

**POLIPLOIDIA EM ACESSOS DE *Lippia alba*
(Mill) NE. Br (Verbenaceae)**

PATRÍCIA MARIA OLIVEIRA PIERRE

2008

PATRÍCIA MARIA OLIVEIRA PIERRE

**POLIPLOIDIA EM ACESSOS DE *Lippia alba* (Mill)
NE. Br (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"

Orientador

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

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

Pierre, Patrícia Maria Oliveira.

Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill) NE. Br (Verbenaceae) / Patrícia
Maria Oliveira Pierre. -- Lavras : UFLA, 2008.

99 p. : il.

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

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. Lippia. 2. Citogenética. 3. Poliploidia. 4. Planta medicinal. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 583.880415

- 633.88

PATRÍCIA MARIA OLIVEIRA PIERRE

**POLIPLOIDIA EM ACESSOS DE *Lippia alba* (Mill) NE. Br
(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 18 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini UFJF

Profa. Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena UFJF

Profa. Dra. Ana Christina Brasileiro-Vidal UFPE

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres UFLA

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

UFLA

(Orientador)

LAVRAS - MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

por sempre iluminar o meu caminho e abrandar o meu coração.

A todos os meus mestres,

pelos ensinamentos.

Aos meus amigos,

por estarem sempre ao meu lado,

OFEREÇO

Aos meus pais, Paulo e Rita e irmãos, Rosanna e Danilo, pelo apoio,
amor incondicional e compreensão.

Ao meu Flávio, por todo amor, respeito e sinceridade,

DEDICO

“A paciência não é um vitral gracioso para as suas horas de lazer. É amparo destinado aos obstáculos.”

“A serenidade não é jardim para os seus dias dourados. É suprimento de paz para as decepções de seu caminho.”

“A calma não é harmonioso violino para as suas conversações agradáveis. É valor substancial para os seus entendimentos difíceis.”

“A tolerância não é saboroso vinho para os seus minutos de camaradagem. É porta valiosa para que você demonstre boa-vontade, ante os companheiros menos envolvidos.”

“A boa cooperação não é processo fácil de receber concurso alheio. É o meio de você ajudar ao companheiro que necessita.”

“A confiança não é um néctar para as suas noites de prata. É refúgio certo para as ocasiões de tormenta.”

“O otimismo não constitui poltrona preguiçosa para os seus crepúsculos de anil. É manancial de forças para os seus dias de luta.”

“A resistência não é adorno verbalista. É sustento de sua fé.”

“A esperança não é genuflexório de simples contemplação. É energia para as realizações elevadas que competem ao seu espírito.”

“Virtude não é flor ornamental. É fruto abençoado do esforço próprio que você deve usar e engrandecer no momento oportuno.”

EMMANUEL

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que colocou em meu caminho, por estar comigo em todas as circunstâncias, por renovar sempre as minhas esperanças e fortalecer sempre os laços do caminho do bem.

A meus pais, Paulo e Rita e irmãos, Rosana e Danilo e familiares, pelo amor e apoio incondicionais, carinho e compreensão. Pela presença sempre constante em minha vida.

Ao amor da minha vida, Flávio, pelo imenso amor, apoio e carinho. Pelos sonhos que tornou realidade, pela alegria que trouxe à minha vida. Por tornar todos os momentos sempre especiais.

À amiga e orientadora Lisete Chamma Davide, pelo auxílio, compreensão nos momentos difíceis, pela confiança e serenidade, pelas oportunidades e por todos os ensinamentos.

Ao orientador e amigo Lyderson Facio Viccini, pela iniciação científica, pela orientação no mestrado e pelos ensinamentos.

À amiga e professora Giovana Augusta Torres, pelas contribuições e pela amizade.

À amiga e professora Fátima (Fatinha), pelos ensinamentos, sugestões e pelo incentivo.

Ao professor André Luiz Laforga Vanzela, da Universidade Estadual de Londrina, por todo o auxílio, ensinamento e disponibilidade.

À professora Ana Christina Brasileiro-Vidal, por todo auxílio, disponibilidade e sugestões.

Aos professores João Bosco, Magno, César, Elaine, João Cândido, Samuel, Eduardo Alves, Daniel, Dulcinéia, Wagner e José Eduardo, pelos ensinamentos no decorrer da pós-graduação.

Aos grandes amigos Saulo, Cris, Fernanda, Caio e Douglas, meus sinceros agradecimentos por todo apoio, auxílio, incentivo e amizade.

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

Aos amigos inesquecíveis do Coral Vozes do Campus que, nesses cinco anos de convivência, muito me ensinaram e encantaram com suas maravilhosas vozes, pela amizade e incentivo. Obrigado por terem me recebido de braços abertos.

Aos amigos do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da Universidade Estadual de Londrina (UEL)-Paraná, pela recepção, por todo auxílio e pela amizade.

A Elaine, Patrícia e Thaísa, 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 a Lamartine, Irondina e Rafaela, por todo auxílio e amizade.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

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

BIOGRAFIA

Patrícia Maria Oliveira Pierre, filha de Paulo Silva Pierre e Rita Maria Pierre, nasceu em 14 de dezembro de 1979, em São Paulo, capital.

Iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora em novembro de 1998, licenciando-se em setembro de 2002 e bacharelado-se em fevereiro de 2003.

Bolsista do Programa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), de março de 2001 a fevereiro de 2003, desenvolveu sua iniciação científica na área de Citogenética Vegetal, em espécies do gênero *Lippia*, sob orientação do Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini.

Em março de 2003, iniciou o mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas na Universidade Federal de Lavras, concluindo-o em setembro de 2004. No mesmo ano, ingressou no doutorado pela mesma instituição e área de concentração, concluindo-o em fevereiro de 2008. Ambos foram realizados sob a orientação da Profa. Dra. Lisete Chamma Davide.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1: Poliploidia em acessos de <i>Lippia alba</i> (Mill) NE. Br (Verbenaceae).....	1
1 Introdução geral.....	2
2 Referencial teórico geral.....	4
2.1 A família Verbenaceae e o gênero <i>Lippia</i>	4
2.1.1 Aspectos botânicos e ecológicos.....	4
2.1.2 Importância econômica.....	5
2.1.3 Variação química em <i>Lippia alba</i>	6
2.1.4 Potencial biotecnológico e caracterização morfológica dos quimiotipos Citral, Carvona e Linalol.....	8
2.2 Aspectos genéticos e citogenéticos de <i>Lippia alba</i>	10
2.3 Poliploidia e evolução do genoma.....	12
2.4 Contribuições da citogenética no estudo da poliploidia e evolução do genoma.....	16
2.4.1 Quantificação do tamanho do genoma nuclear.....	16
2.4.2 Bandeamentos cromossômicos.....	20
2.4.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	25
2.5 Palinologia.....	29
3 Referências bibliográficas Geral.....	33
CAPÍTULO 2: Conseqüências da poliploidia em <i>Lippia alba</i> (Verbenaceae).	44
1 Resumo.....	45
2 Abstract.....	46
3 Introdução.....	47

4 Material e Métodos.....	49
4.1 Obtenção do material.....	49
4.2 Conteúdo de DNA.....	49
4.3 Morfologia do grão de pólen.....	50
4.3.1 Microscopia de luz.....	50
4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	51
5 Resultados e Discussão.....	52
5.1 Conteúdo de DNA.....	52
5.2 Palinologia.....	56
6 Conclusões.....	65
7 Referências Bibliográficas.....	66
CAPÍTULO 3: Bandeamentos cromossômicos e hibridização <i>in situ</i>	
fluorescente em <i>Lippia alba</i> (Verbenaceae) poliplóide.....	70
1 Resumo.....	71
2 Abstract.....	72
3 Introdução.....	73
4 Material e Métodos.....	75
4.1 Material vegetal.....	75
4.2 Preparações cromossômicas.....	75
4.3 Bandeamentos cromossômicos.....	75
4.3.1 Bandeamento C.....	75
4.3.2 Bandeamentos DAPI/CMA3.....	76
4.3.3 Coloração com nitrato de prata.....	77
4.4 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	77
4.5 Ideogramas.....	78
5 Resultados e Discussão.....	79
5.1 Bandeamento C.....	79
5.2 Bandeamentos DAPI/CMA3.....	82

5.3 Coloração com nitrato de prata.....	85
5.4 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	87
5.5 Evolução da poliploidia em <i>Lippia alba</i>	90
6 Conclusões.....	95
7 Referências Bibliográficas.....	96

RESUMO

PIERRE, Patrícia Maria Oliveira. **Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill) NE. Br (Verbenaceae)**. 2008. 99p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*

Lippia alba Mill. N.E.Br, comumente conhecida no Brasil como cidreira, é uma planta medicinal nativa da América do Sul, utilizada na medicina popular contra distúrbios gastrointestinais e respiratórios, dentre outras. É uma espécie citologicamente variável, que apresenta poliploidia natural entre indivíduos, com números cromossômicos de $2n=2x=30$, $2n=4x=60$ e $2n=12$ a 60 (mixoplóide). Embora apresente importância econômica, medicinal, poliploidia natural e seja amplamente difundida em várias regiões brasileiras, estudos sobre a poliploidia e suas consequências para a evolução do genoma de *L. alba* ainda não são encontrados na literatura. Técnicas de citometria de fluxo, análise ultra-estrutural de grãos de pólen por meio de microscopias de luz e eletrônica de varredura, bandeamentos cromossômicos e hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 45S foram aplicadas. Tais metodologias possibilitaram observar que os citótipos poliplóides de *L. alba* estão passando por reorganizações do genoma que envolvem alterações cariotípicas seguidas de perda e inativação de seqüências de DNA. Tais alterações afetaram, inclusive, caracteres palinológicos. As informações obtidas com o presente estudo são importantes para auxiliar na caracterização da biodiversidade da espécie, oferecendo, além disso, evidências para esclarecer a evolução do genoma e as possíveis origens de *L. alba* poliplóide.

* Comitê de Orientação: Lisete Chamma Davide-UFLA (Orientadora), Lyderson Facio Viccini - UFJF.

ABSTRACT

PIERRE, Patrícia Maria Oliveira. **Polyploidy in accessions of *Lippia alba* (Mill) NE. Br (Verbenaceae)**. 2008. 99p. Thesis (Doctor's degree in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*

Lippia alba Mill. N.E.Br, commonly known in Brazil as cidreira, is a medicinal plant native of South America and it is used in folk medicine for gastrointestinal, respiratory disorders and possesses several biological properties. This species is a karyologically variable and display natural polyploidy among individuals, with chromosome numbers of $2n=2x=30$, $2n=4x=60$ and $2n=12$ to 60 (mixoploid). Although its presents economical and medicinal importance; natural polyploidy and is widespread in several Brazilian regions, studies on polyploidy and its consequences to genome evolution in *L. alba* are not-reported in the literature. Flow cytometry, ultrastructural analysis by light microscopy and scanning electron microscopy of pollen grains, chromosome bandings and fluorescent *in situ* hybridization using rDNA 45S probe techniques were employed. Evidences for genome reorganization that include karyotype rearrangements, gene loss and DNA sequence inactivation were observed. These changes have influenced palynological characteristics. All informations obtained with these studies may be important for increase our knowledge on biodiversity characterization and offer further evidences to clarify the genome evolution and possible origins of *L. alba* polyploid.

* Guidance Committee: Lisete Chamma Davide-UFLA (Major Professor), Lyderson Facio Viccini - UFJF.

CAPÍTULO 1

Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill) NE. Br (Verbenaceae)

1 INTRODUÇÃO GERAL

A idéia de evolução como um princípio para a origem da biodiversidade em todos os fenômenos da vida deve incluir a análise dos cromossomos, estruturas responsáveis por carregar a herança nuclear. Assim, alterações no tamanho, na morfologia e no número cromossômico são características evidentes do processo evolutivo em espécies vegetais.

Dentre essas alterações, a poliploidia, ou a multiplicação do número cromossômico, constitui um fator chave na evolução das plantas, sendo um fenômeno comumente observado em diversas famílias de plantas.

Estudos recentes têm revelado que muitos poliplóides apresentam múltiplas origens. Além disso, têm passado por extensivas e rápidas alterações cromossômicas e genômicas e têm seus padrões de expressão gênica alterados e conseqüentemente, suas características morfológicas, ecológicas e fisiológicas modificadas. Essas observações demonstram que a poliploidia em plantas é um processo dinâmico.

Considerando todos os eventos pelos quais os genomas poliplóides podem passar, a descoberta de um poliplóide natural constitui excelente oportunidade para examinar numerosos fenômenos relacionados à especiação e à evolução. Em populações naturais de *Lippia alba* (Verbenaceae), espécie medicinal popularmente conhecida no Brasil como erva cidreira, citótipos apresentando poliploidia e eliminação cromossômica (mixoploidia) foram identificados por Pierre (2004).

No entanto, estudos citogenético-moleculares e palinológicos ainda não foram realizados em citótipos poliplóides e mixoplóides dessa espécie. Considerando que ela habita todas as regiões do Brasil, é muito conhecida pela

população e tem importância econômica, estudos dessa natureza são de grande relevância, pois poderão auxiliar na caracterização da sua biodiversidade.

Desse modo, este trabalho foi realizado com os objetivos de analisar citótipos poliplóides e mixoplóides de *L. alba* por meio de técnicas de citogenética clássica/molecular e palinologia, auxiliando na caracterização de sua biodiversidade e apresentando com relatos inéditos a respeito da poliploidia da espécie. Os resultados obtidos poderão abrir caminhos para que novas metodologias sejam aplicadas, na busca de um melhor entendimento da sua evolução.

2 REFERENCIAL TEÓRICO GERAL

2.1 A família Verbenaceae e o gênero *Lippia*

2.1.1 Aspectos botânicos e ecológicos

A família Verbenaceae está incluída no clado Asteridae e ordem Lamiales (Judd et al., 2002), sendo constituída por 36 gêneros e 1.035 espécies. Diversos gêneros dentro da família têm se destacado em função das propriedades medicinais e ornamentais. Entre eles, podem ser citados os gêneros *Aloysia*, *Lantana* e, principalmente, *Lippia* (Bonzani et al., 1997; Salimena, 2000).

O gênero *Lippia* foi descrito por Linnaeu, em 1753. Segundo Salimena (2000), ele reúne cerca de 200 espécies, distribuídas principalmente nos neotrópicos e subtropicais, com três centros de diversidade: Brasil, México e Argentina. O Brasil é o maior deles com, aproximadamente, 111 espécies. Contudo, a estimativa do número de espécies do gênero tem sido motivo de controvérsias. De acordo com características morfológicas, autores, como Schauer (1847), Bentham & Hooker (1876) e Briquet (1897), consideram os gêneros *Acantholippia* e *Phyla* como sinônimos ou subgêneros de *Lippia*. Por outro lado, outros autores, como Troncoso (1974), Botta (1980) e Salimena (2000), consideram-nos como gêneros distintos.

Espécies do gênero *Lippia* apresentam propriedades medicinais comprovadas, destacando-se entre elas, *Lippia alba*, que tem vários nomes populares: erva-cidreira, falsa-melissa, chá-de-tabuleiro, erva-cidreira-do-campo, salva-do-brasil, salva-limão e erva-cidreira-brava. *Lippia alba* é arbustiva, podendo chegar a dois metros de altura, muito ramificada e possui ciclo perene e crescimento rápido. Floresce durante todo o ano e, em função de

suas inúmeras propriedades medicinais, recebe amplo destaque no gênero (Salimena, 2000). Pode ser encontrada em regiões de clima tropical e subtropical, habitando solos arenosos, margens de rios, açudes, lagos e lagoas (Correa et al., 1994).

Em relação ao sistema reprodutivo, espécies do gênero, incluindo *L. alba*, são alógamas, com dicogamia protândrica e são polinizadas por insetos. Algumas espécies são autocompatíveis e autógamas facultativas, quando a alogamia falha (Sanders, 2001; Schocken, 2007).

2.1.2 Importância econômica

O uso de plantas medicinais é mais antigo do que se imagina. Provavelmente, a propriedade terapêutica das plantas já era conhecida na pré-história. O homem, ao observar o hábito dos outros animais, aprendeu que determinadas plantas apresentam princípios capazes de curar, ou ajudar a curar, os nossos males. Assim, desde épocas remotas, a utilização de plantas de interesse medicinal exerce grande influência sobre o cotidiano do homem.

Estima-se que, desde a validação farmacológica da planta medicinal até a produção do medicamento fitoterápico, sejam gastos de 0,15 a 7 milhões de dólares, envolvendo um tempo total de dois a cinco anos, para a sua disponibilização ao mercado consumidor. Em contrapartida, para medicamentos sintéticos, são gastos de 231 a 500 milhões de dólares e um tempo de 10 a 15 anos (Pinto & Bertolucci, 2002). Assim, a utilização de plantas medicinais para a produção de medicamentos é uma forma economicamente viável, se comparada à produção de medicamentos sintéticos.

Lippia alba é muito utilizada na medicina popular, apresentando diversas atividades farmacológicas, o que vem despertando o interesse cada vez maior dos pesquisadores. Esta espécie é promissora na indústria farmacêutica, de aromas e perfumaria, além de apresentar potencial para ser utilizada na indústria

de defensivos agrícolas, devido ao fato de apresentar ação como repelente e atividades fungicótóxica e inseticida (Santos-Mendes, 2001).

Seus constituintes químicos conferem amplo espectro de ação como sedativa, antiespasmódica, estomáquica, diurética, antiinflamatória, analgésica, antisséptica e miorrelaxante, entre muitas outras (Krishore et al., 1983; Dwivedi et al., 1990; Krishore & Mishra, 1991; Correa, 1992; Vale et al., 1999; Rao et al., 2000; Viana et al., 2000), podendo ser usada na forma de infusão, tinturas, banhos, cataplasmas e inalante.

De acordo com Schocken (2007), as substâncias mais importantes do óleo essencial de *L. alba* são linalol, citral (neral e geranial), limoneno, carvona, cariofileno, β -mirceno, cânfora, 1-8 cineol, germacreno e alfa-fencheno. O linalol, por exemplo, é um monoterpene amplamente utilizado na fabricação de perfumes, como o Chanel nº5 (na forma de óleo essencial bruto), assim como na produção de outros cosméticos e aromatizantes (Frighetto & Oliveira, 1998).

2.1.3 Variação química em *Lippia alba*

Segundo Craveiro (1981), citado por Santos-Mendes (2001), a família Verbenaceae possui composição química dos óleos essenciais bastante variada.

Lippia alba vem sendo intensamente estudada, sob o ponto de vista fitoquímico, particularmente devido à existência de grande variabilidade na composição química dos seus óleos essenciais, o que está estritamente ligado à diversidade de ações terapêuticas que lhes são atribuídas (Ricciardi, Ricciardi & Bandoni, 2000). Essa variação permite, inclusive, classificá-la em diferentes quimiotipos, como: citral, linalol e carvona (analisados no presente trabalho e denominados La1, La2 e La3, respectivamente); mirceno/cânfora, limoneno/carvona e mirceno (Sousa, 2006; Yamamoto, 2006; Schocken, 2007).

Segundo Ming (1992), citado por Santos-Mendes (2001), os resultados obtidos no estudo dos principais componentes do óleo essencial de *L. alba* nem

sempre são os mesmos, devido ao efeito dos fatores ambientais e metodológicos utilizado por diferentes autores. No entanto, Sanders (2001) relata que perfis de óleos essenciais em Verbenaceae são diversificados para as espécies da família.

De acordo com D'Andrea (1995), variações qualitativas na composição química dos óleos essenciais se originam principalmente de uma variação genética e ou de possíveis influências ecológicas. No entanto, em *L. alba*, os quimiotipos citral, linalol e carvona mantiveram suas diferenças químicas e morfológicas, mesmo quando submetidos às mesmas condições ambientais. Outros estudos envolvendo a propagação vegetativa desses três quimiotipos foram realizados por Biasi & Costa (2003) que verificaram que os quimiotipos diferem quanto à resposta de enraizamento, embora apresentem certa facilidade na formação de raízes.

A idéia de que a composição química dos óleos essenciais em *L. alba* seja controlada geneticamente foi corroborada por Yamamoto (2006). No trabalho deste autor, foram avaliadas a magnitude do efeito do genótipo (G), de experimentos (E) e da interação genótipos X ambientes na produção e a composição de óleos essenciais de *L. alba*. Foram utilizados vinte genótipos pertencentes a cinco quimiotipos (linalol, mirceno/cânfora, limoneno/carvona, citral e mirceno) e avaliados seis caracteres fenotípicos: massas da folha fresca e seca, rendimento do óleo essencial, altura das plantas, composição química do óleo e resistência ao vírus do mosaico CMV (*Cumcumber Mosaic Virus*). Nesse trabalho, a autora verificou que o efeito de genótipos (G) e de experimentos (E), bem como a interação GXA, foi altamente significativo para os três primeiros caracteres. Os genótipos foram classificados e os quimiotipos linalol e limoneno/carvona foram estatisticamente superiores em relação aos demais. Por outro lado, não foram observadas grandes variações quantitativas e qualitativas para a composição química do óleo, mostrando que os compostos majoritários devem ser determinados geneticamente e que pequenas variações devem-se,

preferencialmente, ao efeito ambiental e ao efeito GXE. Na avaliação da resistência ao CMV, os genótipos do quimiotipo linalol foram resistentes ao vírus. Com os resultados, a autora sugeriu que os melhores genótipos para a produção de óleos essenciais foram: linalol, limoneno/carvona e citral.

