippia rubella</i> Moldenke	12	X	x	
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	8:30		x	

4.3 Bandeamentos cromossômicos

Para quantificar e caracterizar a heterocromatina utilizou-se o bandejamento com fluorocromo, segundo a metodologia descrita por Schweizer

(1976). Lâminas envelhecidas por, no mínimo, três dias foram coradas sequencialmente com 0,5 mg/mL de cromomicina A₃ (CMA), por 90 minutos e, em seguida, com 2µg/ml de diamidino-2-fenilindol (DAPI), por 30 minutos e montadas, em seguida, em uma proporção de 1:1 de tampão McIlvaine's pH 7,0 e glicerol. Após este tratamento, as lâminas foram envelhecidas por mais três dias em geladeira e observadas em microscópio de fluorescência Olympus BX 51, utilizando os filtros com comprimentos apropriados para o DAPI (UMWU2) e CMA₃ (UMWB2).

4.4 Análise cariotípica

Para a análise cariotípica das seis espécies, no mínimo sete metáfases foram analisadas, tanto para a obtenção do padrão heterocromático como para a análise morfológica dos cromossomos.

Para a análise morfométrica dos cromossomos foram obtidos os comprimentos do braço curto (*si*) e do braço longo (*li*) de cada cromossomo (*i*), e calculados o comprimento total de cada cromossomo ($t = li + si$) e a razão de braços ($r = li / si$). Para a classificação dos cromossomos utilizou-se a nomenclatura padrão descrita por Levan et al. (1964), obedecendo à seguinte regra: cromossomos metacêntricos -m- ($r = 1,01-1,69$); cromossomos submetacêntricos -sm- ($r = 1,70-3,00$); cromossomos subtelocêntricos -st- ($r = 3,01-7,00$) e cromossomos telocêntricos -t- ($r = 7,01-8,00$). Além destas estimativas, foi calculado também o Número Fundamental (NF) de cada espécie, segundo Schubert & Rieger (1985). Para a descrição da assimetria cariotípica, foram calculados o grau de assimetria de cada cromossomo (*Ai*) e o grau de assimetria do cariótipo (*A*), segundo a expressão proposta por Watanabe et al. (1999), sendo *n* o número cromossômico haplóide com o *A* variando de 0 (completamente simétrico) a 1 (completamente assimétrico):

$$Ai = (li - si) / (li + si) \text{ e } A = (1 / n) \sum Ai$$

Para obter o valor das medidas anteriormente citadas, foi utilizado o programa de análise de imagens Pro-Plus (Media Cybernetics). Para a representação de todas as características observadas, foram montados idiogramas em ordem decrescente do tamanho do braço curto de cada cromossomo do complemento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 estão listados os dados morfométricos dos cromossomos das seis espécies de *Lippia* estudadas. *L. rubella* foi a espécie que apresentou o menor comprimento total do lote haplóide (48,52 μm), assim como é também a espécie com o menor número cromossômico e com o menor tamanho médio de cromossomos (1,82 μm). Em contrapartida, *L. hermanioides* foi a espécie que apresentou o maior tamanho do complemento haplóide (68,61 μm), sendo *L. pohliana* aquela que apresentou a maior média para tamanho de cromossomos (2,81 μm).

Por meio destes dados, observa-se que as seis espécies apresentam cromossomos relativamente pequenos e que isso parece ser uma característica do grupo, uma vez que cromossomos de tamanho similar foram também observados em três citótipos de *L. alba* (Pierre, 2004; Sousa, 2006). Todas as espécies apresentam cromossomos biarmados, variando de metacêntricos a submetacêntricos, tendo, portanto, todas as espécies, o número fundamental (NF) igual ao número cromossômico (Tabela 3, Painéis A e D das Figuras 1,2,3, 4, 5 e 6)

TABELA 3. Parâmetros cariotípicos de *L. rubella*, *L. lupulina*, *L. sidoides*, *L. pohliana*, *L. hermanioides* e *L. pseudothea*. TCL = comprimento total do lote haplóide dos cromossomos; ACL = média do tamanho cromossômico; LCL = cromossomo mais longo; SCL = cromossomo mais curto; A = grau de assimetria; Ai = grau de heterogeneidade; NF = número fundamental; KF = fórmula cariotípica.

Specie	2n	TCL	ACL	LCL	SCL	A	Ai	NF	KF
		(μm)	(μm)	(μm)	(μm)				
<i>L. rubella</i>	20	48,52	1,82	2,85	1,01	0,59	4,56	20	7m + 3sm
<i>L. lupulina</i>	28	54,2	2,31	3,26	1,25	0,77	5,32	28	7m + 7sm
<i>L. sidoides</i>	24	52,3	2,45	3,56	1,43	0,52	4,31	24	4 m + 8sm
<i>L. pohliana</i>	24	61,35	2,81	3,86	1,59	0,44	3,38	24	8m + 4 sm
<i>L. hermanioides</i>	26	68,61	2,75	3,84	1,23	0,58	4,32	26	5m + 8sm
<i>L. pseudothea</i>	26	65,34	2,46	3,92	1,35	0,61	5,01	26	6m + 7 sm

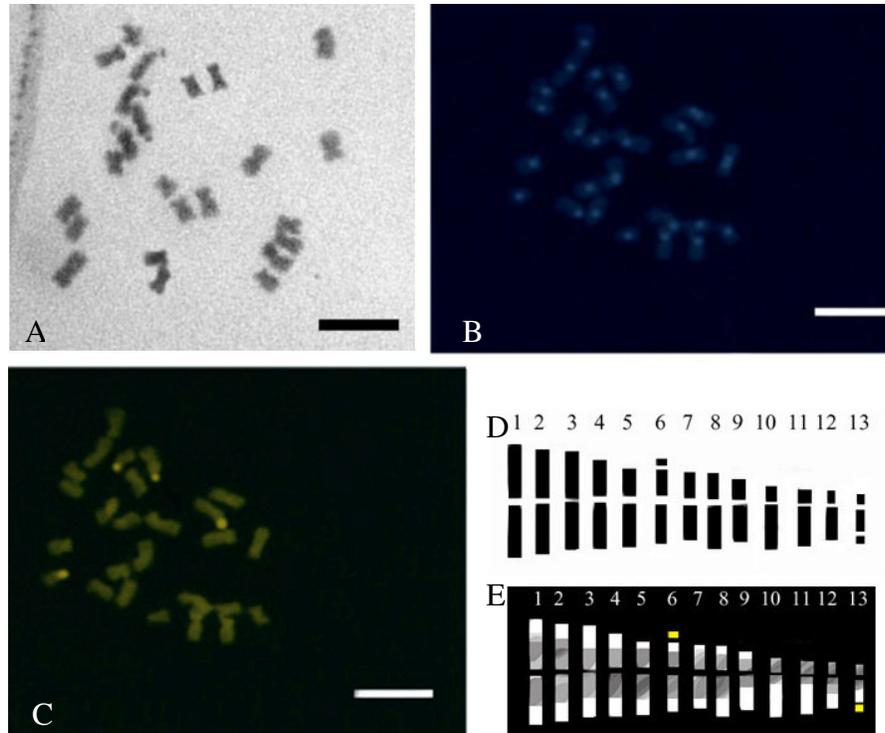


FIGURA 1. *Lippia hermanioides*. Coloração com Giemsa (A), bandeamento com DAPI (B), bandeamento com CMA₃ (C), idiograma representando a coloração com Giemsa (D), idiograma representando os bandeamentos com fluorocromos - em cinza regiões coradas com DAPI, em amarelo, regiões coradas com CMA₃ (E). Barra = 5 μm.

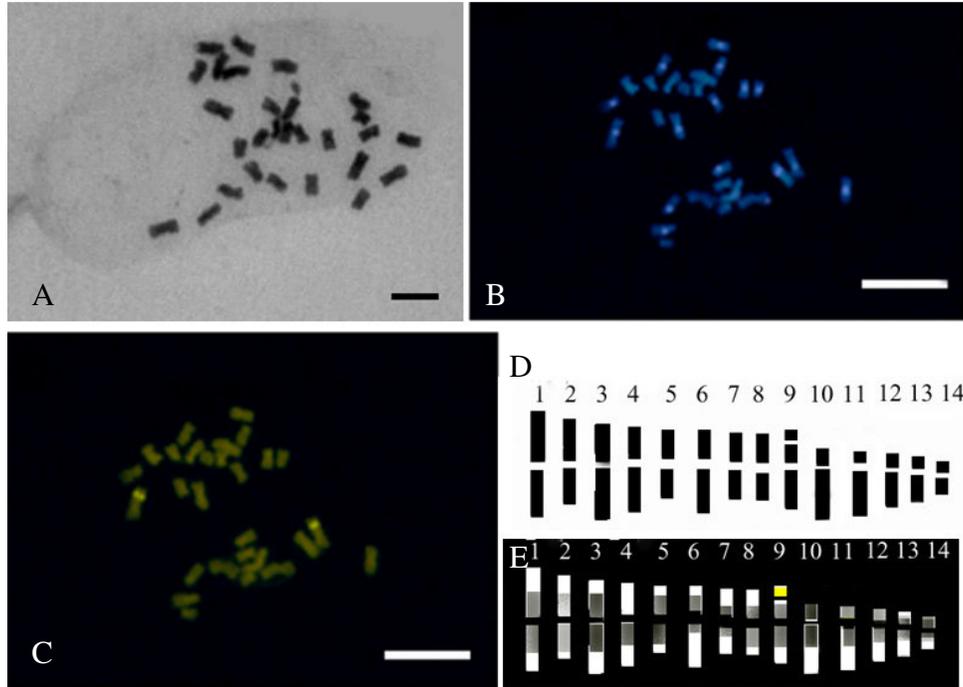


FIGURA 2. *Lippia lupulina*. Coloração com Giemsa (A), bandeamento com DAPI (B), bandeamento com CMA₃ (C), idiograma representando a coloração com Giemsa (D), idiograma representando os bandeamentos com fluorocromos - em cinza regiões coradas com DAPI, em amarelo, regiões coradas com CMA₃ (E). Barra = 5 µm.

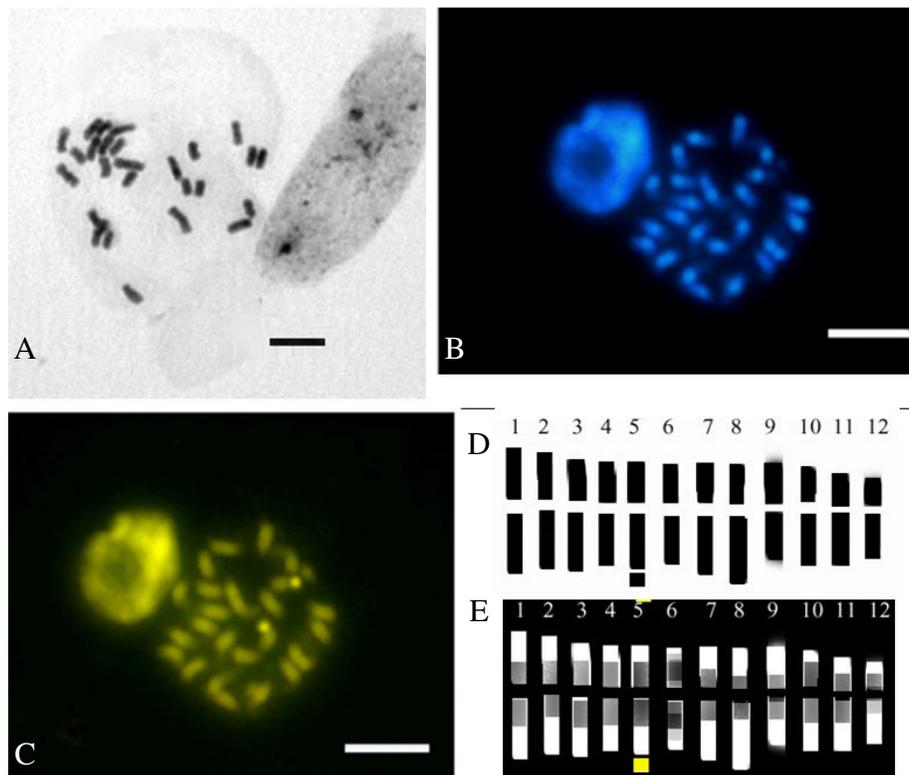


FIGURA 3. *Lippia pohliana*. Coloração com Giemsa (A), bandeamento com DAPI (B), bandeamento com CMA₃ (C), idiograma representando a coloração com Giemsa (D), idiograma representando os bandeamentos com fluorocromos - em cinza regiões coradas com DAPI, em amarelo, regiões coradas com CMA₃ (E). Barra = 5 μm.

