

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E
MOLECULAR DE TRÊS ACESSOS DE *Lippia*
alba (Mill.) N.E.Br (VERBENACEAE)**

PATRÍCIA MARIA OLIVEIRA PIERRE

2004

PATRÍCIA MARIA OLIVEIRA PIERRE

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE TRÊS
ACESSOS DE *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br (VERBENACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Pós - Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”

Orientadora
Profa.Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

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

Pierre, Patrícia Maria Oliveira

Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba*
(Mill.) N.E. Br (Verbenaceae) / Patrícia Maria Oliveira Pierre. -- Lavras :
UFLA, 2004.

80 p. : il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

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

CDD-583.880415
-633.88

PATRÍCIA MARIA OLIVEIRA PIERRE

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE TRÊS
ACESSOS DE *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br (VERBENACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”

APROVADA em 24 de Setembro de 2004

Prof. Dr. Lyderson Facio VicciniUFJF

Profa Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena..... UFJF

Prof. Dr. João Bosco dos Santos.....UFLA

Profa Dra. Lisete Chamma Davide
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A todos os meus mestres que por me ensinarem e incentivarem, possibilitaram que eu descobrisse o maravilhoso e intrigante mundo da genética

OFEREÇO

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

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter colocado em minha vida amigos tão maravilhosos, por me auxiliar a vencer obstáculos e por todas as oportunidades.

A meus pais, Paulo e Rita e irmãos Rosanna e Danilo e familiares, pelo amor incondicional, pelo apoio, carinho, compreensão e por me mostrarem o quanto a família é importante em nossas vidas.

Ao Flávio, pelo imenso amor, carinho e apoio. Pelos sonhos que tornou realidade, pela alegria que trouxe a minha vida e por ter me dado muita força e coragem.

À minha amiga e orientadora, Lisete Chamma Davide, por todo auxílio e compreensão nos momentos difíceis pelos quais passei, pela confiança e credibilidade, pelos ensinamentos e por ter contribuído para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu amigo e orientador, Lyderson Facio Viccini, pela iniciação científica, por ter despertado meu amor pela citogenética, pela confiança, por ter me dado a oportunidade de estudar as Lippias e, acima de tudo, pela amizade.

Ao doutor Marco Antônio Machado (Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora), pelos ensinamentos e por todo o auxílio.

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

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

Aos professores João Bosco, Magno, César e Elaine, pelos ensinamentos e valiosas sugestões.

Aos amigos de turma de mestrado: Mansuêmia (Su), Welcimar (Wel), Breno, Willian, Juliana e demais amigos do curso de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelo incentivo e amizade.

Aos grandes amigos Saulo, José Marcello e Sarah, meus sinceros agradecimentos por todo o apoio, incentivo e amizade.

À amiga Ana Luísa Azevedo, por todo o auxílio e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética de Lavras: Soraya, Josiane, Caio, Lívia, Cássia, Rose, Juliane, Elisa, Suellen, Alexandre, Mívia, Marcos e Sandro, pelos momentos de alegria e pela amizade.

Aos amigos de Juiz de Fora: Aline, Milene, Elisson e Pâmela, pela amizade.

À Elaine, secretária do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelo valioso auxílio, pela paciência e amizade.

Aos funcionários da UFLA e do Departamento de Biologia.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

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

“ Os fatos são as peças que constituem a Ciência, mas a Ciência não começa pelos fatos. Ela começa com as observações.”

Anônimo

“ O mundo está nas mãos daqueles que têm coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos. Cada qual com seus talentos.”

Paulo Coelho

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Importância do estudo de plantas medicinais.....	3
2.2 Plantas medicinais e princípios ativos.....	4
2.2.1 Óleos essenciais.....	5
2.2.1.1 Quimiotipos ou variedades químicas.....	6
2.3 A família Verbenaceae e o gênero <i>Lippia</i>	8
2.3.1 Descrição botânica e ecológica.....	8
2.3.2 Quimiotipos de <i>L. alba</i>	9
2.4 A citogenética e a sua importância.....	12
2.4.1 Citogenética em <i>L. alba</i>	15
2.5 Marcadores RAPD.....	16
2.5.1 Marcadores RAPD em <i>L. alba</i>	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Obtenção do material.....	19
3.2 Citogenética.....	19

3.2.1 Análise mitótica.....	19
3.2.1.1 Preparo das lâminas.....	20
3.2.2 Cariótipo.....	20
3.2.3 Núcleos interfásicos.....	21
3.2.4 Análise meiótica.....	22
3.2.4.1 Preparo das lâminas.....	22
3.2.5 Viabilidade do grão de pólen.....	24
3.2.5.1 Delineamento experimental.....	24
3.2.6 Produção de sementes.....	24
3.3 Marcadores RAPD.....	25
3.3.1 Extração do DNA genômico e reação de RAPD.....	25
3.3.2 Score das bandas e análise dos dados.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Citogenética.....	27
4.1.1 Núcleos interfásicos.....	27
4.1.2 Cromossomos metafásicos.....	31
4.1.3 Análise meiótica.....	49
4.1.3.1 La1- citral.....	49
4.1.3.2 La2-carvona.....	52
4.1.3.3 La3- linalol.....	55
4.1.4 Viabilidade do grão de pólen.....	59

4.2 Marcadores RAPD.....	60
4.3 Relações existentes entre La1-citral, La2- carvona e La3- linalol.....	66
5 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

RESUMO

PIERRE, Patrícia Maria Oliveira. **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.*

Em *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae), popularmente conhecida como cidreira, são observados quimiotipos, denominados La1- citral, La2- carvona e La3- linalol que apresentam variações morfológicas e diferentes atividades farmacológicas. Estudos morfológicos, anatômicos e fitoquímicos desses quimiotipos têm demonstrado que, mesmo sob as mesmas condições ambientais essas diferenças são observadas. A espécie apresenta importância econômica e medicinal e tais variações dificultam a correta identificação desses materiais sendo necessária a utilização de técnicas que auxiliem na identificação precisa dos mesmos. O presente estudo teve por objetivos verificar por meio da citogenética e de marcadores RAPD se as variações observadas entre esses quimiotipos ocorrem devido a diferenças genéticas entre eles e auxiliar na correta identificação e classificação dos mesmos. Três acessos correspondentes aos quimiotipos La1, La2 e La3 foram analisados. Para o estudo dos núcleos interfásicos e do cariótipo, raízes foram pré-tratadas com antimitóticos e as lâminas, preparadas por meio da técnica de dissociação celular. Para a análise meiótica, botões florais foram coletados, fixados e as lâminas preparadas por meio da técnica de secagem ao ar. A viabilidade dos grãos de pólen foi avaliada por meio da coloração de Alexander. Na análise de RAPD, realizada segundo Williams *et al.*(1990), testaram-se 47 primers. Foram calculados os coeficientes de similaridade de Nei & Li (1979) para a construção da matriz de distâncias e do dendrograma. La1 e La2 apresentaram núcleos interfásicos arreticulados, $2n=30$ (6M + 9SM) e $2n=60$ (15M+ 14SM + 1AC) e um comprimento total do genoma de $43\mu\text{m}$ e $83,67\mu\text{m}$, respectivamente. La3- linalol apresentou-se mixoplóide com números cromossômicos variando de $2n=12$ a 60 e um cromossomo com características de cromossomo B em algumas células. Seus núcleos interfásicos são do tipo semi-reticulado. O percentual de anormalidades meióticas foi de 16,49%; 91,9% e 83,6% e a viabilidade do grão de pólen, de 82,35%, 52,51% e 34,75% para La1, La2 e La3, respectivamente. Dos 47 primers testados, 70,2% foram selecionados. Foram amplificadas 208 bandas, 33

Comitê de Orientação: Lisete Chamma Davide- UFLA (Orientadora); Lyderson Facio Viccini (UFJF); Marco Antônio Machado- Embrapa Gado de Leite/ Juiz de Fora.

das quais foram monomórficas. Verificou-se que se formaram dois grupos principais, correspondendo a La1 e La2, e que indivíduos La3 se agruparam com os dois quimiotipos. La3 apresentou maior variação dentro (0,29) do que os demais (0,02 e 0,03 para La1 e La2, respectivamente). As variações observadas entre esses quimiotipos ocorrem devido à existência de diferenças genéticas entre eles. Nossos resultados permitem sugerir que La2- carvona é um autopoliplóide de La1- citral. La3- linalol é possivelmente um híbrido resultante do cruzamento entre La1 e La2. É possível que as mudanças pelas quais esses quimiotipos estão passando constituam mecanismos que podem levar à especiação dos mesmos, sendo necessário reunir a esses resultados, dados morfológicos, bioquímicos e ecológicos para uma reformulação da categoria taxonômica dos mesmos.

ABSTRACT

PIERRE, Patrícia Maria Oliveira. **Cytogenetic and molecular characterization of three accessions of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. (Verbenaceae)**. 2004. 80p. Dissertation- (Master's degree in Genetics and Plant Breeding)- Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

In *Lippia alba* (Mill.) NE Br. (Verbenaceae), commonly known as cidreira, chemotypes are observed and designated as La1-citral, La2-carvone and La3-linalool. They present morphological variation and different pharmacological activities. Morphologic, anatomical and phytochemical studies on these chemotypes has shown that, even under identical environmental conditions, those differences are noted. The species presents economical and medicinal importance, but the correct identification of those materials turn to be had because of such variations. Therefore it is necessary to adapt techniques that allow discrimination among the material. The aims of the present study are to verify, through cytogenetics and RAPD markers if the variations observed among those chemotypes happen due to genetic differences and to assist their correct identification and classification. Three accessions corresponding to the chemotypes La1, La2 and La3 were analyzed. For the study of the interphase nucleus and karyotype analysis, roots were pretreated with antimetabolic agents and the slides were prepared by the cellular dissociation technique. For meiotic analysis, floral buds were collected, fixed and the slides prepared by the air drying technique. The pollen viability was evaluated by Alexander stain. In the analysis of RAPD, accomplished according to Williams *et al.* (1990), 47 primers were tested. The coefficients of similarity of Nei & Li (1979) were utilized for the construction of the distance matrix and dendrogram. La1 and La2 presented areticate interphase nuclei, $2n=30$ (6M + 9SM) and $2n=60$ (15M+ 14SM + 1AC) and a total length of the genome of $43\mu\text{m}$ and $83,67\mu\text{m}$, respectively. La3 was mixoploid with chromosome numbers varying between $2n=12$ to 60 and one chromosome with characteristics of B- chromosome in some cells. Their interphase nucleus is a semi-reticulate type. The percentual of meiotic abnormalities was of 16,49%, 91,9% and 83,6% and the pollen viability, was of 82,35%, 52,51% and 34,75% for La1, La2 and La3, respectively. From the 47 tested primers, 70,2% were selected. 208 bands were amplified, 33 were monomorphic.

Guidance Committee: Lisete Chamma Davide – UFLA (Advisor); Lyderson Facio Viccini (UFJF); Marco Antônio Machado- Embrapa Gado de Leite/ Juiz de Fora.

Two main groups were formed, one with La1 individuals and other with La2, while La3 individuals were included in both groups. La3 presented larger variation inside (0,29) than the others (0,02 and 0,03 for La1 and La2, respectively). The variation observed among those chemotypes happen due to the existence of genetic differences among them. Our results allowed that La2- linalool is an autopolyploid of la1- citral. La3- carvone is possibly a hybrid resulting from the crossing between La1 and La2. It is possible that the changes observed constitute mechanisms that can lead to speciation of the chemotypes. It's necessary to gather those results, morphological, biochemical and ecological datas to review their taxonomic category.

1 INTRODUÇÃO

As plantas apresentam grande plasticidade na produção de compostos químicos graças à variabilidade genética, fatores ecológicos e ambientais. Esses produtos constituem fonte de princípios ativos e podem ser destinados à produção de medicamentos.

Dentre esses compostos, os óleos essenciais destacam-se por apresentarem-se como uma mistura complexa de vários constituintes, podendo chegar até 100 substâncias diferentes. Porém, há o predomínio de algumas dessas substâncias as quais caracterizam o óleo essencial.

Em algumas espécies vegetais ocorre uma variação pronunciada na composição do óleo essencial, de tal modo que essas podem ser classificadas em diferentes quimiotipos ou variedades químicas. Esses são definidos segundo o seu componente majoritário.

Em *Lippia alba* (Verbenaceae), popularmente conhecida como cidreira brasileira, são observados diferentes quimiotipos que foram arbitrariamente classificados como quimiotipos La1, La2 e La3. Seus compostos majoritários são: citral, carvona e linalol, respectivamente, os quais apresentam diferentes atividades farmacológicas. Entre os três quimiotipos, embora tenham sido classificados como sendo da mesma espécie, pequenas variações morfológicas podem ser percebidas em relação ao porte e à morfologia das folhas e flores. Tais diferenças têm sido observadas em função da origem geográfica do material, o que levou à hipótese de que essas variações poderiam ser influenciadas pelo ambiente ao qual a planta está submetida.

Diversos autores têm relatado que essa espécie apresenta ampla plasticidade fenotípica resultante de adaptações às condições ambientais encontradas no local de procedência.

Excluído: es

Entretanto, estudos morfológicos, anatômicos, fitoquímicos e de micropropagação desses quimiotipos foram realizados por Tavares (2003), sendo possível verificar que os mesmos mantiveram suas diferenças, mesmo quando mantidos sob as mesmas condições ambientais, sugerindo que essas são geneticamente controladas.

É importante ressaltar que essa espécie habita todas as regiões do Brasil, é muito conhecida pela população e apresenta importância econômica e medicinal.

Como tais variações dificultam a correta identificação desses materiais, é de grande importância utilizar técnicas que auxiliem na identificação precisa dessas fontes de princípios ativos, subsidiando uma correta padronização para a sua utilização econômica e na medicina popular.

Assim, este trabalho teve como objetivo verificar por meio de análises citogenética e molecular, se as variações observadas entre esses quimiotipos ocorrem devido a diferenças genéticas entre eles, auxiliando, dessa forma, na taxonomia dos mesmos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância do estudo de plantas medicinais

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.

O estudo sobre plantas medicinais é bastante complexo e, por isso, multidisciplinar, polarizando a atenção de botânicos, biólogos, bioquímicos, farmacêuticos, médicos e agrônomos (Pinto & Bertolucci, 2002).

O emprego terapêutico das plantas medicinais e a pesquisa de novas drogas a partir de plantas vêm ganhando importância nos últimos anos. Segundo a Fundação Herbarium (2004), uma estimativa feita pela “PhytoPharm Consulting”, em Berlim, revelou que até o ano 2007, a fitoterapia deve movimentar cerca de US\$47 bilhões anualmente. Ainda de acordo com essa estimativa, acredita-se que os EUA possam vir a se tornar o maior mercado de medicamentos fitoterápicos do mundo, responsáveis por uma participação de US\$20 bilhões. Em segundo lugar, viria a Europa, com US\$14 bilhões e em terceiro a Ásia, com US\$10 bilhões. Os demais países, incluindo o Brasil, seriam responsáveis por um total de US\$ 3 bilhões anuais. No Brasil, em 2000, foram negociados US\$700 milhões e a previsão é de US\$1 bilhão para os próximos dez anos.

Estima-se que, desde a validação farmacológica da planta medicinal até a produção do medicamento fitoterápico, sejam gastos cerca de 0,15 a 7 milhões de dólares, envolvendo um tempo total de 2 a 5 anos para a sua disponibilização ao mercado consumidor. Em contrapartida, para medicamentos sintéticos, são

gastos cerca 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 constitui uma forma economicamente viável, se comparada à produção de medicamentos sintéticos.

2.2 Plantas medicinais e princípios ativos

Planta medicinal refere-se a toda planta que apresenta efeito terapêutico, tanto sob o conhecimento popular quanto pelo científico. O efeito terapêutico é dado pelo seu princípio ativo. Segundo Pinto & Bertolucci (2002), os princípios ativos das plantas medicinais são substâncias que a planta sintetiza e armazena durante o seu crescimento e são produtos do metabolismo secundário. Metabólitos secundários, segundo Theis & Lerdau (2003), são compostos produzidos pelas plantas e que não são essenciais ao metabolismo fotossintético ou respiratório básico. Além disso, são compostos complexos, presentes em baixas concentrações e, assim, exercem importantes funções biológicas que garantem vantagens adaptativas, possibilitando a sobrevivência e a perpetuação da espécie em seu ecossistema. Theis & Lerdau (2003) enfatizam ainda que os compostos secundários existentes nas plantas motivam ecólogos, evolucionistas, agrônomos, entre outros, por dois motivos: há uma diversidade muito grande de compostos secundários, mesmo em plantas de taxa relacionados e, segundo, esses compostos químicos desempenham uma função importante na modulação de interações planta-patógeno, possibilitando sua aplicação na agricultura.

Uma característica interessante dos fitoterápicos é que esses apresentam amplo espectro de ação (devido à diversidade de seus constituintes) e efeitos colaterais mais brandos ou até mesmo inexistentes em relação aos medicamentos sintéticos (Pinto & Bertolucci, 2002).

Quanto aos principais grupos de princípios ativos naturais, esses podem ser divididos em oito grupos: alcalóides, flavonóides, glicosídeos cardiotônicos,

glicosídeos antraquinônicos, taninos, gomas e mucilagens e óleos essenciais. Esses grupos estão distribuídos em todas as famílias de plantas (Gotlieb & Salatino, 1987).

2.2.1 Óleos essenciais

Segundo a definição de Gotlieb & Salatino (1987), óleos essenciais são produtos vegetais separáveis por arraste com vapor d'água e produzidos em estruturas celulares e anatômicas bem definidas. Quimicamente, os componentes dos óleos voláteis são fenilpropanóides e terpenóides. Do ponto de vista físico, os óleos essenciais são líquidos voláteis de aparência oleosa à temperatura ambiente, geralmente com aroma agradável e intenso, podendo ser incolores ou ligeiramente amarelados.

Os óleos essenciais ocorrem em todas as famílias do reino vegetal e são encontrados sob a forma de uma mistura complexa de muitos constituintes, podendo chegar até 100 substâncias diferentes. Porém, há o predomínio de alguns compostos responsáveis pelas características de cada um.