O trabalho realizado por Yamamoto (2006) ressalta o potencial que *L. alba* tem para ser explorado em programas de melhoramento genético. Schocken (2007) realizou um trabalho pioneiro nesse âmbito. Visando dar início a um programa de melhoramento genético em *L. alba*, a autora realizou estudos sobre a biologia reprodutiva da espécie e obteve quimiotipos híbridos que possam, no futuro, auxiliar na identificação de novas combinações de quimiotipos que possam ter interesse comercial. Foram obtidos, a partir de cruzamentos biparentais, híbridos entre os quimiotipos linalol X citral, mirceno/citral X limoneno/carvona e linalol X limoneno/carvona, tendo o linalol apresentado o melhor comportamento nos cruzamentos realizados. Frutos obtidos por autofecundações produziam menor número e taxa de germinação de sementes, o que sugere que a espécie é preferencialmente alógama.

2.1.4 Potencial biotecnológico e características morfológicas dos quimiotipos citral, carvona e linalol

Em relação ao potencial biotecnológico dos quimiotipos de *L. alba*, o óleo essencial do quimiotipo La1- citral apresenta forte atividade fungicida e nematicida, efeitos ansiolítico, hipotérmico, analgésico e antidermatogênico (Vale et al., 1999; Viana et al., 2000; Tavares, 2003).

O quimiotipo La2- carvona possui ações nematicida, bacteriostática, bactericida e fungicida. Além disso, a carvona apresenta atividade alelopática, provocando inibição do brotamento de batatas (Tavares, 2003). O mesmo autor afirma que o linalol (principal constituinte do quimiotipo La3) é utilizado na indústria de perfumaria e apresenta, ainda, efeitos sedativos, atuando sobre o

sistema nervoso central; também possui propriedades hipotérmicas e anticonvulsivantes, podendo exercer atividades antiinflamatória, analgésica, bactericida, antifúngica e inseticida. Além das atividades anteriormente citadas, o linalol apresenta atividade contra linhagens de células de leucemia e linfoma humanos.

Sob o ponto de vista morfológico, observa-se que os quimiotipos de *L. alba* apresentam diversidade especialmente no tamanho e na textura das folhas, e no tamanho e na coloração das flores (Correa, 1992). Este mesmo autor, em estudos anatômicos, histoquímicos e do extrato aquoso de *L. alba*, concluiu que essa espécie está sujeita a grandes variações morfológicas, anatômicas e fitoquímicas, resultantes de adaptações às condições ambientais do local de procedência.

Tavares (2003) avaliou caracteres morfológicos dos quimiotipos La1-citral, La2-carvona e La3-linalol e verificou que estes apresentaram diferenças significativas em relação ao porte (1,6m; 1,8m e 1m para os quimiotipos La1, La2 e La3, respectivamente); à velocidade de crescimento (o quimiotipo La1 apresentou maior velocidade de crescimento e maior capacidade invasiva em relação aos demais e o quimiotipo La3, a menor velocidade de crescimento); ao tamanho das folhas (o quimiotipo La3 apresentou maior tamanho, seguido pelos quimiotipos La1 e La2) e à anatomia da lâmina foliar (variações em relação ao comprimento e à largura das células epidérmicas e à organização do mesofilo). Além disso, nos testes de micropropagação, os quimiotipos responderam diferentemente à desinfestação (o quimiotipo La1 apresentou a melhor resposta ao tratamento, seguida pelos quimiotipos La2 e La3). Em relação à taxa de multiplicação, o quimiotipo La3 apresentou a menor taxa.

Santos-Mendes (2001) afirma que essa espécie é extremamente variável e polimórfica. Sua ampla distribuição no globo terrestre poderia também influenciar na plasticidade fenotípica da espécie.

2.2 Aspectos genéticos e citogenéticos de *Lippia alba*

Para o gênero *Lippia*, já foram descritos os número cromossômicos $n=12, 13, 14, 15, 16$ e 18 (Brandão, 2003). O número básico da família ainda é duvidoso. Sanders (2001) relata que os números básicos formam uma série aneuplóide entre gêneros e entre espécies do mesmo gênero. Os números básicos sugeridos são $x=5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 18, 19$ e 20 . Segundo esse mesmo autor, acredita-se que $x=10$ seja o número básico ancestral e que tenham ocorrido aneuploidias ascendentes e descendentes em torno desse. Para o gênero *Lippia*, o número básico proposto é $x=5$, embora nenhuma espécie com $2n=10$ cromossomos tenha sido descrita. Sanders (2001) relata, ainda, que é comum a ocorrência de poliploidia e de híbridos naturais entre espécies de diferentes gêneros da família Verbenaceae.

Viccini et al. (2005) relataram o número cromossômico de 14 espécies do gênero. Eles verificaram que as espécies apresentaram números cromossômicos entre $2n=20$ a 56 , evidenciando a ocorrência de poliploidia no gênero. Seus dados contribuíram para reforçar a necessidade de revisões a respeito das seções em que as espécies analisadas são colocadas taxonomicamente. Além disso, demonstram serem necessários estudos adicionais para um melhor entendimento sobre o número cromossômico básico e a filogenia do grupo.

Em relação a *L. alba*, o número cromossômico previamente relatado é de $2n=30$ (Bose & Choudhy, 1960). Brandão et al. (2007) confirmaram esse número e verificaram que esta espécie apresenta 11 pares metacêntricos e 4 submetacêntricos. Além disso, os autores observaram a formação de bivalentes durante a meiose e, por meio de técnicas de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que *L. alba* apresenta dois sítios de DNAr 5S e seis sítios de DNAr 45S, sugerindo que a referida espécie apresenta comportamento diplóide.

A taxonomia dessa espécie, como comentado anteriormente, é problemática. Para alguns autores, *L. alba* e *L. geminata* são sinonímias e, para outros, são espécies distintas. No entanto, Kumar & Dutt (1989) estudaram as bases citogenéticas de *L. geminata* e *L. alba* e verificaram que a primeira apresenta $2n=32$ cromossomos.

Pierre (2004) realizou estudos citogenéticos (análise cariotípica, análise meiótica, viabilidade dos grãos de pólen e análise por meio de marcadores RAPD) em três quimiotipos de *L. alba* (La1-citral, La2-carvona e La3-linalol) e verificou a ocorrência de poliploidia e mixoploidia dentro da espécie. Em seus estudos, foram encontrados números cromossômicos de $2n=30$, $2n=60$ e $2n=12$ e 60 para La1, La2 e La3, respectivamente. A autora verificou, ainda, que os quimiotipos tetraplóide e mixoploide apresentam meiose irregular e altas taxas de inviabilidade do grão de pólen. Os marcadores RAPD evidenciaram a existência de variabilidade genética entre os mesmos e, além disso, possibilitaram verificar a formação de dois grupos principais, correspondendo aos quimiotipos La1 e La2 e que indivíduos do quimiotipo La3 se agruparam tanto com o primeiro (representado pelos indivíduos La1) quanto com o segundo (representado pelos indivíduos La2). De acordo com esses resultados, a autora sugeriu que o quimiotipo La2-carvona ($2n=60$) constitui um autopoliplóide de La1-citral ($2n=30$) e que, possivelmente, La3-linalol constitui um híbrido resultante do cruzamento entre La1-citral e La2-carvona. Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar a origem, a evolução e o relacionamento entre esses genótipos.

A partir desse trabalho, questões a respeito da associação entre o número cromossômico e a composição química de *L. alba* surgiram. Para investigar essa indagação, Sousa (2006) analisou diferentes acessos de *L. alba* com $2n=30$ cromossomos por meio de técnicas de bandeamentos cromossômicos. Este autor verificou que, dentre os acessos, estavam presentes dois diferentes quimiotipos

(citrinal e citrinal/linalol), evidenciando, assim, que o número cromossômico não está diretamente associado à variação química. Além disso, foram observadas variações no número de bandas e na quantidade de heterocromatina entre os acessos avaliados. Os blocos de heterocromatina foram visualizados principalmente em regiões cromossômicas centroméricas.

2.3 Poliploidia e evolução do genoma

A poliploidia é um mecanismo evolutivamente importante, sendo um evento muito comum em plantas, ocorrendo esporadicamente entre os animais. Estimativas sugerem que cerca de 80% de todas as angiospermas tenham passado por um ou mais episódios de poliploidização (Soltis & Soltis, 1999; Ramsey & Schemske, 2002; Adams & Wendel, 2005). Diversos estudos têm demonstrado que a poliploidia tem desempenhado um importante papel na evolução das plantas, contribuindo para a diversificação de angiospermas e pteridófitas (Soltis & Soltis, 1999).

Diversas espécies economicamente importantes são poliplóides formados seja pela hibridação intencional e seleção durante o melhoramento genético ou como um resultado de um evento ancestral de poliploidização natural (paleopoliploidia) (Soltis & Soltis, 1999; Otto & Whitton, 2000). Alopoliplóides, como o trigo, o algodão e a canola, formaram-se pela combinação de dois ou mais genomas distintos e autopoliplóides, como a batata, resultaram da duplicação de um único genoma.

Vários mecanismos podem promover a poliploidia em plantas, dentre eles destacam-se a duplicação somática nos estágios zigótico, embriogênico ou meristemático ou, o que é mais comum, a fertilização de gametas não reduzidos (Soltis et al., 2003).

Estudos genéticos e genômicos têm demonstrado que muitas espécies vegetais têm passado por um ou mais episódios de poliploidização, seguidos de

eventos de diploidização. Espécies como a arábida (*Arabidopsis thaliana*) e o milho (*Zea mays*), por exemplo, embora apresentem um número cromossômico que não indica poliploidia ($2n=10$ e $2n=20$ cromossomos, respectivamente) e sejam diplóides funcionais, são consideradas paleopoliplóides (Schubert, 2007). Estudos moleculares indicam que essas espécies passaram por ciclos de poliploidização, apresentando, em seus genomas, regiões cromossômicas duplicadas (Comai et al, 2000; Wolfe, 2001; Soltis et al., 2003; Chen et al., 2007).

Desse modo, estudos genômicos têm questionado: o que é um verdadeiro diplóide? Na tentativa de diferenciar os estágios pelos quais os poliplóides podem passar, diversos autores têm utilizado, freqüentemente, os termos neopoliplóide (poliplóide recém formado) e paleopoliplóide (poliplóide diploidizado) (Soltis et al., 2003).

Detectar um evento ancestral de poliploidização pode ser extremamente desafiante. De acordo com Wolfe (2001), eventos ancestrais de poliploidização são especificamente difíceis de serem detectados, pois o tempo apaga os sinais de duplicação, a segregação dissômica se restabelece, rearranjos cromossômicos levam a sintenias cromossômicas e ocorre a diferenciação ou a perda de cópias gênicas. Isso tem sido considerado, por alguns pesquisadores, como o mistério da diploidização ou o paradoxo de populações poliplóides que se tornam diploidizadas.

Populações poliplóides tendem a ter uma diversidade genética aumentada graças à ocorrência de reorganizações genômicas que podem ocorrer. Além disso, estudos recentes têm demonstrado que as respostas dos poliplóides aos desafios evolutivos ocorrem por meio de diferentes mecanismos (Soltis & Soltis, 1999; Chen et al., 2007).

Poliplóides recém-formados, por exemplo, podem sofrer rápidas mudanças na estrutura e na função dos seus genomas via mudanças genéticas (rearranjos cromossômicos, eliminação de seqüências de DNA e mutações) e epigenéticas (modificações na estrutura e função da cromatina e nos mecanismos de regulação via RNA) (Chen et al., (2007). Tais alterações podem ocasionar a eliminação somática parcial de cromossomos, levando à formação de indivíduos mixoplóides (Germand et al., 2005). Todos os mecanismos citados podem favorecer a diploidização, possibilitando a produção potencial de novos complexos gênicos.

A poliploidização pode afetar o tamanho e o volume celular, a taxa de crescimento, a estrutura e a função de determinados órgãos, como folhas, inflorescências e sementes, o sistema reprodutivo, bem como a distribuição geográfica das espécies (Otto & Whitton, 2000), alterando, desse modo, sistemas genéticos e fenotípicos.

Thompson et a., (2004) relataram que a poliploidia em plantas pode exercer grandes efeitos ecológicos. Trabalhando com a espécie *Heuchera grossulariifolia* (Saxifragaceae), estes mesmos autores observaram diferenças no ataque de herbívoros e na visitação de polinizadores entre plantas diplóides e tetraplóides. Plantas tetraplóides foram sujeitas a altos níveis de ataque pela traça *Greya politella* (Prodoxidae), quando comparadas a plantas diplóides simpátricas e parapátricas. Além disso, as plantas também foram atacadas por outras duas espécies: *G. piperella*, que atacou preferencialmente plantas diplóides e *Eupithecia misturata* (Geometridae), que atacou preferencialmente plantas tetraplóides. Plantas diplóides e tetraplóides que viviam em simpatria também mostraram diferenças em relação à visitação de polinizadores.

Assim, os autores concluíram que a poliploidia pode exercer importante influência sobre a estrutura e a diversificação de comunidades terrestres por meio de diferentes interações plantas/animais.

As condições que favorecem o estabelecimento e a persistência de poliplóides recém-formados ainda não são bem entendidas (Ramsey & Schemske, 2002). Estudos a respeito da origem, do estabelecimento e da evolução de neopoliplóides naturais e artificiais têm sido realizados, por diversos pesquisadores, em espécies como *Arabidopsis*, *Senecio cambrensis*, *S. eboracensis*, *Paeonia obovata* e *Arnica cordifolia* (Comai et al., 2000; Abbot & Lowe, 2004; Sang et al., 2004; Kao, 2007). Mecanismos que favorecem o estabelecimento de poliplóides são amplamente discutidos na literatura. Dentre eles, destacam-se a reprodução assexuada e o hábito perene, que favorecem a coexistência e o estabelecimento de citótipos poliplóides em populações simpátricas (Tate & Simpson, 2004; Kao, 2007).

A descoberta de neopoliplóides naturais constitui uma rica oportunidade para examinar numerosos fenômenos relacionados à especiação e à evolução das plantas e a citogenética constitui uma ferramenta poderosa para esse tipo de estudo.

Por meio da aplicação de diversas técnicas, é possível identificar alterações no nível de ploidia, na forma e na estrutura dos cromossomos por meio da identificação de rearranjos cromossômicos, no comportamento meiótico e no tamanho dos genomas, além de possibilitar que sejam examinadas as suas conseqüências para o volume nuclear e para o tamanho e a morfologia dos grãos de pólen.

2.4 Contribuições da citogenética no estudo da poliploidia e evolução do genoma

A seguir, são relatadas algumas das contribuições da citogenética no estudo da poliploidia e da evolução do genoma em vegetais.

2.4.1 Quantificação do tamanho do genoma nuclear

A quantidade de DNA nuclear (valor C) é um caráter de fundamental significância para o estudo das relações filogenéticas e da sistemática das espécies vegetais. O valor C de um organismo é a quantidade de DNA de um núcleo não duplicado (haplóide) (Greilhuber et al., 2005; Hembly et al., 2007) e tem sido também denominado de tamanho do genoma.

De acordo com Ohri (1998), o forte interesse pelo estudo do tamanho do genoma tem sido sustentado devido à existência de diferenças marcantes do conteúdo de DNA nuclear no âmbito infragenérico, o qual tem sido utilizado para demarcar diversos taxa. A ampla variação do tamanho do genoma nuclear existente dentro de muitas famílias e gêneros de organismos eucariotos foi descrita como o paradoxo do valor C, sendo proposta por Thomas (1971), citado por Ohri (1998). Esta variação não está intimamente relacionada às mudanças na ploidia e nem está correlacionada à complexidade dos organismos (Baack et al., 2005).

O paradoxo do valor C é especialmente observado em plantas superiores. Gimnospermas e muitas monocotiledôneas apresentam enormes quantidades de DNA, ao passo que muitas eudicotiledôneas possuem pequenas quantidades de DNA (Hembly et al., 2007). Entre as angiospermas, por exemplo, o tamanho do genoma varia amplamente e estudos têm demonstrado variação entre 0,2 pg, em *Arabidopsis thaliana* a 127,4 pg, em *Fritillaria assyriaca* (Bennett & Leitch, 1997).

O DNA repetitivo é o principal responsável por essa ampla variação. Este DNA “extra” foi considerado, por muito tempo, como um DNA “lixo” ou “parasita”, porém, sua ocorrência ampla no genoma eucariótico serve como um argumento a favor da importância deste componente do genoma (Hembley et al., 2007).

De acordo com Ohri (1998), embora apresente função não aparente, o DNA repetitivo possui função adaptativa, sendo capaz de produzir vários efeitos fenotípicos nucleares, celulares e tissulares.

Bennett & Leitch (1995) enfatizam que o conteúdo de DNA nuclear pode ser estimado por meio de várias técnicas, como: análise química (utilizada em 1960), cinética de reassociação (empregada a partir de 1970), microdensitometria (em 1976) e, a partir de 1986 até atualmente, citometria de fluxo. Dentre essas, serão destacadas a microdensitometria e a citometria de fluxo, que foram as técnicas que mais contribuíram para a estimativa do valor C das angiospermas.

•**Microdensitometria ou citofotometria** - nesta técnica, núcleos interfásicos são corados com Feulgen (que possui especificidade para a molécula de DNA). Em seguida, as lâminas são preparadas e analisadas em microscópios acoplados com microespectrofotômetros. Os valores de DNA *in situ* são obtidos com base na densidade óptica e convertidos em picogramas, utilizando um valor 4C de uma espécie padrão (Bennett & Leitch, 1995; Das et al., 1998; Sharma & Sharma, 1999).

•**Citometria de fluxo** - constitui um método rápido para separar e quantificar partículas e, normalmente, envolve o isolamento ou o preparo de suspensões cromossômicas ou interfásicas. O DNA é corado com corantes fluorescentes específicos para a molécula de DNA e a análise é realizada em um equipamento denominado citômetro de fluxo. Neste, as partículas (núcleos interfásicos, por exemplo) fluem em uma suspensão líquida e, por meio do

fenômeno de focagem hidrodinâmica, elas são forçadas a fluir, uma a uma, no centro de um fluxo. Com isso, elas são interceptadas por um feixe de luz e este, ao atravessar a partícula, emite uma fluorescência, cuja intensidade dependerá das características da partícula. A intensidade da fluorescência é detectada e digitalizada. São gerados gráficos em tempo real que contêm dados como a intensidade de fluorescência e a frequência das partículas. Os valores também são convertidos em picogramas, utilizando o conteúdo de DNA de uma espécie padrão (Bennett & Leitch, 1995; Dolezel, 1997; Sharma & Sharma, 1999; Côté-Real et al., 2002; Zonneveld et al., 2005).

A partir do desenvolvimento dessas técnicas de quantificação do DNA nuclear em vegetais, diversas listas contendo tais informações para angiospermas vêm sendo constantemente publicadas (Zonneveld et al., 2005). Esses dados têm sido armazenados sob forma eletrônica a partir de 1997 (base de dados de valores C de DNA para angiospermas no site: <http://www.kew.org/genomesize/homepage>).

Dados a respeito do valor C de DNA nuclear são muito importantes para o estudo da evolução do genoma das espécies vegetais. Tem sido relatada, por diversos pesquisadores, a ocorrência de variação intra-específica no tamanho do genoma (Bennett & Leitch, 1995; Ohri, 1998).

Essa variação no conteúdo de DNA nuclear pode ocorrer devido a polimorfismos na heterocromatina, presença de cromossomos B, aneuploidia, poliploidia e hibridação.

No que diz respeito à relação entre a poliploidia e o tamanho do genoma, espera-se que o conteúdo de DNA aumente proporcionalmente com o nível de ploidia e que o tamanho do genoma de anfidiplóides constitua a soma dos valores de DNA dos seus parentais. Correlação positiva entre o conteúdo de DNA nuclear e a poliploidia foi observada em algumas espécies e variedades de

Hordeum (Bennett & Smith, 1971), cultivares de *Celosia* (Nath et al., 1992) e *Vaccinium* (Costich et al., 1993), entre outras.

Entretanto, isso não é o que se observa na maioria dos casos (Ohri, 1998), devido à ocorrência de reorganizações genômicas, à ativação de transposons, à recombinação homeóloga e à eliminação de seqüências específicas de DNA que ocorrem após o processo de poliploidização e ocasionam perdas de DNA (Bennetzen, 2002; Leitch & Bennett, 2004). Assim, diferentes espécies podem responder de maneiras distintas aos eventos de poliploidização. Desse modo, a análise do conteúdo de DNA em plantas poliplóides pode auxiliar na identificação de possíveis mecanismos envolvidos na evolução das plantas.

Alguns pesquisadores têm utilizado somente a citometria de fluxo para avaliar o nível de ploidia de determinadas espécies, não avaliando o número cromossômico. É o caso do que foi relatado para espécies do gênero *Empetrum* (Empetraceae). Suda (2002) relata que *E. nigrum* é uma espécie diplóide com valor $2C=1,29\text{pg}$; *E. hermaphroditum* é tetraplóide com valor $2C=2,56\text{pg}$ e que um novo nível de ploidia (provavelmente triplóide) nessa espécie foi encontrado com $2C=1,94\text{pg}$. Contudo, a avaliação do nível de ploidia apenas por citometria de fluxo deve ser feita com cautela. Bennett & Leitch (1995) e Ohri (1998) observaram, por exemplo, variações no conteúdo de DNA em plantas com números cromossômicos constantes e, em alguns casos, como não houve repetibilidade, elas foram atribuídas a problemas com o método de determinação do conteúdo de DNA nuclear ou a fatores ambientais.

2.4.2 Bandeamentos cromossômicos

O estudo de padrões de bandejamento nos cromossomos surgiu como uma poderosa ferramenta na identificação de segmentos cromossômicos. Cromossomos de um genótipo individual mostram padrões específicos de diferenciação longitudinal. Esta característica pode ser utilizada até mesmo como um critério na identificação de uma espécie (Sharma & Sharma, 1999).

Atualmente, existem várias técnicas de bandejamento cromossômico, as quais foram descobertas casualmente por diferentes pesquisadores. Em 1970, Mary Lou Pardue & Joe Gall estavam trabalhando com protocolos de hibridização *in situ* (HIS), visando localizar seqüências específicas nos cromossomos de camundongos. Eles verificaram que, se após a HIS, corassem as preparações cromossômicas com Giemsa, intensas bandas apareciam nos cromossomos e indicavam a presença de segmentos de heterocromatina. Daí surgiu o bandejamento C (Sharma & Sharma, 1999).