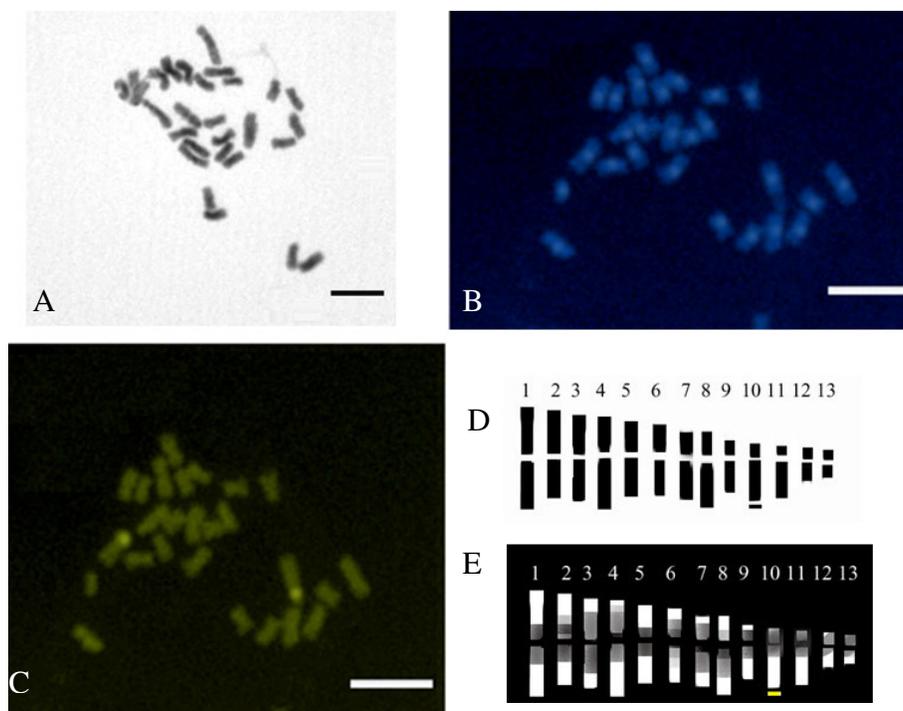


FIGURA 4. *Lippia pseudothea*. Coloração com Giemsa (A), bandeamento com DAPI (B), bandeamento com CMA₃ (C), idiograma representando a coloração com Giemsa (D), idiograma representando os bandeamentos com fluorocromos - em cinza regiões coradas com DAPI, em amarelo, regiões coradas com CMA₃ (E). Barra = 5 μ m.

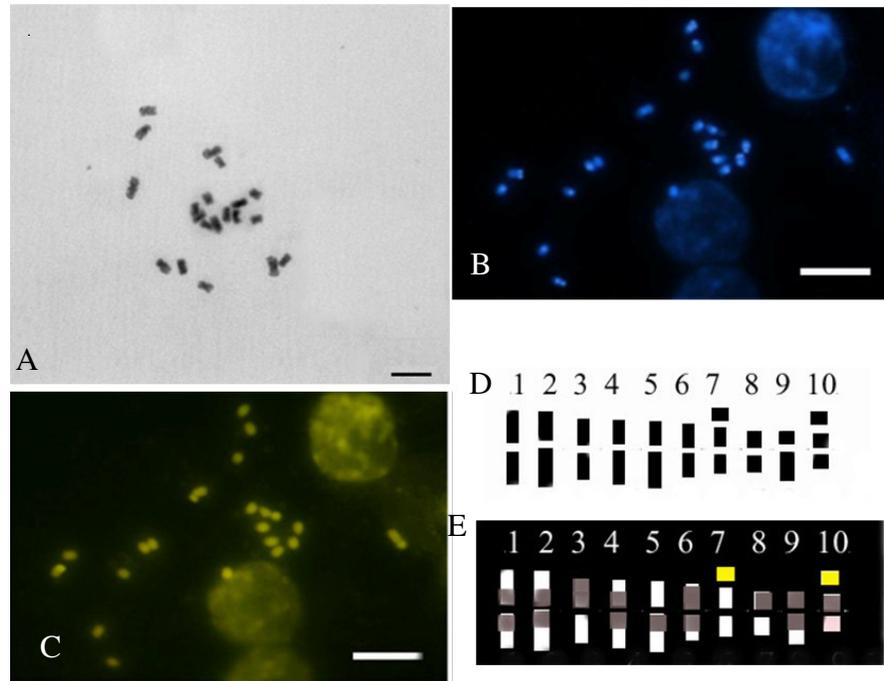


FIGURA 5. *Lippia rubella*. Coloração com Giemsa (A), bandeamento com DAPI (B), bandeamento com CMA₃ (C), idiograma representando a coloração com Giemsa (D), idiograma representando os bandeamentos com fluorocromos - em cinza regiões coradas com DAPI, em amarelo, regiões coradas com CMA₃ (E). Barra = 5 μm.

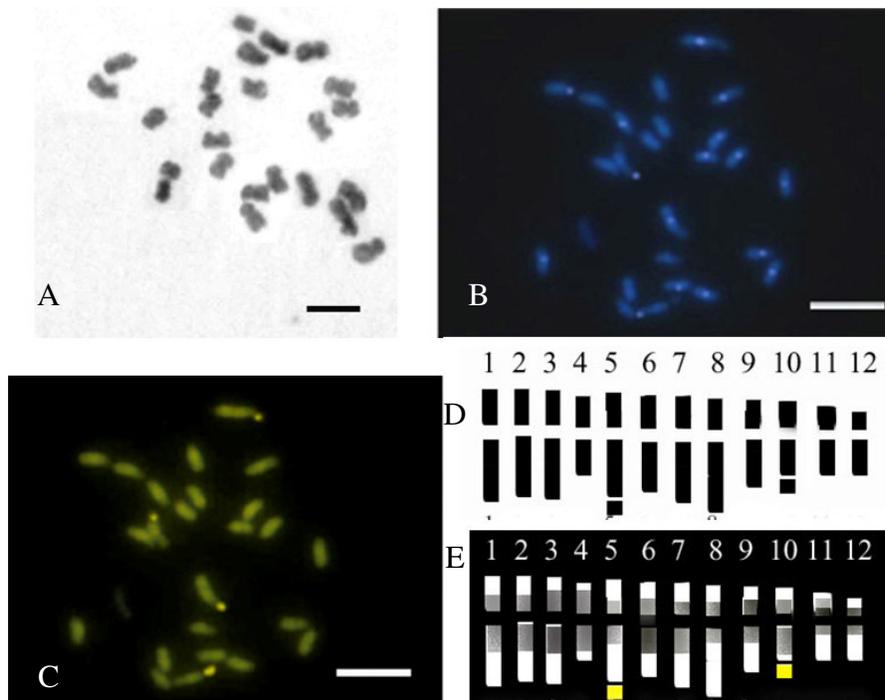


FIGURA 6. *Lippia sidoides*. Coloração com Giemsa (A), bandeamento com DAPI (B), bandeamento com CMA₃ (C), idiograma representando a coloração com Giemsa (D), idiograma representando os bandeamentos com fluorocromos - em cinza regiões coradas com DAPI, em amarelo, regiões coradas com CMA₃ (E). Barra = 5 μm.

Com relação à assimetria dos cariótipos das seis espécies de *Lippia*, nota-se que *L. lupulina* é a mais assimétrica com um índice de assimetria de 0,77 e a mais simétrica é *L. pohliana* com um índice de 0,44 (Tabela 3, Paineis D das Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6). Além disso, em conformidade a esta observação, foi possível constatar que o grau de assimetria das espécies está positivamente correlacionado com o grau de heterogeneidade dos cromossomos. O coeficiente de correlação entre os dois índices foi $r = 0,76$, mostrando que, com o aumento da heterogeneidade entre os cromossomos, ocorre aumento da assimetria cromossômica (Figura 7).

Vários autores têm relatado o mesmo comportamento para vários outros grupos de plantas, constatando, ainda, que, na maioria dos casos, existe um aumento da assimetria dos cariótipos e do grau de heterogeneidade dos cromossomos com o aumento da ploidia das espécies (Liu et al., 2006; Sahin et al., 2006; Selvi et al., 2006). Nas espécies aqui estudadas também foi observado aumento da assimetria e da heterogeneidade com o aumento da ploidia, havendo uma positiva ($r = 0,51$) para o grau de assimetria e para o grau de heterogeneidade ($r = 0,41$) em relação ao aumento do número cromossômico (Tabela 4, Figuras 8 e 9).

Stebbins (1971) sugere que cariótipos assimétricos são mais derivados que cariótipos simétricos. Sendo assim, o parâmetro *A* é um parâmetro importante para a estimativa de relações evolutivas entre subgêneros, ou entre seções de gêneros em plantas. Entretanto, tais inferências devem ser, preferencialmente, realizadas com um número grande de espécies.

Em *L. rubella* foi possível a identificação de duas constrições secundárias, assim como em *L. sidoides* e *L. hermanioides*. As outras espécies apresentaram apenas um par de constrição secundária (Painéis D e E das Figuras 1,2,3, 4, 5 e 6). Nota-se que, em *L. rubella* e *L. lupulina*, estas estruturas se encontram nos braços curtos dos cromossomos, enquanto nas outras quatro

espécies elas se encontram em braços longos, exceto em *L. hermanioides*, na qual em um par dessas estruturas foi observado no braço curto do cromossomo 6 e outra no braço longo do cromossomo 13.

Com os bandeamentos com fluorocromos foi possível observar, em concordância com trabalhos anteriores realizados em *L. alba* por Sousa (2006), Brandão et al. (2007) e Pierre (2008), que, no gênero *Lippia*, existe um padrão de distribuição da heterocromatina ao redor do centrômero e em alguns telômeros de alguns cromossomos, havendo uma concentração maior de heterocromatina no centrômero (Painéis B, C e E das Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6). Além disso, em todas as espécies, essas regiões mostraram-se positivas para o DAPI (Painéis B e E das Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6), indicando uma riqueza em bases nitrogenadas do tipo AT nestas regiões, como descrito anteriormente também em *L. alba*, por Sousa (2006) e Pierre (2008).

Com relação às marcas obtidas com o fluorocromo CMA, foi possível observar que este corante tem afinidade por heterocromatina associada às regiões organizadoras de nucléolo (RONs) localizadas nas constrições secundárias das seis espécies estudadas (Painéis C e E das Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6), como já havia sido descrito em *L. alba* por Sousa (2006) e Pierre (2008). Várias espécies de plantas de outros grupos vegetais também apresentam este comportamento, como descrito em *Citrus* por Miranda et al. (1997), em *Clívia* por Ran et al. (1999), em *Pinus* por Hizume et al. (2001).

A extensão destes estudos a outras espécies do gênero é de fundamental importância para a confirmação dos padrões observados.

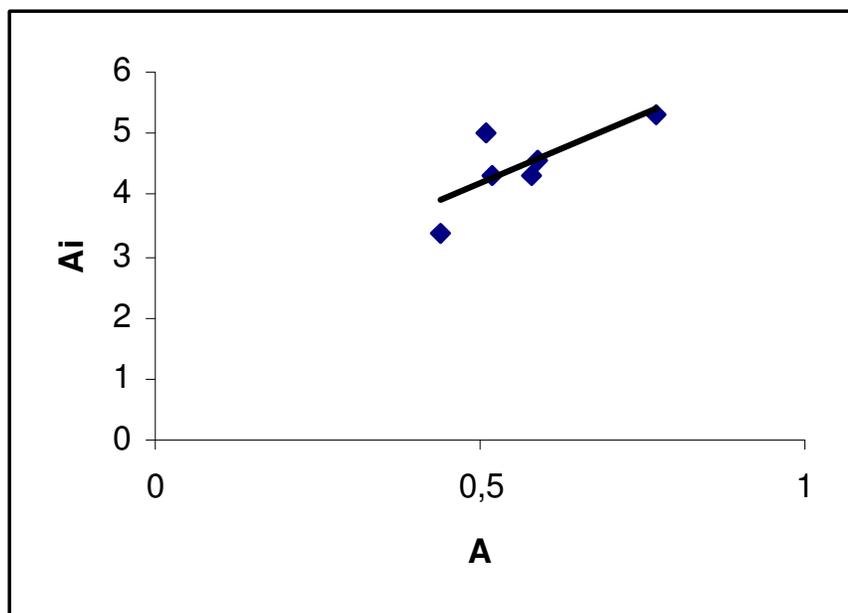


FIGURA 7. Correlação entre o grau de assimetria (A) e o grau de heterogeneidade dos cromossomos (A_i) de seis espécies de *Lippia*

TABELA 4. Correlação entre o grau de assimetria do cariótipo (A) e o grau de heterogeneidade dos cromossomos (A_i) com o número cromossômico das espécies estudadas.

Espécies	A	A_i	Número cromossômico
<i>Lippia rubella</i> Moldenke.	0,59	4,56	$2n = 20$ (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia pohliana</i> Schauer	0,44	3,38	$2n = 24$ (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	0,52	4,31	$2n = 24$ (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia pseudothea</i> (St. Hil) Schauer	0,58	4,32	$2n = 26$ (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia hermanioides</i> Cham	0,61	5,01	$2n = 26$ (Viccini et al., 2005)
<i>Lippia lupulina</i> Cham.	0,77	5,32	$2n = 28$ (Viccini et al., 2005)

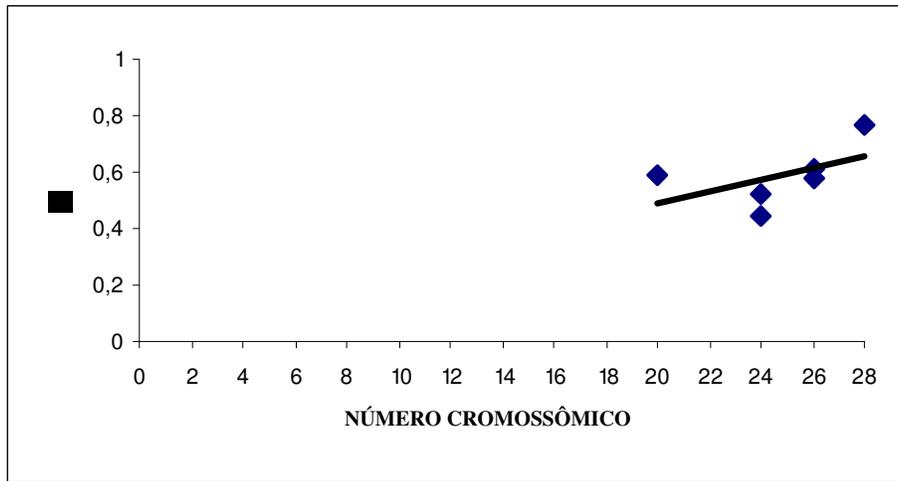


FIGURA 8. Correlação entre o número cromossômico e o grau de assimetria de seis espécies de *Lippia* ($r = 0,51$).

