

**Bandeamento cromossômico em *Lippia alba***

**SAULO MARÇAL DE SOUSA**

**2006**

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

Sousa, Saulo Marçal de  
Bandeamento cromossômico em *Lippia alba* / Saulo Marçal de Sousa. --  
Lavras : UFLA, 2006.  
65 p. : il.

Orientador: Giovana Augusta Torees.  
Dissertação (Mestrado) – UFLA.  
Bibliografia.

1. Erva cidreira. 2. Bandeamento cromossômico. 3. Verbenaceae. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.88388

**SAULO MARÇAL DE SOUSA**

**Bandeamento cromossômico em *Lippia alba***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Citogenética Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”

Orientadora

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006

**SAULO MARÇAL DE SOUSA**

**Bandeamento cromossômico em *Lippia alba***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Citogenética Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”

APROVADA em 17 de Fevereiro de 2006

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

UFJF

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

UFLA

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS- BRASIL

Aos meus queridos pais, Hermínio (*in memoriam*) e Lúcia, pelo exemplo de vida e por serem os melhores pais que eu poderia ter; aos meus irmãos: Kátia, Fernanda, Humberto e Flávio, por todo apoio, carinho, atenção e união,

***DEDICO***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo mais belo dos presentes, a vida.

Aos meus pais, Hermínio (*in memoriam*) e Lúcia, por todo incentivo, presença em todos os momentos, pelo carinho, pelos ensinamentos, por tudo.

Aos meus irmãos, Kátia, Fernanda, Humberto e Flávio, por todo apoio, incentivo e amizade.

Ao professor Lyderson Facio Viccini, por me apresentar ao fabuloso mundo dos cromossomos, pela colaboração, confiança, incentivo, apoio, por todas as oportunidades e pela valiosa amizade.

À professora Giovana Augusta Torres, pela confiança e pela oportunidade de continuar meus estudos com a citogenética.

À professora Lisete Chamma Davide, por toda a atenção e gentileza.

À amiga Pâmela Souza Silva, pela empolgação, alegria e por toda ajuda neste trabalho.

Aos amigos Patrícia, Sarah e José Marcello, pelo companheirismo, pelas boas risadas e pelas contribuições ao longo desta jornada.

À amiga, baiana, Adriana Dias Cardoso, pelo companheirismo e pelo acesso de *Lippia alba* trazido de sua cidade.

A todos os colegas do Laboratório de Citogenética da UFLA e da UFJF.

A todos os funcionários da UFLA e do Departamento de Biologia.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de continuar meus estudos.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 A família Verbenaceae e o gênero <i>Lippia</i> .....	3
2.2 O gênero <i>Lippia</i> e seus aspectos químicos.....	4
2.3 A importância da identificação e do conhecimento de espécies que apresentam quimiotipos.....	5
2.4 <i>Lippia alba</i> e seus quimiotipos.....	5
2.5 Citogenética dos quimiotipos de <i>Lippia alba</i> .....	8
2.6 Bandeamento C e coloração com fluorocromos.....	9
2.7 Constrições secundárias e bandeamento com nitrato de prata.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Obtenção dos acessos de <i>Lippia alba</i> .....	14
3.2 Extração e análise química dos óleos essenciais.....	14
3.3 Análise citogenética.....	15
3.3.1 Pré-tratamento com bloqueador mitótico.....	15
3.3.2 Preparo das lâminas.....	15
3.3.3 Morfometria cromossômica.....	16
3.4 Metodologias de bandeamento cromossômico.....	16
3.4.1 Coloração com DAPI.....	16
3.4.2 Coloração com cromomicina (CMA <sup>3</sup> ).....	17
3.4.3 Técnica de bandeamento C.....	18
3.4.4 Técnica de bandeamento com nitrato de prata.....	18
3.5 Análise de imagens.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20

4.1 Morfometria cromossômica.....	20
4.2 Coloração sólida com giemsa, constrições secundárias, padrão de bandas com CMA 3 e atividade das regiões organizadoras de nucléolo .....	27
4.3 Coloração com DAPI, bandeamento C e polimorfismos cromossômicos entre os acessos de <i>Lippia alba</i> .....	39
4.4 Mapeamento físico da heterocromatina em <i>Lippia alba</i> .....	50
4.5 Análise química, quimiotipos e número cromossômico em <i>Lippia alba</i> .....	53
5 Conclusões.....	56
6 Referências bibliográficas.....	57

## RESUMO

SOUSA, Saulo Marçal de. **Bandeamento cromossômico em *Lippia alba***. 2006. 65p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.<sup>1</sup>

A espécie *Lippia alba*, Verbenaceae, caracteriza-se por apresentar quimiotipos com diferentes princípios ativos. Estudos citogenéticos têm sido realizados entre estes e têm demonstrado que os mesmos apresentam diferenças com relação ao número cromossômico. Apesar de tais estudos, pouco se sabe sobre a organização da heterocromatina nesta espécie. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar 5 acessos de *Lippia alba* com  $2n=30$  cromossomos por técnicas de bandeamento cromossômico. Para isso foram obtidas metáfases de meristemas radiculares de cada acesso com subsequente aplicação das técnicas de bandeamento com fluorocromos DAPI e CMA<sub>3</sub>, bandeamento C e bandeamento com o nitrato de prata. Todos os acessos apresentaram a seguinte fórmula cariotípica: 10m e 5sm. Destes, 3 pares apresentaram constrições secundárias (pares 2, 5 e 11), os quais são CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. Em contrapartida, apenas 2 pares (5 e 11) apresentaram atividade nucleolar quando submetidos à coloração com o nitrato de prata. Tal fato, mais a observação de um número máximo de quatro nucléolos na intérfase, indica que, na espécie estudada, existem dois pares de RONS ativas. O bandeamento C e a coloração com DAPI demonstraram um padrão coincidente de bandas, sendo as bandas observadas com o fluoro cromo DAPI maiores que as bandas C em alguns acessos. Apesar dos acessos terem apresentado uma grande semelhança cariotípica, foram encontrados números diferentes de bandas em cada um deles, assim como diferentes percentuais de heterocromatina. Muitas destas diferenças devem-se à degradação dos cromossomos em resposta aos tratamentos utilizados com o bandeamento C. Alguns polimorfismos observados, no entanto, parecem não ser devido à técnica. Além dos resultados obtidos com os estudos citogenéticos, por meio da análise química foi possível observar que dois dos acessos são diferentes com relação aos seus compostos majoritários. A partir de tais observações concluiu-se que o número cromossômico não está relacionado com quimiotipos específicos e que esta variação química, provavelmente, ocorre por meio de algum mecanismo de controle genético.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Profa Giovana Augusta Torres (Orientador), Lyderson Facio Viccini (Co-orientador)

## ABSTRACT

SOUSA, Saulo Marçal de. **Chromosome banding in *Lippia alba***. 2006, 65p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Plant Breeding). Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.<sup>2</sup>

The specie *Lippia alba* (Verbenaceae) shows variation on chemical compounds of essential oil, being recognized different chemotypes. Cytogenetics studies carried on these chemotypes have been showing that they present different number of chromosomes. However, little information about heterochromatin organization is available about this specie. The aim of this study, was to characterize 5 accesses of *Lippia alba* with  $2n= 30$  chromosomes, regarding to their heterochromatic pattern, using banding techniques. Metaphases were obtained from root tips and submitted to DAPI, CMA<sub>3</sub>, AgNOR and C banding procedures. All accesses showed 10 median and 5 sub-median chromosomes, 1 to 10 and 11 to 15 pairs, respectively. Pairs 2, 5 and 11 showed satellites and their constrictions were CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. On the other hand, only 2 pairs were positive for AgNOR (pairs 5 and 11). The maximum of 4 nucleolus was observed in interphase nuclei, while only two bivalents were associated with the nucleolus in diakinesis. These observation reveal only two pairs of active NORs in *Lippia alba*. Bands revealed by C and DAPI techniques were located at the same sites in telomeres and centromers of all chromosomes, but did not coincide in length, since DAPI bands were larger than CMA<sub>3</sub> ones. This can be result of chromosome degradation resulted from the procedure to obtain C band pattern. Other kinds of polymorphism were observed, revealing variability in karyotype among access. The chemical analysis of oil extracted from the accesses showed differences on principal compounds among accesses. Therefore, the association between chromosome number and chemotype were not verified as proposed in previous works. This suggest that variation on essential oil may be related to genetic control rather than to differences on karyotype.

---

<sup>2</sup> Guiding committee: Profa Giovana Augusta Torres (Major Professor), Lyderson Facio Viccini

## 1 INTRODUÇÃO

Pertencente à família Verbenaceae, *Lippia alba* está presente em todas as regiões do Brasil, sendo amplamente utilizada como medicinal.

Seu rico potencial farmacológico está relacionado à ampla variação química de seu óleo essencial. Tal variação permite, até mesmo, a separação desta espécie em quimiotipos, os quais podem ser delimitados de acordo com o componente químico majoritário presente em seus óleos essenciais.

Atualmente, dentre os diversos quimiotipos descritos para esta espécie, três são bem estudados no Brasil, apresentando seus óleos essenciais ricos em citral, carvona ou linalol.

Além da variação química, estes quimiotipos também apresentam algumas variações morfológicas. Tais variações foram observadas de acordo com a distribuição geográfica dos mesmos, o que levou vários autores a acreditarem que esta variabilidade está relacionada à plasticidade fenotípica da espécie.

No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que, quando expostos ao mesmo ambiente, tais quimiotipos mantêm suas diferenças químicas e morfológicas, demonstrando que esta variabilidade é, em grande parte, controlada geneticamente.

Estudos citogenéticos têm mostrado que os quimiotipos citral, carvona e linalol apresentam diferentes números cromossômicos:  $2n=30$ ,  $2n=60$  e  $2n=12-60$  (mixoplóide), respectivamente.

Apesar destas observações, trabalhos comparando diferentes acessos de cada quimiotipo ainda não foram realizados. Os únicos realizados até o momento apresentam controvérsias em relação à classificação dos cromossomos, assim como a posição de alguns marcadores cromossômicos (construção secundária, por exemplo) em diferentes populações com  $2n=30$

cromossomos. Tais observações evidenciam que diferentes acessos desta espécie podem apresentar polimorfismos cromossômicos.

O objetivo do presente trabalho foi comparar cinco acessos de *L. alba* com  $2n=30$  cromossomos, por meio de técnicas de bandeamento cromossômico, tendo como finalidade detectar possíveis polimorfismos cromossômicos entre os mesmos, estabelecer técnicas de bandeamento C, Ag NOR e verificar o padrão de bandas obtidos com os fluorocromos DAPI e CMA.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A família Verbenaceae e o gênero *Lippia*

A família Verbenaceae, subfamília Verbenoideae, apresenta aproximadamente 36 gêneros e 1.035 espécies. Os gêneros mais representativos são: *Verbena* (200 spp.), *Lippia* (150), *Citharexylum* (70), *Stachytarpheta* (70), *Glandularia* (60) e *Duranta* (30) (Judd *et al.*, 2002).

Além do grande número de espécies representantes, possui também uma ampla distribuição pelas regiões tropicais e temperadas das Américas, África e Índia; os principais centros de diversidade são a América do Sul, o México e a Cordilheira dos Andes (Sanders, 2001, Judd *et al.*, 2002).

O gênero *Lippia*, o segundo maior da família, reúne espécies herbáceas, arbustivas e pequenas árvores que estão distribuídas por toda América do Sul, América Central e territórios intertropicais do continente africano (Troncoso, 1974, Terblanché e Kornelius, 1996, Salimena, 2000). Além de se destacar pela grande diversidade botânica e ampla distribuição, este gênero vem recebendo importante atenção por apresentar espécies que podem ser utilizadas para os mais diversos fins. Dentre estes, um grande número de espécies se destaca por apresentar propriedades medicinais comprovadas, possuindo efeitos contra a malária (Gasquet *et al.*, 1993), efeito antiviral (Abad *et al.*, 1995), atividade citostática (López *et al.* 1979, Slowing Barillas, 1992, Klueger *et al.* 1997), assim como ação sedativa, diurética, anti-reumática, antiinflamatória, miorelaxante e outras (Morton 1981, Costa 1998, Vale *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2000; Viana *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2001).

Algumas espécies também têm sido usadas na indústria alimentícia na produção de aromatizantes, temperos e na produção de cosméticos e perfumes (Stashenko *et al.*, 2003).

Apesar de muitas espécies apresentarem tais utilidades, várias outras

ainda não foram estudadas e, de acordo com alguns autores (Abad *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.

## 2.2 O gênero *Lippia* e seus aspectos químicos

Dentre os grupos de substâncias naturais mais estudados e utilizados para os diversos fins citados anteriormente, estão os óleos essenciais (Pascual *et al.*, 2001). Fisicamente, estas substâncias são líquidas, voláteis e geralmente com um aroma agradável e intenso, podendo ser incolores ou ligeiramente amareladas (Raven *et al.*, 2001, Lima *et al.*, 2003). Na maioria dos vegetais, os óleos essenciais são ricos em terpenóides, e sua composição na maioria das plantas, inclui uma mistura de várias substâncias (Larcher 2000).

Com relação à composição química destes óleos em espécies de *Lippia*, estudos com várias técnicas têm mostrado que os componentes mais comuns, na maioria das espécies, são: limoneno,  $\beta$  criofileno, *p*-cimeno, cânfora, linalol,  $\alpha$ -pineno, ácido ferúlico e timol (Lemos *et al.*, 1992; de Vincenzi *et al.*, 1995; Catalán e Lampasona 1995; Terblanché e Kornelius 1996; Fricke *et al.*, 1999, Pascual *et al.*, 2001).

Outros estudos revelaram também que algumas espécies de *Lippia* podem apresentar grande variabilidade na composição química de seus óleos essenciais, como é o caso de *L. ukambensis*, *L. junelliana*, *L. chevalieri*, *L. multiflora* e *L. alba* (Vale *et al.*, 1999; Juliani-Jr *et al.*, 2002, Theis e Lerdau 2003). Tais variações têm levado à separação destes táxons em “raças químicas” ou quimiotipos, havendo sempre um componente químico majoritário que os caracteriza (Pascual *et al.*, 2001, Tavares, 2003).

### **2.3 Importância da identificação e do conhecimento de espécies medicinais que apresentam quimiotipos**

A taxa de variação do princípio ativo em uma espécie medicinal deve ser muito pequena para que o medicamento produzido a partir da mesma seja seguro e eficaz (Lima *et al.*, 2003). Portanto, a identificação e a correta classificação de quimiotipos, os quais apresentam princípios ativos diferentes em plantas medicinais, são de grande importância para a manutenção da qualidade, planejamento de cultivo e para a obtenção de fitofármacos que não prejudiquem a saúde de quem venha a utilizá-los (Pascual *et al.*, 2001, Lima *et al.*, 2003).

Essa diversidade do óleo essencial em algumas espécies pode resultar da ação de diversos fatores, tais como a variabilidade genética, fatores ecológicos e ambientais (luz, temperatura, umidade e altitude), herbivoria e outros (D'Andrea *et al.*, 1995).

Conhecendo a causa de tais variações, o homem pode se beneficiar de diversas formas, pois, tanto a seleção de genes como a de regimes ambientais ótimos podem ser utilizadas para aumentar a produção de metabólitos secundários, assim como a produtividade e a pureza das substâncias desejadas (Lima *et al.*, 2003).