A observação de que tratamentos com hidróxido de sódio a altas temperaturas poderiam alterar as propriedades de coloração de certas regiões cromossômicas abriu possibilidades de visualização de perfis de bandas ao longo dos cromossomos e, a partir disso, diversas espécies vegetais tiveram seus cromossomos caracterizados por meio do bandejamento C. Esta técnica foi eficiente na diferenciação de cromossomos metafásicos de espécies cultivadas, como trigo, cevada e centeio (Caspersson et al., 1972; Bostock & Sumner, 1978 citados por Jong, 2003).

Além disso, o bandejamento C pode ser empregado também em espécies que apresentam cariótipos similares, quando analisados por coloração convencional. Por exemplo, D'Emérico et al. (2002) analisaram as relações existentes entre duas espécies da família Orchidaceae (*Dactylorhiza romana* e *D. saccifera*) que apresentam $2n=2x=40$ cromossomos. Por meio do emprego do bandejamento C, foi possível a diferenciação dos cariótipos de acordo com a

quantidade e a distribuição da heterocromatina. Aliando esses resultados a dados obtidos com a análise de marcadores isoenzimáticos e de seqüências ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA ribossômico, os autores corroboraram a separação dessas espécies em seções diferentes (*D. romana* em *Sambucinae* e *D. saccifera* em *Dactylorhiza*).

Elneskog-Staan et al., (2007) utilizaram o bandejamento C para comparar os padrões do teosinto (*Zea nicaraguensis*) com *Z. luxurians*, *Z diploperennis* e *Z. mays* (milho cultivado). Com essa técnica, verificaram que o padrão de bandas C do teosinto é mais similar ao de *Z. luxurians* do que ao das demais espécies, resultando em um maior relacionamento entre elas.

Vários antibióticos são capazes de se ligar especificamente à molécula de DNA, como a cromomicina A3 (CMA), que se liga às regiões ricas em guanina e citosina (GC) e o DAPI (4-6 diamino-2-fenilindol), que cora regiões ricas em adenina e timina (AT). Ambos são corantes fluorescentes que produzem padrões de bandejamento, permitindo o estudo da complexidade das seqüências no cromossomo (Jong, 2003).

Em 2004, Souza & Benko-Iseppon analisaram os padrões de bandejamento CMA/DAPI em 13 espécies de Caesalpinioideae e Papilionioideae. Foi observada a presença de bandas CMA⁺ /DAPI⁻ terminais em alguns cromossomos da maioria das espécies analisadas e poucas espécies apresentaram regiões CMA⁻ /DAPI⁺. Associando esses resultados a dados obtidos com o bandejamento C, os autores confirmaram a existência de variabilidade cariológica em leguminosas tropicais, que foi previamente relatada por outros pesquisadores.

Gitaí et al., (2005) estudaram características cromossômicas e evolutivas de 19 taxa de 15 gêneros da família Bromeliaceae, utilizando informações sobre o número cromossômico e o padrão de bandas C, DAPI e CMA. Espécies da família apresentam número básico de $x=25$ cromossomos, caracterizando-se por

apresentar a poliploidia como principal mecanismo evolutivo. Foram observados dois diferentes níveis de ploidia em indivíduos morfologicamente indistinguíveis de *Deuterocohnia lorentziana* ($2n=50$ e $2n=150$) que cresciam no mesmo vaso. Além disso, enquanto as plantas diplóides possuíam cromossomos maiores (entre 1,14 e 2,29 μ m) com tendências para um cariótipo bimodal, as plantas tetraplóides apresentaram cromossomos menores (entre 0,5 e 1,94 μ m). Os autores relatam que essas observações sugerem a ocorrência de eliminação de seqüências genômicas após o processo de poliploidização. O padrão de bandas C revelou que algumas espécies da família são pobres em heterocromatina, uma característica típica em plantas que apresentam cromossomos muito pequenos. Devido ao tamanho reduzido dos cromossomos, foram observadas somente algumas bandas DAPI em poucas células e bandas CMA positivas foram encontradas associadas a constrições secundárias em algumas espécies. Com esses resultados, os autores evidenciaram que a análise do número cromossômico, agregada a outras características do cariótipo, é importante para entender as tendências evolutivas da família Bromeliaceae.

Castiglione et al. (2007) realizaram a caracterização citológica e molecular de *Vicia estraelonensis* ($2n=12$ cromossomos), utilizando, entre outras metodologias, bandeamentos com CMA3 e DAPI. Estes autores verificaram a ocorrência de sítios positivos para o CMA e para o DAPI, nas mesmas regiões cromossômicas. Isso foi observado em locais como regiões centroméricas e pericentroméricas de alguns cromossomos. Além disso, também foram observadas bandas teloméricas DAPI positivas nos cromossomos 2, 3, 4 e 5.

Para confirmar o status taxonômico de duas espécies do gênero *Solanum* (*S. nigrum* e *S. villosum*), Sultana & Alam (2007) analisaram características do cariótipo em relação ao número e tamanho cromossômico, posição do centrômero, comprimento total do lote haplóide e padrões de bandeamento

CMA e DAPI. Suas análises indicaram que *S. nigrum* e *S. villosum* têm $2n=24$ e 48 cromossomos, respectivamente, e tamanhos e morfologia similares. O percentual de regiões CMA bandeadas em *S. villosum* foi de 35,43% e, em *S. nigrum*, de 18,69%. Bandas positivas terminais para o DAPI foram encontradas em todos os cromossomos de ambas as espécies.

De acordo com os autores, o espécime analisado e identificado como *S. nigrum* é, na verdade, a espécie *S. americanum* ($2n=24$ cromossomos), uma vez que, de acordo com relatos anteriores, *S. nigrum* é um hexaplóide e não diplóide, como foi observado. De acordo com o número cromossômico, *S. villosum* é tetraplóide, mas, os autores discutem se se trata de um auto- ou um alotetraplóide. Como apresentou uma meiose regular, produzindo taxas maiores que 80% de grãos de pólen viáveis, os autores sugerem que isso pode ser um indício de uma origem alotetraplóide. Entretanto, segundo os autores, não foram encontradas evidências da existência de diferentes genomas nessa espécie.

A localização e o percentual de bandas CMA e DAPI indicam claramente uma duplicação exata de *S. nigrum* (*S. americanum*), revelando que *S. villosum* é um autopoliplóide. Para justificar o comportamento meiótico regular dessa espécie, os autores relatam que, de acordo com Sttebins (1971), autopoliplóides antigos podem comportar-se como diplóides. Com isso, os autores sugerem que *S. americanum* constitui um ancestral autopoliplóide de *S. villosum* que, no curso da evolução, passou a ter uma meiose regular, com pequenas modificações estruturais.

Outro bandeamento muito utilizado é o Ag-RON, que tem sido empregado na localização de regiões organizadoras do nucléolo (RONs). Nesta técnica, utiliza-se o nitrato de prata (AgNO_3), que tem afinidade por proteínas ribossomais. De acordo com Shaw & Doonan (2005), o nucléolo constitui citologicamente o domínio subnuclear mais proeminente da célula e que foi descoberto por Fontana, em 1781 (Sumner, 2003). Funcionalmente, o nucléolo

constitui o sítio de transcrição de RNAs ribossômicos 45S, a partir de seqüências de DNAr repetidas em tandem que, subseqüentemente, participam da biogênese dos ribossomos (Sharma & Sharma, 1999).

Este bandeamento permite identificar cromossomos que possuem constrições secundárias e RONS ativas na intérfase precedente, além de possibilitar a análise da dinâmica da formação de nucléolos durante a intérfase. Diversos autores têm empregado essa técnica em várias espécies vegetais.

Beserendorfer et al. (2002) analisaram a organização cromossômica de genes ribossomais e a atividade de regiões organizadoras de nucléolo em *Allium commutatum* (Alliaceae). Eles verificaram, em cariótipos diplóides ($2n=2x=16$), que havia sempre a presença de dois pares de cromossomos com constrições secundárias. Além disso, observaram que os quatro sítios de RONS ativos presentes nos cromossomos correlacionaram-se com um número máximo de quatro nucléolos na intérfase.

É importante ressaltar que as técnicas de bandeamento, após a sua descoberta, foram melhoradas, modificadas e adaptadas para uma ampla variedade de espécies, por diversos pesquisadores. Essas técnicas podem ser empregadas na caracterização cariotípica das espécies vegetais, auxiliando no entendimento da organização cromossômica, na identificação de processos envolvidos com a evolução dos genomas e no estudo da evolução cromossômica após a poliploidização.

2.4.3 Hibridização *in situ* fluorescente

A análise cromossômica convencional, baseada em bandeamentos, foi desenvolvida a partir do ano de 1970 e tem sido amplamente utilizada. Com o avanço das técnicas de biologia molecular, surgiu uma nova abordagem: o desenvolvimento da citogenética molecular (Speicer & Carter, 2005).

Assim, a análise citogenética começou a estender-se além da simples descrição do status cromossômico, permitindo o estudo de questões biológicas fundamentais, tais como: a análise da distribuição de seqüências repetitivas ao longo dos genomas, a identificação de mudanças genômicas envolvidas na hibridação interespecífica, o estudo de mecanismos envolvidos com a evolução de genomas poliplóides, o estudo da organização do genoma e sua associação com a cromatina, entre outras.

A citogenética molecular é, usualmente, baseada na hibridização *in situ* fluorescente ou FISH (*fluorescent in situ hybridization*) e suas variações, como GISH (hibridização genômica *in situ* ou *genomic in situ hybridization*), Q-FISH (hibridização *in situ* fluorescente quantitativa ou *quantitative fluorescent in situ hybridization*); PRINS (marcação *in situ* com *primers* ou *primed in situ labelling*), entre outras (Kubaláková et al., 2001; Slijepcevic, 2001; Kato et al, 2005).

A técnica padrão de hibridização *in situ* foi descrita por Pardue & Gall em 1969 e, em termos gerais, consiste no anelamento, no pareamento ou na hibridização de um determinado fragmento de ácido nucléico (DNA ou RNA) em um tecido fixado, sendo seguida pela sua visualização (Wilkinson, 1992). O objetivo é verificar se a célula ou o tecido possuem essa seqüência de nucleotídeos e, em alguns casos, conhecer também a sua exata localização na célula ou no cromossomo.

Para visualizar a localização desse pequeno segmento de DNA que foi hibridizado no interior da célula, é necessário marcá-lo com alguma molécula de

fácil visualização. Assim, a seqüência marcada funcionará como uma sonda. A seqüência complementar de nucleotídeos localizada no cromossomo é denominada seqüência alvo. Quando a sonda é marcada com um fluorocromo, a técnica é denominada hibridização *in situ* fluorescente ou FISH (Guerra, 2004). As sondas podem ser hibridizadas em alvos citológicos como cromossomos metafásicos, núcleos interfásicos, fibras de cromatina estendida ou outras preparações citológicas.

A FISH tem sido utilizada para localizar diversas seqüências de nucleotídeos, tais como seqüências de DNA de cópia única, de DNA repetitivas em tandem, de DNA repetitivo disperso (retrotransposons), entre outras, ao longo dos cromossomos. Dentre essas seqüências, destacam-se as de DNA altamente repetitivo que consistem de seqüências repetitivas que variam em tamanho (de dinucleotídeos a motivos maiores que 10.000 pares de base) presentes em centenas a milhares de cópias (Schmidt et al., 2004).

Em geral, o DNA repetitivo pode ser dividido em várias classes de seqüências que podem diferir em sua organização e localização ao longo dos cromossomos. Seqüências de DNA repetitivo em tandem ocorrem, principalmente, em posições específicas nos cromossomos (regiões pericentroméricas, intercalares e subteloméricas). As unidades de repetição encontram-se adjacentes umas às outras. Entre essas, destacam-se seqüências satélites, microssatélites, genes ribossomais (45S e 5S) e seqüências teloméricas (Sumner, 2003; Schmidt et al., 2004).

Tais seqüências são muito conservadas evolutivamente. Um bom exemplo é a seqüência pTa 71 (DNAr 45S do genoma do trigo), que vários trabalhos utilizam como sonda em diferentes espécies de plantas (El-Twab & Kondo, 2001; Rocco et al., 2003; Li et al.; 2006; Nagano et al., 2007).

O DNA ribossômico 45S é uma seqüência moderadamente repetitiva que forma blocos com muitas repetições em um ou mais pares cromossômicos

(Guerra, 2004). Por outro lado, a seqüência do DNA ribossômico 5S é um pouco mais variável que a do DNA 45S, aparecendo, geralmente, em um ou dois pares do genoma. A investigação dessas seqüências permite o estudo evolutivo dos genomas vegetais, possibilitando o entendimento das relações filogenéticas existentes entre elas.

A utilização de sondas de DNA repetitivo na hibridização *in situ* tem fornecido importantes marcadores para a caracterização molecular e a identificação de cromossomos para o estudo de alterações relacionadas com a especiação ao longo do tempo evolutivo para o melhoramento das plantas (Frello & Heslop-Harrison, 2000), bem como para estudos taxonômicos e filogenéticos entre espécies (Cuadrado et al., 1995).

Vários estudos dessa natureza têm sido realizados, contribuindo, assim, para o estudo da genética e a evolução de diversas espécies de plantas. A identificação de seqüências repetitivas ao longo dos cromossomos, por exemplo, tem auxiliado no conhecimento detalhado do cariótipo de espécies parentais utilizadas em programas de melhoramento, auxiliando, assim, na previsão do comportamento de híbridos interespecíficos e indivíduos resultantes de retrocruzamento (Lim et al., 2001).

Estudos dessa natureza foram realizados em *Lilium longiflorum* e *L. rubellum*. Essas espécies são amplamente utilizadas como parentais em cruzamentos interespecíficos. Elas apresentam o mesmo número cromossômico ($2n=2x=24$), cariótipos praticamente idênticos e uma diferença de 2% na quantidade de DNA, não sendo possível a diferenciação dos parentais por técnicas citogenéticas convencionais. Assim, a hibridização *in situ* fluorescente foi decisiva para a diferenciação molecular dos genomas de ambas as espécies e do híbrido interespecífico, que apresentou famílias de seqüências repetitivas interdispersas que divergiram.

Análises similares também foram realizadas em outras espécies de importância econômica, como a lentilha (*Lens culinaris*) e outras espécies do mesmo gênero, por Balyan et al. (2002) que apresentam cariótipos morfológicamente similares. Neste trabalho, por meio da utilização de sondas de DNA ribossômico 45s e 5S, os autores mapearam os cromossomos de todas as espécies e identificaram diferenças moleculares entre elas.

A hibridização *in situ* fluorescente também possibilita o estudo da evolução e da estrutura de seqüências repetitivas em espécies poliplóides e seus prováveis parentais. Fulnecek et al. (2002) realizaram esse tipo de estudo em *Nicotiana tabacum* (alotetraplóide) e seus prováveis parentais, analisando seqüências de DNA ribossômico 5S presentes nos genomas T e S do tabaco. Eles identificaram que o número de cópias das seqüências repetitivas de DNA ribossômico 5S parece ser característica dada à cultivar e não é influenciada pelo ambiente ou estágio de desenvolvimento. Além disso, há um mecanismo que está fixando o número de cópias de DNAr 5S no alotetraplóide.

Gu & Xiao (2003) verificaram, por meio da FISH, utilizando seqüências de DNAr 45S, a ocorrência de rearranjos cromossômicos estruturais em *Camelia reticulata* (Theaceae) poliplóide, auxiliando no entendimento da evolução poliplóide da espécie.

Essa metodologia tem sido empregada também na caracterização de cariótipos de diversas espécies, contribuindo para a citotaxonomia. Por exemplo, Melo & Guerra (2003) realizaram estudos citotaxonômicos em vinte espécies do gênero *Passiflora*, por meio do estudo da variabilidade dos sítios de DNA ribossômico 5S e 45S. A hibridização *in situ* indicou o número básico do gênero e a ocorrência de paleopoliploidia e disploidia decrescente dentro do gênero.

Nagano et al. (2007) realizaram a análise cariotípica em três espécies do gênero *Juniperus* (Cupressaceae) por meio da hibridização *in situ* fluorescente

com sondas de DNAr 45S e 5S, relatando, pela primeira vez, marcadores dessa natureza em espécies da família.

Em *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae), polimorfismos para seqüências de DNAr 45S e 5S foram encontrados em acessos de cinco espécies isoladas geograficamente. A partir dos resultados obtidos Baeza et al., (2007) sugeriram que as variações encontradas em relação ao número e à posição dos sítios nos cromossomos surgiram, devido à ocorrência de rearranjos cromossômicos estruturais, como translocações, fusões e fissões cêntricas. Tais mecanismos favoreceram a ocorrência de especiação no gênero.

Como vimos, a técnica de FISH surgiu da reunião de numerosos procedimentos metodológicos da citogenética e da genética molecular e se transformou em uma das técnicas mais informativas e elegantes da citogenética.

Tem sido observado um avanço espetacular na análise dos cromossomos com FISH. Além disso, essa técnica pode ser aplicada no estudo da evolução e da filogenia dos genomas vegetais, sendo potencial para a identificação da ocorrência de rearranjos cromossômicos em poliplóides. Além disso, pode auxiliar como ferramenta na construção de mapas físicos de alta resolução e na identificação de marcadores moleculares úteis para o melhoramento de plantas.

2.5 Palinologia

A palinologia é uma ciência relacionada ao estudo das paredes de grãos de pólen e esporos, que mostram grande diversidade na sua estrutura e escultura (Takahashi, 1997) e muito tem contribuído para o estudo da biodiversidade vegetal. Estudos modernos em palinologia consistem em analisar a morfologia e o desenvolvimento dos grãos de pólen, além da paleopalinologia.

Um dos mais importantes atributos que tornam os grãos de pólen adequados para estudos taxonômicos e sistemáticos está no fato de eles variarem em sua forma. Além disso, essa variação é herdável e mostra altos níveis de

consistência dentro de um táxon, embora diferentes formas possam ser encontradas em uma mesma espécie (Blackmore, 2007).

Uma segunda característica importante dos grãos de pólen é a existência de uma parede, denominada exina, que é muito resistente e composta por um polímero denominado esporopolenina, um material altamente resistente a ataques químicos. Conseqüentemente, livros clássicos de palinologia contêm extensivas terminologias para descrever a ornamentação da superfície e a organização dos componentes estruturais da exina (Willard et al., 2004).

O estudo da morfologia do grão de pólen pode ser realizado sob microscopias de luz e eletrônica de transmissão e de varredura. A associação da palinologia ao progresso da microscopia eletrônica possibilitou grandes avanços nessa área, permitindo o entendimento da origem e da diversificação das angiospermas (Takahashi, 1997).

Para a análise sob microscopia de luz, os grãos de pólen são submetidos a um tratamento químico com anidrido acético e ácido sulfúrico (técnica de acetólise), que foi descrita por Erdtman (1960). Por meio desta técnica, este autor realizou importantes descrições a respeito da morfologia do grão de pólen de todas as famílias de angiospermas. Foram demonstrados a existência de uma ampla diversidade e um significado sistemático da morfologia dos grãos de pólen de angiospermas. A partir daí, a metodologia por ele empregada passou a ser considerada um procedimento padrão em palinologia (Willard et al., 2004; Sarwar et al., 2006).

Análises sob microscopia eletrônica possibilitam a visualização de aspectos mais detalhados da estrutura interna da parede e da superfície da exina e têm sido empregadas por diversos pesquisadores, auxiliando na descrição detalhada das características dos grãos de pólen de diversas espécies e contribuindo para a taxonomia (Donmez & Pinar, 2001; Borzan & Stabentheiner, 2002; Liao et al., 2005; Lashin, 2006; Sarwar et al. 2006).

Além do emprego em estudos taxonômicos, a palinologia tem sido utilizada, por alguns autores, para avaliar os efeitos da poliploidia sobre o tamanho dos grãos de pólen. Tem sido considerado regra geral que o aumento no tamanho dos grãos de pólen constitui uma evidência de poliploidia. Isso é amplamente empregado, uma vez que tem sido aceita a idéia de que a duplicação do genoma resulta tipicamente em aumento do tamanho celular (Tate & Simpson, 2004).

Em espécies como o gerânio e o algodão, por exemplo, foram encontradas correlações positivas entre o nível de ploidia e o tamanho dos grãos de pólen (Rauf et al., 2006). Em *Cardamine amara* (Brassicaceae), Lihová & Marhold (2003) relataram que plantas tetraplóides (*C. amara* ssp. *austriaca*) apresentam grãos de pólen maiores que plantas diplóides (*C. amara* ssp. *amara*). Em gerânio, constatou-se que grãos de pólen de plantas tetraplóides apresentam maior número de aberturas (Cramer, 1999).

Cuadrado (2003) realizou a palinologia de três gêneros da família Malvaceae. A autora relatou que o número básico de cromossomos nesses gêneros está relacionado ao número de aberturas do grão de pólen (*Modiolastrum* $x=5$, aberturas: 3 a 5; *Modiola* $x=9$, aberturas: 6 e *Tropidococcus* $x=12$, aberturas: 12).

Aspectos da espessura da parede polínica (exina) também podem ser considerados. Em espécies de Callitrichaceae, por exemplo, Cooper et al., (2000) relataram que a redução ou a perda da exina estavam relacionadas à ocorrência de aneuploidias na família.

Por outro lado, em outras espécies, como *Tarasa geranioides* e *T. urbaniana* (Malvaceae), o tamanho do grão de pólen não foi diretamente relacionado ao nível de ploidia; tendo plantas diplóides apresentado grãos de pólen maiores que plantas tetraplóides (Tate & Simpson, 2004).