Para Gotlieb & Salatino (1987), óleos essenciais podem desempenhar as seguintes funções biológicas:

- **interação planta-planta** - constituintes do óleo essencial podem exercer um efeito alelopático, fazendo com que, por exemplo, um determinado constituinte iniba a germinação de sementes e o crescimento de plântulas de várias espécies, exceto da planta que o produziu; podem, ainda, promover a sinalização química, pois tais substâncias voláteis podem penetrar em outras folhas via ceras cuticulares, induzindo a síntese de defensivos (fenóis, taninos), funcionando como um arsenal químico e, conseqüentemente, diminuindo a intensidade do ataque às folhas, tanto da planta que emitiu a mensagem quanto as receptoras;

- **interação planta-animal** - constituintes do óleo essencial podem oferecer proteção contra a herbivoria, inibindo a atividade bacteriana do rúmen do animal, resultando na redução do consumo alimentar e auxiliar na polinização. Tais substâncias podem penetrar em insetos, alterando os seus equilíbrios hormonais, desencadeando um processo de defesa muito mais sofisticado;

- **interação planta-microrganismos** - proteção contra fungos e bactérias.

Além disso, podem exercer proteção contra a evapotranspiração.

Óleos essenciais funcionam, portanto, como armas de comunicação química entre plantas e defesa química dessas contra o reino animal. Desse modo, podem ser utilizados na agricultura, como substitutos potenciais de agrotóxicos e na indústria farmacêutica, na produção de fármacos.

Segundo Pinto & Bertolucci (2002), os óleos essenciais apresentam atividade farmacológica muito diversa e, muitas vezes, polivalente. Aos óleos essenciais podem ser atribuídas algumas ações genéricas, como ação digestiva, carminativa, hiperemizante local, antisséptica e estimulante, entre outras.

2.2.1.1 Quimiotipos ou variedades químicas

As plantas apresentam grande flexibilidade na produção de compostos químicos, graças à variabilidade genética, fatores ecológicos e ambientais, podendo aumentar a canalização de energia obtida no metabolismo primário (fotossíntese) para o metabolismo secundário. Estudos dessa variação aliados à seleção, tanto de genes como de regimes ambientais ótimos podem, portanto, ser utilizados para aumentar a produção de metabólitos secundários para incrementar a produtividade e pureza das substâncias desejadas (Brown Júnior, 1988 citado por Pinto e Bertolucci, 2002).

Em relação aos óleos essenciais, algumas espécies de plantas exibem uma variação pronunciada na composição química, podendo ser classificadas em quimiotipos ou variedades químicas. Os quimiotipos podem ser classificados segundo seu componente químico majoritário. Por exemplo, Vieira et al. (2001), relatam a ocorrência de variações químicas em relação a constituintes do óleo essencial de 12 acessos de *Ocimum gratissimum* L.

Diversos estudos relatam a ocorrência de quimiotipos em várias espécies: *Lippia alba* (Zoghbi et al., 1998 e Vale et al., 1999); *Aloysia gratissima*, *A. virgata*, *A. triphylla* e *A. polystachya* (Ricciardi et al., 2000); *Lippia junelliana* (Juliani-Jr et al., 2002); *Lippia chevalieri* e *L. multiflora* (Bassole et al., 2003) e *Thymus vulgaris* e *Mentha* (Theis & Lerdau, 2003).

Essas variações qualitativas se originam principalmente de uma variação genética e/ou de possíveis influências ecológicas (D'Andrea et al., 1995).

O número e o tipo de componentes químicos, assim como suas proporções podem variar em uma mesma espécie botânica, por razões ecológicas como:

- **Luz-** este é um fator que influencia na fotossíntese, controlando o desenvolvimento das plantas. Diversos estudos têm demonstrado que a intensidade, duração e qualidade da luz exercem efeitos sobre a produção de óleos essenciais: Li (1996) in Pinto & Bertolucci (2002) verificou que em sálvia, o teor de cânfora (constituente do óleo essencial) foi maior a 45% de irradiância do que a 100%; outros autores como Dudai et al. (1992) in Pinto & Bertolucci (2002) verificaram que em *Origanum syriacum* L. o teor e a composição do óleo essencial foram intensificados sob fotoperíodos curtos.
- **Temperatura-** Fahlén et al. (1997) in Pinto & Bertolucci (2002) verificaram que em camomila, um termoperíodo de 25-18°C produziu elevada concentração dos constituintes majoritários do seu óleo essencial.
- **Umidade-** Singh-Sangwan et al. (1994) in Pinto & Bertolucci (2002) verificaram que em capim-limão, o teor do óleo essencial aumentou

significativamente quando as plantas foram submetidas a 90 dias de estresse hídrico.

Outros fatores como altitude, variação sazonal, latitude e variações geográficas ou fatores puramente genéticos também podem influenciar na composição química das plantas. Este último é mais drástico, uma vez que implicam no fato de que plantas podem ser indiferenciáveis sob o ponto de vista morfológico, mas apresentarem uma composição química completamente diferente em relação aos seus óleos essenciais.

Considerando que essas plantas podem ser utilizadas tanto para a produção de fitoterápicos quanto pela medicina popular, é imprescindível que esses materiais sejam bem caracterizados. Desse modo, a investigação química bem como a correta classificação desses quimiotipos é de grande importância para a atividade econômica ligada a esses produtos.

2.3 A família Verbenaceae e o gênero *Lippia*

2.3.1 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 1035 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* (Salimena-Pires, 1991; Bonzani et al., 1997; Salimena, 2000).

O gênero *Lippia* foi descrito por Linnaeu em 1753. Segundo Salimena (2000), esse gênero reúne cerca de 200 espécies distribuídas principalmente nos neotrópicos e subtrópicos, 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 têm sido motivo de controvérsias.

De acordo com características morfológicas, autores como Schauer (1847), Bentham & Hooker (1876) e Briquet (1897) consideraram os gêneros *Aloysia*, *Acantholippia* e *Phyla* como sinônimos ou subgêneros de *Lippia*. Outros autores como Troncoso (1974), Botta (1980) e Salimena (2000) consideraram-nos como gêneros distintos.

Espécies do gênero *Lippia* apresentam propriedades medicinais comprovadas, destacando-se entre elas, *Lippia alba*. Esta apresenta vários nomes populares: erva cidreira, falsa melissa, chá de tabuleiro, erva cidreira do campo, salva do Brasil, salva-limão e erva cidreira brava. Seus constituintes químicos conferem um amplo espectro de ação como sedativa, antiespasmódica, estomáquica, diurética, antirreumática, antiinflamatória, analgésica, antisséptica, miorelaxante, entre muitas outras (Bezerra, 1981; Krishore et al., 1983; Pio-Correa, 1984, Albuquerque, 1989; Di-Stasi et al., 1989; Dwivedi et al., 1990; Gomes, 1990; Kishore & Mishra, 1991; Correa, 1992; Costa, 1998; Vale et al., 1999; Rao et al., 2000; Viana et al., 2000).

Lippia alba é arbustiva podendo chegar a dois metros de altura. Floresce durante todo o ano e em função de suas inúmeras propriedades medicinais, recebe amplo destaque no gênero (Salimena, 2000). Em relação ao sistema reprodutivo, Sanders (2001) considera que espécies do gênero são alógamas, com dicogamia protândrica. São polinizadas por insetos. Algumas espécies são autocompatíveis e autógamas facultativas quando a alogamia falha.

2.3.2 Quimiotipos de *Lippia alba*

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

L. alba vem sendo intensamente estudada sob o ponto de vista fitoquímico devido a existência de variabilidade marcante na composição química dos seus óleos essenciais, o que está estritamente ligada à diversidade

de ações terapêuticas que lhes são atribuídas (Ricciardi et al., 2000). Essa variação permite, inclusive, classificá-la em diferentes quimiotipos, dentre eles: La1- citral; La2- carvona e La3- linalol. Em relação ao potencial biotecnológico dos três quimiotipos de *L. alba*, Tavares (2003) relata que o quimiotipo La1- citral apresenta forte atividade fungicida e nematocida. Vale et al. (1999), detectaram efeito ansiolítico e hipotérmico do óleo essencial desse quimiotipo em cobaias e Viana et al. (2000) observaram efeito analgésico e antidematogênico.

Segundo Tavares (2003), o quimiotipo La2- carvona possui ações nematocida, bacteriostática, bactericida e fungicida. Além disso, a carvona apresenta atividade alelopática, causando inibição do brotamento de batatas. O mesmo autor afirma que o linalol (principal constituinte do quimiotipo La3) é utilizado na indústria de perfumaria, apresenta ainda efeitos sedativos atuando sobre o sistema nervoso central, possui propriedades hipnóticas, hipotérmicas e anticonvulsivantes. Pode ainda 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 (Chiang et al., 2003 citado por Tavares, 2003).

Outros estudos envolvendo a propagação vegetativa desses três quimiotipos foram realizados por Biasi & Costa (2003). Eles verificaram que os quimiotipos diferem quanto à resposta de enraizamento, embora apresentem certa facilidade na formação de raízes.

Sob o ponto de vista morfológico observou-se que os quimiotipos apresentam diversidade especialmente no tamanho e na textura das folhas, e no tamanho e 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.

Moldenke (1961) citado por Santos-Mendes (2001) afirma que essa espécie é extremamente variável e polimórfica e segundo Vesque (1885) (citado por Santos-Mendes, 2001), a subfamília a que pertence esta espécie apresenta certa instabilidade na estrutura de órgãos habitualmente constantes. Esses autores afirmam que um outro aspecto que também poderia influenciar na plasticidade fenotípica da espécie é sua ampla distribuição no globo terrestre.

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 e altamente específicos para as espécies da família.

Segundo D'Andrea et al. (1995), variações qualitativas na composição química dos óleos essenciais se originam principalmente de uma variação genética e/ou de possíveis influências ecológicas.

As variações morfológicas e na composição química do óleo essencial têm sido observadas dependendo da origem geográfica do material, o que levou à hipótese de que tais variações poderiam ser influenciadas pelo ambiente ao qual a planta está submetida. No entanto, Tavares (2003) verificou que esses quimiotipos mantiveram suas diferenças químicas e morfológicas mesmo quando submetidos às mesmas condições ambientais.

Dentre as características morfológicas avaliadas por Tavares (2003), os quimiotipos apresentaram diferenças significativas em relação ao porte (1,6m; 1,8m e 1m para os quimiotipos La1, La2 e La3, respectivamente); 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); tamanho das folhas (o quimiotipo La3 apresentou maior tamanho, seguido pelos quimiotipos La1 e La2) e anatomia da lâmina

foliar (variações em relação ao comprimento e largura das células epidérmicas e organização do mesofilo). Além disso, nos testes de micropropagação, os quimiotipos responderam diferentemente a 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.

Esses resultados reforçam a idéia de que essas variações não são puramente resultado de influência ambiental, como os autores relatam. Na realidade, há provavelmente um componente genético que está determinando a diferença entre esses quimiotipos.

2.4 A citogenética e a sua importância

A citogenética é proveniente da união de duas ciências: a citologia (estudo da estrutura e a função celular) e a genética (estudo da hereditariedade). Assim, ela se preocupa com o estudo da organização, forma, número, função e movimento dos cromossomos durante o ciclo celular, o que está relacionado à transmissão da informação genética, recombinação e expressão gênica.

A análise cromossômica sempre foi um dos campos mais excitantes da Citologia e da Genética, tanto quando relacionada a estudos taxonômicos e evolutivos, quanto a estudos estruturais, no melhoramento genético, na caracterização de germoplasmas ou na análise clínica. Mesmo com a revolução provocada pela genética molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar todo o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético. Em nenhuma outra instância, o material genético é tão claramente observado (Guerra & Souza, 2002).

Todas as fases do ciclo celular são de grande utilidade para realizar tais estudos. Diversos autores têm estudado, por exemplo, a morfologia do núcleo interfásico uma vez que a cromatina desses núcleos em plantas exibe uma

estrutura variável (Fukui & Nakaiama, 1996) que depende de uma série de caracteres cromossômicos e nucleares, destacando-se como mais importantes a densidade do DNA nuclear, a natureza e a quantidade de heterocromatina (Guerra, 1987b).

Esses caracteres são relativamente constantes dentro de cada espécie, especialmente em núcleos de células de pontas de raiz. Desse modo, a estrutura nuclear também é constante e definitiva para cada espécie, sendo um caráter taxonômico importante. Além disso, segundo Bickmore & Chubb (2003) a localização dos cromossomos no núcleo interfásico não é aleatória.

Vários trabalhos têm sido realizados utilizando esse caráter para classificar núcleos interfásicos de diversas espécies em uma gama de famílias: Rutaceae (Guerra, 1987b), Zingiberaceae (Guerra, 1987a), Velloziaceae (Melo et al., 1997), Cyperaceae (Luceño et al., 1998), Theaceae (Yang et al., 2000) e Passifloraceae (Melo et al., 2001), entre outros.

Além de núcleos interfásicos, outras fases podem ser de grande utilidade, permitindo a contagem do número cromossômico e caracterização do cariótipo, identificação de rearranjos cromossômicos e estudos sobre a regularidade nos processos de divisão celular.

A citogenética também é uma ferramenta útil na criação de novas metodologias para o estudo dos cromossomos (Carvalho, 1995); na identificação de anomalias cromossômicas na meiose (mutações cromossômicas) (Caetano-Pereira, 1995 e Techio, 2002); em cruzamentos interespecíficos nos programas de melhoramento (Barbosa, 2000 e Abreu, 2002); estudos de variação somaclonal (Raimondi et al., 2001); macho-esterilidade (Nirmala & Kaul, 1993, 1994; He et al., 1997), indução de poliploidia (Abreu, 2002); estudos evolutivos e de divergência; estudos de citotaxonomia e de sistemática (Techio, 1998 e Melo et al., 2001); localização de genes específicos (Hibridização *in situ* Fluorescente) (Brandão, 2003) e identificação de genomas (Hibridização

Genômica *in situ*) (Christian et al., 2002; Heslop-Harrison et al., 1999; Heslop-Harrison, 2000).

Informações citogenéticas têm contribuído de forma importante como exame complementar ou mesmo na reformulação de hipóteses filogenéticas (Stebbins, 1971; Qumsieh & Baker, 1988; Singh, 1993).

Durante o processo evolutivo das espécies, os cariótipos se transformaram seguindo regras próprias, muitas das quais ainda desconhecidas, gerando uma imensa diversidade cromossômica em número, forma, tamanho, capacidade de pareamento meiótico, conteúdo de heterocromatina, etc (Guerra & Souza, 2002). Assim, a análise do cariótipo tem sido muito utilizada por diversos pesquisadores em estudos citotaxonômicos (Brandão, 2003; Luceño et al., 1998; Melo et al., 1997, 2001).

A meiose envolve etapas altamente coordenadas, harmoniosas e delicadamente balanceadas, sendo um mecanismo que exibe universalidade e singularidade (Nirmala & Kaul, 1993).

Por meio da recombinação e da permuta genética, a meiose é um processo extremamente importante para o sucesso evolutivo da reprodução sexuada em eucariotos. O entendimento do comportamento meiótico auxilia na identificação de diversos eventos, como os rearranjos cromossômicos, possibilitando realizar inferências a respeito da evolução cromossômica bem como, estudar a relação entre os genomas envolvidos.

O estudo da estabilidade meiótica, juntamente com a análise da viabilidade do grão de pólen, permite indicar se a planta é potencialmente fértil, fornecendo subsídios para usos futuros em programas de seleção, cruzamento e produção de sementes viáveis (Corazza-Nunes et al., 1993, 1995; Andrada et al., 1998; Coelho & Battistin, 1998; Bione et al., 2000; Techio, 2002).

2.4.1 Citogenética em *L. alba*

Para o gênero *Lippia*, já foram descritos os números 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 $x=5$. Sanders (2001) relata ainda que é comum a ocorrência de poliploidia e híbridos naturais entre espécies de diferentes gêneros da família Verbenaceae.

Em relação a *L. alba*, há relatos de um número cromossômico de $2n=30$ (Bose & Choudhy, 1960). Brandão (2003) verificou que esta espécie apresenta 11 pares metacêntricos e quatro submetacêntricos, com constrições secundárias nos braços longos dos pares 2 e 5. Nesse estudo, a autora verificou por meio de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) que esta apresenta dois sítios de rDNA 5S, sugerindo que essa é uma espécie diplóide.

No entanto, estudos envolvendo a citogenética comparativa de diferentes quimiotipos de *L. alba* são inexistentes.

A taxonomia dessa espécie é ainda problemática. Para alguns autores, *L. geminata* e *L.alba* são sinonímias e para outros são espécies distintas (Craveiro et al., 1987; Hegnauer, 1973; citados por Brandão, 2003). No entanto, Kumar & Dutt (1989) citados por Brandão (2003) estudaram as bases citogenéticas de *L. geminata* e *L. alba* e verificaram que a primeira apresenta $2n=32$ cromossomos.

Além disso, em seus estudos, Brandão (2003) indica que *L. alba* constitui um táxon distinto de *L. geminata*.

As diferentes interpretações existentes reforçam a necessidade de investigações citogenéticas que possam auxiliar na diferenciação desses quimiotipos.

2.5 Marcadores RAPD

Mais recentemente, técnicas de biologia molecular, particularmente os marcadores de DNA, têm fornecido importantes contribuições ao estudo da biodiversidade. Vários trabalhos têm utilizado estes marcadores para determinar a estrutura genética das populações, estimar a variabilidade genética e a partir dessas informações, elaborar estratégias de conservação (Nodari & Guerra, 2000; Colombo, 2000; Jones et al., 2001; Lee et al., 2002). Viccini et al. (2004) estudaram a diversidade genética de nove espécies do gênero *Lippia* por meio de marcadores RAPD, contribuindo para o entendimento da adaptação ao ambiente, conservação e taxonomia dessas espécies. Outros autores, como Vieira et al. (2001) têm estudado a correlação existente entre marcadores moleculares e a diversidade química de plantas medicinais.

O RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) é um dos métodos moleculares mais eficientes na produção de marcas polimórficas dentro de um curto período de tempo. Neste método, um primer curto (10 bases) de seqüência arbitrária é usado em uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar seqüências de DNA.

