

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Aline Dias Brandão

“CITOGENÉTICA COMPARATIVA DOS GÊNEROS  
*Lippia, Lantana e Aloysia* (VERBENACEAE, LAMIALES)”

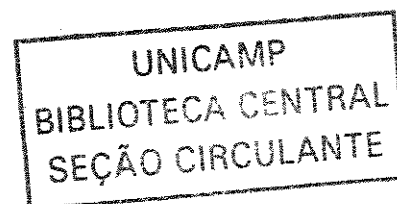
Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Aline Dias Brandão  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*SM Recco Pimentel*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do Título de Mestre em  
Biologia Celular e Estrutural na área de  
Biologia Celular.

Orientador: Profa.Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel

Co-Orientador: Prof.Dr. Lyderson Facio Viccini



|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE    | Re                                  |
| Nº CHAMADA | T/UNICAMP                           |
|            | B733c                               |
| V          | EX                                  |
| TOMBO BCI  | 53876                               |
| PROC.      | 124103                              |
| C          | <input type="checkbox"/>            |
| D          | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO      | R\$ 11,00                           |
| DATA       | 20/05/03                            |
| Nº CPD     |                                     |

CM00184053-1

BIB ID 293996

## FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

### BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

**B733c**

**Brandão, Aline Dias**

Citogenética comparativa dos gêneros *Lippia*, *Lantana* e *Aloysia* (Verbenaceae, Lamiales)/ Aline Dias Brandão. --  
Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel

Co-Orientador: Lyderson Facio Viccini

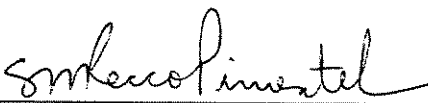
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia

1.Citogenética. 2.Cariótipos. 3.Plantas medicinais. 4.Vegetais.  
I.Recco-Pimentel, Shirlei Maria. II.Viccini, Lyderson Facio.  
III.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV.Título.

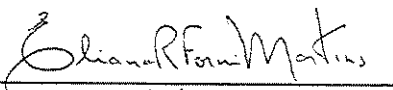
**Campinas, 14 de fevereiro de 2003**

**BANCA EXAMINADORA**

Profa.Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel (Orientadora)

  
Assinatura

Profa.Dra. Eliana Regina Forni Martins

  
Assinatura

Profa.Dra. Lisete Chamma Davide

  
Assinatura

Prof.Dr. Ricardo Augusto Lombello

\_\_\_\_\_  
Assinatura

20087872

Aos meus pais e aos meus irmãos.



*“Uma longa viagem começa  
com um único passo”.*

**Lao-Tse.**

*“O importante, é transformar as pedras  
de nosso caminho, em degraus para  
se transpassar os obstáculos que nele  
surgem”.*

**Anônimo**

*“Ver o que está à frente de nossos  
olhos exige um esforço constante”.*

**George Orwell.**

*“Se vi mais longe, foi por ter-me  
colocado nos ombros de gigantes”.*

**Isaac Newton.**

### *Agradecimentos*

À Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, pela valiosa oportunidade concedida, pela indispensável orientação, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pelo apoio prestado para o desenvolvimento deste trabalho e acima de tudo pela confiança, credibilidade e amizade, que tanto contribuíram em mais uma etapa de minha formação acadêmica e profissional.

Ao Dr. Lyderson Facio Viccini, pela orientação, ensinamentos, incentivo e grande apoio, para o desenvolvimento desse trabalho e acima de tudo pela grande amizade, confiança e credibilidade dada ao meu trabalho, que fizeram superar a grande distância, indispensável para o desenvolvimento deste trabalho, minha formação acadêmica e profissional.

A Dra. Eliana Regina Forni-Martins, pela disponibilidade, grande atenção dispensada, ajuda, apoio e acima de tudo pelas valiosíssimas discussões, que muito contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

A Dra. Fatima Regina Salimena pelo grande apoio, incentivo, sugestões e ajuda na identificação das espécies e coleta de botões florais de *A. virgata*.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento do projeto na forma de bolsa concedida a A.D.B.

Aos professores, Dr. André L. L. Vanzela, pela realização da técnica de FISH, Dra. Vera N. Solferini por permitir o uso da casa de vegetação, Dr. Ivany F. M. Válio e Fabiano M. Scarpa pela coleta das sementes de *A. virgata*, Dr. Angelo L. Cortelazzo pela permissão para o uso da câmara de germinação, Paulo H. P. Peixoto, pela cultura *in vitro* da espécie *L. camara*, Patricia L. Carneiro, pelas tentativas para a germinação das sementes da espécie *L. camara*, Dra. Rossana C. N. de Melo pela permissão ao uso do microscópio e fotomicroscópio do laboratório de Biologia Celular - UFJF e ao professor Raúl M. G. Garcia, por permitir livre acesso ao Departamento de Biologia da UFJF.

Aos membros da pré-banca (Dra. Eliana R. Forni-Martins; Dra. Lisette C. Davide e Dr. Ricardo A. Lombello), pelas valiosas sugestões.

Aos técnicos, Maria do Rosário R. dos Santos, Pedro Maria, Iara de F. Bressan e Klélia A. Carvalho pelo auxílio técnico prestado para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos e colegas de Laboratório de Genética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, Rosana Pezzin, Mateus R Pereira, Patricia M. O. Pierre, José Marcello S. de Campos, Elisson A. C. Romanel, Ana Luisa C. Lima e Milene M. Praça pela grande ajuda prestada na coleta das espécies.

Aos grandes amigos Rosana Pezzin, Mateus R Pereira, Patricia M. O. Pierre, José Marcello S. de Campos, Lilian R. Medeiros, Maristela Miyamoto, Eliane Antonioli, Carla S. L. de Assis, Sérgio S. Júnior, Claudia L. Yano e Estela M. Gonçalves, por todo o apoio, paciência, incentivo, solidariedade, auto-confiança, aprendizado e principalmente amizade, que muito contribuirá para o meu crescimento humano e profissional.

Aos colegas de curso e laboratório que tornaram mais agradável e interessante esta fase de minha vida, Ana Luisa S. Azevedo, Saulo M. de Sousa, Kelly F. Cruz, Carolina D. Boaventura, Vinícius S. Nunes, Fabrício A. Oliveira, Débora C. S. Costa, Rosana Kolb, José Francisco de Souza, Luciana B. Lourenço, Carmem S. Busin, Marta D. S. Scott, Odair A. Júnior, Yeda R. S. D. Quinderé, Ana Cristina P. V. Menoncello e Samanta C. Vieira.

À secretaria do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, pelo auxílio prestado em especial a Lílíam A. S. Panagio, Sidnei H. Simões e Sílvia H. B. Kalaf.

Aos meus pais e irmãos que sempre me incentivaram e apoiaram para a idealização deste trabalho, estando presente sempre em minhas realizações.

Ao meu namorado Sérgio F. S. F. Lopes que sempre me incentivou e apoiou todas as minhas decisões, além de compreender minha constante ausência, para a realização desse trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Resumo .....                                                                                          | 10 |
| 2. Abstract .....                                                                                        | 12 |
| 3. Introdução Geral .....                                                                                | 13 |
| 3.1. Importância do estudo de plantas medicinais .....                                                   | 13 |
| 3.2. Família Verbenaceae .....                                                                           | 14 |
| 3.3. Os gêneros e as espécies em estudo .....                                                            | 14 |
| 3.3.1. <i>Lippia</i> L. ....                                                                             | 14 |
| 3.3.2. <i>Aloysia</i> Ort. & Patau .....                                                                 | 15 |
| 3.3.3 <i>Lantana</i> L. ....                                                                             | 16 |
| 3.4. Citogenética .....                                                                                  | 17 |
| 3.4.1. Ferramenta de estudo em alguns grupos vegetais .....                                              | 17 |
| 3.4.2. Cariótipo .....                                                                                   | 18 |
| 3.4.3 Estudo da Heterocromatina .....                                                                    | 19 |
| 3.4.4. Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) .....                                                   | 21 |
| 3.4.5 Meiose .....                                                                                       | 25 |
| 3.4.6. Citogenética da família Verbenaceae .....                                                         | 27 |
| 4. Justificativa .....                                                                                   | 29 |
| 5. Objetivo .....                                                                                        | 30 |
| 6. Referências bibliográficas .....                                                                      | 31 |
| 7. Artigos .....                                                                                         | 50 |
| 7.1. Caracterização mitótica e meiótica de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown<br>(Verbenaceae) ..... | 52 |
| 7.1.1. Resumo .....                                                                                      | 53 |
| 7.1.2. Introdução .....                                                                                  | 53 |
| 7.1.3. Materias e métodos .....                                                                          | 55 |
| 7.1.4. Resultados .....                                                                                  | 58 |
| 7.1.5. Discussão .....                                                                                   | 59 |

|                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.1.6. Referências bibliográficas .....                                                                                                                 | 64  |
| 7.1.7. Legendas .....                                                                                                                                   | 70  |
| 7.1.8. Figuras .....                                                                                                                                    | 71  |
| 7.2. Caracterização citogenética de <i>Aloysia virgata</i> Ort. & Patau (Verbenaceae),<br>com evidências de um novo número diplóide para o gênero ..... | 78  |
| 7.2.1. Resumo .....                                                                                                                                     | 79  |
| 7.2.2. Introdução .....                                                                                                                                 | 79  |
| 7.2.3. Materias e métodos .....                                                                                                                         | 80  |
| 7.2.4. Resultados .....                                                                                                                                 | 84  |
| 7.2.5. Discussão .....                                                                                                                                  | 85  |
| 7.2.6. Referências bibliográficas .....                                                                                                                 | 89  |
| 7.2.7. Legendas .....                                                                                                                                   | 94  |
| 7.2.8. Figuras .....                                                                                                                                    | 95  |
| 7.3. Caracterização citogenética de <i>Lantana camara</i> L. (Verbenaceae) da flora<br>brasileira .....                                                 | 102 |
| 7.3.1. Resumo .....                                                                                                                                     | 103 |
| 7.3.2. Introdução .....                                                                                                                                 | 103 |
| 7.3.3. Materias e métodos .....                                                                                                                         | 105 |
| 7.3.4. Resultados .....                                                                                                                                 | 109 |
| 7.3.5. Discussão .....                                                                                                                                  | 110 |
| 7.3.6. Referências bibliográficas .....                                                                                                                 | 114 |
| 7.3.7. Legendas .....                                                                                                                                   | 120 |
| 7.3.8. Figuras .....                                                                                                                                    | 121 |
| 8. Conclusões Gerais .....                                                                                                                              | 127 |

## 1. RESUMO

Os gêneros *Lippia*, *Aloysia* e *Lantana* são morfologicamente muito semelhantes e apresentam diversos problemas taxonômicos para delimitação de suas espécies e dos próprios gêneros. No presente trabalho, as espécies *Lippia alba*, *Aloysia virgata* e *Lantana camara*, da flora brasileira, foram caracterizadas através da análise de células mitóticas e meióticas. Diversas fases do ciclo celular meiótico foram identificadas e caracterizadas. Observou-se o comportamento normal dos cromossomos e a formação de 15, 18 e 22 bivalentes durante o diplóteno e diacinese, para as espécies *L. alba*, *A. virgata* e *L. camara*, respectivamente. A análise das células mitóticas permitiu um estudo detalhado do cariótipo das três espécies. *L. alba* apresentou um número diplóide de  $2n = 30$  cromossomos, metacêntricos e submetacêntricos, dois pares com constrição secundária, cerca de 52 % de heterocromatina especialmente rica em AT, três pares com as regiões organizadoras do nucléolo (NORs) na região telomérica dos cromossomos, e um par de cromossomos portando sítios de rDNA 5S. Através dessas análises foi possível diferenciar *L. alba* de *L. geminata*, espécies sinonimizadas morfologicamente. *A. virgata* apresentou  $2n = 36$  cromossomos, todos metacêntricos, dois pares portando constrição secundária e dois pares com NORs, cerca de 64 % de heterocromatina especialmente rica em AT e um par de cromossomo com sítios de rDNA 5S. *L. camara* apresentou  $2n = 44$  cromossomos metacêntricos, quatro pares com constrição secundária e três pares de cromossomos carregando as NORs, cerca de 68 % de heterocromatina especialmente rica em CG e dois pares de cromossomos com sítios de rDNA 5S. A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) mostrou-se um importante marcador citogenético, permitindo sugerir uma origem diplóide para as espécies *L. alba* e *A. virgata* (com  $2n = 2x = 30$  e 36, respectivamente). A espécie *L. camara* possivelmente tenha uma origem poliplóide ( $2n = 4x = 44$ ) apesar da presença constante de bivalentes durante a meiose. Caracterizou-se também a morfologia do núcleo interfásico em células mitóticas para as três espécies, *L. alba* apresentou núcleo areticulado e *L. camara* e *A. virgata* apresentaram núcleos semi-reticulados. Através da análise dos cariótipos foi possível diferenciar as três espécies, corroborando diversos estudos morfológicos, que colocam esses gêneros como entidades taxonômicas distintas.

No entanto, sugere-se que outras espécies sejam analisadas afim de verificar se esses parâmetros citogenéticos poderão ser utilizados como marcadores gerais para cada gênero.

## 2. ABSTRACT

*Lippia*, *Aloysia* and *Lantana* genera are morphologically very similar and present several taxonomic problems at the establishment of their species and their own genera. In this work, the *Lippia alba*, *Aloysia virgata* and *Lantana camara* from Brazilian flora were characterized through the analyses of mitotic and meiotic cells. Several phases of the cellular cycle were identified and characterized. It was observed the normal behaviour of the chromosomes and the formation of 15, 18 and 22 bivalents during the diplotene and diakinesis stages for the *L. alba*, *A. virgata* and *L. camara*, respectively. The analysis of mitotic cells allowed a detailed study of the three species karyotype. *L. alba* presented a diploid number of  $2n = 30$  metacentrics and submetacentrics chromosomes, two pairs with secondary constriction, about 52% of especially AT-rich heterochromatin, three pairs with nucleolar organizer regions (NORs) at the telomeric chromosome region and one chromosome pair with rDNA 5S sites. Through these analysis, it was possible to differ *L. alba* from *L. geminata*, synonymous species at morphological level. *A. virgata* presented  $2n = 36$  metacentric chromosomes, two pairs with secondary constriction, about 64% of especially AT-rich heterochromatin, two pairs with NORs and one pair with rDNA 5S sites. *L. camara* presented  $2n = 44$  metacentric chromosomes, four pairs with secondary constriction, about 68% of especially CG-rich heterochromatin, three pairs with NORs and two chromosome pairs with rDNA 5S. The fluorescent in situ hybridization (FISH) technique has show to be na important cytogenetic marker, allowing the suggestion of a diploid origin for *L. alba* and *A. virgata* species (with  $2n = 2x = 30$  and 36 chromosomes), respectively. *L. camara* specie possibly has a polyploid origin ( $2n = 4x = 44$  chromosomes), besides the constant presence of bivalents during meiosis. It was also characterized intherfasic nucleus morphology in mitotic cells for three species, in which *L. alba* presented areticulate nucleus, while *A. virgata* and *L. camara* presented semi-reticulate nucleus. Through karyotype analysis, it was possible to differ the three species, corroborating several morphological studies, which place these genera as distinct taxonomic entities. However, it is suggested the analysis of other species in order to verity if these cytogenetic parameters could be used as general markers for each genus.



### **3. INTRODUÇÃO GERAL**

#### **3.1. Importância do estudo de plantas medicinais**

A pesquisa de novas drogas a partir de recursos naturais, especialmente a partir de plantas, vem ganhando grande importância nos últimos dez anos (Drews, 2000). Atualmente, o mercado mundial de fitoterápicos está avaliado em 12,4 bilhões de dólares. No Brasil, somente o mercado interno no ano de 1994 movimentou cerca de 355 milhões de dólares (Mendelsohn & Balick, 1995; Ferreira *et al.*, 1998).

A vegetação, em particular a tropical, tornou-se importante foco para obtenção de fitoterápicos em função da rica biodiversidade que abriga, fonte potencial de princípios ativos para utilização na medicina no combate às mais variadas doenças (Farnsworth & Soejarto, 1991; Drews, 2000). A grande difusão da fitoterapia tem estimulado as pesquisas e propiciado a extração de novas e eficazes drogas a partir de plantas (Jain, 1994; Brito, 1996; Goldman, 2001; Rates, 2001; Talalay & Talalay, 2001). Paralelamente, é reconhecido o fato de que apenas pequena parcela dessa biodiversidade foi estudada (Farnsworth & Soejarto, 1991). Prova disso é que os 122 produtos químicos extraídos de plantas mais utilizados no mundo foram isolados de menos de 94 espécies, representantes de um universo de aproximadamente 250.000 espécies vegetais (Principe, 1991; Elisabetsky & Costa-Campos, 1996; Soejarto, 1996; Soejarto *et al.*, 1996; Wilson, 1997; Fabricant & Farnsworth, 2001).

Os trabalhos com plantas medicinais ganharam grande impulso no Brasil a partir de um Programa de Pesquisas com Plantas Medicinais (PPPM) estabelecido pela Central de Medicamentos (CEME), que elaborou uma lista de 74 espécies de plantas consideradas importantes (Ferreira *et al.*, 1998).

Como instrumento de análise da biodiversidade, a taxonomia clássica frequentemente tem se baseado apenas em características morfológicas. Informações citogenéticas têm contribuído de forma complementar ou mesmo na reformulação de hipóteses filogenéticas, ambientais ou fisiológicas (Stebbins, 1971; Qumsiyeh & Baker, 1988; Stevens & Bougourd, 1991; Poggio *et al.*, 1993; Singh, 1993; Hoshino & Waterway, 1994; Duarte & Caparroz, 1995; Thomas, 1995; Dematteis, 1998). Os estudos citogenéticos também têm contribuído no sentido de ampliar a utilização de recursos naturais. Lamaison & Carnat

(1988), trabalhando com *Achillea millefolium* (mil-folhas), uma planta medicinal utilizada principalmente como antiespasmódica e antiinflamatória, relacionaram o teor de princípio ativo de três sub-espécies à diferenças no número cromossômico, constatando que a sub-espécie com maior número de cromossomos apresentou maior quantidade de princípio ativo. No que diz respeito ao estudo das plantas medicinais, a família Verbenaceae foi incluída entre uma das mais importantes, já que possui várias espécies com ação medicinal comprovada. Os trabalhos oriundos dos estudos na família concentraram-se principalmente nas áreas toxicológica e terapêutica, sendo poucos estudos destinados ao conhecimento e à conservação da biodiversidade (Brito & Brito, 1993).

### **3.2. A família Verbenaceae**

A família Verbenaceae está incluída na sub-classe Asteridae e ordem Lamiales (Judd *et al.*, 1999). Ocorre praticamente em todos os ecossistemas terrestres, sendo uma das cinco famílias mais importantes entre as dicotiledôneas dos campos rupestres (Giulietti *et al.*, 1987). A família inclui, segundo Cronquist (1988), aproximadamente 2600 espécies reunidas em 100 gêneros com distribuição pantropical. Um estudo taxonômico mais recente baseado na morfologia e seqüenciamento do gene *rbcL* de cloroplasto (enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase), coloca a família Verbenaceae como monofilética, incluindo a subfamília Verbenoideae. A família possui ainda, 36 gêneros e 1035 espécies (Judd *et al.*, 1999).

Diversos gêneros dentro da família têm sido motivo de destaque em função de suas propriedades medicinais e ornamentais, destacando-se entre eles os gêneros *Aloysia*, *Lantana*, e principalmente *Lippia* (Salimena-Pires, 1991; Bonzani *et al.*, 1997; Salimena, 2000).

### **3.3. Os gêneros e as espécies em estudo**

#### **3.3.1. *Lippia* L.**

O gênero *Lippia* (Verbenaceae, Lamiales) foi descrito por Linnaeu em 1753. Segundo Salimena (2000), esse gênero reúne cerca de 200 espécies, principalmente distribuídas nos trópicos e subtropicais, com três centros de diversidade, Brasil, Argentina e México. O

Brasil é o maior deles, com aproximadamente 111 espécies. Contudo, a estimativa do número de espécies no gênero tem sido sempre motivo de muita controvérsia. De acordo com características morfológicas, autores como Schauer (1847), Bentham & Hooker (1876) e Briquet (1897), consideravam os gêneros *Aloysia*, *Acantholippia* e *Phyla* como sinônimos, seções ou subgêneros de *Lippia*. O mesmo ocorre com Nash & Nee (1984) que não aceitaram a segregação desses a partir de *Lippia*. Outros autores como Troncoso (1974), Botta (1980) e Salimena (2000) consideram os gêneros acima citados distintos. Méndez-Santos (1993) apresentou uma discussão sobre a validade dos Gêneros *Phyla* e *Aloysia*, considerados segregados a partir de *Lippia*. Considerando tais controvérsias, é possível que a abordagem dada até o momento não tenha sido suficiente para esclarecer com precisão as questões taxonômicas dentro do grupo (Salimena, 2000).

Espécies do gênero apresentam propriedades medicinais comprovadas, destacando-se entre elas *Lippia alba* (MILL.) N.E. BR., cujos constituintes químicos têm ação sedativa, antiespasmódica, estomáquica, diurética, antireumática, entre muitas outras (Bezerra, 1981; Khishore *et al.*, 1983; Pio-Correa, 1984; Albuquerque, 1989; Di-Stasi *et al.*, 1989; Dwivedi *et al.*, 1990; Gomes, 1990; Kishore & Mishra, 1991; Correa, 1992; Gomes *et al.*, 1993; Santos, 1996; Costa, 1998; Vale *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2000; Viana *et al.*, 2000).

*Lippia alba*, também conhecida como erva-cidreira, é semi-arbustiva podendo chegar a dois metros de altura. Floresce e frutifica durante todo o ano e em função de suas inúmeras propriedades medicinais a espécie recebe amplo destaque no gênero (Salimena, 2000).

### **3.3.2. *Aloysia* Ort. & Palau.**

O gênero *Aloysia* (Verbenaceae, Lamiales) foi descrito por Ortega & Patau em 1807 e apresenta-se amplamente distribuído nas Américas, desde o Sul dos EUA e México até o norte da Patagônia, reunindo aproximadamente 30 espécies (Botta, 1979; Troncoso, 1980).

As espécies incluídas no gênero apresentam ampla semelhança com o gênero *Lippia*, criando vários sistemas de classificação na família (Salimena-Pires, 1991).

Neste gênero também há relatos de espécies com propriedades medicinais, cujos constituintes químicos possuem ação digestiva, estimulante, antigripal, antiespasmódica,

antimalária, além da utilização industrial de sua madeira na fabricação de implementos agrícolas (Troncoso, 1974; Lopez-Palacios, 1977; Botta, 1979; Bonzani *et al.*, 1997; Andrada *et al.*, 1998; Baelmans *et al.*, 2000; Sanders, 2001).

*Aloysia virgata*, também conhecida como “lixreira”, apresenta-se distribuída geograficamente pelo Brasil, Paraguai, Bolívia, Peru e norte da Argentina (Botta, 1979). *A. virgata* é semi-arbustiva podendo chegar a quatro metros de altura, floresce e frutifica apenas uma vez por ano (setembro a janeiro). A espécie destaca-se por apresentar flores e folhas fortemente aromáticas, sendo cultivada para atrair diversos tipos de abelhas, recebendo destaque no gênero (Salimena-Pires & Giulietti, 1998).

### 3.3.3. *Lantana* L.

O gênero *Lantana* (Verbenaceae, Lamiales) foi descrito por Linnaeus em 1753 e atualmente compreende de 150 a 270 taxa (Cronquist, 1981; Moldenke, 1983). Apresenta distribuição neotropical, com poucos representantes nativos na Ásia e África (Moldenke, 1973). Esta distribuição foi ampliada pelo cultivo de várias espécies sob centenas de nomes vulgares (Howard, 1969; Ghisalberti, 2000).

O gênero *Lantana* se destaca por apresentar espécies com diversas propriedades anti-reumáticas, estomáquicas, estimulantes, febrífugas, sudoríficas e contra afecções bronco-pulmonares. Existem relatos da utilização de espécies no controle biológico e como repelente de determinados insetos, além do uso terapêutico contra doenças como câncer, malária e úlceras. O gênero possui ainda espécies com propriedades tóxicas e outras com características ornamentais (Lopez-Palacios, 1977; Pio-Correa, 1984; Sinha & Sharma, 1984; Weenen *et al.*, 1990; Herbert & Maffrand, 1991; Morton, 1994; Siddiqui *et al.*, 1995; Dua *et al.*, 1996; Kaushik, 1996; Wollenweber *et al.*, 1997; Baars & Neser, 1999; Broughton, 2000; Ghisalberti, 2000; Pereira & Barreto, 2001; Sanders, 2001; Day & McAndrew, 2002).

*Lantana camara*, também conhecida como cambará de espinhos, é nativa da América Tropical (Sinha & Sarma, 1984) e apresenta a maior distribuição geográfica entre as espécies do gênero, é semi-arbustiva podendo chegar a dois metros de altura, floresce e frutifica durante todo o ano (Silva, 1999). A mudança sucessiva e natural da cor de suas

flores e a presença de inúmeras propriedades medicinais levou a espécie a receber amplo destaque no gênero (Morton, 1994; Silva, 1999).

### **3.4. Citogenética**

#### **3.4.1. Ferramenta de estudo em alguns grupos vegetais**

A citogenética tem sido utilizada como ferramenta fundamental na elucidação de problemas taxonômicos ou mesmo na reformulação de hipóteses filogenéticas em muitos grupos vegetais, uma vez que o cariótipo é geralmente conservado, sendo uma característica muito mais constante na espécie do que a maioria dos parâmetros morfológicos ou bioquímicos sujeitos a constantes alterações devido às variações ambientais (Stebbins, 1971; Guerra, 1988; Qumsiyeh & Baker, 1988; Stace, 1989; Stevens & Bougourd, 1991; Poggio *et al.*, 1993; Singh, 1993; Hoshino & Waterway, 1994; Duarte & Caparroz, 1995; Thomas, 1995; Dematteis, 1998; Judd *et al.*, 1999 e Guerra *et al.*, 2000; Stace, 2000). No que diz respeito às plantas medicinais, uma classificação taxonômica precisa é de fundamental importância para que se tenha real controle do material de interesse. Schnack & Covas (1945) segregaram o gênero *Glandularia* a partir do gênero *Verbena*, utilizando parâmetros citogenéticos.

Várias metodologias citogenéticas podem ser realizadas a fim de ajudar na diferenciação ou mesmo na caracterização das espécies ou grupos em estudo, tais como identificação do número cromossômico, análise do cariótipo (tamanho dos cromossomos, posição do centrômero e presença de constrições nos cromossomos), estudo da heterocromatina através das técnicas de bandamento C e fluorocromos e detecção da região organizadora do nucléolo (NOR), através das técnicas de impregnação por prata (Ag-NOR) e hibridação *in situ* fluorescente (FISH), além da detecção de sequências de DNA repetitivo, como rDNA 5S. A citogenética permite ainda, através de análises em células meióticas estudar o comportamento dos cromossomos, verificar o nível de ploidia, identificar híbridos, que ocorrem com grande frequência em vegetais e verificar a regularidade no processo de reprodução sexuada, através da fertilidade (Singh, 1993; Stace 2000).

### 3.4.2. Cariótipo

O estudo do cariótipo é um importante instrumento na definição de uma espécie, já que permite reconhecer o número básico do grupo, contribuindo assim, de forma importante em estudos citotaxonômicos (Stace, 2000; Pitrez *et al.*, 2001). No entanto, os cariótipos podem sofrer alterações numéricas através da perda ou adição de cromossomos. As variações numéricas também podem ocorrer através de processos de fusão ou fissão, sem que haja perda ou ganho aparente de material genético crítico. O tamanho, a posição do centrômero, a presença de constrições, o número de NORs e a identificação de seqüências repetitivas, são importantes variações que podem ocorrer nos cromossomos e são utilizados em estudos comparativos na diferenciação de diversas espécies (Sharma & Datta, 1959; Roy & Singh, 1967; Federov, 1969; Fouzard & Tandon, 1975; Lavania & Sharma, 1980; Narayan & Durrant, 1983; Kuryan & Narayan, 1987; Broich, 1989; Murray *et al.*, 1992; Battistin & Fernández, 1993; Battistin & Fernández, 1994; Stace, 2000; Pitrez *et al.*, 2001).

Guerra (1982) diferenciou espécies do gênero *Crepis* a partir de padrões de banda. C. Sanso & Hunziker (1998) diferenciaram espécies do gênero *Alstroemeria* e *Bomarea* a partir de variações no cariótipo (variação no número cromossômico, variação no tamanho dos cromossomos, além da variação no número e posição das constrições secundárias). Battistin *et al.* (1999) analisaram 15 populações e quatro espécies de *Lathyrus* L. e concluíram que todas eram diplóides com origem diplóide  $2n = 2x = 14$  cromossomos. As espécies foram diferenciadas a partir de diversas variações no cariótipo, tais como posição da constrição secundária e do centrômero, número de constrições secundárias e variação no tamanho dos cromossomos. Guerra & Félix (2000) diferenciaram espécies do gênero *Nothoscordum* a partir de diferenças relacionadas à distribuição de bandas C, fluorocromos e cístrons ribossomais. Pitrez *et al.* (2001) caracterizaram espécies da família Commelinaceae a partir do número cromossômico, de padrões de banda C e presença de constrições secundárias. Raina *et al.* (2001) diferenciaram espécies de *Vicia* a partir do mapeamento de genes rRNA 18S-5,8S-26S e 5S.

### 3.4.3. Estudo da heterocromatina

Heitz (1928) definiu como heterocromatina segmentos cromossômicos que permaneciam condensados durante todo o ciclo celular. Brown (1966) concluiu que existem pelo menos dois tipos de heterocromatina: a facultativa, que é definida como um tipo de cromatina que ora se comporta como heterocromatina e ora se comporta como uma típica eucromatina, e a heterocromatina constitutiva, que permanece condensada durante todo o ciclo celular em todas as células do indivíduo e geralmente encontra-se em blocos, na mesma posição e na mesma quantidade nos cromossomos homólogos. A heterocromatina constitutiva é caracterizada pela presença de seqüências de DNA curtas altamente repetitivas e transcricionalmente inativas (John, 1988; Sumner, 1990; Redi *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2002).

A presença de grande quantidade de heterocromatina é uma característica que ocorre em alguns grupos vegetais. A sua presença representa um fator importante em estudos evolutivos e seu aumento pode estar relacionado ao aumento da biomassa dos organismos (Edelman & Lin, 1995). Alguns relatos sugerem que homens apresentam a síndrome do XYY são mais altos que homens normais. Homens que possuem dois cromossomos X e dois Y, são até 5 cm maiores que homens XYY. A justificativa para essa diferença de altura estaria relacionada ao braço longo do cromossomo Y, já que o mesmo apresenta alta quantidade de heterocromatina (Ford, 1973). Evidências também sugerem que a heterocromatina interfere na replicação do DNA, no volume nuclear, no tamanho da célula, na estrutura do cromossomo e na expressão gênica, além, de influenciar na organização do genoma, no ciclo celular, na taxa de desenvolvimento e na evolução dos organismos (Van't Holf & Sparrow, 1963; Bennett, 1977; Redi *et al.*, 2001). Existem relatos sobre a utilização da variação de heterocromatina em estudos de cariosistemática, filogenia e na solução de problemas genéticos (Schwarzacher *et al.*, 1980; Artoni *et al.*, 1999; Grif, 2000). Alguns autores defendem a idéia de que a existência de pouca heterocromatina no cariótipo indica uma condição plesiomórfica e muita heterocromatina indica uma condição apomórfica para a espécie (Greilhuber, 1979; Ikeda, 1988; Morawetz & Samuel, 1989; Roser, 1994; Redi *et al.*, 2001). Esta característica é considerada uma tendência geral para os grupos vegetais em níveis supra e infra-genéricos, comumente interpretado como um acúmulo de

heterocromatina durante a evolução. Estudos da diferenciação longitudinal em cromossomos de algumas espécies de *Sesbania* sugeriram que a presença de muita heterocromatina indicaria uma linha evolutiva diferenciada para o gênero, enquanto que uma pequena quantidade de heterocromatina representa uma condição ancestral para o grupo (Forni-Martins & Guerra, 1999). Conclusões similares também foram sugeridas anteriormente por Greilhuber *et al.* (1981) e Moscone *et al.* (1996) para outros taxa estudados. Guerra *et al.* (2000) utilizaram variações observadas na quantidade de heterocromatina e padrões de bandamento em Aurantioideae como ferramenta na identificação de híbridos intergenéricos no grupo.