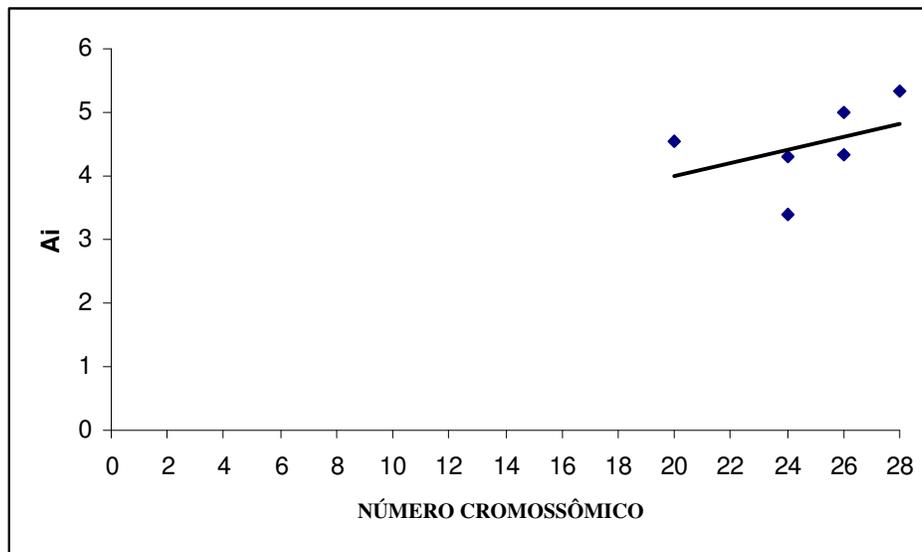


FIGURA 9. Correlação entre o número cromossômico e o grau de heterogeneidade entre os cromossomos de seis espécies de *Lippia* ($r = 0,41$).

6 CONCLUSÕES

- Existe variação para o grau de assimetria do cariótipo e para o grau de heterogeneidade dos cromossomos, entre as seis espécies de *Lippia* estudadas e estas duas características estão positivamente correlacionadas entre si.
- A variação no número cromossômico das seis espécies de *Lippia* estudadas está direta e positivamente correlacionada tanto com o grau de assimetria do cariótipo, como com o grau de heterogeneidade dos cromossomos.
- As espécies do gênero *Lippia* têm grande quantidade de heterocromatina constitutiva pericentromérica rica em bases AT (positivas para DAPI).
- As regiões organizadoras de nucléolo em *Lippia* são constituídas por heterocromatina rica em bases GC (alta afinidade por CMA₃), sendo as únicas regiões do genoma dessas espécies com essa característica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOSE, R. B.; CHOUDHURY, J. K. Cytological studies in *L. alba* (Mill) N. E. Br. Bull. **Botanical Society of Bengal**, v. 14, n. 1, p. 71-72, 1960.
- BRANDÃO, A. D. **Citogenética comparativa dos gêneros *Lippia*, *Lantana* e *Aloysia* (Lamiales)**. 2003. 101 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- BRANDÃO, A. D.; VICCINI, L. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Meiotic analysis of two putative polyploidy specie of Verbenaceae from Brazil. **Caryologia**, v. 4, n. 3, p. 315-319, 2005.
- BRANDÃO, A.D.; VICCINI, L.F.; SALIMENA, F.R.G.; VANZELA, A.L.;RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **Journal of Plant Research**, v. 120, p. 317-321, 2007.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. **Heredity**, v. 70, n. 4, p. 515-519, 1993.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. **Journal of Plant Research**, v. 110, n. 5, p. 417-420, 1997.
- COLEMAN, J. R. Chromosome numbers of angiosperms collected in the state of São Paulo. **Revista Brasileira de Genética**, v. 3, n. 4, p. 533-549, 1982.
- FILIPPA, E. M. El número cromossomico de *L. turbinata* (Verbenaceae). **Kurtziana**, v. 17, n. 1, p. 169-170, 1984.
- KUMAR, P.; DUTT, B. Cytogenetic basis of breeding system in some verbenaceous species. **Cytologia**, v. 54, n. 4, p. 347-353, 1989.
- LEVAN, A.; FREDGA, A.; SANDERBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position in chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 3, p. 201-220, 1964.

LIU, H.; YAN, G.; SHAN, F.; SEDGLEY, R. Karyotypes in *Leucadendron* (Proteaceae): evidence of the primitiveness of the genus. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 151, n. 4, p. 387-394, 2006.

MIRANDA, S. C.; BATISTA, M. A.; DECARVALHO, P. S.; SANTOS, M.L. Levantamento florístico em áreas de campo e cerrado rupestre no Parque Estadual da Serra dos Pireneus, Goiás. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 55., 1997, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Botânica, 1997.

NAVANEETHAN, N. Karyomorphological studies in two species of *Cryptolepis* R. Br. Proc. **Indian Science Congress Association**, v. 69, n. 3, p. 231-232, 1982.

PASTORIZA, A. V.; ANDRADA, A. B. Cytogenetics in *Lippia* species (Verbenaceae) from northwest Argentina. **BAG – Journal of Basic and Applied Genetics**, v. 17, n. 2, p. 25-32, 2006.

PELLICER, J.; GARCIA, S.; GARNATJE, T.; HIDALGO, O.; KOROBKOV, A. A.; DARIIMAA, S.; VALLÈS, J. Chromosome counts in Asian *Artemisia* L. (Asteraceae) species: from diploids to the first report of the highest polyploid in the genus. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 153, n. 3, p. 301-310, 2007.

PIERRE, P. M. O. **Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br (Verbenaceae)**. 2004. 80 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PIERRE, P. M. O. **Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. BR. (Verbenaceae)**. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SAHIN, A.; KIRAN, Y.; ARABACI, T.; TURKOGLU, I. Karyological notes on eight species of *Achillea* L. (Asteraceae, Santonilinoideae) from Turkey. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 151, n. 6, p. 573-580, 2006.

SALIMENA, F. R. G. **Revisão taxonômica de *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae)**. 2000. 208 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. **Harvard Paper in Botany**, v. 5, n. 3, p. 303-358, 2001.

SCHUBERT, I.; RIEGER, R. A new mechanism for altering chromosome number during karyotype evolution. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 70, n. 2, p. 213-221, 1985.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, v. 58, n. 3, p. 307-324, 1976.

SELVI, F.; COPPI, A.; BIGAZZI, M. Karyotype variation, evolution and phylogeny in *Borago* (Boraginaceae), with emphasis on Subgenus *Buglossites* in the Corso-Sardinian System. **Annals of Botany**, v. 98, n. 9, p. 857-868, 2006.

SMITH, E. B. Cytogenetics and phylogeny of *Haplopappus* section *Isopappus* (Compositae). **Canadian Journal of Genetic and Cytology**, v. 8, n. 1, p. 14-36, 1966.

SOUSA, S. M. **Bandeamento cromossômico em *Lippia alba***. 2006.65p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: Edward Arnold, 1971. 216 p.

SUMNER, A. **Chromosomes: organization and function**. North Berwick, United Kingdom: Blackwell Publishing, 2003. 287 p.

VICCINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; COSTA, D. C. S.; ROMANEL, E. C.; SOUSA, S. M.; PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1, p. 1-4, 2005.

WATANABE, K.; YAHARA, T.; DENDA, T.; KONSUGE, K. Chromosomal evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. **Journal of Plant Research**, v. 112, n. 2, p. 145-161, 1999.

CAPÍTULO 4

Citogenética, palinologia, anatomia foliar e quantidade de DNA nuclear em *Lippia lacunosa* e *Lippia rotundifolia* (Verbenaceae), duas espécies de difícil delimitação taxonômica

1 RESUMO

SOUSA, Saulo Marçal de. Citogenética, palinologia, anatomia foliar e quantidade de DNA nuclear em *Lippia lacunosa* e *Lippia rotundifolia* (Verbenaceae), duas espécies de difícil delimitação taxonômica. In: **Contribuições à biosistemática do gênero *Lippia* L. (Verbenaceae)**. 2008. cap. 4, 131 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.⁷

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de obter e de comparar caracteres citogenéticos, palinológicos, anatômicos e ultra-estruturais do limbo foliar de *Lippia lacunosa* e *Lippia rotundifolia* (Verbenaceae), duas espécies de difícil delimitação taxonômica. Adicionalmente, compararam-se o tamanho do genoma, estimado por citometria de fluxo e o comportamento reprodutivo destas espécies. As espécies apresentaram características cromossômicas muito semelhantes, mas com pequenas diferenças em relação ao tamanho, à classificação cromossômica, ao padrão de bandeamentos e à qualidade e à quantidade de heterocromatina. As espécies apresentaram também diferentes quantidades de DNA e morfologia polínica diferencial, possuindo *L. lacunosa* uma exina psilada e *L. rotundifolia* uma exina perfurada. Os dados anatômicos mostraram que as duas espécies apresentam as mesmas adaptações no limbo foliar, apropriadas para o ambiente em que vivem. As informações obtidas são suficientes para que as duas espécies sejam diferenciadas entre si.

⁷ Comitê de Orientação: Giovana Augusta Torres- UFLA (Orientadora), Lyderson facio Viccini- UFJF.

2 ABSTRACT

SOUSA, Saulo Marçal de. Cytogenetics, palinology, leaf anatomy and nuclear DNA content in *L. lacunosa* and *L. rotundifolia* (Verbenaceae), two species of difficult taxonomic delimitation. In: **Contributions to the biosystematics of the genus *Lippia* L. (Verbenaceae)**. 2008. chap. 4, 131 p. Thesis (Doctor's degree in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.⁸

In the present work cytogenetical, palinological, anatomical and ultra structural data of leaves were obtained and compared for *Lippia lacunosa* and *Lippia rotundifolia* (Verbenaceae), two species with difficult taxonomic delimitation. In addition genome size, estimated by flow cytometry, and reproductive behavior of these two species were evaluated. The species showed very similar chromosomal characters but with little difference in relation to the size, chromosome type, banding pattern, and quality and quantity of the heterochromatin. The species also showed difference in DNA content and in the palinological morphology. *L. lacunosa* have a psilate exine and *L. rotundifolia* a perforate one. The anatomic data showed that both species showed the same adaptations in the leaves, suitable for the environment where they live. The obtained data are sufficient to differentiate both species.

⁸ Guidance Committee: Giovana Augusta Torres-UFLA (Major Professor), Lyderson Facio Viccini- UFJF.

3 INTRODUÇÃO

O gênero *Lippia*, o segundo maior gênero da família Verbenaceae, inclui cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores que se encontram distribuídas pelos países da América Central, América do Sul e África (Judd et al., 2002; Sanders, 2001). Embora o gênero apresente inúmeras espécies com importantes aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, pouco se conhece sobre a biologia reprodutiva, ecologia, genética e botânica destas plantas (Pascual et al., 2001).

Taxonomicamente, o gênero apresenta grande número de espécies com problemas em sua delimitação, devido à ausência de bons caracteres taxonômicos. Sendo assim, várias sinonímias, homonímias e taxa infra-específicas são descritos para várias espécies, havendo, portanto, a necessidade de novas revisões para o gênero, com abordagens metodológicas mais apuradas que aquelas que vêm sendo utilizadas até o momento (Salimena & Romero, 1999; Salimena & Silva, 2002; Salimena, 2002; Viccini et al., 2005).

Lippia lacunosa e *Lippia rotundifolia* são duas espécies ocorrentes na Cadeia do Espinhaço, uma importante região de conservação biológica do estado de Minas Gerais, onde se encontram cerca de 70% a 75% das espécies conhecidas do gênero *Lippia* (Viccini et al., 2005). Estas duas espécies apresentam vários caracteres morfológicos similares, o mesmo hábito, uma filotaxia muito semelhante, folhas coreáceas e densa camada de tricomas nas folhas e flores (Salimena, 2002). A delimitação taxonômica das duas espécies tem sido difícil para os taxonomistas do grupo e, por esta razão, mais detalhes sobre a biologia e a morfologia das duas espécies são muito importantes para a definição taxonômica das mesmas.

Um estudo anterior indicou que o número cromossômico é o mesmo para *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*, $2n = 56$ (Viccini et al., 2005), aumentando ainda mais a similaridade entre as duas espécies. No entanto, estudos cromossômicos comparativos entre ambas utilizando cromossomos somáticos, assim como técnicas mais informativas como as de bandeamentos cromossômicos ainda não foram empregadas nestas duas espécies. Além disso, outras informações como quantidade de DNA nuclear; morfologia, tamanho, classificação e ultra-estrutura dos grãos de pólen, assim como descrições e comparações anatômicas, não existem na literatura para estas espécies e poderiam auxiliar de forma enriquecedora na definição taxonômica das mesmas.

Atualmente, várias abordagens metodológicas, utilizadas em conjunto, têm sido utilizadas para a delimitação, a classificação e os estudos dos padrões evolutivos em vários grupos vegetais (Judd et al., 2002). Dentre estas, destacam-se informações obtidas por meio da análise citogenética, da citometria de fluxo, da palinologia, da anatomia e da análise morfológica em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) (Garry et al., 1975; Stuessy, 1979; Judd et al., 2002).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de contribuir para a definição taxonômica das espécies *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*, utilizando informações citogenéticas, palinológicas, anatômicas, ultra-estruturais, assim como da quantidade de DNA nuclear dessas espécies. Além disso, procurou-se obter informações sobre a viabilidade reprodutiva, utilizando informações sobre os comportamentos meiótico e pós-meioótico das duas espécies.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Sementes, estacas, meristemas apicais de ramos aéreos, folhas e botões florais de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* foram obtidos no banco de germoplasma da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Os indivíduos foram originalmente coletados em Diamantina, MG e tombados no Herbário CESJ da Universidade Federal de Juiz de Fora (registro 42.706 para *L. lacunosa* e 34.338 para *L. rotundifolia*).