Esta técnica tem sido utilizada como uma ferramenta valiosa em várias áreas de pesquisa, para estudar variações genéticas inter e intra-específicas, padrões de expressão gênica e identificação de genes específicos (Kuddus & Kuddus, 2002). Além disso, fornecem dados sobre as relações de afinidade dentro e entre as amostras, auxiliando na obtenção de genótipos melhorados a partir de cruzamentos e da introgressão genética (Harvey & Fraleigh, 1995; Caraway et al., 2001). A análise RAPD tem contribuído também para a

identificação de variação somaclonal (Osipova et al., 2001; Soneji et al., 2002); avaliação de variação em plantas coletadas em diferentes regiões geográficas (Peterson & Peterson, 1999; Fisher et al., 2000; Sabatti et al., 2001; Kuddus & Kuddus, 2002; Li et al., 2002); identificação de padrões de variação genética *in situ* e *ex situ* (Etisham-Ul-Haq, 2001); identificação de variedades e aplicações forenses (Congiu, 2000); investigação de aspectos da biologia reprodutiva (Arnholdt-Schmitt, 2000); estudo de relações interespecíficas em espécies apomíticas (Bartish et al., 2001); análises filogenéticas (Tsuji & Ohnishi, 2001; Chen et al., 2001); construção de mapas genéticos de alta cobertura e identificação de genes de interesse econômico (Grattapaglia & Sederoff, 1994; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.5.1 Marcadores RAPD em *Lippia alba*

Trabalhos envolvendo o estudo da divergência genética por meio de marcadores RAPD foram realizados por Santos-Mendes (2001), onde foram caracterizadas oito formas de *L. alba* provenientes da coleção de plantas medicinais do Departamento de Horticultura da FCA/UNESP/Botucatu.

Segundo esse autor, formas referem-se à menor das categorias utilizadas nos trabalhos correntes de taxonomia, aplicando-se normalmente a variações verificadas em indivíduos de qualquer população, tais como a cor da corola, cor do fruto e as de resposta a variações do ambiente. Verificou-se neste trabalho que a partir de marcadores moleculares RAPD, foram geradas um total de 662 bandas, sendo que 318 (48%) mostraram-se polimórficas. A análise das coordenadas principais e de agrupamento refletiram os mesmos quatro grupos (A,B,C e D) obtidos quando a análise de coordenadas principais e de agrupamento foi realizada para os óleos essenciais das oito formas de *L.alba*. Além disso, os autores destacam que o estabelecimento taxonômico correto da espécie poderá ser mais preciso com a utilização desses marcadores.

É importante ressaltar que o presente estudo é o primeiro que utiliza marcadores RAPD para explorar a variação entre e dentro dos quimiotipos La1-citral, La2- linalol e La3- carvona de *L. alba*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 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 interior do estado de São Paulo foram fornecidos pelo Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Estes 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).

3.2 Citogenética

3.2.1 Análise mitótica

Para a obtenção de cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos, foram coletadas estacas dos três quimiotipos. Estas foram mantidas em sistema de hidroponia a 28°C até a emissão das raízes. Posteriormente, as raízes foram submetidas à pré-tratamentos com 8- hidroxiquinoleína (3mM) por 8 horas à 4°C. Em seguida, as raízes foram fixadas em metanol: ácido acético (3:1) por no mínimo 24 horas.

3.2.1.1 Preparo das lâminas

As raízes foram submetidas à maceração enzimática com o complexo enzimático Pectinex (NOVO NORDISK Ferment™ Bioindustrial do Brasil) na concentração de 1:10 (tampão citrato de sódio 2mM, pH 3,5) durante 3 horas a 34°C. As lâminas foram preparadas por meio das técnicas de secagem ao ar com maceração enzimática (Carvalho, 1995) para os três quimiotipos e esmagamento para o quimiotipo La3- linalol. Em seguida, foram coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato 0,1M pH 6,8 durante 3 minutos.

As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz Olympus Bx 60. As metáfases mitóticas e os núcleos interfásicos foram capturados por uma câmera digital acoplada ao microscópio e analisadas pelo programa Image Pro-Plus versão 4.5 da Media Cybernetics.

3.2.2 Cariótipo

Foram contados os números cromossômicos em 50 metáfases para os quimiotipos La1- citral e La2- carvona e 61 metáfases para o quimiotipo La3- linalol. Foram avaliadas cinco metáfases dos quimiotipos La1- citral e La2- carvona para a montagem dos kariogramas e obtenção das medidas de comprimento total dos cromossomos ($CT = \text{comprimento do braço curto} + \text{comprimento do braço longo}$) e comprimento dos braços cromossômicos. Para confecção dos ideogramas foram utilizados os parâmetros de tamanho relativo ($TR = \frac{\text{tamanho total do cromossomo individual} \times 100}{\text{tamanho total do genoma}}$), índice centromérico ($IC = \frac{\text{comprimento do braço curto} \times 100}{\text{comprimento do braço longo} + \text{comprimento do braço curto}}$) e relação de braços ($RB = \frac{\text{comprimento do braço longo}}{\text{comprimento do braço curto}}$). Os cromossomos foram classificados segundo Guerra (1988).

3.2.3 Núcleos interfásicos

Foram analisados 50 núcleos interfásicos para cada quimiotipo que foram classificados segundo a chave proposta por Guerra (1987b) (Quadro 1).

<p>1. Arreticulado</p> <ul style="list-style-type: none">- Reticulo cromatínico invisível ou fracamente corado.- Cromocentros bem delineados.- Eucromatina condensada praticamente ausente. <p>1.1 A. simples- Cromocentros com forma regular;</p> <p>1.2 A. composto- Cromocentros com forma irregular</p> <p>2. Semi-Reticulado</p> <ul style="list-style-type: none">- Cromocentros simples ou ocasionalmente fundidos.- Quantidade variável de eucromatina condensada. <p>2.1 S.M. Reticulo fracamente corado- Cromocentros com forma regular, raramente mostrando prolongações de eucromatina condensada.</p> <p>2.2 S.M. Reticulo cromatínico medianamente corado- cromocentros com densidade muito variável e com forma geralmente irregular.</p> <p>2.3 S.M. Reticulo cromatínico profundamente corado</p> <p>2.3.1 Tamanho- médio, freqüentemente compostos e com cromocentros de forma irregular.</p> <p>2.3.2 Composto, grande e com cromocentros com forma irregular- reticulo cromatínico levemente polarizado.</p> <p>2.3.3 Simples, cromocentros pequenos e numerosos. Aparência geralmente granular e cromatina homogeneamente distribuída.</p> <p>3. Reticulado</p> <p>Reticulo cromatínico intensamente corado, cromocentros pequenos de difícil visualização. Cromatina polarizada.</p>
--

QUADRO 1. Chave para classificação de núcleos interfásicos (Guerra, 1987b).

3.2.4 Análise meiótica

Para a obtenção de células meióticas, foram coletados botões florais antes da antese. Estes foram imediatamente fixados em metanol: ácido acético (3:1).

3.2.4.1 Preparo das lâminas

Tendo em vista o tamanho das flores (1,0 a 1,5mm de comprimento e largura) foi utilizada a metodologia de secagem ao ar com maceração enzimática adaptada para flores de tamanho reduzido descrita por Praça et al. (2000) (Figura 1). Para o preparo da suspensão celular, foram utilizadas aproximadamente 40 anteras provenientes de 12 botões florais (1).

- As anteras foram transferidas para um microtubo de 0,3 mL adaptado em sua extremidade com uma tela de poliéster (60µm) (2).

- O material foi lavado em água destilada e posteriormente imerso em solução enzimática concentrada Pectinex NOVO NORDISK™ por 20 minutos a 34°C (3).

- Após a maceração enzimática, as anteras foram novamente lavadas e o tubo adaptado colocado em outro microtubo contendo água destilada.

- As anteras foram fragmentadas mecanicamente com o auxílio de um estilete adaptado para a retirada das células- mãe do grão de pólen (PMCs) (4).

- A suspensão celular resultante foi centrifugada a 2000 rpm por três vezes, realizando trocas sucessivas de água destilada. Após a última centrifugação, a água foi retirada e completou-se o volume com fixador metanol: ácido acético (3:1) gelado (5).

- A suspensão celular foi ressuspensa e utilizada para a preparação de cada lâmina (cerca de 5 gotas/lâmina) (6).

As lâminas foram secadas ao ar e em placa aquecedora, submersas em ácido acético 45% gelado durante 10 segundos e coradas em solução de Giemsa 5% em tampão fosfato 0,1M pH 6,8 por 1 minuto de 30 segundos. Foram analisadas 291, 399 e 276 células para os quimiotipos La1, La2 e La3 respectivamente.

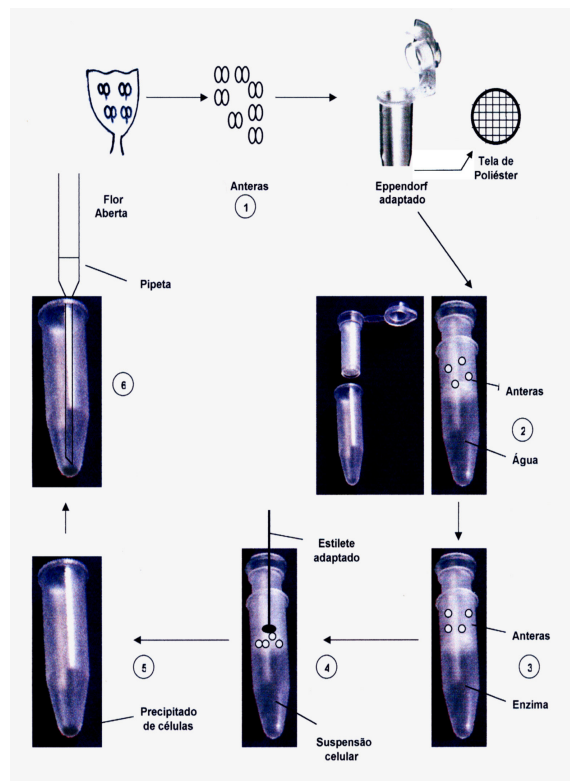


FIGURA 1. Técnica de secagem ao ar com maceração enzimática adaptada para flores de tamanho reduzido (Praça et al. 2000).

3.2.5 Viabilidade do grão de pólen

Botões florais foram coletados de quatro plantas/ quimiotipo e fixados em etanol: ácido acético (3:1). Anteras foram seccionadas sobre lâmina liberando os grãos de pólen. Em seguida, estes foram corados com Corante de Alexander (Alexander, 1980) e cobertos com lamínula. Estas foram seladas e armazenadas em câmara úmida. Após 12 horas, as lâminas foram analisadas em microscópio Leica DMS. Consideraram-se viáveis os grãos de pólen corados de roxo e inviáveis os corados de verde.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Lavras, em delineamento inteiramente casualizado com 40 repetições para La1-citral e La2-carvona, 20 repetições para La3-linalol para a avaliação da viabilidade dos grãos de pólen. As análises de variância foram realizadas no programa SAS (Statistical Analysis System).

3.2.5.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental seguiu um modelo hierárquico:

$$Y_{iwbkj} = m + t_i + p_w + p_{w(i)} + l_{k(wi)} + c_{j(iwk)} + e_{iwbkj}$$

m = média

t_i = efeito de tratamentos i onde $n = 1, 2$ e 3

p_w = efeito de plantas w onde $f = 1, 2, 3$ e 4

$p_{w(i)}$ = efeito de plantas w dentro de cada tratamento i

$l_{k(wi)}$ = efeito de lâminas k dentro de plantas w dentro de cada tratamento i

$c_{j(iwk)}$ = efeito de campos j dentro de lâminas k dentro de plantas w dentro de cada tratamento i

e_{iwbkj} = erro experimental

3.2.6 Produção de sementes

Foi avaliada em campo se os quimiotipos produziam sementes.

3.3 Marcadores RAPD

3.3.1 Extração do DNA genômico e reações de RAPD

Amostras foliares foram coletadas de três plantas por quimiotipo. Plantas do quimiotipo La-1 citral foram identificadas como La1-1, La1-2 e La1-3, de La2- carvona, como La2-1, La2-2 e La2-3 e de La3- linalol, como La3-1, La3-2 e La3-3.

Estas foram colocadas em nitrogênio líquido (-70°C). O DNA genômico foi extraído dos tecidos foliares por meio da técnica de CTAB (Grattapaglia & Sederoff, 1994). O DNA foi quantificado e sua concentração foi avaliada em um espectrofotômetro (GeneQuant Pro RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech Inc). A quantificação e a concentração do DNA também foram checadas com padrões de DNA lambda em gel de agarose.

A análise dos polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (RAPD) foram realizadas segundo Williams et al. (1990) com pequenas modificações. As reações foram realizadas em um volume de 25µL contendo 10mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50mM de KCl; 2mM de MgCl₂ ; 0,1% de Triton X-100; 0,4µM de primers ; 0,2 Mm de cada DNTps; 1 unidade de Taq polimerase e 30 ng de DNA genômico.

Foram testados 47 primers: OPA-01, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-11, OPA-12, OPA-13, OPA-14, OPA-15, OPA-18, OPA-19, OPA-20, OPB-01, OPB-02, OPB-03, OPB-05, OPB-07, OPB-11, OPB-12, OPC-02, OPC-05, OPC-08, OPC-11, OPD-07, OPD-11, OPE-12, OPE-20, OPF-04, OPF-09, OPF-10, OPF-13, OPF-14, OPG-02, OPG-03, OPG-10, OPG-11, OPG-12, OPG-13, OPG-14, OPG-15, OPG-16 e OPG-20.

As reações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer Inc. O programa de ciclos incluiu 1 ciclo de 2 minutos a 94°C, seguido por 45 ciclos de

1 minuto a 94°C, 1min a 36°C e 1,5 min a 72°C, seguido pela incubação final de 5 min a 72°C.

Os produtos da amplificação foram analisados em eletroforese em gel de acrilamida 5% em tampão TBE1X, corado com nitrato de prata 15%. Foram selecionados os primers baseados na presença de polimorfismos capazes de discriminar os quimiotipos analisados, bem como os produtos das ampliações que tiveram reprodutibilidade.

3.3.2 Score das bandas e análise dos dados

Somente as bandas mais claras e fortes foram utilizadas para a análise. O scoring foi acompanhado em Software RFLP (Scanalytics Co) e os dados foram exportados para uma matriz binária relacionada com a presença (1) ou ausência (0) de uma banda para cada marca de um único indivíduo.

O coeficiente médio de dissimilaridade dentro de cada quimiotipo e entre os quimiotipos foram calculados utilizando o complemento do coeficiente de Sorensen ou Nei & Li (1979) por meio do programa estatístico GENES VERSÃO 2004 2.1, expresso por:

$$D_R = 1 - (2n_{yz} / (n_y + n_z + 2n_{yz}))$$

Em que D_R representa a distância entre os indivíduos, n_{yz} representa o número de bandas presentes em ambos os indivíduos, n_y é o número de bandas gerado somente pelo indivíduo y e n_z é o número de bandas gerado somente pelo indivíduo z.

Este coeficiente é apropriado para dados RAPD porque é encontrado neste tipo de marcador a presença ou a ausência de banda, uma vez que se trata de um marcador dominante. Para se estimar as dissimilaridades entre os quimiotipos e construir um dendrograma, foi utilizado o procedimento UPGMA (Software JMP, version 3.1.6.2; SAS Institute).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Citogenética

4.1.1 Núcleos interfásicos

Segundo Guerra (1987b), os núcleos interfásicos podem ser classificados em três tipos fundamentais: arreticulado, semi-reticulado e reticulado.

De acordo com a chave de classificação proposta por esse mesmo autor, os núcleos interfásicos dos quimiotipos La1- citral e La2- carvona são do tipo arreticulado composto (Figuras 2a e 2b, respectivamente), apresentando um retículo cromatínico em uma camada muito fina e fracamente corada, cromocentros bem delineados e com tamanhos irregulares e eucromatina condensada praticamente ausente.

O quimiotipo La3- linalol apresentou uma classificação diferente, sendo do tipo semi-reticulado, com retículo cromatínico medianamente corado (Figura 2c), possuindo cromocentros ocasionalmente fundidos e quantidade variável de eucromatina condensada. A eucromatina condensada é caracterizada por apresentar parte considerável da cromatina com um grau intermediário de condensação entre a heterocromatina e a eucromatina dispersa (Guerra, 1987a).

Como a intérfase constitui uma fase metabólica, onde ocorre a síntese de DNA, RNA e outras substâncias preparatórias para a divisão nuclear seqüencial (Fukui & Nakaiama 1996), podem ser detectadas pequenas variações em relação à distribuição da cromatina e homogeneidade da condensação entre núcleos de diferentes tecidos em um mesmo indivíduo. Entretanto, segundo Guerra (1987a), entre indivíduos da mesma espécie não é observada nenhuma variação a ponto de ocorrerem diferentes classificações. Contudo, alguns gêneros apresentam uma evidente diversificação interespecífica em relação à estrutura de seus núcleos interfásicos. Guerra (1984) relata que a variação interespecífica é mais

comumente encontrada em gêneros que apresentam grande número de espécies, ampla distribuição geográfica e, freqüentemente, diferenças morfológicas acentuadas, como ocorre com espécies do gênero *Lippia*.

Segundo Guerra (1984), fatores como o tamanho e a largura cromossômica, a quantidade de DNA nuclear, a quantidade e distribuição da heterocromatina, a densidade nuclear, o conteúdo de histonas e de DNA repetitivo e o padrão de distribuição de seqüências repetitivas são alguns dos parâmetros que interferem na estrutura do núcleo. Esse autor enfatiza que espécies com núcleos arreticulados apresentam cromossomos profásicos com uma nítida diferenciação entre a porção eucromática e a heterocromática, o que foi visualizado nos núcleos profásicos dos quimiotipos La1-citral e La2-carvona (Figuras 3a e 3b), enquanto que aquelas com núcleos semi-reticulados ou reticulados apresentam diferentes padrões de condensação profásica, com níveis intermediários de condensação da eucromatina, o que foi detectado nos núcleos profásicos do quimiotipo La3- linalol (Figura 3c).