Para detecção da heterocromatina constitutiva utiliza-se normalmente a técnica de bandamento C. Entretanto, pode ser utilizada também a coloração com fluorocromos, como 4'-6' diamidino-2-fenilindol (DAPI) que detecta heterocromatina constitutiva rica em pares de base AT, e cromomicina A (CMA) que detecta regiões ricas em CG, permitindo uma análise quantitativa mais detalhada das regiões heterocromáticas. Para identificação de outros padrões de bandamento, podem ser utilizadas metodologias como bandamento N e Ag-NOR (Sumner, 1990).

O bandamento C foi descoberto por Pardue & Gall (1970) que sugeriram que as regiões evidenciadas eram constituídas basicamente por DNA altamente repetitivo, denominado de DNA satélite. Posteriormente, foi encontrado DNA altamente repetitivo nas regiões banda C-positivas em várias espécies. No entanto, existem casos por exemplo, em que a região centromérica do cromossomo 10 em hamster chinês mostrou-se completamente positiva para a técnica de banda C, mas não apresentava alta proporção de DNA repetitivo (Arrighi *et al.*, 1974).

O mecanismo bioquímico para explicar o bandamento C foi proposto por Holmquist (1979), que detectou uma extração diferencial do DNA, apresentando basicamente três etapas: tratamento ácido, onde ocorre a remoção de purinas do DNA; tratamento alcalino, que provoca  $\beta$ -eliminação da ribose que sofreu depurinação e desnatura irreversivelmente o DNA; e um tratamento salino, que remove os segmentos de DNA quebrados. Acredita-se que a extração diferencial do DNA ocorra mais lentamente nas regiões da heterocromatina



constitutiva, embora não se conheça exatamente o motivo dessa sensibilidade diferencial ao método (Sumner, 1990).

A grande importância da utilização dessa técnica deve-se principalmente, à identificação dos cromossomos através da quantidade e ou posição das bandas nos respectivos cromossomos, sendo possível uma análise mais detalhada do cariótipo da espécie. Em grupos vegetais ainda são poucos os gêneros estudados com essa técnica. No entanto, existem relatos recentes da análise da heterocromatina com o auxílio de fluorocromos. Em diversos grupos vegetais, vários autores têm relatado que a heterocromatina constitutiva é rica em AT (Schwarzacher & Schweizer, 1982; Guerra, 1987b; Felix & Guerra, 2000; Yen-Yu *et al.*, 2001; Besendorfer *et al.*, 2002). A heterocromatina constitutiva rica em CG tem sido frequentemente detectada associada às regiões organizadoras do nucléolo (NORs) (Schweizer, 1976; Deumling & Greilhuber, 1982; Guerra, 1987; Moscone *et al.*, 1995, 1996; Forni-Martins & Guerra, 1999; Guerra *et al.*, 2000; Yen-Yu *et al.*, 2001), característica que Sinclair & Brown (1971) consideraram como regra em grupos vegetais. Contudo existem também relatos de heterocromatina constitutiva rica ou moderadamente rica em AT associada a NOR (Geber & Schweizer, 1987; Guerra *et al.*, 2000; Besendorfer *et al.*, 2002).

#### **3.4.4. Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs)**

As NORs têm sido extensivamente estudadas quanto a sua estrutura e função, sendo consideradas um importante marcador citogenético para o estudo citotaxonômico (Spies, 1984; Sumner, 1990). As NORs são sítios cromossômicos formados por inúmeras unidades repetidas “*in tandem*”, cada uma contendo os genes que codificam os RNA ribossomais (rRNA) 18S, 5.8S e 26S, os quais estão separados por segmentos intercalares transcritos (ITS) (Long & Dawid, 1980; Miller, 1981; Sumner, 1990; Heslop-Harrison, 2000). Além dessas seqüências, cada unidade repetitiva dos “*clusters*” de DNA ribossomal (rDNA) apresenta uma seqüência externa transcrita (ETS) que antecede a seqüência correspondente ao rRNA 18S (Mello, 2001; Alberts *et al.*, 2002) e cada unidade encontra-se separada da outra por uma seqüência denominada espaçador intergênico (IGS).

As NORs normalmente são ricas em CG, principalmente nas regiões que codificam os rRNAs 18S, 5.8S e 26S (Schweizer, 1976; Deumling & Greilhuber, 1982; Guerra, 1987b; Sumner, 1990; Moscone *et al.*, 1995, 1996; Forni-Martins & Guerra, 1999; Guerra *et al.*, 2000; Yen-Yu *et al.*, 2001) e geralmente são regiões de constrições secundárias, (Henderson *et al.*, 1972; Hsu *et al.*, 1975; Besendorfer *et al.*, 2002). No entanto, algumas evidências mostram que nem todas as NORs aparecem como constrições secundárias (Moscone *et al.*, 1995).

A transcrição das NORs na intérfase promove a formação de nucléolos, que são constituídos por proteínas relacionadas ao processo de transcrição de genes ribossomais que representam cerca de 85%, além de DNA e RNA ribossomais que podem representar até 17% e 10%, respectivamente (Mello, 2001). Nos nucléolos ocorre a síntese do transcrito primário, seu processamento para a produção do rRNA 18S, 5.8S e 26S e a associação desses rRNA com as proteínas ribossomais e o rRNA 5S (sintetizado fora do nucléolo e depois transportado para ele) para a formação das subunidades ribossomais 40S e 60S (Mello, 2001). O tamanho, forma e o número de nucléolos existentes na célula dependem do estado funcional celular, variando conforme a espécie e, dentro de uma espécie, de tecido para tecido e mesmo de célula para célula (Guerra, 1988; Moscone *et al.*, 1995; Mello, 2001, Alberts *et al.*, 2002). As diferenças morfológicas nucleolares que oferecem maiores informações sobre as características relativas às NORs e às suas atividades são tamanho e número. Um aumento na síntese de ribossomos, resultante da ativação de mais NORs, promove uma fusão entre elas e conseqüentemente entre os nucléolos. Quando a célula entra em divisão, ocorre a dispersão do nucléolo, originando vários nucléolos pequenos. Geralmente células que dividem-se pouco apresentam um ou poucos nucléolos (Sumner, 1990; Schwarzscher & Wachtler, 1993; Schwarzscher & Mosgoeller, 2000).

Além de ser o sítio de transcrição de rRNA (18S, 5.8S e 26S), o nucléolo apresenta proteínas não ligadas a biogênese ribossomal que exercem importante papel no controle do ciclo celular, como Cdc4, Mdm2, Pch2 (Schwarzscher & Mosgoeller, 2000; Visintin & Amon, 2000). Responsável também pela síntese de alguns RNAs transportadores de fungos, além da maturação do RNA da partícula de reconhecimento de sinal (SRP) e por

outras modificações pós-transcricionais de pequenos RNAs nucleares (snRNA), tais como a metilação do RNA spliceossomal U6 (Olson *et al.*, 2000).

A detecção das NORs para análise do número, tamanho e a localização cromossômica pode ser feita através da utilização de técnicas citoquímicas, como bandamento N, coloração com cromomicina A (CMA), impregnação por íons de prata (Ag-NOR) ou pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

O bandamento N envolve a extração de ácidos nucléicos e histonas dos cromossomos, seguida pela coloração com Giemsa (Matsui & Sasaki, 1973). No entanto, Faust & Vogel (1974) sugeriram que esse bandamento evidenciaria heterocromatinas específicas adjacentes às NORs e não o rDNA dessas regiões. A técnica proposta em 1973 sofreu inúmeras modificações e mostrou-se capaz de detectar NORs em muitas espécies (Sumner, 1990).

A coloração com CMA ocorre em regiões genômicas ricas em CG, podendo evidenciar não só a NOR, como também muitos outros segmentos ricos em CG, como certas regiões heterocromáticas (Matsuyama *et al.*, 1996; Guerra *et al.*, 2000; De Melo *et al.*, 2001).

A detecção pela impregnação do íon de prata (Ag-NOR) é o método mais utilizado para identificação das NORs, embora detecte apenas as NORs que estiverem funcionalmente ativas na intérfase (Schwarzacher & Ambros, 1979; Fukui & Nakayama, 1996; Besendorfer *et al.*, 2002). Essa técnica foi proposta primeiramente por Howell *et al.* (1975) e sofreu inúmeras modificações ao longo dos anos. O procedimento sugerido por Howell & Black (1980) é o mais utilizado.

O método Ag-NOR baseia-se na afinidade de proteínas ácidas associadas às NORs ativas na intérfase pelo íon da prata. Essas proteínas argirófilas, também conhecidas como proteínas Ag-NOR, permanecem associadas às NORs mesmo durante a mitose e até o paquíteno da meiose. Vários estudos estão sendo desenvolvidos para identificar tais proteínas. Algumas como RNA polimerase I (Scheer & Rose, 1984), nucleolina (Ochs *et al.*, 1983), DNA topoisomerase I (Guldner *et al.*, 1993), p135 (Pfeifle *et al.*, 1986) e UBF (Chan *et al.*, 1991) já foram identificadas. Alguns estudos realizados na observação do aumento nucleolar em células tumorais, sugerem que proteínas envolvidas no preparo dos

genes ribossomais para a duplicação também sejam argirófilas (Trerè *et al.*, 1989). O domínio protéico responsável pela impregnação da prata também está sendo investigado. Alguns pesquisadores acreditam que a afinidade da prata se dá pelo grupo fosfato (Sato & Busch, 1981; Hubbell, 1985), outros, pelos grupos carboxilas (Olert *et al.*, 1979; Buys & Osinga, 1984), existem pesquisadores que afirmam que o grupo argirófilo seja o sulfidril (De Capoa *et al.*, 1982). No entanto os autores que acreditam que a afinidade seja dada pelo grupo fosfato e grupos carboxila não aceitam esta última hipótese. Hernandez-Verdun *et al.* (1993) propuseram que a afinidade pela prata seja promovida pelo domínio ácido amino-terminal das proteínas argirófilas e que seja independente de fosforilação. Os grupos químicos responsáveis pela redução do íon metálico da prata na NOR ainda não são bem conhecidos, sendo necessário portanto, que outros estudos sejam realizados para elucidar melhor a questão.

Apesar do método de impregnação por prata ser o mais utilizado para a detecção das NORs, tanto para animais quanto para vegetais, em alguns casos ela pode se mostrar inespecífica, pois estruturas como cinetocoro, heterocromatina e “cores” cromossômicos também podem ser marcados. Todavia quando essas estruturas são marcadas, podem ser distinguidas facilmente das NORs pela forma e coloração, pois geralmente as NORs aparecem mais escuras e puntiformes (Goodpasture & Bloom 1975; Sumner, 1990; Moscone *et al.*, 1995).

Apesar de vários estudos já terem relatado que algumas NORs podem permanecer inativas (Guerra, 1988; Schwarzacher & Wachtler, 1993; Moscone *et al.*, 1995; Schwarzacher & Mosgoeller, 2000; Besendorfer *et al.*, 2002), pouco se sabe sobre os mecanismos de interação entre as diferentes NORs e das NORs com outras regiões do genoma, que interferem na regulação da atividade de cístrons de rDNA (Sumner, 1990).

A utilização da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para identificação da NOR, é o método mais preciso e específico, uma vez que evidencia todos os cístrons ribossomais (ativos e inativos) das NORs (Goodpasture & Bloom, 1975; Schwarzacher & Ambros, 1979; Besendorfer *et al.*, 2002), tendo grande importância na identificação e distinção entre os cromossomos de uma mesma espécie e entre espécies distintas (Bedbrook *et al.*, 1980; Schubert & Wobus, 1985; Shen *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 1988;

Schwarzacher *et al.*, 1988; Visser *et al.*, 1988; Bergey *et al.*, 1989; Le *et al.*, 1989; Maluszynska & Schweizer, 1989; Mouras *et al.*, 1989; Skorupska *et al.*, 1989; Gustafson *et al.*, 1990; Mukai *et al.*, 1990; Friebi *et al.*, 1991; Griffor *et al.*, 1991; Lapitan *et al.*, 1991; Leitch *et al.*, 1991; Mukai & Gill, 1991; Schwarzacher & Heslop-Harrison, 1991; Wang *et al.*, 1991; Singh, 1993; Fukui & Nakayama, 1996; Raina *et al.*, 2001).

A técnica de hibridação *in situ* foi descrita primeiramente por Gall & Pardue (1969) e John *et al.* (1969). No entanto, a técnica sofreu inúmeras modificações, tendo sido refinada a fim de facilitar o diagnóstico e identificação dos cromossomos, particularmente em humanos e animais (Viegas-Pequignot *et al.*, 1989; Lichter *et al.*, 1990).

A aplicação da técnica de FISH em plantas é pouco utilizada quando comparada com sua utilização em mamíferos, devido a grande dificuldade na obtenção de metáfases sem parede celular e sem citoplasma, que são grandes obstáculos para a utilização da técnica (Singh, 1993). Apesar disso, a técnica vem sendo utilizada nos últimos anos com maior frequência como uma importante ferramenta citogenética. Griffor *et al.* (1991) desenvolveram um método de FISH para detectar sequências repetitivas de DNA em cromossomos mitóticos de células de soja. Guerra *et al.* (1996) utilizaram a técnica de FISH para identificar o número de sítios de rDNA em células de *V. unguiculata* e *P. coccineus*. Schrader *et al.* (1997) analisaram o cariótipo de *Helianthus* utilizando coloração com Giemsa e FISH e Gortner *et al.* (1997) usando FISH localizaram sequências teloméricas no genoma de *Cicer arietinum* L. Vanzela *et al.* (2002) caracterizaram populações diplóides, tetraplóides e hexaplóides de *Helianthus* através da técnica de FISII e Raina *et al.* (2001) e Besendorfer *et al.* (2002), utilizaram outra família de genes (5S rDNA) como marcador citogenético em espécies do mesmo gênero.

### 3.4.5. Meiose

A meiose é considerada o evento mais importante no processo de diferenciação dos organismos, tendo um papel crucial na produção de células reprodutivas (gametas ou esporos) com metade do número cromossômico e nova combinação genética. Esse processo é essencial para a existência de organismos diplóides e é o principal responsável pelo sucesso evolutivo da reprodução sexuada em eucariotos, através da recombinação, além de

ter um importante papel no reparo de células com defeitos genéticos (Holliday, 1984; Fukui & Nakayama, 1996).

A meiose envolve duas divisões consecutivas com apenas uma fase de duplicação do DNA. A meiose I ou divisão reducional é caracterizada pela redução do número cromossômico resultando em duas células haplóides. A primeira fase denominada de prófase I é a mais longa e caracteriza-se pela ocorrência de processos genéticos importantes que contribuem para a variabilidade da espécie. A prófase I é subdividida em 05 fases: leptóteno, que caracteriza-se pelo início da condensação da cromatina em filamentos, apresentando regiões intercalares mais compactas (cromômeros); zigóteno, onde ocorre o emparelhamento dos cromossomos homólogos e o aparecimento do complexo sinaptonêmico; paquíteno, fase em que ocorre a permuta genética e que os cromossomos encontram-se mais condensados e estão completamente emparelhados; diplóteno, caracterizado pela condensação ainda maior da cromatina e presença de quiasmas (regiões onde ocorreu a permuta e que mantém os cromossomos unidos quando inicia-se a separação dos mesmos); diacinese, fase em que os cromossomos estão ainda mais condensados, sendo possível a visualização do emparelhamento. Na metáfase I ocorre o grau máximo de condensação dos cromossomos e sua migração para o plano equatorial da célula. A anáfase I é caracterizada pela migração dos cromossomos homólogos para os polos opostos da célula, reduzindo pela metade o número cromossômico. Na telófase I ocorre a descondensação dos cromossomos e a citocinese, formando duas novas células haplóides, no entanto com uma quantidade de DNA ainda duplicado. A meiose II é caracterizada por ser bem mais rápida e pela ausência de nova síntese de DNA. A prófase II é muito rápida e na metáfase II ocorre a migração dos cromossomos para o plano equatorial da célula. A anáfase II caracteriza-se pela migração das cromátides-irmãs para os polos opostos da célula e a telófase II pela descondensação dos cromossomos e outra citocinese, formando 04 células haplóides com o conteúdo de DNA reduzido (Fukui & Nakayama, 1996; Recco-Pimentel & Junior, 2001; Alberts *et al.*, 2002).

Através de análises em células meióticas é possível observar o comportamento dos cromossomos a fim de identificar diversos eventos como os rearranjos cromossômicos, que podem ser utilizados na construção de mapas citogenéticos. De acordo com sua

estabilidade, podem ajudar na determinação de relações evolutivas entre cromossomos de determinadas espécies. Os rearranjos podem ser detectados através de configurações específicas, oriundas do emparelhamento dos cromossomos e são importantes para verificar a viabilidade das células e detectar a presença de poliplóides ou híbridos. Pode-se ainda, observar possíveis falhas ou distúrbios devido a mutações, ocasionando o aparecimento de diversas anormalidades (Fukui e Nakayama, 1996).

Stevens & Bougourd (1991) detectaram através de um estudo em células meióticas a frequência de variações estruturais nos cromossomos em populações naturais de *Allium schoenoparsum*, observando ainda a presença de populações diplóides e triplóides. Qu *et al.* (1998) identificaram a ocorrência de autopoliploidia em *Vaccinium* através de análises no pareamento dos cromossomos em células meióticas e divergência genômica. Pagliarini *et al.* (2001) caracterizaram o nível de ploidia e o comportamento cromossômico de acessos de *Paspalum* através de análises em células meióticas. Seijo & Fernandez (2001) observaram a formação de bivalentes em *Lathyrus* e a presença de pontes e fragmentos, devido provavelmente a ocorrência de inversões paracêntricas e segregação tardia na anáfase. Esses autores detectaram também a formação de micronúcleos que reduz a viabilidade do pólen, e associaram esse evento com a segregação tardia de alguns cromossomos. Cheng *et al.* (2002) caracterizaram híbridos de *Brassica napus* x *Orychophragmus violaceu* a partir de análises em células meióticas.

Portanto, é importante que os eventos da meiose normal sejam descritos para que possam ser detectadas eventuais alterações do processo em populações naturais.

#### **3.4.6. Citogenética da família Verbenaceae**

Dermen (1936) estudou várias espécies de diferentes seções do gênero *Verbena*, registrando o número básico de cinco cromossomos. Arora (1978) investigou 12 espécies do gênero *Verbena*, e relatou que a maioria delas possuíam 10 cromossomos em suas células somáticas. O mesmo número foi relatado por Poggio *et al.* (1993) para o gênero *Glandularia*. No gênero *Clerodendrum*, as espécies estudadas revelaram uma variação de  $2n = 24$  a  $2n = 184$  cromossomos (Rueda, 1993). Para o gênero *Aloysia* existem apenas cinco, entre as trinta espécies descritas, estudadas citogeneticamente: *A. ligustrina* e *A.*

*polistachia* ( $2n = 36$ ), *A. lycioides* e *A. gratissima* ( $2n = 54$ ) e *A. scorodonioides* ( $2n = 72$ ) (Diers, 1961 apud Corazza-Nunes *et al.*, 1995; Andrada *et al.*, 1998; Covas & Schnack, 1946 apud Corazza-Nunes *et al.*, 1995; Andrada *et al.*, 1998; Corazza-Nunes *et al.*, 1995). No gênero *Lippia*, existem relatos do número cromossômico de *L. juncea* ( $2n = 30$ ) e *L. nodiflora* ( $2n = 36$ ) (Junell, 1934), *L. alba* ( $2n = 30$ ) (Bose & Choudhury, 1960), *L. lanceolata* ( $2n = 32$ ) (Smith, 1966), *L. citriodora* ( $2n = 36$ ) (Navaneethan, 1982), *L. lycioides* ( $2n = 36$ ) e *L. salviaefolia* ( $2n = 24$ ) (Coleman, 1982) e *L. turbinata* ( $2n = 30$ ) (Filippa, 1984). Em um estudo mais recente envolvendo algumas espécies brasileiras foram determinados também o número cromossômico de *L. sidoides*, *L. rosella*, *L. hermannioides*, *L. corymbosa*, *L. pseudothea*, *L. filifolia*, *L. diamantinensis*, *L. florida*, *L. lupulina* (Viccini *et al.*, in prep). Apenas Kumar & Dutt (1988) realizaram estudos citogenéticos referentes ao sistema reprodutivo de algumas espécies de Verbenaceae e relataram o número e o comportamento cromossômico de *L. geminata* ( $2n = 32$ ) e Andrada *et al.* (1998) estudaram o comportamento e a viabilidade do grão de pólen em *L. fissicalyx* ( $2n = 60$ ). O gênero *Lantana* é o que apresenta maior número de relatos sobre o número cromossômico dentro de família Verbenaceae. Foram estudadas populações da espécie *L. trifolia* ( $2n = 48$ ) (Patermann, 1935) e ( $2n = 27$ ) com  $x = 9$  (Sanders, 1987); *L. lilacina* ( $2n = 36$ ), *L. involucrata* ( $2n = 36$ ) e *L. indica* ( $2n = 72$ ) (Natarajan & Ahuja, 1957), além de populações de *L. montevidensis* que apresentaram indivíduos tetraplóide e triplóide, com 48 e 36 cromossomos, respectivamente (Henderson, 1969). Em diversos estudos envolvendo um grande número de populações da espécie *L. camara*, observou-se  $2n = 22$ , 33 e 44 cromossomos (Tjio, 1948; Schnack & Covas, 1947; Singh, 1951; Sen & Sahni, 1955; Tandon & Chandi, 1955; Arora, 1960; Raghavan & Arora, 1960). Uma série poliplóide foi descrita com  $2n = 33$ , 55 e 66 cromossomos (Sen & Sahni, 1955; Sinha *et al.*, 1995; Natarajan & Ahuja, 1957; Raghavan & Arora, 1960; Koul *et al.*, 1979. Choudhary & Roy (1982) relataram a presença de 15 bivalentes e  $2n = 33$  cromossomos em *L. camara* sugerindo anormalidades durante a meiose. Spies (1983-4, 1984) estudou populações do complexo *L. camara* L. da África do Sul e observou variação de  $2n = 22$ , 33, 44, 55 e 66 cromossomos. Sanders (1987) também realizou estudos cromossômicos de populações de *L. camara* do Caribe, identificando triploides como resultado de hibridação entre diplóides



e tetraplóides. Em geral tem sido considerado como número básico para a espécie *L. camara*  $x = 11$  e 12 cromossomos (Sinha *et al.*, 1995; Tandon & Chandi, 1955).

#### 4. JUSTIFICATIVA

A família Verbenaceae apresenta diversos problemas taxonômicos em nível genérico, específico e infra-específico, relatados amplamente por diversos autores (Chamisso, 1832; Schauer, 1847; Bentham & Hooker, 1876; Brinquet, 1897; Chodat, 1902; Moldenke, 1958; Troncoso, 1974; Noamesi, 1977; Botta, 1980; Pio-Corrêa, 1984; Nash & Nee, 1984; Compadre *et al.*, 1986; Gomes, *et al.*, 1993; Valentin *et al.*, 1995; Bonzani *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1998; Zoghbi, 1998; Judd, *et al.*, 1999; Silva, 1999; Salimena, 2000, 2002).

Baseado em estudos morfológicos e anatômicos, vários sistemas de classificação para a família foram propostos por diversos autores (Schauer, 1847, 1851; Bentham & Hooker, 1876; Briquet, 1895; Junell, 1934; Moldenke, 1946; Troncoso, 1974). Essa dificuldade se justifica pela grande semelhança morfológica apresentada por espécies do mesmo gênero e até mesmo por espécies de gêneros próximos. Outra característica observada na família que dificulta sua sistemática é a presença de híbridos naturais, além da ocorrência de poliploidia sugerida por vários autores (Sen & Sahni, 1955; Raghavan & Arora, 1960; Spies, 1983-84, 1984; Sinha & Sharma, 1984; Sanders, 1987 e Ojha & Dayal, 1993). Esses e outros processos naturais poderiam justificar a derivação de novas espécies e a grande dificuldade em diferenciá-las apenas a partir de dados morfológicos. Essas dificuldades se refletem em nível específico e genérico. No primeiro caso, pode-se citar *Lippia geminata* e *Lippia alba* que para alguns autores são sinônimos (Mesa, 1945; Fester *et al.*, 1954, 1960-61; Braga, 1960; Moldenke, 1965) e para outros são espécies distintas (Hegnauer, 1973; Craveiro *et al.*, 1987). Considerando apenas características morfológicas das plantas, existem diversas controvérsias entre os autores com relação à alocação de determinadas espécies nos gêneros, sendo que alguns consideram, por exemplo, os gêneros *Aloysia*, *Acantholippia* e *Phyla*, como sinônimos, seções ou sub-gêneros de *Lippia* (Bentham & Hooker, 1876; Briquet, 1897), enquanto outros os consideram como gêneros distintos (Moldenke, 1959, 1961; Troncoso, 1974; Botta, 1980; Salimena, 2000).

O gênero *Lantana* também apresenta características morfológicas muito próximas a *Lippia*, diferenciando-se apenas pela morfologia do fruto, o que tem levado a classificações incorretas dessas plantas e a uma constante migração de espécies de um gênero para o outro. Existem também problemas na identificação de espécies. Silva (1999) por exemplo, incluiu 10 novos sinônimos para a espécie *Lantana camara*, com base em caracteres vegetativos e da inflorescência. Além disso, existem relatos de poliploidia e aneuploidia cromossômica na família que dificultam ainda mais se estabelecer o número básico para as espécies, já que os estudos citogenéticos que podem auxiliar na taxonomia são escassos e relatam apenas o número cromossômico de algumas espécies da família.

## 5. OBJETIVOS

Em função dos problemas taxonômicos citados para a família Verbenaceae e em especial para os gêneros *Lippia*, *Aloysia* e *Lantana*, e da insuficiência de estudos citogenéticos que possam contribuir para elucidar melhor essas questões, no presente trabalho foram analisadas três espécies, sendo uma de cada gênero, com o objetivo de ampliar os conhecimentos citogenéticos e auxiliar na diferenciação dos gêneros.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter, P. 2002. **Molecular biology of the cell**. Fourth edition. Garland Science. New York. 1464p.
- Albuquerque, J. N. de. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS/MEC, 1989. 96p.
- Andrada, A. B.; Pastoriza, A. & Martincz-Pulido, L. V. 1998. Citogenética en tres especies de Verbenaceas. **Rev. Fac. Agron. (Luz)**. 15: 312-318.
- Arora, C. M. 1960. New chromosome report. **Bull. Bot. Surv. India**, 2, 305.
- Arora, O. P. 1978. Chromosomal differentiation in *Verbena* species. **Cytologia** 43: 525-531.
- Arrighi, F. E.; Hsu, T. C.; Pathak, S. & Sawada, H. 1974. The sex chromosome of the chinese hamster: constitutive heterochromatin deficient in repetitive sequences. **Cytogenetics and Cell Genetics** 13: 268-274.
- Artoni, R. F.; Molina, W. F.; Bertollo, L. A. C. & Junior, P. M. G. 1999. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anostomatus* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). **Genet. Mol. Biol.** 22(1): 39-44.
- Baars, J. R. & Neser, S. 1999. Past and present initiatives on the biological control of *L. camara* (Verbenaceae) in South Africa. **Afric. Entomol. Jun.** 21-33.
- Baelmans, R.; Deharo, E.; Bourdy, G.; Muñoz, V.; Quenevo, C. Sauvain, M. & Ginsburg, H. 2000. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? **J. Ethnopharmacology** 73: 271-275.
- Battistin, A. & Fernández, A. 1993. Bandas C, Q, Hoechst e RON em 4 espécies sul-americanas e uma cultivada de *Lathyrus*. XXXIX Congresso Nacional de Genética, Caxambú, MG. Brasil. **Rev. Bras. Genet.** 16 (supl.): 189.
- Battistin, A. & Fernández, A. 1994. Karyotypes of four species of South America natives and one cultivated species of *Lathyrus* L. **Caryologia** 47: 325-330.
- Battistin, A.; Biondo, E. & Coelho, L. G. M. 1999. Chromosomal characterization of three native and one cultivated species of *Lathyrus* L. in southern Brazil. **Genet. Mol. Biol.** 22 (4): 557-563.

- Bedbrook, J. R.; Jones, J.; O'Dell, M.; Thompson, R. D. & Flavell, R. B. 1980. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. **Cell** 19: 545-560.
- Bennett, M. D. 1977. Heterochromatin, aberrant endosperm nuclei and grain shrivelling in wheatrye genotypes. **Heredity** 39: 411-419.
- Bentham, G & Hooker, W. J. 1876. Verbenaceae. In: Bentham, G. (ed) **Genera Plantarum** 2(2): 1131-1160.
- Bergey, D. R.; Stelly, D. M.; Price, H. J. & McKnight, T. D. 1989. *In situ* hybridization of biotinylated DNA probes to cotton meiotic chromosomes. **Stain Tech.** 64: 25-37.
- Besendorfer, V.; Samardzija, M.; Zoldos, V.; Solic, M. E. & Papes, D. 2002. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss (Aliaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 139: 99-108.
- Bezerra, P.; Fernandes, A. G.; Craveiro, A. A.; Andrade, C. H. S.; Matos, F. J. A.; Alencar, J. W.; Machado, M. I. L.; Viana, G. S. B.; Matos, F. & Rouquayrol, R. M. 1980. Composição química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Nordeste- Gênero *Lippia*. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil VI. Resumos. **Ciênc. Cult.** 33: supl.1, 1-14.
- Bonzani, N. E.; Fillipa, E. M. & Barboza, G.E. 1997. Particularidades epidérmicas em algumas espécies de Verbenaceae. **Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.** 68 (2): 47-56.
- Bose, R. B. & Choudhury, J. K. 1960. Cytological studies in *L. alba* (Mill) N. E. Br. **Bull. Bot. Soc. Bengal.** 14 (1-2): 71-72.
- Botta, S. M. 1979. Las espécies argentinas del género *Aloysia* (Verbenaceae). **Darwiniana** 22 (1-3):67-108.
- Botta, S. M. 1980. Las espécies del género *Acantholippia* (Verbenaceae). **Darwiniana** 22: 511-532.
- Braga, R. **Plantas do Nordeste especialmente do Ceará.** 2 ed. Fortaleza. Imprensa Oficial. 1960. 540p.
- Briquet, I. 1895. Verbenaceae. In: Engler, A & Prantl, K (ends). **Nat. Pflanzenfam.** 4(3A): 132- 182.
- Briquet, I. 1897. Verbenaceae. In: Engler, A & Prantl, K (ends). **Nat. Pflanzenfam.** 4(3A): 132- 182.