Assim, além do emprego na sistemática e taxonomia, análises de morfologia e do tamanho do grão de pólen podem auxiliar no entendimento da evolução de plantas poliplóides, possibilitando o estudo dos possíveis efeitos da poliploidia sobre a estrutura dos mesmos.

Vários autores têm investigado a estrutura dos grãos de pólen de espécies da família Verbenaceae. Análises comparativas dos grãos de pólen utilizando microscopia de luz e eletrônica de 228 espécies em 68 gêneros de Verbenaceae, dentre elas, *L. alba*, mostraram que pólen das verbenáceas são prolatos ou subprolatos, radialmente simétricos e geralmente tricolporados (raramente 4 ou 5 aperturados). Entre os gêneros analisados, os grãos de pólen apresentaram-se praticamente idênticos, com pequenas diferenças que não apresentaram significado sistemático (Sanders, 2001).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, R.J.; LOWE, A.J. Origins, establishment and evolution of new polyploidy species: *senecio cambrensis* and *S. eboracensis* in the British Isles. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.82, p.467-474, 2004.

ADAMS, K.L.; WENDEL, J.F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.135-141, 2005.

BAACK, E.J.; WHITNEY, K.D.; RIESEBERG, L.H. Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. **New Phytologist**, v.167, p.623-630, 2005.

BAEZA, C.; SCHRADER, O.; BUDAHN, H. Characterization of geographically isolated accessions in five *Alstroemeria* L. species (Chile) using FISH of tandemly repeated DNA sequences and RAPD analysis. **Plant Systematics and Evolution**, v. 269, p.1-14, 2007.

BALYAN, H.S.; HOUBEN, A.; AHNE, R. Karyotype analysis and physical mapping of 18S-5.8S and 5S ribosomal RNA loci in species of genus *Lens* Miller (Fabaceae). **Caryologia** v.55, n.2, p. 121-128, 2002.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, v.76, p.113-176, 1995.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms- 583 new estimates. **Annals of Botany**, v.80, p.169-196, 1997.

BENNETT, M.D.; SMITH, J.B. The 4C nuclear DNA content of several *Hordeum* genotypes. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.13, p.607-611, 1971.

BENNETZEN, J.L. Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants. **Genetica** v.115, p.29-36, 2002.

BENTHAN, G.; HOOKER, W.J. Verbenaceae. **Genera Plantarum**, Bruxells, v.2, n.2, p.1131-1160, 1876.

BESERENDORFER, 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**, v.139, p.99-108, 2002.

BIASI, L. A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p.455-459, maio/jun. 2003.

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

BONZANI, N.E. et al. Particularidades epidérmicas em algumas espécies de Verbenaceae. **Annales des institute Biologie Universidad Nacional del México México**, v.68, n.2, p.47-56, 1997.

BORZAN, Z.; STABENTHEINER, E. Biological and taxonomical investigations of some oak species. **Acta Botanica Croatia**, v.61, n.2, p.135-144, 2002.

BOSE, R.B.; CHOUDHURY, J.J. Cytological studies in *Lippia alba* (Mill)N. E. Br. **Botanical Bulletin Society Bengal**, v.14, n.71-72, 1960.

BOTTA, S.M. Las espécies del género *Acantholippia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, Buenos Aires, v.22, p.511-532, 1980.

BRANDÃO, A.D. **Citogenética Comparativa dos gêneros *Lippia*, *Lantana* e *Aloysia*(Lamiales)**. 2003. 101p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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.

BRIQUET, I. Verbenaceae. **Natürlichen Pflanzenfamilien**, Leipzig, v.4, n.3A, p.132-182, 1897.

CASTIGLIONE, M.R.; FREDIANI, M.; GELATI, M.T.; RAVALLI, C.; VENORA, G.; CAPUTO, P.; CREMONINI, R. Cytological and molecular characterization of *Vicia esdraelonensis* Warb. & Eig: a rare taxon. **Protoplasma**, v.231, p.151-159, 2007.

CHEN, Z.J.; HA, M.; SOLTIS, D. Polyploidy: genome obesity and its consequences. **New Phytologist** v.173, p.717-720, 2007.

COMAI, L.; TYAGI, A.P.; WINTER, K.; HOLMES-DAVIS, R.; REYNOLDS, S.H.; STEVENS, Y.; BYERS, B. Phenotypic instability and rapid silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. **The Plant Cell**, v.12, p.1551-1567, 2000.

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.

CORREA, 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, maio/jun. 1992.

CORREA, J.R.C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.151.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.; SILVA, M.; LEÃO, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de levedura. **Boletim de Biotecnologia**, v.71, p.19-33, 2002.

COSTICH, D.E.; ORITZ, R.; MEAGHER, T.R.; BRUEDERLE, L.P.; VORSA, N. Determination of ploidy level and nuclear DNA content in blueberry by flow cytometry. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.1001-1006, 1993.

CRAMER, C. Laboratory techniques for determining ploidy in plants. **Hortechology**, v.9, n.4, p.594-596, 1999.

CUADRADO, A.; CELONI, C.; JOUVE, N. Variation in highly repetitive DNA composition of heterochromatin in rye studied by fluorescence *in situ* hybridization. **Genome**, v.38, p.1061-1069, 1995.

CUADRADO, G.A. Palinologia de los géneros *Modiola*, *Modiolastrum* e *Tropidococcus* (Malvaceae). **Universidade Nacional del Nordeste- Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, v. B-014, 2003.

D'ANDREA, A. Examen 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. **Anales...** 1995. p. 74.

D'EMERICO, S.; COZZOLINO, S.; PELLEGRINO, G.; PIGNONE, D.; SCRUGLI, A. Karyotype structure, supernumerary chromosomes and heterochromatin distribution suggest a pathway of karyotype evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** v.138, p.85-91, 2002.

DAS, A.B.; MOHANTY, S.; DAS, P. Interspecific variation of nuclear DNA and structural changes in meiotic and mitotic chromosome in some species of *Mammillaria* (Cactaceae). **Caryologia**, v.51, n.3-4, p.289-301, 1998.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes, **Journal of Applied genetics**. v.38, n.3, p.285-303, 1997.

DONMEZ, E.O.; PINAR, N.M. The clypeate pollen grains of Turkish *Iris* L. (Iridaceae): subgenus *Scorpiris* Sach. **Turkish Journal of Botany**, v.25, p.57-62, 2001.

DWIVEDI, S. K. et al. Fungicotoxicity of some essential oils against *Macrophomina phaseolina*. **Indian Perfum**, Bangalore, v.34, n.1, p.20-21, 1990.

EL-TWAB, M.H.A.; KONDO, K. Molecular cytogenetic identification of the parental genomes in the intergeneric hybrid between *Leucanthemella linearis* and *Nipponanthemum nipponicum* during meiosis and mitosis. **Caryologia** v.54, n.2, p.109-114, 2001.

ELLNESKOG-STAAM, P.; LOAISIGA, C.H.; MERKER, A. Chromosome C banding of the teosinte *Zea nicaraguensis* and comparison to other species. **Hereditas**, v.144, p.96-101, 2007.

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

FRELLO, S.; HESLOP-HARRISON, J.S. Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill (Iridaceae) investigated by *in situ* hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence. **Annals of Botany**, v.86, p.317-322, 2000.

FRIGHETTO, N.; OLIVEIRA, J.G. *Lippia alba* (Mill.) N.E. BR. (Verbenaceae) as a source of linalool. **Journal of Essential Oils Res.** v.10, p.578-580, 1998.

FULNECEK, J.; LIM, K.Y.; LEITCH, A.R.; KOVARÍK, A.; MATYÁSEK, R. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. **Heredity**, v.88, n.19-25, 2002.

GERMAND, D.; RUTTEN, T.; VARSHNEY, A.; RUBTSOVA, M.; PRODANOVIC, S.; BRÜB, C.; KUMLEHN, J.; MATZK, F.; HOUBEN, A. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. **The Plant Cell**, v.17, p.2431-2438, 2005.

GITAÍ, J.; HORRES, R.; BENKO-ISEPPON, A.M. Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. **Plant systematics and Evolution**, v.253, p.65-80, 2005.

GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; LYSAK, M.A.; BENNET, M.D. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms "genome size" and "C-value" to describe nuclear DNA contents. **Annals of Botany**, v.95, p.255-260, 2005.

GU, Z.; XIAO, H. Physical mapping of the 18S-26S rDNA by fluorescent in situ hybridization (FISH) in *Camelia reticulata* complex (Theaceae). **Plant Science**, v.164, p.279-285, 2003.

GUERRA, M. (Org). **FISH- Fluorescent *in situ* Hybridization**: conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 176p.

HEMBLEY, V.; KOVARIK, A.; TORRES-RUIZ, R.A.; VOLKOV, R.A.; BERIDZE, T. Plant highly repeated satellite DNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. **Systematic and Biodiversity**, v.5, n.3, p.277-289, 2007.

JONG, H. Visualizing DNA domains and sequences by microscopy: a fifty year history of molecular cytogenetics. **Genome**, v.46, p.943-946, 2003.

JUDD, W.S. **Plant systematics**. a phylogenetic approach. 2.ed. Sinauer Associates, 2002. 419p.

KAO, R.H. Asexuality and the coexistence of cytotypes. **New Phytologist**, v.175, p.764-772, 2007.

KATO, A.; VEGA, J.M.; HAN, F.; LAMB, J.C.; BIRCHLER, J.A. Advances in plant chromosome identification and cytogenetics techniques. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.148-154, 2005.

KRISHORE, N. E.; MISHRA, A. K. Effect of essential oils on sclerential germination of *Rhizoctonia solani*. **National Academic Science Letters USA**, Washington, v.14, p.239-240, 1991.

KRISHORE, N.E.; DUBEY, N.K.; SRIVASTAVA, O.P.; SINGH, S.K. Volatile fungicotoxicity in some higher plants as evaluated against *Rhizoctonia solani* and some other fungi. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.36, n.4, p.724-726, Dec. 1983.

KUBALÁKOVÁ, M.; VRANA, J.; CIHALIKOVÁ, J.; LYSÁK, M. A.; DOLEZEL, J. Localization of DNA on plant chromosomes using PRINS and C-PRINS. **Methods in Cell Science**, v.23, p.71-82, 2001.

KUMAR, P.; DUTT, B. Cytogenetics basis of breeding system in some verbenaceous species. **Cytologia**, v.54, p.347-353, 1989.

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.

LEITCH, I.J.; BENNET, M.D. Genome downsizing in polyploid plants. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.82, p.651-663, 2004.

LI, Z.Y.; FU, M.L.; HU, F.F.; HUANG, S.F.; SONG, Y.C. Visualization of the ribosomal DNA (45S rDNA) of *Indica* rice with FISH on some phases of cell cycle and extended DNA fibers. **Biocell**, v.30, n.1, p.27-32, 2006.

LIAO, G.I.; CHEN, M.Y.; KUOH, C.S. Pollen morphology of *Cuscuta* (Convolvulaceae) in Taiwan. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v.46, p.75-81, 2005.

LIHOVÁ, J.; MARHOLD, K. Chromosome numbers and distribution of *Cardamine amara* (Brassicaceae) in Slovenia. **Biologia Bratislava**, v.58, n.1, p.37-43, 2003.

- LIM, K.B.; WENNEKS, J. JONG, J.H., JACOBSEN, E.; TUYLI, J.M.V. Karyotype analysis of *Lilium longiflorum* and *Lilium rubellum* by chromosome banding and fluorescence *in situ* hybridization. **Genome**, v.44, p.911-918, 2001.
- MELO, N.F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, v.92, p.309-316, 2003.
- NAGANO, K.; MATOBA, H.; YONEMURA, K.; MATSUDA, Y.; MURATA, T.; HOSHI, Y. Karyotype analysis of three *Juniperus* species using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with two ribosomal RNA genes. **Cytologia**, v.72, n.1, p.37-42, 2007.
- NATH, O.; OHRI, D.; PAL, M. Nuclear DNA content in *Celosia* (Amaranthaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v.182, p.253-257, 1992.
- OHRI, D. Genome size variation and plant systematics **Annals of Botany**, v.82, p.75-83, 1998.
- OTTO, S.P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Reviews in Genetics**. v.34, p.401-437, 2000.
- PIERRE, P.M.O. **Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br (Verbenaceae)**. 2004. 80p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PINTO, J.E.P.B.; BERTOLUCCI, S.K.V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 169p. (Texto Acadêmico).
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Neopolyploidy in flowering plants **Annual Review in Ecology and Systematics**, v.33, p.589-639, 2002.
- 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, Nov. 2000.
- RAUF, S; KHAN, A., KHAN, F.A. Colchicine-induced tetraploidy and changes in allele frequencies in colchicine-treated populations of diploids assessed with RAPD markers in *Gossypium arboreum* L. **Turkish Journal of Biology**. v30., p.93-100, 2006.

- RICCIARDI, G; RICCIARDI, A.I.A.; BANDONI, A.L. Fitoquímica de verbenaceas (*Lippias y Aloysias*) del Nordeste Argentino. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, UNNE; Exactas 039**; 2000.
- ROCCO, M.; HOPP, E.; POGGIO, L. **Citogenética clásica y molecular em girassol**. ASAGIR, 2003.
- SALIMENA, F.R.G. **Revisão taxonômica de *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae)**. 2000. 208p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SANDERS, R.W. The genera of Verbenaceae in the Southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**, Harvard, v.5, n.2, p.303-358, 2001.
- SANG, T.; PAN, J.; ZHANG, D.; FERGUSON, D.; WANG, C.; PAN, K.Y.; HONG, D.Y. Origins of polyploids: an example from peonies (*Paeonia*) and a model for angiosperms. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.82, p.561-571, 2004.
- SANTOS-MENDES, M.M.F.B. **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, SP.
- SARWAR, A.K.M.G.; ITO, T.; TAKAHASHI, H. Pollen of *Ceratostema* (Ericaceae, Vacciniae): tetrads without septa. **Journal of Plant Research**, v.119, p.685-688, 2006.
- SCHAUER, J.C. Verbenaceae. In: DE CANDOLE, A.P. (Ed.). **Prodomus Systematics Naturalis Regni Vegetabilis**, Paris, v.11, p.522-700, 1847.
- SCHMIDT, T.; DESEL, C.; DECHYEVA, D.; FLEISHER, B.; GINDULLIS, F.; SCHMIDT, A.; HESLOP-HARRISON, J.S.; DOUDRICK, R.L. FISHing repeated DNA sequences in *Beta* genomes. **Chromosomes Today**, v.14, p.249-265, 2004.
- SCHOCKEN, N.R.L. **Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. BROWN**. 2007. 96p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas.

- SCHUBERT, I. Chromosome evolution. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.109-115, 2007.
- SHARMA, A.K.; SHARMA, A. **Plant chromosomes- analysis, manipulation and engineering**. Índia: Harwood Academic, 1999. 371p.
- SHAW, P.; DOONAN, J. The nucleolus: playing by different rules? **Cell Cycle**, v.4, n.1, p.102-105, 2005.
- SLIJEPCEVIC, P. Telomere length measurement by Q-FISH. **Methods in Cell Science**, v.23, p.17-22, 2001.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Tree**, v.14, n.9, p.348-352, 1999.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; TATE, J.A. Advances in the study of polyploidy since plant speciation **New Phytologist**, v.161, p.173-191, 2003.
- SOUSA, S.M. **Bandeamento cromossômico em *Lippia alba***. 2006. 65p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SOUZA, M.G.; BENKO-ISEPPON, A.M. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionoideae species of Pará, Amazonas, Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.144, p.181-191, 2004.
- SPEICER, M.R.; CARTER, N.P. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. **Nature Genetics**, v.6, p.782-792, 2005.
- SUDA, J. New DNA ploidy level in *Empetrum* (Empetraceae) revealed by flow cytometry. **Ann. Bot. Fennic**, v.39, p.133-141, 2002.
- SULTANA, S.S.; ALAM, S.S. Differential fluorescent chromosome banding of *Solanum nigrum* L. and *Solanum villosum* L. from Bangladesh. **Cytologia**, v.72, n.22, p.213-219, 2007.
- SUMNER, A. **Chromosomes: organization and function**. United Kingdom, North Berwick: Blackwell, 2003. 287p.

- TAKAHASHI, M. Palynological approaches to the origin and early diversification of angiosperms. In: IWATSUKI, K.; RAVEN, P.H. (Ed.). **Evolution and diversification of land plants**. Tokio/Berlin/Nova Iorque: Springer-Verlag, 1997. 329p.
- TATE, J.A.; SIMPSON, B.B. breeding system evolution in *Tarasa* (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploid species. **American Journal of Botany**, v.92, n.2, p.207-213, 2004.
- TAVARES, E.S. **Estudos integrados em *Lippia alba* (Verbenaceae)- uma planta de interesse econômico e medicinal**. 2003. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- THOMPSON, J.N.; NUISMER, S.L.; MERG, K. Plant Biology and the evolutionary ecology of plant/animal interactions. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.82, p.511-519, 2004.
- TRONCOSO, N.S. Los generos de Verbenaceas de sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolívia, Paraguai, Uruguai 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.
- 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.
- WILKINSON, D.G. **In situ Hybridization: a practical approach**. Oxford: IRL, 1992. 163p.

WILLARD, D.A.; BERNHARDT, C.E.; WEIMER, L.; COOPER, S.; GAMEZ, D.; JENSEN, J. Atlas of pollen and spores of the Florida everglades. **Palynology**, v.28, p.125-227, 2004.

WOLFE, K.H. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization **Nature reviews Genetics**, v.2, p.333-341, 2001.

YAMAMOTO, P.Y. **Interação genótipo X ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N.E. BR.** 2006. 78p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.

ZONNEVELD, B.J.M.; LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. **Annals of Botany**, v.96, p.229-244, 2005.

CAPÍTULO 2

Conseqüências da poliploidia em *Lippia alba* (Verbenaceae)

1 RESUMO

PIERRE, Patrícia Maria Oliveira. Conseqüências da poliploidia em *Lippia alba* (Verbenaceae). In: _____. **Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill) NE. Br (Verbenaceae)**. 2008. Cap.2, p.44-69. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O estudo das conseqüências da poliploidia sobre o valor 2C e a morfologia do grão de pólen em citótipos com comportamentos diplóide ($2n=2x=30$), tetraplóide ($2n=4x=60$) e mixoplóide ($2n=12$ a 60) de *Lippia alba* (Verbenaceae) foi realizado pela primeira vez. Os valores médios do conteúdo 2C de DNA variaram de 1,86pg a 3,42pg. A mixoploidia anteriormente relatada foi confirmada pelas análises fluxo-citométricas. Os coeficientes de correlação mostraram que os níveis de ploidia e o conteúdo 2C de DNA são parâmetros interdependentes, sugerindo a existência de uma relação entre a poliploidia e o conteúdo de DNA durante a evolução dessa espécie. O citótipo tetraplóide não apresentou um múltiplo exato do conteúdo 2C de DNA em relação ao seu diplóide correspondente, sugerindo a ocorrência de perdas de DNA. A poliploidia ocasionou polimorfismos nos grãos de pólen. Os citótipos diferiram primariamente em relação ao diâmetro médio, bem como na espessura da exina e na presença ou ausência de aberturas. Entretanto, a escultura dos grãos de pólen não foi alterada com o nível de ploidia. Esses resultados mostram que os eventos de poliploidização são importantes na evolução dessa espécie, ocasionando alterações nos aspectos genéticos e reprodutivos.

* Comitê de Orientação: Lisete Chamma Davide-UFLA (Orientadora), Lyderson Facio Viccini - UFJF.

2 ABSTRACT

PIERRE, Patrícia Maria Oliveira. Polyploidy and its consequences in *Lippia alba* (Verbenaceae). In: _____. **Polyploidy in accessions of *Lippia alba* (Mill) NE. Br (Verbenaceae)**. 2008. Cap.2, p.44-69. Thesis (Doctor's degree in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Studies on polyploidy and its consequences upon 2C DNA content and pollen morphology in diploid ($2n=2x=30$); tetraploid ($2n=4x=60$) and mixoploid ($2n=12$ to 60) cytotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae) were carried out for the first time. Mean 2C-values display values among 1,86pg to 3,42pg. Ploidy polymorphism in mixoploid cytotype was confirmed by flow cytometric analysis. The correlation coefficients showed that ploidy levels and 2C DNA contents parameters are interdependent suggesting a relationship between polyploidy and DNA content during evolution of this species. Tetraploid cytotype do not presents an exact multiple of 2C DNA content with regard to correspondent diploid. These results suggest that loss of DNA can be occurred. Morphological differences in the pollen grains were observed with polyploidy. Cytotypes primarily differed with respect to diameter mean, as well to exine thickness and presence or absence of aperture. However, the sculpture of pollen grains was not changed with ploidy level. These results showed that polyploidization events are important in evolution of this species, raising changes in genetics and reproductive aspects.

* Guidance Committee: Lisete Chamma Davide-UFLA (Major Professor), Lyderson Facio Viccini - UFJF.

3 INTRODUÇÃO

O gênero *Lippia* inclui, aproximadamente, 200 espécies pantropicais (Salimena, 2002) e pertence à família Verbenaceae, que compreende cerca de 1.035 espécies e 36 gêneros (Judd et al., 2002). *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br, comumente conhecida como erva-cidreira, constitui uma das espécies mais importantes do gênero, sendo amplamente cultivada nos trópicos, onde se naturalizou (Sanders, 2001). Ela é utilizada na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e respiratórios e apresenta propriedades antiinflamatória, antimicrobiana e antifúngica (Biasi & Costa, 2003).

A espécie apresenta ampla variação em relação à composição de seus óleos essenciais, possibilitando identificar diferentes quimiotipos ou variedades químicas (Ricciardi, Ricciardi & Bandoni, 2000). Pierre (2004), por exemplo, analisando citogeneticamente três desses quimiotipos (La1-citral, La2-carvona e La3-linalol), verificou que os mesmos apresentam diferentes números cromossômicos, encontrando, além de plantas com comportamento diplóide ($2n=30$), citótipos tetraplóides ($2n=60$) e mixoplóides ($2n=12$ a 60) que, além disso, possuem comportamento meiótico anormal e altas taxas de inviabilidade do grão de pólen.