4.2 Preparações cromossômicas

Meristemas radiculares obtidos de sementes e estacas, assim como meristemas apicais de ramos aéreos, foram pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína (2mM). Na Tabela 1 estão listados os tempos de bloqueio e as temperaturas utilizadas para a obtenção dos cromossomos mitóticos, para cada um dos tecidos empregados.

TABELA 1. Tempo de bloqueio e temperatura para a obtenção de cromossomos mitóticos para diferentes tecidos de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*.

Tecido utilizado	Tempo (temperatura)	
	<i>L. lacunosa</i>	<i>L. rotundifolia</i>
Radícula	8 horas (4°C)	9 horas (4°C)
Raiz secundária	8 horas (4°C)	9 horas (4°C)
Meristemas apicais de ramos aéreos	9 horas (4°C)	14 horas (4°C)

Após a obtenção dos melhores tempos e temperaturas de bloqueio, os tecidos pré-tratados foram lavados em água corrente, secos em papel de filtro e fixados em metanol:ácido acético (3:1), por, no mínimo, 24 horas antes da preparação das lâminas. Subsequentemente, os meristemas radiculares foram macerados em uma solução enzimática {4% celulase (Sigma) mais 40% de pectinase (Sigma) diluída em tampão citrato-fosfato pH 4,8} a 37 °C, por 4 horas, sendo as lâminas preparadas posteriormente por dissociação celular, como descrito por Carvalho & Saraiva (1993, 1997).

Com relação aos meristemas apicais de ramos aéreos, foram preparadas suspensões celulares adaptando-se a técnica para a obtenção de suspensões celulares de anteras de flores de tamanho reduzido para a obtenção de meiócitos, como descrito por Viccini et al. (2005). Os meristemas foram digeridos em solução enzimática {4% celulase (Sigma) mais 40% de pectinase (Sigma) diluída em tampão citrato-fosfato pH 4,8} a 37°C, por 6 horas, e macerados, em solução fixadora 3:1 metanol-ácido acético, em microtubos adaptados contendo uma malha de poliéster de 60 µm de espessura. Após a maceração, o material obtido foi centrifugado por três vezes, a 2.500 rpm, por 4 minutos, descartando-se o sobrenadante e reintroduzindo-se novamente o fixador a cada centrifugação. Para a obtenção das lâminas, alíquotas das suspensões obtidas foram pingadas nas lâminas com o auxílio de pipetas de Pasteur. As lâminas foram secas ao ar e coradas em Giemsa 5%, por 5 minutos.

4.3 Bandeamentos cromossômicos

Para a observação da heterocromatina constitutiva, o procedimento adotado foi o de bandejamento C, descrito por Schwarzacher et al. (1980), com pequenas modificações. Lâminas envelhecidas por, no mínimo, três dias foram hidrolisadas em ácido acético 45% (60°C), por 12 minutos e, subsequentemente, imersas em Ba (OH)₂, a 28°C, por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram

incubadas em 2x SSC, a 60°C, por 80 minutos e coradas com solução de Giemsa 10%, por 30 minutos.

Os bandeamentos com fluorocromos foram realizados segundo Schweizer (1976). Nesta metodologia, lâminas envelhecidas por, no mínimo, três dias, foram coradas seqüencialmente com 0,5 mg/mL de cromomicina A₃ (CMA), por 90 minutos e, em seguida, com 2µg/ml de diamidino-2-fenilindol (DAPI), por 30 minutos e montadas, em seguida, em meio contendo tampão McIlvaine's pH 7,0 e glicerol na proporção 1:1. As lâminas foram envelhecidas por mais três dias em geladeira e observadas em microscópio de fluorescência Olympus BX 51, utilizando os filtros com comprimentos apropriados para o DAPI (UMWU2) e CMA (UMWB2).

Para a verificação da atividade nucleolar das regiões organizadoras de nucléolo, lâminas foram submetidas à técnica de coloração com nitrato de prata, como descrito por Howell & Black (1980).

4.4 Análise cariotípica

Para a análise cariotípica das duas espécies, no mínimo sete metáfases foram analisadas tanto para a obtenção do padrão heterocromático como para a descrição morfológica dos cromossomos. Para a análise morfométrica dos cromossomos, foram obtidos os comprimentos do braço curto (BC) e do braço longo (BL) de cada cromossomo (*i*), e calculados o comprimento total de cada cromossomo (CT), o tamanho relativo de cada cromossomo (TR%) e a razão de braços (RB). Para a classificação dos cromossomos, a nomenclatura padrão descrita por Levan et al. (1964) foi utilizada, obedecendo-se à seguinte regra: cromossomos metacêntricos -m- (RB = 1,01-1,69); cromossomos submetacêntricos -sm- (RB = 1,70-3,00); cromossomos subtelo-cêntricos -st- (RB = 3,01-7,00); cromossomos telocêntricos -t- (RB = 7,01-8,00). Além dessas estimativas, foi calculado também o número fundamental (NF) do cariótipo de

cada espécie, segundo Schubert & Rieger (1985) e para a descrição da assimetria cariotípica, o grau de assimetria de cada cromossomo (A_i) e o grau de assimetria do cariótipo (A), segundo a fórmula proposta por Watanabe et al. (1999), sendo n o número cromossômico haplóide com o A variando de 0 (completamente simétrico) a 1 (completamente assimétrico):

$$A_i = (BL - BC) / (BL + BC) \text{ e } A = (1 / n) \sum A_i$$

Para obter o valor das medidas anteriormente citadas, foi utilizado o programa de análise de imagens Image Pro-Plus (Media Cybernetics). Para a representação de todas as características observadas, foram montados idiogramas para as duas espécies, em ordem decrescente do tamanho do braço curto de cada cromossomo do complemento.

4.5 Comportamento meiótico e viabilidade do pólen e de sementes

4.5.1 Análise meiótica

Para a análise meiótica, anteras em diferentes estágios de amadurecimento para as duas espécies estudadas foram coletadas e fixadas em solução de metanol:ácido acético (3:1) por, no mínimo, 24 horas antes de as lâminas serem preparadas, segundo Viccini et al. (2005).

4.5.2 Viabilidade do grão de pólen

Para estudos pós-meióticos, com a finalidade de se obter o grau de fertilidade dos grãos de pólen das duas espécies, grãos de pólen de botões florais maduros foram corados com o corante de Alexander, segundo a técnica descrita por Alexander (1969, 1980) e examinados sob microscopia de luz. Polens

corados de roxo foram considerados férteis, enquanto aqueles corados de verde foram considerados estéreis.

Além da coloração com o corante de Alexander, a viabilidade polínica também foi investigada com a utilização do fluorocromo diacetato de fluoresceína (FDA), segundo metodologia descrita por Heslop-Harrison & Heslop-Harrison (1970). Para isso, grãos de pólen maduros foram corados, por 10 minutos, em uma gota de solução de sacarose a 50% contendo 0,5 mg/mL de FDA, em câmara úmida e observados sob microscopia de fluorescência. Polens que apresentaram fluorescência intensa foram considerados viáveis, enquanto aqueles que não fluoresceram foram considerados estéreis.

Adicionalmente às metodologias para análise da viabilidade citadas anteriormente, testes de germinação *in vitro* foram realizados, para as duas espécies. Para isso, grãos de pólen maduros foram coletados e transferidos imediatamente para um meio de germinação contendo sacarose em diferentes concentrações (1%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%), sendo mantidos em temperatura ambiente para a determinação da melhor concentração para a germinação dos grãos, como descrito por Bhattacharya & Mandal (2000).

4.5.3 Viabilidade de sementes

Para o teste de germinação das sementes de cada uma das espécies, 100 sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri com papel de germinação umedecido. O teste foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, à temperatura ambiente e sob fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias, o número de sementes germinadas foi registrado diariamente, até o 12º dia.

4.6 Estimativa da quantidade de DNA nuclear

Para a estimativa da quantidade de DNA nuclear, de 20 a 30 mg de folhas frescas de *L. lacunosa* e de *L. rotundifolia* e o mesmo peso de folhas frescas de *Pisum sativum* (padrão interno de referência) foram fatiados em tampão gelado LB01, para o preparo da suspensão nuclear (Dolezel et al., 1989). Os tecidos fatiados foram aspirados com o auxílio de pipetas plásticas e filtrados através de malhas de náilon de 50 µm; os filtrados foram coletados em tubos de poliestireno. Cada suspensão nuclear foi corada com 25 µL de solução de iodeto de propídio (1mg/mL), acrescentando-se, em seguida, 5 µL de RNase. As amostras foram armazenadas no escuro, em refrigerador e analisadas após 1-2 horas. Para cada amostra, o mínimo de 10.000 núcleos foi analisado usando uma escala logarítmica. As suspensões foram analisadas em citômetro de fluxo (FacsCalibur- Becton Dickinson). Os histogramas foram obtidos e analisados a partir dos softwares Cell Quest e WinMDI 2.8 e a estimativa do conteúdo de DNA foi obtida a partir da seguinte fórmula:

Amostra (2C) = (valor observado no canal do pico da espécie/valor observado no canal do pico do padrão) X 9,09pg

Para cada espécie, três indivíduos e três amostras de cada indivíduo foram analisados. A análise de variação no conteúdo de DNA entre as amostras e entre os indivíduos foi realizada por análise de variância (ANOVA).

4.7 Palinologia

Grãos de pólen de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* foram examinados por meio de microscopia de luz (ML) e de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.7.1 Microscopia de luz

Para a ML, polens das duas espécies foram colocados em um microtubo contendo ácido acético, por 3 minutos e, então, acetolisados segundo metodologia descrita por Erdtman (1960). O meio de montagem das lâminas foi preparado com gelatina glicerinada e analisado sob microscópio Olympus BX 52. As lâminas obtidas encontram-se depositadas no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.7.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na metodologia usada para a MEV, após a desidratação em série crescente de acetona, os grãos de pólen foram secos em aparelho de ponto crítico e transferidos para suportes contendo fita adesiva de dupla face (Skvarla, 1966). Os suportes foram banhados com ouro, por 15 minutos, examinados e fotografados em diferentes magnitudes, em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40 XVP. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Lavras.

4.8 Anatomia

O limbo foliar de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* foi examinado por ML e MEV.

4.8.1 Microscopia de luz

Após serem coletadas, folhas jovens e maduras de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* foram fixadas imediatamente em uma mistura contendo formaldeído 2,5% e glutaraldeído (1:1) em tampão fosfato 0,15 M, pH 7,4. Após 24 horas de

fixação, as folhas foram seccionadas em pequenos pedaços retangulares (5 x 7 mm), na região mediana do limbo foliar, contendo a nervura central (principal). Em seguida, adaptando-se a metodologia ao protocolo descrito por Berlyn & Miksche (1976), os cortes foram submetidos a três baterias de álcool absoluto, a 60°C, por 30 minutos cada; três baterias de xilol, a 60°C, por 30 minutos cada e infiltrados em parafina, a 60°C, por 1 hora. Em seguida, foram emblocados em parafina em cassetes específicos para emblocamentos histológicos. Os blocos foram, então, cortados em micrótomo E Reichert, sendo os cortes realizados com espessura de 10 µm. Após a obtenção dos cortes, os mesmos foram desidratados em série alcoólica (três baterias de 5 minutos), seguidos de três baterias de 5 minutos em xilol e corados seqüencialmente, por 30 segundos, em azul de astra e fucsina básica, respectivamente. Os cortes foram observados e fotografados em microscópio de luz Olympus BX 51, no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras contendo pedaços (2-3 cm de diâmetro) de folha em diferentes estágios de desenvolvimento foram fixadas em glutaraldeído 3%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2, por 4 horas, a 4°C. Após ser lavado no mesmo tampão, o material foi desidratado em uma série crescente de acetona, secos em aparelho de ponto crítico e cobertos com uma fina camada de ouro. Em seguida, as faces abaxial e adaxial do limbo foliar foram observadas em diferentes magnitudes e fotografadas utilizando-se microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40 XVP a 15KV. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica (Centro de Microscopia da UFLA) da Universidade Federal de Lavras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cariótipos, bandeamentos cromossômicos e estimativas do conteúdo de DNA por citometria de fluxo

Embora ambas as espécies apresentem o mesmo número cromossômico ($2n = 56$), a análise cariotípica revelou importantes diferenças entre as duas espécies. *L. lacunosa* apresentou menor tamanho do complemento haplóide dos cromossomos e cariótipo mais assimétrico, quando comparada com *L. rotundifolia* (Tabelas 2, 3 e 4). Ambas as espécies apresentaram cromossomos pequenos e biarmados $NF = 56$, variando gradualmente de meta a submetacêntricos (Tabelas 2, 3 e 4, Figura 1 A e C). Entretanto, *L. rotundifolia* apresentou cromossomos maiores que *L. lacunosa* (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2. Morfometria cromossômica de *L. lacunosa*, apresentada em valores médios. BC = comprimento do braço curto (μm), BL = comprimento do braço longo (μm), CT = comprimento total do cromossomo (μm), TR = tamanho relativo, RB = relação de braços, CC = classificação centromérica, CTLH = comprimento total do lote haplóide. * Constrições secundárias