- Brito, A. R. M. 1996. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **J. Ethnopharm.** 54: 131-138.
- Brito, A. R. M. & Brito, A. A. S. 1993. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **J. Ethnopharm.** 39: 53-67.
- Broich, S. L. 1989. Chromosome numbers of North American *Lathyrus* (Fabaceae). **Madronõ.** 36: 41-48.
- Broughton, S. 2000. Review and evaluation of *Lantana* biocontrol programs. **Biol. Control** 17 (3): 272-286.
- Brown, S. W. 1966. Heterochromatin. **Science** 151: 417-425.
- Buys, C. H. C. M. & Osinga, J. 1984. Selective staining of the same set of nucleolar phosphoproteins by silver and Giemsa. A combined biochemical and cytochemical study on staining of NORs. **Chromosoma** 89: 387-396.
- Chamisso, A. 1832. Plantis Verbenaceae. In: Expeditione Romanzoffiana et in Herbarius Regiis. Schelechtendal, D.F. **Linnaea** 7:105-128.
- Chan, E. K. L.; Imai, H.; Hamel, J. C. & Tan, E. M. 1991. Human autoantibody to RNA polymerase. I transcription factor hUBF. Molecular identity of nucleolus organizer region autoantigen NOR 90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor. **J. Exp. Med.** 174: 1239-1244.
- Cheng, B.F.; Seguin-Swartz, G. & Somers, D. J. 2002. Cytogenetic and molecular characterization of intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus*. **Genome** 45 (1): 110-5
- Chodat, R. 1902. Verbenaceae. In: Chodat & Hassler, Plantae Hasslerianae I: 196-201 in **Bull. Her. Boissier, Ser. II**9:817-822.
- Choudhary, S. S. & Roy, R. P. 1982. Karyological studies and trend of speciation in some members of Verbenaceae. **Cytologia** 48: 735-740.
- Coleman, J. R. 1982. Chromosome numbers of angiosperms collected in the state of São Paulo. **Rev. Bras. Genet.** 3: 533-549.
- Compadre, C. M.; Robbins, E. F. & Kinghorn, A. D. 1986. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev. : historical uses, field inquiries, and constituents. **J. Ethnoph.** 15 (1): 89-106.
- Corazza-Nunes, M. J.; Pagliarini, M. S.; Silva, N. & Silva, I. 1995. Hexaploidy and fertility

- interrelationships in *Aloysia lycioides* (Verbenaceae). **Arq. Biol. Tecnol.** 38 (2): 627-630.
- Corrêa, C. B. V. 1992. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. ex. Britt & Wilson - erva cidreira. **Rev. Bras. Farm.** 73(3): 57-64.
- Costa, S. M. O.; Lemos, T. L. G.; Monte, F. J. Q. & Matos, F. J.A. 1998. Quinona dimérica (tectol) de *Lippia sidóides* (Verbenaceae). **XV Simpósio de Plantas Medicinais, Resumos** p.132.
- Craveiro, A. A.; Alencar, J. W.; Matos, F. J. A. & Fernandes, A. G. 1987. Contribuição a quimiotaxonomia do gênero *Lippia*. In: 39ª reunião anual da SBPC. **Ciência e Cultura** São Paulo 39 (7): 530.
- Cronquist, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press. New York.
- Cronquist, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2nd. ed. The New York Botanical Garden. New York. 1988.
- Day, M. D. & McAndrew, T. D. 2002. Status of *Charidotis pygmaea* (Coleoptera: Chrysomelidae) as biological control agent of *Lantana montevidensis* (Verbenaceae) in Australia. **Biol. Control** 23, 27-34.
- De Capoa, A.; Ferraro, M.; Lavia, P.; Pellicia, F. & Finazzi-Agro, A. 1982. Silver staining of nucleolus organizer regions (NORs) requires clusters of sulphhydryl groups. **J. Histochem. Cytochem.** 30: 908-911.
- Dematteis, M. 1998. Chromosome studies of some *Vernonia species* (Asteraceae). **Genet. Mol. Biol.** 21 (3): 381-385.
- De Melo, N.F.; Cervi, A. C. & Guerra, M. 2001. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Pl. Syst. Evol.** 226:69-84.
- Dermen, H. 1936. Cytological study and hybridization in two sections of *Verbena*. **Cytologia** 7: 160-175. 1934.
- Deumling, B. & Greilhuber, J. 1982. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by in situ hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. **Chromosoma** 84: 535-555.
- Di-Stasi, L.C.; Santos, E. M. G.; Santos, C. M. dos & Hiruma, C.A. Erva cidreira. In: **Plantas medicinais da Amazônia**. São Paulo: UNESP, 1989. p.65-6.
- Drews, J. 2000. Drug discovery: A historical perspective (review). **Science** 287: 1960-1964

- Dua, V. K.; Gupta, N. C.; Pandey, A. C. & Sharma, V. P. 1996. Repellency of *Lantana camara* (verbenaceae) flowers against *Aedes* mosquitoes. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 12 (3Pt1) 406-408.
- Duarte, J. M. B. & Caparroz, R. 1995. Cytotaxonomic analysis of brazilian species of the genus *Amazona* (Psittacidae, Aves) and confirmation of the *Salvatoria* (Ribeiro, 1920). **Braz. J. Genet.** 18 (4): 623-628.
- Dwivedi, S. K.; Kishore, N. & Dwivedi, S. K. 1990. Fungitoxicity of some essential oils against *Macrophomina phaseolina*. **Indian Perfum.**, 34 (1); 20-21.
- Edelman, J. R. & Lin, Y. J. 1995. Repetitive DNA/heterochromatin: can it be the "driving force" of evolution and speciation ?. **Cytobios** 83: 117-127.
- Elisabetsky, E.; Costa-Campos, L. 1996. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the brazilian perspective. **J. Ethnopharmacology** 51: 111-120.
- Fabricant, D. S. & Farnsworth, N. R. 2001. The value of plants used in tradicional medicine for drug discovery. **Environ. Health Perspect.** 109 Suppl. 1: 69-75.
- Farnsworth, N. R. & Soejarto, D. D. The conservation of medicinal plants In: **Global importance of medicinal plants**. Cambridge University Press, Cambridge 1991. P. 25-51.
- Faust, J. & Vogel, W. 1974. Are "N bands" selective staining of heterochromatin ? **Nature** 249: 352-353.
- Federov, A. N. A. 1969. Chromosome numbers of flowering plants. **Acad. Scien. USSR**, Leningrad.
- Felix, L. P. & Guerra, M. S. 2000. O cariótipo de *Nhotoscordum pulchellum* (Alliaceae) com ênfase na hetercromatina e nos sítios de rDNA. **Bol. Soc. Argent. Bot.** 35 (3-4): 283-289.
- Ferreira, S. H.; Barata, L. E. S.; Sales, S. L. M.; Queirós, S. R. R.; Neto, N. E. H.; Corazza, & Farias, R. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Academia Brasileira de Ciências. 1998. 132p.
- Fester, G. A.; Martinuzzi, E. A.; Retamar, J.; Ricciardi, A.; Fonseca, L. R. & Cassano, A. 1960-61. Variedades fitoquímicas em plantas aromáticas argentinas. **Rev. Fac. Cienc. Agrár.**, Mendoza. 8 (2); 45-9.
- Fester, G. A.; Martinuzzi, E. A. & Ricciardi, A. I. 1954. Esencias volátiles de Verbenáceas Argentinas. **Anal. Asoc. Quím. Arg.**, Buenos Aires 42 (2): 43-58.

- Filippa, E. M. 1984. El numero cromossomico de *L. turbinata* (Verbenaceae). **Kurtziana** 17: 169-170.
- Ford, E. H. R. 1973. **Human chromosomes**. Academic Press, New York.
- Forni-Martins, F. R. & Guerra, M. 1999. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. species (Fabaceae). **Caryologia** 52 (1-2): 87-103.
- Fouzard, A. & Tandon, S. I. 1975. Cytotaxonomic investigations in the genus *Lathyrus*. **Nucleus** 18: 24-33.
- Friebe, B.; Hatchett, J. H.; Gill, B. S.; Mukai, Y. & Sebesta, E. E. 1991. Transfer of Hessian fly by resistance from rye to wheat via radiation-induced terminal and intercalary chromosomal translocations. **Theor. Appl. Genet.** 83:33-40.
- Fukui, K. & Nakayama, S. **Plant chromosomes: laboratory methods**. Boca Raton: CRC. 1996. 274p.
- Gall, J. G. & Pardue, M. L. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in Cytological preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 63: 378-383.
- Geber, G. & Schweizer, D. 1987. Cytochemical heterochromatin differentiation in *Sinapis alba* (Cruciferae) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. **Pl. Syst. Evol.** 158: 97-106.
- Ghisalberti, E. L. 2000. *Lantana camara* L. (Verbenaceae) Review. **Fitoterapia** 71: 467-486.
- Giulietti, A. M.; Menezes, N. L.; Pirani, J. R.; Meguro, M. & Wanderley, M. L. 1987. Flora da Serra do Cipó, MG: caracterização e lista das espécies. **Bol. Bot. Univ. São Paulo.** 9: 1-151. 1987.
- Goldman, P. 2001. Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. **Ann. Intern. Med.** 16(135): 594-600.
- Gomes, E. C. 1990. **Ensaios preliminares e marcha sistemática e fitoquímica para *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. Verbenaceae**. Curitiba: UFPR. 6p.
- Gomes, E. C.; Ming, L. C.; Moreira, E. A.; Miguel, O. G.; Miguel, M. D.; Kerber, V. A.; Conti, & Filho, A. W. 1993. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. (Verbenaceae). **Rev. Bras. Farm.** 74 (2): 29-32.
- Goodpasture, C. & Bloom, S.E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma** 53: 37-50.



- Gortner, G.; Nenno, M.; Weising, K.; Zing, D.; Nagl, W. & Kahl, G. 1997. Chromosomal localization and distribution of simple sequence repeats and the Arabidopsis-type telomere sequence in the genome of *Cicer arietinum* L. **Chromos. Res.** 6: 97-104.
- Greilhuber, J. 1979. C-band distribution, DNA content, and basic composition in *Ardoxa maschatellina* (Ardoxaceae), a plant with cold sensitive chromosome segments **Pl. Syst. Evol.** 129: 63-109.
- Greilhuber, J.; Deumling, B. & Speta, F. 1981. Evolutionary aspects of chromosome banding, heterochromatin, satellite DNA, and genome size in *Scilla* (Liliaceae). **Ber. Deutsch. Bot. Ges.** 94: 249-266.
- Grif, V.G. 2000. Some aspects of plant karyology and karyosystematics. **Int. Rev. Cytol.** 196: 131-75.
- Griffor, M. C.; Vodkin, L. O.; Singh, R. J. & Hymowitz, T. 1991. Fluorescent *in situ* hybridization to soybean metaphase chromosomes. **Plant Mol. Biol.** 17: 101-109.
- Guerra, M. 1982. Padrão de bandas C em *Crepis vesicaria* L. **Bol. Soc. Brot. Sér. 2** (55): 167-174.
- Guerra, M. S. 1987a. Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). **Pl. Syst. Evol.** 158: 107-115.
- Guerra M. S. 1987b. Cytogenetics of Rutaceae IV. Structure and systematic significance of interphase nuclei. **Cytologia** 52: 213-222.
- Guerra, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara. 1988. 142p.
- Guerra, M. 2000. Chromosome number variation and evolution in monocots. In: Wilson K. L. Morrison D. A. (eds.) *Monocots – Systematics and evolution*, Vol 1. **Proceedings of Second International Conference on the comparative biology of the Monocots**. CSIRO, Melbourne, 125-134.
- Guerra, M.; Barros e Silva, K. G. B., A. E. & Ehrendorfer, F. 2000. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioidae – A case of parallel chromosomal evolution. **Am. J. Bot.** 87(5): 735-747.
- Guerra, M. & Félix, L. P. 2000. O cariótipo de *Northoscordum pulchellum* (Alliaceae), com ênfase na heterocromatina e nos sítios de DNAr. **Bol. Soc. Argent. Bot.** 35 (3-4): 283-289.

- Guerra, M.; Kenton, A. & Bennett, M. D. 1996. rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. And *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization. **Ann. Bot.** 78: 157-161.
- Guldner, H. H.; Szostecki, C.; Vosberg, H. P.; Lakomek, H. J.; Penner, E. & Bautz, F. A. 1993. Sc1 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 KDa protein identified as DNA topoisomerase I. **Chromosoma** 94: 132-138.
- Gustafson, J. P.; Butler, E. & McIntyre, C. L. 1990. Physical mapping of a low-copy DNA sequence in rye (*Secale cereale* L.). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87: 1899-1902.
- Hegnauer, R. 1973. Verbenaceae. In: Chemotaxonomie der Pflanzen. Dicotyledoneae: Rafflesiaceae – Zygophyllaceae. **Birkhauser Verlag Basel und Stuttgart** 6: 658-81.
- Heitz, E. 1928. Das heterochromatin der moose. **I. Jabet. Wiss. Bot.** 69: 762-818.
- Henderson, A. S.; Warburton, D. & Atwood, K. C. 1972. Localization of ribosomal DNA in the human chromosome complement. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 69: 3394-3398.
- Henderson, R. J. F. 1969. A cytological study of *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. In **Queensland. Contrib.** from the Queensland Herbar. 3: 1-4.
- Herbert, J. M. & Maffrand, J. P. 1991. Verbascoside isolated from *Lantana camara* an inhibitor of protein kinase. C. **J. Nat. Prod.** 54(6): 1595-1600. 1991.
- Hernandez-Verdun, D.; Roussel, P. & Gautier, T. 1993. Nucleolar proteins during mitosis. **Chrom. Today** 11: 79-90.
- Heslop-Harrison, J. S. 2000. RNA, genes, genomes and chromosomes: repetitive DNA sequences in plants. **Chrom. today** 13: 45-57.
- Holliday, R. 1984. The biological significance of meiosis. **Symp. Soc. Exp. Biol.** 38: 381-94.
- Holmquist, G. 1979. The mechanism of C-banding: depurination and  $\beta$ -elimination. **Chromosoma** 72: 203-224.
- Hoshino, T. & Waterway, M. J. 1994. Cytogeography and meiotic chromosome configurations of six intraespecific aneuploids of *Carex conica* Boott. (Cyperaceae) in Japan. **J. Plant Res.** 107 (1086): 131-138.
- Howard, R. A. 1969. A check list of cultivar names used in the genus *Lantana*. **Arnoldia** 29 (11): 73-109.

- Howell, W. M.; Denton, T. E. & Diamont, J. R. 1975. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. **Experientia** 31: 260-262.
- Howell, W. M. & Black, D. A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36: 1014-1015.
- Hsu, T. C.; Spirito, S. E. & Pardue, M. L. 1975. Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma** 53: 25-36.
- Huang, P. L.; Hahlbrock, K. & Somssich, E. 1988. Detection of a single-copy gene on plant chromosomes by *in situ* hybridization. **Mol. Gen. Genet.** 211: 143-147.
- Hubbell, H. R. 1985. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. **Stain Techn.** 60: 285-294.
- Ikeda, H. 1988. Karyomorphological studies on the genus *Crepis* with special reference to C- banding pattern. **J. Sci.** 22: 65-117.
- Jain, S. K. 1994. Ethnobotany and research on medicinal plants in India. **Ethno. Bot.** 185: 153-164.
- John, B. The biology of heterochromatin. In: Verma, R. S. (Ed). **Heterochromatin: Molecular and structural aspects.** Cambridge University Press, Cambridge. 1988. p. 1-147.
- John, H.; Birnstiel, M. & Jones, K. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. **Nature** 233: 582.
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A. & Stevens, P. F. **Plant systematics. A phylogenetic approach.** Sinauer Associates, Inc. 1999. 419p.
- Junell, S. 1934. Zur gynaceummorphologie und systematik der verbenaceen und labiaten. **Sym. Bot. Upsal.** 4: 1-219.
- Jussieu, A. L. 1789. **Genera Plantarum.** Paris
- Kaushik, G. C. 1996. Cytological effects of *Lantana camara* L. leaf extract on *Vicia faba* root-tip cells. **Ad. Plant sci.** 9 (2): 159-164.
- Kishore, N.; Dubey, N. B.; Srivasta, O. P. & Singh, S. K. 1983. Volatile fungitoxicity in some higher plants as evaluated against *Rhizoctonia solani* and some other fungi. **Indian Phytopathol.** 36 (4): 724-726.
- Kishore, N. & Mishra, A. K. 1991. Effect of essential oils on sclerotial germination of *Rhizoctonia solani*. **Nat. Acad. Sci. Lett. USA.** 14: 239-240.

- Koul, A. K.; Karihaloo, J. L. & Langer, A. 1979. Cytology of pentaploid *Lantana camara* L. **Cell & Chromos. Newsletter** 2, 1.
- Kumar, P. & Dutt, B. 1989. Cytogenetic basis of breeding system in some verbenaceous species. **Cytologia** 54: 347-353.
- Kuryan, N. P. & Narayan, R. K. J. 1987. Distribution and divergence during evolution of classes of repetitive DNA sequences in *Lathyrus* species. **Heredity** 59: 318.
- Lamaison, J. L.; Carnat, A. P. 1988. Recherche d'azulene chez les trois sous-espèces d'*Achillea millefolium* L. **Ann. Pharm. Franç.** 46 (2): 139-143.
- Lapitan, N. L. V.; Ganai, M. W. & Tanksley, S. D. 1991. Organization of the 5S ribosomal RNA genes in the genomes of tomato. **Genome** 34: 509-514.
- Lavania, U. C. & Sharma, A. K. 1980. Giemsa C-banding in *Lathyrus*. **Bot. Gaz.** 141: 199-203.
- Le, H. T.; Armstrong, K. C. & Miki, B. 1989. Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. **Plant Mol. Biol. Rep.** 7: 150-158.
- Leitch, I. J.; Leitch, A. R. & Heslop-Harrison, J. S. 1991. Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneous *in situ* hybridization of two differently labelled fluorescent probes. **Genome** 34: 329-333.
- Lichter, P.; Tang, C. J. C.; Call, K.; Hermanson, G.; Evans, G. A.; Housman, D. & Ward, D. C. 1990. High-resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridization with cosmic clones. **Science** 247: 64-69.
- Long, E. O. & Dawid, I. B. 1980. Repeated genes in eukaryotes. **Ann. Rev. Bioch.** 49: 727-764.
- Lopez-Palacios, S. **Flora de Venezuela**. Talleres graficos universitarios: Merida. 654p. 1977.
- Maluszynska, J. & Schweizer, D. 1989. Ribosomal RNA genes in B chromosomes from plant protoplast. **Plant Sci. Lett.** 17: 141-147.
- Matsui, S.I. & Sasaki, M. 1973. Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. **Nature** 246: 148-150.
- Matsuyma, T.; Akihama, T.; Ito, Y.; Omura, M. & Fukui, K. 1996. Characterization of heterochromatic regions in "Trovira" orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes by fluorescent staining and FISH method. **Genome** 39: 941-945.

- Mello, M. L. S. Nucléolo. In: **A célula 2001**. Carvalho, H. F. & Recco-Pimentel, S. M. Ed. Manole Ltda. Barueri, SP. 287p. 2001
- Mendelsohn, R. & Balick, M. 1995. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. **Econ. Bot.** 49(2): 223-228.
- Méndez-Santos, I.E. 1993. La tribu Lantanaceae Briq. (Verbenaceae) em Cuba. **Fontqueira** 36: 245- 251.
- Mesa, J. T. R. Y. **Plantas medicinales: Aromaticas o venenosas de Cuba**. 2ed. Habana, Editorial Guerrero. 1945.
- Miller, O. L. 1981. The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. **J. Cell Biol.** 91: 15-17.
- Moldenke, H. N. 1946. A brief historical survey of the Verbenaceae and related families. **Plant life** (2): 13-98.
- Moldenke, H. N. 1958. Hybridity in the Verbenaceae and related families. **American Midland Naturalist** 59 (2): 333.
- Moldenke, H. N. 1959. Notes on new or noteworthy plants XXIV. **Phytologia** (7): 77-91.
- Moldenke, H. N. 1961. Additional notes on the genus *Aegiphila* XIV. **Phytologia** 7 (8): 451-464.
- Moldenke, H. N. 1965. Materials toward a monograph of the genus *Lippia*. **Phytologia** 12 (1): 6-71.
- Moldenke, H. N. 1973. Notes on new and noteworthy. **Phytologia** 25 (4): 220.
- Moldenke, H. N. 1983. Verbenaceae. In Dassanayake, M. D. & Fosberg, F. A. **A revised handbook to the Flora of Ceilão**. 4: 212-231.
- Morawetz, W. & Samuel, M. R. A. 1989. **Karyological patterns in the Hamamelidae**. In: P. R. Crane and Blackmore (eds), Evolution, systematics and fossil history of the Hamamelidae, Introduction and "Lower Hamamelidae", 129-154. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Morton, J. F. 1994. *Lantana*, or red sage (*Lantana camara*, Verbenaceae), notorious weed and popular garden flower: some cases of poisoning in Florida. **Econ. Bot.** 48 (3): 259-270.
- Moscone, E. A.; Loidl, J.; Ehrendorfer, F & Hunziker, A. 1995. Analysis of active nucleo-

- lus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae). **Amer. J. Bot.** 82 (2): 276-287.
- Moscone, E. A.; Lambrou, M. & Ehrendorfer, F. 1996. Fluorescent chromosome banding in the cultivates species of *Capsicum* (Solanaceae). **Pl. Syst. Evol.** 202:37-63.
- Mouras, A.; Negruțiu, I.; Horth, M. & Jacobs, M. 1989. From repetitive DNA sequences to single copy gene mapping in plant chromosomes by *in situ* hybridization. **Plant Physiol. Biochem.** 27: 161-168.
- Mukai, Y.; Endo, T. R. & Gill, B. S. 1990. Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. **J. Hered.** 81: 290-295.
- Mukai, Y. & Gill, B. S. 1991. Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization. **Genome** 34: 448-452.
- Murray, B. G.; Bennett, M. D. & Hammett, K. R. W. 1992. Secondary constrictions and NORs of *Lathyrus* investigated by silver and *in situ* hybridization. **Heredity.** 68: 473-478.
- Narayan, R. K. J. & Durrant, A. 1983. DNA distribution in chromosomes of *Lathyrus* species. **Genetica** 61: 47-53.
- Nash, D. L. & Nee, M. 1984. **Flora de Veracruz, México, Verbenaceae**. Inst. Nac. de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos, Xalapa, Veracruz. México. 108p.
- Natarajan, A. T. & Ahuja, M. R. 1957. Cytotaxonomical studies in the genus *Lantana*. **J. Indian Bot. Soc.** 36, 35
- Navaneethan, N. 1982. Karyomorphological studies in two species of *Cryptolepis* R. Br. Proc. **Indian Sci. Congr. Assoc.** 69 (3VI): 231-232.
- Noamesi, B.K. 1977. Power tea (*Lippia nodiflora*) a potent hypertensive therapy. **West. Afr. J. Pharmacol. Drug. Res.** 4(1):33-36.
- Ochs, R.; Lischwe, M.; O'leary, P. & Bush, H. 1983. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. **Exp. Cell. Res.** 146: 139-149.
- Ojha, B. M. & Dayal, N. 1993. Cytological investigations in the genus *Lantana* in India. **Cytologia** 57, 9-13.
- Olert, J.; Sawatzki, G.; Kling, H. & Gebauer, J. 1979. Cytological and histochemical studies on the mechanism of the selective silver staining of nucleolar organizer regions (NORs). **Histochemistry** 60: 91-99.
- Olson, M. O. J.; Dundr, M. & Szebeni, A. 2000. The nucleolus: an old factory with unex-

- pected capabilities. **Trends Cell Biol.** 10: 189-196.
- Pagliarini, M. S.; Carraro, L. R.; De Freitas, P. M.; Adomowski, E. V.; Batista, L. A. & Valls, J. F. 2001. Cytogenetic characterization of brazilian *Paspalum* accessions. **Hereditas** 135 (1): 27-34.
- Pardue, M. L. & Gall, J. G. 1970. Chromosomal localization of the mouse satellite DNA. **Science** 168: 1356-1358.
- Patermann, W. 1935. **Beiträger zur zytologie der Verbenaceen.** Diss. Berlin.
- Pereira, J. M. & Barreto, R. W. 2001. Additions to the mycobiota of the weed *Lantana camara* (Verbenaceae) in southeastern Brazil. **Mycopathologia** 151 (2): 71-80.
- Pfeifle, J.; Boller, K. & Anderer, F. A. 1986. Phosphoprotein p135 is an essential component of the nucleolus organizer region (NOR). **Exp. Cell. Res.** 162: 11-22.
- Pio-Corrêa, M. 1984. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** 747p.
- Pitrez, S.R.; Felix, L. P.; Barreto, R. & Guerra, M. 2001. Números cromossômicos de espécies de Commelinaceae R. BR. ocorrentes no nordeste do Brasil. **Bol. Bot. Univ. São Paulo.** 19: 7-14
- Poggio, L.; Botta, S.M.; Greizerstein, E. J. & Ferrari, M. R. 1993. Natural hybridization in *Glandularia* (Verbenaceae). I Evolutionary implications of chromosome pairing. **Darwiniana** 32: 77-90.
- Principe, P. P. 1991. The conservation of medicinal plants In: **Global importance of medicinal plants.** Cambridge University Press, Cambridge 1991. P. 79-124.
- Qu, L.; Hancock, J. F. & Whallon, J. H. 1998. Evolution in an autopolyploid group displaying predominantly bivalent pairing at meiosis: genomic similarity of diploid *Vaccinium darrowi* and autotetraploid *V. corymbosum* (Ericaceae). **Amcr. J. Bot.** 85 (5): 698-703.
- Qumsiyeh, M. B. & Baker, R. J. 1988. Comparative cytogenetics and the determination of primitive karyotypes. **Cytogen. Cell Genet.** 47: 100-3.
- Raghavan, R. S. & Arora, C. M. 1960. Morphological and cytological studies in the genus *Lantana* L. **Bull. Bot. Surv. Índia.** 2(3-4):299-303.

- Raina, S. N.; Mukai, Y.; Kawaguchi, K. & Goel, S. 2001. Physical mapping of 18S-5,8S-26S and 5S ribosomal RNA gene families in three important vetches (*Vicia* species) and their allied taxa constituting three species complexes. **Theor. Appl. Genet.** 103: 839-845.
- Rao, G. P.; Singh, M.; Singh, P.; Singh, S. P.; Catalan, C.; Kapoor, I. P. S; Singh, O. P. & Singh, G. 2000. Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf essential oil of *Lippia alba* (Mill). **Indian J. of chemical technology.** 7 (6): 332-335.
- Rates, S. M. 2001. Plants as source of drugs. **Toxicon** 39(5): 603-613.
- Recco-Pimentel, M. S. & Junior, O. A. Meiose. In: **A célula 2001**. Carvalho, H. F. & Recco-Pimentel, S. M. (Eds). Manole Ltda. Barueri, SP. 287p. 2001
- Redi, C. A.; Garagna, S.; Zacharias, H.; Zuccotti, M. & Capanna, E. 2001. The other chromatin. **Chromosoma** 110: 136-147.
- Roser, M. 1994. Pathways of karyological differentiation in *Palms* (Asteraceae). **Plant Sys. Evol.** 189: 83-122.
- Roy, R. & Singh, M. K. 1967. Cytological studies in the genus *Lathyrus*. **J. Cytol. Genet.** 2: 128-140.
- Rueda, M. R. 1993. The genus *Clerodendrum* (Verbenaceae) in mesoamerica. **Ann. Mis. Bot. Gard.** 80: 870-890.
- Salimena, F. R. G. **Revisão taxonômica de *Lippia* L., sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae)**. São Paulo, SP: USP, 2000. 208p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de São Paulo, 2000.
- Salimena, F. R. G. 2002. Duas novas espécies de *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae) da América do Sul. **Hickenia** 3 (37): 145-147.
- Salimena-Pires, F. R. **Verbenaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. São Paulo, SP: USP, 1991. 302p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de São Paulo, 1991.
- Salimena-Pires, F. R. & Giuliatti, A. M. 1998. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Verbenaceae. **Bol. Bot. Univ. São Paulo.** 17: 155-180.
- Sanders, R. W. 1987. Taxonomic significance of chromosome observations in Caribbean species of *Lantana* (Verbenaceae). **Am. J. Bot.** 74 (6): 914-920.
- Sanders, R. W. 2001. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. **Harvard Papers in Botany.** 5 (2): 303-358.



- Sanso, A. M. & Hunziker, J. H. 1998. Karyological studies in *Alstroemeria* and *Bomarea* (Alstroemeriaceae). **Hereditas** 129: 67-74.
- Santos, M. M. F. B. dos. **Efeito de extratos de duas formas de *Lippia alba* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) isolado de *Citrus* sp.** Piracicaba, SP: USP, 1996. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências/Fisiologia Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1996.
- Satoh, K. & Busch, H. 1981. Silver staining os phosphoserine and phosphothreonine in nucleolar and other phosphoproteins. **Cell Biol. Int. Rep.** 5: 857-866.
- Schnack, B. & Covas, G. 1945. Hibridación interespecífica em *Glandularia* (Verbenáceas). **Darwiniana** 7 (1): 71-90.
- Schnack, B. & Covas, G. 1947. Estudios cariologicos in antofitas. **Haumania** 1, 32.
- Schauer, J. C. 1847. Verbenaceae. In: A. P. De Candole (ed). **Prodomus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis**. 11: 522-700. Paris.
- Schauer, J.C. 1851. Verbenaceae. In: **Fl Brasiliensis** (9) 10: 169-308. .
- Scheer, U. & Rose, K. M. 1984. Localization of RNA polimerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 81: 1431-1435.
- Schrader, O.; Ahne, R; Fuchs, J. & Schubert, I. 1997. Karyotype analysis of *Helianthus annuus* using Giemsa banding and fluorescence *in situ* hybridization. **Chromosome Research** 5: 451-456.
- Schwarzacher, D. & Ambros, P. W. 1979. Analysis of nucleolus organizer regions (NORs) in mitotic and polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* by silver staining and Giemsa C-banding. **Pl. Syst. Evol.** 132: 27-51.
- Schwarzacher, H. G. & Wachtler, F. 1993. The nucleolus. **Anat. Embryol.** 188: 515-536.
- Schwarzacher, H. G. & Mosgoeller, W. 2000. Ribosome biogenesis in man: current views on nucleolar structures and function. **Cytogent. Cell Genet.** 91: 243-252.
- Schwarzacher, T.; Ambros, P. & Schweizer, D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analyses. **Pl. Syst. Evol.** 134: 293-97.

- Schwarzacher, T. & Schweizer, D. 1982. Karyotype analysis and heterochromatin differentiation with C-banding and fluorescent counterstaining in *Cephalanthera* (Orchidaceae). **Pl. Syst. Evol.** 141: 91-113.
- Schwarzacher, T. & Heslop-Harrison, J. S. 1991. *In situ* hybridization to plant telomeres using synthetic oligomers. **Genome** 34: 317-323.
- Schwarzacher, T. Leitch, A. R.; Bennett, M. D. & Heslop-Harrison, J. S. 1988. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. **Ann. Bot.** 64: 315-324.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma** 58: 307-24.
- Schubert, I. & Wobus, U. 1985. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. **Chromosoma** 92: 143-148.
- Seijo, G.; Fernandez, A. 2001. Cytogenetic analysis of *Lathyrus japonicus* Wild. (Leguminosae). **Caryologia** 54 (2): 173-179.
- Sen, N. K & Sahni, V. M. 1955. Triploid, tetraploid and pentaploid *Lantana camara*. **Sci. Cul.** 20 (11) 558-559.
- Sharma, A. K. & Datta, P.C. 1959. Application of improved technique in tracing karyotypic differences between strains of *Lathyrus odoratus* L. **Cytologia** 24: 389-402.
- Shen, D.; Wang, Z. & Wu, M. 1987. Gene mapping on maize pachytene chromosomes by *in situ* hybridization. **Chromosoma** 95: 311-314.
- Siddiqui, B. S.; Raza, S. M.; Begum, S.; Siddiqui, S. Firdous, S. 1995. Pentacyclic triterpenoids from *Lantana camara*. **Phytochemistry** 38 (3): 681-685.
- Silva, T. R. S. **Redelimitação e revisão taxonômica do gênero *Lantana* L. (Verbenaceae) no Brasil.** São Paulo, SP: USP, 1999. 176p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- Sinclair, J. H. & Brown, D. D. 1971. Retention of common nucleotide sequences in the ribosomal deoxyribonucleic acid of eukaryotes and some of their physical characteristics. **Biochemistry** 10: 2761-2769.
- Singh, B. 1951. Chromosome numbers in some flowering plants. **Curr. Sci.** 20: 105.
- Singh, R.J. **Plant Cytogenetics** Boca Raton: CRC. 1993. 391p.
- Sinha, S. & Sharma, A. 1984. *Lantana camara* L., A review. **Fed. Repert.** 95 (9-10): 621-633.