Como relatado anteriormente, a classificação dos núcleos interfásicos constitui um caráter taxonômico importante, pois dentro da espécie o núcleo interfásico é constante, não sendo praticamente afetado pelos polimorfismos cromossômicos (Guerra, 1984).

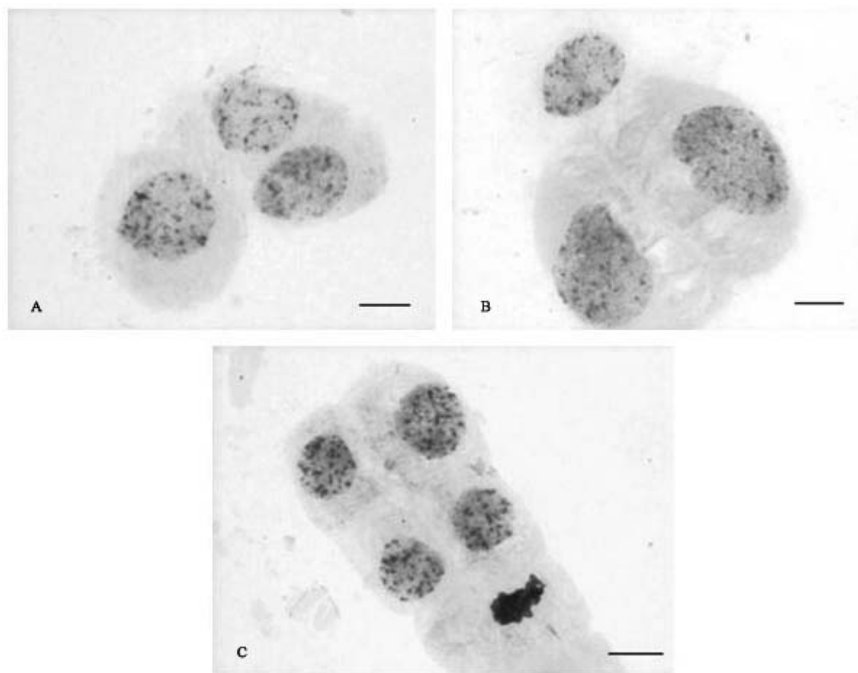


FIGURA 2. Núcleos interfásicos dos três quimiotipos de *L. alba*. A e B: núcleos arreticulados de La1- citral e La2-carvona, respectivamente. C: núcleos semi-reticulados de La3- linalol. Barra= 10 μ m. Lavras, 2004.

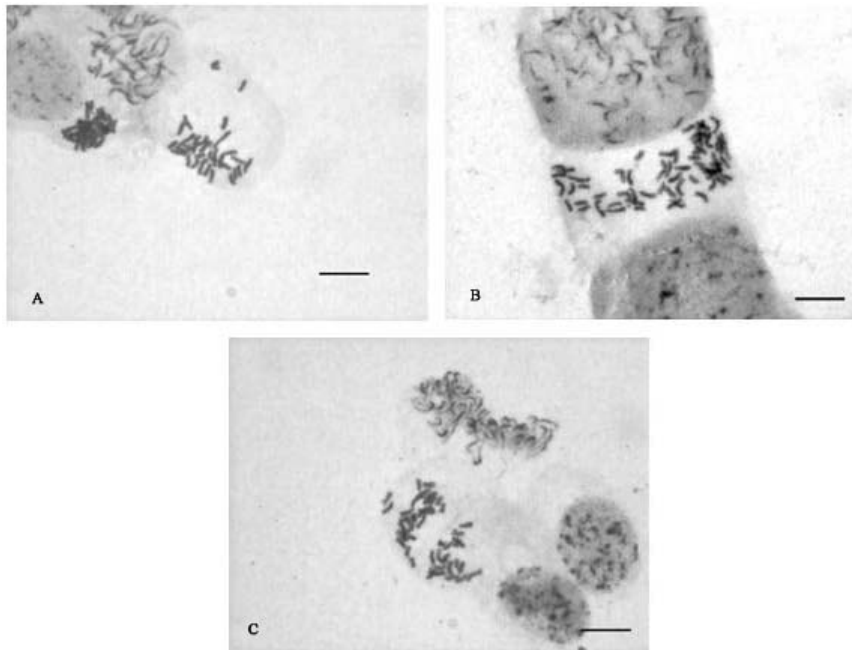


FIGURA 3. Núcleos profásicos dos três quimiotipos de *L. alba*. A e B: cromossomos profásicos de La1- citral e La2- carvona, respectivamente, que apresentam núcleos arreticulados e C: cromossomos profásicos de La3- linalol, que apresenta núcleos semi-reticulados. Compare os núcleos das figuras A e B com o núcleo da figura C. Barra= 10 μ m. Lavras, 2004.

4.1.2 Cromossomos metafásicos

O tratamento com o antimitótico 8- hidroxiquinoleína (3mM, 8hrs a 4°C) possibilitou a obtenção de grande número de metáfases (em média, 20 metáfases/lâmina). A maioria delas apresentou cromossomos com boa morfologia e que permitiu a contagem do número cromossômico dos três acessos.

Os quimiotipos analisados apresentam diferentes números cromossômicos. La1- citral apresenta $2n=30$ cromossomos (Figuras 4A e 4B), o que corresponde ao número já relatado para *L. alba* (Bose & Choudhry, 1960), sendo 6 pares metacêntricos (1 ao 6) e 9 pares submetacêntricos (7 ao 15). Os pares 5 e 11 apresentam uma constrição secundária no braço curto (Tabela 1, Figuras 5, 6A e 6B). O comprimento total do lote haplóide (CTLH) é de 43,02 μ m. Os pares cromossômicos apresentam tamanhos que variam de 2,04 μ m a 4,27 μ m.

Brandão (2003) relatou a presença de 11 pares metacêntricos e 4 pares submetacêntricos, dois pares metacêntricos com constrição secundária e um CTLH de 54,67 μ m para *L. alba* (La-1). Como os dois materiais são oriundos de diferentes populações, é possível que rearranjos tenham ocorrido, originando esse polimorfismo cromossômico.

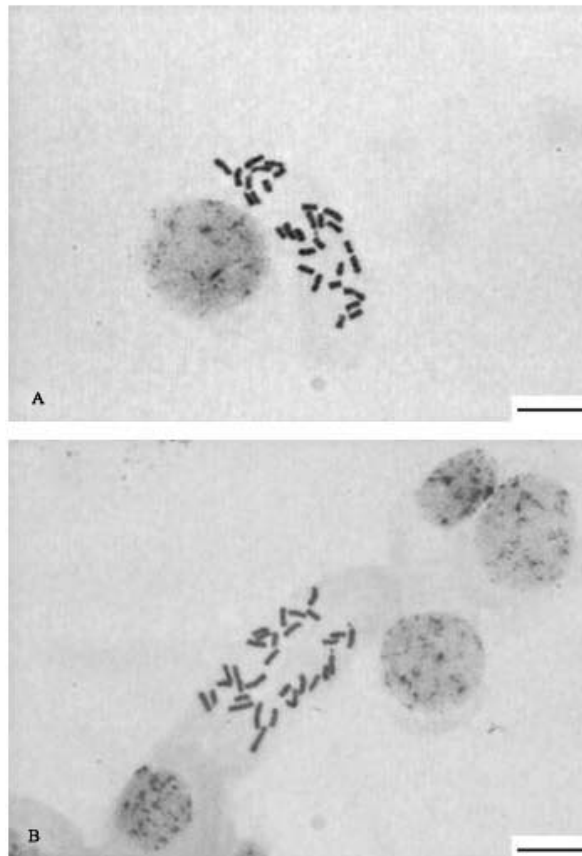


FIGURA 4. A e B. Metáfases mitóticas do quimiotipo La1- citral, com $2n=30$ cromossomos. Barra= $10\mu\text{m}$. Lavras, 2004.

TABELA 1. Dados morfométricos dos cromossomos de La1- citral (2n=30). N=5. Lavras, 2004.

Par	BC	BL	CT	TR%	RB	IC	CC
1	1,92	2,35	4,27	9,93	1,22	44,96	MT
2	1,90	2,17	4,07	9,46	1,14	46,60	MT
3	1,53	1,74	3,26	7,58	1,13	46,77	MT
4	1,29	1,61	2,90	6,74	1,24	44,40	MT
5	1,2	1,66	2,86	6,65	1,38	41,95	MT
6	1,11	1,30	2,41	5,59	1,17	46,15	MT
7	1,01	2,02	3,03	7,04	2	33,30	SM
8	0,93	1,46	2,39	5,56	1,56	38,90	SM
9	0,91	2,02	2,93	6,81	2,21	31,05	SM
10	0,91	1,94	2,85	6,62	2,13	31,92	SM
11	0,91	1,84	2,75	6,39	2,02	33,00	SM
12	0,91	1,66	2,57	5,97	1,82	35,40	SM
13	0,83	1,38	2,21	4,93	1,66	37,60	SM
14	0,83	1,65	2,48	5,76	1,98	33,40	SM
15	0,75	1,30	2,04	4,75	1,73	36,59	SM
CTLH			43,02				

BC= Comprimento do Braço Curto (μm); BL= Comprimento do Braço Longo (μm); CT= Comprimento Total do Cromossomo (μm); TR= Tamanho Relativo; RB= Relação de Braços; IC= Índice Centromérico; CC= Classificação Centromérica; MT= Metacêntrico; SM= Submetacêntrico; CTLH= Comprimento Total do Lote Haplóide (μm) N= Número de metáfases medidas.

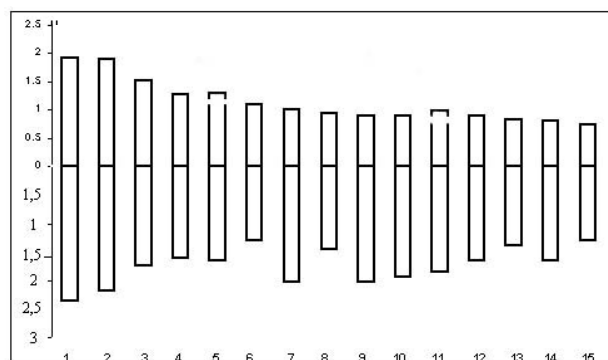


FIGURA 5. Ideograma de L1- citral (2n=30) baseado dos dados morfométricos da Tabela 1. Os pares 5 e 11 apresentam constrições secundárias. Lavras, 2004 .

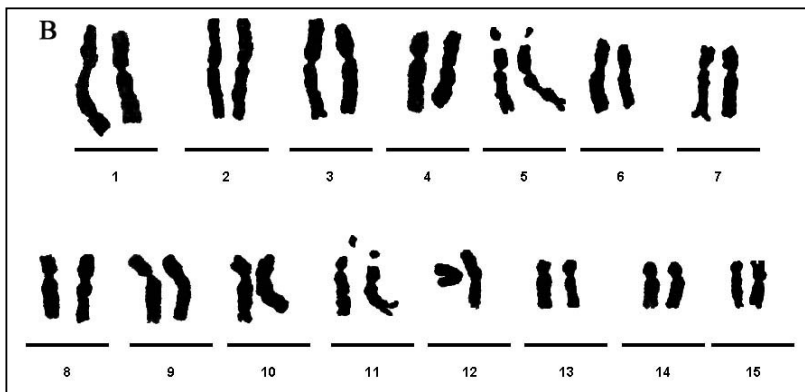
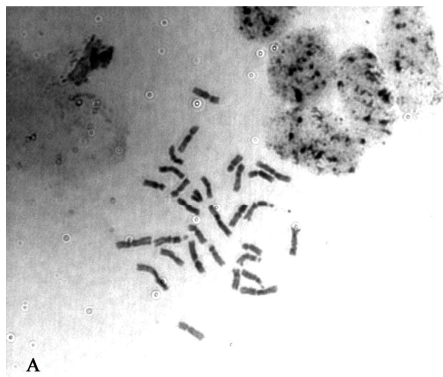


FIGURA 6. Metáfase mitótica (A) e Cariograma (B) de L1- citral. Barra= 10µm. Lavras, 2004.

O quimiotipo La2- carvona apresenta $2n=60$ cromossomos (Figuras 7A e 7B), sendo 15 pares metacêntricos (1, 3, 4, 6-14, 23-25); 14 pares submetacêntricos (2, 5, 15-22, 27-29) e 1 par acrocêntrico (30). O par 6 apresentou uma constrição secundária no braço curto (Tabela 2, Figuras 8, 9A e 9B). O comprimento total do genoma foi de $84,67\mu\text{m}$. Os pares cromossômicos apresentaram tamanhos que variaram de $1,48\mu\text{m}$ a $4,81\mu\text{m}$.

La2- carvona apresentou comprimento total do lote haplóide de $84,67\mu\text{m}$, praticamente o dobro do observado para La1- citral ($43,02\mu\text{m}$). Considerando a similaridade dos núcleos interfásicos e a semelhança morfológica dos cromossomos, este resultado indica que La2- carvona pode ser um autopoliplóide de La1- citral.

Entretanto, esperava-se que este apresentasse 12 pares de cromossomos metacêntricos, 18 submetacêntricos e quatro pares de cromossomos com constrição secundária, o que não foi observado para esse quimiotipo.

Diversos autores têm relatado a ocorrência de variações cromossômicas intra- ou interespecíficas. Por exemplo, Singh & Sharma (1981) detectaram variações cariotípicas entre diferentes populações de *Ocimum sanctum* (alfavaca). Moretti et al. (1991) observaram variação cromossômica intraespecífica em *Zamia* (Zamiaceae, Cycadales) e Martínez et al. (2000) relataram a ocorrência de variações gênicas e citológicas entre 9 populações de *Echeandia nana* (Anthericaceae).

Segundo Guerra (1988), variações cariotípicas podem ser originadas devido a variações numéricas (euploidias e aneuploidias) e estruturais (deleções, duplicações, inversões, translocações, fissões e fusões cêntricas). Esse mesmo autor enfatiza que em condições climáticas apropriadas o polimorfismo cromossômico é mais intenso que em condições desfavoráveis para algumas espécies.

Este polimorfismo é atribuído ao fato de que sob condições favoráveis, a espécie pode explorar diferentes microhabitats, ou seja, quanto maior a diversidade ambiental explorada, maior o polimorfismo cromossômico. Uma das características das espécies do gênero *Lippia* é que estas são colonizadoras bem sucedidas de ambientes hostis como cerrados e campos.

Desse modo, as diferenças cariotípicas observadas entre La1- citral e La2- carvona podem estar relacionadas à ocorrência de rearranjos cromossômicos. Pode-se, portanto, sugerir algumas possibilidades de rearranjos que podem ter ocorrido (Figura 10).

La1- citral pode ter passado por uma duplicação cromossômica, originando indivíduos com $2n=60$ cromossomos, sendo 12 pares metacêntricos e 18 submetacêntricos (Figura 10). Em seguida, essas plantas podem ter passado por mudanças cariotípicas e originado La2- carvona.

Como La2- carvona apresenta um maior número de cromossomos metacêntricos do que o esperado (15 ao invés de 12). Podem ter ocorrido mecanismos que levaram ao aumento desse número. Uma possibilidade para explicar o aumento no número de metacêntricos seria a ocorrência de quebras no braço longo levando a inversões paracêntricas (Figura 10A).

Para explicar a origem do cromossomo acrocêntrico, uma possibilidade seria que um outro par de cromossomos submetacêntricos tenha sofrido quebras no braço curto levando a inversões paracêntricas (Figura 10B).

La-1- citral apresenta dois pares de cromossomos com constrição secundária, enquanto que La-2 carvona apresenta um par. Isso pode ter ocorrido devido à atividade e estrutura das regiões organizadoras do nucléolo (NORs). Gupta & Reddy (1991) destacam que a atividade das NORs depende dos genomas participantes e dos genes regulatórios que controlam a estrutura e a atividade dessas regiões.

É importante ressaltar que esses processos são altamente dinâmicos e complexos e que várias outras possibilidades de rearranjos podem ter ocorrido.

Como o polimorfismo cromossômico pode ter pelo menos três efeitos importantes: alterar o conjunto gênico em expressão no organismo; alterar a frequência de recombinação genética ou até mesmo, reduzir ou impedir o fluxo gênico (Guerra, 1988), tais variações cromossômicas são muito importantes para a espécie, apresentando um significado evolutivo.

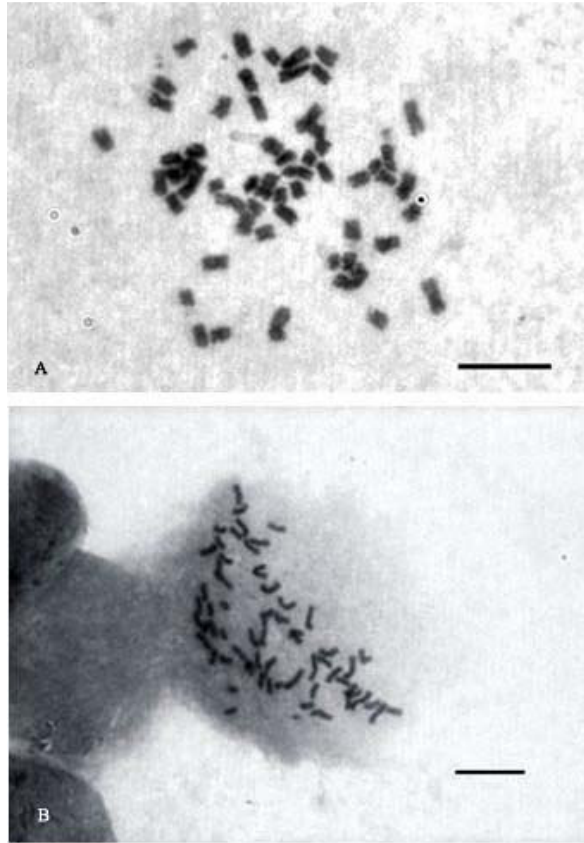


FIGURA 7. A e B. Metáfases mitóticas do quimiotipo La2- carvona, com $2n=60$ cromossomos. Barra= $10\mu\text{m}$. Lavras, 2004.