Par	BC	BL	CT	TR%	RB	CC
1	1,63	2,03	3,66	5,4	1,24	M
2	1,61	1,82	3,43	5,1	1,13	M
3	1,53	1,83	3,36	5,0	1,19	M
4	1,43	1,85	3,28	4,8	1,29	M
5	1,27	1,55	2,82	4,2	1,22	M
6	1,20	1,84	3,04	4,5	1,53	M
7	1,15	1,49	2,64	3,9	1,29	M
8	1,05	1,31	2,36	3,5	1,24	M
9	1,05	1,71	2,76	4,1	1,62	M
10	1,01	1,83	2,84	4,2	1,81	SM
11	0,98	1,66	2,64	3,9	1,69	M
12 *	0,9	1,55	2,45	3,6	1,72	SM
13	0,98	1,36	2,24	3,3	1,54	M
14	0,86	1,43	2,29	3,4	1,66	M
15	0,86	1,76	2,62	3,9	2,04	SM
16 *	0,85	1,17	2,02	3,0	1,37	M
17	0,84	1,2	2,04	3,0	1,42	M
18	0,82	1,52	2,34	3,4	1,85	SM
19	0,80	1,12	1,92	2,8	1,40	M
20	0,77	1,09	1,86	2,7	1,41	M
21	0,76	1,24	2,00	2,9	1,63	M
22	0,74	1,27	2,01	2,9	1,71	SM
23	0,72	1,23	1,95	2,9	1,70	SM
24	0,71	1,03	1,74	2,5	1,45	M
25	0,71	1,28	1,99	2,9	1,80	SM
26	0,70	0,91	1,61	2,3	1,30	M
27	0,67	0,75	1,42	2,1	1,11	M
28	0,65	1,12	1,77	2,6	1,72	SM
CTLH			67,1			

TABELA 3. Morfometria cromossômica de *L. rotundifolia* apresentada em valores médios. BC = comprimento do braço curto (μm), BL = comprimento do braço longo (μm), CT = comprimento total do cromossomo (μm), TR = tamanho relativo, RB = relação de braços, CC = classificação centromérica, CTLH=comprimento total do lote haplóide. *Constrições secundárias

Par	BC	BL	CT	TR%	RB	CC
1	2,18	2,33	4,51	5,9	1,06	M
2	1,59	2,06	3,65	4,7	1,29	M
3	1,54	1,70	3,24	4,2	1,10	M
4	1,50	1,66	3,16	4,1	1,10	M
5	1,47	2,07	3,55	4,6	1,40	M
6	1,41	1,93	3,34	4,3	1,36	M
7	1,33	1,87	3,20	4,2	1,40	M
8	1,23	1,60	2,83	3,7	1,30	M
9	1,17	1,59	2,76	3,6	1,36	M
10	1,16	1,70	2,87	3,7	1,46	M
11	1,15	2,14	3,29	4,3	1,86	M
12	1,14	1,37	2,51	3,2	1,19	M
13	1,13	1,44	2,57	3,3	1,27	M
14	1,1	1,63	2,73	3,5	1,48	M
15	1,08	1,85	2,94	3,8	1,70	SM
16 *	1,05	1,84	2,9	3,8	1,74	SM
17	1,05	1,32	2,37	3,1	1,26	M
18	1,04	1,86	2,91	3,8	1,78	SM
19	0,97	1,36	2,33	3,0	1,40	M
20	0,96	1,44	2,40	3,1	1,49	M
21	0,93	1,23	2,16	2,8	1,32	M
22	0,92	1,18	2,10	2,7	1,28	M
23	0,87	1,58	2,46	3,2	1,81	SM
24	0,84	1,56	2,40	3,1	1,84	SM
25	0,84	1,13	1,97	2,5	1,33	M
26	0,79	0,83	1,63	2,1	1,05	M
27	0,67	1,12	1,79	2,3	1,67	M
28	0,58	0,99	1,57	2,0	1,71	SM
CTLH			76,2			

TABELA 4. Grau de assimetria do cariótipo (A), grau de heterogeneidade entre os cromossomos (Ai) e fórmula cariotípica (FC) de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*.

Espécies	A	Ai	Fórmula cariotípica (FC)
<i>L. lacunosa</i>	0,24	6,91	20m + 8sm
<i>L. rotundifolia</i>	0,16	4,73	21 m + 7sm

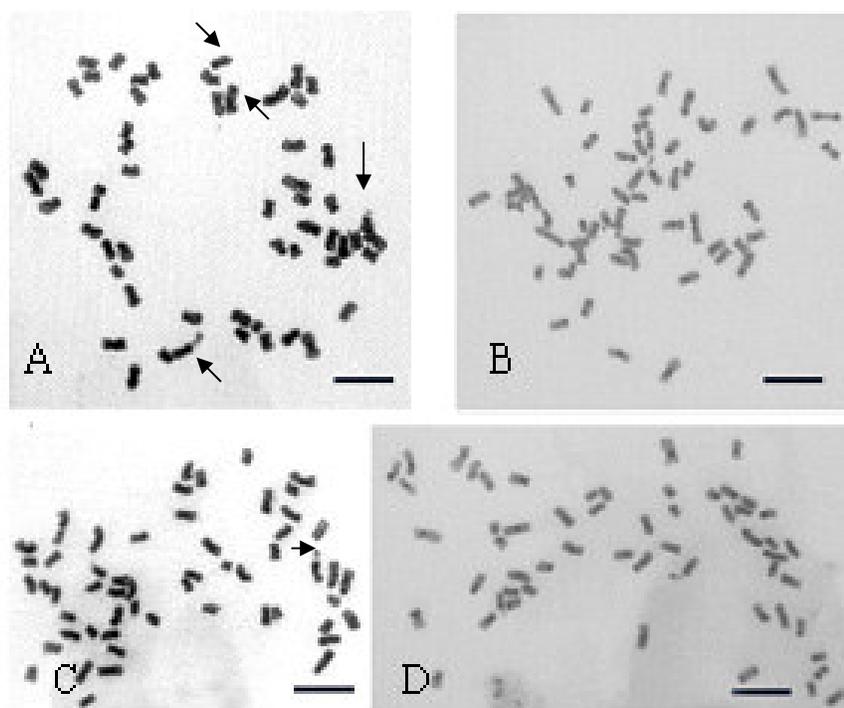


FIGURA 1. Coloração com Giemsa e bandeamento C em *L. lacunosa* (A e B) e em *L. rotundifolia* (C e D), respectivamente. As setas indicam constrições secundárias. Barra = 10 μ m.

Nas duas espécies, algumas constrições secundárias (CSs) foram observadas nas regiões terminais de alguns cromossomos de poucas das metáfases analisadas. No entanto, não foi possível determinar o número real dessas estruturas, devido ao pequeno tamanho dos cromossomos. Em *L. lacunosa*, o número mais freqüente observado foi de dois pares de CS, presentes, principalmente, nos pares de cromossomos 12 e 16, enquanto que, em *L. rotundifolia*, foi observado apenas um par, no cromossomo 16 (Figura 1 A e C). Entretanto, a aplicação do nitrato de prata, utilizado para inferir sobre a atividade nucleolar de genes ribossomais encontrados nas regiões organizadoras de nucléolos (RONs) e para a demonstração do número máximo de nucléolos nos núcleos interfásicos (Sumner, 2003), indicou que o número máximo de nucléolos observados em *L. lacunosa* foi seis e, em *L. rotundifolia*, foi oito, sendo possível detectar também diferenças no tamanho destes nucléolos (Figura 2 A e B). Estas observações permitem inferir que, em *L. lacunosa*, existem, pelo menos, três pares de CS e, em *L. rotundifolia*, pelo menos quatro pares dessas estruturas.

Na maioria das espécies de plantas, o número de genes de RNAr com atividade é muito baixo. Em *Pisum sativum*, por exemplo, somente 5% das unidades são transcritas (González-Melendi et al., 2001). Sendo assim, apenas uma pequena fração de genes de RNAr parece ser suficiente para suprir todas as necessidades ribossomais de uma célula. Portanto, cromossomos homólogos com RONs, geralmente, apresentam comportamento idêntico, em termos de sua expressão e, conseqüentemente, ambos são transcritos ou silenciados (Caperta et al., 2002). Entretanto, alguns estudos sobre a regulação da transcrição de DNAr, em níveis intra e interespecíficos, indicam que fatores de transcrição podem competir por diferentes locos de DNAr, levando a diferentes graus de atividades das RONs (Pikaard, 1999, 2000; Zurita et al., 1998, 1999). Com isso podem ocorrer diferentes graus de condensação das CSs, levando, em casos de

inatividades das RONS, à não formação de CSs em alguns cromossomos. Tal comportamento foi observado, em *L. alba*, por Sousa (2006) e Pierre (2008).

Porém, adicionalmente aos dados obtidos com o nitrato de prata em núcleos interfásicos mitóticos, diplótenos tardios e diacineses, observados em alíquotas de suspensões celulares meióticas, permitiram a observação de três pares de cromossomos associados a um grande nucléolo em *L. lacunosa* e quatro pares em *L. rotundifolia*, reforçando as evidências de que o número de CSs é seis em *L. lacunosa* e oito em *L. rotundifolia*, podendo, de fato, existir atividade parcial das RONS nas espécies aqui estudadas (Figura 2 B e C). A utilização da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), utilizando sondas de DNAr, seria importante ferramenta para a real determinação do número de constrições secundárias nestas espécies, uma vez que esta técnica possibilita a identificação da posição e do número de seqüências nos cromossomos, independente da atividade gênica das mesmas.

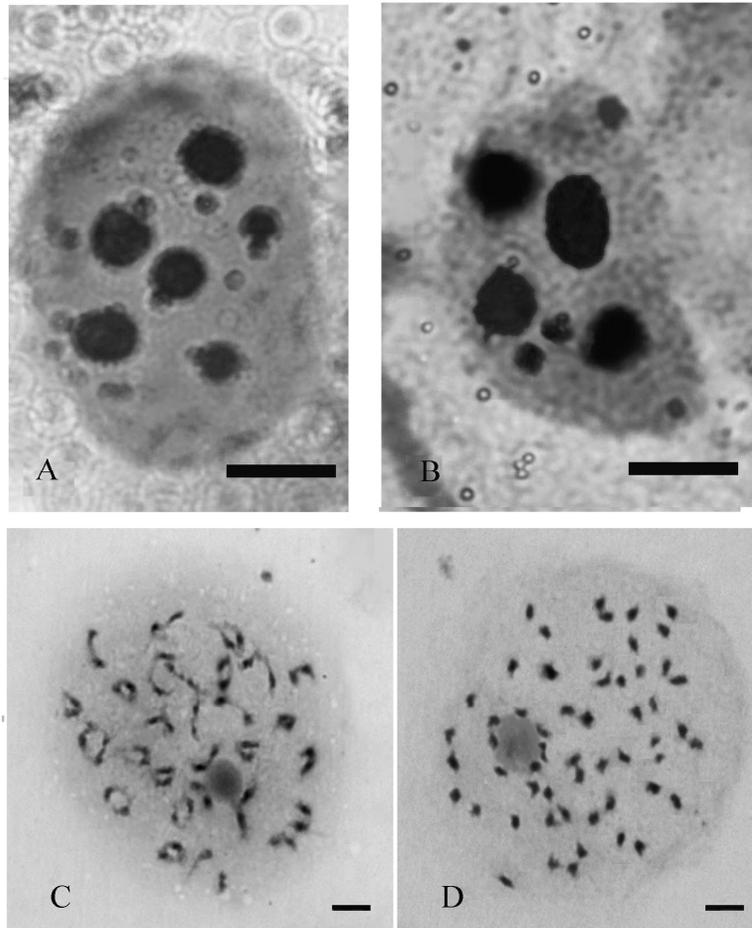


FIGURA 2. Núcleos interfásicos corados com nitrato de prata, evidenciando seis nucléolos em *L. lacunosa* (A) e oito nucléolos em *L. rotundifolia* (B). Em (C), observa-se uma célula em diplóteno tardio com três bivalentes associados ao nucléolo de *L. lacunosa* e, em (D), diacinese com quatro bivalentes associados ao nucléolo de *L. rotundifolia*. Barra = 5 μ m.

Com o estudo da heterocromatina por meio do bandejamento C, foi possível detectar um padrão de heterocromatina constitutiva similar para as duas espécies (Figuras 1 B e D e 4). Ambas apresentaram blocos heterocromáticos pericentroméricos com pequenos blocos nos telômeros de alguns cromossomos (6, 10, 14, 18, 21, 25 e 28 em *L. lacunosa* e 1, 4, 8, 24 e 26 em *L. rotundifolia*) (Figuras 1 B e D e 4). O conteúdo heterocromático foi diferente para as espécies. Em *L. lacunosa*, a heterocromatina correspondeu a 32,75% do comprimento total dos cromossomos, enquanto que, em *L. rotundifolia*, esse percentual foi de 28,16%.

Em relação às características qualitativas da heterocromatina, o padrão de bandeamentos obtidos com os fluorocromos mostrou que a heterocromatina das duas espécies é rica em bases nitrogenadas do tipo AT, uma vez que a coloração com DAPI foi positiva nas regiões pericentroméricas dos cromossomos (Figura 3 A e C), havendo grande coincidência de bandas DAPI⁺ com as regiões positivas para o bandejamento C. Algumas marcas positivas para o DAPI também foram coincidentes com algumas bandas C⁺ presentes em regiões teloméricas de ambas as espécies (Figura 4). Com relação ao padrão de bandejamento obtido com o CMA₃, apenas foram observadas bandas terminais nas duas espécies. No entanto, *L. lacunosa* apresentou seis marcas e *L. rotundifolia*, oito (Figura 3 B e D). Dados de bandejamento com DAPI e CMA semelhantes a estes foram observados anteriormente em quimiotipos de *L. alba*, por Sousa (2006), Brandão et al., (2007) e Pierre (2008), indicando que espécies do gênero *Lippia* são ricas em heterocromatina constitutiva.

A ampliação desses dados para outras espécies é de fundamental importância, uma vez que, com tais estudos, pode-se ter idéia do papel da heterocromatina na evolução das espécies no gênero. Segundo Greilhuber (1979) e Redi et al. (2001), a presença de pouca heterocromatina no cariótipo de várias espécies em um grupo indica uma condição plesiomórfica para as espécies,

enquanto o acúmulo de heterocromatina indica condição apomórfica, sendo tais condições importantíssimas para a realização de inferências filogenéticas sobre os grupos vegetais.