- Sinha, S.; Sinha, B. & Sharma, A. 1995. Chromosome composition of *Lantana camara* L. karyotype, basic number and DNA diversity. **Nucleus** 38 (1-2): 16-22.
- Skorupska, H.; Albertsen, M. C.; Langholz, K. D. & Palmer, R. G. 1989. Detection of ribosomal RNA genes in soybean, *Glycine max* (L.) Merr., by *in situ* hybridization. **Genome** 32: 1091-1095.
- Smith, E. B. 1996. Cytogenetics and phylogeny of *Haplopappus* section *Isopappus* (Compositae). **Can. J. Gen. Cytol.** 8 (1):14-36.
- Spies, J.J. 1984. A cytotaxonomic study of *Lantana camara* (Verbenaceae) from South Africa. **S. Afr. J. Bot.** 3: 231-250.
- Spies, J.J. 1983-1984. Hybridization potencial of *Lantana camara* (Verbenaceae). **Gracia de Ota, Ser. Bot. Lisboa.** 6(1-2):145-150.
- Soejarto, D. D. 1996. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from field. **J. Ethnopharm.** 51: 115
- Soejarto, D. D.; Gyllenhaal, C. & Farnsworth, N. R. 1996. Preface. **J. Ethnopharm.** 51: ix-x.
- Stace, C. A. 2000. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> centuries. **Taxon** 49: 451-477.
- Stace, C. A. **Plant taxonomy and biosystematics.** Cambridge University Press, USA. 1989. 264p.
- Stebbins, G. L. 1971. **Chromosomal evolution in higher plants.** J. W. Arrowsmith Ltd. 216p.
- Stevens, J. P. & Bougourd, S. M. 1991. The frequency and meiotic behaviour of structural chromosome variants in natural populations of *Allium schoenoprasum* L. (wild chives) in Europe. **Heredity** 66: 391-401.
- Sumner, A. T. 1990. **Chromosome banding.** Unwin. Human Ltda. London, p. 434.
- Talalay, P. & Talalay, P. 2001. The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. **Acad. Med.** 76(3): 238-247.
- Tandon, S. L. & Chandi, A. S. 1955. Basic chromosome number of *L. camara* L. **Curr. Sci.** 4: 124-125.
- Thomas, H. M. 1995. Meiosis of triploid *Lolium*. II. discrepancies between the analysis of

- chromosome configurations at metaphase I in inverse autoallotriploid combinations. **Heredity** 75 (5): 446-452
- Tjio, J. H. 1948. The somatic chromosomes of some tropical plants. **Hereditas** 34, 136.
- Trerè, D.; Pession, A. & Derenzini, M. 1989. The silver stained proteins of interphase nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. **Exp. Cell Res.** 184: 131-137.
- Troncoso, N. S. 1974. Los generos de Verbenaceas de sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolivia, Paraguai, Uruguay y sur de Brasil). **Darwiniana** 18 (3-4): 295-412.
- Troncoso, N. S. 1980. Novedades taxonomicas en los *Lantana* y *Lippia* (Verbenaceas). **Hickenia** 1 (42): 227- 231.
- Vale, T. G.; Matos, F. J. A.; Lima, T. C. M. & Viana, G. S. B. 1999. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown chemotypes. **J. Ethnopharmacology** 167: 127-133.
- Van't Hof, J. & Sparrow A. H. 1963. A relationship between DNA content, nuclear volume and minimum mitotic cycle time. **Proc. Nat. Acad. Scien. USA.** 49: 897-902.
- Vanzela, A. L. L.; Ruas, C. F.; Oliveira, M. F. & Ruas, P. M. 2002. Characterization of diploid, tetraploid, and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. **Genetica** 114: 105-111.
- Viana, B. G. S.; Vale, T. G.; Silva, C. M. & Matos, A. F. J. 2000. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Biol. Pharm. Bull.** 23 (11): 1314-17.
- Viegas-Pequignot, E.; Dutrillaux, B.; Magdelenat, H. & Coppey-Moisan, M. 1989. Mapping of single-copy DNA sequences on human chromosomes by *in situ* hybridization with biotinylated probes: enhancement of detection sensitivity by intensified-field-fluorescence digital-imaging microscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 86: 582-586.
- Visintin, R. & Amon, A. 2000. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. **Curr. Opin. Cell Biol.** 12: 372-377.
- Visser, R. G. F.; Hoekstra, R.; Van Der Leij, F. R.; Pijnacker, L. P.; Witholt, B. & Feenstra, W. J. 1988. *In situ* hybridization to somatic metaphase chromosomes of potato. **Theor. Appl. Genet.** 76: 420-424.

- Wang, S.; Lapitan, N. L. V. & Tsuchiya, T. 1991. Characterization of telomeres in *Hordeum vulgare* chromosomes by *in situ* hybridization. I. normal diploid barley. **Jnp. J. Genet.** 66: 313-316.
- Weenen, H.; Nkunya, H. H.; Bray, D. H.; Mwasumbi, L. B.; Kinabo, L.S. & Kilimali, V. A. F. B. 1990. Antimalarial activity of tanzanian medicinal plants. **Planta Med.** 56:368-370.
- Wilson, E. O. **Biodiversidade**. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro. 1997. 657 p.
- Wollenweber, E.; Dörr, M.; Muniappan, R. & Siems, K. 1997. Flavonoid a glycones and triterpenoids from the leaf exudate of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis*. **Bioch. Syst. Ecol.** 25 (3): 269-270.
- Yen-Yu, K.; Song-Bin, C.; Tsai-Yum, L.; Chang-Huain, H.; Yao-Huang, C.; Wen-Huei, C. & Chi-Chang, C. 2001. Defferential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids. **Ann. Bot.** 87: 387-395.

## **7. ARTIGOS**

- 7.1. Caracterização mitótica e meiótica de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). <sup>1</sup>Brandão, A. D.; <sup>2</sup>Viccini, L. F.; <sup>3</sup>Salimena, F. R. G. & <sup>1</sup>Recco-Pimentel, S. M.**
- 7.2. Caracterização citogenética de *Aloysia virgata* Ort. & Patau (Verbenaceae), com evidências de um novo número diplóide para o gênero. <sup>1</sup>Brandão, A.D., <sup>2</sup>Viccini, L.F. <sup>3</sup>Vanzela, A.L.L & <sup>1</sup>Recco-Pimentel, S.M.**
- 7.3. Caracterização citogenética de *Lantana camara* L. (Verbenaceae) da flora brasileira. <sup>1</sup>Brandão, A.D.; <sup>2</sup>Viccini, L.F. & <sup>1</sup>Recco-Pimentel, S.M.**

## **Artigo 1**

**Caracterização mitótica e meiótica de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae)**

**<sup>1</sup>Brandão, A.D.; <sup>2</sup>Viccini, L.F.; <sup>3</sup>Salimena, F.R.G. & <sup>1</sup>Recco-Pimentel, S.M.**

**(1) Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Campinas, SP, Brasil**

**(2) Departamento de Biologia e (3) Departamento de Botânica, Instituto de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.**

Palavras-chave: citogenética, heteropicnose, heterocromatina, FISH, Verbenaceae, *Lippia*.



## RESUMO

A espécie *Lippia alba* apresentou 30 cromossomos, sendo 11 pares metacêntricos e quatro pares submetacêntricos, com constrições secundárias nos braços longos dos pares 2 e 5. Grande quantidade de heterocromatina foi detectada por meio de coloração com Giemsa e das técnicas de banda C, CMA e DAPI, especialmente rica em AT, em células mitóticas e meióticas, sugerindo uma condição apomórfica para a espécie. A técnica de impregnação por prata (Ag-NOR) mostrou-se inespecífica para detecção da região organizadora do nucléolo (NOR), provavelmente devido à impregnação nos inúmeros blocos de heterocromatina. Através da técnica de hibridação de *in situ* fluorescente (FISH) observou-se seis NORs, localizadas na região telomérica de três pares de cromossomos. Os sítios de rDNA 5S foram localizados em um par de cromossomos. Esses marcadores citogenéticos sugerem a possibilidade de uma origem diplóide para a espécie. A presença de 30 cromossomos em *L. alba* é uma característica que corrobora a proposta de distinção em relação a *L. geminata* ( $2n = 32$  cromossomos).

## INTRODUÇÃO

Diversos gêneros dentro da família Verbenaceae têm sido motivo de destaque em função de suas propriedades medicinais e ornamentais, podendo-se citar entre eles *Lantana*, *Aloysia* e, principalmente, *Lippia* que tem sido muito estudado quimicamente (Salimena-Pires, 1991; Bonzani *et al.*, 1997; Salimena, 2000 e Sanders, 2001).

O gênero *Lippia* foi descrito por Linnaeu em 1753 e reúne cerca de 200 espécies, distribuídas principalmente nos trópicos e subtropicais, com três centros de diversidade. O Brasil é o maior deles, com aproximadamente 111 espécies (Salimena, 2000). Contudo, a estimativa do número de espécies no gênero tem sido sempre motivo de muita controvérsia. De acordo com características morfológicas, autores como Schauer (1847), Benthams & Hooker (1876) e Briquet (1897) consideram os gêneros *Aloysia*, *Acantholippia* e *Phyla* como sinônimos, seções ou subgêneros de *Lippia*. O mesmo ocorre com Nash & Nee (1984) que não aceitaram a segregação desses, a partir de *Lippia*. Outros autores como Troncoso (1974), Botta (1980), Salimena (2000, 2002) e Sanders (2001) consideram os gêneros anteriormente citados distintos. Méndez-Santos (1993) apresentou uma discussão

sobre a validade dos gêneros *Phyla* e *Aloysia*, considerados segregados a partir de *Lippia*. Considerando tais controvérsias, é possível que a abordagem dada até o momento não tenha sido suficiente para esclarecer com precisão as questões taxonômicas dentro do grupo (Salimena, 2000; Sanders, 2001).

O gênero *Lippia* também apresenta vários sistemas de classificação infragenéricos. Troncoso (1961) considerou difícil em alguns casos a delimitação taxonômica em nível específico devido, por exemplo, à ocorrência de dioícia no gênero, não sendo esta característica comum na família. Para alguns autores, *L. geminata* e *L. alba* são sinônimos e para outros são espécies distintas (Craveiro *et al.*, 1987; Hegnauer, 1973). Moldenke (1965) considerou válida a sinonímia, uma vez que *L. alba* é extremamente variável e polimórfica. No entanto, Kumar & Dutt (1989) estudaram as bases citogenéticas de *L. geminata* e verificaram que a espécie apresentava  $n = 16$  cromossomos, diferentemente de *L. alba*  $n = 15$  cromossomos. Corrêa (1992), por meio de análises histológicas, histoquímicas e fitoquímicas da folha de *L. geminata* e *L. alba*, concluiu que *L. alba* é uma espécie sujeita a grandes variações morfológicas, anatômicas e fitoquímicas devido às condições ambientais, considerando, portanto, a sinonímia válida.

Do ponto de vista citogenético, existem poucas informações para espécies dos gêneros pertencentes à família Verbenaceae. No gênero *Lippia*, foi determinado apenas o número cromossômico de *L. juncea* ( $2n = 30$ ), *L. nodiflora* ( $2n = 36$ ) (Junell, 1934), *L. alba* ( $2n = 30$ ) (Bose & Choudhury, 1960), *L. lanceolata* ( $2n = 32$ ) (Smith, 1966), *L. citriodora* ( $2n = 36$ ) (Navaneethan, 1982), *L. lycioides* ( $2n = 36$ ), *L. salviaeifolia* ( $2n = 24$ ) (Coleman, 1982) e *L. turbinata* ( $2n = 30$ ) (Filippa, 1984). Em um estudo mais recente envolvendo algumas espécies brasileiras também foi determinado o número cromossômico de *L. sidoides*, *L. rosella*, *L. hermannioides*, *L. corymbosa*, *L. pseudothea*, *L. filifolia*, *L. diamantinensis*, *L. florida* e *L. lupulina* (Viccini *et al.*, in prep). Estudos relacionados as bases citogenéticas no sistema reprodutivo foram realizados por Kumar e Dutt (1988) e Andrada *et al.* (1998), que relataram o número e o comportamento cromossômico de *L. geminata* ( $2n = 32$ ) e *L. fissicalyx* ( $2n = 60$ ), respectivamente.

No presente trabalho, foi feita a caracterização mitótica e meiótica da espécie *Lippia alba*, visando contribuir com dados que possam auxiliar em investigações filogenética e da

sistemática, uma vez que existem diversas contradições na delimitação dos gêneros da família Verbenaceae.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta do material**

Foram coletadas estacas e inflorescências de *Lippia alba* (Figura 1) no Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora - MG. As estacas com aproximadamente quatro nós foram mantidas em hidroponia a 28°C até a emissão das raízes. As inflorescências imaturas de *L. alba* foram imediatamente fixadas após a coleta em metanol:ácido acético (3:1).

Uma exsicata da espécie *Lippia alba* foi depositada no Herbário CESJ da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) como material voucher e registrado sob o número de tombo 28.702.

### **Preparação de lâminas**

Após a emissão das raízes, as estacas foram transferidas para tubos contendo 8-hidroxiquinoleína 3 mM, a 8°C, durante seis horas. Em seguida, foram submetidas a solução de orizalina 12 µM, à temperatura ambiente, durante uma hora. Após os tratamentos, as raízes foram fixadas em metanol:ácido acético (3:1) por, no mínimo 24 horas. A digestão enzimática foi realizada com o complexo enzimático Pectinex (Novo Nordisk Ferment™ Bioindustrial do Brasil) na concentração de 1:10 (tampão citrato de sódio 2 mM, pH 3,5), durante 3 horas a 34°C. As lâminas foram preparadas a partir da técnica de secagem ao ar com maceração enzimática segundo Carvalho (1995).

Para obtenção de células meióticas utilizou-se a metodologia descrita por Brandão *et al.* (2000) em função do tamanho reduzido das flores (1,0 a 1,5 mm de comprimento e 1,0 a 1,5 mm de largura, respectivamente). Foram utilizadas aproximadamente 60 anteras que foram transferidas para um microtubo de 0,3 mL, com tela de poliéster em sua extremidade. O material foi lavado em água destilada durante 30 minutos. O tubo contendo as anteras foi imerso em uma solução enzimática concentrada (Pectinex - Novo Nordisk Ferment™ Bioindustrial do Brasil) durante 25 minutos a 34°C. Após a digestão, esse material foi

lavado em água destilada durante 20 minutos. Em seguida, as anteras foram fragmentadas, expulsando as células mãe do grão de pólen (PMCs). A suspensão celular foi centrifugada a 2000 rpm durante seis minutos. Decorridos 20 minutos, o material foi ressuspensionado e gotejado nas lâminas. Após secagem ao ar e em placa aquecedora, as lâminas foram submersas em ácido acético 45% durante 20 segundos. A coloração foi feita com Giemsa a 10% em tampão fosfato 0,1 M pH 6,8, durante um minuto.

### **Cariótipo**

Para análise do cariótipo, as lâminas foram tratadas com ácido acético 45% gelado durante 20 segundos e em seguida coradas com Giemsa (10% em tampão fosfato 0,1 M a pH 6,8), durante um minuto. Foram avaliadas 15 metáfases para montagem dos cariogramas e obtenção das medidas de comprimento total dos cromossomos (CT – comprimento do braço curto + comprimento do braço longo) e comprimento dos braços dos cromossomos. Para confecção do ideograma foram utilizados os parâmetros de tamanho relativo (TR – tamanho total do cromossomo individual X 100/tamanho total do genoma), índice centromérico (IC – comprimento do braço curto X 100/comprimento do braço longo + comprimento do braço) e relação de braços (RB – comprimento do braço longo/comprimento do braço curto) com ajuda do programa Image Pro-Plus versão 4.5, da Media Cybernetics. Os cromossomos foram classificados segundo Guerra (1988).

### **Núcleos Interfásicos**

A morfologia nuclear foi analisada através da coloração com Giemsa em aproximadamente 1000 núcleos interfásicos. Foi utilizada a classificação de Guerra (1987a, b).

### **Banda C**

A heterocromatina constitutiva foi detectada de acordo com a técnica descrita por Schwarzscher *et al.* (1980) com pequenas modificações. As lâminas foram tratadas com ácido acético 45% a 60°C, durante 20 minutos, depois tratadas com hidróxido de bário a

5%, em temperatura ambiente, durante 8 minutos e incubadas em 2xSSC, a 60°C, durante 80 minutos. A coloração foi realizada com Giemsa a 10% durante 15 minutos.

O percentual de heterocromatina constitutiva foi obtido a partir da média das áreas positivas à banda C em relação ao genoma total de dez metáfases. As medidas foram obtidas com o auxílio do programa Image Pro-Plus versão 4.5, da Media Cybernetics.

### **Coloração com fluorocromos**

A coloração com fluorocromos foi obtida a partir da técnica descrita por Schweizer (1976) com algumas modificações. Para coloração com DAPI, as lâminas foram tratadas com 150 µL de distamicina (0,1 mg/mL em água deionizada estéril) por 20 minutos, lavadas com tampão McIlvaine e secas ao ar. As lâminas foram incubadas em solução DAPI (0,2 mg/mL em água deionizada estéril) no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 minutos.

Para a coloração com cromomicina (CMA) as lâminas foram tratadas com 150 µL de distamicina (0,3 mg/mL em água deionizada estéril) por 20 minutos, lavadas com tampão McIlvaine e secas ao ar. A coloração foi realizada com CMA (0,5 mg/10 mL em água deionizada estéril) à temperatura ambiente, durante 45 minutos no escuro.

Para ambas as colorações após lavagem em tampão, as lâminas foram secas ao ar e montadas com solução de sacarose saturada e analisadas ao microscópio após 15 dias.

### **Ag-NOR**

Para observação das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foram testadas diversas metodologias, sendo utilizada a técnica descrita por Fukui e Nakayama (1996), que consiste em tratar o material com quatro a oito gotas da solução de nitrato de prata 50% em citrato de sódio 0,002%, pH 3,0 (1:1), a 60°C durante 10 a 15 minutos, lavadas em água deionizada, secas ao ar e analisadas ao microscópio.

### **Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)**

A técnica de FISH foi realizada segundo método de Heslop-Harrison *et al.* (1991), com pequenas modificações. Utilizou-se como sondas os recombinantes pTa 71 contendo

uma unidade de rDNA 45S (18S-5.8S-26S + IGS) de *Triticum aestivum* de aproximadamente 9Kb clonada em pUC 19 (Gerlach & Bedbrook, 1979) e pTa 794, contendo um fragmento de rDNA 5S de *T. aestivum*, com 410pb, clonada em pBR 322 (Gerlach & Dyer, 1980), ambas marcadas com biotina por “nick translation”. As lâminas foram incubadas com 100 µL/mL RNase durante uma hora a 37°C, fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos, desidratadas em série gradativa de álcool 70 a 100% e secas ao ar. As sondas (100 ng de DNA/µL) foram desnaturadas a 70°C por dez minutos e imediatamente colocadas no gelo. Utilizou-se 5 µL de sonda para cada lâmina e os cromossomos foram desnaturados juntamente com a sonda em termociclador (MJ Research) a 90°C durante dez minutos. Em seguida foram transferidas para 48°C por dez minutos e à 38°C por cinco minutos, sendo finalmente incubadas em câmara úmida a 37°C overnight. As lavagens pós-hibridação para rDNA 45S foram realizadas segundo Cuadrado e Jouve (1994) e para rDNA 5S foi utilizado 6xSSC durante 20 minutos e 4xSSC durante dez minutos, todas com agitação constante. As regiões hibridadas foram detectadas com Avidina-FITC. Os cromossomos foram corados com solução de iodeto de propídio (2,5 µg/µL) durante 30 minutos.

### **Meiose**

Foram analisadas cerca de 100 células de cada fase, as quais foram identificadas com o auxílio das imagens do ciclo celular meiótico de milho, cevada e *Artemisia* descritas respectivamente por Singh (1993) e Fukui & Nakayama (1996).

## **RESULTADOS**

### **Mitose**

O cariótipo de *L. alba* apresentou  $2n = 30$  cromossomos, consistindo de 11 pares metacêntricos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14 e 15) e quatro pares submetacêntricos (8, 9, 11 e 13). Os pares 2 e 5 apresentaram uma constrição secundária no braço curto (Figuras 2, 3 e tabela 1).

O núcleo interfásico foi classificado como areticulado, segundo Guerra (1987a) (Figura 4a).

Grande quantidade de regiões heteropícnóticas foram observadas, inclusive através de coloração direta com Giemsa, nos núcleos interfásicos (Figura 4a), nos cromossomos mitóticos (Figura 4b) e nas células meióticas (Figura 5c-h). Resultados semelhantes foram obtidos com o método de banda C (Figura 4c), indicando a presença de heterocromatina. A coloração com o fluorocromo DAPI revelou grandes extensões de regiões heterocromáticas ricas em pares de bases AT (Figura 4d-e), enquanto que a coloração com CMA mostrou apenas algumas regiões ricas em CG (Figura 4f-g).

Na tentativa de identificação das NORs pela prata ( $\Delta$ g-NOR) observou-se inúmeras marcações inespecíficas para todas as técnicas testadas, sendo por isso apresentado apenas os resultados do método de Fukui & Nakayama (1996) (Figura 4h-i). Através da técnica de FISH foram detectadas seis NORs, sendo quatro menores de tamanho similar entre si e duas maiores, localizadas na região telomérica dos cromossomos (Figura 4j-k) e dois sítios de rDNA 5S localizados na região telomérica dos cromossomos (Figura 4l).

Não foi possível quantificar ou mesmo localizar a posição dos blocos de heterocromatina, das NORs e do rDNA 5S no ideograma, devido à grande dificuldade em definir suas posições exatas nos cromossomos e identificar o número do cromossomo portador, dado à grande similaridade entre eles e ao tamanho reduzido.

Foi possível observar as fases de intérfase (Figura 5a), leptóteno (Figura 5b), zigóteno (Figura 5c), paquíteno (Figura 5d-f), diplóteno (Figura 5g-h), diacinese (Figura 5i), metáfase I (Figura 5j), anáfase I (Figura 5k) e telófase II (Figura 5l). Observou-se também a formação de 15 bivalentes durante o diplóteno, diacinese e metáfase I (Figura 5h-j) e a segregação normal dos conjuntos cromossômicos durante a anáfase I e telófase II (Figura 5k-l).

## DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta a primeira descrição detalhada do cariótipo de *L. alba* com  $2n = 30$  cromossomos, confirmado também através de análises em células reprodutivas ( $n = 15$ ). Para o gênero *Lippia* já foram descritos os números cromossômicos  $n = 12, 15, 16, 18$ . Caracteres citogenéticos, tais como o número cromossômico, morfologia dos cromossomos, tamanho do genoma, comportamento dos cromossomos, entre outros, têm

sido de fundamental importância na caracterização de espécies e no estudo taxonômico em vegetais (Stace, 2000). Mejias (1993), identificou em citogrupos indivíduos da espécie *Lactuca viminea*. Mansanares (2002), caracterizou através do número cromossômico várias espécies do gênero *Lychnophora*. De acordo com nosso trabalho, *L. alba* pode ser diferenciada de *L. geminata* pelo número de cromossomos, já que esta última apresenta um par a mais ( $2n = 32$ ) (Kumar & Dutt, 1989). Nossos dados sugerem portando, que *L. alba* e *L. geminata* sejam tratadas como espécies distintas, embora estudos citogenéticos mais detalhados da espécie *L. geminata* sejam necessários a fim de fornecer informações para a diferenciação das duas espécies.

Uma característica marcante observada em *L. alba* foi a presença de blocos heteropicnóticos em células mitóticas e meióticas coradas com Giemsa. Através do bandamento C e da coloração com fluorocromos, pode-se demonstrar a presença de grande quantidade de heterocromatina constitutiva (52%), sobretudo ricas em AT, que coincidem com os blocos corados diferencialmente por Giemsa.

A presença de grande quantidade de heterocromatina é uma característica já observada em alguns grupos vegetais, mas ainda não relatada para a família Verbenaceae. A heterocromatina talvez represente um dos fatores mais importantes na evolução (Edelman & Lin, 1995). Evidências sugerem que a heterocromatina interfere na replicação do DNA, no volume nuclear, no tamanho da célula, na estrutura do cromossomo, na expressão gênica, na organização do genoma, no tempo do ciclo celular, na taxa de desenvolvimento e na evolução dos organismos (Van't Hof & Sparrow, 1963; Bennett, 1977; Redi *et al.*, 2001). Variações da quantidade de heterocromatina são utilizadas em estudos de cariosistemática, filogenia e na solução de problemas genéticos (Schwarzacher *et al.*, 1980; Artoni, *et al.*, 1999 e Grif, 2000). Alguns autores defendem a idéia de que a existência de pouca heterocromatina no cariótipo indica uma condição plesiomórfica e muita heterocromatina indica uma condição apomórfica para a espécie (Greilhuber, 1979; Poggio & Hunziker, 1986; Ikeda, 1988; Morawetz & Samuel, 1989; Roser, 1994; Redi *et al.*, 2001). Esta característica é considerada uma tendência geral para os grupos vegetais em níveis supra e infra-genéricos, comumente interpretada como um acúmulo de heterocromatina durante a evolução. Estudos da diferenciação longitudinal em



cromossomos de algumas espécies de *Sesbania* sugeriram que a presença de muita heterocromatina indicaria uma linha evolutiva diferenciada para o gênero, enquanto que uma pequena quantidade de heterocromatina representa uma condição ancestral para o grupo (Forni-Martins & Guerra, 1999), o que já havia sido também sugerido por Greilhuber *et al.* (1981) e Moscone *et al.* (1996) para outras taxa estudados. Guerra *et al.* (2000) utilizaram variações observadas na quantidade de heterocromatina e padrões de bandamento em Aurantioideae como ferramenta na identificação de híbridos intergenéricos no grupo. É possível que a grande quantidade de heterocromatina observada em *L. alba* indique uma condição apomórfica para a espécie. No entanto, para que essa hipótese venha a ser confirmada é necessário que estudos em outras espécies do gênero e da família sejam realizados para que se tenha um panorama das modificações que possivelmente ocorreram durante a evolução e que contribuíram para os cariótipos atuais da família Verbenaceae e sua especiação.

A inespecificidade de marcação obtida com a técnica Ag-NOR é um evento bastante raro, tendo sido relatado anteriormente por Schwarzacher & Ambros (1979). Normalmente esta técnica evidencia as NOR ativas durante o processo de intérfase precedente. A inespecificidade se deve provavelmente à marcação das regiões heterocromáticas. Em anfíbios, por exemplo, há evidências de marcação inespecífica da heterocromatina pela prata (Lourenço *et al.*, 1998; Busin *et al.*, 2000). A marcação por CMA provavelmente esteja evidenciando as NORs, já que geralmente estas respondem positivamente a essa coloração por apresentarem-se ricas em pares de base CG, principalmente nas regiões que codificam os rRNAs 18S, 5,8S e 28S (Schweizer, 1976; Deumling & Greilhuber, 1982; Guerra, 1987b; Sumner, 1990; Moscone *et al.*, 1995, 1996; Forni-Martins & Guerra, 1999; Guerra *et al.*, 2000; Yen-Yu *et al.*, 2001). Os resultados de CMA em *L. alba* mostraram seis regiões positivas ao CMA, sugerindo tratarem-se das NORs, mesmo número de marcações obtidos com a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). A técnica de FISH é a mais usada para identificação da NOR, por ser a mais precisa e específica, uma vez que evidencia todos os cistrons ribossomais, ativos e inativos das NORs (Goodpasture & Bloom, 1975; Schwarzacher & Ambros, 1979; Besendorfer *et al.*, 2002). O método vem sendo utilizado nos últimos anos com maior frequência como importante marcador

molecular citogenético. Guerra *et al.* (1996) utilizaram o número de sítios de rDNA identificados por FISH para separar as espécies *V. unguiculata* e *P. coccineus*. Schrader *et al.* (1997) analisaram o cariótipo de *Helianthus* utilizando coloração com Giemsa e FISH para diferenciação dos cromossomos do cariótipo e Gortner *et al.* (1997) localizaram seqüências teloméricas no genoma de *Cicer arietinum* L. a partir da utilização da técnica de FISH. Vanzela *et al.* (2002) caracterizaram populações diplóides, tetraplóides e hexaplóides de *Helianthus* através da técnica de FISH e Raina *et al.* (2001) e Besendorfer *et al.* (2002), utilizaram outra família de genes (5S rDNA) como marcador citogenético para diferenciar espécies e populações do gênero *Allium*. No presente trabalho, o número de sítios de rDNA 5S, se constituiu em importantes marcadores tornando possível sugerir uma origem diplóide para *L. alba*. No entanto, não podemos deixar de considerar que pode ter ocorrido processos como deleção ou quebra envolvendo a perda dessas regiões em outros cromossomos. Com a presença de seis sítios de NORs seria possível sugerir uma origem poliplóide através da aloploidia, no entanto, a espécie apresenta apenas um par de cromossomos portador de sítios de rDNA 5S, não sendo possível portanto, explicar uma origem poliplóide.

Através da análise meiótica observou-se a formação de 15 bivalentes durante o diplóteno, diacinese e metáfase I, além da segregação normal dos conjuntos cromossômicos durante a anáfase I e telófase II, semelhante ao já observado em outras espécies (Dermen, 1936; Kumar & Dutt, 1989). Porém, Andrada *et al.* (1998) observou anormalidades durante a meiose, com a formação de uni e multivalentes, além da alta frequência (82,4%) de grãos de pólen anormais em *L. fissicalyx*, sendo relacionado com o grau de ploidia caracterizado para a espécie. Em outros gêneros da família Verbenaceae também foram verificadas inúmeras anormalidades e irregularidades nos cromossomos e no desenvolvimento das sementes, sendo diretamente relacionado com o grau de ploidia presente nas espécies analisadas (Poggio *et al.*, 1993). Em espécies do gênero *Lantana*, observou-se uma distribuição desigual dos cromossomos durante a anáfase (Sinha & Sharma, 1984). Corazza-Nunes *et al.* (1995) relataram alterações na meiose de uma espécie do gênero *Aloysia* tendo observado segregação anormal dos cromossomos e fusos multipolares múltiplos. Em *L. alba* nenhuma dessas anormalidades foi observada. Esses resultados

também corroboram a hipótese de uma possível origem diplóide para a espécie, embora saiba-se que existem casos em que a formação de multivalentes é dificultada em cromossomos pequenos e que o controle gênico pode inibir a formação de multivalentes, além de casos (alopoliploide segmental) onde ocorre o pareamento de cromossomos homeólogos não existindo a presença de tetravalentes (Riley & Chapman, 1958, Stebbins 1971; Srivastav & Raina, 1982; Stace, 1989, 2000).

Os dados deste trabalho, em conjunto, indicam que *L. alba* é uma espécie diplóide, com origem diplóide e um taxón distinto de *L. geminata*.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (Processo nº 00/11842-2) pela bolsa concedida a A.D.B. e FAPEMIG pelo auxílio à pesquisa, à Rosana Pezzin, Mateus R Pereira e Patricia M. O. Pierre pela ajuda na coleta de inflorescências e estacas de *L. alba* no Horto da Faculdade de Farmácia da UFJF, à Dra. Vera N. Solferini por permitir o uso da casa de vegetação, ao Dr. André L. L. Vanzela, pela realização da técnica de FISH e à Dra. Eliana R. Forni-Martins pelas valiosas discussões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrada, A. B.; Pastoriza, A. & Martínez-Pulido, L. V. 1998. Citogenética en tres especies de Verbenaceae. **Rev. Fac. Agron. (Luz)**. 15: 312-318.
- Artoni, R. F.; Molina, W. F.; Bertollo, L. A. C. & Junior, P. M. G. 1999. Heterochromatin Analysis in the fish species *Liposarcus anostomatus* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes) **Genet. Mol. Biol.** 22(1): 39-44.
- Bennett, M. D. 1977. Heterochromatin, aberrant endosperm nuclei and grain shrivelling in wheat-rye genotypes. **Heredity** 39: 411-419.
- Bentham, G & Hooker, W. J. 1876. In: Bentham, G. (ed) **Genera Plantarum** Verbenaceae. 2(2): 1131-1160.
- Besendorfer, V.; Samardzija, M.; Zoldos, V.; Solic, M. E. & Papes, D. 2002. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss (Aliaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 139: 99-108.
- Bonzani, N.E.; Fillipa, E. M. & Barboza, G. E. 1997. Particularidades epidérmicas em algumas espécies de Verbenaceae. **Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.** 68 (2): 47-56.
- Bose, R. B. & Choudhury, J. K. 1960. **Cytological studies in *L. alba* (Mill) N.E.Br.** **Bull. Bot. Soc. Bengal.** 14(1-2): 71-72.
- Botta, S. M. 1980. Las especies del género *Acantholippia* (Verbenaceae). **Darwiniana** 22: 511-532.
- Brandão, A. D.; Viccini, L. F. & Pezzin, R. 2000. Meiotic characterization in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Genet. Mol. Biol. (Suppl.)** 23 (3): 372.
- Briquet, I. 1897. Verbenaceae. In: Engler, A & Prantl, K (eds). **Nat. Pflanzenfam.** 4(3A): 132- 182.
- Busin, C. S.; Vinciprova, G. & Recco-Pimentel, S. M. 2001. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). **Genetica** 110: 131-141.
- Carvalho, C. R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.).** Viçosa, MG: UFV, 1995. 127p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. 1995.