Dentre as espécies de *Lippia*, aquela com quimiotipos mais bem delimitados e conhecidos é *Lippia alba* (Ricciard *et al.* 2000) que é também conhecida no Brasil como erva-cidreira, falsa-melissa, chá-de-tabuleiro, erva-cidreira-do-campo, salva-do-Brasil, salva-limão e erva-cidreira-brava (Rao *et al.* 2000).

### **2.4 *Lippia alba* e seus quimiotipos**

*Lippia alba* é uma planta arbustiva com ampla distribuição nas Américas Central e do Sul, sendo encontrada em praticamente todas as regiões do Brasil. Esta espécie apresenta inúmeras propriedades medicinais e seus constituintes

químicos podem conferir ação sedativa, antiespasmódica, estomáquica, diurética, anti-reumática, antiinflamatória, analgésica e anti-séptica, entre outras (Bezerra, 1981, Gomes, 1990, Viana, 2000).

Como citado anteriormente, a espécie apresenta uma inconstância nos seus constituintes químicos. A composição química dos óleos essenciais de seus quimiotipos sofre uma variação quantitativa e qualitativa, conferindo-lhes diferentes propriedades farmacológicas (Matos *et al.* 1996, Frigheto *et al.* 1998, Zoghbi *et al.* 1998).

Segundo Ricciard *et al.* (2001), na Argentina, são conhecidos cinco quimiotipos de *Lippia alba* que são encontrados em diversas regiões com diferentes características climáticas, diferentes tipos de solo e com variado grau de umidade. Estes cinco quimiotipos são: La citral/linalol, La d-limoneno/lippiona, La d-piperitona, La citral e La piperitona/limoneno + 1,8 cineol.

No Brasil, por outro lado, atualmente, distinguem-se três quimiotipos com base nas variações qualitativas e quantitativas dos teores de citral, carvona, e linalol. Alguns autores, como Tavares *et al.* (2005), Santos-Mendes (2001) e outros, denominam estes quimiotipos de forma arbitrária. Aqui, serão denominados La1, La2 e La3, respectivamente para os componentes majoritários citral, carvona e linalol.

Vários estudos têm mostrado as diferentes propriedades de cada um destes quimiotipos. Dentre estes, Vale *et al.* (1999) detectaram efeito ansiolítico e hipotérmico para o óleo essencial do quimiotipo La1. Viana *et al.* (2000) também observaram efeito analgésico e antidematogênico.

Segundo Tavares (2003), o quimiotipo La2 possui ações nematocida, bacteriostática, bactericida e fungicida, e a carvona, encontrada em La2, tem efeito alelopático sobre o brotamento de batatas, diminuindo a taxa de brotos quando o óleo essencial é aplicado aos tubérculos.

Para o quimiotipo La3, são descritas inúmeras funções, tais como efeitos sedativos, propriedade hipnótica, hipotérmica, anticonvulsivante, antiinflamatória, analgésica, antifúngica, inseticida e atividade contra linhagens de células de leucemia e linfomas humanos (Andrada *et al.*, 1998, Elizabetsky *et al.*, 1999, Re *et al.*, 2000, Chiang *et al.*, 2003, Tavares, 2003, Tavares *et al.*, 2005). Além de ser utilizado farmacologicamente, outra característica do linalol é que ele também é essencial para a fabricação de vários perfumes e cosméticos (Frighetto *et al.*, 1998).

Além desta variação química, tais quimiotipos também apresentam variações no que diz respeito à sua morfologia. Estudos mostraram que os três quimiotipos diferenciam-se, principalmente, em relação ao tamanho, à textura das folhas e à coloração das flores (Tavares, 2003). Outras observações revelaram também que alguns caracteres anatômicos e histoquímicos estão sujeitos a grandes variações resultantes de adaptações às condições ambientais dos locais de origem (Correa, 1992).

Santos-Mendes (2001) observou que a plasticidade fenotípica em *L. alba* poderia estar relacionada à sua ampla distribuição pelos mais diversos ambientes. Para muitos autores, os resultados obtidos no estudo dos principais componentes do óleo essencial de *L. alba* nem sempre são os mesmos devido ao efeito de fatores ambientais e metodológicos utilizados (Matos *et al.*, 1996, Correa, 1992). No entanto, Sanders (2001) relata que perfis de óleos essenciais em Verbenaceae são diversificados e altamente específicos para as espécies da família.

Como as variações morfológicas e da composição química do óleo essencial têm sido observadas dependendo da origem geográfica do material analisado, muitas hipóteses apontam para o fato de que elas sejam causadas principalmente pelo ambiente ao qual a planta está submetida (Santos-Mendes 2001). Porém, Tavares *et al.* (2005) verificaram que os três quimiotipos La1,

La2 e La3, obtidos em diferentes procedências, mantiveram suas diferenças químicas e morfológicas, mesmo quando submetidos às mesmas condições ambientais em experimentos bem delineados em casa de vegetação. Tal fato indica que as variações são de cunho genético e não apenas ambiental. Estes resultados foram reforçados pelos resultados observados por Pierre (2004), que demonstrou, por meio de marcadores moleculares e análises citogenéticas, que tais quimiotipos apresentam diferenças genéticas.

## **2.5 Citogenética dos quimiotipos de *Lippia alba***

O primeiro relato sobre a citogenética da espécie *Lippia alba* se refere apenas ao número cromossômico, quando Bose e Choudhy (1960) observaram  $2n=30$  cromossomos.

Brandão (2003), ao realizar estudos cariológicos nesta espécie, verificou que esta apresenta onze pares de cromossomos metacêntricos (pares cromossômicos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14 e 15) e quatro pares submetacêntricos (pares cromossômicos 8, 9, 11 e 13). Dentre estes, foi observado que as constrições secundárias localizam-se nos braços curtos dos pares cromossômicos 2 e 5.

Pierre (2004), ao estudar a cariologia dos quimiotipos La1, La2 e La3, observou que os mesmos apresentam-se diferentes em relação ao número e morfologia dos cromossomos. Foi observado que o quimiotipo La1 citral apresenta  $2n=30$  cromossomos, o que corresponde ao primeiro número relatado para *L. alba* (Bose e Choudhry, 1960). No entanto, seis pares mostraram-se metacêntricos (pares cromossômicos do 1 ao 6) e 9 pares submetacêntricos (pares cromossômicos do 7 ao 15), tendo os pares 5 e 11 apresentado constrições secundárias nos braços curtos diferentemente do que foi observado por Brandão (2003).

Para o quimiotipo La2 carvona, verificou-se número cromossômico de

$2n=60$ , levando Pierre (2004) a inferir que este quimiotipo poderia ser um autopoliplóide do quimiotipo La1. Como não houve semelhança entre o cariótipo deste quimiotipo com aquele de La1, sugeriu-se que, durante o processo de poliploidização, vários rearranjos estruturais teriam ocorrido nos cromossomos de La2, diferindo-os dos cromossomos de La1. Por outro lado, tais rearranjos ainda não foram identificados.

Com relação ao quimiotipo La3 linalol, Pierre (2004) observou variação numérica dentro dos próprios indivíduos estudados,  $2n=12$  a  $60$ , tratando-se, portanto, de um quimiotipo mixoplóide.

Como se pode observar, os quimiotipos de *Lippia alba* são extremamente variáveis entre si no que diz respeito às suas características cromossômicas. No entanto, trabalhos que comparem acessos de um mesmo quimiotipo, a fim de confirmar se estas características cromossômicas numéricas e morfológicas sejam constantes para cada quimiotipo, ainda não foram realizados.

Além das diferenças numéricas observadas entre os três quimiotipos por Pierre (2004), pode-se observar que existe também um polimorfismo cromossômico estrutural, entre acessos diferentes de um mesmo quimiotipo, visto que foram observadas diferentes classificações cromossômicas nos trabalhos realizados por Brandão (2003) e Pierre (2004).

Sob ponto de vista técnico, uma boa ferramenta que elucidaria alguns dos fatos observados seriam as técnicas de bandeamentos cromossômicos, as quais ainda não foram aplicadas com sucesso em *Lippia alba*.

## **2.6 Bandeamento C e coloração com fluorocromos**

As técnicas de bandeamento cromossômico com giemsa (bandeamento C) ou com os fluorocromos permitem uma análise mais detalhada do cariótipo, uma vez que coram diferencialmente regiões específicas dos cromossomos,

sendo, por isso, reconhecidas como técnicas de diferenciação longitudinal (Vosa, 1985).

Entre as técnicas que permitem a análise da heterocromatina, as mais empregadas em vegetais são o bandeamento C e a coloração com os fluorocromos CMA e DAPI (Sumner, 1990).

A utilização de fluorocromos nas análises cromossômicas a partir do final da década de 1960 permitiu identificar diferentes tipos de heterocromatina com base na propriedade de corarem mais ou menos intensamente os segmentos cromossômicos ricos em determinados pares de bases (Schweizer, 1976; Vosa, 1985, Sumner, 1990).

Os fluorocromos mais empregados na citogenética vegetal são a quinacrina e a cromomicina A<sub>3</sub> (específicos para regiões ricas em GC), assim como o Hoechst 33258 e o DAPI (específicos para regiões ricas em AT) (Guerra e Souza, 2002).

Alguns táxons com cariótipo estável, quando observados com técnicas de coloração convencionais, podem revelar uma intensa variação estrutural quando analisados com bandeamento C ou com fluorocromos. É o caso, por exemplo, do gênero *Cycas*, que apresenta número e morfologia cromossômica bastante estável, possuindo, no entanto, uma quantidade variável de heterocromatina em diferentes espécies (Kokubugata e Kondo, 1996).

Técnicas de bandeamento podem auxiliar 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 e Hossain (1997) verificaram que alguns tetraplóides neste gênero apresentam um 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 falcata*, respectivamente.

Em alguns programas de melhoramento de *Citrus*, a utilização de fluorocromos, principalmente CMA, tem sido amplamente empregada para a identificação de híbridos somáticos ainda *in vitro* (Miranda *et al.*, 1997), assim como a identificação de *Citrus* de origem nucelar ou zigótica (Pedrosa *et al.*, 2000).

Em estudos de citotaxonomia, as técnicas de bandeamento também possibilitam a confirmação da presença de cromossomos B em algumas espécies, uma vez que a maioria dos cromossomos B já descritos é extremamente heterocromática em sua extensão (Hossain e Bauchan, 1999, Jones e Houben, 2003).

Estas técnicas também têm auxiliado na identificação e no entendimento dos tipos de alterações em plantas que apresentam polimorfismos cromossômicos. Svetlana *et al.* (2000), ao estudarem o padrão de bandas N, em oito acessos de *Aegilops geniculata*, observou que os mesmos apresentam polimorfismos cromossômicos em seu padrão de bandas N. Alguns acessos apresentavam bandas terminais não encontradas em outros, os quais apresentavam, por sua vez, bandas intersticiais não encontradas naqueles. A partir destes dados e outros de morfometria cromossômica, o autor conseguiu identificar translocações e inversões nos cromossomos destes acessos.

Vários autores especulam que polimorfismos cromossômicos podem estar relacionados com o fenótipo de alguns vegetais (Vosa, 1974, Weimarck, 1975, Lelley *et al.*, 1978, Sumner, 1990). Heneen e Brismar (1987), por exemplo, observaram que linhagens de trigo que apresentavam blocos heterocromáticos terminais apresentavam grãos maiores do que linhagens cujos cromossomos não apresentavam heterocromatina terminal. Rayburn *et al.* (1985), observaram, a partir do padrão de bandas C, que linhagens de milho obtidas de regiões geográficas distintas apresentavam quantidades diferentes de heterocromatina. As linhagens, quando submetidas aos mesmos tratamentos de

cultivo, que apresentavam pouca heterocromatina, alcançavam a maturidade mais rápido que aquelas com muita heterocromatina. Para os autores, as linhagens com menos heterocromatina apresentavam um ciclo celular mais rápido, levando as plantas a um desenvolvimento adiantado.

Brandão (2003), ao utilizar fluorocromos e a técnica de banda C, observou que *Lippia alba* é uma espécie muito rica em heterocromatina constitutiva. No entanto, em nenhum momento, o mapeamento da heterocromatina nos cromossomos desta espécie foi mencionado. A realização deste mapeamento em *Lippia alba* seria mais um passo para o entendimento cariológico da mesma, uma vez que a espécie apresenta variantes cromossômicas.

## **2.7 Condições secundárias e bandeamento com nitrato de prata**

A coloração com nitrato de prata, em condições adequadamente controladas, é um método altamente seletivo para a coloração de nucléolos interfásicos e regiões organizadoras de nucléolos (constricções secundárias ou outras regiões com sítios responsáveis pela transcrição de RNA ribossomal, também denominados RON) em cromossomos (Sumner, 1990), apesar da técnica de FISH ser mais utilizada devido à sua maior especificidade.

A grande limitação desta técnica é o fato do nitrato de prata marcar apenas as regiões organizadoras de nucléolo que foram ativamente transcritas durante as intérfases precedentes às metáfases analisadas (Sumner, 1990), não possibilitando, muitas vezes, a demonstração do número real de RONS.

A técnica também se destina ao estudo do comportamento nucleolar durante o ciclo celular (Sumner, 2003). Na maioria das espécies, esta organela se desintegra no final da prófase. No entanto, vários autores utilizando o nitrato de prata para a marcação de nucléolos, têm demonstrado que, em algumas espécies,

estes não se desintegram e podem permanecer até mesmo durante a anáfase e a telófase (Murugesan *et al.*, 2001).

O estabelecimento da coloração de RON em *Lippia alba* com nitrato de prata ainda não foi obtido. Esta técnica poderia ser um ferramenta útil para a análise de acessos destes quimiotipos, tanto para a localização das RONs nas metáfases, como na sua atividade. Além disso, tal técnica poderia ajudar na identificação de possíveis polimorfismos relacionados à posição destes marcadores em *Lippia alba*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção dos acessos de *Lippia alba*

Cinco acessos de *Lippia alba*, contendo  $2n=30$  cromossomos foram obtidos de diferentes locais. Na Tabela 1 estão indicadas as procedências de cada um deles.

**TABELA 1.** Procedências dos acessos de *Lippia alba*

ACESSO	CIDADE DE ORIGEM	ESTADO
LaCat	Cataguases	Minas Gerais
LaGua	Guarani	Minas Gerais
LaJF	Juiz de Fora	Minas gerais
LaRJ	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro
LaVC	Vitórias da Conquista	Bahia

Os acessos LaCat, LaGua, LaJF e LaRJ foram multiplicados na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG e, após a obtenção de mudas, cinco réplicas de cada um destes quatro acessos foram encaminhadas para a Universidade Federal de Lavras, MG, (UFLA) onde foram mantidas em casa de vegetação. O acesso LaVC foi multiplicado a partir de estacas recebidas na própria UFLA.

#### 3.2 Extração e análise química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, empregando-se extrator descrito na Farmacopéia Brasileira, IV edição, durante 2 horas, para cada um dos acessos a partir da trituração de 80g de folha dos mesmos.