TABELA 2. Dados morfométricos dos cromossomos de La2-carvona (2n=60).
N=5. Lavras, 2004.

Par	BC	BL	CT	TR%	RB	IC	CC
1	2,04	2,04	4,08	4,81	1	50	MT
2	1,85	2,96	4,81	5,68	1,6	38,46	SM
3	1,67	2,04	3,71	4,38	1,22	45	MT
4	1,56	1,85	3,41	4,02	1,18	45,74	MT
5	1,48	2,41	3,89	4,59	1,62	38	SM
6	1,37	1,85	3,22	3,8	1,35	42,5	MT
7	1,30	1,84	3,14	3,7	1,41	41,4	MT
8	1,30	1,84	3,14	3,7	1,41	41,4	MT
9	1,30	1,67	2,97	3,5	1,28	43,77	MT
10	1,30	1,48	2,78	3,28	1,13	46,76	MT
11	1,30	1,48	2,78	3,28	1,13	46,76	MT
12	1,30	1,48	2,78	3,28	1,13	46,76	MT
13	1,30	1,30	2,6	3,07	1	50	MT
14	1,30	1,30	2,6	3,07	1	50	MT
15	1,11	2,04	3,15	3,72	1,83	35,23	SM
16	1,11	2,04	3,15	3,72	1,83	35,23	SM
17	0,93	2,04	2,97	3,5	2,19	31,31	SM
18	0,93	2,04	2,97	3,5	2,19	31,31	SM
19	0,93	1,67	2,6	3,07	2,11	35,7	SM
20	0,93	1,67	2,6	3,07	2,11	35,7	SM
21	0,93	1,67	2,6	3,07	2,11	35,7	SM
22	0,93	1,48	2,41	2,84	1,59	38,58	SM
23	0,93	1,11	2,04	2,42	1,19	45,58	MT
24	0,93	1,11	2,04	2,42	1,19	45,58	MT
25	0,93	1,11	2,04	2,42	1,19	45,58	MT
26	0,74	1,85	2,59	3,05	2,5	28,57	SM
27	0,74	1,48	2,22	2,62	2	33,33	SM
28	0,74	1,30	2,04	2,4	1,75	36,27	SM
29	0,56	1,30	1,86	2,19	2,32	30,1	SM
30	0,37	1,11	1,48	1,74	3	25	AC
CTLH			84,67				

BC= Comprimento do Braço Curto (μm); BL= Comprimento do Braço Longo (μm); CT= Comprimento Total do Cromossomo (μm); TR= Tamanho Relativo; RB= Relação de Braços; IC= Índice Centromérico; CC= Classificação Centromérica; MT= Metacêntrico; SM= Submetacêntrico; AC= Acrocêntrico; CTLH= Comprimento Total do Lote Haplóide (μm); N= Número de metáfases medidas.

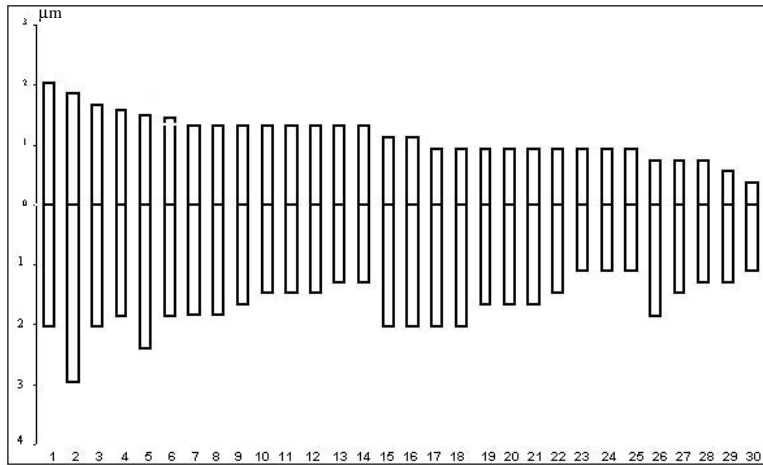


FIGURA 8. Ideograma de L2- carvona ($2n=60$) baseado dos dados morfométricos da Tabela 2. O par 6 apresenta constricção secundária. Lavras, 2004 .

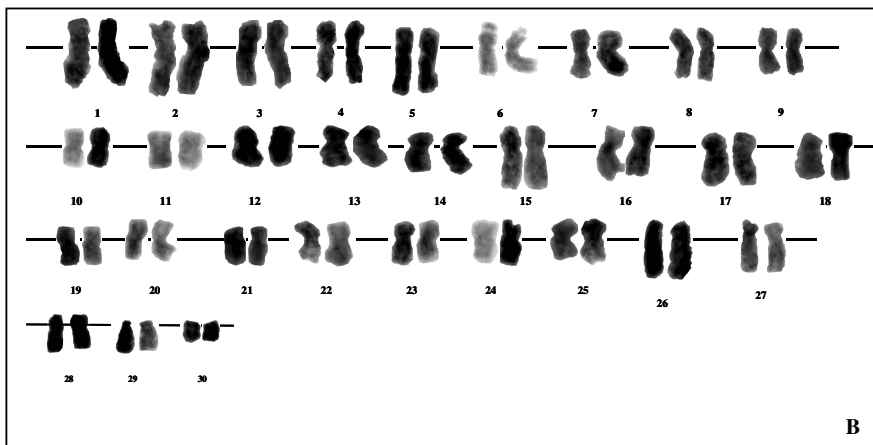


FIGURA 9. Metáfase mitótica (A) e Cariograma (B) de La2- carvona. Barra= 10µm. Lavras, 2004.

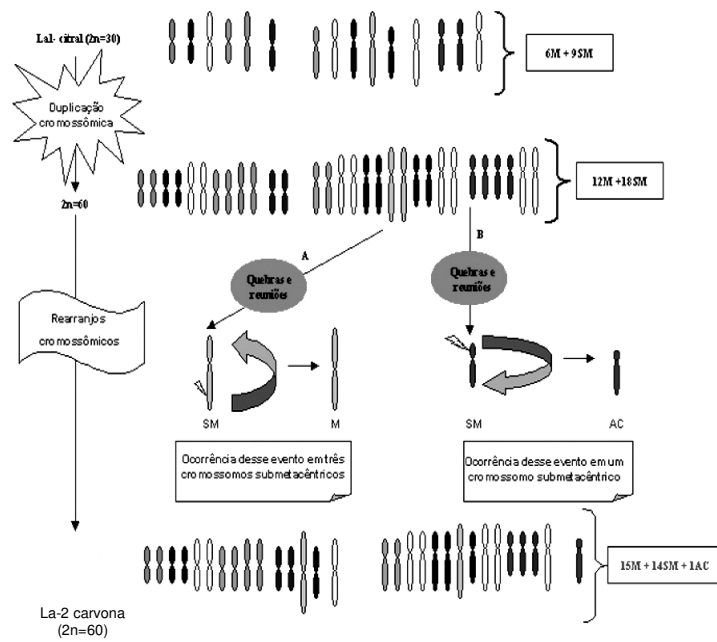


FIGURA 10. Possibilidades de rearranjos cromossômicos que originaram polimorfismos cromossômicos entre os quimiotipos La1- citral e La2- carvona. M= metacêntricos, SM= submetacêntricos e AC= acrocêntrico. Lavras, 2004.

O quimiotipo La3- linalol apresentou-se mixoplóide, com números cromossômicos variando de $2n=12$ a 60. Em algumas células foi observado um pequeno cromossomo com características de acessório, ou cromossomo B (Figuras 11A- 11I).

Inicialmente, as lâminas desse quimiotipo foram preparadas por meio da técnica de secagem ao ar. Para se verificar a possibilidade de estarem ocorrendo perdas cromossômicas devido à metodologia, foi empregada também a técnica de esmagamento. Verificou-se a ocorrência de variação no número cromossômico em ambas as metodologias. Na Figura 12 estão representados os números cromossômicos encontrados em lâminas preparadas por secagem ao ar. Dentre os números cromossômicos observados no quimiotipo La3- linalol, aqueles em torno de 40 foram os mais freqüentes.

É importante salientar que os números encontrados em La2- carvona e La3- linalol foram relatados pela primeira vez.

Segundo Goswani & Khandelwal (1980), a mixoploidia é um fenômeno que pode ocorrer em híbridos naturais nos quais os genomas envolvidos apresentam ciclos celulares assíncronicos, resultando em uma eliminação cromossômica. Este fato pode ser uma resposta adaptativa de uma espécie a mudanças ecológicas e ambientais ou ainda, ocorrer devido à mutação. Pagliarini (2002) também relata que a mixoploidia às vezes é relacionada à ocorrência de poliploidia, hibridação, substâncias químicas e, algumas vezes, ela é geneticamente controlada.

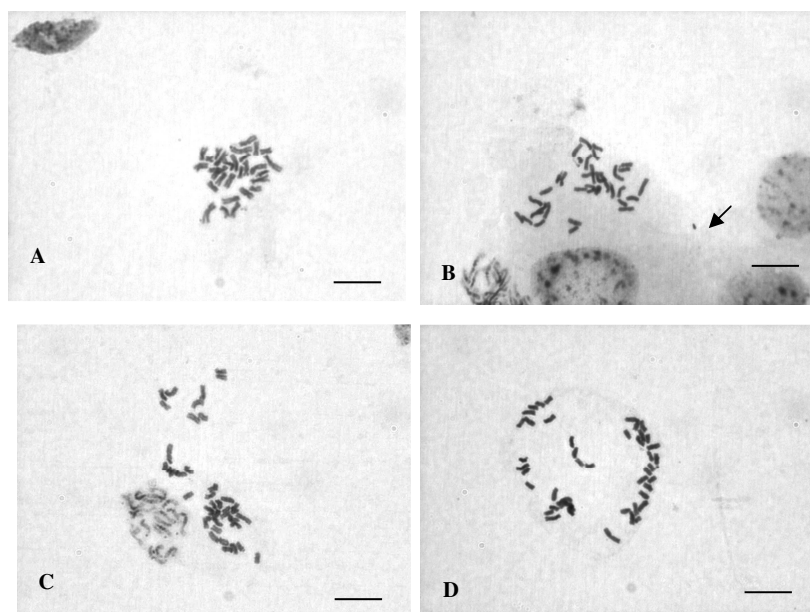


FIGURA 11. Metáfases mitóticas do quimiotipo La3- linalol, apresentando mixoploidia. (A) $2n= 29$; (B) $2n= 36+1B$; (C) apresentando célula metafásica com $2n= 38$ (à direita) e prometáfase com $2n= 21$ cromossomos (à esquerda); (D) $2n= 40$. Barra= $10\mu\text{m}$. Seta indica o cromossomo B. Lavras, 2004. (“...continua...”).

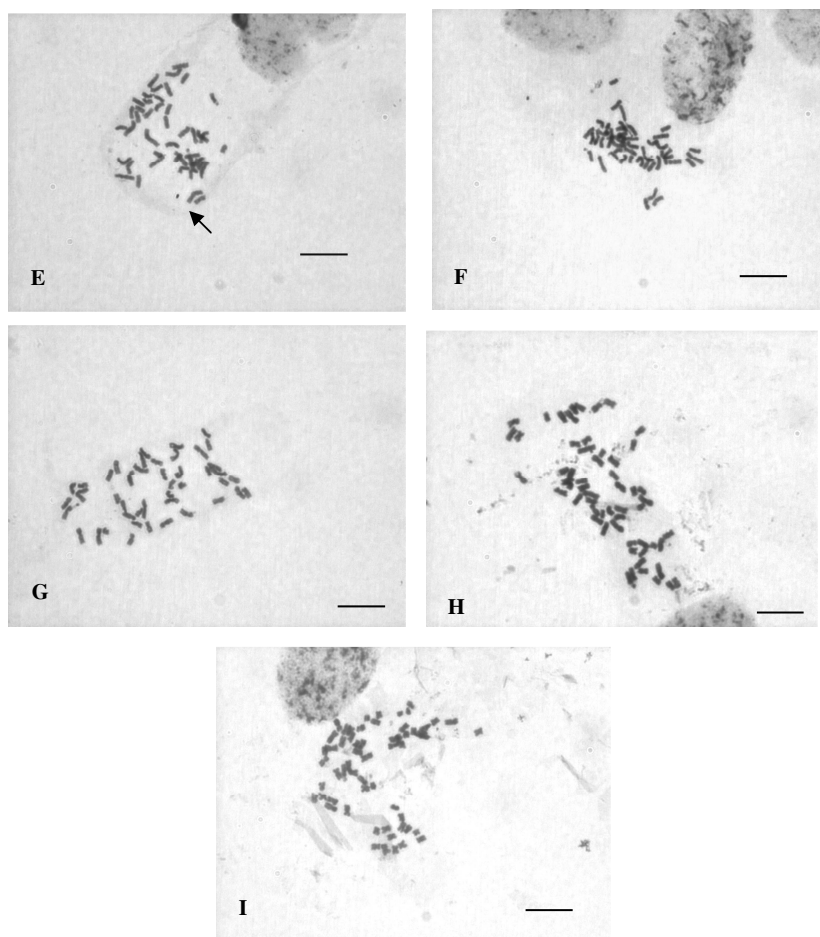


FIGURA 11, "Cont". Metáfases mitóticas do quimiotipo La3- linalol, apresentando mixoploidia. (E e F) $2n = 44 + 1B$; (G) $2n = 45$; (H e I) $2n = 58$ cromossomos. Seta indica o cromossomo B. Barra = $10\mu\text{m}$. Lavras, 2004.

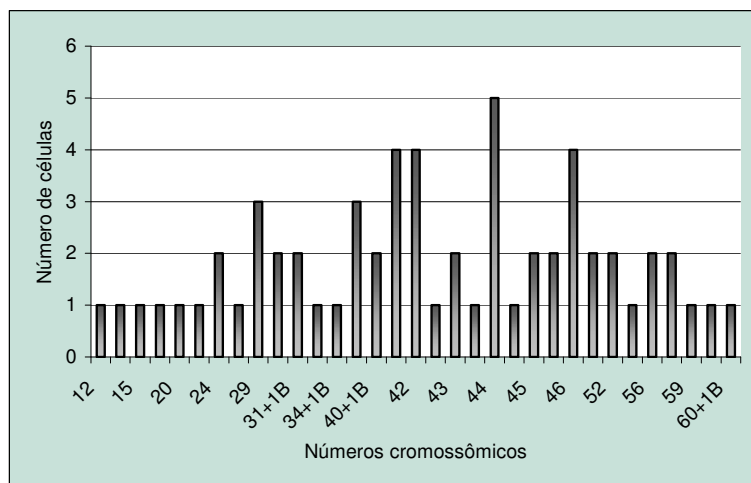


FIGURA 12. Números cromossômicos observados no quimiotipo La3 carvona (mixoplóide) de *Lippia alba*. Lavras, 2004.

Como no gênero *Lippia* é comum a ocorrência de híbridos interespecíficos naturais (Sanders, 2001), a mixoploidia observada no quimiotipo La3-linalol pode estar associada a uma possível hibridação entre *L. alba* e uma espécie próxima. Além disso, a variação de números cromossômicos observada no presente trabalho entre os diferentes quimiotipos de *L. alba* permite sugerir várias possibilidades de cruzamento para explicar a origem de La3- linalol, como mostra a Figura 13.

Considerando que o maior número cromossômico encontrado em La3-linalol foi de $2n=60$, é possível que, por exemplo, La1- citral ($2n=30$) produzindo grãos de pólen não-reduzidos ou La2-carvona ($2n=60$), tenham se hibridado com uma espécie próxima de *L. alba* que possua $2n=60$ (cruzamentos 1 e 2, Figura 13).

Outra hipótese seria que esses mesmos quimiotipos tenham se hibridado e originado La3- linalol (cruzamento 3, Figura 13).

Pode-se considerar ainda a possibilidade de que La1- citral ou La2-carvona tenham se hibridado com *L. geminata* ($2n=32$) (cruzamentos 4 e 5,

Figura 13) que é considerada por alguns autores, como sinônimo de *L. alba* e como um táxon distinto por outros autores, como citado anteriormente.

E, finalmente uma outra possibilidade é que *L. geminata* tenha se hibridado com uma espécie próxima (*Lippia* sp) e originado La3- linalol (cruzamento 6, Figura 13).

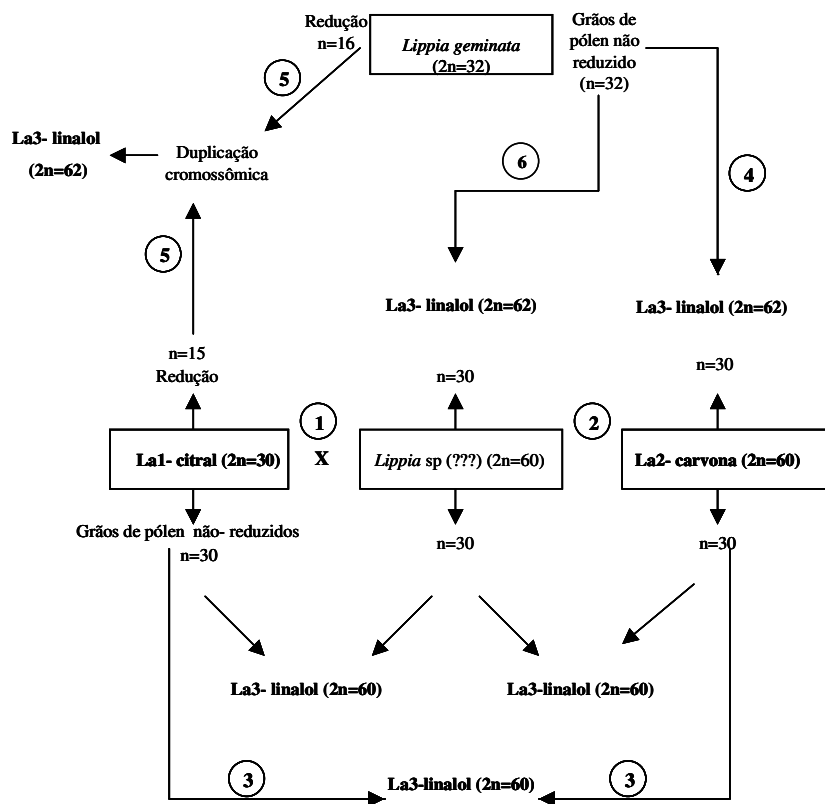


FIGURA 13. Cruzamentos hipotéticos que podem ter ocorrido entre quimiotipos L1- citral, L2- carvona de *L. alba* e outras espécies do gênero e originado o quimiotipo L3- linalol. Lavras, 2004.