- Coleman, J. R. 1982. Chromosome numbers of angiosperms collected in the state of São Paulo. **Rev. Brasil. Genet.** 3: 533-549.
- Corazza-Nunes, M. J.; Pagliarini, M. S.; Silva, N. & Silva, I. 1995. Hexaploidy and fertility interrelationships in *Aloysia lycioides* (Verbenaceae). **Arq. Biol. Tecnol.** 38 (2): 627-630
- Corrêa, C. B. V. 1992. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. ex Britt & Wilson- erva cidreira. **Rev. Bras. Farm.** 73(3): 57-64.
- Craveiro, A. A.; Alencar, J. W.; Matos, F. J. A. & Fernandes, A. G. 1987. Contribuição a quimiotaonomia do gênero *Lippia*. In: 39<sup>a</sup> reunião anual da SBPC. **Ciência e Cultura** São Paulo 39 (7): 530.
- Cuadrado, A. & Jouve, N. 1994. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-*Triticale*. **Chrom. Res.** 2: 231-238.
- Dermen, H. 1936. Cytological study and hybridization in two sections of *Verbena*. **Cytologia** 7: 160-175. 1934.
- Deumling, B. & Greilhuber, J. 1982. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by in situ hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. **Chromosoma** 84: 535-555.
- Edelman, J. R. & Lin, Y. J. 1995. Repetitive DNA/heterochromatin: can it be the "driving force" of evolution and speciation ?. **Cytobios** 83: 117-127.
- Filippa, E. M. 1984. El numero cromossomico de *L. turbinata* (Verbenaceae). **Kurtziana** 17: 169- 170.
- Forni-Martins, E. R. & Guerra, M. 1999. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. species (Fabaceae). **Caryologia** 52 (1-2): 87-103.
- Fukui, K. & Nakayama, S. **Plant chromosomes: laboratory methods**. Boca Raton: CRC. 1996. 274p.
- Gerlach, W. L. & Bedbrook, J. R. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. **Nucl. Acids Res.** 7: 1869-1885.
- Gerlach, W. L. & Dyer, T. A. 1980. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contains 5S-rRNA genes. **Nucl. Acids Res.** 8: 4851-4865.

- Goodpasture, C. & Bloom, S.E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma** 53: 37-50.
- Gortner, G.; Nenno, M.; Weising, K.; Zing, D.; Nagl, W. & Kahl, G. 1997. Chromosomal localization and distribution of simple sequence repeats and the Arabidopsis-type telomere sequence in the genome of *Cicer arietinum* L. **Chrom. Res.** 6: 97-104.
- Greilhuber, J. 1979. C-band distribution, DNA content, and basic composition in *Ardoxa maschatellina* (Ardoxaceae), a plant with cold sensitive chromosome segments **Pl. Syst. Evol.** 129: 63-109.
- Greilhuber, J.; Deumling, B. & Speta, F. 1981. Evolutionary aspects of chromosome banding, heterochromatin, satellite DNA, and genome size in *Scilla* (Liliaceae). **Ber. Deutsch. Bot. Ges.** 94: 249-266.
- Grif, V.G. 2000. Some aspects of plant karyology and karyosystematics. **Int. Rev. Cytol.** 196: 131-75.
- Guerra, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara. 1988. 142p.
- Guerra, M. S. 1987a. Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). **Pl. Syst. Evol.** 158: 107-115.
- Guerra M. S. 1987b. Cytogenetics of Rutaceae IV. Structure and systematic significance of interphase nuclei. *Cytologia* 52: 213-222.
- Guerra, M.; Dos Santos, K. G. B.; Barros e Silva, A. E. & Ehrendorfer, F. 2000. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae - Aurantioideae – A case of parallel chromosomal evolution. **Am. J. Bot.** 87(5): 735-747.
- Guerra, M.; Kenton, A. & Bennett, M.D. 1996. rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. And *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization. **Ann. Bot.** 78: 157-161.
- Hegnauer, R. 1973. Verbenaceae. In: Chemotaxonomie der Pflanzen. Dicotyledoneae: Rafflesiaceae – Zygophyllaceae. **Birkhauser Verlag Basel und Stuttgart** 6: 658-81.
- Heslop-Harrison, J. S.; Schwarzacher, K.; Ananthawat-Jonsson, A. R.; Leitch, M. & Leitch, I. J. 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. **Technique** 3: 106-109.
- Ikeda, H. 1988. Karyomorphological studies on the genus *Crepis* with special reference to C- banding pattern. **J. Sci.** 22: 65-117.
- Junell, S. 1934. Zur gynaceummorphologie und systematik der verbenaeen und labiaten.

- Sym. Bot. Upsal.** 4: 1-219.
- Kumar, P. & Dutt, B. 1989. Cytogenetic basis of breeding system in some verbenaceous species. **Cytologia** 54: 347-353.
- Lourenço, L. B.; Recco-Pimentel, S. M. & Cardoso, A. J. 1998. Polymorphism of the nucleolar organizer regions (NORs) in *Physaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. **Chrom. Res.** 6: 621-628.
- Mansanares, M. E.; Forni-Martins, E. R. & Semir, J. 2002. Chromosome numbers in the genus *Lychnophora* Mart. (Lychnophorinae, Veroniceae, Asteraceae). **Caryologia** 55 (4): 367-374.
- Mejias, J. A. 1993. Cytotaxonomic studies in the Iberian taxa of the genus *Lactuca* (compositae). **Botanica Helvetica** 103 (1): 113-130.
- Méndez-Santos, I. E. 1993. La tribu Lantanaceae Briq. (Verbenaceae) em Cuba. **Fontqueira** 36: 245- 251.
- Moldenke, H.N.A. 1965. Materials toward a monograph of the genus *Lippia* L. **Phytologia** 12 :6-71; II: 73-120; III: 130-181.
- Morawetz, W. & Samuel, M. R. A. 1989. **Karyological patterns in the Hamamelidae.** In: P.R. Crane and Blackmore (eds), Evolution, systematics and fossil history of the Hamamelidae, vol. 1, Introduction and "Lower Hamamelidae", 129-154. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Moscone, E. A.; Loidl, J.; Ehrendorfer, F & Hunziker, A. 1995. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae). **Amer. J. Bot.** 82 (2): 276-287.
- Moscone, E. A.; Lambrou, M. & Ehrendorfer, F. 1996. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). **Pl. Syst. Evol.** 202: 37-63.
- Nash, D. L. & Nee, M. 1984. **Flora de Veracruz, México, Verbenaceae.** Inst. Nac. de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos, Xalapa, Veracruz. México. 108p.
- Navaneethan, N. 1982. Karyomorphological studies in two species of *Cryptolepis* R. Br. Proc. **Indian Sci. Congr. Assoc.** 69(3VI): 231—232.
- Poggio, L.; Botta, S.M; Greizerstein, E.J. & Ferrari, M.R. 1993. Natural hybridization in *Glandularia* (Verbenaceae) I. Evolutionary implications of chromosome pairing. **Darwiniana** 32: 77-90.

- Raina, S. N.; Mukai, Y.; Kawaguchi, K. & Goel, S. 2001. Physical mapping of 18S-5,8S-26S and 5S ribosomal RNA gene families in three important vetches (*Vicia* species) and their allied taxa constituting three species complexes. **Theor. Appl. Genet.** 103: 839-845.
- Redi, C. A.; Garagna, S.; Zacharias, H.; Zuccotti, M. & Capanna, E. 2001. The other chromatin. **Chromosoma** 110: 136-147.
- Riley, R. & Capman, V. 1958. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. **Nature** Lon. 183: 713-715.
- Roser, M. 1994. Pathways of karyological differentiation in palms (Asteraceae). **Plant Sys. Evol.** 189: 83-122.
- Salimena, F. R. G. 2002. Duas novas espécies de *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae) da América do Sul. **Hickenia**. 3 (37): 145-147.
- Salimena, F. R. G. **Revisão taxonômica de *Lippia* L., sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae)**. São Paulo, SP: USP, 2000. 208p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de São Paulo, 2000.
- Salimena-Pires, F.R. **Verbenaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. São Paulo, SP: USP, 1991. 302p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de São Paulo, 1991.
- Sanders, R. W. 2001. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**. 5 (2): 303-358.
- Schauer, J. C. 1847. Verbenaceae. In: A. P. De Candolle (ed). **Prodomus Systema Naturalis**. 11: 522-700.
- Schrader, O.; Ahne, R.; Fuchs, J. & Schubert, I. 1997. Karyotype analysis of *Helianthus annuus* using Giemsa banding and fluorescence in situ hybridization. **Chrom. Res.** 5: 451-456.
- Schwarzacher, D. & Ambros, P. W. 1979. Analysis of nucleolus organizer regions (NORs) in mitotic and polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* by silver staining and Giemsa C-banding. **Pl. Syst. Evol.** 132: 27-51.
- Schwarzacher, T.; Ambros, P. & Schweizer, D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analyses. **Pl. Syst. Evol.** 134: 293-97.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma** 58: 307-324.



- Singh, R.J. **Plant Cytogenetics**. Boca Raton: CRC. 1993. 391p.
- Sinha, S. & Sharma, A. 1984. *Lantana camara* L. A review. **Fed. Report**. 95 (9-10): 621-633.
- Smith, E. B. 1966. Cytogenetics and phylogeny of *Haplopappus* section *Isopappus* (Compositae). **Can. J. Gen. Cytol.** 8 (1): 14-36.
- Srivastav, P.K. & Raina, S. N. 1982. Cytogenetics of *Clitoria*. 1. Induced autotetraploidy in *Clitoria* – Fernatea. **Cytologia** 47 (1): 99-107.
- Stace, C. A. 2000. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> centuries. **Taxon** 49: 451-477.
- Stace, C. A. **Plant taxonomy and biosystematics**. Cambridge University Press, USA. 1989. 264p.
- Stebbins, G. L. 1971. **Chromosomal evolution in higher plants**. J. W. Arrowsmith Ltd. 216p.
- Sumner, A. T. 1990. **Chromosome banding**. Unwin. Human Ltda. London, p. 434.
- Troncoso, N. S. 1961. Las Lippia (Verbenaceas) descritas del Paraguay por Robert Chodat Y John Briquet. **Darwiniana** 12: 256-292.
- Troncoso, N.S. 1974. Los generos de Verbenaceas de sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolivia, Paraguay, Uruguay y sur de Brasil). **Darwiniana** 18 (3-4): 295-412.
- Van't Hof, J. & Sparrow A. H. 1963. A relationship between DNA content, nuclear volume and minimum mitotic cycle time. **Proc. Nat. Acad. Scien.** 49: 897-902.
- Vanzela, A. L. L.; Ruas, C. F.; Oliveira, M. F. & Ruas, P. M. 2002. Characterization of diploid, tetraploid, and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. **Genetica** 114: 105-111.
- Yen-Yu, K.; Song-Bin, C.; Tsai-Yum, L.; Chang-Huain, H.; Yao-Huang, C.; Wen-Huei, C. & Chi-Chang, C. 2001. Defferential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in Phalaenopsis orchids. **Ann. Bot.** 87: 387-395.

Figura 1 - *Lippia alba* (Verbenaceae). Exemplar do Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, medindo cerca de 1,5m de altura.

Figura 2 - Metáfase mitótica (a), kariograma (b), metáfase com constrição secundária (c) e no destaque, os pares cromossômicos portadores das constrições (d) corados com Giemsa 10%.

Barra = 10  $\mu$ m.

Figura 3 - Ideograma de *L. alba* baseado nos dados morfométricos da tabela 1. As interrupções representam as constrições secundárias.

Figura 4 - Núcleo interfásico (a) e metáfase (b) corados com Giemsa 10%; metáfase submetida a banda C (c); núcleo interfásico (d) e metáfase (e) corado com DAPI; núcleo interfásico (f) e metáfase (g) com CMA; Ag-NOR em núcleo interfásico (h) e metáfase (i); FISH em núcleo interfásico (j) e metáfase (k) mostrando 06 NORs; FISH mostrando 2 sítios de rDNA 5S (l).

Barra = 10  $\mu$ m.

Figura 5 – Células do botão floral em: interfase (a); leptóteno (b); zigóteno (c); paquíteno inicial (d); paquíteno (e); paquíteno em estágio final (f); diplóteno inicial (g); diplóteno (h); diacinese (i); metáfase I (j); anáfase I (k); telófase II (l).

Barra = 10  $\mu$ m.



Figura 1

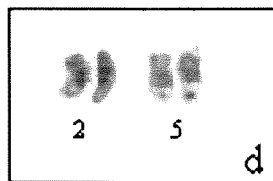
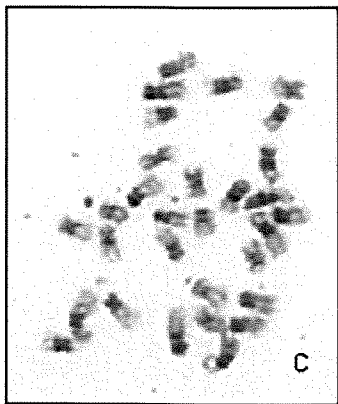
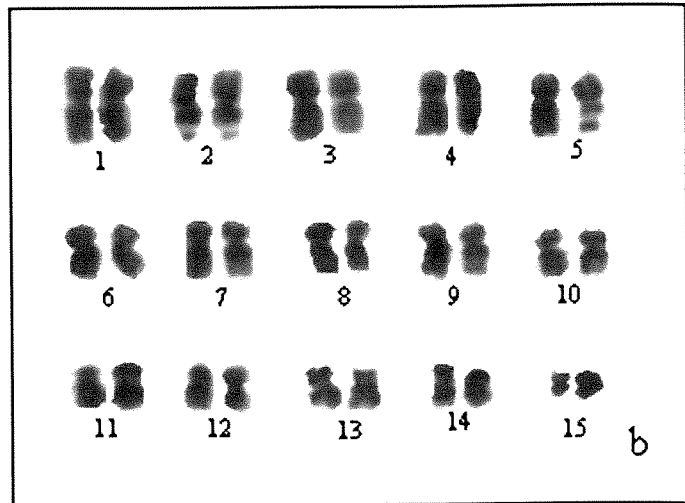
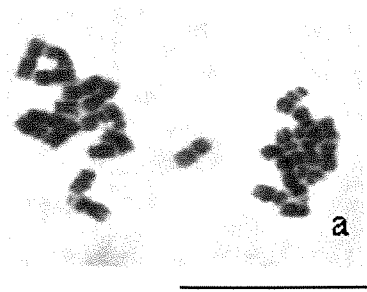


Figura 2

Tabela 1 - Dados morfométricos dos cromossomos de *Lippia alba*, N = 15.

| C  | CT   | TR%  | RB   | IC   | CC |
|----|------|------|------|------|----|
| 1  | 5.24 | 9.58 | 1.27 | 43.8 | M  |
| 2  | 4.85 | 8.86 | 1.15 | 46.4 | M  |
| 3  | 4.61 | 8.42 | 1.09 | 47.7 | M  |
| 4  | 4.40 | 8.04 | 1.30 | 43.2 | M  |
| 5  | 4.16 | 7.61 | 1.35 | 42.3 | M  |
| 6  | 3.81 | 6.96 | 1.42 | 41.2 | M  |
| 7  | 3.77 | 6.89 | 1.40 | 41.5 | M  |
| 8  | 3.57 | 6.52 | 1.60 | 38.3 | SM |
| 9  | 3.45 | 6.30 | 1.80 | 35.6 | SM |
| 10 | 3.28 | 6.00 | 1.38 | 42.0 | M  |
| 11 | 3.27 | 5.97 | 1.79 | 35.7 | SM |
| 12 | 2.98 | 5.44 | 1.44 | 40.9 | M  |
| 13 | 2.79 | 5.11 | 1.71 | 36.8 | SM |
| 14 | 2.78 | 5.09 | 1.19 | 45.6 | M  |
| 15 | 1.71 | 3.13 | 1.06 | 48.3 | M  |

C=Cromossomo; CT=Comprimento Total do Cromossomo; TR = Tamanho Relativo; RB = Relação de Braços; IC = Índice Centromérico; CC = Classificação Centromérica; M = Metacêntrico; SM = Submetacêntrico; N = Número de Metáfases Medidas.

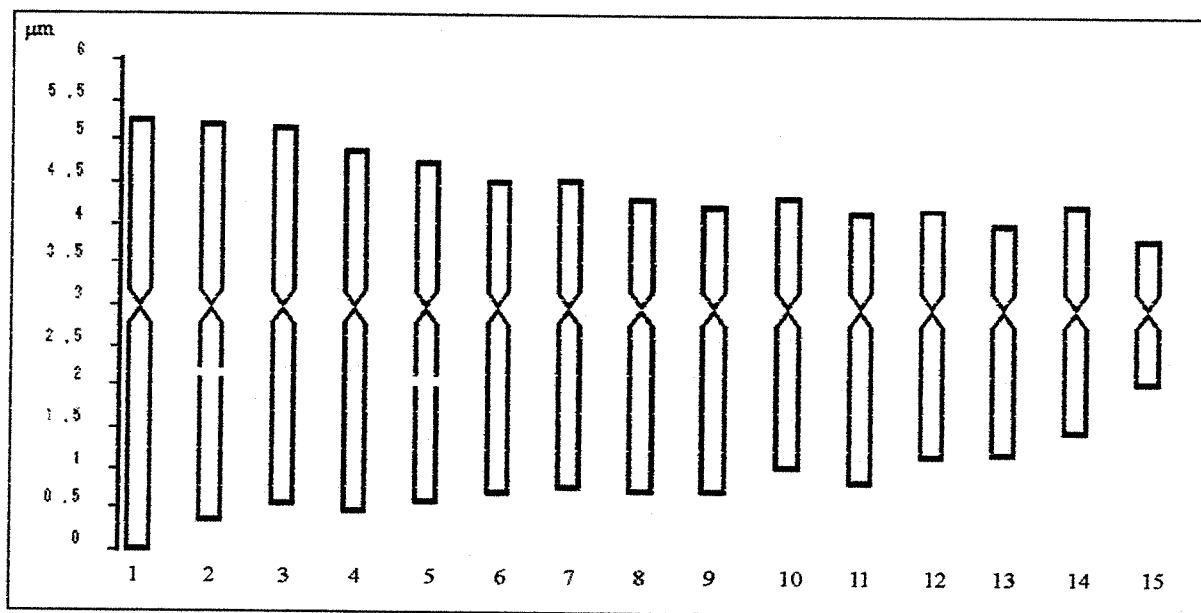


Figura 3

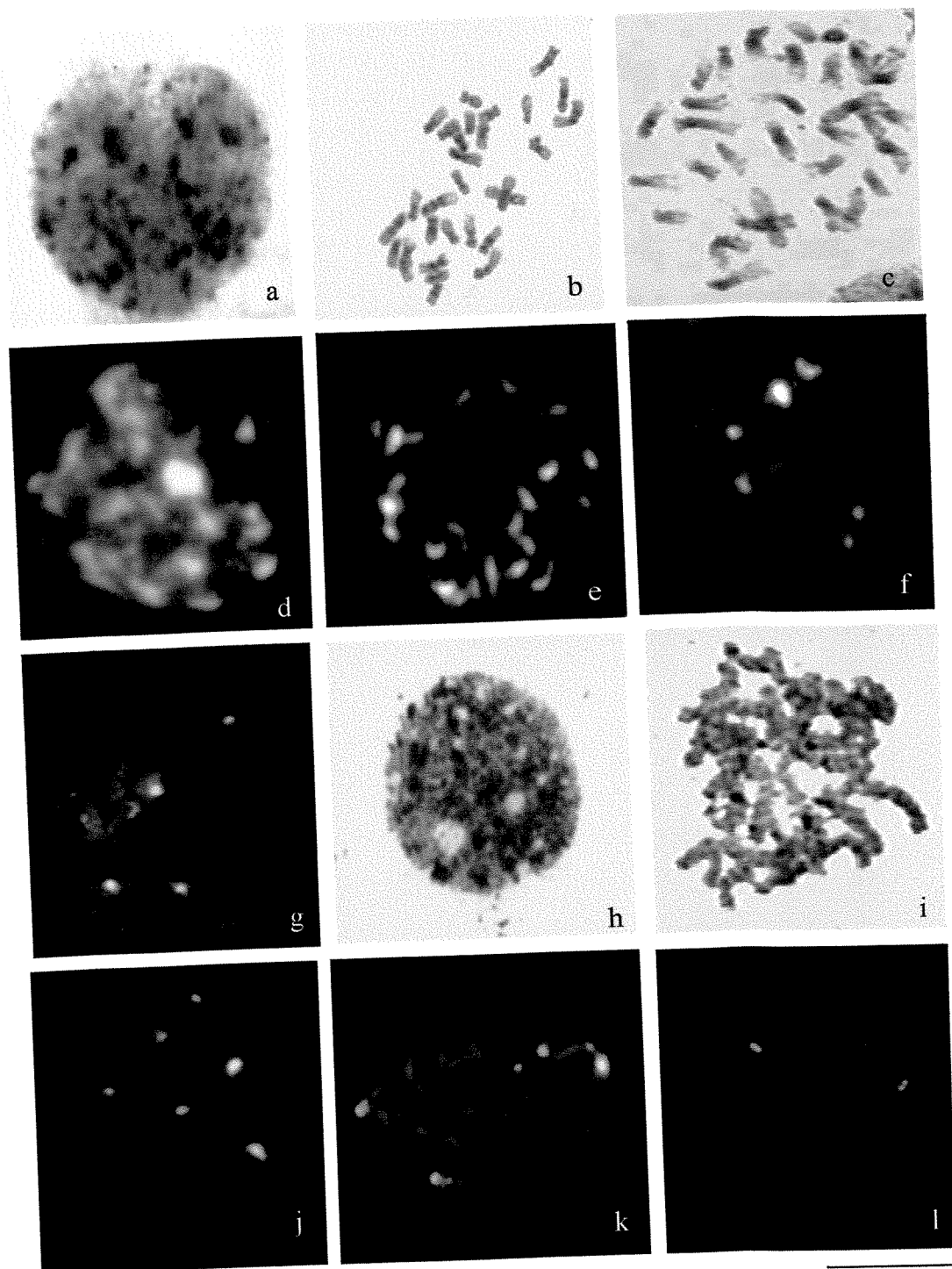


Figura 4

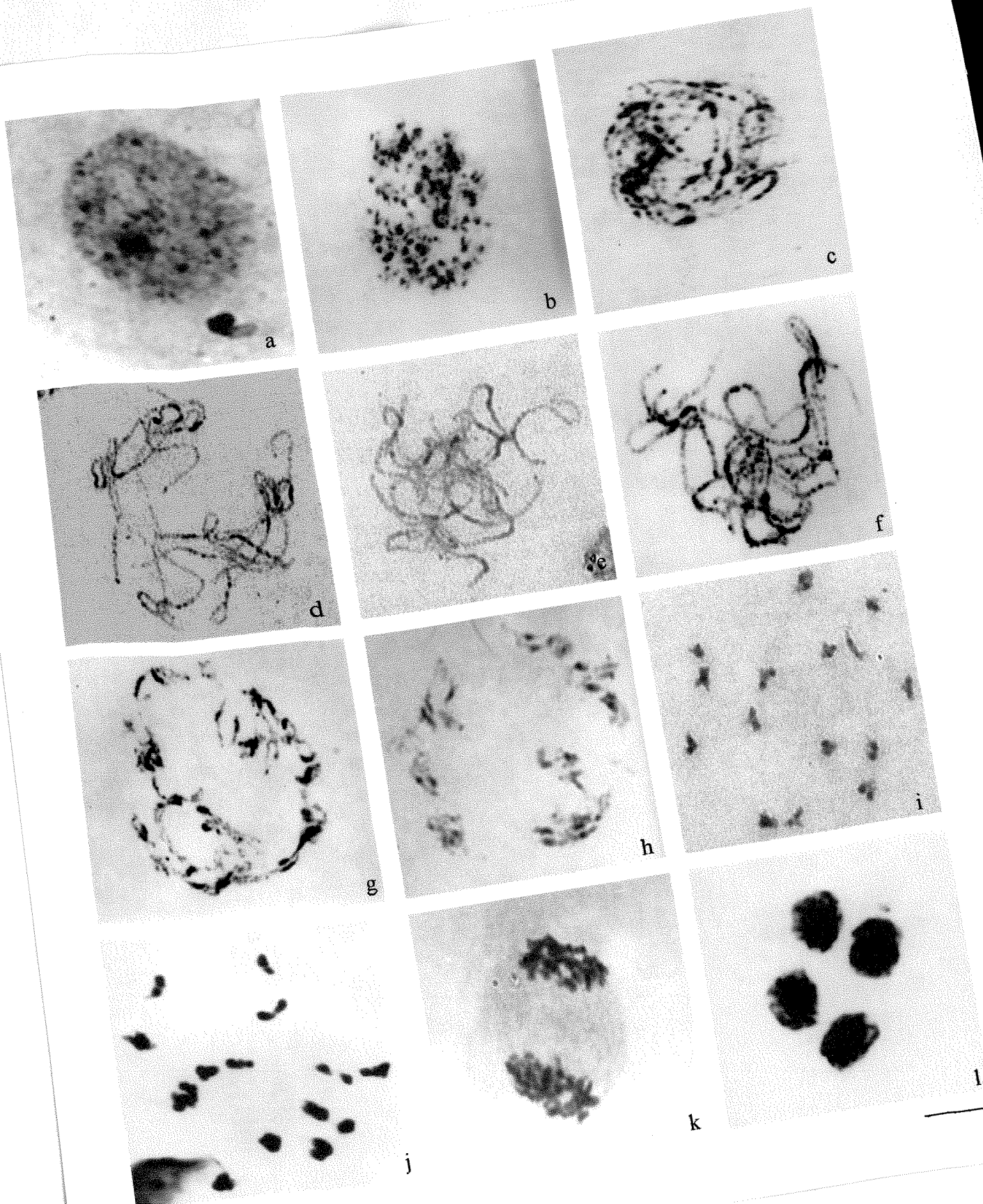


Figura 5



## **Artigo 2**

**Caracterização citogenética de *Aloysia virgata* Ort. & Patau (Verbenaceae), com evidências de um novo número diplóide para o gênero.**

**<sup>1</sup>Brandão, A.D., <sup>2</sup>Vicini, L.F. <sup>3</sup>Vanzela, A.L.L. & <sup>1</sup>Recco-Pimentel, S.M.**

- (1) Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13084-971, Campinas, SP, Brasil**
- (2) Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brasil.**
- (3) Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), 86051-990, Londrina, PR, Brasil**

Palavras-chave: citogenética, heterocromatina, NOR, FISH, Verbenaceae, *Aloysia*.

## RESUMO

*Aloysia virgata* apresenta  $2n = 36$  cromossomos metacêntricos, com cariótipo simétrico e constrição secundária nos braços longos dos pares 1 e 2. Grande quantidade de heterocromatina foi observada através das técnicas de banda C, CMA e DAPI, especialmente rica em AT. Foram detectadas quatro regiões organizadoras de nucléolo (NOR) e dois sítios de rDNA 5S pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Realizou-se também a caracterização meiótica com a identificação das fases de intérfase, prófase I, anáfase I, telófases I e II, nas quais os cromossomos apresentaram comportamento normal. Os resultados possibilitaram, pela primeira vez, obter evidências de que a espécie possivelmente tem origem diplóide com  $2n = 2x = 36$  cromossomos. Os dados desse trabalho sugerem que os gêneros de *Aloysia* e *Lippia*, embora morfológicamente muito semelhantes, devam permanecer como taxa distintos. *A. virgata* pode ser diferenciada de *Lippia alba* pela morfologia dos cromossomos e do núcleo interfásico e pelo número de regiões organizadoras de nucléolo (NORs).

## INTRODUÇÃO

A família Verbenaceae tem sido muito estudada fitoquimicamente porque alguns gêneros possuem espécies com propriedades medicinais, destacando-se entre eles, *Lippia*, *Lantana* e *Aloysia*. Os constituintes químicos de *A. virgata* possuem propriedades digestiva, estimulante, antigripal, antiespasmódica e antimalárica. Além disso, sua madeira é utilizada na indústria para a fabricação de implementos agrícolas (Troncoso, 1974; Lopez-Palacios, 1977; Botta, 1979; Bonzani *et al.*, 1997; Baelmans *et al.*, 2000; Sanders, 2001).

O gênero *Aloysia* foi descrito por Ortega & Patau em 1807 e apresenta-se amplamente distribuído nas Américas, desde o Sul dos EUA e México até o norte da Patagônia, reunindo aproximadamente 30 espécies (Botta, 1979; Troncoso, 1980).

De acordo com suas características morfológicas, a circunscrição do gênero tem sido motivo de controvérsia. Espécies do gênero *Aloysia* são freqüentemente incluídas no gênero *Lippia*, considerado morfológicamente muito próximo, levando a erros na delimitação de ambos os gêneros (Salimena-Pires, 1991; Salimena, 2000, 2002; Sanders,

2001). Ortega & Patau em 1807, descreveram o gênero *Aloysia* que foi sinonimizado por Walpers (1845) como *Verbena* L. e este foi incluído como seção *Aloysioides* do subgênero de *Lippia* L.. Schauer (1847) criou a seção *Aloysia* dentro de *Lippia* considerando-a como sinonímia de *Aloysia*. Moldenke (1959), Troncoso (1974) e Botta (1979, 1980) validaram *Aloysia* como um gênero independente de *Lippia*. No entanto, existem autores que não aceitam a segregação das espécies de *Aloysia*, uma vez que estas diferem de *Lippia* apenas pelas características das inflorescências, tais como, flores subactinomorfas e cálice 4-denteado em *Aloysia* e flores zigomorfas e cálice 2-4 denteado em *Lippia* (Botta, 1979, 1980; Salimena-Pires, 1991; Salimena-Pires & Giulietti, 1998) aspectos considerados por Nash & Nee (1984) insuficientes para segregação desse grupo de espécies em um gênero distinto.

A análise citogenética é escassa para a maioria dos gêneros na família Verbenaceae, em parte devido à presença de grande quantidade de citoplasma que permanece aderido à lâmina e ao pequeno tamanho dos cromossomos. Suas flores são de tamanho reduzido dificultando também as análises meióticas (Kumar & Dutt, 1989; Brandão *et al.*, in prep. - ver artigo 1). Para o gênero *Aloysia*, estudos citogenéticos foram realizados em apenas cinco das 30 espécies conhecidas: *A. ligustrina* e *A. polistachia* ( $2n = 36$ ) (Diers, 1961 apud Corazza-Nunes *et al.*, 1995; Andrada *et al.*, 1998), *A. lycioides* e *A. gratissima* ( $2n = 54$ ) (Corazza-Nunes *et al.*, 1995; Andrada *et al.*, 1998) e *A. scorodonioides* ( $2n = 72$ ) (Covas & Schnack, 1946 apud Corazza-Nunes *et al.*, 1995).

Com o objetivo de contribuir com dados que possam ajudar na resolução de problemas de sistemática e taxonomia no gênero e na família, neste trabalho determinou-se o cariótipo, o padrão de heterocromatina e NOR, e algumas fases meióticas da espécie *A. virgata*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção das sementes e das raízes**

Sementes de *Aloysia virgata* (Figura 1) foram coletadas na Reserva Municipal da Mata de Santa Genebra, Campinas (SP), Brasil. As sementes foram colocadas em placas de Petri, contendo papel de filtro umedecido com água destilada e incubadas em câmara

germinativa com fotoperíodo de 12 horas a 25°C, até a emissão da raiz. As inflorescências imaturas de *A. virgata* foram imediatamente fixadas após a coleta em metanol:ácido acético (3:1).

Avaliou-se o índice percentual de germinação das sementes, utilizando-se 5000 sementes, nas mesmas condições anteriormente citadas. Após 08 dias contou-se o número total de sementes germinadas em relação ao número total de sementes utilizadas. Foram realizadas 03 repetições.