A poliploidia, ou a multiplicação do número cromossômico, constitui um fator chave na evolução vegetal (Ramsey & Schemske, 2002), sendo um evento freqüente entre as angiospermas. Estudos sobre suas consequências em vegetais têm sido frequentemente relatados por diversos autores. Dentre os efeitos mais comuns e universais da poliploidização está o aumento do conteúdo de DNA. Entretanto, há evidências de que a poliploidia, em alguns casos, pode ocasionar um efeito contrário (Ohri, 1998; Otto & Whitton, 2000). Isso ocorre pelo fato de que, após a poliploidização, muitas espécies passam por extensivas

alterações genéticas e epigenéticas que levam, conseqüentemente, à diminuição do tamanho do genoma e do volume nuclear (Bennett, 2000; Leich & Bennett, 2004; Chen et al., 2007).

A poliploidia também pode exercer importantes efeitos sobre a morfologia dos grãos de pólen. Informações dessa natureza são de grande importância, contribuindo para um melhor entendimento sobre os efeitos da poliploidia sobre os sistemas reprodutivos de uma espécie. Caracteres florais e polínicos (como o diâmetro e a presença de ornamentações) podem ser alterados devido aos diferentes níveis de ploidia. Essas alterações podem influenciar na adaptabilidade reprodutiva dos indivíduos e nas interações bióticas com polinizadores (Yan et al., 1997; Ortiz, 1997; Cavalcante et al., 2000; Otto & Whiton, 2000).

Estudos dessa natureza já foram realizados em várias espécies (Lihová & Marhold, 2003; Naiki & Nagamasu, 2004; Oselebe et al., 2006). Contudo, alguns autores relatam que nem sempre o tamanho do grão de pólen está correlacionado com o nível de ploidia (Tate & Simpson, 2004).

Embora *L. alba* apresente importância econômica e medicinal, estudos no sentido de avaliar as conseqüências da poliploidia sobre o conteúdo de DNA e a morfologia do pólen são inexistentes.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar, pela primeira vez, as conseqüências da poliploidia sobre o conteúdo de DNA e a morfologia dos grãos de pólen de quimiotipos de *L. alba*, contribuindo para o entendimento da evolução genômica da espécie, bem como seus efeitos sobre a morfologia do pólen.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material

Estacas de três acessos de *L. alba*, correspondentes a três quimiotipos (La1- citral, La2- carvona e La3- linalol) provenientes da cidade do Rio de Janeiro, do estado do Ceará e da cidade de Valinhos, no estado de São Paulo, foram fornecidas pelo Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Estes acessos foram mantidos em casa de vegetação do Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (Minas Gerais).

Excisas desses quimiotipos foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, UFRJ (RFA), registradas sob os números 29421, 29422 e 29423, respectivamente. Posteriormente, foram identificadas pela Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena, da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

4.2 Conteúdo de DNA

As análises foram realizadas no Laboratório de Genética (Departamento de Biologia) da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG.

Plântulas de *Pisum sativum* foram utilizadas com padrão (9,09 pg/2C) (Cavallini & Natali, 1990). Folhas jovens (30 mg) de três plantas por quimiotipo e de *P. sativum* (padrão interno) foram coletadas e fragmentadas com o auxílio de um bisturi em 50µL de tampão de extração LB01 e filtrados em uma tela de náilon de 50 µm. O tampão de coloração contendo 25µL de iodeto de propídeo (1mg/mL) e 5µL de RNase foram adicionados. A suspensão foi colocada à temperatura ambiente, por 60 a 120 minutos, no escuro até a análise. A suspensão foi analisada em citômetro de fluxo (FacsCalibur- Becton Dickinson).

Os histogramas foram obtidos e analisados a partir dos softwares Cell Quest e WinMDI 2.8. A estimativa do conteúdo de DNA foi realizada 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

O tamanho do genoma em Mpb foi estimado de acordo com Bennett et al. (2000), em que 1pg de DNA equivale a 978 Mpb.

4.3 Morfologia do grão de pólen

4.3.1 Microscopia de luz

As análises foram realizadas no Laboratório de Citogenética, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizados botões florais com tamanhos entre 2,0mm a 2,5mm fixados em ácido acético 100% por, no mínimo, 24 horas. Grãos de pólen foram acetolisados de acordo com o procedimento descrito por Erdtman (1960). Os eixos polar (P) e equatorial (E) foram medidos a partir de 25 grãos de pólen maduros para cada citótipo. Valores de P/E foram calculados para cada grão de pólen medido.

As terminologias e as classificações do tamanho dos grãos de pólen, da morfologia da superfície polínica na visão equatorial e do número de aberturas, foram adotadas de acordo com as definições de Erdtman (1952), citado por Willard et al. (2004) e de Punt et al. (1994), na edição disponível online, no site <http://www.bio.uu.nl/~palaeo/glossary/glosint.htm>. Medidas da espessura da exina também foram realizadas para 50 grãos de pólen por citótipo. Imagens digitalizadas foram obtidas por meio do microscópio de luz Olympus BX60. As medidas foram realizadas pelo software Sigma ScanPro.

Para as análises estatísticas descritivas foram calculados a média, as amplitudes máxima e mínima, o desvio padrão, a variância e o coeficiente de

variação dos diâmetros de 100 grãos de pólen em visão equatorial e da espessura da parede de 10 grãos de pólen para os três citótipos. Além disso, foram realizados a análise de variância e o teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade, para essas mesmas variáveis. Todas as análises foram realizadas no programa Sisvar, versão 4.6.

Foi obtido o coeficiente de correlação entre o diâmetro médio dos grãos de pólen e o número cromossômico, pelo programa Excel - Microsoft Office 2003.

4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural do Departamento de Fitopatologia (UFLA).

Para uma visualização detalhada da escultura da parede dos grãos de pólen, anteras provenientes de botões florais, com tamanhos entre 2,0 e 2,5mm, foram fixadas em solução de Karnovsky modificada e em tampão cacodilato. Posteriormente, elas foram fixadas em solução de tetróxido de ósmio 2% e lavadas em água destilada.

As amostras foram desidratadas em uma série crescente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%) e colocadas para secar no ponto crítico (Aparelho CPD030). Após a secagem, anteras inteiras foram montadas sobre stubs ou suportes de alumínio. Uma secção longitudinal foi realizada em cada teca com o auxílio de uma agulha fina para a liberação dos grãos de pólen. Os suportes foram levados a um Sputtering (SCD050) para a metalização com ouro. Imagens digitalizadas foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Conteúdo de DNA

Os conteúdos de DNA nuclear (valor 2C) encontrados em La1, La2 e La3 e os tamanhos dos genomas em Mpb encontram-se na Tabela 1.

Os histogramas e seus respectivos coeficientes de variação (CV) obtidos com a citometria de fluxo para os três quimiotipos de *L. alba* encontram-se nas Figuras 1A-C. Nas Figuras 1B, 1D e 1F a 1I, também estão representados os cariótipos dos três quimiotipos.

Em relação à poliploidia e ao tamanho do genoma, espera-se que o conteúdo de DNA aumente proporcionalmente com o nível de ploidia e que o tamanho do genoma de anfidiplóides constitua a soma dos valores de DNA dos seus parentais. Entretanto, isso não é o que se observa na maioria dos casos (Ohri, 1998; Bennetzen, 2002; Leitch & Bennett, 2004).

TABELA 1 Conteúdo 2C de DNA, tamanho do genoma (Mpb) e outros parâmetros citológicos, em 3 quimiotipos de *Lippia alba*.

Quim	2n	Ploidia	2C DNA (pg)	Tam genoma (Mpb)
La1	30	2x	1,86	1819
La2	60	4x	3,42	3344
La3	12 a 60	x-3 a 4x	2,05 a 3,41	2005 a 3334

Quim = quimiotipo; 2n = número cromossômico somático; 2C DNA (pg) = conteúdo 2C de DNA nuclear em picogramas; Tam. Genoma (Mpb) = tamanho do genoma em Mpb.

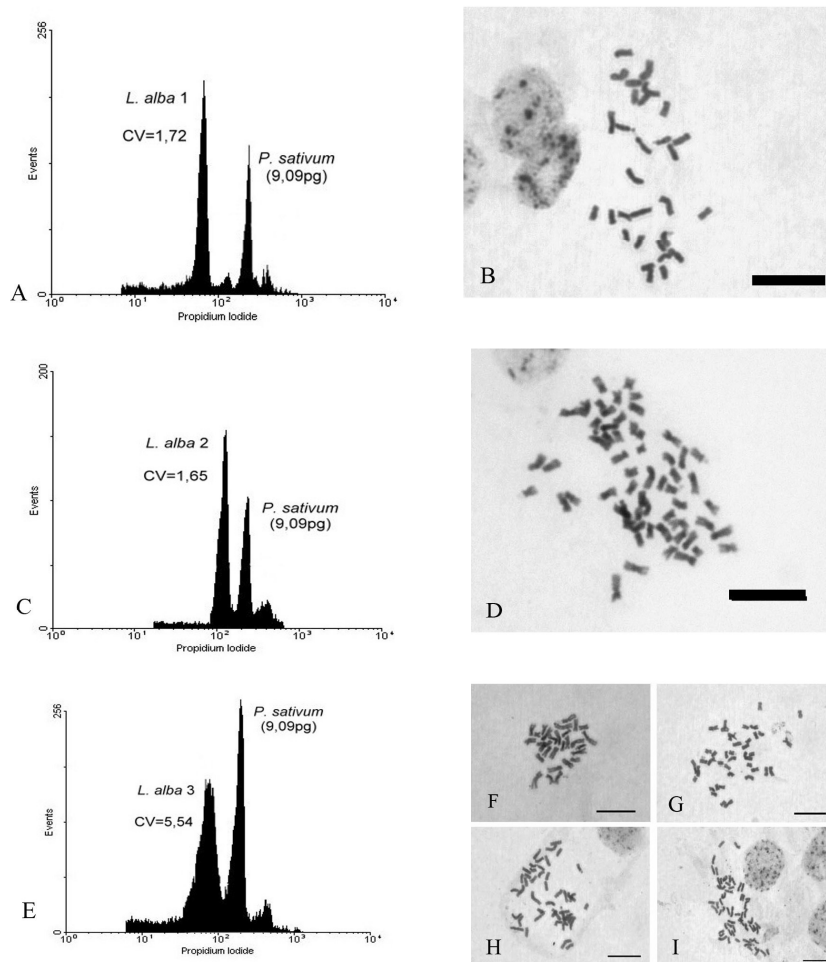


FIGURA 1 Histogramas representativos documentando o tamanho do genoma e o CV em 3 quimiotipos de *Lippia alba* utilizando *Pisum sativum* como padrão de referência interno (A-La1 citral, C-La2 carvona e E-La3 linalol). Metáfases mitóticas correspondentes aos quimiotipos (B-La1, D-La2 e F a I-La3). Fonte: Pierre (2004). Barra=10 μ m.

Foi observada alta correlação entre o número cromossômico dos três quimiotipos e o conteúdo de DNA ($r=0,994$). Entretanto, o conteúdo 2C de DNA das plantas tetraplóides (La2-carvona) não correspondeu a um múltiplo exato do genoma diplóide (La1-citral). Plantas tetraplóides apresentaram 83,87% a mais de DNA em relação às plantas diplóides. Um decréscimo no tamanho do genoma de poliplóides, em comparação com diplóides, também foi observado em outras espécies, por alguns pesquisadores (Lysak & Dolezel, 1998; Horandl & Greilhuber, 2002; Kotseruba et al., 2003; Baack, Whitney & Rieseberg, 2005; Pecinka et al., 2006). A possível razão para essa diminuição é a ocorrência de eliminação parcial de seqüências de DNA repetitivo em genomas poliplóides (Ohri, 1998; Wolfe, 2001; Leitch & Bennett, 2004; Chen, Ha & Soltis, 2007), não sendo ainda entendida a magnitude dessas alterações.

A eliminação de seqüências pode ocorrer por meio de diversos mecanismos, como pela ação de transposons, rearranjos cromossômicos, entre outros. Tais alterações podem ocorrer rapidamente em genomas neopoliplóides (Soltis & Soltis, 1999; Soltis et al., 2003).

De acordo com Pierre (2004), os citótipos diplóide e tetraplóide apresentaram diferentes fórmulas cariotípicas (La1-citral, $2n=2x=30$, 6M+9Sm e La2-carvona, $2n=4x=60$, 15M+14Sm+1Ac). Além disso, o comprimento total do lote haplóide (CTLH) relatado para plantas tetraplóides é de 83,67 μ m, o que não corresponde a um múltiplo exato do diplóide (43 μ m). Esses relatos, juntamente com os resultados obtidos no presente trabalho, evidenciam que, além de rearranjos cromossômicos, perdas de DNA podem ter atuado na evolução do genoma tetraplóide em *L. alba*.

A citometria de fluxo confirmou o estado mixoplóide do quimiotipo La3-linalol, anteriormente relatado por Pierre (2004), que observou a ocorrência de eliminação cromossômica e mixoploidia nesse quimiotipo (Figura 1E-II). Este apresentou núcleos com quantidades de DNA entre 2,05 e 3,41pg. É

interessante ressaltar que o maior número cromossômico observado nesse quimiotipo corresponde exatamente ao número cromossômico de La2-carvona (tetraplóide), que apresenta um valor 2C de DNA igual a 3,42pg. Desse modo, células tetraplóides encontradas em plantas mixoplóides apresentam exatamente a mesma magnitude de DNA do quimiotipo La2. O mesmo não foi observado para núcleos com menor conteúdo de DNA (2,05 pg) no mixoplóide, cujo menor número cromossômico relatado foi de $2n=12$ (Pierre, 2004). Isso pode ser explicado pela sua baixa frequência entre as células, ou devido à dinâmica no processo de eliminação cromossômica, em que núcleos com esses números cromossômicos podem ter sido completamente eliminados.

5.2 Palinologia

A descrição morfológica dos grãos de pólen dos três citótipos encontra-se no Quadro 1.

La1-citral (2n=2x=30)- Diplóide

Grãos de pólen com âmbito triangular, subesferoidal; P/E: 0,977 (0,89-1,08); eixo polar: 33,72 (26,77-36,41)µm; eixo equatorial: 34,34 (39,98-36,06) µm; tricolporados; cólporos lalongados equatorialmente, sexina com aspecto perfurado; exina com espessura de 2,04µm (1,62-2,71) µm. **(Figuras 2 A e B e 5A).**

La2-carvona (2n=4x=60)- Tetraplóide

Grãos de pólen com âmbito triangular a quadrado, subesferoidal; P/E: 1,01 (0,92-1,10); eixo polar: 36,33 (28,52-49,28)µm; eixo equatorial: 35,63 (25,78-48,82) µm; tri-tetracolporados; cólporos lalongados equatorialmente, sexina com aspecto perfurado; exina com espessura de 3,26µm (2,35-4,14) µm. **(Figuras 2 C e D; 3 A e 5 B)**

La3-linalol (2n=12 a 60)- Mixoplóide

Grãos de pólen com âmbito triangular a quadrado, subesferoidal; P/E: 1,03 (0,91-1,15); eixo polar: 35,74 (19,69-42,00)µm; eixo equatorial: 34,22 (19,96-39,62) µm; tri-tetracolporados; cólporos lalongados equatorialmente, sexina com aspecto perfurado; exina com espessura de 3,03µm (1,61-3,54) µm. **(Figuras 2 E e F; 3B e 5C e D)**

QUADRO 1 Descrição morfológica dos grãos de pólen dos citótipos diplóide (La1-citral (2n=2x=30)); tetraplóide (La2-carvona (2n=4x=60)) e mixoplóide (La3-linalol (2n=12 a 60)).

Os citótipos apresentaram algumas diferenças em relação à forma e ao número de aberturas dos grãos de pólen (Figuras 2, 3 e 5). Plantas diplóides (La1-citral) apresentaram grãos exclusivamente triangulares e tricolporados quando observados em visão polar (Figuras 2A-B e 5A). Entretanto, os citótipos tetraplóide (La2-carvona) e mixoplóide (La3-linalol) apresentaram grãos com forma variando de triangular a quadrado e número de colporos de três e quatro (Figuras 2C-F; 3A-B e 5B-D). As proporções de grãos de pólen com três aberturas foram de 61,5% e 52,3%, para La2 e La3, respectivamente (Figura 4).

Para *L. alba*, este constitui o primeiro relato da ocorrência de variações na forma e no número de aberturas dos grãos de pólen. Raj (1983), citado por Sanders (2001), relata que grãos de pólen das verbenáceas geralmente são tricolporados, podendo raramente apresentar 4 e 5 aberturas.

Considerando que um maior número de aberturas do grão de pólen foi observado somente em plantas com poliploidia e mixoploidia, pode-se inferir que o nível de ploidia está relacionado ao número de aberturas presentes no grão de pólen. Interpretações similares foram realizadas por Cramer (1999), que verificou que, no gerânio, plantas tetraplóides apresentam um maior número de aberturas.

Além disso, Cuadrado (2003), realizando a palinologia em espécies da família Malvaceae, observou que plantas com maiores números básicos apresentavam grãos de pólen com um maior número de aberturas.

Em *Lantana camara*, uma espécie da família Verbenaceae, por exemplo, autores relatam a existência de uma série poliplóide envolvendo números de $2n=22, 33, 44, 55$ e 66 cromossomos (Brandão et al., 2007). Embora não tenham sido realizadas análises da morfologia dos grãos de pólen associadas a variações no seu número cromossômico, há relatos da ocorrência de grãos de pólen com três e quatro cólporos para esta espécie (Willard, 2004).

Em relação à escultura, análises detalhadas da superfície do pólen revelaram que o nível de ploidia não influenciou a morfologia da sexina dos grãos de pólen. Todos os citótipos apresentaram ornamentações de aspecto foveolado ou perfurado (Figuras 5A-D).

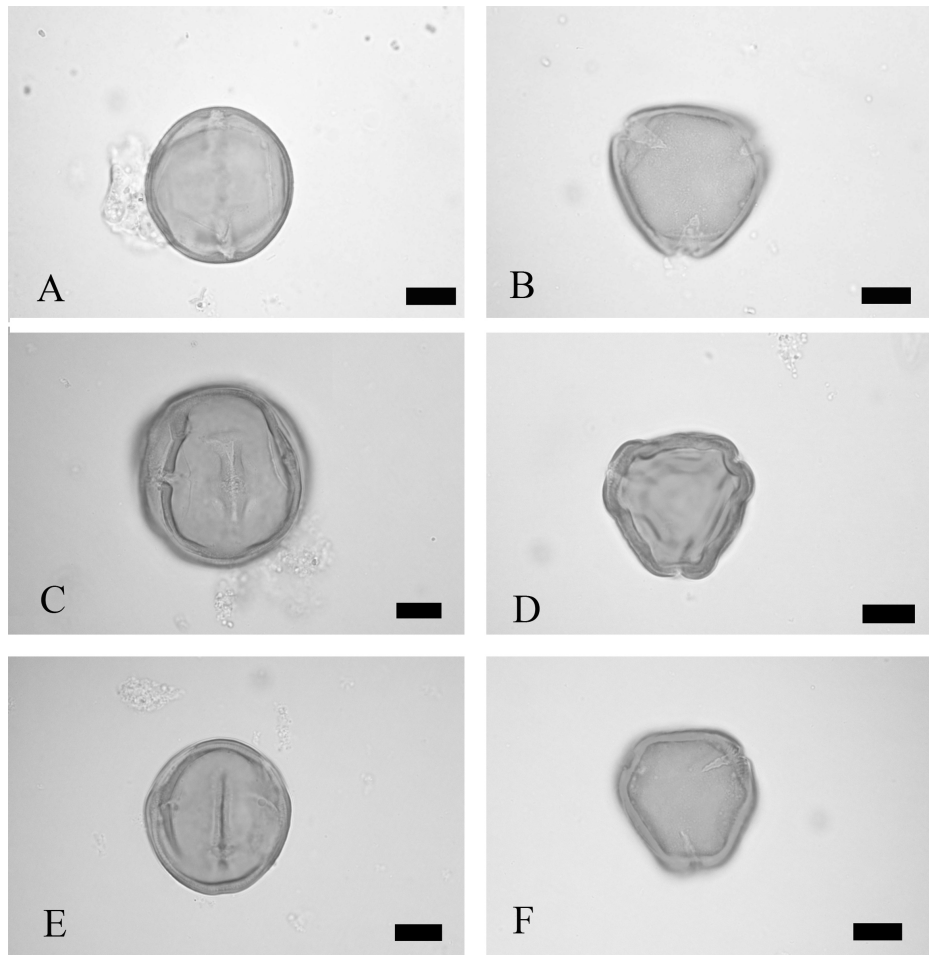


FIGURA 2 Grãos de pólen acetolisados de três citótipos de *L. alba*. A, C e E = grãos em visão equatorial de La1, La2 e La3, respectivamente. B, D e F = grãos tricolporados em visão polar de La1, La2 e La3, respectivamente. Barra=10µm.

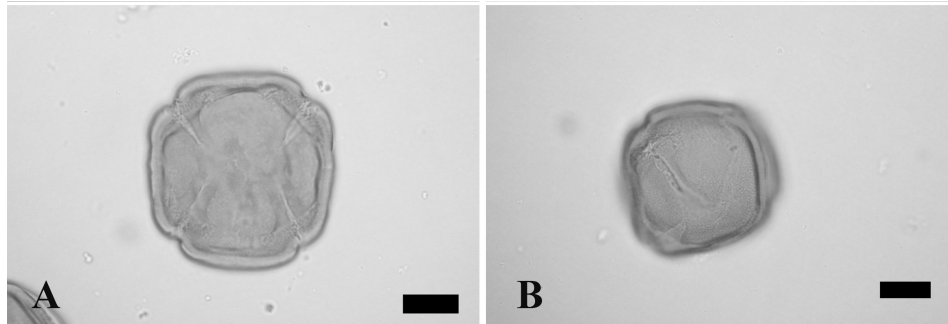


FIGURA 3 Grãos de pólen acetolisados de dois citótipos de *L. alba*. A) Grão tetracolporado de La2-carvona (tetraplóide); B) Grão tetracolporado de La3-linalol(mixoplóide). Barra=10 μ m.