A mixoploidia é um evento importante e apresenta implicações práticas e evolutivas. Em plantas superiores, na ausência de reprodução sexual, a mixoploidia é uma força potencial na evolução, enquanto que em espécies propagadas sexuadamente, a instabilidade cromossômica em tecidos reprodutivos pode levar a produção de gametas com números cromossômicos variáveis, produzindo aneuplóides (Pagliarini, 2002).

A frequência de células metafásicas apresentando um cromossomo B foi de 22,95%. Cromossomos B, também chamados de supernumerários ou acessórios, são cromossomos adicionais ao complemento cromossômico A padrão de uma espécie e que podem não estar presentes em certos tecidos, indivíduos ou populações (Dhar et al., 2002). Segundo esses mesmos autores, cromossomos B não pareiam e não recombinam com cromossomos A durante a meiose, são às vezes heterocromáticos e usualmente não contém genes, exceto para DNA ribossômico. Os cromossomos B já foram relatados em várias espécies (Bjerketvedt & Laane, 1980; Gohil & Kaul, 1980; Jones & Rees, 1982; Confalonieri, 1992; Hiremath & Murthy, 1992; Hossain et al., 1992; Chen et al., 1993a, 1993b; Estepa et al., 1993; Dagne, 1995; Dias et al., 1998; Houben et al., 2001; Muratova & Vladimirova, 2001; Dhar et al., 2002).

A variação observada em relação à presença desses cromossomos nas células é explicada pelo fato de que cromossomos B não sofrem disjunção das cromátides-irmãs durante a anáfase, sugerindo que estes apresentam centrômero não funcional (Houben et al., 2001).

Cromossomos B diferem dos cromossomos A em morfologia e comportamento e não são necessários para o crescimento e desenvolvimento normal (Houben et al., 2001). Sua origem ainda é um enigma e muitos acreditam que tenham surgido a partir de cromossomos A (Dhar *et al.*, 2002). Segundo Muratova & Vladimirova (2001), a presença de cromossomos B modifica o fenótipo do núcleo, influencia na separação dos cromossomos mitóticos e

meióticos, na recombinação e adaptação das plantas a condições ambientais adversas. A presença de cromossomos B pode influenciar na produção de sementes.

Foi observado por Tavares (2003) que plantas La3- linalol são pouco vigorosas, apresentando baixa taxa de crescimento e multiplicação em relação aos demais quimiotipos. Além disso, no campo, somente esse quimiotipo não produziu sementes. Essas características podem estar relacionadas além da poliploidia e mixoploidia, à presença dos cromossomos B, pois Jones & Rees (1982) relatam que plantas com cromossomos supernumerários apresentam baixa produção de sementes, vigor reduzido e redução no porte.

4.1.3 Análise meiótica

A meiose é um evento de alta estabilidade evolutiva que culmina na redução do número cromossômico. Uma meiose com curso normal e harmonioso assegura a viabilidade dos gametas (Pagliarini, 2002). Além disso, os eventos citológicos da gametogênese são controlados geneticamente.

4.1.3.1 La1- citral

Em La1- citral ($2n=30$), a análise da meiose permitiu detectar que a maioria das células apresentou meiose regular e normal. Foram obtidas células em paquíteno (Figura 14A), diacinese com 15 bivalentes (Figura 14B), anáfase I, telófase I (Figura 14C) e tétrades normais (Figura 14D). Dentre as irregularidades meióticas, foram detectados univalentes na diacinese, cromossomos adiantados na metáfase I, cromossomos atrasados na anáfase I e telófase II. A frequência dessas irregularidades foi de 16,49%. (Tabela 3).

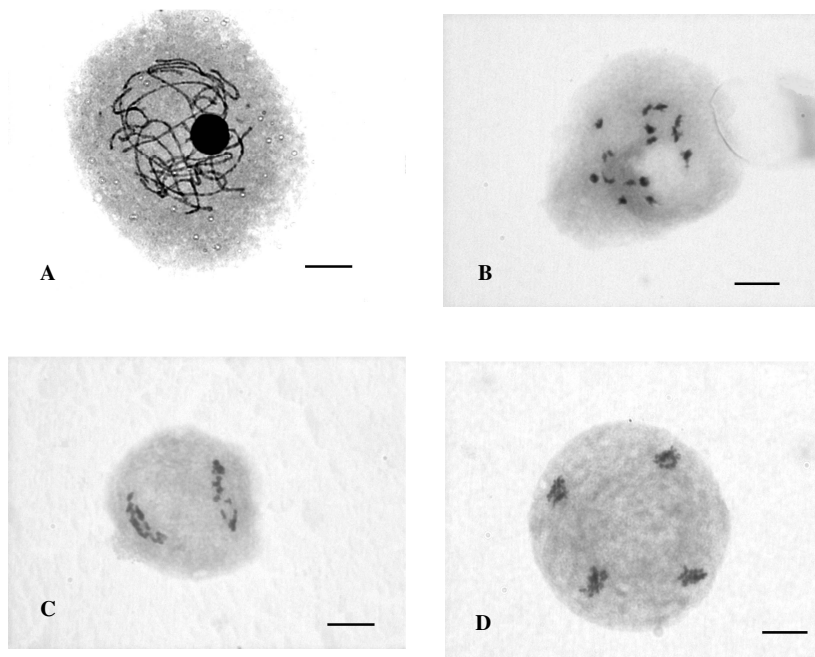


FIGURA 14. Células-mãe do grão de pólen do quimiotipo La1- citral ($2n=30$) de *L. alba*. A) Paquíteno; B) Diacinese com 15 bivalentes; C) Telófase I e D) Tétrade. Barra= 10 μ m. Lavras, 2004.

TABELA 3. Anormalidades meióticas encontradas nos quimiotipos La1-citral, La2-carvona e La3-linalol de *Lippia alba* (Verbenaceae). Lavras, 2004.

Células normais	Quimiotipos		
	La1- citral	La2- carvona	La3-linalol
	Obs	Obs	Obs
Zigóteno	18	0	0
Paquíteno	99	7	12
Diplóteno	30	1	18
Diacinese	24	7	0
Metáfase I	27	7	6
Telófase I	15	0	9
Metáfase II	6	6	0
Tétrade	24	4	0
Total (N)	243	32	45
Células anormais	Obs	Obs	Obs
Paquíteno	9	0	3
Diacinese	9	4	96
Metáfase I	9	12	21
Telófase I	9	10	15
Metáfase II	0	3	6
Tétrade	9	2	90
Mónades	3	336	0
Total (A)	48	367	231
Total Geral(N+A)	291	399	276
% Anormalidade (A/(N+A))	16,49	91,9	83,6

A= Total de células anormais, N= Total de células normais

4.1.3.2. La2- carvona

O quimiotipo La2- carvona ($2n=60$ cromossomos) apresentou irregularidades meióticas como a presença de univalentes e associações multivalentes (trivalentes) na diacinese (Figura 15A), metáfase I com migração cromossômica precoce (Figura 15B), anáfase I com pontes e fragmentos cromossômicos (Figura 15C), telófase I com cromossomos tardios, células com fragmentação cromossômica (Figura 15D), metáfase II com migração cromossômica precoce (Figura 14E), tétrades com cromossomos perdidos (Figura 15F); mônades (Figura 15G) e díades (Figura 15H). A frequência de células com irregularidades meióticas foi de 91,9% (Tabela 3). Das anormalidades encontradas, células com micronúcleos foram as mais frequentes (91,5%).

As associações multivalentes encontradas em La2- carvona reforçam as hipóteses de que esse quimiotipo é um autopoliploide de La1- citral ($2n=30$) ou um aloploiploide segmental resultante do cruzamento entre *L. alba* e uma espécie muito próxima, que apresente cromossomos com regiões de homeologia.

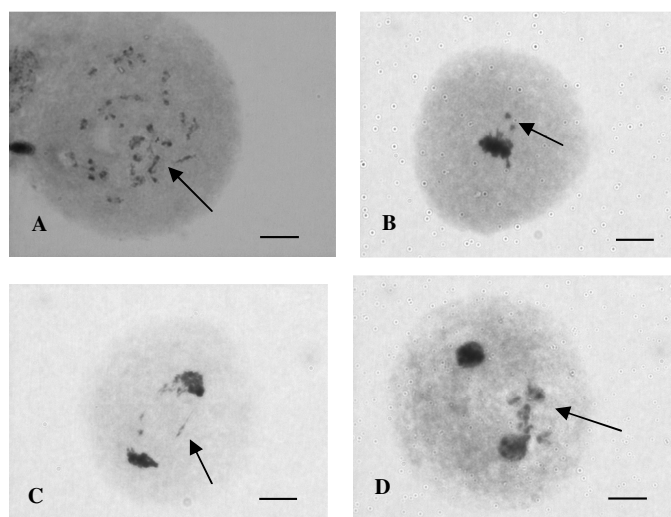
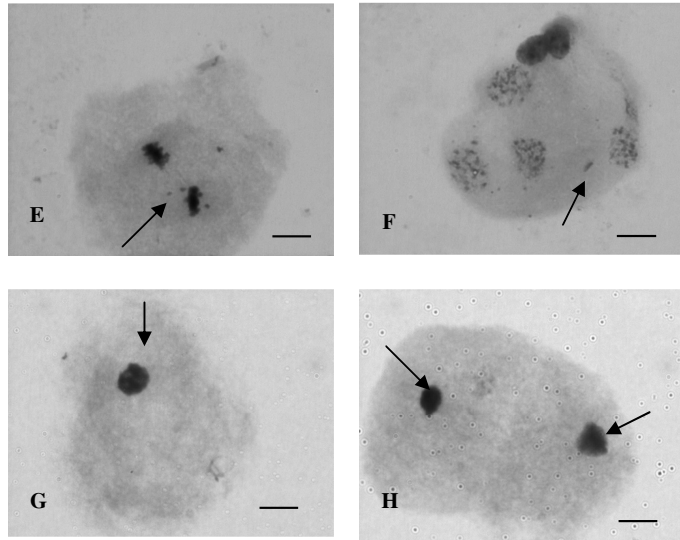


FIGURA 15. Células-mãe do grão de pólen do quimiotipo La2- carvona ($2n=60$) de *L. alba*. A) Diacinese apresentando trivalentes (seta), bivalentes e univalentes; B) Metáfase I com migração cromossômica precoce (seta); C) Telófase I com ponte cromossômica e fragmentos cromossômicos (seta); D) Fragmentação cromossômica (seta). Barra= $10\mu\text{m}$. Lavras, 2004. (“...continua...”).



“FIGURA 15, Cont.” Células-mãe do grão de pólen do quimiotipo La2- carvona ($2n=60$) de *L. alba*. E) Metáfase II com migração cromossômica precoce (seta); F) Tétrade com cromossomos perdidos (seta); G) Mônade (seta) e H) Díade (setas). Barra= 10 μ m. Lavras, 2004.

4.1.3.3 La3-linalol

La3- linalol (mixoplóide) apresentou 83,6% das células analisadas com irregularidades meióticas (Tabela 3). Dentre essas, destacou-se a presença de diacineses com univalentes, cadeias cromossômicas envolvendo vários cromossomos e anéis de translocação envolvendo quatro cromossomos (41,5% das células anormais), telófase I desbalanceadas, com cromossomos perdidos e tétrades com micronúcleos (38,9% das anormalidades). As diacineses analisadas não permitiram a contagem do número cromossômico em função da presença de muitas associações multivalentes e cadeias cromossômicas (Figuras 16 A-I).

Entretanto, todas as células em telófase I que possibilitaram a contagem dos cromossomos nos dois pólos permitiram observar que mesmo desbalanceadas, possuíam um total de $2n=40$ a $2n=44$ cromossomos (Figura 16G) (o que corresponde ao número mais freqüentemente encontrado na análise mitótica). O cromossomo B não foi observado nas células meióticas.

Segundo Pozner (2001), células somáticas diferenciam-se por meio de um processo denominado PCD (Diferenciação Celular Pré-Meiótica) em células meióticas. Desse modo, o número cromossômico observado nos meiócitos sugere que as células mitóticas que entraram em meiose também apresentavam números cromossômicos em torno de $2n=44$.

Univalentes em ascensão precoce na metáfase I ou cromossomos tardios na anáfase I podem originar micronúcleos na telófase I e na meiose II (Figuras 16F a 16I). Em consequência disso, podem ser formados gametas aneuplóides. Cromossomos univalentes resultam da baixa freqüência de quiasmas, terminalização precoce dos quiasmas ou da presença de genes assinápticos ou dessinápticos na prófase I. Segundo Pagliarini (2002), a presença de univalentes leva à inviabilidade do pólen e baixa produção de sementes.

As translocações correspondem à troca de partes entre cromossomos não-homólogos e podem ter origem espontânea ou podem ser induzidas. É um

fenômeno importante, pois estabelece novas relações de ligação entre genes, constituindo um mecanismo de origem de rearranjos cromossômicos sobre os quais a evolução pode atuar (Clark & Wall, 1996).

É possível que essas plantas estejam passando por um processo de evolução cariotípica que, segundo Aparício & Albaladejo (2003), constitui um processo de especiação. De acordo com estes autores, se tais rearranjos são fixados, reduzindo o fluxo gênico entre os indivíduos, pode ocorrer um isolamento reprodutivo.

É importante ressaltar que as anormalidades observadas nesses quimiotipos podem comprometer a produção de grãos de pólen viáveis e conseqüentemente, a produção de sementes. Kumar & Dutt (1989) relataram que espécies do gênero *Lippia* são colonizadoras bem sucedidas de diversos habitats em um curto tempo, estando sobre uma seleção natural intensa. Além disso, os autores destacam ainda que plantas desse gênero possuem um mecanismo dinâmico de propagação vegetativa dos genótipos/fenótipos adaptados em nichos ecológicos.

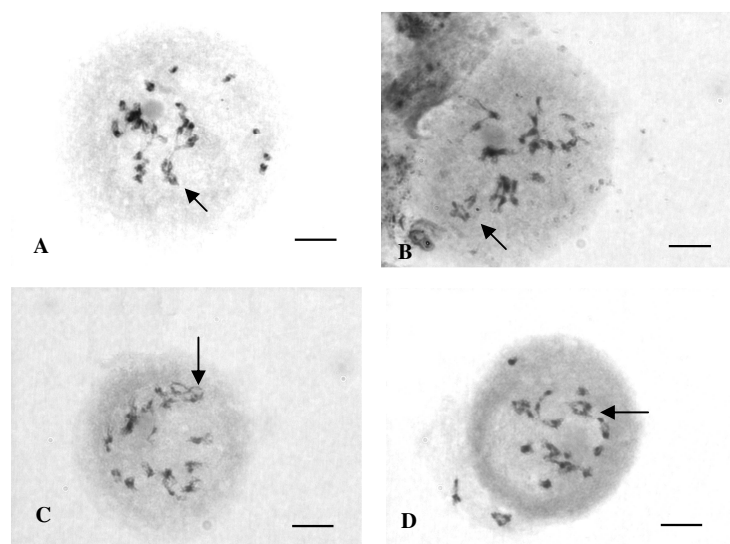
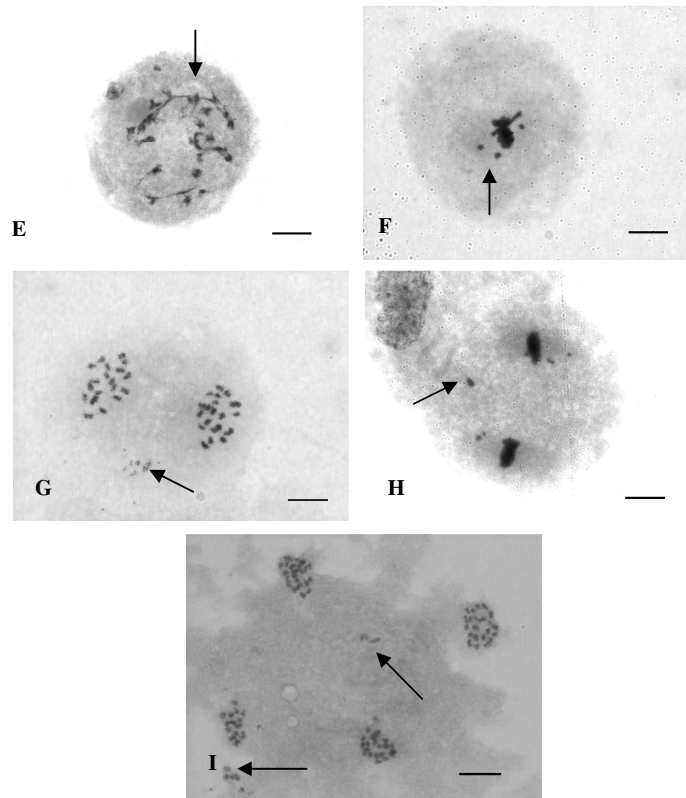


FIGURA 16. Células- mãe do grão de pólen do quimiotipo La3-linalol (mixoplóide). A) Diacinese com cadeias cromossômicas, associações trivalentes e anéis de translocação (seta). B) Diacinese com associações multivalentes (seta); C) Diacinese com anel de translocação envolvendo quatro cromossomos (seta); D) Diacinese com anel cromossômico (seta) e cadeias cromossômicas. Barra= 10 μ m. Lavras, 2004. (“...continua...”).



“FIGURA 16, Cont.” Células- mãe do grão de pólen do quimiotipo La3-linalol (mixoplóide). E) Diacinese com cadeias cromossômicas (seta); F) Metáfase I com migração cromossômica precoce (seta); G) Telófase I desbalanceada (19 cromossomos em um pólo e 20 no outro) e com micronúcleo (seta); H) Metáfase II com migração cromossômica precoce (seta) e I) Tétrade com cromossomos perdidos (seta). Barra= 10µm. Lavras, 2004.