Uma exsicata da espécie *Aloysia virgata* foi depositada no Herbário CESJ da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) como material voucher e registrado sob o número de tombo 39.308.

### **Preparação de lâminas**

Após a emissão das raízes, as sementes foram transferidas para placas escavadas contendo solução de orizalina 12  $\mu$ M, a 25°C, durante 4 horas e 30 minutos. Após esse tratamento, as raízes foram fixadas em metanol:ácido acético (3:1) por, no mínimo, 24 horas. A digestão enzimática foi realizada com o complexo Pectinex (Novo Nordisk Ferment<sup>TM</sup> Bioindustrial do Brasil) na concentração de 1:20 (tampão citrato de sódio 2 mM, pH 3,5), durante uma hora, a 34°C. As lâminas foram preparadas a partir da técnica de secagem ao ar com digestão enzimática segundo Carvalho (1995).

Para obtenção de células meióticas utilizou-se a metodologia descrita por Brandão *et al.* (2000), em função do tamanho reduzido das flores (1,0 a 1,5 mm de comprimento e 1,0 a 1,5 mm de largura, respectivamente). Foram utilizadas aproximadamente 60 anteras que foram transferidas para um microtubo de 0,3 mL, com tela de poliéster em sua extremidade. O material foi lavado em água destilada durante 30 minutos. O tubo contendo as anteras foi imerso em uma solução enzimática concentrada (Pectinex - Novo Nordisk Ferment<sup>TM</sup> Bioindustrial do Brasil) durante 25 minutos a 34°C. Após a digestão, esse material foi lavado em água destilada durante 20 minutos. Em seguida, as anteras foram fragmentadas, expulsando as células-mãe do grão de pólen (PMCs). A suspensão celular foi centrifugada a 2000 rpm durante seis minutos. Decorridos 20 minutos, o material foi ressuspensionado e gotejado nas lâminas. Após secagem ao ar e em placa aquecedora, as lâminas foram

submersas em ácido acético 45% durante 20 segundos. A coloração foi feita com Giemsa a 10% em tampão fosfato 0,1 M pH 6,8, durante um minuto.

### **Cariótipo**

Para análise do cariótipo, as lâminas foram tratadas com ácido acético 45% gelado durante 20 segundos e em seguida coradas com Giemsa (10% em tampão fosfato 0,1 M a pH 6,8), durante um minuto. Foram avaliadas 15 metáfases para montagem dos cariogramas e obtenção das medidas de comprimento total dos cromossomos (CT – comprimento do braço curto + comprimento do braço longo) e comprimento dos braços dos cromossomos. Para confecção do ideograma foram utilizados os parâmetros de tamanho relativo (TR – tamanho total do cromossomo individual X 100/tamanho total do genoma), índice centromérico (IC – comprimento do braço curto X 100/comprimento do braço longo + comprimento do braço) e relação de braços (RB – comprimento do braço longo/comprimento do braço curto) com ajuda do programa Image Pro-Plus versão 4.5, da Media Cybernetics. Os cromossomos foram classificados segundo Guerra (1988).

### **Núcleos Interfásicos**

A morfologia nuclear foi analisada através da coloração com Giemsa em aproximadamente 1000 núcleos interfásicos. Foi utilizada a classificação de Guerra (1987a, b).

### **Banda C**

A heterocromatina constitutiva foi detectada de acordo com a técnica descrita por Schwarzscher *et al.* (1980), com pequenas modificações. As lâminas foram hidrolisadas em ácido clorídrico 0,2 N, à temperatura ambiente, durante 1 minuto e 15 segundos. Em seguida, foram tratadas em solução saturada de hidróxido de bário a 5%, em temperatura ambiente, durante oito minutos e finalmente incubadas em 2xSSC, a 60°C, durante 80 minutos. A coloração foi realizada com Giemsa (10% em tampão fosfato 0,1 M pH 6,8), durante 15 minutos.

O percentual de heterocromatina constitutiva foi obtido a partir da média das áreas positivas à banda C em relação ao genoma total de dez metáfases. As medidas foram obtidas com o auxílio do programa Image Pro-Plus versão 4.5, da Media Cybernetics.

### **Coloração com fluorocromos**

A coloração com fluorocromos foi obtida a partir da técnica descrita por Schweizer (1976) com algumas modificações. Para coloração com DAPI, as lâminas foram tratadas com 150 µL de distamicina (0,1 mg/mL em água deionizada estéril) por 20 minutos, lavadas com tampão McIlvaine e secas ao ar. As lâminas foram incubadas em solução DAPI (0,2 mg/mL em água deionizada estéril) no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 minutos.

Para a coloração com cromomicina (CMA) as lâminas foram tratadas com 150 µL de distamicina (0,3 mg/mL em água deionizada estéril) por 20 minutos, lavadas com tampão McIlvaine e secas ao ar. A coloração foi realizada com CMA (0,5 mg/ 10mL em água deionizada estéril) à temperatura ambiente, durante 45 minutos no escuro.

Para ambas as colorações, após lavagem em tampão as lâminas foram secas ao ar e montadas com solução de sacarose saturada e analisadas ao microscópio após 15 dias.

### **Ag-NOR**

Para observação das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foram testadas diversas metodologias, sendo utilizada a técnica descrita por Fukui e Nakayama (1996), que consiste em tratar o material com quatro a oito gotas da solução de nitrato de prata 50% em citrato de sódio 0,002%, pH 3,0 (1:1), a 60°C durante 10 a 15 minutos, lavadas em água deionizada, secas ao ar e analisadas ao microscópio.

### **Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)**

A técnica de FISH foi realizada segundo método de Heslop-Harrison *et al.* (1991), com pequenas modificações. Utilizou-se como sondas os recombinantes pTa 71 contendo uma unidade de rDNA 45S (18S-5.8S-26S + IGS) de *Triticum aestivum* de aproximadamente 9Kb clonada em pUC 19 (Gerlach & Bedbrook, 1979) e pTa 794,

contendo um fragmento de rDNA 5S de *T. aestivum*, com 410pb, clonada em pBR 322 (Gerlach & Dyer, 1980), ambas marcadas com biotina por “nick translation”. As lâminas foram incubadas com 100 µl/mL RNase durante uma hora a 37°C, fixadas em paraformaldeído 4% por dez minutos, desidratadas em série gradativa de álcool 70 a 100% e secas ao ar. As sondas (100 ng de DNA/µL) foram desnaturadas a 70°C por dez minutos e imediatamente colocadas no gelo. Utilizou-se 5 µL de sonda para cada lâmina e os cromossomos foram desnaturados juntamente com a sonda em termociclador (MJ Research) a 90°C durante dez minutos. Em seguida foram transferidas para 48°C por 10 minutos e à 38°C por cinco minutos, sendo finalmente incubadas em câmara úmida a 37°C overnight. As lavagens pós-hibridação para rDNA 45S foram realizadas segundo Cuadrado e Jouve (1994) e para rDNA 5S foi utilizado 6xSSC durante 20 minutos e 4xSSC durante 10 minutos, todas com agitação constante. As regiões hibridadas foram detectadas com Avidina-FITC. Os cromossomos foram corados com solução de iodeto de propídio (2,5 µg/µL) durante 30 minutos.

#### **Germinação das sementes**

Foi possível observar que 80% das sementes utilizadas germinaram sob condições anteriormente citadas.

#### **Meiose**

Foram analisadas cerca de 100 células de cada fase, as quais foram identificadas com o auxílio das imagens do ciclo celular meiótico de milho, cevada, *Artemisia* e *Lippia alba* descritas respectivamente por Singh (1993), Fukui & Nakayama (1996) e Brandão *et al.* (in prep – ver artigo 1).

### **RESULTADOS**

O cariótipo de *A. virgata* apresentou  $2n = 36$  cromossomos pequenos, todos metacêntricos, constituindo portanto um cariótipo simétrico. Os pares 1 e 2 apresentaram uma constrição secundária no braço longo (Figuras 2 e 3 e tabela 1).



O núcleo interfásico foi classificado como semi-reticulado, segundo Guerra (1987a) (Figura 4a).

A técnica de banda C mostrou grande quantidade de heterocromatina constitutiva, representando cerca de 64% do genoma (Figura 4c), que também foi observada com coloração convencional com Giemsa 10% (Figura 4b). Através da coloração com DAPI observou-se várias regiões heterocromáticas ricas em pares de bases AT (Figura 4d-e), enquanto a coloração com CMA evidenciou apenas algumas poucas regiões ricas em CG (Figura 4f-g).

Mediante a aplicação de várias metodologias para localização das NORs pela prata (Ag-NOR), observou-se marcações inespecíficas para todos os testes, tanto em células mitóticas quanto em células meióticas (Figura 4h-i). A técnica de FISH permitiu detectar quatro sítios da NOR, sendo estes de tamanho diferente nos dois pares de cromossomos (Figura 4j-k). O rDNA 5S foi localizado em dois sítios de um par de homólogos (Figura 4l).

Não foi possível localizar no ideograma as posições dos blocos de heterocromatina, dos sítios da NOR e do rDNA 5S, devido à grande dificuldade em definir suas posições exatas nos cromossomos e identificar o número dos cromossomos portadores, dado à grande similaridade entre eles e ao tamanho reduzido.

A análise da viabilidade das sementes mostrou 80% de germinação.

Foi possível observar as fases de intérfase (Figura 5a), leptóteno (Figura 5b), zigóteno (Figura 5c), paquíteno (Figura 5d), diplóteno inicial (Figura 5e), diplóteno (Figura 5f), diplóteno tardio (Figura 5g), diacinese (Figura 5h), anáfase I (Figura 5i), telófase I (Figura 5j) telófase II inicial (Figura 5k) e telófase II (Figura 5l). Observou-se também a formação de 18 bivalentes durante a diacinese (Figura 5h), a presença  $n = 18$  cromossomos durante a telófase I (Figura 5j) e a segregação normal dos conjuntos cromossômicos durante a anáfase I, telófase I e II (Figura 5i-l).

## DISCUSSÃO

A dificuldade encontrada por diversos autores para estabelecer a taxonomia da família, se justifica pela grande semelhança morfológica apresentada pelas espécies do

mesmo gênero e com espécies de gêneros próximos (Jussieu, 1789; Chamisso, 1832; Schauer, 1847, 1851; Bentham & Hooker, 1876; Briquet, 1895, 1897; Chodat, 1902; Junell, 1934; Moldenke, 1946, 1958; Troncoso, 1974; Noamesi, 1977; Botta, 1980; Corrêa, 1984; Nash & Nee, 1984; Compadre *et al.*, 1986; Gomes *et al.*, 1993; Valentin *et al.*, 1995; Bonzani *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1998; Zoghbi, 1998; Judd *et al.*, 1999; Silva, 1999; Salimena, 2000, 2002). Existem ainda características na família que dificultam sua sistemática, tais como a presença de híbridos naturais, ocorrência de poliploidia, redução no tamanho e no número dos cromossomos e a ocorrência de apomixia (Sen & Sahni, 1955; Raghavan & Arora, 1960; Khoshoo & Mahal, 1967; Botta, 1979; Spies, 1983-84; Spies 1984; Sinha & Sharma, 1984; Sanders, 1987; Ojha & Dayal, 1992; Corazza-Nunes *et al.*, 1995; Sinha *et al.*, 1995).

Estudos da viabilidade de sementes, fertilidade do grão de pólen e do comportamento dos cromossomos meióticos em *Aloysia*, revelaram inúmeras anormalidades, que associadas ao alto percentual de grãos de pólen estéreis e ao baixo índice de germinação das sementes, sugerem a presença de poliploidia na espécie *A. lycioides* e *A. gratissima* ( $2n = 54$ ) e *A. polistachia* ( $2n = 36$ ) (Corazza-Nunes *et al.*, 1995; Andrada *et al.*, 1998). As espécies *A. ligustrina* ( $2n = 36$ ) e *A. scorodonioides* ( $2n=72$ ) (Diers, 1961; Covas & Schnack, 1946 apud Corazza-Nunes *et al.*, 1995), são consideradas tetraplóide e octaplóide, respectivamente, já que o número básico indicado para o gênero é  $x = 9$  cromossomos (Corazza-Nunes *et al.*, 1995). Nossos estudos revelaram  $2n = 36$  cromossomos para *Aloysia virgata*, com um cariótipo simétrico e todos os cromossomos metacêntricos, não sendo possível definir o nível de ploidia para a espécie através de técnicas convencionais. No entanto, através das análises de FISH foi possível observar a presença de um único par de cromossomos com sítio de rDNA 5S e dois pares com NORs, porém de tamanhos diferentes. Esses dados sugerem que o cariótipo de *A. virgata* seja de origem diplóide com um número básico  $x = 18$  cromossomos. A possível ocorrência de poliploidia em *A. virgata* foi descartada pela inexistência de no mínimo dois pares cromossômicos carregando os sítios de rDNA 5S, no entanto, não podemos deixar de considerar que a perda desse sítios possa ter ocorrido ao longo do tempo. O alto índice de germinação das sementes (cerca de 80%) para a população de *A. virgata* analisada no presente trabalho, também reforça a

hipótese de diploidia, já que plantas poliplóides normalmente apresentam baixo índice de germinação e alto índice de esterilidade das sementes, como relatado por diversos autores para diversas espécies (Stace, 1989; McKellar & Quesenberry, 1992; Judd *et al.*, 1999; Miller & Venable, 2000; Otto & Whitton, 2000). Outro resultado que corrobora a hipótese da ausência de poliploidia para a origem da *A. virgata* foi a presença constante de 18 bivalentes normais observados durante a diacinese e metáfase I, contrariando os relatos já existentes para o gênero, embora saiba-se que a presença de bivalentes não seja um indicativo definitivo para indicar o nível de ploidia, uma vez que pode não haver a formação de multivalentes em poliplóides e que quando os cromossomos são muito pequenos, a formação de multivalentes pode ser dificultada (Srivastav & Raina, 1982). Pode haver também um controle gênico inibindo a formação de multivalentes em poliplóides, como relato em trigo (Riley & Chapman, 1958) e o pareamento de cromossomos homeólogos, inibindo a formação de tetravalentes (Stebbins, 1971; Stace, 1989, 2000). No entanto, as sondas utilizadas na técnica de FISH funcionaram como importantes marcadores citogenéticos para a evidenciar o nível de ploidia da origem da espécie *A. virgata*, principalmente os sítios de rDNA 5S. Raina *et al.* (2001) e Besendorfer *et al.* (2002), também utilizaram rDNA 5S como marcadores em espécies vegetais. Considerando os resultados de citogenética molecular, *A. virgata* seria o primeiro caso em que foi possível evidenciar uma origem diplóide no gênero, determinando, portanto,  $x = 18$  cromossomos como o novo número básico para *Aloysia*.

O gênero *Aloysia* é considerado morfológicamente muito semelhante a *Lippia*. No entanto, não existe na literatura descrição do cariótipo para espécies desse gênero que permita uma comparação mais detalhada entre eles, havendo apenas relato do número cromossômico. Uma única espécie de *Lippia*, *L. alba*, foi recentemente estudada por Brandão *et al.* (in prep - ver artigo 1). Assim, considerando *L. alba* e *A. virgata* como representantes dos respectivos gêneros, algumas características citogenéticas contribuem para diferenciar essas taxa. Em *L. alba* observou-se a presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, enquanto todos são metacêntricos em *A. virgata*; foram detectadas seis NORs (três pares portadores) em *L. alba* e quatro NORs em *A. virgata* e o núcleo interfásico apresenta morfologia do tipo areticulado em *L. alba* e semi-reticulado em

*A. virgata*. A morfologia dos núcleos interfásicos representa um importante parâmetro na citotaxonomia. Sua morfologia apresenta-se constante entre as espécies, podendo ser utilizado para definir uma determinada espécie (Guerra, 1987a). Essas espécies, no entanto, assemelham-se quanto à presença de grande quantidade de heterocromatina em relação ao tamanho de seus genomas e dois sítios de rDNA 5S. Portanto, os dados obtidos no presente trabalho, comparados com os de *L. alba*, ainda nos permitem sugerir que *Aloysia* e *Lippia* sejam tratados como gêneros independentes. Entretanto, caracteres citogenéticos poderão ser de grande importância para o estudo taxonômico de ambos os gêneros, desde que exista diferenças citogenéticas em cada gênero à medida que novas espécies venham a ser estudadas.

#### **AGRADECIMENTOS:**

Os autores agradecem à FAPESP (Processo nº 00/11842-2) pela bolsa concedida a A.D.B., ao Dr. Ivany F. M. Válio e MSc. Fabiano M. Scarpa pela coleta das sementes, à Dra. Fatima R. G. Salimena pela identificação da espécie e coleta das inflorescências, ao Dr. Angelo L. Cortelazzo pela permissão para uso da câmara de germinação e à Dra. Eliana R. F. Martins pelas valiosas discussões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrada A. B., Pastoriza A., Martínez-Pulido L. V. (1998). Citogenética en tres especies de Verbenaceas. Rev. Fac. Agron. 15: 312-318.
- Baelmans R., Deharo E., Bourdy G., Muñoz V., Quenevo C., Sauvain M., Ginsburg H. (2000). A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach part IV. Is a new hem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products ? J. Ethnopharmacology 73: 271-275.
- Bentham G., Hooker W. J. (1876). Verbenaceae. In: Bentham G. (ed.) Genera Plantarum 2 (2):1131-1160.
- Besendorfer V., Samardzija M., Zoldos V., Solic M. E., Papes D. (2002). Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Aliaceae). Bot. J. Linn. Soc. 139: 99-108.
- Bonzani N. E., Fillipa E. M., Barboza G. E. (1997). Particularidades epidérmicas em algumas espécies de Verbenaceae. Ann. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot. 68 (2): 47-56.
- Botta S. M. (1979). Las especies argentinas del género *Aloysia* (Verbenaceae). Darwiniana 22: (1-3) 67-108.
- Botta S. M. (1980). Las especies del género *Acantholippia* (Verbenaceae). Darwiniana 22: 511-532.
- Brandão A. D.; Viccini, L. F. & Pezzin, R. 2000. Meiotic characterization in *Lippia alba* (Verbenaceae). Genet. Mol. Biol. (Suppl.) 23 (3): 372.
- Briquet I. (1895). Verbenaceae. In: Engler A., Prantl K. (eds.). Nat. Pflanzenfam. 4 (3A): 132-182.
- Briquet I. (1897). Verbenaceae. In: Engler A., Prantl K. (eds.). Nat. Pflanzenfam. 4 (3A): 132-182.
- Carvalho C. R. (1995). Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.). D.Sc Thesis. Universidade Federal de Viçosa. 127p.
- Chamisso A. (1832). De plantis Verbenaceae in Expeditione Romanzoffiana et In: Schelechtendal D. F. (ed.) Herbarius Regiis. Linnaea 7: 105-128.
- Chodat R. (1902). Verbenaceae. In: Chodat R., Hassler (eds) Plantae Hasslerianae I: 196-201 In: Bull. Her. Boissier, Ser. II 9: 817-822.

- Compadre C. M., Robbins E. F., Kinghorn A. D. (1986). The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquiries, and constituents. J. Ethnopharmacol. 15 (1): 89-106.
- Corazza-Nunes M. J., Pagliarini M. S., Silva N., Silva I. (1995). Hexaploidy and fertility interrelationships in *Aloysia lycioides* (Verbenaceae). Arq. Biol. Tecnol. 38 (2): 627-630.
- Costa S. M. O., Lemos T. L. G., Monte F. J. Q., Matos F. J. A. (1998). Quinona dimérica (tectol) de *Lippia sidoides* (Verbenaceae). In: XV Simpósio de Plantas Medicinais 132p.
- Cuadrado A., Jouve N. (1994). Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x - *Triticale*. Chrom. Res. 2: 231-238.
- Fukui K., Nakayama S. (1996). Plant chromosomes: laboratory methods. Boca raton: CRC. 274p.
- Gerlach W. L., Bedbrook J. R. (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucl. Acids Res. 7: 1869-1885.
- Gerlach W. L., Dyer T. A. (1980). Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contains 5S-rRNA genes. Nucl. Acids Res. 8: 4851-4865.
- Gomes E. C., Ming L. C., Moreira E. A., Miguel O. G., Miguel M. D., Kerber V. A., Filho A. W. (1993). Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (Verbenaceae). Rev. Bras. Farm. 74 (2):29-32.
- Guerra M. S. (1987a). Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). Plant Syst. Evol. 158: 107-115.
- Guerra M. S. (1987b). Cytogenetics of Rutaceae IV. Structure and systematic significance of interphase nuclei. Cytologia 52: 213-222.
- Guerra, M. (1988). Introdução a citogenética geral. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara. 142p.
- Heslop-Harrison, J. S.; Schwarzacher, K.; Ananthawat-Jonsson, A. R.; Leitch, M. & Leitch, I. J. 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. Technique 3: 106-109.
- Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A., Stevens P. F. (1999). Plant systematics. A phylogenetic approach. Sinauer Associates, Inc. 419p.
- Junell S. (1934). Zur gynaceummorphologie und systematik der verbenaeen und labiaten. Sym. Bot. Upsal. 4: 1-219.

- Khoshoo T. N., Mahal C. (1967). Versatile reproduction in *Lantana camara*. Curr. Sci. 20 (8): 201-203.
- Kumar P., Dutt B. (1989). Cytogenetic basis of breeding system in some verbenaceous species. Cytologia 54: 347-353.
- Lopez - Palacios S. (1977). Flora de Venezuela. Talleres graficos universitarios: Merida. 654pp.
- McKellar M. A., Quesenberry K. H. (1992). Chromosome pairing and pollen viability in *Desmodium ovalifolium* Wall. X *Desmodium heterocarpon* (L.) DC. Hybrids. Aust. J. Bot. 40: 243-247.
- Miller J. S., Venable D. L. (2000). Polyploidy and the evolution of gender dimorphism in plants. Science 289: 2335-2338.
- Moldenke H. N. A. (1946). A brief historical survey of the Verbenaceae and related families. Plant Life 2: 13-98.
- Moldenke H. N. (1958). Additional notes on the genus *Aegiphila* IX. Phytologia 2: 433-450.
- Moldenke H. (1959). Résumé of Verbenaceae, Aviceniaceae, Stilbaceae, Symphoremaceae and Eriocaulaceae of the world as to valid taxa. Geographic distribution and synonym 495pp.
- Nash D. L., Nee M. (1984). Flora de Veracruz, México, Verbenaceae. Inst. Nac. Inv. Sobre Recursos Bióticos, Xalapa, Veracruz. México. 108p.
- Noamesi B. K. (1977). Power tea (*Lippia nodiflora*) a potent hypertensive therapy. West. Afr. J. Pharmacol. Drug. Res. 4 (1): 33-36.
- Ojha B. M., Dayal N. (1993). Cytological investigations in the genus *Lantana* in India. Cytologia 57: 9-13.
- Otto S. P., Whitton J. (2000). Polypliod incidence and evolution. Ann. Rev. Genet. 34: 401-437.
- Pio-Corrêa M. (1984). Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 747p.

- Raghavan R. S., Arora C. M. (1960). Morphological and cytological studies in the genus *Lantana* L. Bull. Bot. Surv. Índia. 2 (3-4): 299-303.
- Raina S. N., Mukai Y., Kawaguchi K., Goel S. (2001). Physical mapping of 18S-5,8S-26S and 5S ribosomal RNA gene families in three important vetches (*Vicia* sp) and their allied taxa constituting three species complexes. Theor. Appl. Genet. 103: 839-845.
- Riley R., Capman V. (1958). Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. Nature Lon. 183: 713-715.
- Salimena F. R. G. (2000). Revisão taxonômica de *Lippia* L., sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae). D.Sc Thesis. Universidade de São Paulo. 298p.
- Salimena F. R. G. (2002). Duas novas espécies de *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae) da América do Sul. Hickenia 3 (37): 145-147.
- Salimena-Pires F. R. (1991). Verbenaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. M.Sc Thesis. Universidade de São Paulo. 302p.
- Salimena-Pires F. R., Giuliatti A. M. (1998). Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Verbenaceae. Bol. Bot. Univ. São Paulo. 17: 155-180.
- Sanders R. S. (1987). Taxonomic significance of chromosome observations in Caribbean species of *Lantana* (Verbenaceae). Am. J. Bot. 74 (6): 914-920.
- Sanders R. W. (2001). The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. Harvard Papers in Botany 5 (2): 303-358.
- Schauer J. C. (1847). Verbenaceae. In: Candolle A. P. (ed). Prodomus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis. 11: 522-700.
- Schauer J. C. (1851). Verbenaceae. In: Martius C. F. (ed.) Flora Brasiliensis (9): 170-322, tab. 32-50.
- Schwarzacher T., Ambros P., Schweizer D. (1980). Application of Giemsa banding to orchid karyotype analyses. Plant Syst. Evol. 134: 293-97.
- Schweizer D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. Chromosoma 58: 307-324.
- Sen N. K., Sahni V. M. (1955). Triploid, tetraploid and pentaploid *Lantana camara*. Sci. Cul. 20 (11): 558-559.
- Silva T. R. S. (1999). Redelimitação e revisão taxonômica do gênero *Lantana* L. (Verbenaceae) no Brasil. D.Sc Thesis. Universidade de São Paulo. 176p.



- Singh R. J. (1993). Plant Cytogenetics. Boca Raton: CRC. 391p.
- Sinha S., Sharma A. (1984). *Lantana camara* L. A review. Fed. Repert. 95 (9-10): 621-633.
- Sinha S., Sinha B., Sharma A. (1995). Chromosome composition of *L. camara* L.: Karyotype, basic number and DNA diversity. Nucleus 38 (1-2): 16-22.
- Spies J. J. (1984). A cytotaxonomic study of *Lantana camara* (Verbenaceae) from South Africa. S. Afr. J. Bot. 3: 231-250.
- Spies J. J. (1983-84). Hybridization potencial of *Lantana camara* (Verbenaceae). Gracia de Orta, Ser. Bot. Lisboa. 6 (1-2): 145-150.
- Srivastav P. K., Raina S. N. (1982). Cytogenetics of *Clitoria*. 1. Induced autotetraploidy in *Clitoria* – Fernateia. Cytologia 47 (1): 99-107.
- Stace C. A. (2000). Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> centuries. Taxon 49: 451-477.
- Stace C. A. (1989). Plant taxonomy and biosystematics. Cambridge University Press, USA. 264pp.
- Stebbins G. L. (1971). Chromosomal evolution in higher plants. J. W. Arrowsmith Ltd. 216p.
- Troncoso N. S. (1974). Los generos de Verbenaceas de sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolivia, Paraguai, Uruguay y sur de Brasil). Darwiniana 18 (3-4): 295-412.
- Troncoso N. S. (1980). Novidades taxonomicas em los *Lantana* y *Lippia* (Verbenaceas). Hickenia 1 (42): 227- 231.
- Walpers G. (1845). Repertorium Botanices Systematicae 4: 3-314.
- Zoghbi M. G. B., Andrade E. H. A., Santos A. S., Silva M. H. L., Maia J. G. S. (1998). Essential oils of *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. growing wild in the brazilian amazon. Flav. Frag. J. 13: 47- 48.

Figura 1 – *Aloysia virgata* (Verbenaceae). Exemplar da Cadeia do Espinhaço-MG., medindo aproximadamente 3,5m de altura (a) botões florais em destaque (b).

Figura 2 – Metáfase mitótica (a), kariograma (b), metáfase com constrição secundária (c) e no destaque, os pares cromossômicos portadores das constrições (d) corados com Giemsa 10%.

Barra = 10  $\mu$ m.

Figura 3 - Ideograma de *A. virgata* baseado nos dados morfométricos da tabela 1. As interrupções representam as constrições secundárias.

Figura 4 – Núcleo interfásico (a) e metáfase (b) corados com Giemsa; metáfase submetida a banda C (c); núcleo interfásico (d) e metáfase (e) corado com DAPI; núcleo interfásico (f) e metáfase (g) com CMA; Ag-NOR em núcleo interfásico (h) e diacinese em células meióticas (i); FISH em núcleo interfásico (j) e metáfase (K) mostrando 04 NORs; FISH em prófase mostrando 2 sítios de rDNA5S (l).

Barra = 10  $\mu$ m.

Figura 5 – Células do botão floral em: interfase (a); leptóteno (b); zigóteno (c); paquíteno (d); diplóteno inicial (e); diploteno (f); diploteno tardio (g); diacinese (h); anáfase I (i); telófase I (j); telófase II inicial (k); telófase II (l).

Barra = 10  $\mu$ m.

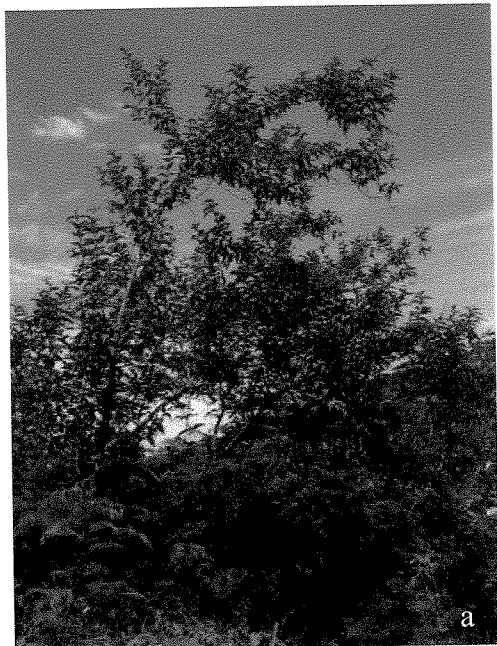
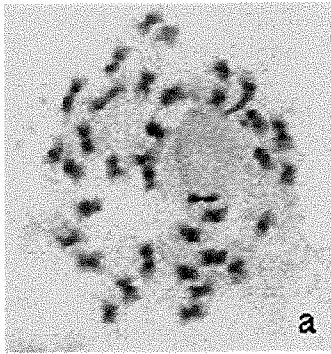
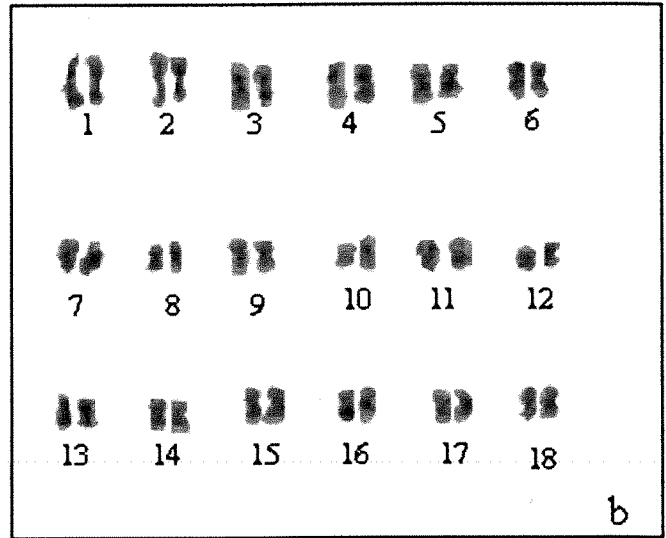


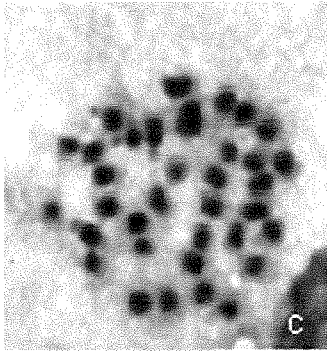
Figura 1



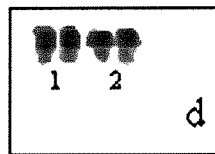
a



b



c



d

Figura 2

Tabela 1 - Dados morfométricos dos cromossomos de *Aloysia virgata*, N = 15.

| C  | CT   | TR%  | RB   | IC   | CC |
|----|------|------|------|------|----|
| 1  | 2.62 | 7.70 | 1.47 | 40.5 | M  |
| 2  | 2.50 | 7.16 | 1.33 | 42.8 | M  |
| 3  | 2.20 | 6.30 | 1.29 | 43.6 | M  |
| 4  | 2.19 | 6.27 | 1.38 | 42.0 | M  |
| 5  | 2.15 | 6.16 | 1.21 | 45.1 | M  |
| 6  | 2.08 | 5.95 | 1.31 | 43.2 | M  |
| 7  | 2.03 | 5.81 | 1.33 | 42.8 | M  |
| 8  | 2.00 | 5.73 | 1.29 | 43.5 | M  |
| 9  | 1.92 | 5.50 | 1.40 | 41.6 | M  |
| 10 | 1.90 | 5.44 | 1.23 | 44.7 | M  |
| 11 | 1.88 | 5.38 | 1.26 | 44.1 | M  |
| 12 | 1.84 | 5.27 | 1.27 | 44.0 | M  |
| 13 | 1.78 | 5.10 | 1.37 | 42.1 | M  |
| 14 | 1.71 | 4.89 | 1.28 | 43.8 | M  |
| 15 | 1.68 | 4.81 | 1.27 | 44.0 | M  |
| 16 | 1.59 | 4.55 | 1.37 | 42.1 | M  |
| 17 | 1.48 | 4.24 | 1.20 | 45.2 | M  |
| 18 | 1.35 | 3.86 | 1.28 | 43.7 | M  |

C = Cromossomo; CT = Comprimento Total do Cromossomo; TR = Tamanho Relativo; RB = Relação de Braços; IC = Índice Centromérico; CC = Classificação Centromérica; M = Metacêntrico; SM = Submetacêntrico; N = Número de Metáfases Medidas.