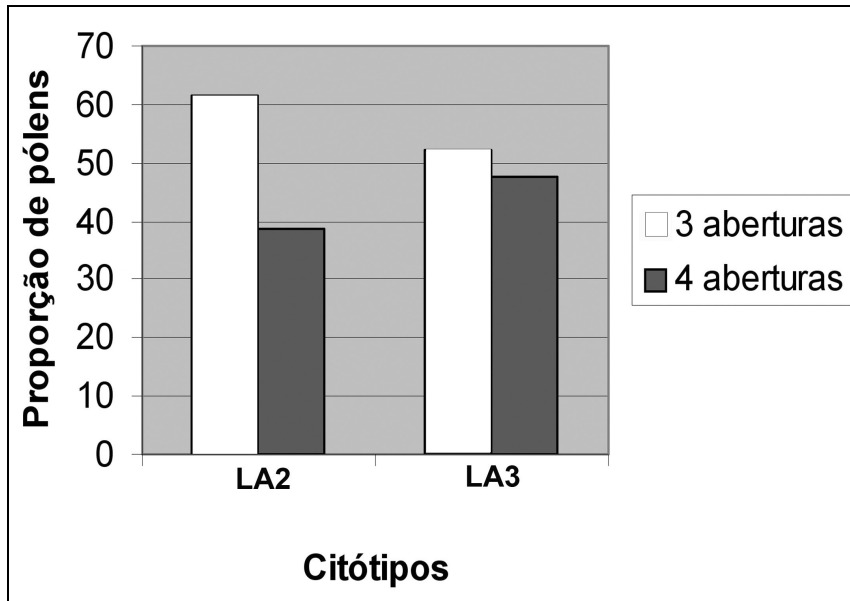


FIGURA 4 Proporção (%) de grãos de pólen tri- e tetracolporados nos citótipos tetraplóide (La2) e mixoplóide (La3) de *L. alba*.

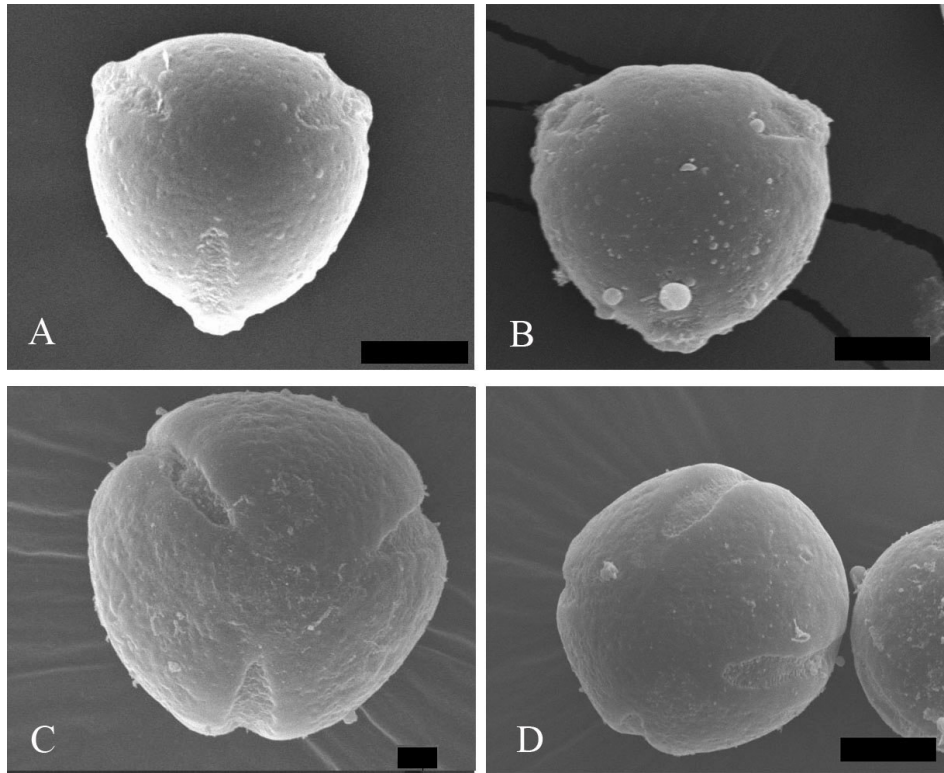


FIGURA 5 Grãos de pólen de citótipos de *L. alba*, observados por microscopia eletrônica de varredura. A, B e C = grãos tricolporados em visão polar de La1, La2 e La3, respectivamente. D = grão tetraporado de La3 em visão polar. Barra=10µm (Figuras A, B e D) e 3µm (Figura C).

Resultados da estatística descritiva para o diâmetro e a espessura da parede dos grãos de pólen dos três citótipos estão representados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2 Estatísticas descritivas para a variável diâmetro (sob visão equatorial) dos grãos de pólen dos citótipos diplóide (La1-citral ($2n=2x=30$)); tetraplóide (La2-carvona ($2n=4x=60$)) e mixoplóide (La3-linalol ($2n=12$ a 60)).

Estatísticas descritivas	Citótipos		
	La1-citral (diplóide)	La2-carvona (tetraplóide)	La3-linalol (mixoplóide)
N	100	100	100
Média (μm)	34,03	35,90	34,75
Amplitude mínima (μm)	26,77	25,78	19,69
Amplitude máxima (μm)	38,60	49,28	43,44
Desvio padrão (μm)	1,99	4,14	4,34
Variância (μm^2)	3,98	17,20	18,83
Coefficiente de variação (%)	5,86	11,55	12,48

TABELA 3 Estatísticas descritivas para a variável espessura da exina da parede dos grãos de pólen dos citótipos diplóide (La1-citral ($2n=2x=30$)); tetraplóide (La2-carvona ($2n=4x=60$)) e mixoplóide (La3-linalol ($2n=12$ a 60)).

Estatísticas descritivas	Citótipos		
	La1-citral (diplóide)	La2-carvona (tetraplóide)	La3-linalol (mixoplóide)
N	10	10	10
Média (μm)	2,08	3,26	3,03
Amplitude mínima (μm)	1,62	2,35	1,61
Amplitude máxima (μm)	2,71	4,14	3,54
Desvio padrão (μm)	0,34	0,55	0,57
Variância (μm^2)	0,12	0,31	0,33
Coefficiente de variação (%)	16,50	17,07	18,96

Análises estatísticas revelaram a existência de diferenças significativas para a média dos diâmetros sob a visão equatorial e a espessura da exina da parede dos grãos de pólen entre os três citótipos (Tabela 4).

Para o diâmetro, as médias diferiram entre si quando comparadas pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade, tendo La1 e La3 se apresentado estatisticamente iguais e inferiores a La2.

Para a espessura da exina, as médias também diferiram entre si, quando comparadas pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade, tendo La2 e La3 se apresentado estatisticamente iguais e superiores a La1.

Em relação às amplitudes mínima e máxima do diâmetro dos grãos de pólen, o citótipo mixoplóide foi o que apresentou o menor diâmetro (19,69 μ m) ao passo que o citótipo tetraplóide apresentou o maior diâmetro (49,28 μ m).

A poliploidia provocou um aumento significativo no tamanho dos grãos de pólen no citótipo La2 (tetraplóide), embora não tenha sido proporcional ao nível de ploidia. O mesmo não foi observado no citótipo mixoplóide. Isso, provavelmente, ocorreu devido à variação no número cromossômico (Pierre, 2004), o que poderia ocasionar a formação de pólenes menores e inviáveis.

TABELA 4 Médias dos diâmetros sob visão equatorial e da espessura da exina da parede de grãos de pólen dos citótipos diplóide (La1-citral (2n=2x=30)); tetraplóide (La2-carvona (2n=4x=60)) e mixoplóide La3-linalol (2n=12 a 60)).

Citótipos	Diâmetro (visão equatorial)	Espessura da exina
La1-citral (diplóide)	34,03 a1	2,08 a1
La2-carvona (tetraplóide)	35,90 a2	3,03 a2
La3-linalol (mixoplóide)	34,75 a1	3,26 a2

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade.

Foi observada alta correlação entre o diâmetro médio dos grãos de pólen e o número cromossômico nos três citótipos ($r=0,921$).

Tem sido considerado como regra geral que o aumento do tamanho dos grãos de pólen constitui uma evidência de poliploidia, pois é amplamente aceita a idéia de que a duplicação do genoma resulta tipicamente em aumento do tamanho celular (Otto & Whitton, 2000). Em outras espécies também foram encontradas correlações positivas entre o tamanho dos grãos de pólen e o nível de ploidia (Lihová & Marhold, 2003; Rauf et al., 2006). Em outras espécies, entretanto, não foram encontradas evidências de aumento do tamanho do grão de pólen com a poliploidia (Tate & Simpson, 2004).

Para a espessura da exina, os resultados permitiram observar que a mesma também aumentou com o nível de ploidia. De acordo com Cooper et al., (2000), em espécies da família Callitrichaceae, a redução ou a perda da exina está relacionada à ocorrência de aneuploidias na família. Desse modo, o aumento do nível de ploidia está relacionado ao aumento da espessura da exina em *L. alba*.

Como a poliploidia pode alterar caracteres florais e palinológicos, ela pode exercer profundos efeitos sobre interações entre plantas e polinizadores, (Soltis et al., 2003). Além disso, considerando que a seleção opera sobre os gametas masculinos, que estão em maior abundância (Tejaswini, 2002) e que ela assume a existência de variabilidade, variações no tamanho e capacidade de germinação de grãos de pólen são de grande importância evolutiva.

Em organismos que se reproduzem sexuadamente, características que auxiliam na maximização da reprodução tendem a ser selecionadas. Assim, a existência de polimorfismos em grãos de pólen pode influenciar na adaptabilidade reprodutiva dos indivíduos. O tamanho e o número dos grãos de pólen influenciam, por exemplo, na competição, pois determinam a área ocupada na superfície do estigma da flor. Para ser reprodutivamente bem

sucedida na natureza, uma planta deve distribuir seus recursos adequadamente para otimizar o tamanho dos grãos de pólen, a capacidade de germinação e o crescimento do tubo polínico (Tejaswini, 2002).

Em *Dianthus* (Caryophyllaceae), foi relatada uma correlação negativa entre o tamanho do grão de pólen e o comprimento do tubo polínico (Tejaswini, 2002). O autor sugere que, para uma planta, é mais vantajoso produzir um maior número de grãos de pólen menores do que um menor número de pólenes maiores. Grãos de pólen menores possuem maior habilidade para competir (capacidade de germinar e produzir tubos polínicos maiores), aumentando, desse modo, a adaptabilidade reprodutiva de um indivíduo.

Considerando que a poliploidia ocasionou um aumento no tamanho do pólen e que estudos anteriores demonstraram que alterações meióticas afetam a sua viabilidade (Pierre, 2004), eventos de poliploidização exercem forte impacto sobre aspectos reprodutivos dos citótipos de *L. alba*.

Assim, o presente estudo fornece evidências da importância dos eventos de poliploidização na evolução da espécie no sentido de influenciar nos aspectos genéticos e reprodutivos em *L. alba*. Isso indica que a presença de poliploidia na espécie constitui um mecanismo muito importante na especiação desses citótipos.

Além disso, esses eventos possibilitam que plantas poliplóides se adaptem a uma grande variedade de condições ambientais, culminando, assim, em uma ampla distribuição geográfica, o que exerce grande influência na adaptação e na evolução da espécie.

6 CONCLUSÕES

Este estudo representa um avanço na citogenética de *L. alba*, dado que relatos sobre as consequências da poliploidia sobre o conteúdo de DNA e a morfologia do grão de pólen são inexistentes.

As análises confirmaram o estado mixoplóide de um dos quimiotipos de *L. alba*. Além disso, mostraram que, provavelmente, ocorreram perdas de sequências de DNA após a poliploidização.

Alterações significativas ocorreram na morfologia dos grãos de pólen com a poliploidização.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAACK, E.J.; WHITNEY, K.D.; RIESEBERG, L.H. Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. **New Phytologist**, v.167, p.623-630, 2005.
- BENNETT, M.D.; BHANDOL, P.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses: 807 new estimates. **Annals of Botany**, v.86, p.859-909, 2000.
- BENNETZEN, J.L. Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants. **Genetica** v.115, p.29-36, 2002.
- BIASI, L.A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p.455-459, maio/jun. 2003.
- 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.
- CAVALCANTE, H.C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DORNELLES, A.L.C. Meiotic behaviour and pollen fertility in an open-pollinated population of Lee mandarin [*Citrus clementina* X (*C. paradise* X *C. tangerina*)]. **Scientia Horticulturae**, v.86, p.103-114, 2000.
- CAVALLINI, A.; NATALI, L. Nuclear DNA variability within *Pisum sativum* (Leguminosae): cytophotometric analysis. **Plant Systematic and Evolution**, v.173, p.173-185, 1990.
- CHEN, Z.J.; HA, M.; SOLTIS, D.E. Polyploidy: genome obesity and its consequences. **New Phytologist**, v.173, p.717-720, 2007.
- 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.

- CRAMER, C. Laboratory techniques for determining ploidy in plants. **Hortechology**, v.9, n.4, p.594-596, 1999.
- CUADRADO, G.A. Palinología de los géneros *Modiola*, *Modiolastrum* y *Tropidococcus* (Malvaceae). **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas-Universidad Nacional del Nordeste**, B-014, 2003.
- ERDTMAN, G. The acetolysis method, a revised description. **Svensk Bot.anic Tidskr.** v.54, p.561-564, 1960.
- HORANDL, E.; GREILHUBER, J. Diploid and autotetraploid sexuals and their relationships to apomicts in the *Ranunculus cassubicus* group: insights from DNA content and isozyme variation. **Plant Systematics and Evolution**, v.234, p.85-100, 2002.
- JUDD, W.S. Plant systematics. In: _____. **A phylogenetic approach**. 2.ed. Sauer Associates, 2002. 419p.
- KOTSERUBA, M V.; GERNAND, D.; MEITER, A.; HOUBEN, A. Uniparental loss of ribosomal DNA in allotetraploid grass *Zingieria trichopoda* (2n=8). **Genome**, v.46, p.156-163, 2003.
- LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. Genome downsizing in polyploid plants. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.82, p.651-663, 2004.
- LIHOVÁ, J.; MARHOLD, K. Chromosome numbers and distribution of *Cardamine amara* (Brassicaceae) in Slovenia. **Biologia Bratislava**, v.58, n.1, p.37-43, 2003.
- LYSAK, M.A.; DOLEZEL, J. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). **Caryologia**, v.52, p.123-132, 1998.
- NAIKI, A.; NAGAMASU, H. Correlation between distyly and ploidy level in *Damnacanthus* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v.91, n.5, p.664-671, 2004.
- OHRI, D. Genome size variation and plant systematics. **Annals of Botany**, v.82, p.75-83, 1998.
- ORTIZ, R. Occurrence and inheritance of 2n pollen in *Musa*. **Annals of Botany**, v.79, p.449-453, 1997.

OSELEBE, H.O.; TENKOUANO, A.; PILLAY, M. Ploidy variation of *Musa* hybrids from crosses. **African journal of Biotechnology**, v.5, n.11, p.1048-1053, 2006.

OTTO, S.P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review in Genetics**, v.34, p.401-437, 2000.

PECINKA, A.; SUCHANKOVA, P.; LYSAK, M.A.; TRAVNICER, B.; DOLEZEL, J. Nuclear DNA content variation among central European *Koeleria* taxa. **Annals of Botany**, v.98, p.117-122, 2006.

PIERRE, P.M.O. **Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br (Verbenaceae)**. 80p. 2004. Dissertação (Mestrado 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: 15 jul. 2007.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual Review in Ecology and Systematics**. v.33, p.589-639, 2002.

RAUF, S.; KHAN, I.A.; KHAN, P.A. Colchicine-induced tetraploidy and changes in allele frequencies in colchicine-treated populations of diploids assessed with RAPD markers in *Gossypium arboreum* L. **Turkish Journal of Biology**, v.30, p.93-100, 2006.

RICCIARDI, G.; RICCIARDI, A.I.A.; BANDONI, A.L. Fitoquímica de verbenaceas (*Lippias* y *Aloysias*) del Nordeste Argentino. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, UNNE**, Exactas 039, 2000. Disponível em: <<http://www.unne.edu.ar>>. Acesso em: 15 jul. 2007.

SALIMENA, F.R.G. New synonyms and typifications in *Lippia* sect *Rhodolippia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v.40, p.121-125, 2002.

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

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Tree**, v.14, n.9, p.348-352, 1999.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; TATE, J.A. ,Advances in the study of polyploidy since plant speciation. **New Phytologist**, v.161, p.173-191, 2003.

TATE, J.A.; SIMPSON, B.B. ,Breeding system evolution in Tarasa (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploid species. **American Journal of the Botany**, v.91, n.2, p.207-213, 2004.

TEJASWINI. Variability of pollen grain features: a plant strategy to maximize reproductive fitness in two species of *Dianthus*? **Sexual Plant Reproduction**, v.14, p.347-353, 2002.

WILLARD, D.A.; BERNHARDT, C.E.; WEIMER, L.; COOPER, S.; GAMEZ, D.; JENSEN, J. Atlas of pollen and spores of the Florida everglades. **Palynology**, v.28, p.125-227, 2004.

WOLFE, K.H. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. **Nature Reviews**, v.2, p.333-341, 2001.

YAN, T.; FERGUSON, A.R.; MCNEILAGE, M.A.; MURRAY, B.G. Numerically unreduced (2n) gametes and sexual polyploidization in *Actinidia*. **Euphytica**, v.96, p.267-272, 1997.

CAPÍTULO 3

Bandeamentos cromossômicos e hibridização *in situ* fluorescente em *Lippia alba* (Verbenaceae) poliplóide

1 RESUMO

PIERRE, Patrícia Maria Oliveira. Bandeamentos cromossômicos e hibridização *in situ* fluorescente em *Lippia alba* (Verbenaceae) poliplóide. In: _____. **Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill) NE. Br (Verbenaceae)**. 2008. Cap.3, p.70-99. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O cariótipo de um citótipo brasileiro tetraplóide ($2n=4x=60$) de *L. alba* (Verbenaceae) foi estudado por meio de técnicas de bandeamento C, bandeamento DAPI/CMA3, coloração com nitrato de prata para evidenciar RONS (regiões organizadoras de nucléolo) e hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 45S. A caracterização de RONS associadas à cromatina, bem como sua atividade, foi discutida pela observação do número máximo de nucléolos no núcleo interfásico. Plantas tetraplóides apresentaram um padrão similar ao já relatado para a espécie. A coloração com DAPI revelou que segmentos de DNA ricos em AT estão concentrados nas regiões teloméricas e proximais ao centrômero dos cromossomos. Diferenças no número de sítios ricos em GC entre os citótipos diplóide e tetraplóide não foram observadas. Entretanto, foram observadas diferenças em relação ao número máximo de nucléolos e de sítios de DNAr 45S entre ambos os citótipos. Comparações entre o número de RONS e os sítios de DNAr 45S indicam que alguns desses sítios são transcricionalmente inativos em células de pontas de raiz de *L.alba* tetraplóide. Os resultados observados mostram que vários mecanismos podem ter atuado na reorganização genômica durante a poliploidização nessa espécie.

* Guidance Committee: Lisete Chamma Davide-UFLA (Major Professor), Lyderson Facio Viccini - UFJF.

2 ABSTRACT

PIERRE, Patrícia Maria Oliveira. Chromosome banding and fluorescent *in situ* hybridization of polyploid *Lippia alba* (Verbenaceae). In: _____. **Polyploidy in accessions of *Lippia alba* (Mill) NE. Br (Verbenaceae)**. 2008. Cap.3, p.70-99 Thesis (Doctor's Degree in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The karyotype of tetraploid ($2n=4x=60$) Brazilian cytotype of *L. alba* (Verbenaceae) was studied using C-banding, DAPI/CMA3 banding, Ag-NOR (nucleolar organization region) banding and fluorescence *in situ* hybridization with a 45S rDNA probe. Characterization of NOR-associated chromatin and NOR activity are discussed by observation of maximum number of nucleoli in interphase nuclei. Tetraploid plants presented a similar pattern of constitutive heterochromatin if compared with reported for this species. DAPI stain revealed that AT-rich DNA segments are concentrated at telomeric and proximal position in the chromosome centromeres. Differences of number of GC-rich DNA sites among diploid and tetraploid cytotypes were not observed. However, differences were seen in the maximum number of nucleoli and 45S rDNA sites among both cytotypes. Comparisons of the number of NORs and 45S rDNA sites indicate that some of these sites are transcriptionally inactive in root-tip cells of *L.alba* tetraploid. The results showed that several mechanisms can be acting in genome reorganization during polyploidization in this species.

* Guidance Committee: Lisete Chamma Davide-UFLA (Major Professor), Lyderson Facio Viccini - UFJF.

3 INTRODUÇÃO

O gênero *Lippia* está incluído na família Verbenaceae e apresenta, aproximadamente, 200 espécies com distribuição pantropical (Salimena, 2002). *Lippia alba* Mill. N.E.Br, comumente conhecida no Brasil como erva-cidreira é uma planta medicinal nativa da América do Sul e é amplamente empregada na medicina popular contra desordens gastrintestinais e respiratórias, possuindo, além disso, propriedades biológicas como sedativa, antiinflamatória, antimicrobiana e antifúngica, entre outras (Biasi & Costa, 2003).