Outra abordagem interessante obtida com os resultados do bandeamento com o fluorocromo CMA₃ é que regiões organizadoras de nucléolo, geralmente, são ricas em bases nitrogenadas do tipo GC (Sumner, 1990, 2003), cujo corante citado anteriormente tem afinidade. As marcas obtidas neste estudo com o CMA₃ coincidiram com as constrições que foram possíveis de serem observadas com a coloração convencional nas duas espécies (Figura 4 A e B). Além disso, a mesma situação foi observada em *L. alba*, por Sousa (2006) e Pierre (2008), e os dados obtidos com o CMA₃ podem ser importante ferramenta na identificação de cromossomos que apresentem constrições secundárias de difícil identificação em *Lippia*, caso esse comportamento persista entre as outras espécies do grupo.

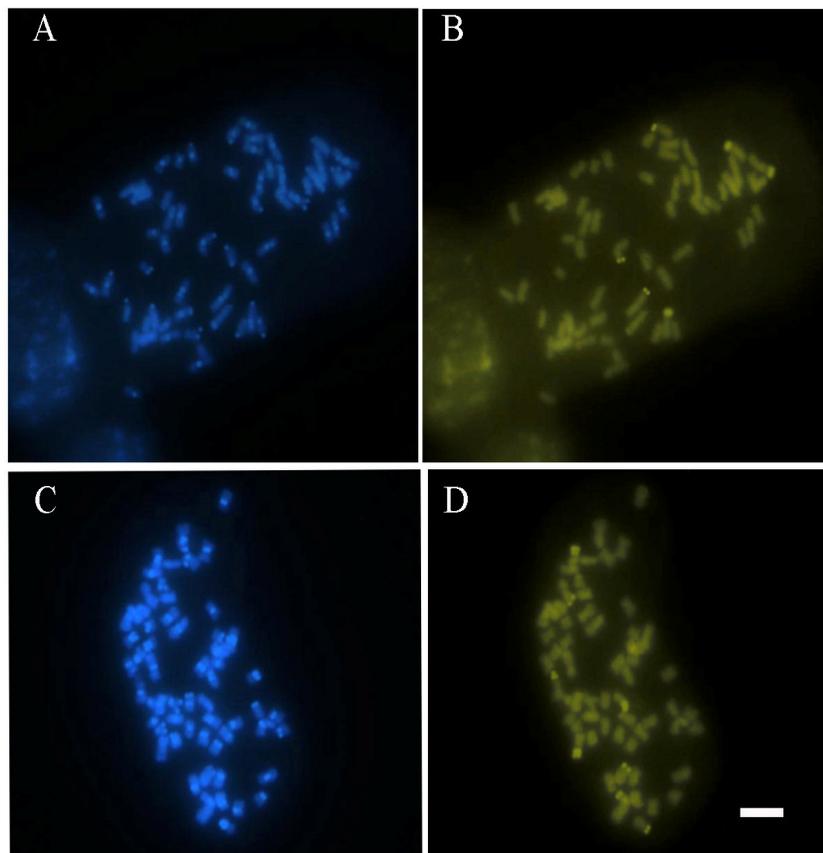


FIGURA 3. Padrão de bandeamentos com fluorocromos em *L. lacunosa* (A-DAPI e B-CMA) e em *L. rotundifolia* (C-DAPI e D-CMA). Barra = 5 μ m.

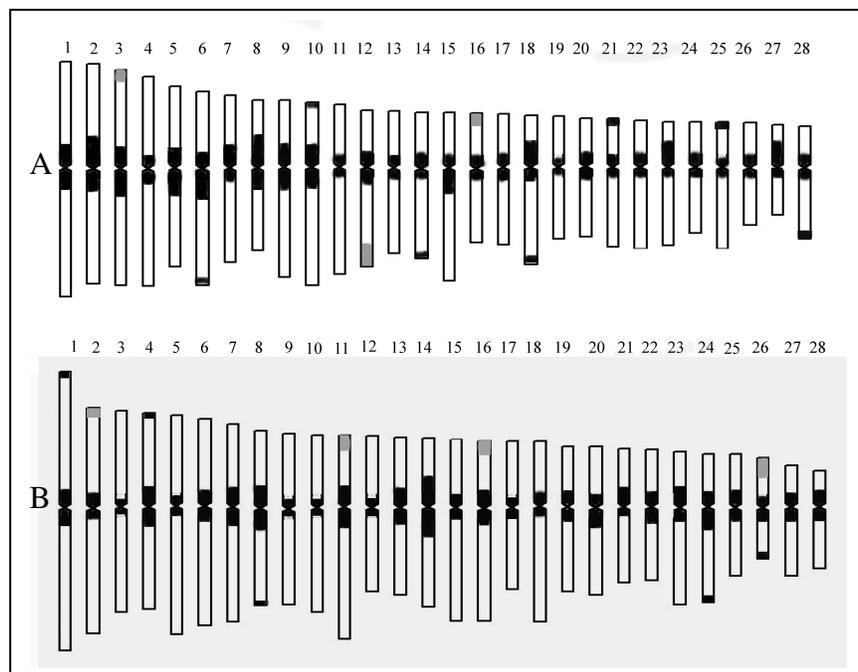


FIGURA 4. Idiogramas com padrões de bandeamentos em (A) *L. lacunosa* e (B) *L. rotundifolia*. Marcas em preto indicam regiões de coincidência entre bandas DAPI e C e marcas em cinza indicam regiões positivas para o CMA.

As espécies também apresentaram diferença na estimativa da quantidade de DNA nuclear. *L. rotundifolia* apresentou quantidade de 3,14 pg de DNA, enquanto *L. lacunosa* apresentou 3,05 pg, havendo diferença significativa entre os resultados obtidos para as espécies (Tabela 5; Figura 5).

Poucos são os trabalhos relacionados à estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo para o gênero *Lippia*. Entretanto, a utilização desta metodologia tem auxiliado de forma enriquecedora a taxonomia e sistemática de vários grupos de plantas, principalmente plantas que apresentam similaridades ou diferenças morfológicas devido à plasticidade fenotípica (Dolezel et al., 2007).

Segundo Murray (2005), a quantidade de DNA pode estar diretamente relacionada com uma infinidade de caracteres nos vegetais, inclusive com a diferenciação morfológica das espécies. O autor aponta, inclusive, que, mesmo no nível intra-específico, diferenças na quantidade de DNA podem levar a tal diferenciação morfológica, a ponto de impedir o fluxo gênico entre populações e, com isso, à especiação. Portanto, a quantidade de DNA é um importante ponto a ser levado em consideração, em estudos taxonômicos.

Mishiba et al. (2000), ao estudarem espécies do gênero *Petunia*, que muitas vezes são confundidas com espécies do gênero *Calibrachoa*, sendo este considerado um gênero sinônimo de *Petunia* para alguns autores, conseguiram, por meio da citometria de fluxo e da determinação da quantidade de DNA, separar bem os dois gêneros. As espécies de *Petunia* apresentaram quantidades de DNA entre 2,6-3,41 pg, enquanto as espécies de *Calibrachoa* apresentaram espécies com conteúdo de DNA entre 1,56-1,91 pg.

Além da determinação da quantidade de DNA, outra abordagem interessante para o gênero *Lippia* seria a realização da citometria de fluxo utilizando o fluorocromo DAPI. Vários trabalhos na literatura utilizam esta

TABELA 5. Conteúdo 2C de DNA nuclear de células de folha em *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*

	Conteúdo de DNA (pg)			
	Indivíduo 1	Indivíduo 2	Indivíduo 3	Média
<i>L. rotundifolia</i>	3,22±0,092	3,13±0,094	3,08±0,021	3,14±0,071*
<i>L. lacunosa</i>	3,08±0,049	3,04±0,015	3,05±0,096	3,05±0,021*

*Diferença significativa, pelo teste F ($p < 0,01$)

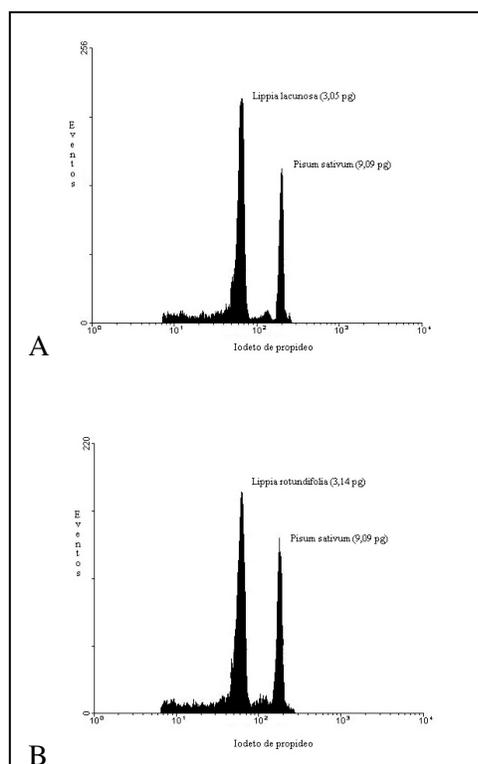


FIGURA 5. Histogramas representativos da quantidade de DNA em pg, para *L. lacunosa* (A) e *L. rotundifolia* (B).

abordagem para quantificar o conteúdo de DNA e o percentual de bases AT presente no genoma, uma vez que o DAPI tem afinidade por estas bases nitrogenadas (Bennett & Leitch, 1995; Mishiba et al., 2000; Fujimoto et al., 2005). Este estudo seria interessante, uma vez que os dados de bandeamentos cromossômicos com fluorocromos DAPI e CMA em *L. alba* (Sousa, 2006; Brandão et al., 2007; Pierre, 2008) mais os dados obtidos em *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* neste trabalho indicam que todas estas espécies possuem a heterocromatina rica em bases do tipo AT. Este tipo de estudos em mais espécies do gênero indicaria se, no gênero, este padrão é recorrente.

5.2 Meiose, viabilidade polínica e viabilidade de sementes

Por meio da análise meiótica constatou-se que *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* apresentam comportamento meiótico normal, com a formação de bivalentes (Figura 2 C e D) e sem a ocorrência de alterações meióticas. Entretanto, a viabilidade polínica mostrou-se diferente para as duas espécies. Todos os testes de viabilidade do grão de pólen, incluindo o de germinação do grão de pólen, mostraram baixa viabilidade para *L. lacunosa* e alta para *L. rotundifolia* (Tabela 6), indicando que *L. rotundifolia* apresenta viabilidade reprodutiva superior à observada em *L. lacunosa*. Na Figura 6 podem ser observados alguns resultados dos testes de viabilidade.

TABELA 6. Percentual de viabilidade e germinação do grão de pólen em *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*. TCA - teste de viabilidade com corante de Alexander; TFDA - teste de viabilidade com o fluorocromo fluoroceína diacetato; TGIV - teste de germinação *in vitro*

	TCA	TFDA	TGIV
<i>L. lacunosa</i>	63,21%	71,45%	34,3%
<i>L. rotundifolia</i>	87,43%	95,32%	92,11%

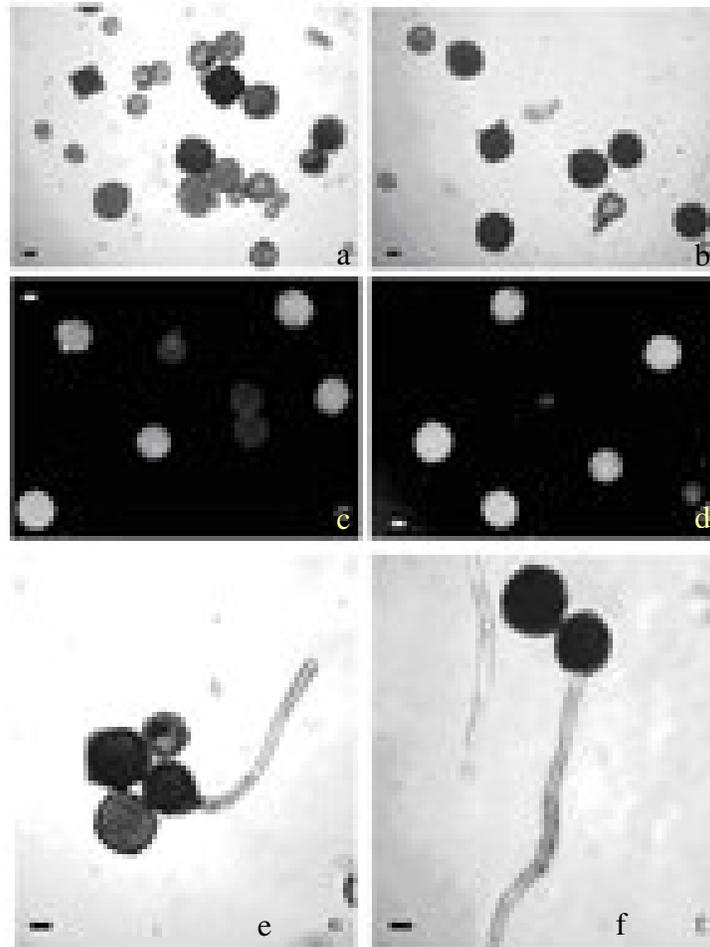


FIGURA 6. Teste de viabilidade polínica com corante de Alexander em (a) *L. lacunosa* e em (b) *L. rotundifolia*; teste de viabilidade com o fluorocromo FDA em (c) *L. lacunosa* e em (d) *L. rotundifolia*; teste de germinação *in vitro* do tubo polínico para (e) *L. lacunosa* e (f) *L. rotundifolia*. Barra = 10 μ m.