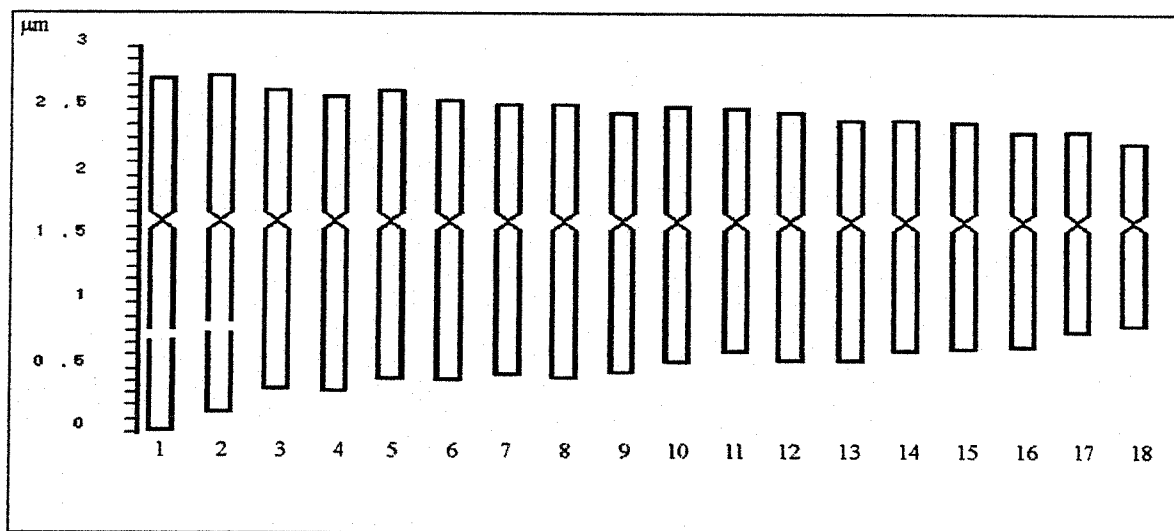


Figura 3

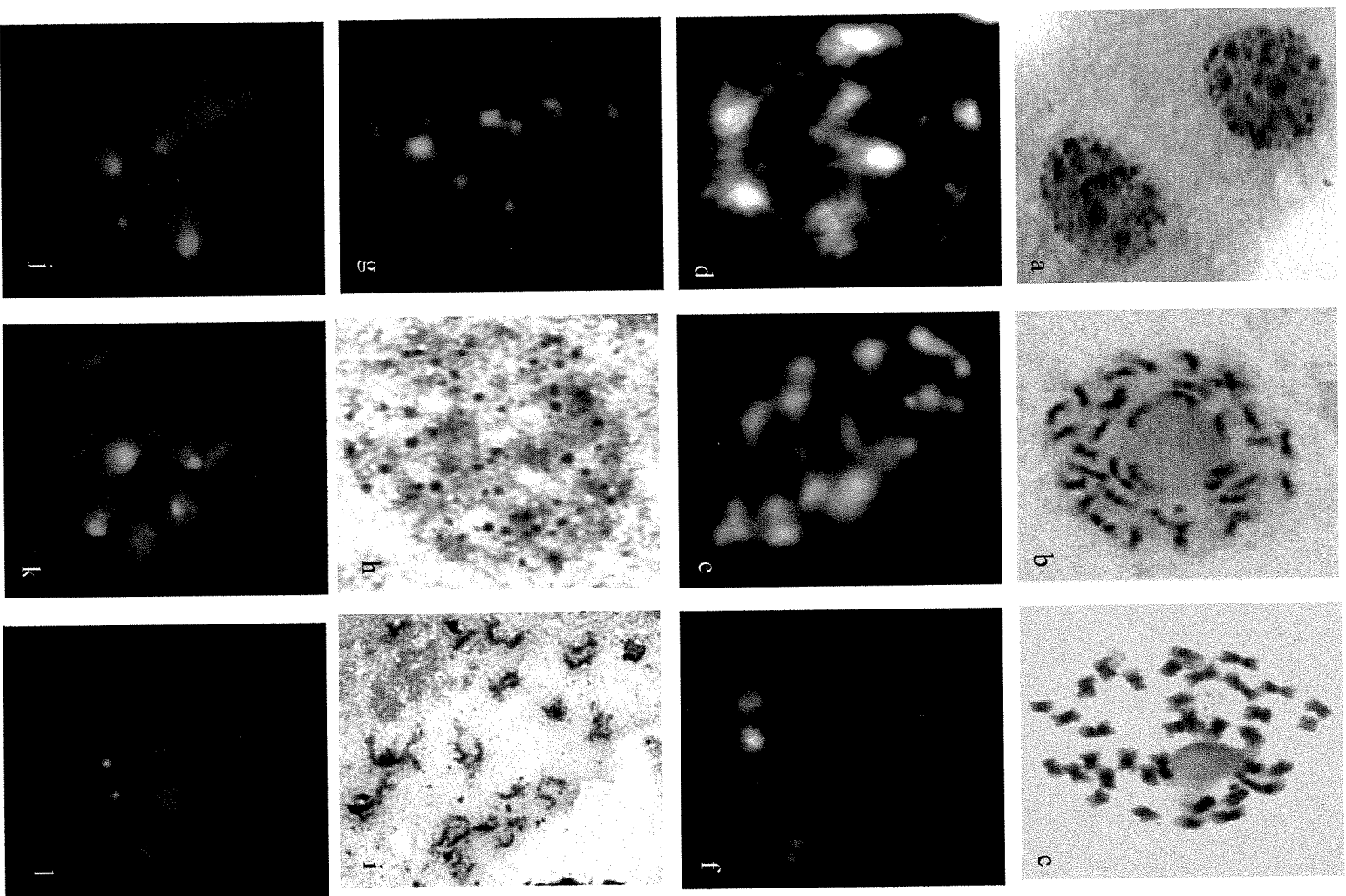


Figura 4

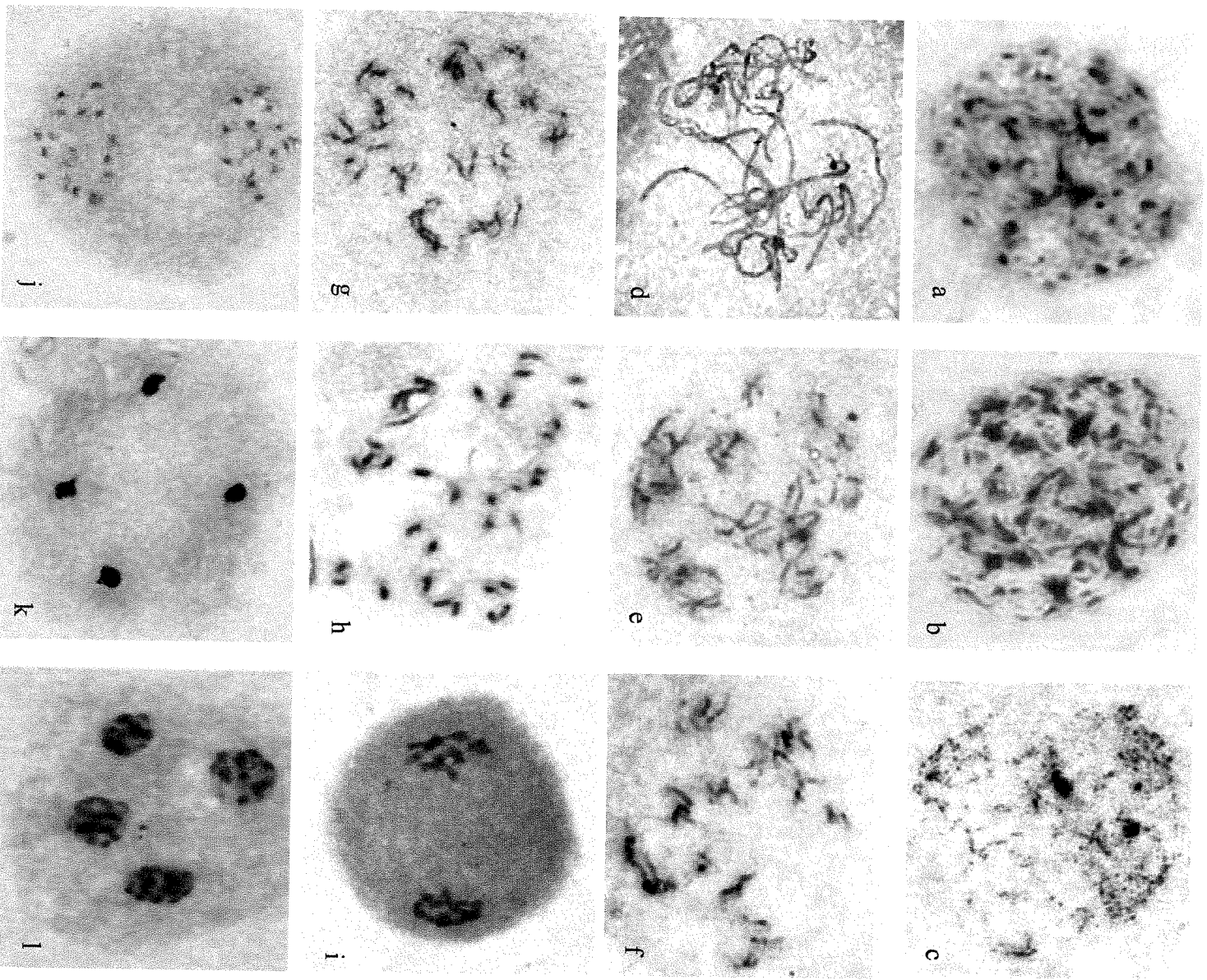


Figura 5



### **Artigo 3**

**Caracterização citogenética de *Lantana camara* L. (Verbenaceae) da flora brasileira**

**<sup>1</sup>Brandão, A.D.; <sup>2</sup>Viccini, L.F. & <sup>1</sup>Recco-Pimentel, S.M.**

**(1) Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13084-971, Campinas, SP, Brasil**

**(2) Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), 36100-000, Juiz de Fora, MG, Brasil.**

Palavras-chave: citogenética, banda C, DAPI, CMA, FISH, Verbenaceae, *Lantana*.

## RESUMO

*Lantana camara* L. apresentou 44 cromossomos todos metacêntricos e quatro pares portando constrição secundária. Grande quantidade de heterocromatina foi observada através das técnicas de banda C, DAPI e CMA, especialmente rica em CG. Foram localizadas seis regiões organizadoras de nucléolo (NORs) e quatro sítios de rDNA 5S pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). O núcleo interfásico foi classificado como semi-reticulado. Foi também realizada a caracterização meiótica da espécie, que mostrou segregação normal dos cromossomos e a presença constante de 22 bivalentes durante o diplóteno e a diacinese. Os resultados obtidos quanto ao número de cromossomos, de NOR e de sítios de rDNA 5S não excluem uma possível origem poliplóide para *L. camara* coletada em Minas Gerais, Brasil, embora o comportamento dos cromossomos meióticos seja de uma planta diplóide. Os resultados desse trabalho comparados aos estudos citogenéticos existentes para os gêneros *Lippia* e *Aloysia*, considerados morfológicamente semelhantes, acrescentaram diferenças citogenéticas importantes entre as espécies que favorecem a hipótese de que os três gêneros sejam taxa distintos.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Lantana* (Verbenaceae, Lamiales) foi descrito por Linnaeus em 1753 e atualmente compreende de 150 a 270 taxa (Cronquist, 1981; Moldenke, 1983). Apresenta distribuição neotropical, com poucos representantes nativos na Ásia e África (Moldenke, 1973). Esta distribuição foi ampliada pelo cultivo de várias espécies, sob centenas de nomes vulgares (Howard, 1969; Ghisalberti, 2000).

O gênero *Lantana* se destaca por apresentar espécies com diversas propriedades medicinais anti-reumáticas, estomáquicas, estimulantes, febrífugas, sudoríficas e contra afecções bronco-pulmonares. Existem relatos da utilização de espécies no controle biológico e como repelente de determinados insetos, além do uso terapêutico contra doenças como câncer, malária e úlceras. O gênero possui ainda espécies com propriedades tóxicas e outras com características ornamentais (Lopez-Palacios, 1977; Pio-Corrêa, 1984; Sinha & Sharma, 1984; Weenen *et al.*, 1990; Herbert & Maffrand, 1991; Morton, 1994;

Siddiqui *et al.*, 1995; Dua *et al.*, 1996; Kaushik, 1996; Wollenweber *et al.*, 1997; Baars & Naser, 1999; Broughton, 2000; Ghisalberti, 2000; Pereira & Barreto, 2001; Sanders, 2001; Day & McAndrew, 2002).

A espécie *Lantana camara* é nativa da América Tropical (Sinha & Sarma, 1984) e apresenta a maior distribuição geográfica entre as espécies do gênero (Silva, 1999). A espécie é semi-arbustiva podendo chegar a dois metros de altura, floresce e frutifica durante todo o ano. A mudança sucessiva e natural da cor de suas flores e a presença de inúmeras propriedades medicinais levou a espécie a receber amplo destaque no gênero (Silva, 1999).

Espécies do gênero *Lantana* apresentam características morfológicas muito próximas ao gênero *Lippia*, diferenciando-se apenas pela morfologia do fruto, sendo drupáceo em *Lantana* e esquizocarpico em *Lippia* (Salimena, 2000). Em função disso, as plantas são freqüentemente classificadas de forma incorreta, gerando inúmeros conflitos na delimitação e no número de espécies nos respectivos gêneros (Silva, 1999; Salimena, 2000, 2002). Com base nas características do fruto, Jansen-Jacobs (1988) considerou *Lippia* e *Lantana* como um único gênero dentro da família Verbenaceae. Silva (1999), Salimena & Silva (in prep) incluíram espécies consideradas do gênero *Lippia* no gênero *Lantana* e vice-versa. Além disso, Silva (1999) incluiu 10 novos sinônimos para a espécie *L. camara*, baseando-se em caracteres vegetativos e da inflorescência. Uma característica que dificulta ainda mais a delimitação das espécies do gênero é a presença da variação da cor nas flores, em particular da espécie *L. camara* (Khoshoo & Mahal, 1967; Silva, 1999).

O gênero *Lantana* é o que apresenta maior número de estudos citogenéticos dentro da família Verbenaceae, porém estes restringem-se apenas à determinação do número cromossômico. Há relatos desse tipo para populações de *L. trifolia* ( $2n = 48$  e  $27$  cromossomos, com  $x = 9$ ) (Patermann, 1935 e Sanders, 1987); para *L. lilacina* ( $2n = 36$ ), *L. involucrata* ( $2n = 36$ ), *L. indica* ( $2n = 72$ ) (Natarajan & Ahuja, 1957) e para populações triploides e tetraploides de *L. montevidensis*, com  $36$  e  $48$  cromossomos, respectivamente (Henderson, 1969).

Para a espécie *L. camara* há vários estudos na literatura, porém nenhum para populações brasileiras. Foram observados  $2n = 22$ ,  $33$  e  $44$  cromossomos (Tjio, 1948; Schnack & Covas, 1947; Singh, 1951; Sen & Sahni, 1955; Tandon & Chandi, 1955;

Arora, 1960; Raghavan & Arora, 1960). Uma série de poliplóides incluindo triplóides, pentaplóides e hexaplóides com  $2n = 33, 55$  e  $66$  cromossomos foi descrita por diversos autores (Sen & Sahni, 1955; Sinha *et al.*, 1995; Natarajan & Ahuja, 1957; Raghavan & Arora, 1960; Koul *et al.*, 1979). Choudhary & Roy (1982) relataram a presença de 15 bivalentes e  $2n = 33$  cromossomos sugerindo anormalidades durante a meiose. Spies (1983-4, 1984) estudou populações do complexo *L. camara* L. da África do Sul e determinou  $2n = 22, 33, 44, 55$  e  $66$  cromossomos, admitindo haverem hibridações potenciais dentro do complexo da espécie. Sanders (1987) também realizou estudos cromossômicos de populações de *L. camara* do Caribe, identificando triplóides como resultado da hibridação entre diplóides e tetraplóides. De forma geral tem sido sugerido os números básicos  $x = 11$  e  $12$  para a espécie (Sinha *et al.*, 1995; Tandon & Chandi, 1955).

Essa grande variabilidade do número cromossômico encontrada na espécie *L. camara* pode indicar que ela está passando por um processo de adaptação evolutiva, através de mudanças cariotípicas, por mecanismos que envolvem aneuploidia e poliploidia. A análise citogenética de populações brasileiras pode fornecer informações importantes sobre seu comportamento cromossômico e auxiliar na compreensão da evolução desse complexo.

Assim, este trabalho teve como objetivo determinar o número cromossômico e o cariótipo de *Lantana camara* coletada no Brasil, além de identificar e caracterizar algumas fases da meiose, visando contribuir com informações adicionais para a solução dos problemas de sistemática e taxonomia relacionados à delimitação das espécies nos gêneros da família Verbenaceae.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta do material**

Foram coletadas estacas de *Lantana camara* (Figura 1) na Estação Experimental de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. As estacas foram mantidas em hidroponia a  $25^{\circ}\text{C}$  até a emissão das raízes. As inflorescências imaturas de *L. camara* foram imediatamente fixadas após a coleta em metanol:ácido acético (3:1).

Uma exsicata da espécie *Lantana camara* foi depositada no Herbário CESJ da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) como material voucher e registrado sob o número de tombo 39.309.

### **Preparação de lâminas**

Após a emissão das raízes, as estacas foram transferidas para tubos contendo solução de colchicina 0,025%, à temperatura ambiente, durante duas horas ou então as estacas foram pré-tratadas com solução de orizalina 5  $\mu$ M, à temperatura ambiente, durante quatro horas e 30 minutos. Após os tratamentos, as raízes foram fixadas em metanol:ácido acético (3:1) por, no mínimo, 24 horas. A digestão enzimática foi realizada com o complexo enzimático Pectinex (Novo Nordisk Ferment<sup>TM</sup> Bioindustrial do Brasil) na concentração de 1:10 (tampão citrato de sódio 2 mM, pH 3,5), durante 3 horas e 15 minutos a 34°C. As lâminas foram preparadas a partir da técnica de secagem ao ar com digestão enzimática segundo Carvalho (1995).

Para obtenção de células meióticas utilizou-se a metodologia descrita por Brandão et al. (2000). Foram utilizadas flores de 1,0 a 1,5 mm de comprimento e 2,0 a 2,5 mm de largura. Aproximadamente 60 anteras foram lavadas em água destilada durante 30 minutos. As anteras foram imersas em uma solução enzimática concentrada (Pectinex - Novo Nordisk Ferment<sup>TM</sup> Bioindustrial do Brasil) durante 25 minutos a 34°C. Após a digestão, esse material foi lavado em água destilada durante 20 minutos. Em seguida, as anteras foram fragmentadas, expulsando as células mãe do grão de pólen (PMCs). A suspensão celular foi centrifugada a 2000 rpm durante seis minutos. Decorridos 20 minutos, o material foi ressuspenso e gotejado nas lâmina. Após secagem ao ar e em placa aquecedora, as lâminas foram submersas em ácido acético 45% durante 20 segundos. A coloração foi feita com Giemsa a 10% em tampão fosfato 0,1 M pH 6,8, durante um minuto.

### **Cariótipo**

As lâminas foram tratadas com ácido acético 45% gelado durante 10 segundos e em seguida coradas com Giemsa a 10% em tampão fosfato 0,1 M pH 6,8, durante três minutos. Foram utilizadas 20 metáfases montagem dos kariogramas e obtenção das medidas de

comprimento total dos cromossomos (CT – comprimento do braço curto + comprimento do braço longo) e comprimento dos braços dos cromossomos. Para confecção do ideograma foram utilizados os parâmetros de tamanho relativo (TR – tamanho total do cromossomo individual X 100/tamanho total do genoma), índice centromérico (IC – comprimento do braço curto X 100/comprimento do braço longo + comprimento do braço) e relação de braços (RB – comprimento do braço longo/comprimento do braço curto) com ajuda do programa Image Pro-Plus versão 4.5, da Media Cybernetics. Os cromossomos foram classificados segundo Guerra (1988).

### **Núcleos Interfásicos**

A morfologia nuclear foi analisada através da coloração com Giemsa em aproximadamente 1000 núcleos interfásicos. Foi utilizada a classificação de Guerra (1987a, b).

### **Banda C**

A heterocromatina foi detectada de acordo com a técnica descrita por Schwarzscher *et al.* (1980), com pequenas modificações. As lâminas foram hidrolisadas em ácido clorídrico 0,2 N, à temperatura ambiente, durante 1 minuto e 15 segundos. Em seguida, foram tratadas em solução saturada de hidróxido de bário a 5%, à temperatura ambiente, durante 8 minutos e finalmente incubadas em 2xSSC, a 60°C, durante 80 minutos. A coloração foi realizada com Giemsa a 10% em tampão fosfato 0,1 M pH 6.8, durante 15 minutos.

O percentual de heterocromatina constitutiva foi obtido a partir da média das áreas positivas à banda C em relação ao genoma total de dez metáfases. As medidas foram obtidas com o auxílio do programa Image Pro-Plus versão 4.5, da Media Cybernetics.

### **Coloração com fluorocromos**

A coloração com fluorocromos foi obtida a partir da técnica descrita por Schweizer (1976) com algumas modificações. Para coloração com DAPI, as lâminas foram tratadas com 150 µL de distamicina (0,1 mg/mL em água deionizada estéril) por 20 minutos,

lavadas com tampão McIlvaine e secas ao ar. As lâminas foram incubadas em solução DAPI (0,2 mg/mL em água deionizada estéril) no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 minutos.

Para a coloração com cromomicina (CMA) as lâminas foram tratadas com 150 µL de distamicina (0,3 mg/mL em água deionizada estéril) por 20 minutos, lavadas com tampão McIlvaine e secas ao ar. A coloração foi realizada com CMA (0,5 mg/10mL em água deionizada estéril) à temperatura ambiente, durante 45 minutos no escuro.

Para ambas as colorações após lavagem em tampão, as lâminas foram secas ao ar e montadas com solução de sacarose saturada e analisadas ao microscópio após 15 dias.

### **Ag-NOR**

Para observação das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foram testadas diversas metodologias, sendo utilizada a técnica descrita por Fukui e Nakayama (1996), que consiste em tratar o material com quatro a oito gotas da solução de nitrato de prata 50% em citrato de sódio 0,002%, pH 3,0 (1:1), a 60°C durante 10 a 15 minutos, lavadas em água deionizada, secas ao ar e analisadas ao microscópio.

### **Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)**

A técnica de FISH foi realizada segundo a técnica de Heslop-Harrison *et al.* (1991), com pequenas modificações. Utilizou-se como sondas os recombinantes pTa 71 contendo uma unidade de rDNA 45S (18S-5.8S-26S + IGS) de *Triticum aestivum* de aproximadamente 9Kb clonada em pUC 19 (Gerlach & Bedbrook, 1979) e pTa 794, contendo um fragmento de rDNA 5S de *T. aestivum*, com 410pb, clonada em pBR 322 (Gerlach & Dyer, 1980), ambas marcadas com biotina por “nick translation”. As lâminas foram incubadas com 100 µL/mL de RNase durante uma hora a 37°C, fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos, desidratadas em série gradativa de álcool 70 a 100% e secas ao ar. As sondas (100 ng de DNA/µL) foram desnaturadas a 70°C por dez minutos e imediatamente colocadas no gelo. Utilizou-se 5 µL de sonda para cada lâmina e os cromossomos foram desnaturados juntamente com a sonda em termociclador (MJ Research) a 90°C durante dez minutos. Em seguida foram transferidas para 48°C por dez



minutos e à 38°C por cinco minutos e incubadas em câmara úmida a 37°C overnight. As lavagens pós-hibridação para rDNA 45S foram realizadas segundo Cuadrado e Jouve (1994) e para rDNA 5S foi utilizado 6xSSC durante 20 minutos seguido de 4xSSC durante dez minutos, sob agitação constante. As regiões hibridadas foram detectadas com avidina-FITC. Os cromossomos foram corados com solução de iodeto de propídio (2,5 µg/µL) durante 30 minutos.

### Meiose

Foram analisadas cerca de 100 células de cada fase, as quais foram identificadas com o auxílio das imagens do ciclo celular meiótico de milho, cevada, *Artemisia*, *Lippia alba* e *Aloysia virgata*, descritas respectivamente por Singh (1993), Fukui & Nakayama (1996) e Brandão *et al.* (in prep – ver artigos 1 e 2).

## RESULTADOS

O cariótipo de *L. camara* apresentou 44 cromossomos, com todos os pares metacêntricos. Observou-se de dois a quatro pares de cromossomos com constrição secundária, nos pares 1, 2, 3 e 4 (Figura 2, 3 e tabela 1).

O núcleo interfásico foi classificado como semi-reticulado, segundo Guerra (1987a) (Figura 4a).

A técnica de banda C mostrou grande quantidade de heterocromatina constitutiva centromérica (68% da cromatina) (Figura 4b). A coloração com DAPI evidenciou apenas algumas dessas regiões (Figura 4f-g), enquanto que CMA detectou várias regiões (Figura 4d-e). A presença de blocos heterocromáticos também foi observada através da coloração com Giemsa (Figura 4c).

Mediante a aplicação de várias metodologias para localização das NORs pela prata (Ag-NOR), observou-se marcações inespecíficas para todos os testes. A figura 4h mostra o resultado obtido em célula mitótica com a técnica de Fukui & Nakayama (1996). A técnica de FISH detectou seis NORs em três pares de cromossomos (Figura 4i-j) e quatro sítios de rDNA 5S em dois pares de cromossomos (Figura 4k-l).

Não foi possível localizar no ideograma a posição dos blocos de heterocromatina, NOR e dos sítios de rDNA 5S, devido à grande dificuldade em definir suas posições e identificar os cromossomos portadores, em função do pequeno tamanho e à grande similaridade dos mesmos.

Foi possível observar as fases de intérfase (Figura 5a), leptóteno (Figura 5b), zigóteno (Figura 5c), paquíteno (Figura 5d), diplóteno (Figura 5e), diacinese inicial (Figura 5f), diacinese (Figura 5g), metáfase I (Figura 5h), anáfase I (Figura 5i), telófase I (Figura 5j), prófase II (Figura 5k) e telófase II (Figura 5l). Observou-se também a formação de 22 bivalentes durante o diplóteno e a diacinese (Figura 5e-g), a segregação normal dos conjuntos cromossômicos durante a anáfase I, telófase I e II e prófase II (Figura i-l).

## DISCUSSÃO

*Lantana camara*, ocorrente em MG, Brasil, apresentou 44 cromossomos bem uniformes, não sendo possível no entanto sugerir o nível de ploidia para a espécie através do número ou por técnicas convencionais para análise do cariótipo. Embora os números cromossômicos já relatados na literatura  $2n = 22, 33, 44, 55$  e  $66$  cromossomos para diferentes populações de *L. camara* não permitam excluir a hipótese de poliploidia na população estudada no presente trabalho, o número de NORs detectadas pela técnica de FISH (seis NORs localizadas em três pares de cromossomos) não é coerente com uma origem autopoliplóide. Portanto, torna-se difícil explicar que o cariótipo com 44 cromossomos e seis NORs seja auto-tetraplóide, a não ser que um par de NOR tenha surgido posteriormente à poliploidização, por eventos envolvendo rearranjos cromossômicos do tipo duplicação e translocação dos segmentos cromossômicos contendo a NOR. A presença de quatro sítios de genes de rRNA 5S (em dois pares de cromossomos) também favorece a hipótese de uma possível origem alopoliplóide. Entretanto, observou-se que todas as células analisadas formaram 22 bivalentes durante a diacinese. Adicionalmente, não foram observadas anormalidades na segregação dos conjuntos cromossômicos para a população brasileira estudada. A maioria dos estudos realizados em populações de *L. camara* de outras localidades, as classificam como tetraplóides ( $x = 11$ ) e descrevem a presença de uni, bi, tri e multivalentes durante a meiose (Schnack & Covas,

1947; Tjio, 1948; Sen & Sahni, 1955; Tandon & Bali, 1955; Raghavan & Arora, 1960; Arora, 1961; Spies, 1983-4, 1984; Sanders, 1987; Ojha & Dayal Sinha *et al.*, 1995). Singh (1951) relatou o número cromossômico ( $2n = 22$ ) de uma população de *L. camara*, porém sob a forma de nota, sem nenhum tipo de documentação. É possível que as populações estudadas por estes autores não sejam as mesmas entidades taxonômicas do presente estudo. Os resultados do presente trabalho não excluem que a população de *L. camara* do Brasil tenha uma possível origem poliplóide, embora tenha sido detectado 22 bivalentes, sem qualquer anormalidade na meiose. Essa característica, no entanto, não é garantia de uma origem diplóide, considerando-se que pode não haver a formação de multivalentes em poliplóides, que quando os cromossomos são muito pequenos a formação de multivalentes pode ser dificultada (Srivastav & Raina, 1982), que pode haver o controle gênico inibindo a formação de multivalentes em poliplóides (Riley & Chapman, 1958) ou ainda que pode ocorrer o pareamento de cromossomos homeólogos em aloploplóide segmental (Stebbins, 1971; Stace, 1989). Além disso, espécies originadas por poliploidia são tratadas como diplóides, porque apresentam meiose normal e restauram a fertilidade adquirindo uma estabilidade no processo evolutivo (Stebbins, 1971; Stace, 1989; Singh, 1993; Stace, 2000).

Apesar da grande semelhança morfológica entre os gêneros *Lantana* e *Lippia*, não foi observada uma relação entre eles quando comparamos os números cromossômicos básicos citados na literatura. Os resultados do presente trabalho revelaram algumas características citogenéticas que permitem diferenciar *Lantana camara* de *Lippia alba*, as únicas espécies desses dois gêneros cujo cariótipo foi analisado através de técnicas citogenéticas mais detalhadas (Brandão *et al.*, in prep. - ver artigo 1). Essas duas espécies diferenciaram-se pela morfologia dos cromossomos, pelo número de constrições secundárias, pela presença de dois sítios de rDNA 5S em *Lippia* e de quatro sítios em *Lantana*, pela presença de maior quantidade de heterocromatina rica em pares de base AT em *Lippia* e CG em *Lantana*, além da diferença apresentada no fenótipo nuclear, areticulado em *Lippia* e semi-reticulado em *Lantana* (Brandão *et al.*, in prep - ver artigo 1). A morfologia nuclear dos núcleos interfásicos representa um importante parâmetro na citotaxonomia. Sua morfologia apresenta-se constante entre as espécies, podendo ser utilizado para definir uma determinada espécie (Guerra, 1987a). Foram observadas também características

citogenéticas comuns em ambos os gêneros, tais como a presença de grande quantidade de heterocromatina em relação ao tamanho dos seus genomas e o mesmo número de NORs. Brandão *et al.* (in prep - ver artigo 2) analisaram citogeneticamente uma espécie do gênero *Aloysia* (*A. virgata*), considerado muito próximo a *Lantana*. A análise conjunta dos dados das três espécies, *L. alba*, *A. virgata* e *L. camara*, revela que várias características citogenéticas permitem sugerir uma possível diferenciação entre os gêneros *Lippia*, *Aloysia* e *Lantana*. No entanto, é necessário que um número maior de espécies seja analisado para se encontrar caracteres citogenéticos comuns a cada gênero e que possa defini-los claramente.