A análise por cromatografia com fase gasosa (CG) foi efetuada sob as seguintes condições: coluna capilar Supleco DB 5 de 30m com o hélio como gás de arraste; temperatura do injetor de 200°C, temperatura do detector 250°C,

aquecimento da coluna programado para 50° a 200°C com velocidade de aquecimento de 4°C/min. A análise por CG foi realizada acoplado ao espectrômetro de massa Shimadzu QP5050A com temperatura da interface de 220°C e o tamanho dos fragmentos a serem detectados de 40 a 300 m/z. Para cada acesso foi analisada uma amostra composta do óleo de vários indivíduos.

### **3.3 Análise citogenética**

#### **3.3.1 Pré-tratamento com bloqueador mitótico**

Para a obtenção de cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos, foram coletadas estacas dos cinco acessos. Estas foram mantidas em sistemas de hidroponia à temperatura ambiente até a formação de raízes. Em seguida, as raízes foram submetidas à pré-tratamentos com 8-hidroxiquinoleína (3mM) por 8 horas a 4°C. Após o tratamento, as raízes foram secas e fixadas em metanol-ácido acético 3:1 por, no mínimo, 24 horas.

#### **3.3.2 Preparo das lâminas**

As raízes foram submetidas à maceração enzimática em uma solução contendo celulase 4% e pectinase 40% durante 4 horas e meia, a 37°C. As lâminas foram preparadas por meio da técnica de secagem ao ar com maceração enzimática (Carvalho, 1995). Em seguida, foram analisadas em microscopia de luz (microscópio Olympus BX 60), sob contraste de fase. As metáfases completas e os núcleos interfásicos mais espalhados na lâmina foram marcados em lâmina guia.

Em seguida, as lâminas foram colocadas em estufa a 28°C e foram envelhecidas por, no mínimo, sete dias antes de serem submetidas às técnicas de bandeamentos.

Para a observação de metáfases em coloração sólida com giemsa, após a confecção das lâminas, as mesmas foram imersas diretamente em solução de

giemsa a 5% em tampão fosfato pH 6,8, à temperatura ambiente, por 5 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram secas ao ar e analisadas ao microscópio.

### **3.3.3 Morfometria cromossômica**

Para cada acesso, foram avaliadas 10 metáfases para cada técnica aplicada. A partir destas metáfases, foram obtidas as medidas de comprimento total dos cromossomos (CT= comprimento do braço curto+comprimento do braço longo) e o comprimento dos braços cromossômicos. Além disso, foi medido o percentual de heterocromatina em cada acesso.

Para a confecção dos ideogramas foram utilizados os seguintes parâmetros: tamanho relativo (TR= comprimento total do cromossomo individual x 100/comprimento total do genoma), índice centromérico (IC= comprimento do braço curto x 100/comprimento do braço longo+comprimento do braço curto) e relação de braços (RB= comprimento do braço longo/comprimento do braço curto) e comprimento total do lote haplóide (CTLH). Os cromossomos foram classificados segundo Levan *et al.*(1964).

## **3.4 Metodologias de bandeamento cromossômico**

### **3.4.1 Coloração com DAPI**

Para a obtenção do padrão de bandas com o fluorocromo DAPI, utilizaram-se os protocolos descritos por Schweizer (1976), Sumner (1990) e Fukui e Nakayama (1996), com algumas modificações.

Após os sete dias de envelhecimento, as lâminas foram coradas com solução de 4,6-diamidino-2-phenilindole (Sigma<sup>TM</sup>), à temperatura ambiente, em câmara úmida, no escuro, por 20 minutos. A solução foi preparada momentos antes do uso, na concentração de 1µg/ml em solução tampão McIlvaine pH 7,0. Após a coloração, a preparação foi lavada com o mesmo tampão e seca ao ar.

Duas gotas do tampão foram depositadas sobre as lâminas, as quais foram cobertas, posteriormente, com lamínula. O excesso de tampão foi removido, pressionando-se cuidadosamente a lâmina e a lamínula entre papel-filtro. Em seguida, a lamínula foi vedada com esmalte incolor. O material foi imediatamente observado em microscópio equipado com acessório de fluorescência, utilizando-se comprimento de onda entre 360 e 390 nm.

### **3.4.2 Coloração com cromomicina (CMA<sub>3</sub>)**

O seguinte protocolo foi realizado a partir de pequenas modificações dos protocolos desenvolvidos por Sumner (1990) e Fukui e Nakayama (1996): preparações envelhecidas por 7 dias, previamente incubadas em tampão McIlvaine pH 7,0 contendo 0,5mM de MgCl<sub>2</sub>, por 20 minutos, foram coradas com cromomicina A<sub>3</sub>-CMA (Sigma<sup>TM</sup>), em câmara úmida, no escuro e à temperatura ambiente.

A solução de CMA foi preparada em concentração de 0,1 mg/ml, em tampão McIlvaine contendo 0,5mM de MgCl<sub>2</sub>, e armazenada em geladeira por, no mínimo, 24horas antes do uso. Após 30 minutos de coloração, as lâminas foram lavadas cuidadosamente com solução-tampão e secas ao ar. A mesma solução-tampão contendo MgCl<sub>2</sub> foi utilizada para a montagem da lâmina que foi coberta com lamínula e vedada com esmalte incolor. Para estabilizar a fluorescência, as lâminas ficaram armazenadas em geladeira (4°C) por, no mínimo, 24horas e, em seguida, foram examinadas em microscópio de fluorescência, usando comprimento de ondas de 430 a 480 nm.

Algumas lâminas anteriormente utilizadas para o bandeamento com DAPI foram descoradas em três baterias de álcool absoluto, durante trinta minutos e, em seguida, foram submetidas ao protocolo descrito para o bandeamento com CMA. Assim, foi possível a coloração seqüencial de algumas metáfases.

### **3.4.3 Técnica de bandeamento C**

O protocolo utilizado para técnica de bandeamento C foi o estabelecido por Schwarzacher *et al.* (1980), com algumas modificações.

Após o período de envelhecimento, as lâminas foram incubadas em ácido acético 45%, a 65°C. Em seguida, foram lavadas em água destilada por 30 minutos, em 5 baterias de lavagem. Posteriormente, realizou-se incubação das mesmas em solução de hidróxido de bário 5% por 25 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente por 30 minutos em água destilada, em 5 baterias de lavagem. As lâminas lavadas foram incubadas em 2xSSC a 65°C por uma hora e trinta minutos e lavadas em água destilada por 15 minutos, em 3 baterias de lavagem. Finalmente, as lâminas foram secas e coradas em giemsa 10% por, no mínimo, 10 minutos.

### **3.4.4 Técnica de bandeamento com nitrato de prata**

O método utilizado para a marcação de RONS (regiões organizadoras de nucléolo) e nucléolos com nitrato de prata foi o proposto por Howell e Black (1980), com algumas modificações.

Para esta técnica foi preparado um meio coloidal com gelatina incolor, em que 2g de gelatina foram dissolvidas em 100 ml de água deionizada. Após a total dissolução da gelatina, foram acrescentados ao meio, 2ml de ácido fórmico. Em seguida, foi preparada uma solução de nitrato de prata a 40% em água deionizada.

Para coloração das RONS e nucléolos, duas gotas da solução coloidal foram colocadas sob a lâmina e, em seguida, mais quatro gotas de nitrato de prata a 40%. As lâminas foram cobertas com lamínula e colocadas em câmara úmida a 45°C, por cerca de 30 minutos. A coloração dos nucléolos foi monitorada a cada 10 minutos, sob microscópio e com a marcação dos mesmos,

as lâminas foram lavadas por 30 min em água corrente e 10 minutos em água destilada.

Algumas lâminas utilizadas para o bandeamento com CMA foram descoradas em três baterias de álcool absoluto e submetidas à técnica de bandeamento com nitrato de prata, possibilitando, assim, a coloração seqüencial de algumas metáfases.

Além de ter sido aplicada às células mitóticas, esta técnica foi aplicada também em células meióticas. Para a obtenção dos meiócitos, foi utilizada a técnica de secagem ao ar com maceração enzimática adaptada para plantas de flores de tamanho reduzido (Praça *et al.*, 2000).

### **3. 5 Análise de imagens**

Todas as metáfases e núcleos interfásicos analisados foram capturados por uma câmara digital acoplada ao microscópio Olympus Bx 60 e analisadas pelo programa Image Pro-Plus versão 4.5 (Media Cybernetics).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Morfometria cromossômica

Os cinco acessos estudados no presente trabalho apresentaram  $2n=30$  cromossomos. Dentre estes, aquele que apresentou o maior cromossomo, cromossomo 1, foi LaCat, cujo comprimento total foi de 6,59  $\mu\text{m}$ . Em contrapartida, o acesso com o menor cromossomo, cromossomo 15, foi LaGua, cujo comprimento total foi de 2,52  $\mu\text{m}$ .

Todos os acessos estudados apresentaram uma morfologia cromossômica muito semelhante, com a seguinte fórmula cariotípica: 10M (metacêntrico) e 5SM (submetacêntrico). Dos quinze pares de cromossomos, do 1 ao 10, todos foram metacêntricos, sendo que, dos pares 11 ao 15, todos foram submetacêntricos.

Com relação ao comprimento total do lote haplóide, foi observado que o acesso que apresentou o maior tamanho foi LaCat com 67,99  $\mu\text{m}$ , enquanto o menor tamanho foi observado para o acesso LaRJ, cujo tamanho foi de 52,54  $\mu\text{m}$ . Tal variação se deve, principalmente, à variação no grau de condensação dos cromossomos nos acessos estudados, visto que o tamanho relativo dos cromossomos, quando comparados entre os acessos, foi muito próximo. Todos os dados relacionados à morfometria dos cromossomos podem ser observados nas Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6.

Resultados semelhantes foram observados por Linde-Laursen & Ole Seberg (2001), entre acessos de *Elymus scabrifolius*. Estes autores observaram diferentes valores para o tamanho total do complemento haplóide e dos cromossomos entre os acessos. No entanto, os tamanhos relativos dos cromossomos foram muito próximos, indicando com isso, que as diferenças eram somente devido à condensação dos cromossomos.

As classificações propostas, em relação à posição do centrômero em *Lippia alba*, por Brandão (2003) e Pierre (2004) são discordantes, levantando

com isso a hipótese de rearranjos estruturais entre as respectivas populações estudadas. Diferente destes autores, comparando-se diferentes populações desta espécie, observa-se que a mesma apresenta um cariótipo muito semelhante, não havendo diferenças na classificação dos cromossomos entre os acessos estudados.

**TABELA 2.** Dados morfológicos dos cromossomos do acesso LaCat Lavras, 2006.

ACESSO LaCat							
PAR	BC	BL	CT	TR%	RB	IC	CC
1	2,83	3,53	6,59	9,69	1,24	42,94	MT
2	2,51	3,43	5,94	8,73	1,36	42,25	MT
3	2,4	3,37	5,77	8,48	1,40	41,59	MT
4	2,1	3,53	5,63	8,28	1,68	37,30	MT
5	1,81	2,93	4,74	6,97	1,61	38,18	MT
6	1,74	2,82	4,56	6,70	1,62	38,15	MT
7	1,73	2,94	4,67	6,86	1,69	37,04	MT
8	1,53	2,54	4,07	5,98	1,66	37,59	MT
9	1,54	2,51	4,05	5,95	1,62	38,02	MT
10	1,34	2,21	3,55	5,22	1,64	37,74	MT
11	1,33	2,62	3,95	5,80	1,96	33,67	SM
12	1,27	2,25	3,52	5,17	1,77	36,07	SM
13	1,25	2,92	4,17	6,13	2,33	29,97	SM
14	1,18	2,68	3,86	5,67	2,27	30,56	SM
15	0,89	2,03	2,92	4,29	2,28	30,47	SM
CTHL					67,99		

BC= comprimento do braço curto ( $\mu\text{m}$ ); BL= comprimento do braço longo ( $\mu\text{m}$ ); CT= comprimento total do cromossomo ( $\mu\text{m}$ ); TR= tamanho relativo; RB= relação de braços; IC= índice centromérico; CC= classificação centromérica; MT= metacêntrico; SM= submetacêntrico; CTLH = comprimento total do lote haplóide ( $\mu\text{m}$ );

**TABELA 3.** Dados morfométricos dos cromossomos do acesso LaGua Lavras, 2006.

ACESSO LaGua							
PAR	BC	BL	CT	TR%	RB	IC	CC
1	2,16	2,52	4,68	8,47	1,16	46,15	MT
2	2,02	2,78	4,8	8,6	1,37	42,08	MT
3	2	2,27	4,27	7,72	1,13	46,83	MT
4	1,98	2,5	4,48	8,10	1,26	44,19	MT
5	1,73	2,31	4,04	7,31	1,33	42,82	MT
6	1,7	2,1	3,8	6,87	1,23	44,73	MT
7	1,66	1,83	3,46	6,26	1,08	47,97	MT
8	1,44	2,47	3,84	6,94	1,66	37,5	MT
9	1,4	2,35	3,75	6,78	1,67	37,3	MT
10	1,38	2,25	3,63	6,56	1,63	38,01	MT
11	1,23	2,11	3,34	6,04	1,71	36,82	SM
12	1,11	2	3,11	5,62	1,80	35,69	SM
13	1,09	1,88	2,97	5,37	1,72	36,70	SM
14	0,98	1,75	2,73	4,94	1,78	35,89	SM
15	0,63	1,73	2,36	4,27	2,74	26,69	SM
CTHL				55,26			

BC= comprimento do braço curto ( $\mu\text{m}$ ); BL= comprimento do braço longo ( $\mu\text{m}$ );CT= comprimento total do cromossomo ( $\mu\text{m}$ ); TR= tamanho relativo; RB= relação de braços; IC= índice centromérico; CC= classificação centromérica; MT= metacêntrico; SM= submetacêntrico; CTLH = comprimento total do lote haplóide ( $\mu\text{m}$ );

**TABELA 4.** Dados morfométricos dos cromossomos do acesso LaJF Lavras, 2006.

ACESSO LaJF							
PAR	BC	BL	CT	TR%	RB	IC	CC
1	3,02	3,1	6,12	9,82	1,02	49,34	MT
2	2,23	3,05	5,28	8,48	1,36	42,23	MT
3	2,03	2,98	5,01	8,04	1,46	40,51	MT
4	1,92	3,01	4,93	7,91	1,56	38,94	MT
5	1,76	2,97	4,73	7,59	1,68	37,20	MT
6	1,54	1,98	3,52	5,65	1,28	43,75	MT
7	1,52	1,76	3,28	5,26	1,15	46,34	MT
8	1,46	2,14	3,6	5,78	1,46	40,55	MT
9	1,41	2,38	3,79	6,08	1,68	37,20	MT
10	1,36	2,29	3,65	5,86	1,68	37,26	MT
11	1,27	2,38	3,65	5,86	1,87	34,79	SM
12	1,15	2,1	3,25	5,22	1,82	35,38	SM
13	1,1	2,9	4	6,42	2,63	27,5	SM
14	1	2,93	3,93	6,31	2,93	25,44	SM
15	0,98	2,54	3,52	5,65	2,59	27,84	SM
CTHL				62,26			

BC= comprimento do braço curto ( $\mu\text{m}$ ); BL= comprimento do braço longo ( $\mu\text{m}$ ); CT= comprimento total do cromossomo ( $\mu\text{m}$ ); TR= tamanho relativo; RB= relação de braços; IC= índice centromérico; CC= classificação centromérica; MT= metacêntrico; SM= submetacêntrico.