Esta espécie é cariológicamente variável, apresentando poliploidia natural entre indivíduos, com números cromossômicos de $2n=2x=30$ e $2n=4x=60$ (Pierre, 2004). Estes citotipos são denominados La1-citral e La2-carvona, respectivamente, devido às diferenças encontradas na composição de seus óleos essenciais.

Técnicas de citogenética clássica e molecular constituem ferramentas que podem auxiliar na identificação de homólogos, no estudo de efeitos fenotípicos, no mapeamento físico e na análise da organização cromossômica, exercendo grande importância em estudos evolutivos (Sumner, 2003). Assim, a combinação de padrões de bandeamento C, DAPI e CMA e atividade de regiões organizadoras de nucléolo (RONs) com marcadores obtidos a partir da hibridização *in situ* com sondas de DNAr 45S têm contribuído para a caracterização citológica, auxiliando também no entendimento de eventos de divergência, hibridação, poliploidia e especiação em vegetais.

Análises envolvendo a combinação dessas técnicas para esses propósitos já foram relatadas em diversas espécies como *Citrus* e *Poncirus* (Rutaceae), *Clivia* (Amaryllidaceae), *Camelia* (Theaceae), *Selaginella*

(Pteridophyta) e *Urvillea* (Sapindaceae), dentre outras (Roose et al., 1998; Ran et al., 2001; Gu & Xiao, 2003; Marcon et al., 2005; Urdampilleta et al., 2006).

Em *L. alba*, estudos dessa natureza foram realizados apenas para o citótipo diplóide dessa espécie. Considerando a ausência dessas informações para plantas poliplóides da espécie, a aplicação dessas metodologias é de grande importância, podendo auxiliar na caracterização de sua biodiversidade e no entendimento de organizações genômicas ocorridas após eventos de poliploidização.

Considerando o exposto anteriormente, o objetivo do presente estudo foi utilizar, pela primeira vez, técnicas de bandeamento (C, DAPI e CMA), coloração com nitrato de prata e hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 45S para caracterizar os cromossomos de um citótipo tetraplóide de *L. alba*, auxiliando na identificação de possíveis reorganizações genômicas após a poliploidização e fornecendo evidências que possam auxiliar no entendimento da sua origem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Para os bandeamentos cromossômicos, somente o citótipo tetraplóide foi utilizado. Estes foram conduzidos no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Para a hibridização *in situ* fluorescente, utilizaram-se dois citótipos de *Lippia alba* Mill N.E. Br, denominados La1-citral ($2n=2x=30$) e La2-carvona ($2n=4x=60$), cultivados na casa de vegetação do Departamento de Biologia, UFLA, Minas Gerais. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná.

4.2 Preparação cromossômica

Raízes jovens foram pré-tratadas com 8-Hidroxiquinoleína 3mM (Sigma) a 4°C, por 8 horas, e fixadas em metanol: ácido acético (3:1). Meristemas radiculares foram digeridos em solução enzimática pectinase: celulase (20%: 2%) (Sigma), a 37°C, por 6 horas. As lâminas foram preparadas por meio da técnica de secagem ao ar (Carvalho & Saraiva, 1993).

4.3 Bandeamentos cromossômicos

4.3.1 Bandeamento C

Foram utilizadas preparações cromossômicas envelhecidas por, no mínimo, três semanas. A partir desse tempo, as lâminas foram submetidas a três tratamentos:

. **tratamento ácido:** solução de ácido acético 45%, a 60°C, por 20 minutos;

. **tratamento básico:** solução saturada de hidróxido de bário, a 60°C, por 35 minutos;

. **tratamento salino:** solução de 2X SSC (citrato de sódio e cloreto de sódio), a 60°C, por 80 minutos.

As lâminas foram lavadas, em seguida, em água destilada, secas e coradas com Giemsa 10%, por 30 minutos. Algumas preparações cromossômicas também foram coradas com orceína acética 2% por, no mínimo, 10 minutos.

As imagens foram obtidas por meio de uma câmera digital acoplada ao microscópio óptico Leica. Os cromossomos de cinco cariótipos foram mensurados no programa Sigma Scan Pro 5.0. Posteriormente, foi calculado o percentual de heterocromatina constitutiva presente no genoma: (Σ tamanho bandas heterocromáticas genoma/comprimento total do lote haplóide (CTLH))X100.

4.3.2 Bandeamentos DAPI/CMA3

Foram utilizadas lâminas recém-preparadas. Foram colocados sobre as células, no escuro, 50 μ L de solução de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol- Sigma) a uma concentração de 2 μ g/mL. O material foi coberto com lamínula 24 X 60 e colocado em câmara úmida escura, por 30 minutos. Em seguida, a lamínula foi retirada com um jato de água destilada e o material foi seco.

Sobre as mesmas lâminas, foram adicionados, no escuro, 50 μ L de solução de CMA (cromomicina A3- Sigma), a uma concentração de 0,5mg/mL. O material foi coberto com lamínula 24 x 60 e colocado em câmara úmida escura, por 60 minutos. O excesso de corante foi retirado com um jato de água destilada e as lâminas foram secas.

As lâminas foram montadas em solução antifade (glicerol/DABCO) pH=8,0. A visualização das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX 60 acoplado com câmera Optronics.

4.3.3 Coloração com nitrato de prata

As preparações cromossômicas foram tratadas de acordo com o método de Howel & Black (1980), com algumas modificações.

Foram adicionados à lâmina 50µL de solução coloidal (2g gelatina/100mL água) e 200µL de solução de nitrato de prata 50%, em tampão citrato-fosfato pH=3 (ajustado com ácido fórmico). As lâminas foram cobertas com lamínula e colocadas em câmara úmida, a 55°C, por, aproximadamente, 30 minutos. A coloração dos nucléolos foi monitorada a cada 10 minutos, sob microscópio óptico. Após a coloração dos mesmos, as lâminas foram lavadas por 10 minutos em água corrente e destilada.

Aproximadamente 100 núcleos interfásicos foram analisados. As melhores imagens foram capturadas em microscópio Leica acoplado com câmera digital.

4.4 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

Antes dos experimentos de FISH, as lâminas foram tratadas em solução de ácido acético 45%, por 20 minutos, para remover o corante das preparações mitóticas.

A hibridização *in situ* fluorescente foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Heslop-Harrison et al. (1991) e Cuadrado & Jouve (1994), com pequenas modificações. Plasmídeos pTA71 contendo a sequência de DNAr 45S do genoma do trigo foram utilizados como sonda (Gerlach & Bedbrook, 1979). Estes foram marcados com biotina 14 d-ATP por meio do kit BioNick (Invitrogen) e utilizados durante a hibridização.

Cada lâmina foi tratada com 30µL de mistura de hibridização (previamente desnaturada a 70°C), contendo 100-150 ng de sonda marcada (3µL); formamida 50% (15µL), polietilenoglicol 50% (6µL); SSC 20X (3µL); 100 ng de DNA de esperma de salmão (1µL); SDS 10% (1µL) e água destilada (1µL). O DNA cromossômico contendo a mistura de hibridização foi desnaturado, a 90°C, por 10 minutos e, em seguida, tratado a uma temperatura de 50°C.

A hibridização foi realizada overnight, a 37°C, em câmara úmida. As lavagens pós-hibridização foram realizadas em SSC 2X; formamida 20% em SSC 0,1X; SSC 0,1X e em SSC 4X/tween 20° a 42°C. A sonda foi detectada com avidina conjugada com FITC. Após a detecção, as lâminas foram lavadas em SSC 4X/ Tween20, à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas em 25µL de uma solução composta por antifade (glicerol/DABCO) (24µL) e 50 µg/mL de DAPI (1µL). A visualização da sonda hibridizada foi realizada no microscópio de epifluorescência Leica acoplado com câmera digital.

4.5 Ideogramas

Os cinco melhores cariótipos submetidos aos bandeamentos C, CMA e DAPI e à FISH foram utilizados para a construção de ideogramas. As medições e a confecção dos mesmos foram realizadas por meio dos programas Sigma Scan Pro 5.0 e Corel Photo Paint-12.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bandejamento C

Este é o primeiro relato de bandejamento C em citótipos tetraplóides de *L. alba*. Células submetidas a esta técnica apresentaram grandes blocos de heterocromatina nos núcleos interfásicos e profásicos (Figuras 1A-B). Em cromossomos prometafásicos e metafásicos, a heterocromatina foi evidenciada, em grande parte, em regiões proximais. Além disso, em alguns cromossomos, a heterocromatina encontra-se presente em grandes porções de um ou de ambos os braços cromossômicos (Figuras 1C-D e 2). As bandas heterocromáticas apresentaram-se de diferentes tamanhos (Figura 2), tendo o percentual de heterocromatina constitutiva no genoma sido de 46,77%.

Padrões de bandejamento similares foram relatados para o citótipo diplóide, por Sousa (2006). Este autor realizou o bandejamento C em diferentes populações de *L. alba* diplóide e verificou que o padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva entre populações desta espécie é pouco variável, apresentando baixo polimorfismo. Entre os cinco acessos analisados, foram relatados percentuais de heterocromatina variando de 43% a 54%. As bandas estavam presentes, principalmente nas regiões centrométicas dos cromossomos. Tal fato sugere que, nesta espécie, a poliploidia não ocasionou grandes alterações no padrão de heterocromatina constitutiva.

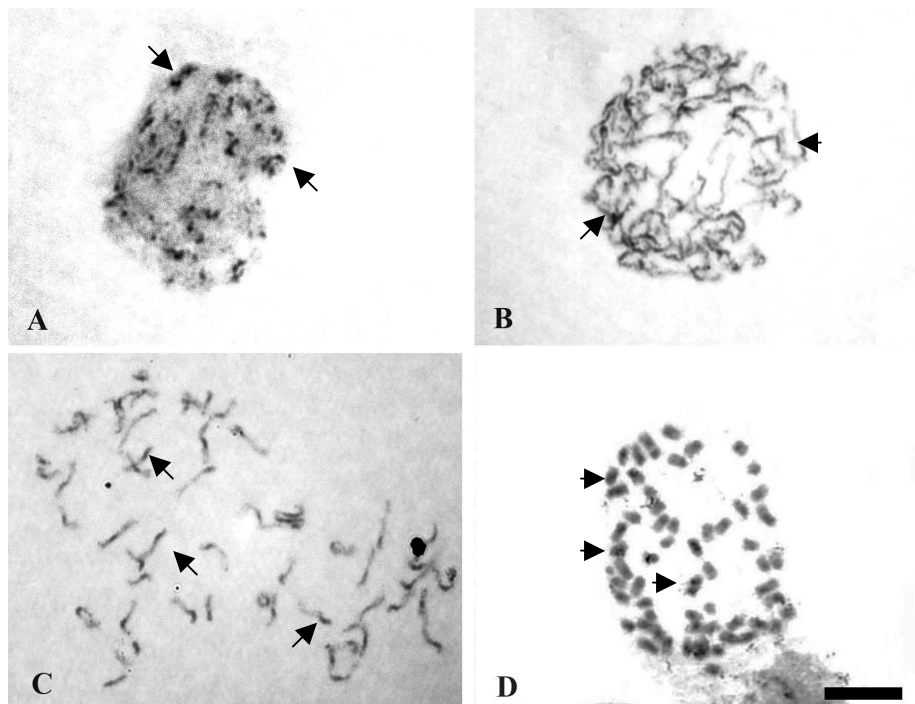


FIGURA 1 Bandejamento C em células de um citótipo tetraplóide de *L. alba*. A) Núcleo interfásico. B) Núcleo profásico. C) Cromossomos prometafásicos. D) Cromossomos metafásicos. Setas indicam regiões ricas em heterocromatina constitutiva. Barra=10 μ m.

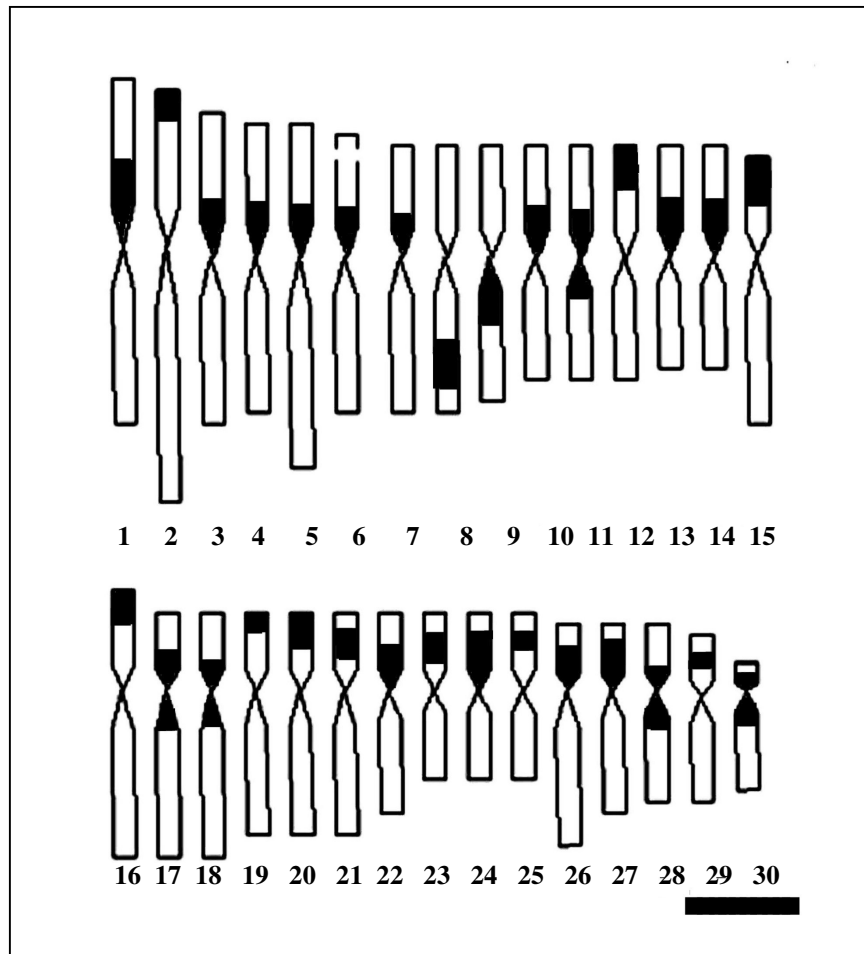


FIGURA 2 Ideograma representando a localização de bandas heterocromáticas de um citótipo tetraplóide de *L. alba*. Barra=2 μ m.

A ocorrência de grandes blocos de heterocromatina tem sido descrita em algumas famílias de plantas, mas poucos são os relatos para Verbenaceae. Brandão et al. (2007), por exemplo, relataram a presença de padrões de bandeamento similares ao de *L. alba* (presença de grandes blocos de heterocromatina constitutiva ocupando grande parte dos braços cromossômicos) em *Lantana camara*. Estudos devem ser realizados em outras espécies, para verificar se este padrão se repete dentro da família.

Além disso, considera-se que a presença de pequena quantidade de heterocromatina em um dado cariótipo seja uma condição plesiomórfica (Redi et al., 2001). Desse modo, a presença de grandes blocos de heterocromatina no cariótipo deste citótipo pode indicar uma condição apomórfica.

5.2 Bandeamentos DAPI/CMA3

Bandeamentos com fluorocromos DAPI/CMA3 foram realizados pela primeira vez em plantas tetraplóides de *L. alba*. Núcleos interfásicos apresentaram a maior parte de regiões ricas em AT (DAPI⁺), ao passo que sinais CMA⁺ (ricos em GC) apresentaram-se polarizados em uma região específica dos núcleos interfásicos (Figura 3A). Isso pode ser explicado pelo fato de que cromossomos encontram-se organizados em territórios específicos nos núcleos interfásicos (Khalil et al., 2007). Aparentemente, o tamanho cromossômico e a densidade de genes parecem influenciar nesse posicionamento. Outra possibilidade é que, por serem sítios correspondentes a seqüências de DNA ribossômico, estes podem estar posicionados proximamente para a formação do nucléolo.

Os padrões de distribuição de regiões ricas em AT foram coincidentes em cromossomos prometafásicos e metafásicos. Seqüências DAPI⁺

encontraram-se concentradas principalmente no telômero de um (pares 9, 10, 11, 12, 20, 21 e 22) ou de ambos os braços cromossômicos (pares 1, 2 e 5) e nas regiões proximais ao centrômero de todos os cromossomos do cariótipo (Figuras 3B, 3D e 6). Além disso, nem todas as marcas DAPI⁺ coincidiram com o padrão de heterocromatina constitutiva obtido com o bandeamento C. Foi observado que principalmente as marcas DAPI⁺ teloméricas não se apresentaram C⁺. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de a coloração com DAPI ser menos destrutiva aos cromossomos em relação à técnica de bandeamento C. Padrões similares foram observados por Sousa (2006), em plantas diplóides.

O bandeamento com CMA3 revelou a presença de três pares de cromossomos com sinais CMA⁺. Quatro dos sinais apresentaram-se em regiões terminais dos cromossomos dos pares 14 e 27 (Figura 3C e 6). Dois dos sinais foram visualizados em outras regiões cromossômicas, mas apresentaram-se muito fracos, impossibilitando a sua captura.

O padrão de bandeamento observado nas colorações com CMA3 mostrou a presença do mesmo número de sinais anteriormente relatado por Sousa (2006) para o citótipo diplóide. Isso pode ter ocorrido devido a problemas metodológicos. Alguns sinais não foram capturados pelo sistema de análise de imagens.

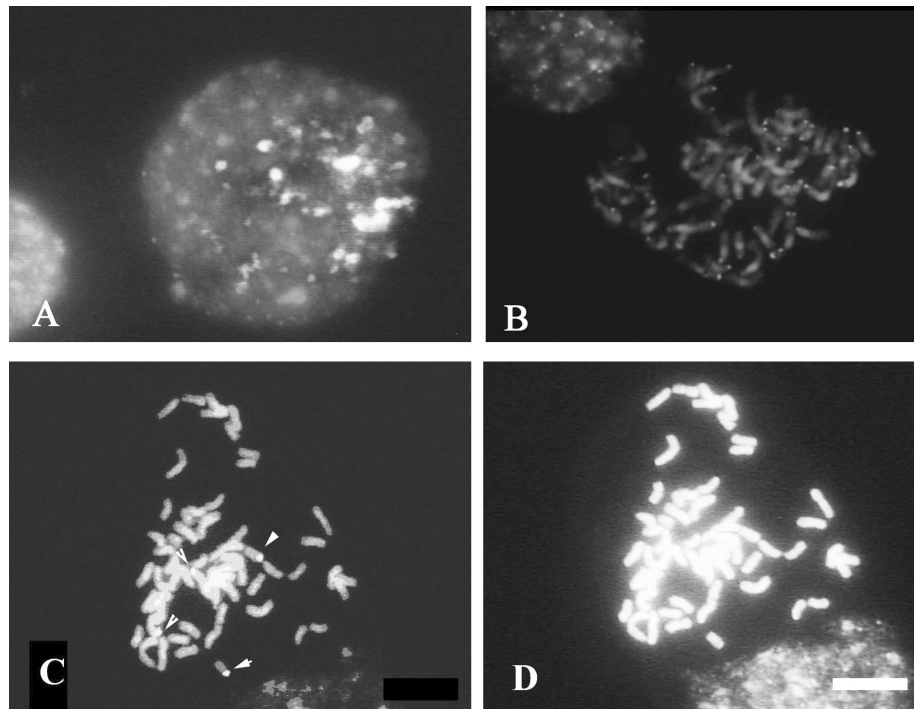


FIGURA 3 Bandeamentos com fluorocromos DAPI e CMA em *L. alba* tetraplóide. A) Regiões DAPI⁺ (azul) e CMA⁺ (verde) em um núcleo interfásico. B) Regiões DAPI⁺ em cromossomos metafásicos. C) Sinais CMA⁺ em cromossomos metafásicos (setas). D) Coloração com DAPI. Barra=5µm.

5.3 Coloração com nitrato de prata

Regiões organizadoras do nucléolo (RONs) constituem sítios que contêm sequências de DNA repetitivo e que, geralmente, codificam RNAs ribossômicos 45S (Guerra, 1988). Citologicamente, essas regiões podem corresponder a constrições secundárias nos cromossomos metafásicos e são responsáveis pela formação de nucléolos na interfase precedente (Beserendorfer et al., 2002).

O número máximo de RONs ativas foi correlacionado com o número máximo de nucléolos observados nos núcleos interfásicos no citótipo tetraplóide de *L. alba*. No presente estudo foi observado um número máximo de oito nucléolos (Figura 4A), indicando que *L. alba* tetraplóide apresenta quatro pares de RONs ativas. Foi possível observar também aspectos sobre a dinâmica da formação dos nucléolos. Alguns núcleos interfásicos mostraram uma variação no número e no tamanho dos nucléolos (três e dois nucléolos, Figura 4B; um nucléolo ocupando grande parte do núcleo, Figura 4C). Essas observações indicam que fenômenos de fusão nucleolar ocorreram. Sousa (2006) também observou aspectos similares em *L. alba* diplóide.

A atividade das RONs e a sua relação com a organização de genes ribossomais será discutida posteriormente.