4.1.4 Viabilidade do grão de pólen

Verificou-se que La1-citral apresentou uma média de 82,35% de grãos de pólen viáveis, enquanto que La2- carvona apresentou 52,51% e La3-linalol, 34,75%.

As médias da viabilidade do grão de pólen dos quimiotipos e das plantas dentro do quimiotipo La3- linalol diferiram quando comparadas pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade (Tabelas 4 e 5).

Esses resultados permitiram constatar que o nível de ploidia e, conseqüentemente, as anormalidades meióticas observadas nessas plantas influenciaram a viabilidade do grão de pólen. Além disso, o menor percentual de grãos de pólen viáveis e as diferenças significativas encontradas entre os indivíduos do quimiotipo La3- linalol estão relacionadas com a sua condição mixoplóide.

Tabela 4. Proporções médias de grãos de pólen viáveis dos quimiotipos La1-citral, La2- carvona e La3- linalol. Lavras, 2004.

Quimiotipos	Médias
La1- citral	0,3475a
La2- carvona	0,5250 b
La3- linalol	0,8235 c

Tabela 5. Proporções médias de grãos de pólen viáveis de plantas do quimiotipo La3- linalol. Lavras, 2004.

Plantas	Médias
2	0,1769 a
4	0,5607 b

Números seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

4.2 Marcadores RAPD

A técnica RAPD foi utilizada para caracterizar 3 acessos de *L. alba* correspondentes aos quimiotipos denominados La1-citral; La2- carvona e La3-linalol.

Dos 47 primers 10-mer arbitrários utilizados, 33 (70,2%) foram selecionados e escoreados devido à consistência na amplificação. Os primers selecionados foram: OPA-01, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-11, OPA-12, OPA-13, OPA-14, OPA-15, OPA-18, OPA-19, OPA-20, OPB-03, OPB-05, OPB-07, OPB-12, OPC-02, OPC-08, OPC-11, OPD-07, OPF-09, OPF-10, OPF-13, OPF-14, OPG-02, OPG-03, OPG-14, OPG-15, OPG-16 e OPG-20.

Vários padrões de bandas foram revelados por diferentes primers. Estas apresentaram um tamanho médio de 968,41pb que variaram de 249pb (OPC-02) a 3062pb (OPA-05).

Foram geradas no mínimo duas (OPA-13 e OPG-16) e no máximo 13 (OPA09 e OPB03) bandas amplificadas, totalizando 208 bandas. O número de bandas/primer foi de 6,3. Das 208 marcas produzidas, 33 (15,86%) foram monomórficas, ou seja, foram comuns a todos os genótipos analisados.

Na Tabela 6 está representada a matriz de distância gerada por meio do complemento do coeficiente de Nei & Li (1979).

Verificou-se que o quimiotipo La3- linalol apresentou maior variação dentro (0,4416) do que os demais (0,02 e 0,03 para os quimiotipos L1 e L2, respectivamente) (Tabela 7). Essa maior variação pode ter ocorrido em função da condição mixoplóide do quimiotipo La3.

Entretanto, é amplamente discutido entre os autores se marcadores RAPD podem identificar a variação no número de cromossomos. Raimondi et al. (2001), por exemplo, detectaram variantes somaclonais em *Asparagus* por

meio de análises citogenéticas, não conseguindo o mesmo por meio de marcadores RAPD. Os autores atribuem essa falha do RAPD em detectar algum polimorfismo associado à variação somaclonal devido à pequena porção do genoma que é coberta pelos marcadores RAPD. Uma outra explicação dos autores é que o número de marcadores analisados foi insuficiente para saturar o genoma de asparagus. É importante ressaltar que a variação somaclonal detectada em asparagus por meio da análise citogenética ocorreu devido a aneuploidias ($2n=2x+12=32$ e $2n=2x+14=34$). Ou seja, os números cromossômicos encontrados foram $2n=32$ e $2n=34$. No presente estudo, o quimiotipo La3 apresentou uma variação de números cromossômicos muito pronunciada ($2n=12$ a $2n=60+1B$), como relatado anteriormente, o que deve ter contribuído para que o RAPD a detectasse.

Outros autores, como Osipova et al. (2001) e Soneji et al. (2002), conseguiram detectar polimorfismo por meio de marcadores RAPD em variantes somaclonais de milho e abacaxi, respectivamente.

Para a análise de agrupamento, foram utilizados três diferentes métodos hierárquicos (single linkage, complete linkage e ward). Segundo Cruz (2001), nesta análise são identificados na matriz de distância ou dissimilaridade os indivíduos mais similares, os quais são reunidos formando um grupo inicial. Calculam-se as distâncias daquele grupo em relação aos demais indivíduos e em relação a outros grupos já formados. Assim, a matriz de dissimilaridade foi utilizada para a análise de agrupamento UPGMA, possibilitando a obtenção de um dendrograma (Figura 17). Todos os métodos hierárquicos utilizados forneceram o mesmo dendrograma, demonstrando consistência nos resultados obtidos.

Pôde-se verificar que se formaram 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 grupo (representado pelos indivíduos La2). Isso se deve ao fato de que La3 apresentou bandas em comum com os dois quimiotipos. A variação entre La1 e La3 e entre La2 e La3 foi de 0,40 e 0,43, respectivamente (Tabela 7).

Nas Figuras 18 e 19 estão alguns perfis de RAPD obtidos com os primers OPC-11, OPF-10, OPG-03 e OPG-15.

TABELA 6. Estimativas das distâncias genéticas baseadas no coeficiente de Nei & Li entre e dentro dos quimiotipos La1- citral; La2- carvona e La3- linalol. Lavras, 2004.

	La1.1	La1.2	La1.3	La2.1	La2.2	La2.3	La3.1	La3.2	La3.3
La1.1	0								
La1.2	0,00943	0							
La1.3	0,04306	0,03318	0						
La2.1	0,56863	0,57282	0,57635	0					
La2.2	0,57843	0,58252	0,58621	0,01010	0				
La2.3	0,59162	0,59585	0,58947	0,07027	0,07027	0			
La3.1	0,20419	0,21244	0,22105	0,54595	0,55676	0,53488	0		
La3.2	0,47000	0,46535	0,47739	0,55670	0,56701	0,58011	0,39227	0	
La3.3	0,50495	0,50000	0,50249	0,17347	0,18367	0,21311	0,45355	0,47917	0
Média	0,37129	0,37027	0,36912	0,16956	0,17221	0,16601	0,10573	0,05990	0

TABELA 7. Estimativas das distâncias médias entre e dentro dos quimiotipos La1, La2 e La3 de *Lippia alba* (Verbenaceae). Lavras, 2004.

	La1	La2	La3
La1	0,02		
La2	0,58	0,03	
La3	0,40	0,43	0,44

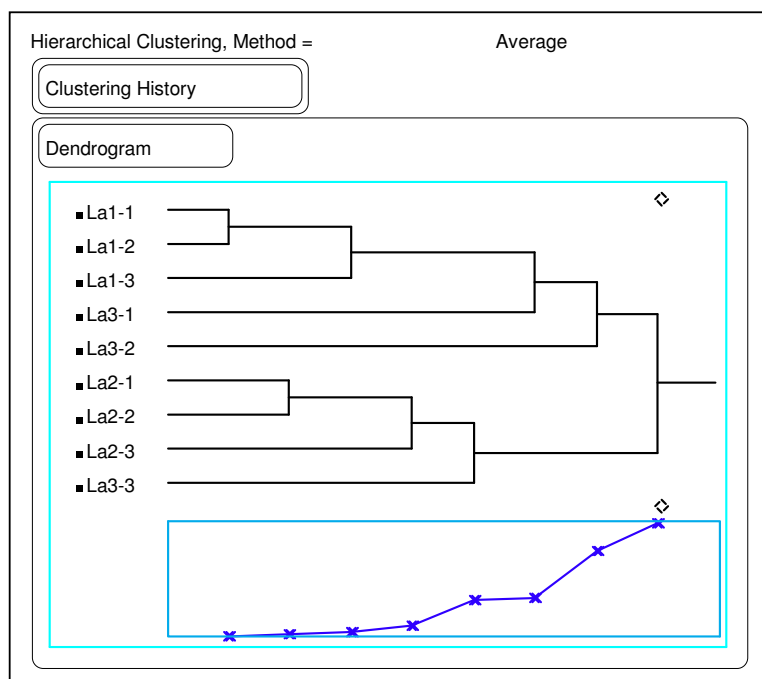


FIGURA 17. Dendrograma UPGMA baseado em dados RAPD mostrando as relações existentes entre e dentro de três quimiotipos de *Lippia alba*. La1-1, La1-2 e La1-3 (La1- citral); La2-1, La2-2 e La2-3 (La2- carvona) e La3-1, La3-2 e La3-3 (La3- linalol).

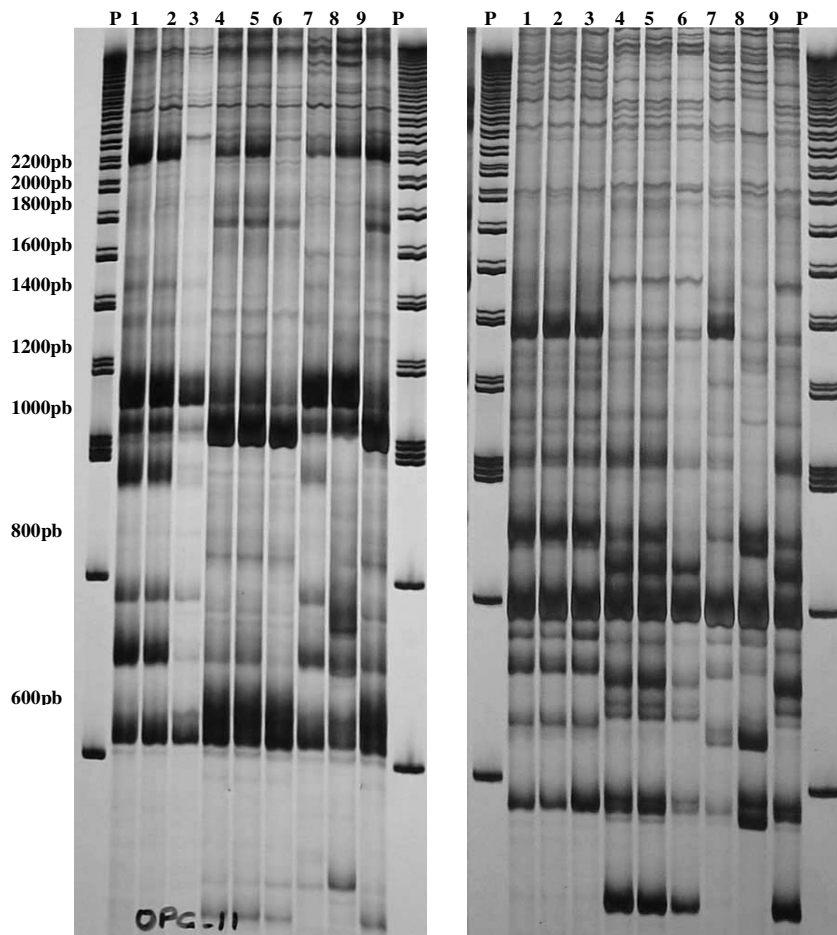


FIGURA 18. Perfis de RAPD obtidos pela amplificação de amostras de DNA com os primers OPC-11 e OPF-10. Os números 1, 2 e 3 correspondem aos indivíduos do quimiotipo La1- citral; 4,5,6 aos indivíduos de La2- carvona e 7,8,9 aos indivíduos de La3- linalol. Note o polimorfismo presente entre os indivíduos do quimiotipo L3- linalol. A letra P representa o padrão de DNA de fago λ . Lavras, 2004.

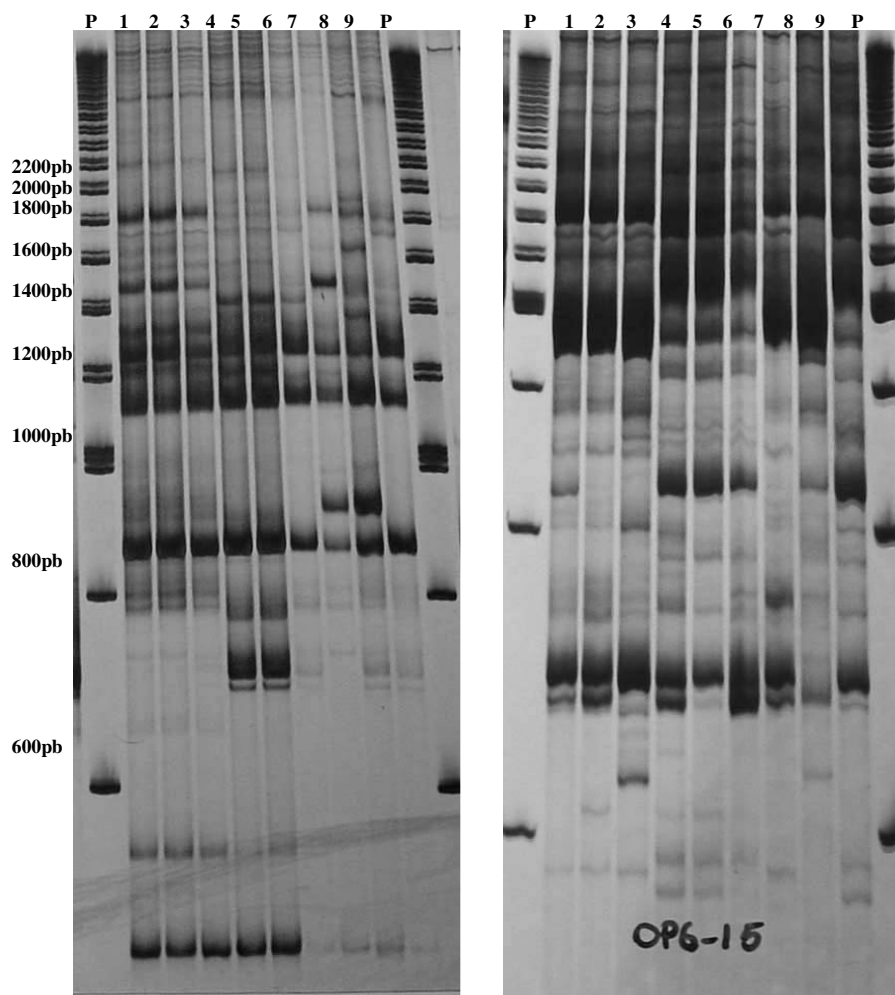


FIGURA 19. Perfis de RAPD obtidos pela amplificação de amostras de DNA com os primers OPG-03 e OPG-15. Os números 1, 2 e 3 correspondem aos indivíduos do quimiotipo La1- citral; 4,5,6 aos indivíduos de La2- carvona e 7,8,9 aos indivíduos de La3- linalol. Note o polimorfismo presente entre os indivíduos do quimiotipo La3- linalol. A letra P representa o padrão de DNA de fago λ . Lavras, 2004.

4.3 Relações existentes entre La1-citral, La2- carvona e La3- linalol

De forma geral, as análises citogenéticas sugerem que o acesso La2-carvona ($2n=60$) seja um autopoliploide de La1- citral ($2n=30$) devido a características do cariótipo de ambos. O polimorfismo cromossômico identificado entre os dois acessos pode ser explicado devido à ocorrência de rearranjos ocorridos em La2- carvona. Além disso, anormalidades meióticas, como associações multivalentes, encontradas em La2- carvona também indicam a ocorrência de autopoliploidia. Os marcadores RAPD separaram La1- citral e La2- carvona em grupos distintos. Isso pode ter acontecido devido à ocorrência de duplicação seguida de rearranjos que ocorreram em La2- carvona, pois, tais alterações constituem mudanças evolutivas que levam a diferenças gênicas e cromossômicas.

Em relação ao acesso La3- linalol (mixoplóide), tanto as análises citogenéticas quanto as moleculares indicam que este pode ser um híbrido resultante do cruzamento entre La1- citral e La2- carvona, por vários motivos: este quimiotipo apresentou um tipo diferente de núcleo interfásico, é mixoplóide, apresenta meiose irregular, baixo vigor e não produz sementes. Além disso, os marcadores RAPD, além de terem detectado a ocorrência de mixoploidia, indicaram que indivíduos La3- linalol se agruparam tanto com La1- citral quanto com La2-carvona.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram verificar que os quimiotipos apresentam diferenças genéticas. Como as mudanças cariotípicas constituem um aspecto significativo da especiação, pois tais alterações podem introduzir barreiras efetivas de cruzamentos por produzir híbridos estéreis e causar problemas na divisão meiótica (Clark & Wall, 1996), é possível que as mudanças pelas quais esses quimiotipos estão passando constituam mecanismos que podem levar à especiação dos mesmos.

É importante salientar que é necessário reunir aos resultados obtidos no presente estudo, dados morfológicos, bioquímicos e ecológicos para uma correta classificação desses quimiotipos e estabelecimento dos táxons.

São necessários estudos que verifiquem a relação existente entre os genomas desses quimiotipos, o que poderá elucidar a sua origem.

5 CONCLUSÕES

Os três quimiotipos mostraram diferenças genéticas e citogenéticas com base nas análises mitóticas, meióticas e nos marcadores RAPD.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o quimiotipo La2-carvona seja um autopoliplóide de La1- citral e La3- linalol seja um híbrido resultante do cruzamento entre La1-citral e La2- carvona.

As alterações cariotípicas observadas sugerem que esses quimiotipos estão passando por um processo de especiação.