**TABELA 5.** Dados morfológicos dos cromossomos do acesso LaRJ Lavras, 2006.

ACESSO LaRJ							
PAR	BC	BL	CT	TR%	RB	IC	CC
1	2,02	2,64	4,66	8,86	1,30	43,34	MT
2	1,98	2,73	4,71	8,96	1,37	42,03	MT
3	1,78	2,6	4,38	8,33	1,46	40,63	MT
4	1,69	2,63	4,32	8,22	1,55	39,12	MT
5	1,61	2,37	3,98	7,57	1,47	40,45	MT
6	1,5	1,63	3,13	5,95	1,08	47,92	MT
7	1,48	1,59	3,07	5,84	1,07	48,20	MT
8	1,45	1,52	2,97	5,65	1,04	48,82	MT
9	1,38	1,68	3,06	5,82	1,21	45,09	MT
10	1,34	1,76	3,1	5,90	1,31	43,22	MT
11	1,1	1,98	3,08	5,86	1,8	35,71	SM
12	1,18	2,03	3,21	6,10	1,72	36,76	SM
13	1,13	1,93	3,06	5,82	1,70	36,92	SM
14	1,1	1,9	3	5,70	1,72	36,66	SM
15	0,95	1,86	2,81	5,34	1,95	33,80	SM
CTHL				52,54			

BC= comprimento do braço curto ( $\mu\text{m}$ ); BL= comprimento do braço longo ( $\mu\text{m}$ ); CT= comprimento total do cromossomo ( $\mu\text{m}$ ); TR= tamanho relativo; RB= relação de braços; IC= índice centromérico; CC= classificação centromérica; MT= metacêntrico; SM= submetacêntrico.

**TABELA 6.** Dados morfométricos dos cromossomos do acesso LaVC Lavras, 2006.

ACESSO LaVC							
PAR	BC	BL	CT	TR%	RB	IC	CC
1	2,21	2,51	4,72	8,91	1,13	46,82	MT
2	2,18	2,41	4,59	8,67	1,10	47,94	MT
3	1,98	2,38	4,36	8,23	1,20	45,41	MT
4	1,65	2,34	3,99	7,53	1,41	41,35	MT
5	1,58	2,21	3,79	7,16	1,39	41,68	MT
6	1,5	2,48	3,98	7,52	1,65	37,68	MT
7	1,46	1,59	3,05	5,76	1,08	47,86	MT
8	1,43	1,95	3,38	6,38	1,36	42,30	MT
9	1,38	1,98	3,36	6,34	1,43	41,07	MT
10	1,33	1,66	2,99	5,65	1,24	44,48	MT
11	1,12	1,94	3,06	5,78	1,73	36,60	SM
12	1,1	2,1	3,2	6,04	1,90	34,37	SM
13	1,01	1,87	2,88	5,44	1,85	34,35	SM
14	1	1,94	2,94	5,55	1,94	34,01	SM
15	0,89	1,74	2,63	4,96	1,95	33,84	SM
CTHL					52,92		

BC= comprimento do braço curto ( $\mu\text{m}$ ); BL= comprimento do braço longo ( $\mu\text{m}$ ); CT= comprimento total do cromossomo ( $\mu\text{m}$ ); TR= tamanho relativo; RB= relação de braços; IC= índice centromérico; CC= classificação centromérica; MT= metacêntrico; SM= submetacêntrico.

#### **4.2 Coloração sólida com giemsa, constrições secundárias, padrão de bandas com CMA<sub>3</sub> e atividade das regiões organizadoras de nucléolo**

Diferente do que foi relatado por Brandão (2003) e Pierre (2004), que observaram apenas quatro cromossomos com constrições secundárias, a partir da coloração sólida com giemsa, nos cinco acessos estudados no presente trabalho, foi possível observar que *Lippia alba* apresenta seis cromossomos com estas estruturas (Figura 1). Tal diferença pode ser devido à variação no grau de condensação dos cromossomos, uma vez que, no presente trabalho, foi possível observar que, com o aumento da condensação cromossômica, algumas constrições secundárias podem ser imperceptíveis (Figura 2).

Em algumas espécies de plantas, o número de constrições secundárias varia de célula para célula. No entanto, o número máximo de constrições secundárias é, geralmente, constante para cada espécie (Sato et al, 1980, Yonenaga-Yassuda et al, 1983). Guerra et al (1997), ao estudarem 51 acessos de citrus, observaram que dentre estes, 19 apresentavam variação no número das constrições secundárias devido ao grau de condensação. Estes acessos pareciam, numa primeira análise, possuir menos constrições secundárias que os outros. Por outro lado, ao analisar pro-metáfases o autor observou que o número de constrições era semelhante ao dos outros acessos.

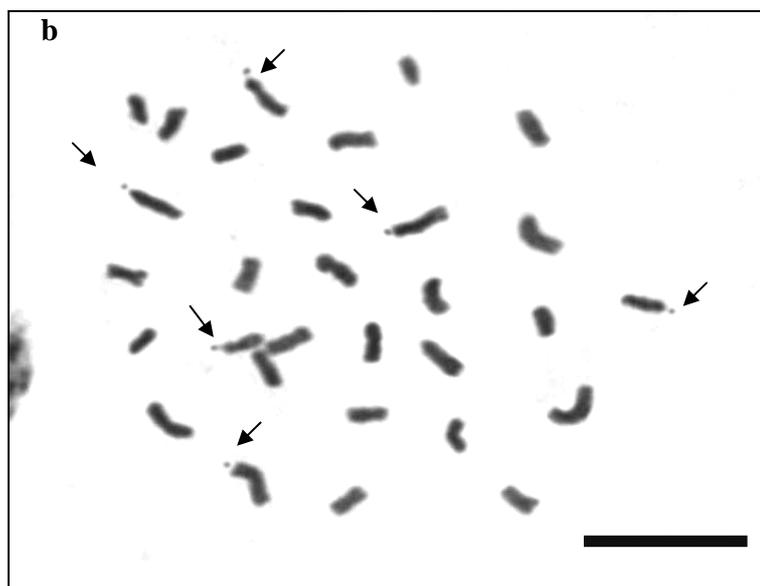
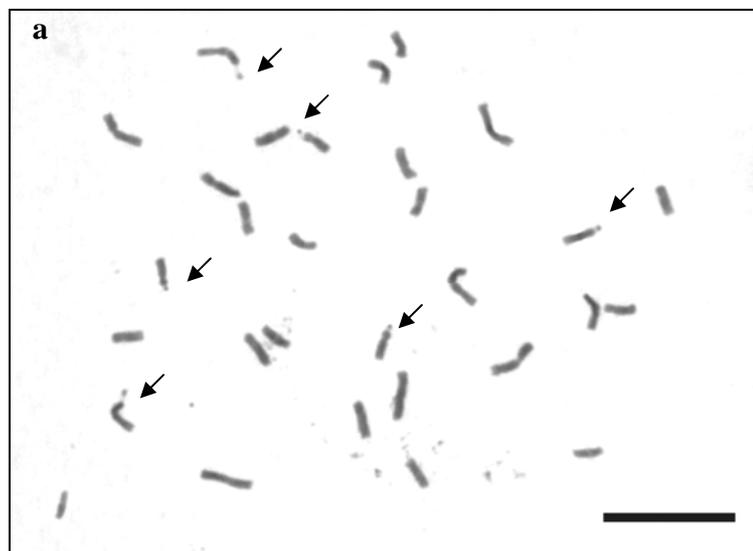
Brandão (2003) observou estas estruturas em *Lippia alba* nos cromossomos 2 e 5, enquanto Pierre (2004) observou nos cromossomos 5 e 11. Como aqui elas foram observadas nos cromossomos 2, 5 e 11, para os cinco acessos, tais resultados reforçam a idéia de variação na condensação e não na posição das mesmas, mostrando, com isso, que estas estruturas são bastante estáveis nas diferentes populações de *Lippia alba*.

Com relação às constrições secundárias, todas as seis mostraram-se positivas para o fluorocromo CMA<sub>3</sub>, em todos os acessos (Figura 3).

A marcação de constrições secundárias com este fluorocromo tem sido observada em várias outras espécies por inúmeros autores (Schweizer, 1976; Guerra et al., 2000; Yen-Yu et al, 2001). A explicação para isso é que, na maioria das espécies, as regiões organizadoras de nucléolo (sítios contendo genes que codificam RNA ribossomal dos tipos 18S, 5,8S e 28S) estão presentes nas constrições secundárias. Tais sítios de transcrição, por sua vez, apresentam regiões ricas em bases do tipo GC (Sumner 1990), cujo fluorocromo CMA<sub>3</sub> tem alta afinidade.

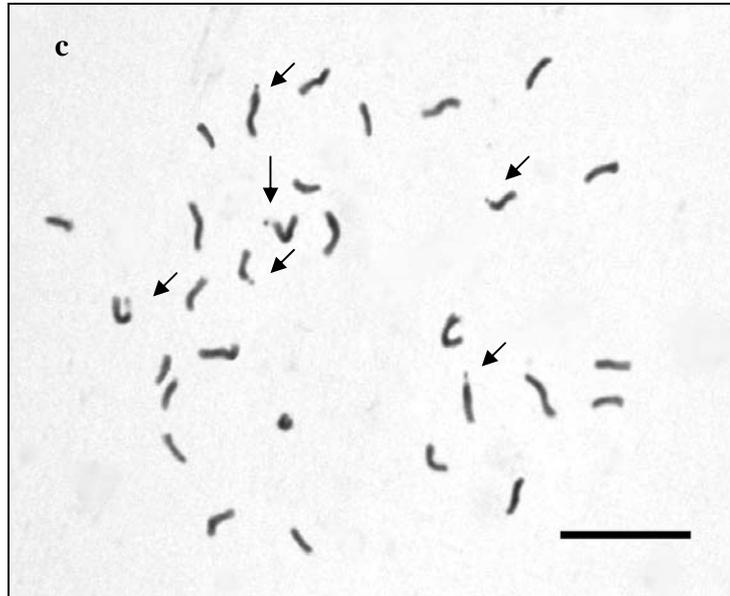
Estes resultados, portanto, sugerem que *L. alba* apresenta as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) localizadas em suas constrições secundárias e, além disso, que estas são encontradas em número de seis nesta espécie.

Atualmente, para a identificação de RONs, a técnica mais utilizada tem sido a de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH), a partir de sondas contendo as seqüências de DNAr 18S, 5,8S e 28S. Esta técnica tem sido amplamente utilizada devido à sua precisão e especificidade ao evidenciar todos os cístrons ribossomais, ativos e inativos das RONs (Schwarzacher & Ambros, 1979; Besendorfer *et al.*, 2002).

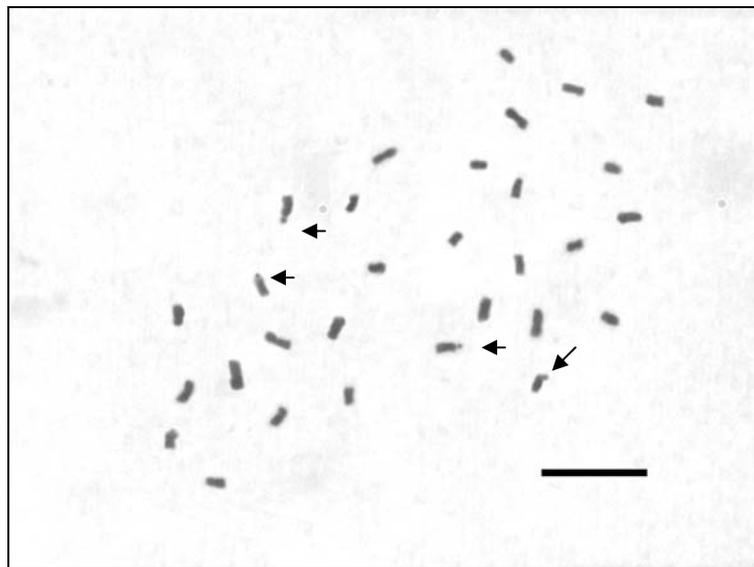
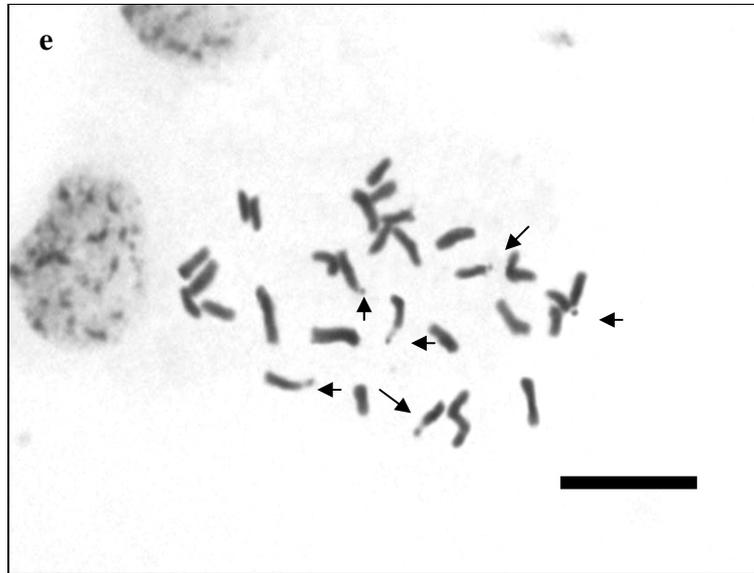


**FIGURA 1.** Metáfases dos acessos LaCat (a) e LaGua (b), LaJF (c), LaRJ (d) e LaVC (e), respectivamente, apresentando três pares de constrictões secundárias (setas). Barra = 10  $\mu$ m. Lavras, 2006 (“...continua...”).