A presença de heterocromatina constitutiva rica em AT tem sido comumente detectada em diversas espécies vegetais (Schwarzacher & Schweizer, 1982; Guerra, 1987b; Guerra & Felix, 2000; Yen-Yu *et al.*, 2001; Besendorfer *et al.*, 2002), inclusive da família Verbenaceae, como nos gêneros *Aloysia* e *Lippia*, considerados morfologicamente semelhantes a *Lantana* (Brandão *et al.*, - ver artigos 1 e 2). A heterocromatina constitutiva rica em CG, tem sido detectada principalmente associada às NORs (Schweizer, 1976; Deumling & Greilhuber, 1982; Guerra, 1987b; Moscone *et al.*, 1995, 1996; Forni-Martins & Guerra, 1999; Guerra *et al.*, 2000; Yen-Yu *et al.*, 2001; Brandão *et al.*, - ver artigo 1), característica muito comum em diversos grupos vegetais (Sinclair & Brown, 1971). Porém outras regiões no genoma ricas em CG, também são identificadas por CMA (Matsuyama, *et al.*, 1996; Guerra *et al.*, 2000; De Melo *et al.*, 2001), o que explicaria a presença de inúmeras regiões positivas no núcleo e prometáfase de *L. camara*. Schwarzacher & Schweizer (1982) relataram que 85% da heterocromatina não associada a NOR em *Cephalanthera damasonium* é rica em CG.

Em conclusão, com base nos caracteres citogenéticos obtidos no presente trabalho pode-se sugerir que *Lantana camara* que ocorre em Minas Gerais (Brasil) é possivelmente uma espécie com origem aloploplóide,  $2n = 4x = 44$  cromossomos, e que as espécies *Lantana camara*, *Lippia alba* e *Aloysia virgata* apresentam características citogenéticas diferentes, corroborando a proposta baseada em estudos taxonômicos e morfológicos, de que devam pertencer a gêneros distintos.

**AGRADECIMENTOS:**

Os autores agradecem à FAPESP (Processo nº 00/11842-2) pela bolsa concedida a A.D.B., a Rosana Pezzin, Mateus R Pereira, Patricia M. O. Pierre, Elisson A. C. Romanel, José Marcelo S. de Campos e Ana Luisa C. Lima, pelo auxílio na coleta das estacas, à Dra. Fatima R.G. Pires pela identificação da espécie e à Dra. Eliana R. F. Martins pelas valiosas discussões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arora, C. M. 1961. New chromosome report. **Bull. Bot. Surv. India**, 2, 305.
- Baars, J. R. & Naser, S. 1999. Past and present initiatives on the biological control of *L. camara* (Verbenaceae) in South Africa. **Afric. Entomol.** 21-33.
- Besendorfer, V.; Samardzija, M.; Zoldos, V.; Solic, M. E. & Papes, D. 2002. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Aliaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 139, 99-108.
- Brandão, A. D.; Viccini, L. F. & Pezzin, R. 2000. Meiotic characterization in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Genet. Mol. Biol. (Suppl.)** 23 (3): 372.
- Broughton, S. 2000. Review and evaluation of *Lantana* biocontrol programs. **Biol. Control** 17 (3): 272-286.
- Carvalho, C.R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 127p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. 1995.
- Choudhary, S. S. & Roy, R. P. 1982. Karyological studies and trend of speciation in some members of Verbenaceae. **Cytologia**. 48: 735-740.
- Cronquist, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press. New York.
- Cuadrado, A. & Jouve, N. 1994. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-*Triticale*. **Chrom. Res.** 2: 231-238.
- Day, M. D. & McAndrew, T. D. 2002. Status of *Charidotis pygmaea* (Coleoptera: Chrysomelidae) as biological control agent of *Lantana montevidensis* (Verbenaceae) in Australia. **Biol. Control**. 23, 27-34.
- De Melo, N.F.; Cervi, A. C. & Guerra, M. 2001. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **PL Syst. Evol.** 226: 69-84.
- Dua, V. K.; Gupta, N. C.; Pandey, A. C. & Sharma, v. p. 1996. Repellency of *Lantana camara* (verbenaceae) flowers against *Aedes* mosquitoes. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 12 (3Pt1): 406-408.
- Deumling, B. & Greilhuber, J. 1982. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by in situ hybridization of satellite DNAs and

- fluorochrome banding. **Chromosoma** 84: 535-555.
- Forni-Martins, E.R. & Guerra, M. 1999. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. species (Fabaceae). **Caryologia** 52 (1-2): 87-103.
- Fukui, K. & Nakayama, S. **Plant chromosomes: laboratory methods**. Boca Raton: CRC. 1996. 274p.
- Gerlach, W. L. & Bedbrook, J.R 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. **Nucl. Acids Res.** 7: 1869-1885.
- Gerlach, W. L. & Bedbrook, J.R. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. **Nucl. Acids Res.** 7: 1869-1885.
- Ghisalberti, E. L. 2000. *Lantana camara* L. (Verbenaceae) Review. **Fitoterapia** 71: 467-486.
- Guerra M. S. (1987a). Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). **Plant Syst. Evol.** 158: 107-115.
- Guerra M. S. (1987b). Cytogenetics of Rutaceae IV. Structure and systematic significance of interphase nuclei. **Cytologia** 52: 213-222.
- Guerra, M. (1988). *Introdução a citogenética geral*. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara. 142p.
- Guerra, M.; Dos Santos, K.G.B.; Barros e Silva, A.E. & Ehrendorfer, F. 2000. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae – A case of parallel chromosomal evolution. **Am. J. Bot.** 87(5):735-747.
- Guerra, M. & Félix, L. P. 2000. O cariótipo de *Northoscordum pulchellum* (Alliaceae), com ênfase na heterocromatina e nos sítios de DNAr. **Bol. Soc. Argent. Bot.** 35 (3-4): 283-289.
- Henderson, R. J. F. 1969. A cytological study of *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. In **Queensland. Contrib.** from the Queensland Herbar. 3: 1-4.
- Herbert, J. M. & Maffrand, J. P. 1991. Verbascoside isolated from *Lantana camara* an inhibitor of protein kinase. C. **J. Nat. Prod.** 54(6): 1595-1600. 1991.
- Heslop-Harrison, J. S.; Schwarzacher, K.; Ananthawat-Jonsson, A. R.; Leitch, M. & Leitch, I. J. 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. **Technique** 3: 106-109.
- Howard, R. A. 1969. A check list of cultivar names used in the genus *Lantana*. **Arnoldia** 29 (11): 73-109.

- Jansen-Jacobs, M. J. 1988. Verbenaceae. Verbenaceae. Flora das Guianas. **Koeltz scientific books.**
- Kaushik, G. C. Cytological effects of *Lantana camara* L. leaf extract on *Vicia faba* root – tip cells. **Ad. Plant Sci.** 9 (2): 159-164. 1996.
- Khoshoo, T. N. & Mahal, C. 1967. Versatile reproduction in *Lantana camara*. **Curr. Sci.** 20 (8): 201-203.
- Koul, A. K.; Karihaloo, J. L. & Langer, A. 1979. Cytology of pentaploid *Lantana camara* L. **Cell & Chromosome Newsletter** 2: 1.
- Lopez-Palacios, S. **Flora de Venezuela.** Talleres graficos universitarios: Merida. 1977. 654p.
- Matsuyama, T.; Akihama, T.; Ito, Y.; Omura, M. & Fukui, K. 1996. Characterization of heterochromatic regions in “Trovira” orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes by fluorescent staining and FISH method. **Genome** 39: 941-945.
- Moldenke, H. 1973. Notes on new and noteworthy. **Phytologia** 25 (4): 220.
- Moldenke, H. 1983. Verbenaceae. In Dassanayake, M.D. & Fosberg, F. A. **A revised handbook to the Flora of Ceilão.** 4: 212-231.
- Morton, J. F. *Lantana*, or red sage (*Lantana camara* L., Verbenaceae), notorious weed and popular garden flower; some cases of poisoning in Florida. **Econ. Bot.** 48 (3): 259-270. 1994.
- Moscone, E.A.; Loidl, J.; Ehrendorfer, F & Hunziker, A. 1995. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae). **Amer. J. Bot.** 82 (2): 276-287.
- Moscone, E. A.; Lambrou, M. & Ehrendorfer, F. 1996. Fluorescent chromosome banding in the cultivates species of *Capsicum* (Solanaceae). **Pl. Syst. Evol.** 202:37-63.
- Natarajan, A. T. & Ahuja, M. R. 1957. Cytotaxonomical studies in the genus *Lantana*. **J. Indian Bot. Soc.** 36, 35
- Ojha, B. M. & Dayal, N. 1993. Cytological investigations in the genus *Lantana* in India. **Cytologia** 57, 9-13.
- Paterman, W. 1935. **Beiträger zur zytologie der Verbenaceen.** Diss. Berlin.
- Pereira, J. M. & Barreto, R. W. 2001. Additions to the mycobiota of the weed *Lantana camara* (Verbenaceae) in southeastern Brazil. **Mycopathologia** 151 (2): 71-80.



- Pio-Corrêa, M. P. 1984. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** 747p.
- Raghavan, R. S. & Arora, C. M. 1960. Morphological and cytological studies in the genus *Lantana* L. **Bull. Bot. Surv. Índia.** 2 (3-4): 299-303.
- Riley, R. & Capman, V. 1958. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. **Nature** Lon. 183: 713-715.
- Salimena, F. R. G. **Revisão taxonômica de *Lippia* L., sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae).** São Paulo, SP: USP, 2000. 208p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de São Paulo, 2000.
- Salimena, F. R. G. 2002. Duas novas espécies de *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae) da América do Sul. **Hickenia** 3 (37): 145-147.
- Sanders, R. S. 1987. Taxonomic significance of chromosome observations in Caribbean species of *Lantana* (Verbenaceae). **Am. J. Bot.** 74 (6): 914-920.
- Sanders, R. W. 2001. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. **Harvard Papers in Botany.** 5 (2): 303-358.
- Schnack, B. & Covas, G. 1947. Estudios cariologicos in antofitas. **Haumania** 1: 32.
- Schwarzacher, T.; Ambros, P. & Schweizer, D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analyses. **Pl. Syst. Evol.** 134: 293-97.
- Schwarzacher, T. & Schweizer, D. 1982. Karyotype analysis and heterochromatin differentiation with C-banding and fluorescent counterstaining in *Cephalanthera* (Orchidaceae). **Pl. Syst. Evol.** 141: 91-113.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma** 58: 307-324.
- Sen, N. K. & Sahni, V. M. 1955. Triploid, tetraploid and pentaploid *Lantana camara*. **Sci. Cul.** 20 (11) 558-559.
- Siddiqui, B. S.; Raza, S. M.; Begum, S.; Siddiqui, S. Firdous, S. 1995. Pentacyclic triterpenoids from *Lantana camara*. **Phytochemistry** 38 (3): 681-685.
- Silva, T.R. S. **Redelimitação e revisão taxonômica do gênero *Lantana* L. (Verbenaceae) no Brasil.** São Paulo, SP: USP, 1999. 176p. Tese (Doutorado em Botânica)– Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

- Sinclair, J. H. & Brown, D. D. 1971. Retention of common nucleotide sequences in the ribosomal deoxyribonucleic acid of eukaryotes and some of their physical characteristics. **Biochemistry** 10: 2761-2769.
- Singh, B. 1951. Chromosome numbers in some flowering plants. **Curr. Sci.** 20: 105.
- Singh, R. J. **Plant Cytogenetics**. Boca Raton: CRC. 1993. 391p.
- Sinha, S. & Sharma, A. 1984. *Lantana camara* L. A review. **Fed. Repert.** 95 (9-10): 621-633.
- Sinha, S.; Sinha, B. & Sharma, A. 1995. Chromosome composition of *Lantana camara* L.: karyotype, basic number and DNA diversity. **Nucleus** 38 (1-2): 16-22.
- Spies, J. J. 1984. A cytotaxonomic study of *Lantana camara* (Verbenaceae) from South Africa. **S. Afr. J. Bot.** 3: 231-250.
- Spies, J. J. 1983-1984. Hybridization potential of *Lantana camara* (Verbenaceae). **Gracia de Orta, Ser. Bot. Lisboa.** 6 (1-2): 145-150.
- Srivastava, P.K. & Raina, S. N. 1982. Cytogenetics of *Clitoria*. 1. Induced autotetraploidy in *Clitoria* – Fernateia. **Cytologia** 47 (1): 99-107.
- Stace, C. A. 2000. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> centuries. **Taxon** 49: 451-477.
- Stace C. A. (1989). Plant taxonomy and biosystematics. Cambridge University Press, USA. 264pp.
- Stebbins, G. L. 1971. **Chromosomal evolution in higher plants**. J. W. Arrowsmith Ltd. 216p.
- Tandon, S. L. & Bali, P. N. 1955. Morphological and cytological studies of the diploid and naturally occurring triploid in *Lantana camara* L. **Indian J. Hort.** 12: 1-5. 1955.
- Tandon, S. L. & Chandi, A. S. Basic chromosome number of *Lantana camara* L. **Current Science** 4: 124-125. 1955.
- Tjio, J. H. 1948. The somatic chromosomes of some tropical plants. **Hereditas** 34: 136.
- Weenen, H.; Nkunya, H. H.; Bray, D. H.; Mwasumbi, L. B.; Kinabo, L.S. & Kilimali, V. A. E. B. Antimalarial activity of tanzanian medicinal plants. **Planta Med.** 56: 368-370. 1990.
- Wollenweber, E.; Dörr, M.; Muniappan, R. & Siems, K. 1997. Flavonoid and glycosides and

triterpenoids from the leaf exudate of *Lanata camara* and *Lantana montevidensis*. **Bioch. Syst. Ecol.** 25 (3): 269-270.

Yen-Yu, K.; Song-Bin, C.; Tsai-Yum, L.; Chang-Huain, H.; Yao-Huang, C.; Wen-Huei, C. & Chi-Chang, C. 2001. Defferential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids. **Ann. Bot.** 87: 387-395.

Figura 1 – Exemplar de *Lantana camara* (Verbenaceae) da Estação Experimental de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG, medindo cerca de 1,5 m de altura.

Figura 2 – Metáfase mitótica (a), kariograma (b), metáfase com constrição secundária (c) e no destaque os pares com as constrições (d) corados com Giemsa 10%.

Barra = 12  $\mu$ m.

Figura 3 - Ideograma de *L. camara* baseado nos dados morfométricos da tabela 1. As interrupções representam as constrições secundárias.

Figura 4 - Núcleo interfásico (a) e metáfase (b) submetidos a banda C; metáfase com coloração convencional Giemsa (c); núcleo interfásico (d) e metáfase (e) corado com CMA; núcleo interfásico (f) e metáfase corado com DAPI (g); Ag-NOR em metáfase mitótica (h); FISH em prófase (i) e metáfase (j) mostrando 06 NORs; FISH mostrando 4 sítios rDNA 5S (k, l).

Barra = 12  $\mu$ m.

Figura 5 – Células do botão floral em: interfase (a); leptóteno (b); zigóteno (c); paquíteno (d); diplóteno (e); diacinese inicial (f); diacinese (g); metáfase I (h); anáfase I (i); telófase I (j); prófase II (k); telófase II (l).

Barra = 12  $\mu$ m.



Figura 1

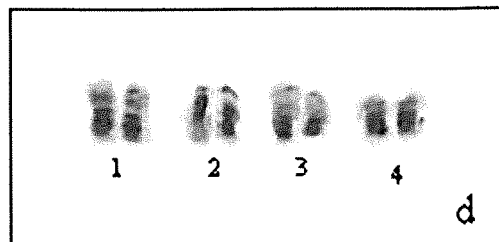
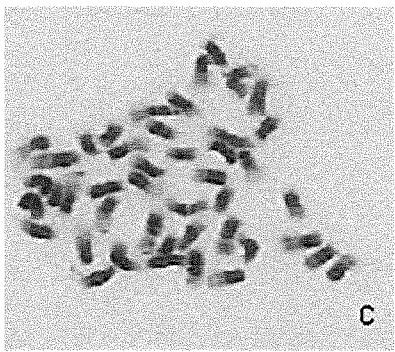
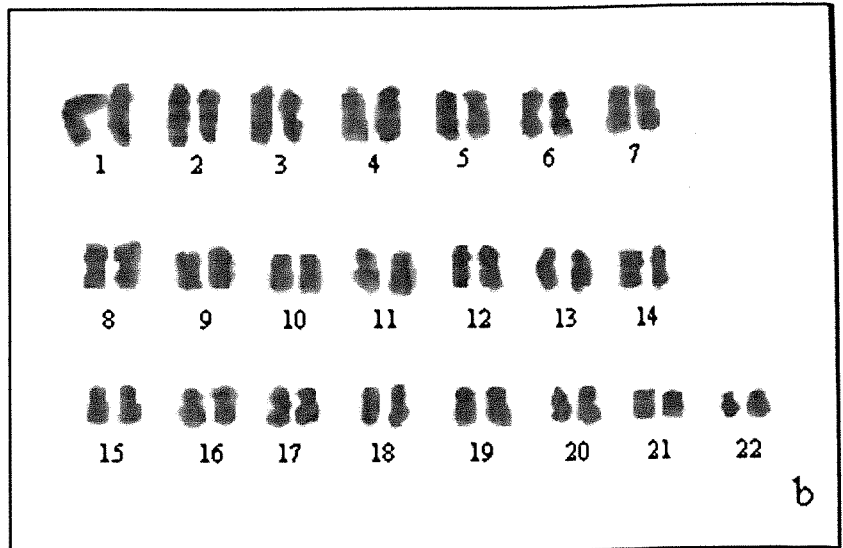
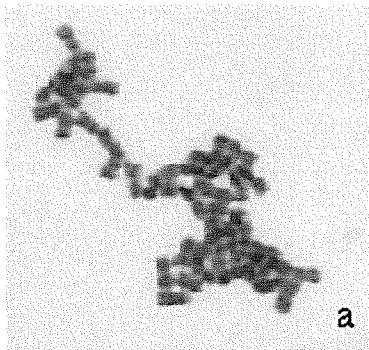


Figura 2

Tabela 1 - Dados morfométricos dos cromossomos de *Lantana camara*, N= 20

| C  | CT    | TR%  | RB   | IC    | CC |
|----|-------|------|------|-------|----|
| 1  | 12.00 | 6.66 | 1.25 | 44.75 | M  |
| 2  | 10.98 | 6.08 | 1.17 | 45.99 | M  |
| 3  | 10.52 | 5.83 | 1.20 | 45.05 | M  |
| 4  | 9.89  | 5.48 | 1.17 | 45.90 | M  |
| 5  | 9.31  | 5.16 | 1.22 | 44.89 | M  |
| 6  | 9.14  | 5.06 | 1.34 | 42.66 | M  |
| 7  | 8.89  | 4.92 | 1.22 | 44.88 | M  |
| 8  | 8.89  | 4.92 | 1.27 | 43.98 | M  |
| 9  | 8.84  | 4.90 | 1.24 | 44.57 | M  |
| 10 | 8.48  | 4.70 | 1.02 | 45.28 | M  |
| 11 | 8.19  | 4.54 | 1.20 | 45.29 | M  |
| 12 | 7.99  | 4.43 | 1.25 | 44.43 | M  |
| 13 | 7.79  | 4.31 | 1.33 | 42.74 | M  |
| 14 | 7.59  | 4.20 | 1.23 | 44.66 | M  |
| 15 | 7.35  | 4.07 | 1.22 | 45.03 | M  |
| 16 | 7.11  | 3.94 | 1.23 | 44.72 | M  |
| 17 | 6.89  | 3.82 | 1.20 | 45.42 | M  |
| 18 | 6.67  | 3.69 | 1.26 | 44.07 | M  |
| 19 | 6.45  | 3.57 | 1.17 | 46.04 | M  |
| 20 | 6.00  | 3.32 | 1.14 | 46.66 | M  |
| 21 | 5.72  | 3.17 | 1.29 | 43.53 | M  |
| 22 | 5.65  | 3.13 | 1.25 | 44.42 | M  |

C=Cromossomo; CT=Comprimento Total do Cromossomo; TR = Tamanho Relativo; RB = Relação de Braços; IC = Índice Centromérico; CC = Classificação Centromérica; M = Metacêntrico; SM = Submetacêntrico= Submetacêntrico; N = Número de Metáfases Medidas

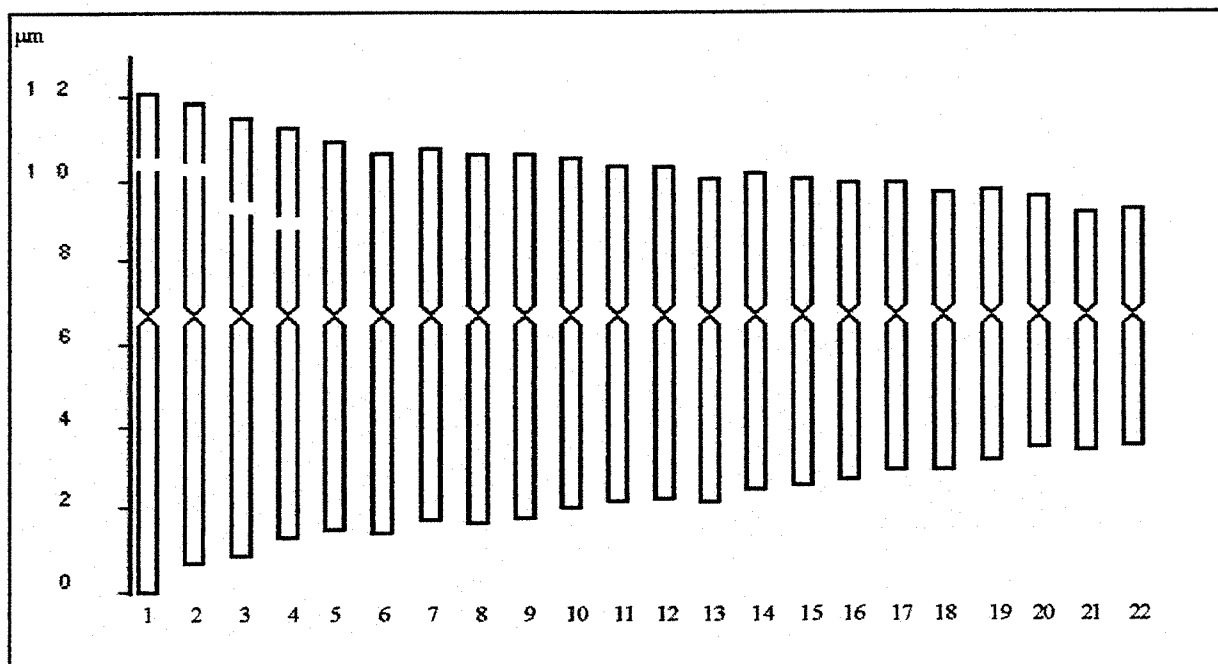


Figura 3



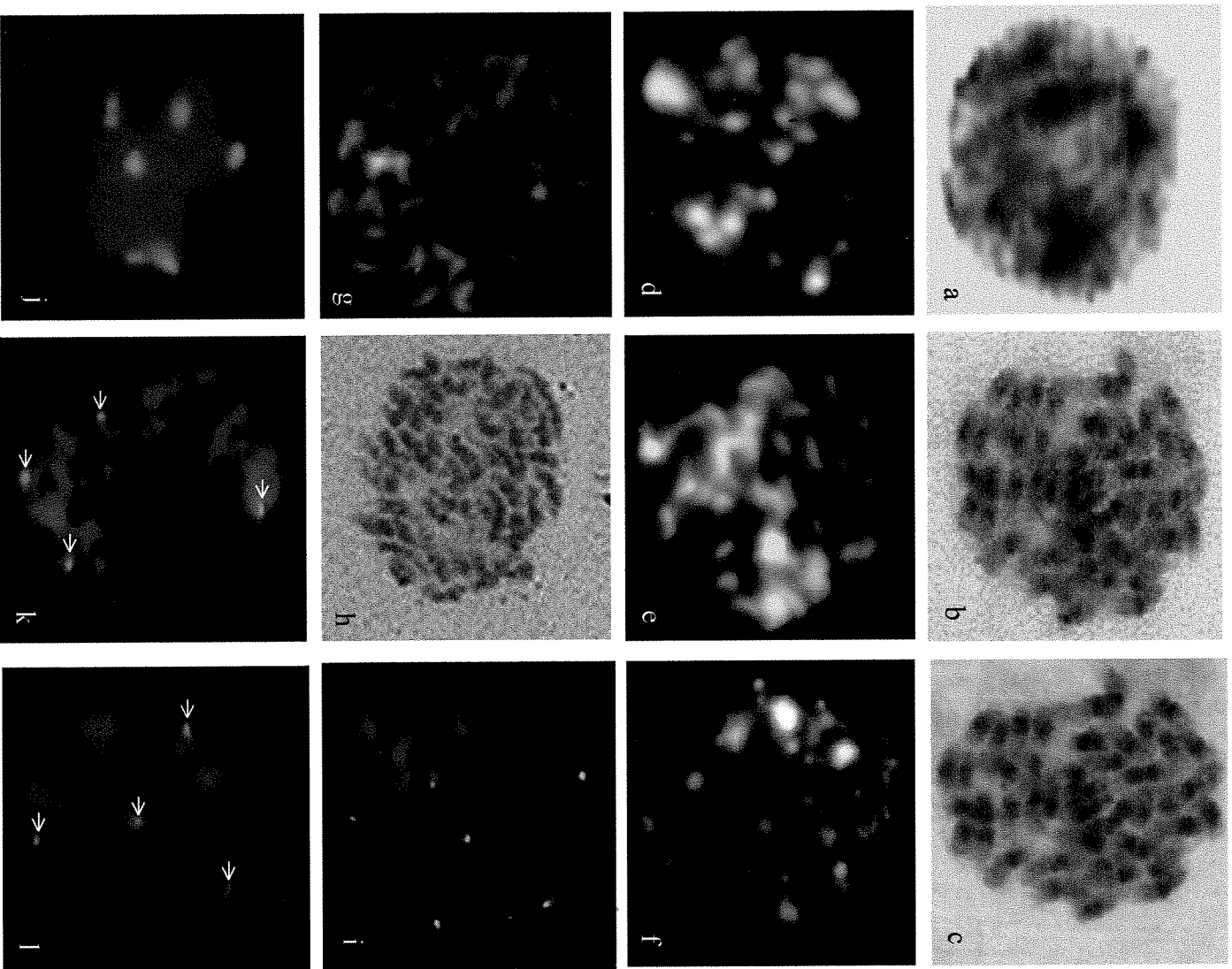


Figura 4

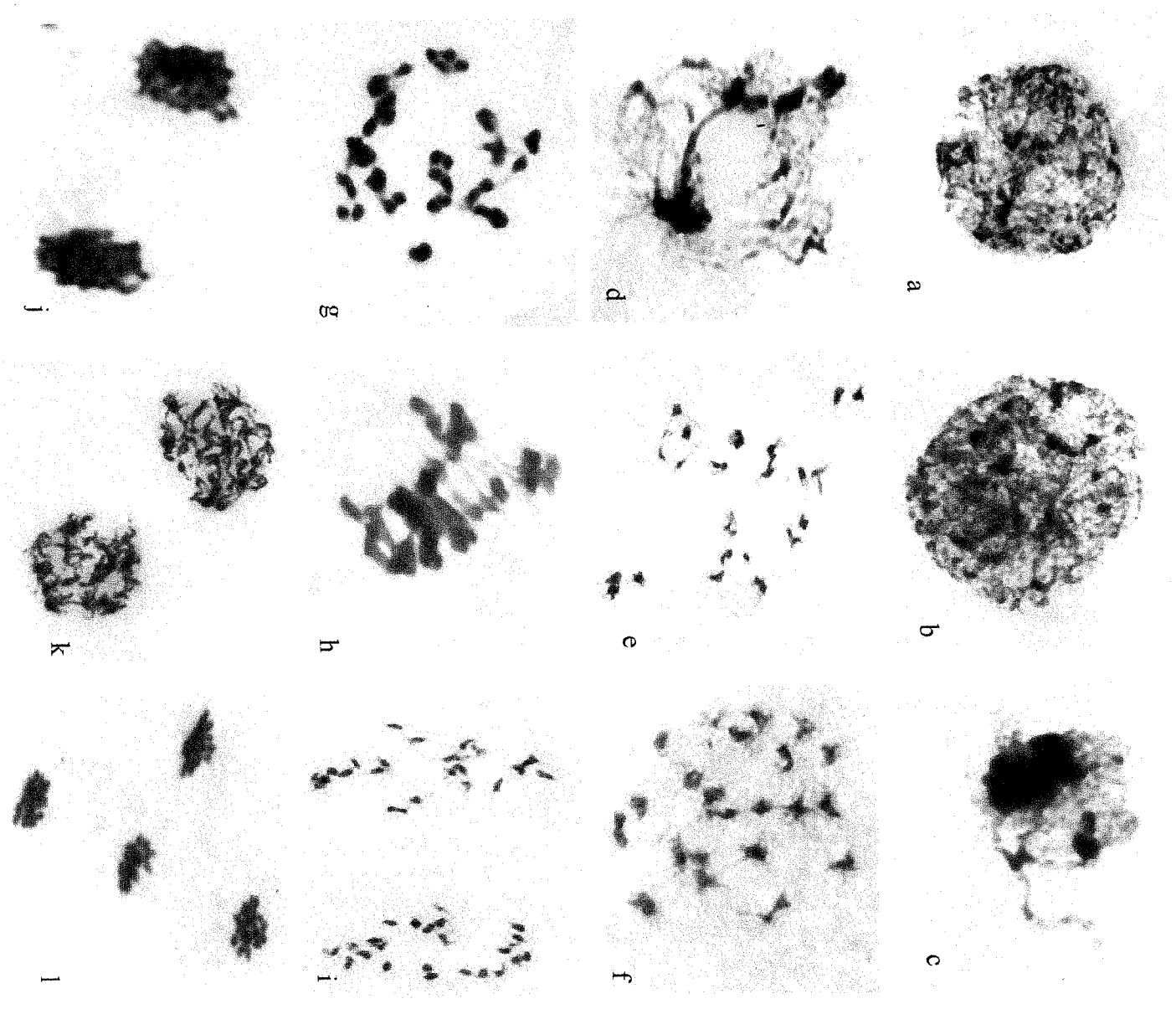


Figura 5

## 7. Conclusões Gerais

- *Lippia alba*, *Aloysia virgata*, *Lantana camara* apresentam, respectivamente  $2n = 2x = 30$ ,  $2n = 2x = 36$ ,  $2n = 4x = 44$  cromossomos, diferindo entre si também quanto à morfologia dos cromossomos;
- A presença de 30 cromossomos em *L. alba* e de 32 cromossomos em *L. geminata* corrobora a proposta de que as espécies sejam distintas;
- As três espécies estudadas apresentaram comportamento normal dos cromossomos na meiose;
- As três espécies (*L. alba*, *A. virgata* e *L. camara*) apresentaram grande quantidade de heterocromatina constitutiva (54%, 64% e 68%, respectivamente), sendo principalmente rica em AT em *A. virgata* e *L. alba* e rica em CG em *L. camara*, sugerindo uma condição apomórfica para as três espécies;
- A técnica de Ag-NOR mostrou-se inespecífica para as três espécies, sendo esta detecção de inúmeros blocos marcados atribuída possivelmente à grande quantidade de heterocromatina;
- O número de NORs em *A. virgata* (quatro), *L. alba* (seis) e *L. camara* (seis), determinado por hibridação *in situ* fluorescente, mostrou ser importante marcador para diferenciação das três espécies;
- O número de sítios de rDNA 5S se mostrou um marcador adequado para indicar o nível de ploidia da origem das três espécies;
- A morfologia nuclear determinada para as espécies *L. alba* (areticulado) *L. camara* e *A. virgata* (semi-reticulado) foi mais um marcador utilizado na diferenciação das espécies;

- O número de bivalentes encontrado na meiose comprovou o comportamento diploide das três espécies;
- Os dados deste trabalho acrescentaram características citogenéticas úteis para delimitação das três espécies e determinação do nível de ploidia.