A maior viabilidade reprodutiva de *L. rotundifolia* persistiu nos testes de germinação de sementes. *L. lacunosa* apresentou percentual de germinação nulo durante todo o período de avaliação, enquanto *L. rotundifolia* apresentou, já no quinto dia após a implantação do experimento, percentual de germinação de 32,13%, alcançando 93,2% de germinação no décimo segundo dia. Contudo, testes de dormência não foram realizados em *L. lacunosa*, assim como testes relacionados ao metabolismo do embrião.

É importante a realização de testes de germinação para sementes armazenadas, uma vez que várias espécies de *Lippia* da Cadeia do Espinhaço, estudadas por Pimenta et al. (2007), apresentaram percentual de germinação maior, após armazenamento, do que as sementes que foram colocadas para germinar logo após a coleta. Apesar disso, sob as mesmas condições, as espécies comportaram-se diferentemente.

5.3 Palinologia

Outra abordagem que revelou diferenças entre as espécies foi o estudo dos tratos palinológicos das duas espécies. Em relação ao número de aberturas, *L. lacunosa* apresentou grãos com abertura tri e tetracolporadas (Figura 7 B e D), havendo frequência maior de pólenes tetracolporados (72,51% dos 3.210 grãos analisados eram tetracolporados). Por outro lado, *L. rotundifolia* apresentou grãos apenas tetracolporados (Figura 7 F e H).

Já a ornamentação da exina foi o caráter palinológico mais diferente entre as duas espécies. *L. lacunosa* apresentou exina isenta de ornamentação, denominada psilada, segundo Punt et al.,(2001) (Figura 7 C), enquanto *L. rotundifolia* apresentou exina perfurada (Figura 7 G). Trabalhos anteriores, realizados com outras espécies, indicam que a maior parte das espécies no

gênero apresenta exina sem ornamentação, ou seja, psilada (Raj, 1983; Pierre, 2008; Silva, 2008).

Com relação ao tamanho, os grãos de *L. lacunosa* apresentaram amplitude muito grande dos eixos equatorial (E) e polar (P), de E = 17,2 μm – 39,3 μm e de P = 17,89 μm – 40,1 μm e, em *L. rotundifolia*, essa variação foi de E = 26,8 μm – 42,1 μm e P = 25,73 μm – 44,36.

Além destes caracteres, por meio da análise com microscopia de luz dos grãos acetolisados (Figura 7 D e H), foi possível mensurar a espessura da exina, que se apresentou mais espessa em *L. rotundifolia* (2,71 μm) do que em *L. lacunosa* (2,11 μm).

Embora as espécies apresentem as diferenças citadas anteriormente, ambas possuem âmbitos quadrangulares, mesmo que uma pequena porcentagem de polens em *L. lacunosa* apresente âmbito triangular e a classificação oblato esferoidal quanto à razão P/E. Na Tabela 7 estão resumidos os valores para todas as estimativas palinológicas.

A maior viabilidade reprodutiva de *L. rotundifolia* persistiu nos testes de germinação de sementes. *L. lacunosa* apresentou percentual de germinação nulo durante todo o período de avaliação, enquanto *L. rotundifolia* apresentou, já no quinto dia após a implantação do experimento, percentual de germinação de 32,13%, alcançando 93,2% de germinação no décimo segundo dia. Contudo, testes de dormência não foram realizados em *L. lacunosa*, assim como testes relacionados ao metabolismo do embrião. É importante a realização de testes de germinação para sementes armazenadas, uma vez que várias espécies de *Lippia* da Cadeia do Espinhaço, estudadas por Pimenta et al. (2007), apresentaram um percentual de germinação maior após armazenamento do que as que foram colocadas para germinar logo após a coleta. Apesar disso, sob as mesmas condições, as espécies comportaram-se diferentemente.

TABELA 7. Médias dos tratos palinológicos de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*. EDE = medida da endoexina; ECE = medida da ectoexina; EE = espessura da exina; E = eixo equatorial; P = eixo polar; P/E = razão do eixo polar pelo eixo equatorial; TE = tipo de exina, PS = psilada, PF = perfurada, CP/E = classificação quanto à razão de eixos Polar e Equatorial.

	EDE	ECE	EE	E	P	P/E	TE	CP/E
	µm	µm	µm	µm	µm	µm		
<i>L. lacunosa</i>	0,75	0,92	1,67	37,3	38,41	1,02	PS	Oblato esferoidal
<i>L. rotundifolia</i>	0,81	0,86	1,67	40,21	40,32	1,02	PF	Oblato esferoidal

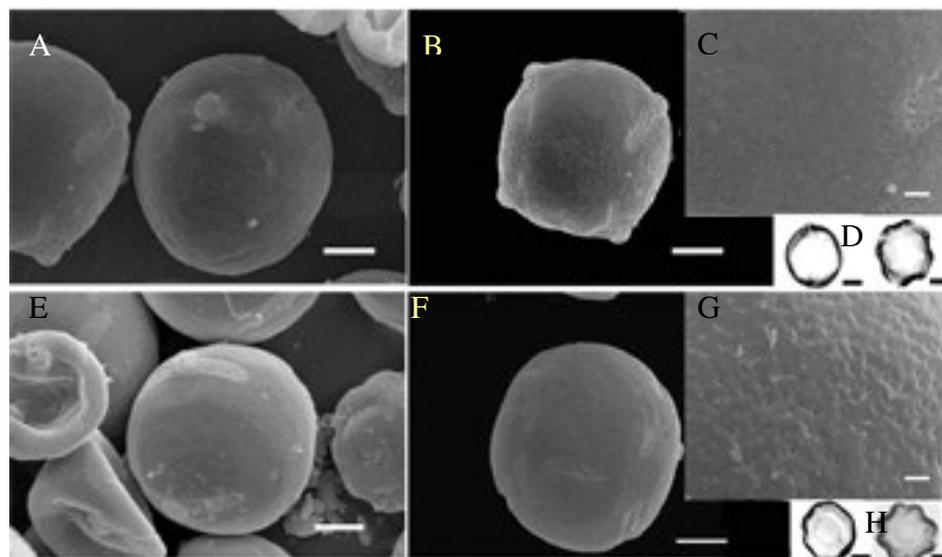


FIGURA 7. Micrografias obtidas em microscopia eletrônica de varredura para polens nas visões: equatorial (A) e polar (B), em *L. lacunosa* e equatorial (E) e polar (F), em *L. rotundifolia*. Detalhe da ornamentação da exina em (C) *L. lacunosa* e em (G) *L. rotundifolia*. Micrografias obtidas em microscopia de luz de visões equatorial e polar de polens acetolisados em (D) *L. lacunosa* e (H) em *L. rotundifolia*.

5.4 Anatomia

Os cortes anatômicos obtidos em *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* permitiram, pela primeira vez, uma comparação entre os mesófilos das duas espécies. Foi possível observar que tanto *L. lacunosa* quanto *L. rotundifolia* apresentam especializações que permitem que as mesmas se adaptem ao ambiente em que vivem.

Ambas possuem espessa cutícula recobrindo toda a epiderme e depressões na face abaxial das folhas, contendo muitos tricomas e estômatos. Tais depressões são conhecidas como criptas estomáticas e são importantes adaptações encontradas em plantas xerófitas para impedir a perda de água pelos estômatos (Raven et al., 2001). Nota-se, entretanto, que as criptas em *L. lacunosa* são formadas na epiderme e alcançam profundidades da endoderme, enquanto em *L. rotundifolia* elas se restringem à epiderme (Figura 8). Estudos recentes indicam algumas funções importantes para a camada cuticular em vegetais, principalmente de regiões muito quentes e secas, como é o caso das espécies aqui estudadas. Segundo Oliveira (2005), a cutícula tem importante papel na determinação quantitativa e qualitativa da radiação que chega ao mesófilo e, segundo Alquini et al. (2003), por se tratar de uma camada lisa e refletora, atua também na proteção contra o excesso de luminosidade e de radiação solar.

Além das observações anteriores, nota-se também que os parênquimas paliádico e lacunoso no limbo foliar estão concentrados nas regiões das criptas (Figura 8 B e D). A concentração destes tecidos ao redor das criptas de *L. lacunosa* e de *L. rotundifolia* pode ser explicada pelo fato de a maior concentração de estômatos ocorrer nestas regiões.

Outra importante observação está na nervura central (ou principal) de ambas as espécies. Nota-se que, nesta região da folha, importantes diferenças ocorrem, permitindo uma delimitação muito clara entre as duas espécies

estudadas (Figura 9). *L. lacunosa* possui, nesta região, da face adaxial para a abaxial, cutícula espessa, seguida por uma camada de células epidérmicas, células colenquimais, xilema, floema e uma espessa camada de células colenquimais, seguida da epiderme e cutícula da face abaxial. Por outro lado, *L. rotundifolia* apresenta cutícula bem mais espessa na face adaxial, seguida de uma camada de células epidérmicas, células colenquimais, xilema e floema seguido de uma espessa camada de fibras do floema coradas em vermelho, que não existe em *L. lacunosa*. Em seguida, nota-se espessa camada de células colenquimais, seguida da epiderme e da cutícula na face abaxial.

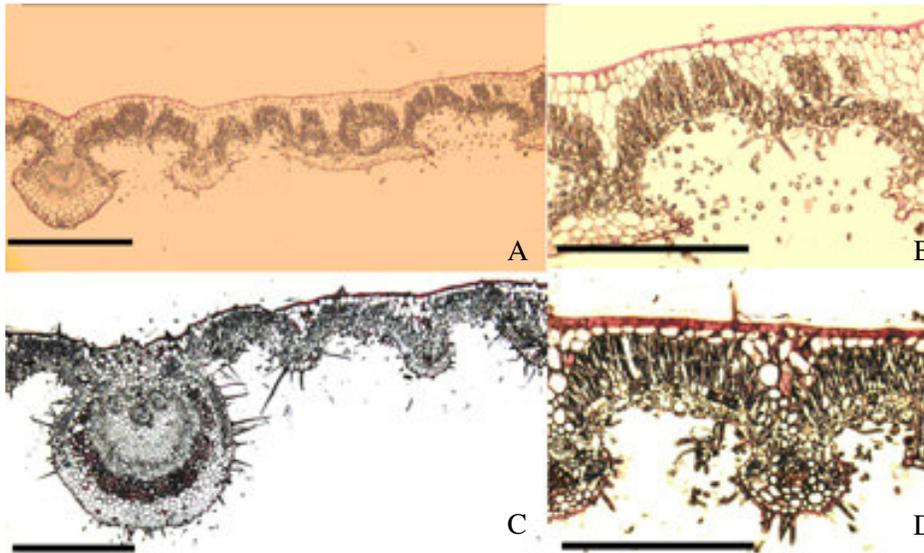


FIGURA 8. Cortes transversais do limbo foliar de *L. lacunosa* (A e B) e em *L. rotundifolia* (C e D), visualizados em microscopia de luz mostrando a disposição das criptas estomáticas. Barra = 220 μm .

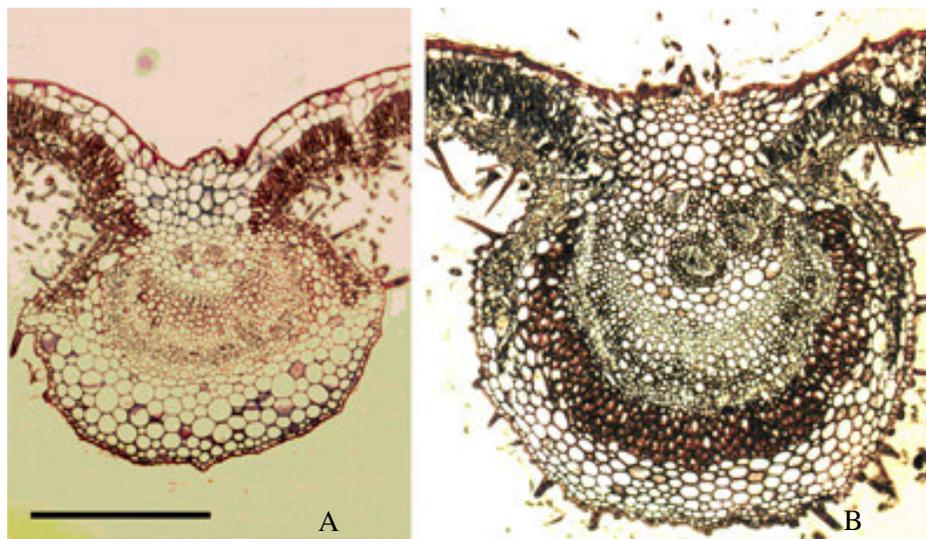


FIGURA 9. Cortes transversais da nervura principal de *L. lacunosa* (A) e *L. rotundifolia* (B), visualizados em microscopia de luz. Barra = 220 μm .

Além dessas observações obtidas com a microscopia de luz, por meio da microscopia eletrônica de varredura foi possível fazer um detalhamento da densa camada de tricomas encontrada nas duas espécies. Ambas possuem inúmeros tricomas tectores e glandulares nas duas faces do limbo foliar, havendo maior densidade de tricomas na face abaxial (Figura 10). Segundo Cantino (1990), os tricomas na família Verbenaceae apresentam variabilidade suficiente para a utilização dos mesmos na taxonomia vegetal. Em *Lippia*, nenhum estudo, exceto para *L. escaberrima*, uma espécie endêmica da África, foi feito até o momento (Combrinck et al., 2007). Entretanto, estas estruturas vêm sendo amplamente utilizadas para estudos taxonômicos e filogenéticos em vários grupos de plantas (Heinrich et al., 2002; Kaya et al., 2007).