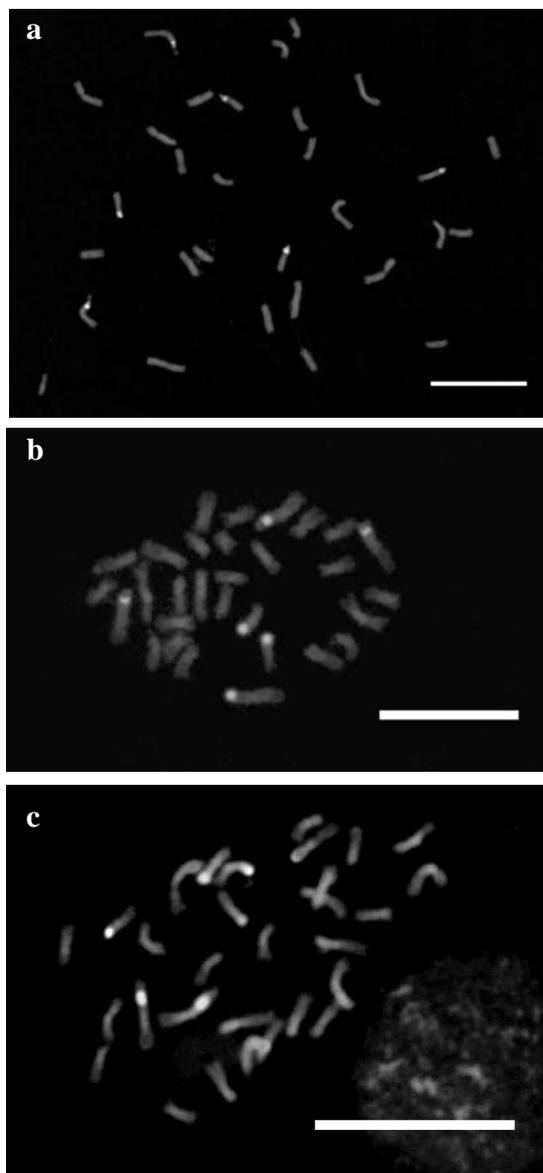
**FIGURA 1, cont.**



**FIGURA 1, cont.**

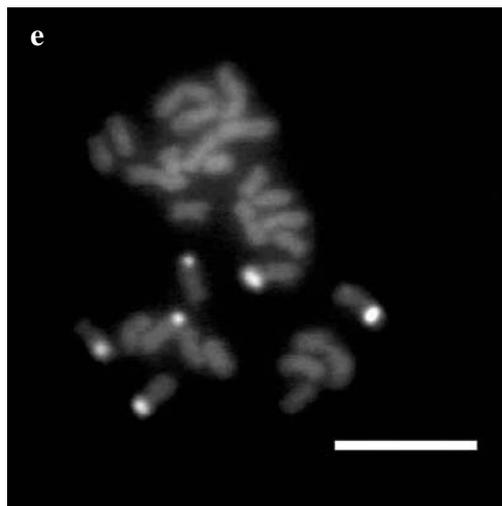
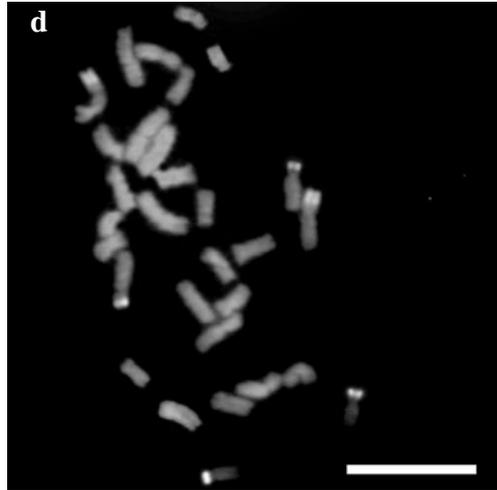


**FIGURA 2.** Metáfase do acesso LaCat apresentando apenas dois pares de constrictões secundárias (setas). Barra = 10  $\mu$ m. Lavras, 2006



**FIGURA 3.** Metáfases dos acessos LaCat (a), LaGua (b) e LaJF (c), LaRJ (d) e LaVC (e) respectivamente, coradas com CMA<sub>3</sub>. Barra = 10  $\mu$ m. Lavras, 2006 (“...continua...”)

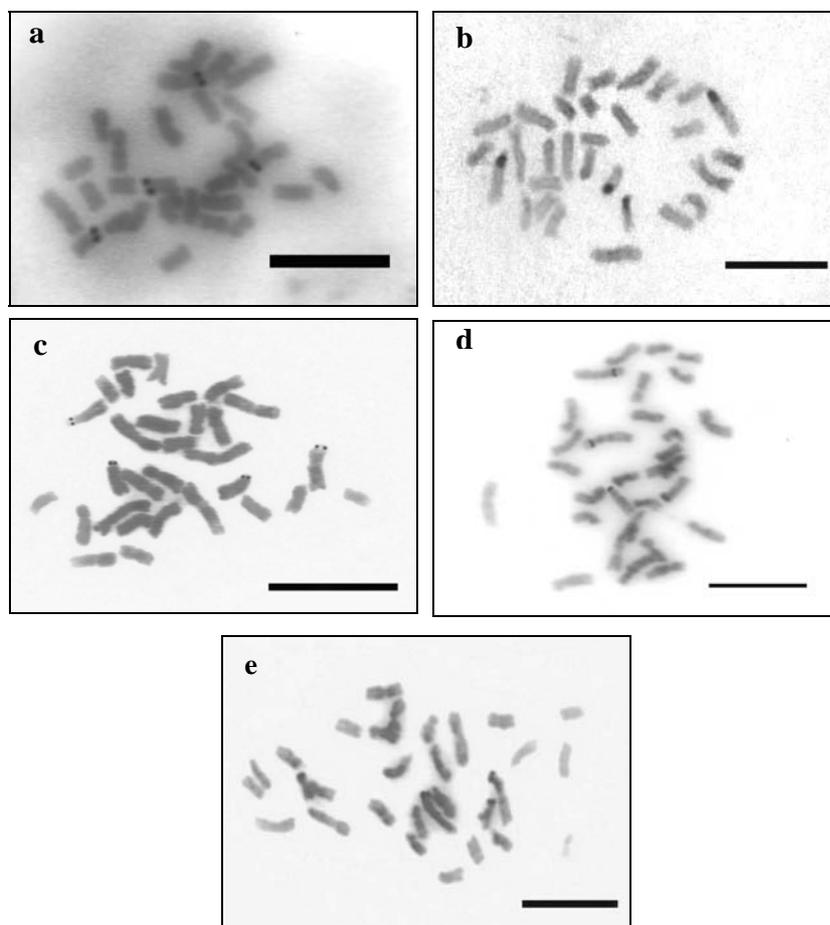
**Figura 3. cont.**



Brandão (2003), ao aplicar a técnica de FISH em *Lippia alba* observou seis marcas, mas não descreveu a posição destas RONS nos cromossomos. Apesar destes sítios, geralmente, estarem localizados em constrições secundárias (Guerra, 1988), muitos estudos têm mostrado que existem sítios de DNAr (RONS) que estão presentes em outras regiões dos cromossomos. Este é o caso do que foi descrito por Panzera *et al.* (1996), que detectaram uma quinta família de RONS no telômero do braço longo do cromossomo 8 de *Allium cepa*, no qual não existe constrição secundária. Sumner (1990) mencionou que as RONS são regiões que apresentam genes para a transcrição de RNAr 18 S, 5,8S e 28 S, independente do local onde se encontram nos cromossomos. Além disso, este autor relatou que muitas constrições secundárias não contêm estes sítios, apresentando apenas heterocromatina inativa que se descondensa, formando esta estrutura.

Com a finalidade de identificar a posição das RONS nos cromossomos dos cinco acessos, foi empregada a técnica de bandeamento com nitrato de prata. Esta técnica possibilitou a observação de apenas quatro RONS nos cromossomos de *Lippia alba*. Em todos os acessos, foi possível a observação destes sítios nos pares de cromossomos cinco e onze (Figura 4). Todas as marcas apresentaram praticamente o mesmo tamanho e coincidiram em dois pares de constrições secundárias. No entanto, não foi observada nenhuma marcação no par cromossômico 2. Esta técnica, ao contrário da FISH, permite a observação apenas de RONS que foram ativas na intérfase precedente (Sumner 1990). Com isso, pode-se inferir que apenas dois pares de RONS em *Lippia alba* são ativas. Além disso, foi observado um número máximo de quatro nucléolos em todos os acessos, o que corrobora com a possibilidade de um par das RONS ser inativo (Figura 5).

A presença de nucléolos na meiose, geralmente, é observada até a fase de paquíteno (Sumner 2003). No entanto, alguns estudos mostram a presença de nucléolo no final da prófase I e até mesmo durante a metáfase da segunda divisão meiótica (Almeda 1992; Almeda 1997).



**FIGURA 4.** Metáfases dos acessos LaCat (a), LaGua (b), LaJF (c), LaRJ (d) e LaVC (e), respectivamente, mostrando dois pares de cromossomos com RONS ativos, após coloração com nitrato de prata. Barra = 10  $\mu$ m. Lavras, 2006.

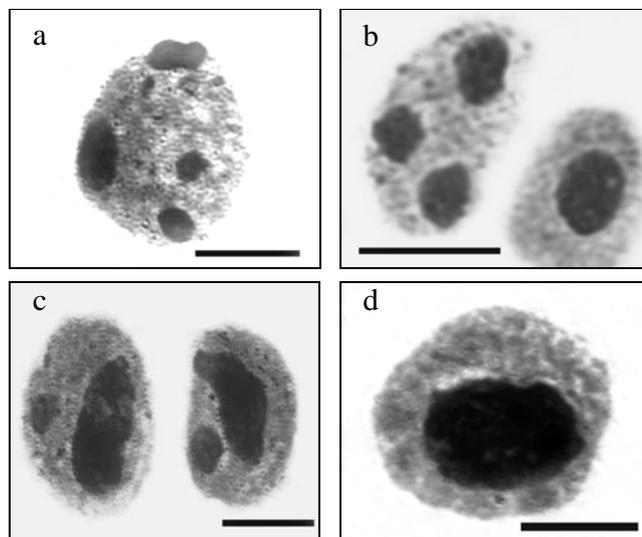
Foi observado que, nesta espécie, durante a meiose, o nucléolo pode permanecer até o final da prófase I. Com a aplicação do bandeamento com nitrato de prata na meiose dos acessos LaCat e LaGua, foi possível observar com clareza a presença de dois pares de cromossomos associados ao nucléolo (Figura 6), aumentando, assim, as evidências de inativação de um par de RON.

Apesar da técnica de bandeamento AgNOR ter evidenciado a presença de dois pares de cromossomos com RONs ativas, é importante ressaltar que o nitrato de prata possui afinidade por proteínas nucleolares e RNAr que se mantêm presos às RONs de algumas metáfases. Não há, portanto, afinidade pela cromatina ou DNA destas regiões. Segundo Sumner (1990), o componente granular do nucléolo é desfeito após a prófase e se dispersa pelos cromossomos durante a mitose. Caso em uma RON ativa não fiquem resquícios deste material, ela pode não ser corada, levando a uma interpretação de inativação da mesma.

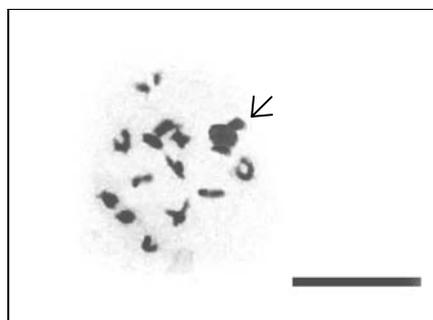
Vários eventos, principalmente epigenéticos, podem levar a uma real inativação destas regiões, tornando-as silenciosas, fato comum entre híbridos interespecíficos e intergenéricos (Pikaard 2000).

Como, entre os acessos de *Lippia alba*, uma das constrições não apresentou sinais de atividade, novos estudos, principalmente utilizando a técnica de FISH, devem ser realizados com o intuito de se observar se esta constrição secundária contém RON ou se o terceiro par destes sítios se encontra em outras regiões dos cromossomos, uma vez que o fluorocromo CMA<sub>3</sub> foi positivo para as seis constrições secundárias.

Além disso, outras técnicas específicas para marcar RONs poderiam ser utilizadas, como é o caso do bandeamento N, auxiliando, assim, no entendimento da atividade destas regiões.



**FIGURA 5.** Núcleos interfásicos de *Lippia alba* corados com nitrato de prata, apresentando quatro nucléolos (a), três nucléolos (b), dois nucléolos (c) e um único nucléolo (d). Barra = 10  $\mu$ m. Lavras, 2006.



**FIGURA 6.** Diacinese do acesso LaCat corada com nitrato de prata apresentando dois bivalentes associados a um nucléolo (seta). Barra = 10  $\mu$ m. Lavras, 2006.

### **4.3 Coloração com DAPI, bandeamento C e polimorfismos cromossômicos entre os acessos de *Lippia alba*.**

Com relação ao padrão heterocromático em *Lippia alba*, Brandão (2003) observou que esta espécie apresenta grandes blocos de heterocromatina constitutiva. No entanto, não foi relatado, em seu trabalho, o mapeamento desta cromatina. Foram realizadas inferências em relação ao tamanho e a constituição das regiões heterocromáticas, sendo sugerido que as mesmas poderiam ser ricas em bases do tipo AT (devido à presença de grandes extensões coradas com DAPI e poucas com CMA<sub>3</sub>).

No presente trabalho, o emprego de colorações sequenciais DAPI/CMA/Banda C permitiu a obtenção de mapas físicos, bem como a caracterização qualitativa das bandas heterocromáticas para esses acessos. Foi possível observar, com a técnica de banda C, que todos os acessos apresentam bandas centroméricas em todos os cromossomos e bandas teloméricas em apenas alguns. Além disso, todas as bandas centroméricas apresentaram-se ricas em bases adenina e timina, uma vez que se mostraram DAPI positivas (DAPI<sup>+</sup>) em todos os cromossomos. No entanto, algumas bandas obtidas com DAPI foram maiores do que aquelas obtidas com o bandeamento C, sendo também variável em tamanho quando comparadas entre os acessos (Figura 7). Tal fato também pode ser observado em núcleos interfásicos, nos quais, além da coincidência entre padrão de bandas C e DAPI, pôde-se observar a maior quantidade de marcas positivas para o DAPI (Figura 8).

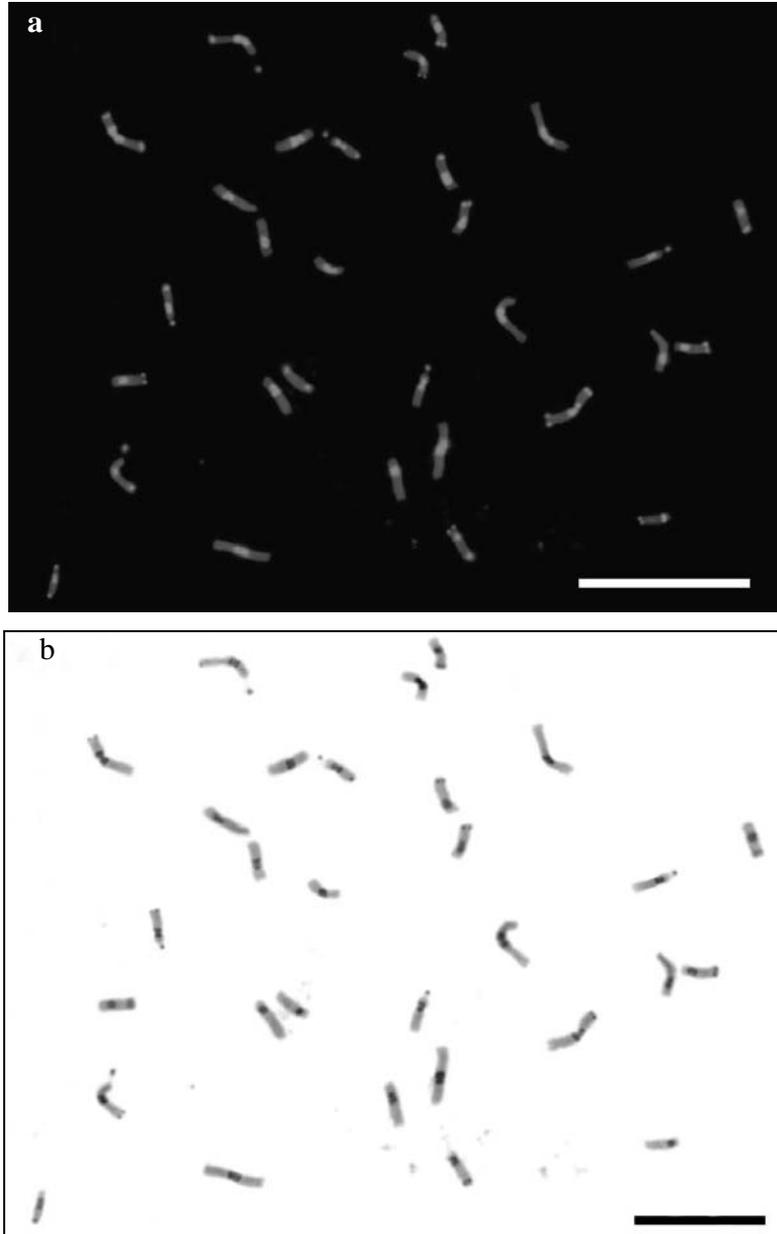
Segundo Rocchi (1982), a diferença de tamanho de bandas obtidas por diferentes métodos de coloração em indivíduos e entre indivíduos de uma mesma espécie, pode ser explicada, principalmente, pelas diferentes concentrações de DNA satélite localizados na heterocromatina constitutiva. Atualmente, sabe-se que este tipo de DNA é altamente polimórfico, variando muito entre indivíduos de diferentes populações ou de uma mesma população.