É necessário que os resultados do presente estudo sejam reunidos a dados morfológicos, bioquímicos e ecológicos para uma reformulação da categoria taxonômica dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. C. de. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante X milheto tratados com agentes antimitóticos**. 2002. 72 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ALBULQUERQUE, J. N. **Plantas medicinais de Uso Popular**. Brasília: ABEAS/ME, 1989. 96 p.
- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v. 55, n. 1, p. 13-19, Jan./Feb. 1980.
- ANDRADA, A. B.; PASTORIZA, A.; PULIDO, L. V. M. Citogenética en tres especies de Verbenaceas. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Luz, v. 15, n. 4, p. 312-318, 1998.
- APARÍCIO, A.; ALBALADEJO, R. G. Microsporogenesis and meiotic abnormalities in the hybrid complex of *Phlomis composita* (Lamiaceae). **Botanical and Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 143, n. 1, p. 79-85, Sept. 2003.
- ARNHOLDT-SCHMITT, B. RAPD analysis: a method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hypericum perforatum* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 6, p. 906-911, Apr. 2000.
- BARBOSA, S. **Citogenética de híbridos entre *Pennisetum purpureum* Schumak e *P. glaucum* L. e seus genitores**. 2000. 48 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BARTISH, I. V.; HYLMO B.; NYBOM, H. RAPD analysis of interspecific relationships in presumably apomictic *Cotoneaster* species. **Euphytica**, Washington, v. 120, n. 2, p. 273-280, 2001.
- BASSOLE, I. H. N.; OUATTARA, A. S.; NEBIE, R.; OUATTARA, C. A. T.; KABORE, Z. I.; TRAORE, S. A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *L. multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, St. Paul, v. 62, n. 2, p. 209-212, Jan. 2003.

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

BEZERRA, P. *et al.* Composição química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas no nordeste- gênero *Lippia*. In: Simpósio de plantas Medicinais do Brasil VI. Resumos. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 33. p. 1-14, 1980. Suplemento 1.

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

BICKMORE, W. A.; CHUBB, J. R. Chromosome position: Now, where was I? **Current Biology**, Cambridge, v. 3, n. 9, p. 357-359, Apr. 2003.

BIONE, N. C. P.; PAGLIARINI, M. S.; DE TOLEDO, J. F. F. Meiotic behavior of several Brazilian soybean varieties. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 3, p. 623-631, Sept. 2000.

BJERKETVEDT, D.; LAANE, M. M. Accessory chromosomes in norwegian populations of *Paris quadrifolia* L. **Cytologia**, Tokyo, v. 47, n. 2, p. 391-398, 1980.

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

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. Tese (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

CAETANO-PEREIRA, L. M. *et al.* Spontaneous chromosome fragmentation in maize microsporocytes. **Cytologia**, Tokyo, v. 60, p. 297-301, 1995.

CARAWAY, V.; CARR, G. D.; MORDEN, C. W. Assesment of hybridization and introgression in lava-colonizing hawaiian *Dubautia* (Asteraceae: Madiinae)

using RAPD markers. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, n. 9, p. 1688-1694, Sept. 2001.

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

CHEN, Q.; JAHIER, J.; CANDERON, Y. The B chromosome system of Inner Mongolian *Agropyron* Gaertn. 1. Distribution, morphology and cytological behaviour. **Caryologia**, Florence, v. 46, n. 4, p. 245-260, Oct./Dec. 1993.

CHEN, K. T.; SU, Y. C.; LIN, J. G.; HSIN, L. H.; SU, Y. P.; CHEN, H. J. Identification of *Atractylodes* plants in chinese herbs and formulations by random amplified polymorphic DNA. **Acta pharmacol Sin**, Shanghai, v. 22, n. 6, p. 493-497, June 2001.

CHRISTIAN, A. T.; PATTEE, M. S.; MARCHETTI, F. Meiotic chromosomes as templates for microdissection. **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 10, n. 1, p. 45-48, 2002.

CLARK, M. S.; WALL, W. J. **Chromosomes - the complex code**. London: Chapman & Hall, 1996. 345 p.

COELHO, L. G. M.; BATTISTIN, A. Meiotic behavior of *Adesmia* DC (Leguminosae-Faboideae) species native to Rio Grande do Sul, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 3, p. 403-406, Sept. 1998.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 189-199, Mar. 2000.

CONFALONIERI, V. A. B- chromosomes of *Trimerotropis pallidipennis* (Oeopodinae, Acrididae): new effects on chiasma conditions. **Caryologia**, Florence, v. 45, n. 2, p. 145-153, Apr./June 1992.

CONGIU, L. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 229-232, June 2000.

CORAZZA-NUNES, M. J. Polyploidy and the consequences in *Aloysia lycioides* (Verbenaceae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 36, n. 4, p. 753-759, out./dez. 1993.

- CORAZZA-NUNES, M. J. *et al.* Hexaploidy and fertility interrelationships in *Aloysia lycioides* (Verbenaceae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 38, n. 2, p. 627-630, 1995.
- CORREA, C. B. V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill) NE Br ex Britt & Wilson- erva cidreira. **Revista Brasileira de Farmacia**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 3, p. 57-64, maio/jun. 1992.
- COSTA, S. M. O. *et al.* Quinona dimérica (tectol) de *Lippia sidoides* (Verbenaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS, 15., 1998. **Resumos...** 1998. p. 132.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2. ed. New York: The New York Botanic Garden, 1988.
- CRUZ, C. D. **Programa genes: versão Windows- Aplicativo Computacional em Genética e Estatística**. 2001. 648 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- DAGNE, K. Mitotic and meiotic behaviour of B- chromosomes of *Guizotia scabra* (Vis.) Chiov. ssp. *scabra* (Compositae). **Caryologia**, Florence, v. 48, n. 1, p. 35-45, 1995.
- D'ANDREA, A. *et al.* Examen del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. la salvia morada de corrientes. **IX Sesión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE**; p. 74. 1995.
- DHAR, M. K.; FRIEBE, B.; KOU, A. K.; GILL, B. S. Origin of an apparent B chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. **Chromosoma**, New York, v. 111, n. 5, p. 332-340, Dec. 2002.
- DIAS, A. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Synapsis in supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Prochilodontidae). **Caryologia**, Florence, v. 51, n. 2, p. 105-113, Apr./June 1998.
- DI-STASI, L. C. *et al.* Erva cidreira. In: **Plantas medicinais da Amazônia**. São paulo: UNESP, 1989. p. 65-6.
- DWIVEDI, S. K. *et al.* Fungicotoxicity of some essential oils against *Macrophomina phaseolina*. **Indian Perfum**, Bangalore, v. 34, n. 1, p. 20-21, 1990.

ESTEPA, M. A.; NARESH, R.; DEY, S.; SWARUP, D. Odd-even effect of rye B-chromosomes on homeologous pairing in wheat-rye hybrids. **Caryologia**, Florence, v. 46, n. 1, p. 17-23, Jan./Mar. 1993.

ETISHAM-UL-HAQ, M. Patterns of Genetic variation in *in* and *ex situ* populations of the threatened Chilean vine *Berberidopsis corallina*, detected using RAPD markers. **Annals of Botany**, London, v. 87, n. 6, p. 813-821, June 2001.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA- CENARGEN, 1998. 220 p.

FISCHER, M.; HUSI, R.; PRATI, D.; PEINTINGER, M.; VAN KLEUNEN, M.; SCHMID, B. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 8, p. 1128-1137, Aug. 2000.

FUKUI, K.; NAKAIAMA, S. **Plant chromosomes-laboratory methods**. London: CRC press, 1996. 271 p.

GOHIL, R. N.; KAUL, R. B- chromosomes and structural hybridity in *Petunia hybrida* Vilm. **Cytologia**, Tokyo, v. 45, n. 4, p. 763-768, 1980.

GOLDMAN, P. Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. **Annals of International Medicine**, Philadelphia, v. 16, n. 8, p. 594-600, Oct. 2001.

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

GOSWANI, H. K.; KHANDELWAL, S. Chromosomal elimination in natural populations of *Ophioglossum*. **Cytologia**, Tokyo, v. 45, n. 1, p. 77-86, 1980.

GOTLIEB, O. R.; SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 39, n. 8, p. 707-716, ago. 1987.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudotestcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Baltimore, v. 137, n. 4, p. 121-137, Aug. 1994.

- GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC, 2002. 131 p.
- GUERRA, M. dos S. Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 158, p. 107-115, 1987a.
- GUERRA, M. dos S. Cytogenetics of Rutaceae IV. Structure and systematic significance of interphase nuclei. **Cytologia**, v. 52, p. 213-222, 1987b.
- GUERRA, M. dos S. Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas. In: AGUIAR-PERECIN, MARTINS, P. S.; BANDEL, G. (Ed.). **Tópicos de citogenética e evolução de plantas**. Piracicaba, 1984. 239 p.
- GUPTA, P. K.; REDDY, V. R. K. Cytogenetics of triticales. In: GUPTA, P. K.; TSUCHIYA, T. **Chromosome engineering in plants: genetic, breeding and evolution**. Amsterdam: Ed. Elsevier, 1991. p. 351.
- HARVEY, B. L.; FRALEIGH, B. impacts on Canadian Agriculture of the convention on biological diversity. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 75, n. 1, p. 17-21, Jan. 1995.
- HE, C. *et al.* An *Arabidopsis* mutant showing aberrations in male meiosis. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 9, n. 1, p. 54-57, 1997.
- HESLOP-HARRISON, J. S. RNA, genes, genomes and chromosomes repetitive DNA sequences in plants. **Chromosome Today**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 45-57, 2000.
- HESLOP-HARRISON, P. *et al.* Fluorescent *in situ* Hybridization of plants chromosomes: illumination the *Musa* genome. **INIBAP Annual Report 1998: 1999**. p. 26-29.
- HIREMATH, S. C.; MURTHY, H. N. Cytogenetical studies in *Guizotia* (Asteraceae). **Caryologia**, Florence, v. 45, n. 1, p. 69-82, Jan./Mar. 1992.

HOSSAIN, A. B. M. M.; KISHIKAWA, H.; TAKAGI, Y. Effect of some structurally altered B chromosomes on the pairing of standard B chromosomes of rye in wheat. **Caryologia**, Florence, v. 45, n. 3/4, p. 243-254, July/Mar. 1992.

HOUBEN, A.; VERLIN, D.; LEACH, C. R.; TIMMIS, J. N. The genomic complexity of micro B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosoma**, New York, v. 110, n. 7, p. 451-459, Dec. 2001.

JONES, B.; GLIDDON, C.; GOOD, J. E. G. The conservation of variation in geographically peripheral populations: *Lloydia serotina* (Liliaceae) in Britain. **Biological Conservation**, Oxford, v. 101, n. 1, p. 147-156, Mar. 2001.

JONES, R. N.; REES, H. **B Chromosomes**. London: Academic Press, 1982. 266 p.

JUDD, W. S. *et al.* **Plant systematics. A phylogenetic approach**. 2. Ed. Sauer Associates, 2002. 419 p.

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

KISHORE, N.; DUBEY, N. K.; SRIVASTAVA, O. P.; SINGH, S. K. Volatile fungicotoxicity in some highers plant as avaluated against *Rhizoctonia solani* and some others fungi. **Indian Phytopatology**, New Delhi, v. 36, n. 4, p. 724-726, Dec. 1983.

KISHORE, 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.

KUDDUS, R. H.; KUDDUS, N. N. DNA polymorphism in the living fossil *Ginkgo biloba* from the Eastern United States. **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 1, p. 8-12, Mar. 2002.

KUMAR, P.; DUTT, B. Cytogenetic basis of breeding system in some verbenaceous species. **Cytologia**, Tokyo, v. 54, n. 2, p. 347-353, June 1989.

LEE, C. T.; WICKNESWARE, R.; MAHANI, M. C.; ZAKRI, A. H. Effect of selective logging on the genetic diversity of *Scaphium macropodium*. **Biological Conservation**, Oxford, v. 104, n. 1, p. 107-118, Mar. 2002.

- LI, X.; RALPHS, M. H.; GARDNER, D. R.; WANG, R. R. C. Genetic variation within and among 22 accessions of three tall larkspur species (*Delphinium* spp.) based on RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 91-102, Feb. 2002.
- LUCENÑO, M.; VANZELA, A. L. L.; GUERRA, M. Cytotaxonomy studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae) a genus exhibiting holocentric chromosomes. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, n. 3, p. 440-449, Mar. 1998.
- MARTÍNEZ, J.; MENDEZ, I.; PAOLOMIRIO, G. Cytological and genical differentiation between cytotypes of *Echeandia nana* (Anthericaceae). **Caryologia**, Florence, v. 53, n. 2, p. 147-158, Apr./June 2000.
- MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematic and Evolution**, Vienna, v. 226, n. 1/2, p. 69-84, 2001.
- MELO, N. F.; GUERRA, M.; BENKOLSEPPON, A. M.; DOMENEZES, N. L. Cytogenetics and cytotaxonomy of Velloziaceae. **Plant Systematic and Evolution**, Vienna, v. 204, n. 3/4, p. 257-273, 1997.
- MORETTI, A.; CAPUTO, P.; GANDU, L.; STEVENSON, D. W. Intraespecific chromosome variation in *Zamia* (Zamiaceae, Cycadales). **Caryologia**, Florence, v. 44, n. 1, p. 1-10, Jan./Mar. 1991.
- MURATOVA, E. N.; VLADIMIROVA, O. S. Supernumerary chromosomes of the karyotype of siberian spruce *P. obovata*. **Cytology and Genetics**, New York, v. 35, n. 4, p. 37-43, 2001.
- NEI, M.; LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academic Science USA**, Washington, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.
- NIRMALA, C.; KAUL, M. L. H. Male sterility in Pea IV. Meiotic absence, arrest, breakdown and continuation. **Cytologia**, Tokyo, v. 58, p. 247-255, 1993.
- NIRMALA, C.; KAUL, M. L. H. Male sterility in Pea VI. Gene action duplicity. **Cytologia**, v. 59, p. 195-201, 1994.

- NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. In: SIOMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 2. ed. rev. UFRGS/Ed. UFSC, 2000.
- OSIPOVA, E. S.; KOKAEVA, Z. G.; TROITSKIG, A. V.; SHAMINA, Z. B. RAPD analysis of maize somaclones. **Russian Journal of Genetics**, New York, v. 37, n. 1, p. 91-96, Jan. 2001.
- PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 997-1002, Dec. 2002.
- PETERSON, A.; PETERSON, J. Genotypic differentiation on an individual level in *Gagea villosa* (M. BIEB.) Duby, *gagea lutea* (L.) Ker- gawler and *Gagea bohémica* subsp. *Saxatilis* (Koch) Pascher in saxony-anhalt using RAPD markers. **Journal of Applied Botany**, Berlin, v. 73, n. 5/6, p. 228-233, Dec. 1999.
- PINTO, J. E. P. B.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: UFLA, 2002 169 p. (Texto acadêmico).
- PIO- CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis e medicinais do Brasil e das exóticas cultivadas**. 1984. 747 p.
- POZNER, R. Approach to the early sporangial development in angiosperms considering meiosis control and cellular differentiation. **Plant Systematic and Evolution**, Vienna, v. 230, n. 1, p. 25-42, 2001.
- PRAÇA, M. M. *et al.* Metodologia para obtenção de PMCs em plantas com flores de tamanho reduzido. In: ENCONTRO MINEIRO DE GENETICISTAS, 6., 2000, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2000.
- QUMSIYEH, M. B.; BAKER, R. J. Comparative cytogenetics and the determination of primitive karyotypes. **Cytogenetic and Cell Genetics**, Basel, v. 47, n. 1/2, p. 100-103, 1988.
- RAIMONDI, J. P. *et al.* Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprint and cytogenetics analyses. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 90, n. 1/2, p. 19-29, Oct. 2001.
- 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.
- RICCIARDI, G. *et al.* Fitoquímica de verbenaceas (*Lippias* y *Aloysias*) del Nordeste Argentino. <http://www.unne.edu.ar>. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, UNNE; **Exactas** **039**; 2000.
- SABATTI, M.; D'OVIDIO, R.; TANZARELLA, O. A.; MUGNOZZA, G. E. S. Assessment of geographic variation by RAPD markers among Italian open-pollinated progenies of *Populus alba* L. **Genetics Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 48, n. 5, p. 423-428, Oct. 2001.
- SALIMENA, F. R. G. **Revisão taxonômica de *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae)**. 2000. 208 p. Tese (Doutorado em Botânica)-Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SALIMENA-PIRES, F. R. **Verbenaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. 1991. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Biociência, 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.
- SANTOS-MENDES *et al.* **Caracterização morfo-anatômica, fitoquímica e molecular de oito formas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex BRITT. & WILSON (VERBENACEAE)**. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual. Paulista. Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu.
- SCHAUER, J. C. Verbenaceae. In: De CANDOLE, A. P. (Ed.). **Prodromus systematis naturalis Regni Vegetabilis**, Paris, v. 11, p. 522-700, 1847.
- SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC, 1993. 391 p.
- SINGH, T. P.; SHARMA, A. K. Cytotypes and phenotypes in *Ocimum sanctum*-Their characteristics. **Cytologia**, Tokyo, v. 46, n. 4, p. 723-729, 1981.
- SONEJI, J. R.; SAHIJRAM, L.; BOLLAMMA, K. T. Suitability of RAPD for analyzing spined and spineless variant regenerants of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.). **Plant Molecular Biology Reporter**, Oxford, v. 20, p. 307a-307i, 2002.

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

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.

TECHIO, V. H. **Citotaxonomia de algumas espécies e de híbridos interespecíficos de *Pennisetum*.** 1998. 112 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TECHIO, V. H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp.** 2002. 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

THEIS, N. & LERDAU, M. The evolution of function in plant secondary metabolites. **International Journal in Plant Science**, Chicago, v. 164, p. S93-S102, 2003. Supplement. 3

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.

TSUJI, K.; OHNISHI, O. Phylogenetic position of east Tibetan natural populations in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaert.) revealed by RAPD analyses. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 48, n. 1, p. 63-67, Feb. 2001.

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.; COSTA, D. C. S.; MACHADO, M. A.; CAMPOS, A. L. Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD

markers. **Plant Systematic and Evolution**, Vienna, v. 246, n. 1/2, p. 1-8, Apr. 2004.

VIEIRA, R. F.; GRAYER, R. J.; PATON, A.; SIMON, J. E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 287-304, Mar. 2001.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

YANG, S.; SU, Y. P.; HUANG, W. D.; LAU, K. M. A cytotoxic study of the genus *Pyrenaria complex* (Theaceae). **Caryologia**, Florence, v. 53, n. 3/4, p. 245-253, July/Dec. 2000.

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