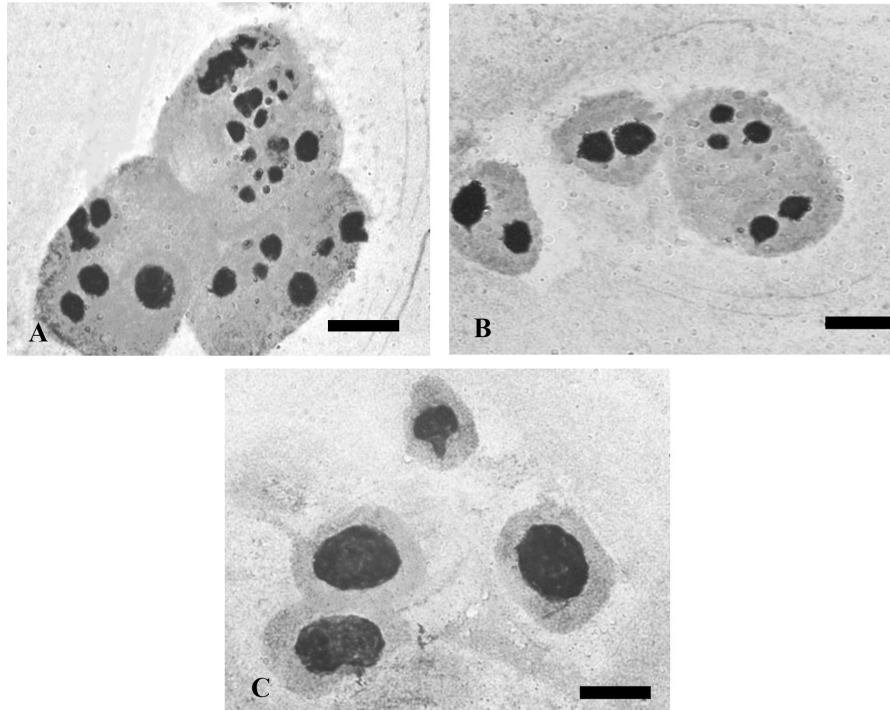


FIGURA 4 Núcleos de *L. alba* tetraplóide coradas com nitrato de prata. A) Intérfases com número de nucléolos variando de um a oito. B) Intérfases com dois a três nucléolos. C) Núcleos interfásicos com um nucléolo grande (fusão de nucléolos). Barra=10µm.

5.4 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

As células apresentaram sítios para DNAr 45S bem discriminados. Nos núcleos interfásicos de ambos os citótipos, não foi possível contar o número de sítios de DNAr 45S (Figura 5A), devido ao estado de condensação da cromatina que ocasionou um prolongamento ou a fusão dos cístrons. No entanto, em células profásicas e cromossomos metafásicos, o número de sinais mostrou-se muito claro em ambos os citótipos.

O citótipo diplóide apresentou seis sítios de hibridização, ao passo que, no tetraplóide, foram observados oito sítios grandes e dois muito pequenos para o DNAr 45S, nos pares 14, 24, 27, 28 e 29 (Figuras 5B-D e 6). Em *L. alba* diplóide, Brandão et al. (2007) também descreveram a presença de seis sítios para o DNAr 45S. Dessa forma, os resultados aqui apresentados corroboram os relatos anteriores.

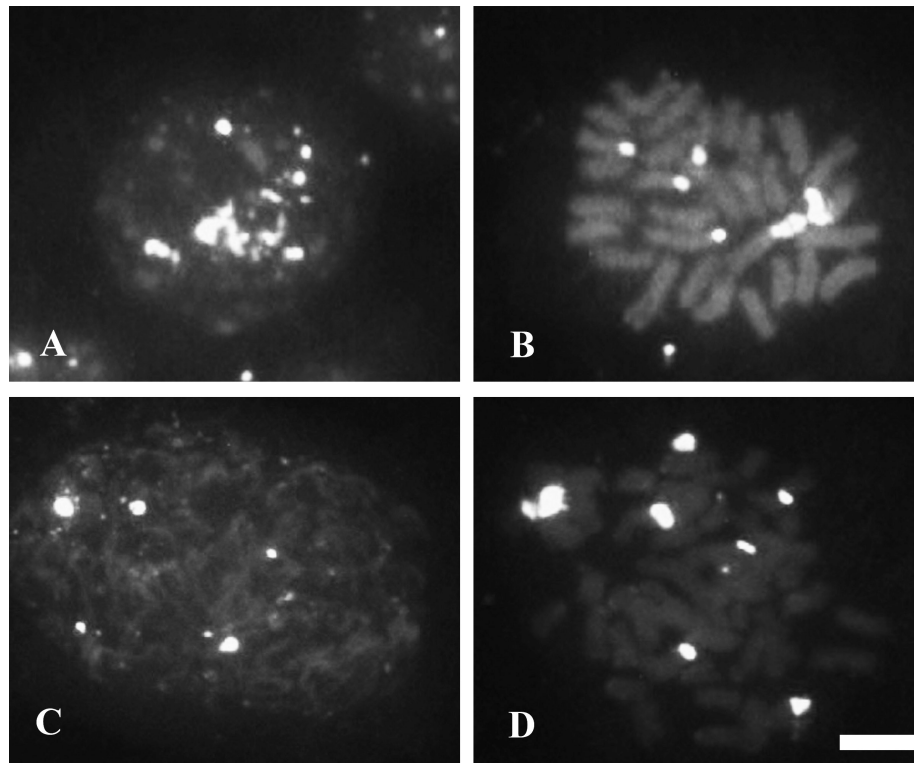


FIGURA 5 Localização de seqüências de DNAr 45S em núcleos de dois citótipos de *L. alba*. A) Núcleo interfásico de La1-citral (diplóide). B) Cromossomos metafásicos de La1-citral (diplóide) com seis sinais. C) Prófase mitótica de La2-carvona (tetraplóide). D) Cromossomos metafásicos de La2-carvona (tetraplóide) com oito sinais grandes e dois muito pequenos. Barra=10 μ m.

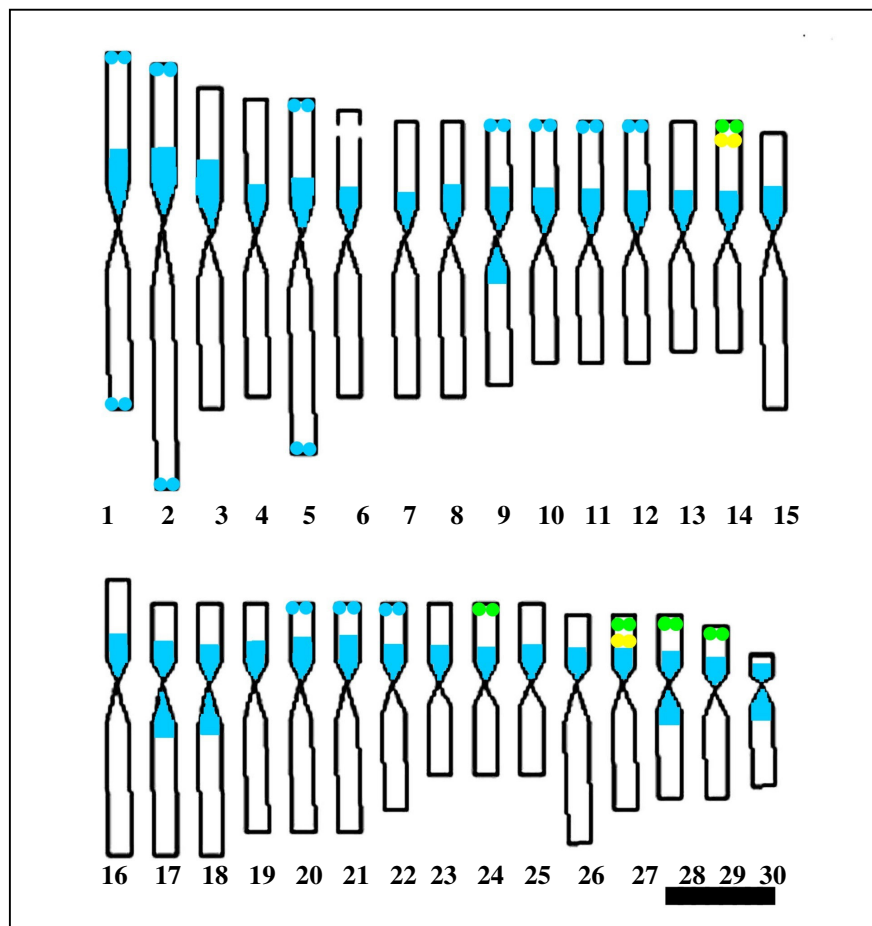


FIGURA 6 Ideograma representando a localização de sinais DAPI+ (azul), CMA3+(amarelo) e sítios de DNAr 45S (verde) em cromossomos de um citótipo tetraplóide de *L. alba*. Barra=2 μ m.

5.5 Evolução da poliploidia em *L. alba*

Para fins de comparação, a Tabela 1 mostra um resumo dos relatos e resultados obtidos sobre o número de constrições secundárias, sítios CMA⁺, número máximo de nucléolos e de sítios de DNAr 45S, para os citótipos diplóide e tetraplóide de *L. alba*.

Os dados da Tabela 1 mostram claramente a existência de uma diferenciação, no âmbito genético-molecular, entre esses citótipos.

Baseando-se nas fórmulas cariotípicas, observa-se que rearranjos cromossômicos ocorreram na evolução da poliploidia nessa espécie, para todas as características observadas, exceto para o número de sítios CMA⁺.

O padrão de bandeamento DAPI mostrou que, com a poliploidia, La2-carvona passou a apresentar regiões ricas em AT, preferencialmente nas regiões pericentroméricas ou proximais, ocupando boa parte dos braços cromossômicos.

TABELA 1 Características do cariótipo de dois citótipos de *L. alba*

Características	Citótipos	
	La1 (diplóide)	La2 (tetraplóide)
Número cromossômico	2n=2x=30**	2n=4x=60**
Fórmula cariotípica	6M+ 9Sm**	15M+14Sm+1Ac**
Constrições secundárias	4*	8***
Sítios CMA ⁺	6*	6***
Padrão DAPI ⁺	Prefencialmente centromérico, alguns teloméricos	Prefencialmente pericentromérico e proximal
Número máximo de nucléolos	4*	8***
Sítios DNAr 45S	6***	10***

*Informações relatadas por Sousa (2006); ** dados relatados por Pierre (2004);

*** Informações obtidas no presente estudo.

Além disso, alguns cromossomos (três pares) apresentaram bandas teloméricas em ambos os braços cromossômicos e, em outros sete pares, as bandas foram observadas nos telômeros de um dos braços.

As tendências no número de sítios de DNAr 45S na evolução de plantas poliplóides têm sido relatadas por diversos autores. Tais estudos demonstram que diversas situações podem ocorrer. Mishima et al. (2002), por exemplo, relataram conservação no número de sítios de DNAr 45S após cada ciclo de poliploidização de espécies do gênero *Sanguisorba* (Rosaceae). Entretanto, isso nem sempre é observado. No presente estudo, observa-se que, em *L. alba*, o número de sítios de DNAr 45S encontrado no citótipo tetraplóide não é consistente com o nível de ploidia.

A discordância entre o número de sítios de DNAr e o nível de ploidia também já foi relatada para outras espécies. Em um complexo poliplóide de *Camelia reticulata* (Theaceae), Gu & Xiao (2003), realizando o mapeamento físico de seqüências de DNAr 45S, também não verificaram uma correspondência entre o número de sítios e o nível de ploidia. Plantas diplóides, tetraplóides e hexaplóides apresentaram 8, 12 e 18 sítios de hibridização para este loco. Os autores sugeriram que a ocorrência de rearranjos cromossômicos deve ter levado à divergência na distribuição dessas seqüências ao longo do genoma desses citótipos. Mondin et al. (2007) também observaram menor número de sítios 45S do que o esperado em plantas tetraplóides do gênero *Crotalaria* (Leguminosae-Papilionoideae), sugerindo que estas perderam seqüências de DNAr durante a sua evolução.

Em *L. alba*, várias hipóteses podem ser levantadas para explicar a discordância entre o número de sítios de DNAr e o nível de ploidia. Caso La2-carvona seja autotetraplóide, sítios de DNAr podem ter sido eliminados, levando a uma diminuição no número de locos no autotetraplóide. Caso La2-carvona seja alotetraplóide, um dos parentais poderia ter sido La1-citral (com seis sítios) e o

outro poderia apresentar quatro sítios de DNAr 45S, originando um híbrido com cinco sítios e que, após uma duplicação cromossômica, originaria o tetraplóide atual com dez sítios.

Possivelmente, os parentais poderiam também apresentar um diferente número de sítios de DNAr 45S e a ocorrência de rearranjos cromossômicos, como translocações com pontos de quebra envolvendo o sítio 45S, eventos de transposição, eliminação e ampliações gênicas poderiam ter ocorrido com a evolução do poliplóide.

Observou-se que, em ambos os citótipos, o número de sítios de DNAr 45S excedeu o número de constrições secundárias e o número máximo de nucléolos na intérfase (Tabela 1). De acordo com Guerra (1988), os sítios de DNAr 45S geralmente localizam-se nas constrições secundárias. Entretanto, diversos estudos têm relatado discrepâncias em relação ao número e distribuição de RONS e de sítios de DNAr 45S, em várias taxa (Gu & Xiao, 2003; Fregonezi et al., 2006; Hasteroc et al., 2006; Mlinarec et al., 2006; Winterfeld & Rösen, 2007).

Constrições secundárias são consideradas RONS ativas na intérfase precedente (Gu & Xiao, 2003) e a presença de sítios de DNAr 45S não indica a atividade transcricional do loco de DNA ribossômico.

Considerando que, no citótipo tetraplóide, o número de máximo de nucléolos encontrado foi oito e que dez sítios de DNAr 45S foram observados, pode-se inferir que, possivelmente, um par de RONS está inativo. A inativação de seqüências de DNAr 45S também foi relatada para o citótipo diplóide por Sousa (2006).

Além disso, a perda de DNAr 45S ou a inativação das RONS é comum no decorrer da poliploidização. São comuns os relatos da ocorrência de locos de DNAr 45S em menor número que o esperado com a poliploidia (Gu & Xiao, 2003; Winterfeld & Rösen, 2007).

Em Aveneae, Winterfeld & Rösen (2007) observaram que não houve a coincidência entre o número de sítios de DNA45S e o número de RONS ativas. Além disso, foi verificado que sítios menores de DNA ribossômico não apresentavam atividade nucleolar.

De acordo com esses autores, a perda de atividade transcricional é freqüentemente observada em híbridos interespecíficos, sendo denominada dominância nucleolar. Neste caso, a inativação das RONS ocorre devido à ação de mecanismos de metilação do DNA e desacetilação de histonas. Em indivíduos que não são híbridos, as RONS podem ser suprimidas porque as células contêm, freqüentemente, maior número de cópias de DNAr que o necessário. Além disso, alternativamente, locos menores podem constituir pseudogenes ou seqüências com homeologias ao DNAr 45S (Pikaard, 2000).

Entender a história evolutiva por meio de padrões de bandejamento cromossômico e dos locos de DNAr 45S para fornecer evidências para elucidar a origem do citótipo poliplóide constitui uma tarefa difícil.

Com os dados do presente trabalho não foi possível elucidar a origem do citótipo tetraplóide (se auto- ou alotetraplóide), entretanto, foram levantadas evidências da ocorrência de alterações genômicas após a poliploidia. Diversos eventos envolvendo a modificação dos genomas podem ter ocorrido, ocasionando as alterações observadas. Além disso, é amplamente relatado por diversos autores que, após um evento de poliploidização, os genomas podem sofrer extensivas modificações, passando por uma reestruturação genômica na tentativa de se ajustar às novas condições impostas pela poliploidia (Leitch & Bennett, 1997; Sankoff, 2003; Rieseberg & Wendel, 2004; Chen et al., 2007).

É importante ressaltar que, no gênero *Lippia*, é comum a ocorrência de híbridos interespecíficos naturais (Sanders, 2001), o que poderia reforçar a hipótese de ocorrência de hibridação interespecífica na origem do citótipo tetraplóide.

Técnicas como a hibridização genômica *in situ* (GISH-Genomic *in situ* Hybridization) têm possibilitado a análise da organização genômica em híbridos interespecíficos, em espécies aloploplóides e linhagens interespecíficas de introgressão (Kato et al., 2005). Desse modo, a aplicação dessa técnica, associada a dados morfológicos, bioquímicos e ecológicos, poderia auxiliar na elucidação da origem do citótipo tetraplóide.

É importante ressaltar que esta não será uma tarefa fácil, pois a eficiência na distinção dos genomas depende do grau de divergência existente entre as espécies parentais (Kato et al., 2005); além disso, o tempo apaga os sinais de duplicação genômica (Wolfe, 2001) e as rápidas mudanças genéticas sofridas em poliplóides recém-formados dificultam a identificação dos genomas no híbrido interespecífico (Chen et al., 2007). Uma outra dificuldade a ser encontrada, caso sua origem seja por aloploidia, seria a identificação dos parentais doadores dos genomas.

Considerando a importância da espécie e a diversidade de técnicas atualmente disponíveis, estas limitações não devem constituir entraves para que novas pesquisas sejam realizadas com a finalidade de estudar a origem de citótipos poliplóides nessa espécie.

6 CONCLUSÕES

O trabalho realizado foi de grande relevância, uma vez que relatos desta natureza são inexistentes para citótipos poliplóides de *L. alba*.

Os padrões de bandeamento cromossômico e a hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 45S não possibilitaram a elucidação da origem do citótipo tetraplóide de *L. alba*, entretanto, evidenciaram que reorganizações no genoma (provavelmente envolvendo a eliminação e inativação de sequências) ocorreram após a poliploidização.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESERENDORFER, 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. (Alliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.139, p. 99-108, 2002.

BIASI, L. A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 455-459, maio/jun. 2003.

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. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biothetic & Histochemistry**, v. 68, n.3, p.142-145, 1993.

CHEN, Z.J.; HA, M.; SOLTIS, D. Polyploidy: genome obesity and its consequences. **New Phytologist** v.173, p.717-720, 2007.

CUADRADO, A.; JOUVE, N. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6X-Triticale. **Chromosome Research**, v.2, p.331-338, 1994.

FREGONEZI, J.N.; FERNANDES, T.; TOREZAN, J.M.D.; VIEIRA, A.O.; VANZELA, A.L.L. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.97-104, 2006.

GERLACH, W.L.; BEDBROOK, J.R. Cloning characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. **Nucleic Acids Research**, v.7, p.1869-1885, 1979.

GU, Z.; XIAO, H. Physical mapping of the 18S-26S rDNA by fluorescent in situ hybridization (FISH) in *Camelia reticulata* polyploid complex (Theaceae). **Plant Science**, v.164, n.279-285, 2003.

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

HASTEROK, R.; WOLNY, E.; HOSIAWA, M.; KOWALCZYK, M.; KULAK-KSIAZCZYK, S.; KSIAZCZYK, T.; HENEEN, W.K.; MALUSZYNSKA, J. Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. **Annals of Botany**, v.97, p.205-216, 2006.

HESLOP-HARRISON, J.S.; SCWARZACHER, T.; ANAMTHAWAT-JONSSON, K.; LEITCH, A.R.; SHI, M.; LEICH, I.J. *In situ* Hybridization with automated chromosome denaturation. **Technique**, v.3, p.106-109, 1991.

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.

KATO, A.; VEGA, J.M.; HAN, F.; LAMB, J.C.; BIRCHLER, J.A. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.148-154, 2005.

KHALIL, A.; GRANT, J.L.; CADDLE, L.B.; ATZEMA, E.; MILLS, K.D.; ARNEODO, A. Chromosome territories have a highly nonspherical morphology and nonrandom positioning. **Chromosome Research**, v.15, n.7, p.899-916, 2007.

LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**, v.2, n.2, p.470-476, 1997.

MARCON, A.B.; BARROS, I.C.L.; GUERRA, M. Variation in chromosome numbers, CMA bands and 45S rDNA sites in species of *Selaginella* (Pteridophyta). **Annals of Botany**, v.95, p.271-276, 2005.

MISHIMA, M.; OHMIDO, N.; FUKUI, K.; YAHARA, T. Trends in site number change of DNAr loci during polyploid evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae). **Chromosoma**, v.110, p.550-558, 2002.

MLINAREC, J.; PAPES, D.A.; BESERENDORFER, V. Ribosomal, telomeric and heterochromatin sequences localization in the karyotype of *Anemone hortensis*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.150, p.177-186, 2006.

MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; FUCHS, M.C.P.; ANDRADE, L.M. Chromosomal evolution of the genus *Crotalaria* (leguminosae-Papilionoideae) and its taxonomy relationships. **Chromosome Research**, v.15, p.37, 2007. Supplement, 2.

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

PIKAARD, C.S. The epigenetics of nucleolar dominance. **Trends in Genetics**, v.16, n.11, p.495-499, 2000.

RAN, Y.; HAMMETT, R.W.; MURRAY, B.G. Hybrid identification in *Clivia* (Amaryllidaceae) using chromosome banding and genomic in situ hybridization. **Annals of Botany**, v.87, p.457-462, 2001.

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

RIESEBERG, L.H.; WENDEL, J. Plant speciation- rise of the poor cousins. **New Phytologist**, v.161, p.1-21, 2004.

ROOSE, M.L.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J.S. The chromosomes of *Citrus* and *Poncirus* species and hybrids: identification of characteristic chromosomes and physical mapping of rDNA loci using in situ hybridization and fluorochrome banding. **The Journal of Heredity**, v.89, n.1, p.83-86, 1998.

SALIMENA, F.R.G. New synonyms and typifications in *Lippia* sect *Rhodolippia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v.40, p.121-125, 2002.

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

SANKOFF, D. Rearrangements and chromosomal evolution. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.13, p.583-587, 2003.

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

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

URDAMPILLETA, J.D.; FERRUCCI, M.S.; TOREZAN, J.M.D.; VANZELA, A.L.L. Karyotype relationships among four south american species of *Urvillea* (Sapindaceae: Paullinieae). **Plant Systematics and Evolution**, v.258, p.85-95, 2006.

WINTERFELD, G.; RÖSER, M. Disposition of ribosomal DNAs in the chromosomes of perennial oat (Poaceae: Aveneae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.155, n.193-210, 2007.

WOLFE, K.H. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization **Nature Reviews Genetics** v.2, p.333-341, 2001.