Associado ao que foi dito anteriormente, vários trabalhos, como o de Popov *et al.* (2001), mostram que, de acordo com o tamanho dos cromossomos, porções de heterocromatina podem não ser visualizadas devido ao grau de condensação. Além disso, a presença de proteínas em determinadas regiões dos cromossomos pode prejudicar a visualização da real extensão dos blocos heterocromáticos, de acordo com a técnica utilizada.

Segundo Guerra (2000), o estudo do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (HC) em vegetais deve sempre considerar que esta porção do genoma apresenta variação qualitativa e quantitativa entre as espécies. Além disso, este mesmo autor cita que, entre indivíduos de uma mesma espécie, polimorfismos para o número e tamanho das bandas heterocromáticas podem ser muito frequentes.

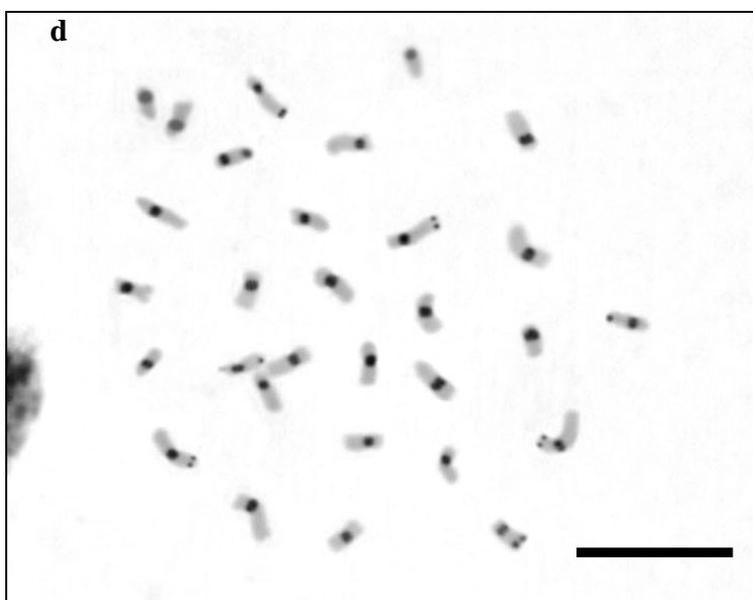
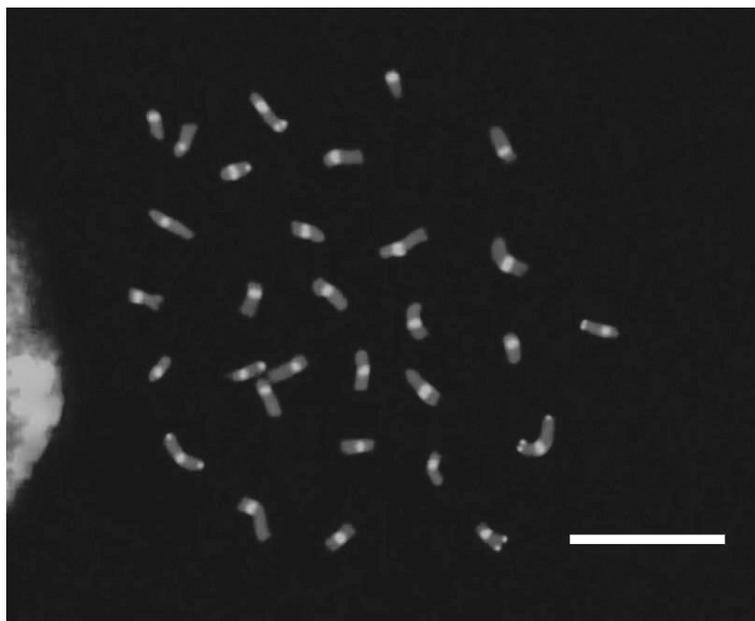
De acordo com Sumner (2003), este tipo de cromatina pode sofrer grandes mudanças em pouquíssimo tempo e diferentes metodologias podem revelar diferentes frações da mesma.

Em termos quantitativos, no presente trabalho, o acesso que apresentou o maior percentual de heterocromatina em relação ao genoma total foi o acesso LaCat, com 54% do seu genoma sendo formado de heterocromatina constitutiva, enquanto o que apresentou o menor percentual foi o acesso LaGua, com 43%. Além destas observações, nota-se que o número de bandas não é o mesmo para todos os acessos (Tabela 7).

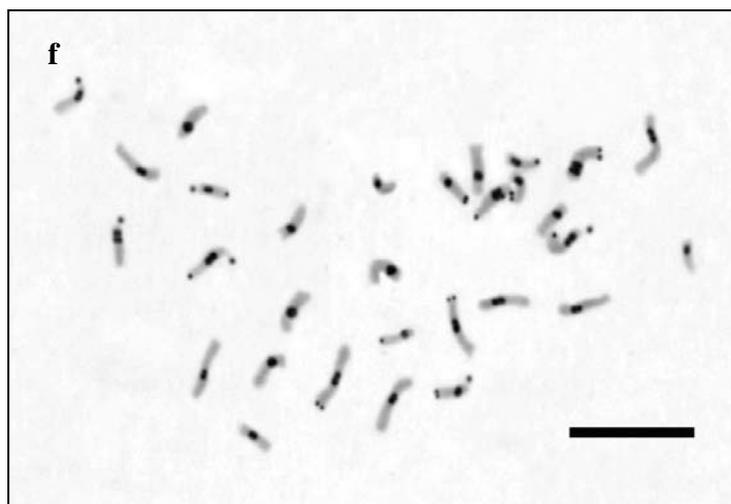
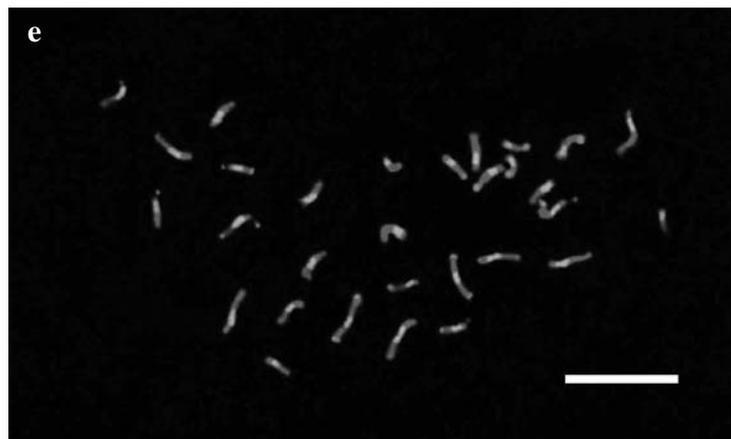


**FIGURA 7.** Coloração seqüencial DAPI/Banda C, mostrando o padrão heterocromático em metafase do acesso LaCat (a e b), LaGua (c e d), LaJF (e e f), LaRJ (g e h) e LaVC (i e j) respectivamente. Barra = 10 $\mu$ m. Lavras, 2006. (“...continua...”)

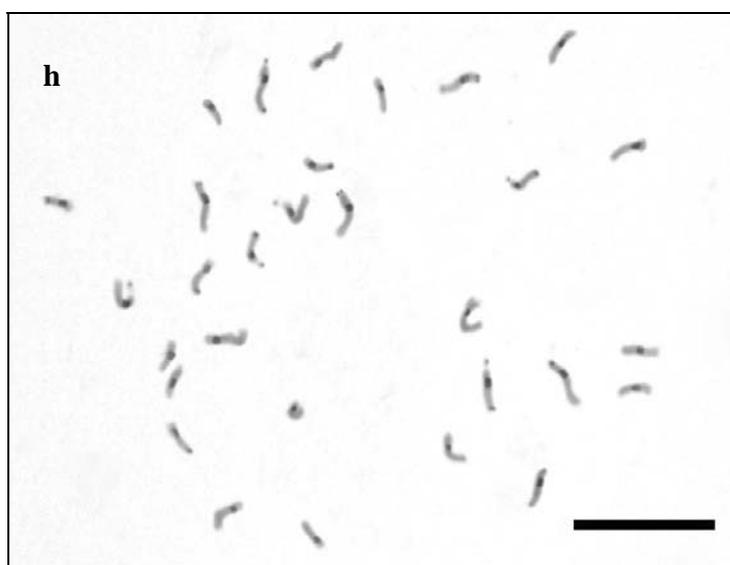
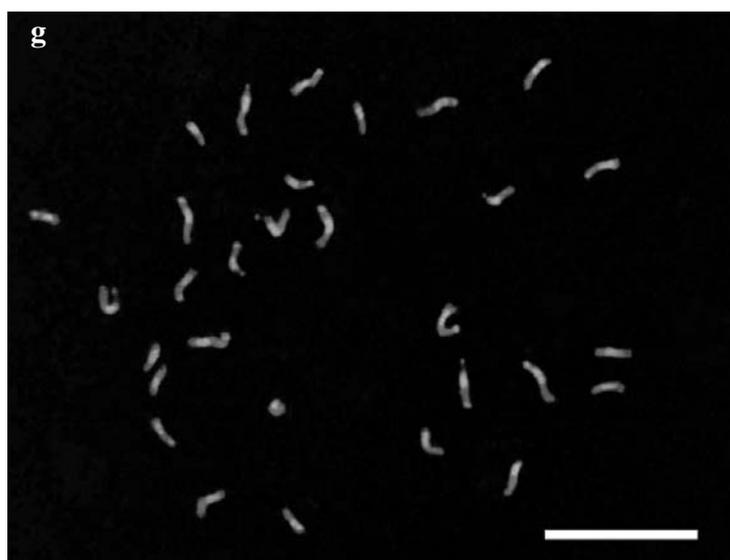
**FIGURA 7. cont.**



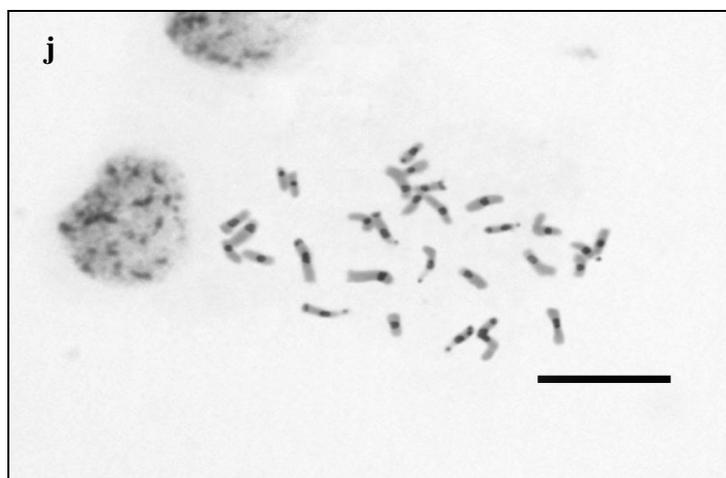
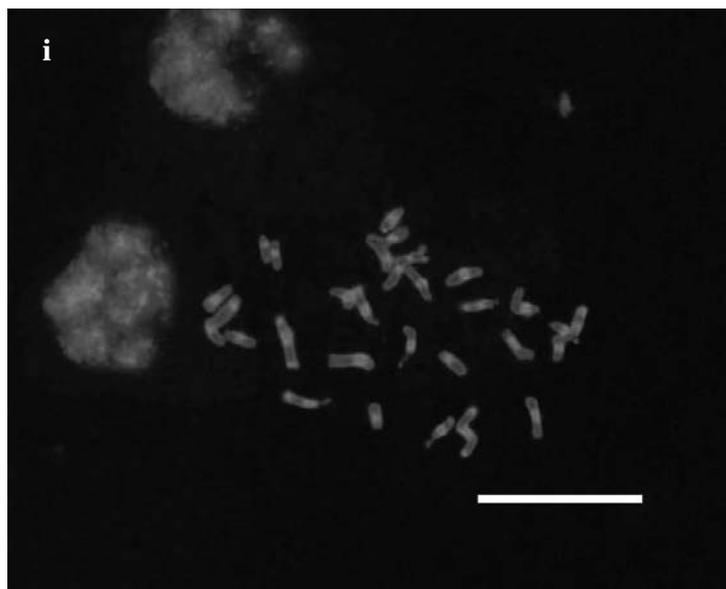
**FIGURA 7. cont.**

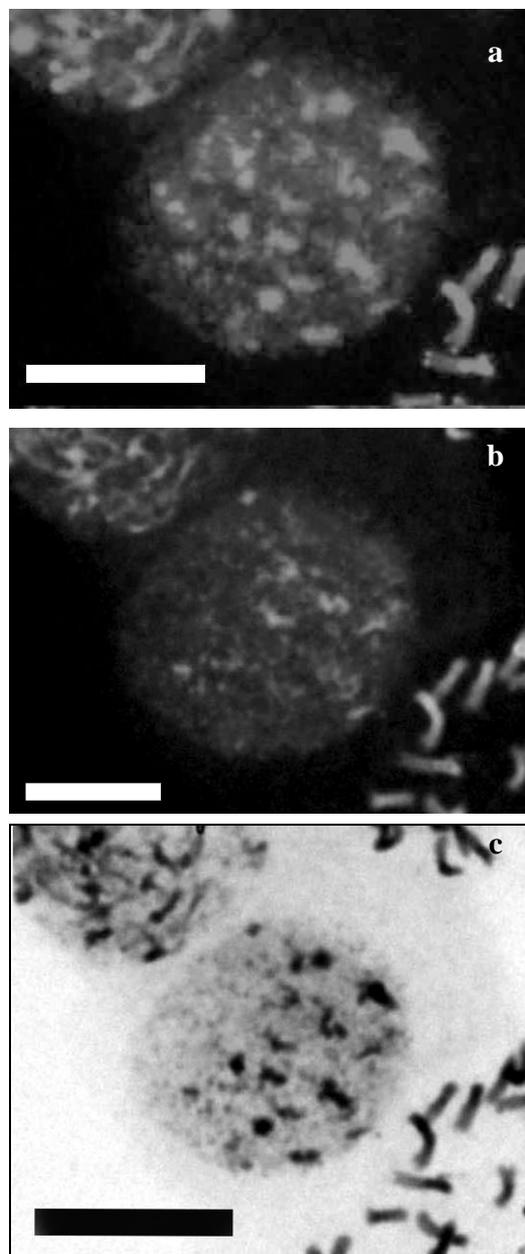


**FIGURA 7. cont.**



**FIGURA 7. cont.**





**FIGURA 8.** Coloração seqüencial com DAPI (a), CMA(b), Banda C (c) em núcleos interfásicos de *Lippia alba*. Barra = 10µm. Lavras, 2006.