Sendo assim, as análises realizadas no presente trabalho possibilitaram a observação de quatro tipos de tricomas em *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*, sendo um destes exclusivo de *L. rotundifolia*. Os tricomas observados nas duas espécies foram: tectores (grandes e pequenos) e dois tipos de glandulares, captados e subsésseis, classificados, segundo Cantino (1990), como tipo 1 (Figura 11 A e B) e tipo 2 (Figura 11 C). O tipo 1 apresenta curto pedúnculo, formado por uma única célula e uma única célula glandular na cabeça glandular do tricoma, enquanto o tipo 2 apresenta duas pequenas células, formando um curto pedúnculo com duas células glandulares na cabeça glandular do tricoma.

Em relação ao tricoma exclusivo de *L. rotundifolia*, este se mostrou pedunculado, com três células formando o pedúnculo e captado com oito células glandulares formando a cabeça glandular do tricoma, sendo classificado como tipo glandular, captado e pedunculado (Figura 11 D, E, F, G, I, J, M, N).

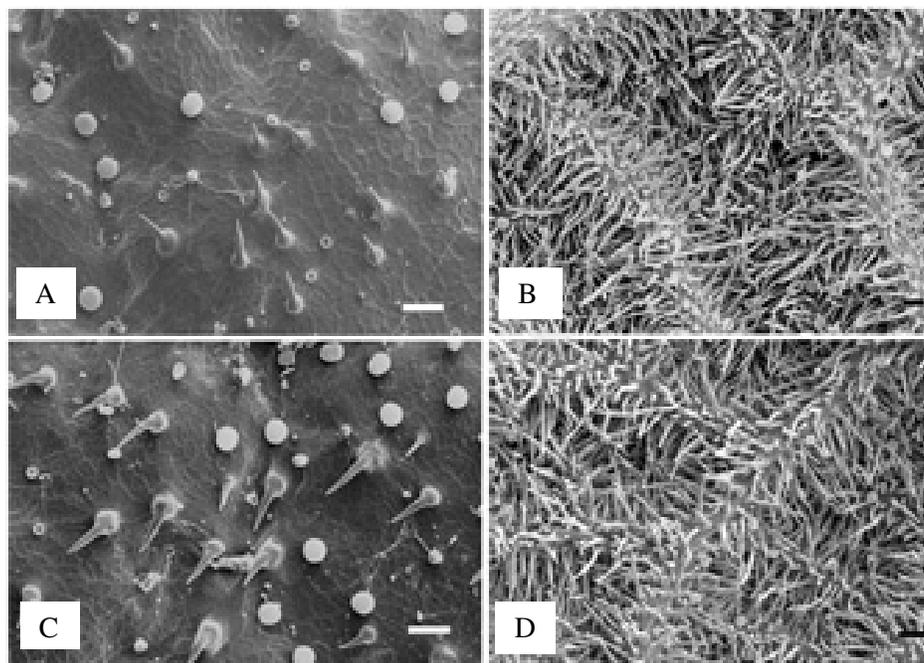


FIGURA 10. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das faces adaxiais (A- *Lippia lacunosa* e C- *L. rotundifolia*) e das faces abaxiais (B- *L. lacunosa* e D- *L. rotundifolia*). Barra = 10µm.

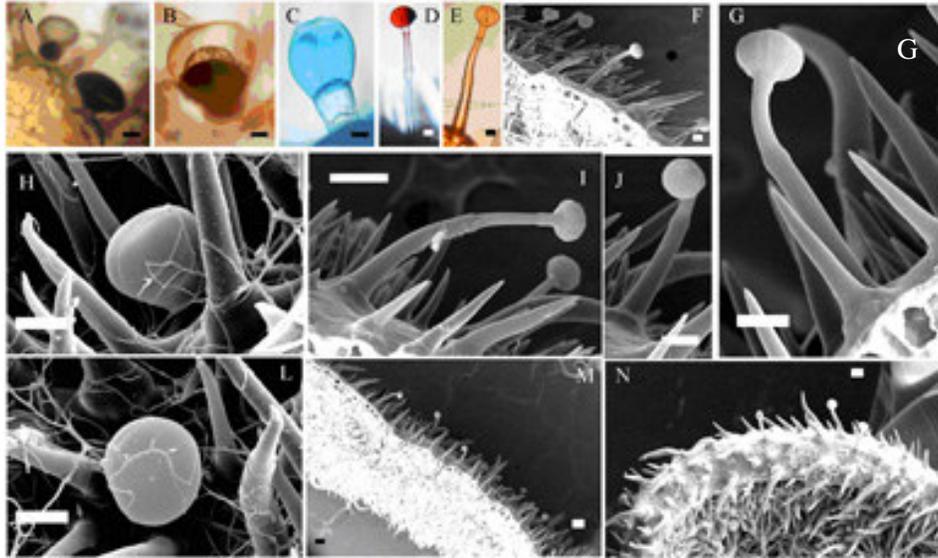


FIGURA 11. Tipos de tricomas encontrados em *L. lacunosa* e em *L. rotundifolia*: (A) tricoma subséssil do tipo 1, (B) tricoma subséssil do tipo 1 mostrando conteúdo em seu interior, (C) tricoma glandular subséssil do tipo 2, (D) e (E) tricoma glandular captado e pedunculado exclusivo de *L. rotundifolia*. (H) e (L) detalhes em diferentes visões para o tricoma do tipo 1. (F, G, I, J, M, N) detalhes da morfologia e da distribuição do tricoma glandular exclusivo de *L. rotundifolia*. Barra = 5 μ m.

6 CONCLUSÕES

- As duas espécies apresentam diferenças citogenéticas que as distinguem, principalmente o padrão de bandeamento com CMA₃ e o número máximo de nucléolos.
- O conteúdo de DNA é diferente para as duas espécies, sendo também um bom diferenciador entre *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*.
- O padrão morfológico da exina do pólen das duas espécies pode ser utilizado para a delimitação entre *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*.
- *L. rotundifolia* apresenta viabilidade reprodutiva maior que *L. lacunosa*.
- *L. rotundifolia* apresenta uma camada de fibras no floema que a diferencia de *L. lacunosa*, cuja camada é ausente nesta última.
- *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* devem ser consideradas táxons diferentes e não sinônimos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v. 55, n. 1, p. 13-19, 1980.
- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, v. 44, n. 2, p. 117-122, 1969.
- ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M. R. T.; COSTA, C. G.; BARROS, C. F. Epiderme. In: GLÓRIA, B. A. da; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. p. 87-107.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, v. 76, n. 2, p. 113-176, 1995.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa: Ames, 1976. 212 p.
- BHATTACHARYA, A.; MANDAL, S. Pollination biology in *Bombax ceiba* Linn. **Current Science**, v. 79, n. 12, p. 1706-1712, 2000.
- BRANDÃO, A. D.; VICCINI, L. F.; SALIMENA, F. R. G.; VANZELA, A. L.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **Journal of Plant Research**, v. 120, n. 3, p. 317-321, 2007.
- CANTINO, P. D. The phylogenetic significance of stomata and trichomes in the labiatae and verbenaceae. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 71, n. 4, p. 323-370, 1990.
- CAPERTA, A. D.; NEVES, N.; MORAIS-CECÍLIO, L.; MALHO, R.; VIEGAS, W. Genome restructuring in rye affects the expression, organization and disposition of homologous rDNA loci. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 11, p. 2839-2846, 2002.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. **Heredity**, v. 70, n. 6, p. 515-519, 1993.

- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. **Journal of Plant Research**, v. 110, n. 5, p. 417-420, 1997.
- COMBRINCK, S.; DU PLOOY, G. W.; MCCRINDLE, R. I.; BOTHA, B. M. Morphology and histochemistry of the glandular Trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). **Annals of Botany**, v. 99, n. 9, p. 1111-1119, 2007.
- DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, v. 31, n. 2, p. 113-120, 1989.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. **Flow cytometry with plant cells. Analysis of genes, chromosomes and genomes**. Weinheim, Czech Republic KGaA, 2007. 454 p.
- ERDTMAN, G. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, v. 54, n. 6, p. 561-564, 1960.
- FUJIMOTO, S.; ITO, M.; MATSUNAGA, S.; FUKUI, K. An upper limit of the ratio of the DNA volume to nuclear volume exists in plants. **Genes and Genetics Systematics**, v. 80, n. 1, p. 345-350, 2005.
- GARRY, T.; COLE, H.; BEHNKE, D. Electron microscopy and plant systematics. **Taxon**, v. 24, n. 1, p. 3-15, 1975.
- GONZÁLEZ-MELENDI, P.; WELLS, B.; BEVEN, A.; SHAW, J. Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli. **Plant Journal**, v. 27, n. 3, p. 223-233, 2001.
- GREILHUBER, J. C-band distribution, DNA content, and basic composition in *Ardoxa maschatellina* (Ardoxaceae), a plant with cold sensitive chromosomes segments. **Plant Systematics and Evolution**, v. 129, n. 2, p. 63-109, 1979.
- HEINRICH, G.; PFEIFHOFER, H. W.; STABENTHEINER, E.; SAWIDIS, T. Glandular hairs of *Sigesbeckia jorullensis* Kunth (Asteraceae): morphology, histochemistry, and composition of essential oil. **Annals of Botany**, v. 89, n. 5, p. 459-469, 2002.
- HESLOP-HARRISSON, J.; HESLOP-HARRISSON, Y. Pollen viability. **Stain Technology**, v. 45, n. 2, p. 115-120, 1970.

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

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics. A phylogenetic approach**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002. 419 p.

KAYA, A.; DEMIRCI, B.; BASER, K. H. C. Micromorphology of glandular trichomes of *Nepeta congesta* Fisch. & Mey. var. *congesta* (Lamiaceae) and chemical analysis of the essential oils. **South African Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p. 29-34 2007.

LEVAN, A.; FREDGA, A.; SANDERBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position in chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 3, p. 201-220, 1964.

MISHIBA, K. C.; ANDO, T.; MII, M.; WATANABE, H.; KOKUBUN, H.; HASHIMOTO, G.; MARCHESI, E. Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). **Annals of Botany**, v. 85, n. 7, p. 665-673, 2000.

MURRAY, B. G. When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? **Annals of Botany**, v. 95, n. 2, p. 119-125, 2005.

OLIVEIRA, A. F. M. Ceras epicuticulares como fator antiestresse. In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. (Ed.). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, 2005. p. 32-41.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ-MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 201-214, 2001.

PIERRE, P. M. O. **Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. BR. (Verbenaceae)**. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PIKAARD, C. Nucleolar dominance and silencing of transcription. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 5, p. 478-483, 1999.

PIKAARD, C. Nucleolar dominance: uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids. **Plant Molecular Biology**, v. 43, n. 2, p. 163-177, 2000.

PIMENTA, M.; FERNANDES, L. S.; PEREIRA, U. J.; GARCIA, L. S.; LEAL, S. R.; LEITÃO, S. G.; SALIMENA, F. R. G.; VICCINI, L. F.; PEIXOTO, P. H. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 2, p. 211-220, 2007.

PUNT, W.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. **Glossary of pollen and spore terminology**. 2001. Disponível em: <http://www.bio.uu.nl/~palaeo/glossary/glosint.htm>. Acesso em: 20 mar. 2008.

RAJ, B. A contribution to the pollen morphology of Verbenaceae. **Review of Paleobotany and Palynology**, v. 39, n. 4, p. 343-422, 1983.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHCHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

REDI, C. A.; GARAGNA, S.; ZACHARIAS, H.; ZUCCOTTI, M.; CAPANNA, E. The other chromatin. **Chromosoma**, v. 110, n. 2, p. 136-147, 2001.

SALIMENA, F. R. G.; ROMERO, M. E. M. Nuevos sinonimos para *limpia lasyocalycina* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v. 37, n. 2, p. 129-132, 1999.

SALIMENA, F. R. G.; SILVA, T. R. S. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v. 40, n. 1, p. 33-41, 2002.

SALIMENA, F. R. G. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* e *Lantana* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v. 40, n. 1, p. 24-32, 2002.

SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. **Harvard Paper in Botany**, v. 5, n. 3, p. 303-358, 2001.

SCHUBERT, I.; RIEGER, R. A new mechanism for altering chromosome number during karyotype evolution. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 70, n. 2, p. 213-221, 1985.

SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHWEIZER, D. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. **Plant Systematics and Evolution**, v. 134, n. 2, p. 293-297, 1980.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, v. 58, n. 3, p. 307-324, 1976.

SILVA, P. S. **Verbenaceae da Serra do Cipó**: aspectos biosistemáticos, químicos e farmacológico. 2008. 206 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

SOUSA, S. M. **Bandeamento cromossômico em *Lippia alba* (Verbenaceae)**. 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SKVARLA J. J. Techniques of pollen and spore electron microscopy. I. Staining, dehydration, and embedding. **Oklahoma Geological Notes**, v. 26, p.179-186, 1966.

STUESSY, T. F. Ultrastructural data for the practicing plant systematist. **Integrative and Comparative Biology**, v. 19, n. 6, p. 621-636, 1979.

SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. London: Unwin. Human, 1990. 434 p.

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

VICINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; COSTA, D. C. S.; ROMANEL, E. C.; SOUSA, S. M.; PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1, p. 1-4, 2005.

ZURITA, F.; JIMENEZ, R.; BURGOS, M.; GUARDIA, R. D. Sequential silver staining and in situ hybridization reveal a direct association between rDNA levels and the expression of homologous nucleolar organizer regions: a hypothesis for NOR structure and function. **Journal of Cell Science**, v. 111, n. 9, p. 1433-1439, 1998.

ZURITA, F.; JIMENEZ, R.; DIAZ DE LA GUARDIA, R.; BURGOS, M. The relative rDNA content of a NOR determines its level of expression and its probability of becoming active. A sequential silver staining and in situ hybridization study. **Chromosome Research**, v. 7, n. 5, p. 563-570, 1999.

WATANABE, K.; YAHARA, T.; DENDA, T.; KONSUGE, K. Chromosomal evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using

phylogenetic information. **Journal of Plant Research**, v. 112, n. 2, p. 145-161, 1999.