**TABELA 7.** Percentual heterocromático (PH) e número de bandas C, DAPI e CMA<sub>3</sub> observadas em cinco acessos de *Lippia alba*.

ACESSO	PH	N° de bandas C	N° Bandas DAPI	N° Bandas CMA <sub>3</sub>
LaCat	54%	48	48	6
LaGua	43%	42	40	6
LaJF	48%	48	46	6
LaRJ	51%	48	44	6
LaVC	45%	44	40	6

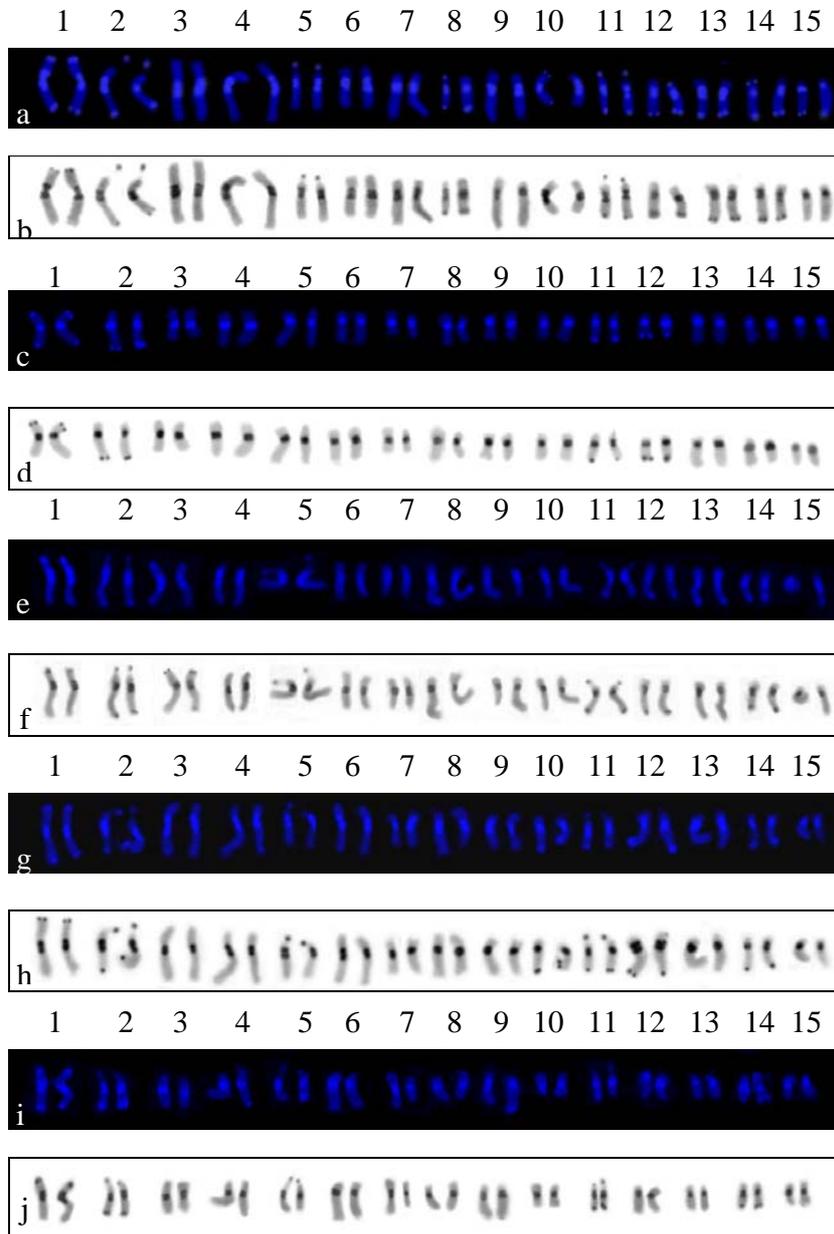
Esta diferença no percentual heterocromático está relacionada com a ausência de algumas marcas para o bandejamento C em alguns cromossomos entre os acessos (telômeros dos cromossomos 12, 13 e 14, principalmente). No entanto, como estas marcas ausentes no bandejamento C foram DAPI<sup>+</sup> em todos os acessos, tal fato leva-nos a inferir que tais resultados podem ser explicados pela degradação dos cromossomos após o emprego da técnica de bandejamento C (Pignone and Attolico, 1980, Sato and Yoshioka, 1984). Isso pode ser observado quando comparam-se os cariógramas obtidos a partir de metáfases submetidas primeiramente, à coloração com DAPI e, posteriormente, ao bandejamento C (Figura 9). Nota-se que as bandas degradadas pelo bandejamento C estão presentes nas metáfases coradas com DAPI, provavelmente porque a coloração com DAPI provoca menos dano à estrutura cromossômica.

Por outro lado, nos cinco acessos, nem todas as marcas DAPI<sup>+</sup> coincidiram com marcas C positivas (C<sup>+</sup>). Quatro deles (LaCat, LaGua, LaRJ e LaVC) apresentaram uma marca DAPI no telômero do braço longo do cromossomo 1, enquanto o outro acesso (LaJF), em todas as metáfases analisadas, não apresentou marcas nesta região. Isso pode ter ocorrido, possivelmente, devido à perda de tais regiões a partir de eventos deletérios.

Ao contrário do fato exposto anteriormente, o acesso LaCat apresentou

uma banda DAPI<sup>+</sup> e C<sup>+</sup> (coincidentes) no telômero do braço longo do cromossomo 8 em todas as metáfases analisadas. Como essa marca não foi observada para os outros acessos, algumas hipóteses poderiam ser formuladas. Dentre estas, uma possível translocação não recíproca entre dois cromossomos, sendo o cromossomo 8 o receptor de uma pequena porção contendo esta banda heterocromática. Outra hipótese poderia ser a transposição de um segmento heterocromático do genoma do acesso LaCat para o telômero deste cromossomo.

Apesar de tais observações e hipóteses levantadas, vale ressaltar que para se obter um resultado mais consistente em relação aos polimorfismos entre populações de *Lippia alba*, novos estudos com uma boa amostragem devem ser realizados, explorando o máximo de regiões de onde os acessos tenham origem.



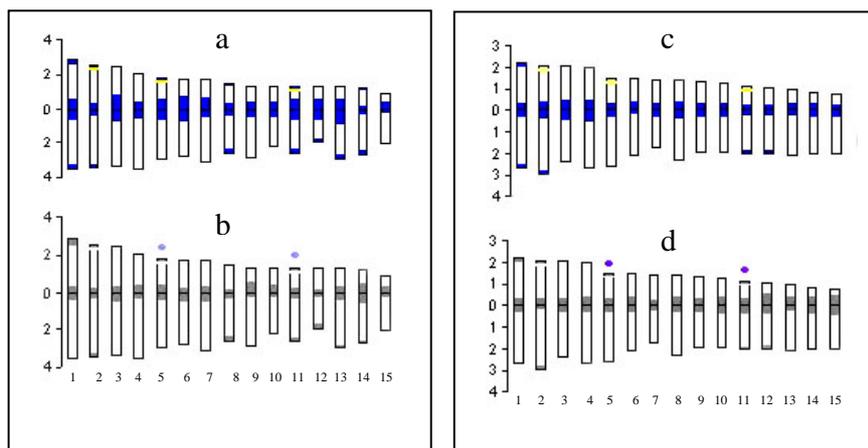
**FIGURA 9.** Cariogramas dos acessos LaCat (a e b) e LaGua (c e d), LaJF (e e f), LaRJ (g e h) e LaVC (i e j), respectivamente. Com coloração seqüencial DAPI/Bandeamento C. N° 1- 15 = pares cromossômicos. Lavras, 2006.

#### **4.4 Mapeamento físico da heterocromatina em *Lippia alba***

A partir dos dados obtidos com as técnicas utilizadas nos cinco acessos de *Lippia alba*, foi possível obter-se o padrão de distribuição da heterocromatina nesta espécie.

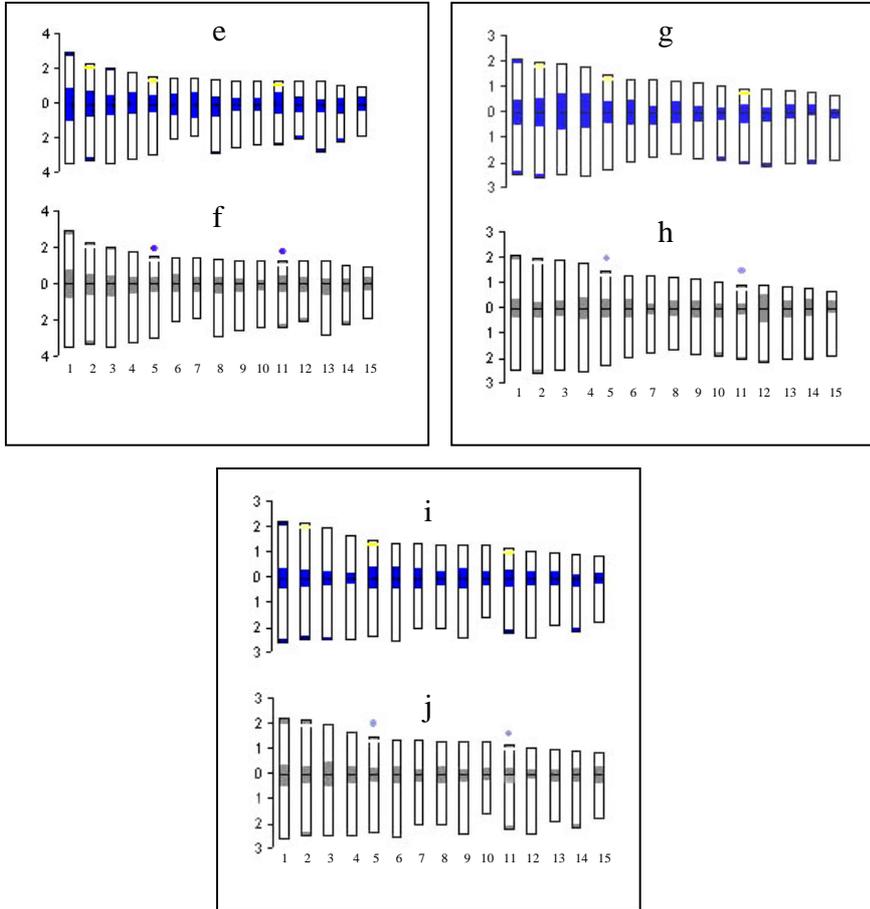
Os idiogramas da Figura 10 representam o mapeamento de toda heterocromatina (em termos quantitativos e qualitativos) observada no presente trabalho.

Foi possível concluir que este padrão é pouco variável entre as populações desta espécie e que a maior parte das variações com relação à presença ou ausência de bandas está relacionada com a metodologia utilizada e não com a presença de polimorfismos.



**FIGURA 10.** Idiogramas dos acessos LaCat (a e b) e LaGua (c e d), LaJF (e e f), LaRJ (g e h) e LaVC (i e j), respectivamente Lavras, 2006. Legenda: representação da coloração com DAPI (azul); representação da coloração com CMA<sub>3</sub> (amarelo); representação do bandeamento C (cinza); representação da coloração com prata (Esfera azul indica os cromossomos com RONS ativas). (“...Continuação...”)

**FIGURA 10.** cont.



#### **4.5 Análise química, quimiotipos e número cromossômico em *Lippia alba***

Vários trabalhos têm mostrado que a ocorrência de quimiotipos é muito comum entre plantas aromáticas e medicinais ( Zoghbi et al., 1998; Vale et al., 1999; Ricciardi et al., 2000; Juliani Jr et al., 2002; Theis & Lerdau, 2003).

No entanto, a maior parte destes trabalhos está relacionada apenas com a caracterização da composição química dos diferentes quimiotipos, havendo poucos estudos que mostram a origem, genética ou ambiental, de tais variações químicas.

Estudos recentes têm indicado que as variações químicas em *Lippia alba* são devido a variações genotípicas entre os três quimiotipos de *Lippia alba* (Tavares et al., 2005) e que tais quimiotipos apresentam números cromossômicos diferentes (Pierre 2004). A partir das análises citogenéticas e químicas realizadas em nosso trabalho, algumas considerações adicionais ao que vêm sendo realizado neste sentido devem ser feitas.

Os resultados das análises dos componentes majoritários dos óleos essenciais dos cinco acessos de *L. alba* estudados em nosso trabalho estão descritos na Tabela 8. Nota-se que os acessos LaCat, LaJF e LaRJ apresentam o citral (geranial + neral) como composto majoritário e que os acessos LaGua e LaVC possuem o citral e o linalol.

**TABELA 8.** Componentes do óleo essencial obtido a partir de folhas de cinco acessos de *Lippia alba*.

ACESSOS	LaCat		LaGua		LaJF		LaRJ		LaVC	
Componentes	TR*	%*	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%
Linalol	-	-	13.25	46.82	-	-	-	-	13.25	38.33
Neral	18.36	32.87	18.37	19.47	18.37	38.38	18.36	38.86	18.37	21.48
Geranial	19.42	41.97	19.42	24.96	19.43	55.06	19.41	54.62	19.42	26.52

\*TR= Tempo de retenção, %= porcentagem relativa.

Tais resultados, como observado por Tavares et al (2005), confirmam que a diferença na composição do óleo essencial dos cinco acessos estudados não se deve a fatores ambientais, uma vez que os diferentes acessos foram cultivados sob as mesmas condições em nosso estudo. Se a variação fosse apenas ambiental, tais acessos teriam de apresentar uma constituição química semelhante e não divergente, como foi observado.

Por outro lado, resultados mostraram também que o número cromossômico não está diretamente relacionado com quimiotipos específicos, visto que todos os acessos apresentaram  $2n=30$ . Segundo Pierre (2004), quimiotipos de *Lippia alba* contendo  $2n=30$  são ricos em citral, enquanto que aqueles ricos em linalol são indivíduos mixoplóides. É possível que a autora não tenha observado diferenças porque, naquele trabalho, somente um acesso de cada quimiotipo foi utilizado. A partir de tais observações, pode-se inferir que plantas desta espécie que contenham  $2n=30$  cromossomos apresentam diferenças genotípicas entre si, que estão relacionadas com o controle da produção dos componentes químicos. A fim de se investigar o controle genético de tais variações, estudos populacionais com amostragem significativa devem ser realizados.

Tais descobertas ajudariam muito no direcionamento de formas adequadas de aumento da produção dos diferentes compostos que possam ser obtidos a partir dessa espécie.

## 5 CONCLUSÕES

O citótipo com  $2n=30$  cromossomos de *Lippia alba* é rico em heterocromatina constitutiva, apresentando blocos centroméricos e teloméricos.

Grande parte da heterocromatina constitutiva é rica em bases adenina e timina. A espécie apresenta variação no número de bandas e na quantidade de heterocromatina, entre os diferentes acessos.

Quimicamente, este citótipo apresenta variações qualitativas e quantitativas, cujo ambiente parece não ter grande influência.

O número cromossômico não está diretamente relacionado com a variação química.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, M. J.; SÁNCHEZ, S.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of some medicinal plants. **Phytotherapy Research**, London, v. 14, n. 8, p. 604-607, Nov. 2000.
- ALMEDA, F. Chromosomal observations on the Alzateaceae (Myrtales). **Annals of Missouri Botanic Garden**, St. Louis, v. 84, n. 2, p. 305-308, 1997.
- ALMEDA, F. Chromosome numbers and their systematics significance in some Mexican Melastomataceae. **Systematic Botany**, Bronx, v. 17, n. 4, p. 583-593, Oct./Dec. 1992.
- ANDRADA, A. B.; PASTORIZA, A.; PULIDO, L. V. M. Citogenética em tres espécies de Verbenáceas. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, v. 15, n. 4, p. 312-318, jul./ago. 1998.
- 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. 6, p. 533-537, Nov./Dec. 1997.
- BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M. E.; PAPES, D. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss (Aliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 139, n. 1, p. 99-108, May 2002.
- BEZERRA, P. et al. Composição química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas no nordeste- gênero *Lippia*. In: Simpósio de plantas Medicinais do Brasil VI. Resumos. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 33. p. 1-14, 1980. Suplemento 1.
- BOSE, R. B.; CHOUDHURY, J. K. Cytological studies in *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. **Bulletin Botanical Society**, Bengal, v. 14, n. 1/2, p. 71-72, 1960.
- BRANDÃO, A. D. **Citogenética comparativa dos gêneros *Lippia*, *Lantana* e *Aloysia* (Lamiales)**. 2003. Tese (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CARVALHO, C. R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. 1995. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CATÁLAN, C. A. N.; LAMPASONA, M. E. P. Trace constituents of *Lippia integrifolia*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 58, n. 11, p. 1713-1717, Nov. 1995.

CHIANG, L. C.; CHIANG, W.; CHIANG, M. Y.; NG, L. T.; LIN, C. C. Antileukemic activity of selected natural products in Taiwan. **American Journal of Chinese Medicine**, Singapore, v. 31, n. 1, p. 37-46, 2003.

CORRÊA, C. B. V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill) NE Br ex Britt & Wilson- erva cidreira. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 3, p. 57-64, 1992.

COSTA, M.; DI STASI, L. C.; KIRIZAWA, M.; MENDACOLLI, S. L.; GOMES, C.; TROLIN, G., Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purpose in the State of São Paulo. Part II. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 27, n. 1/2, 25-33, Nov. 1989.

D' ANDREA, A. et al. Exame del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. La salvia morada de corrientes. In: SESIÓN DE COMUNICACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS DE LA UNNE, 9., 1995. p. 74.

DE MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotoxicity of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 266, n. 1/2, p. 69-84, 2001.

DE VINCENZI, M.; MAIALETTI, F.; DESSI, M. R. Monographs on botanical flavouring substances used in foods. Part IV. **Fitoterapia**, Milano, v. 66, p. 203-210, 1995.

ELIZABETSZKY, E.; SILVA BRUM, L. F.; SOUZA, D. O. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine**, Jena, v. 6, n. 2, p. 107-113, May 1999.

FRICK, C.; HARDT, I. H.; KONIG, W. A.; JOULAIN, D.; ZYGADLO, J. A.; GUZMAN, C. A. Sesquiterpenes from *Lippia integrifolia* essential oil. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 62, n. 5, p. 694-696, May 1999.

FRIGHETTO, N.; OLIVEIRA, J. G.; SIANI, A. C.; CHAGAS, K. C. *Lippia alba* Mill N. E. Br. (Verbenaceae) as a source of linalool. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 10, p. 578-580, 1998.

FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. **Plant chromosomes: laboratory methods**. Boca Raton: CRC, 1996. p. 247.

GASQUET, M.; DELMAS, F.; TIMÓN-DAVID, P.; KEITA, A.; GUINDO, M.; KOITA, N.; DIALLO, D.; DOUMBO, O. Evaluation in vitro and in vivo of a traditional antimalarial, 'Malarial-5'. **Fitoterapia**, Milano, v. 64, p 423-426, 1993.

GOMES, E. C. **Ensaio preliminar e pesquisa sistemática e fitoquímica para *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. Verbenaceae**. Curitiba: UFPR, 1990. 6 p.

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

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

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

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

HENEEN, W. K.; BRISMAR, K. Rye heterochromatin in the somatic chromosomes of triticale in relation to grain shrivelling. **Hereditas**, Landskrona, v. 107, n. 2, p. 137-145, 1987.

HOSSAIN, M. A.; BAUCHAN, G. R. Identification of B Chromosomes Using Giemsa Banding in Medicago. **The journal of Heredity**, Cary v. 90, n. 3, p. 428-429, May 1999.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a I-step method. **Experientia**, Basel, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, 1980.

JONES, N.; HOUBEN, A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? **Trends in Plant Science**, London, v. 8, n. 9, p. 417-423, Sept. 2003.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 2. ed. Sauer Associates, 2002. 419 p.

JULIANI- JR., H. R.; KOROCZ, A. R.; TRIPPI, V. S.; ZYGADLO, J. A. Intraespecific variation in leaf oils of *Lippia junelliana* (mold.) tronc. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 163-170, Feb. 2002.

KLUEGER, P. A.; DAROS, M. R.; SILVA, R. M.; FARIAS, M. R.; DE LIMA T. C. M. Neuropharmacological evaluation of crude and semipurified extracts from *Lippia alba* Will N. E. Br. (Verbenaceae). In: INTERNATIONAL JOINT SYMPOSIUM: Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from the Americas, 1997. **Abstracts...** 1997. Poster Session, 2: B23.

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

LANDJEVA, S. P.; GANEVA, G. D. Chromosome N-banding polymorphism in *Aegilops geniculata* Roth. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 47, n. 1, p. 35-42, Feb. 2000.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531 p.

LELLEY, T.; JOSIFEK, K.; KALTSIKES, P. J. Polymorphism in the Giemsa C-banding pattern of rye chromosome. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Montreal, v. 20, n. 3, p. 307-312, 1978.

LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**, Milano, v. 63, p. 266-268, 1992.

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

LIMA, H. R. P.; KAPLAN M, A. C.; CRUZ A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LINDE-LAURSEN, I. B.; SEBERG, O. Karyotypes of *Elymus scabrifolius* (Poaceae: Tritiaceae) from South America studied by banding techniques and in situ hybridization. **Hereditas**, Landskrona, v. 135, n. 1, p. 41-50, 2001.

LÓPEZ, A. A. M.; ROJAS, H. N. M.; JIMÉNEZ, M. C. A. Plants extracts with cytostatic properties growing in Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, La Habana, v. 31, n. 2, p. 105-111, 1979.

MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO A. A.; ALENCAR, J. W. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 8, p. 695-698, 1996.

MIRANDA, M.; IKEDA, F.; ENDO, T.; MORIGUCHI, T. Chromosome markers and alteration in mitotic cells from interspecific *Citrus* somatic hybrids analysed by fluorochrome staining. **Plant Cell reports**, New York, v. 16, n. 12, p. 807-812, Oct. 1997.

MORTON, **Atlas of Medicinal Plants of Middle America**. v. 1. Springfield, Illinois, USA, 1981. p. 745.

MURUGESAN, R.; CHANDRA, N.; SANTHIYA, S. T.; GOPINATH, P. M.; MARIMUTHU, K. M. Nucleolar behaviour in a few legumes. **Caryologia**, Florence, v. 54, n. 1, p. 17-21, Jan./Mar. 2001.

PANZERA, F.; GIMENEZ ABIAN, M. J.; LOPEZ SAEZ, J. F.; GIMENEZ MARTINS, G.; CUADRADO, A.; SHAW, P. J.; BEVEN, A. F.; CANOVAS, J. L.; DELTORRE, C. Nucleolar organizer expression in *Allium cepa* L. chromosomes. **Chromosoma**, New York, v. 105, n. 1, p. 12-19, July 1996.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 76, n. 3, p. 201-214, Aug. 2001.

PEDROSA, A.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Theoretical Applied and Genetics**, Berlin, v. 100, n. 3/4, p. 361-367, Feb. 2000.

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

PIGNONE, D.; ATTOLICO, M. Chromosome banding in four groups of *Vicia faba* L. **Caryologia**, Florence, v. 33, n. 2, p. 283-288, Apr./June 1980.

PIKAARD, C. S. The epigenetics of nucleolar dominance. **Trends in Genetics**, London, v. 16, n. 11, p. 495-500, Nov. 2000.

POPOV, K. V.; MURAVENKO, O. V.; SAMATDZE, T. E.; AMOSOVA, A. V.; ZELENIN, A. V. Peculiarity of the analysis of heterochromatic regions in small chromosome of plants. **Doklady Biological Science**, New York, v. 381, p. 543-546, 2001.

PRAÇA, M. M. et al. Metodologia para obtenção de PMCs em plantas com flores de tamanho reduzido. In: ENCONTRO MINEIRO DE GENETICISTAS, 6., 200, Lavras. **Anais...** . Lavras: UFLA, 2000.

RAO, G. P.; SINGH, M.; SINGH, P.; SINGH, S. P.; CATALAN, C.; KAPOOR, I. P. S. Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf essential oil of *Lippia alba* (Mill). **Indian Journal of Chemical Technology**, New Delhi, v. 7, n. 6, p. 332-335, 2000.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHCHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. New York, 1999.

RAYBURN, A. L.; PRICE, H. J.; SMITH, J. D.; GOLD, J. R. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 72, n. 10, p. 1610-1617, Oct. 1985.

RE, L.; BAROCCI, S.; SONNINO, S.; MENCARELLI, A.; VIVANI, C.; PALOUCCI, G.; SCARPANTONIO, A.; RINALDI, L.; MOSCA, E. Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. **Pharmacological Research**, London, v. 42, n. 2, p. 177-181, Aug. 2000.

RICCIARDI, G. et al. Efecto de las variaciones estacionales sobre la composición química del aceite esencial de plantas de “Salvia morada” de Sáenz Peña (Chaco). Disponível em: <<http://www.unne.edu.ar>>. Acesso em: 10 fev. 2006. **Comunicaciones Científicas y tecnológicas, UNNE; Exactas 039**; 2001.

RICCIARDI, G. et al. Fitoquímica de verbenáceas (*Lippias y Aloysias*) del Nordest Argentino. Disponível em: <<http://www.unne.edu.ar>>. Acesso em: 10 fev. 2006. **Comunicaciones Científicas y tecnológicas, UNNE; Exactas 039**; 2000.

ROCCHI, A. On the heterogeneity of heterochromatin. **Caryologia**, Florence, v. 35, n. 2, p. 169-189, 1982.

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.

SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in Southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**, Harvard, v. 5, n. 2, p. 303-358, 2001.

SANTOS-MENDES *et al.* **Caracterização morfo-anatômica, fitoquímica e molecular de oito formas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex BRITT. & Wilson (Verbenaceae)**. 2001. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu.

SATO, S.; OHTA, S.; KUROKI, Y. Heteromorphic appearance of acrocentric nucleolus organizer regions in *Nothoscordum fragrans*. **Cytologia**, Florence, v. 45, p. 87-96, 1980.

SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P. W. Analysis of nucleolus organizer regions (NORs) in mitotic and polytene chromosome of *Phaseolus coccineus* by silver staining and Giemsa C-banding. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 132, n. 1, p. 27-51, 1979.

SCHWARZACHER, D.; AMBROS, P.; SHWEIZER, D. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analyses. **Plant Systematics and evolution**, Vienna, v. 134, n. 3/4, p. 293-297, 1980.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, Berlin, v. 58, n. 4, p. 307-324, 1976.

SLOWING BARILLAS, K. V. **Estudio de la Actividad Antiinflamatoria de Diversas Especies de la Flora de Guatemala.** Facultad de farmácia. 1992. Memoria Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Comparación de la composición química y la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Bogota**, v. 27, n. 105, p. 579-597, dic. 2003.

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

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

SVETLANA, P. L.; GANEVA, G. D.; Chromosome N-banding polymorphism in *Aegilops geniculata* Roth. **Genetic Resource and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 47, n. 1, p. 35-41, Feb. 2000.

TAVARES, E. S. **Estudos integrados em *Lippia alba* (Verbenaceae)- uma planta de interesse econômico e medicinal.** 2003. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essencial oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)- A literature review. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 8, p. 471-485, 1996.

THEIS, N.; LERDAU, M. The evolution of function in plant secondary metabolites. **International Journal in Plant Science**, Chicago, v. 164, p. 93-102, May 2003. Supplement. 3

TRONCOSO, N. S. los generos de verbenaceae de sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolívia, Paraguai, uruguay y sur de Brasil). **Darwiniana**, Buenos Aires, v. 18, n. 3/4, p. 295-412, 1974.

VALE, T. G.; MATOS, F. J. A.; LIMA, T. C. M.; VIANA, G. S. B. Behavioral affects of essential Oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 167, n. 2, p. 127-133, Nov. 1999.

VIANA, G. S. D.; VALE, T. G.; SILVA, C. M. M.; MATOS, F. J. D. Anticonvulsant activity of essential oils and active from chemotypes of *Lippia alba* (Mill) NE Br. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 23, n. 11, p. 1314-1317, Nov. 2000.

VOSA, C. G. The basic karyotipe of rye (*Secale cereale*) analysed with Giemsa and fluorecence methods. **Heredity**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 403-408, 1974.

VOSA, C. G. Chromosome banding in plants. In: SHARMA, A. K.; SHARMA, A. (Ed.). **Chromosome and cell genetics**. London: Gordon and Breach Science Publishers, 1985. p. 79-104.

VOSA C. G. Heterochromatin recognition with fluorochromes. **Chromosoma**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 366- 372, 1970.

WEIMARCK, A. Heterochromatin polymorphism in the rye karyotype as detected by the Giemsa C-banding technique. **Hereditas**, Landskrona, v. 79, n. 2, p. 293-300, 1975.

YEN- YU, K.; SONG-BIN, C.; TSAI-YUM, L.; CHANG-HUAIN, H.; YAO-HUANG, C.; WEN-HUEI, C.; CHI-CHANG, C. Defferential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotipe variation in Phalaenopsis orchids. **Annals of Botany**, London, v. 87, n. 3, p. 387-395, Mar. 2001.

YONENAGA-YASSUDA, Y.; ASSIS, M. DE F. L.; KASAHARA, S., L'ABBATE, M.; SOUZA, M. J. Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for the activity of rDNA genes in both X chromosomes of females. **Cytogenetic, Cell Genetic**, Basel, v. 35, n. 2, p. 143-147, 1983.

ZOGHBI, M. G. B.; LIZ, A. I. R.; RAMOS, L. S. Essential Oil of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Growing wild in the brazilian amazon. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 13, n. 1, p. 47-48, 1998.