

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Imunologia e DIP / Genética e Biotecnologia

Aryane Campos Reis

**EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA NO COMPLEXO
POLIPLOIDE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.**

JUIZ DE FORA - MG
2013

Aryane Campos Reis

**Evolução Cromossômica no Complexo
Poliploide *L. alba* (Mill.) N. E. Br.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini
Co-orientador: Prof. Dr. Saulo Marçal de Sousa

Juiz de Fora - MG
2013

ARYANE CAMPOS REIS

**EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA NO COMPLEXO
POLIPLOIDE *L. alba* (Mill.) N. E. Br.**

Universidade Federal de Juiz de Fora
Mestrado em Ciências Biológicas. Área: Genética/Biotecnologia

Aprovado em 05 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. José Marcello Salabert Campos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dra. Lisete Chamma Davide
Universidade Estadual de Campinas

Juiz de Fora - MG
2013

*“Nothing in Biology Makes Sense
Except in the Light of Evolution.”*

(Theodosius Dobzhansky)

Aos meus pais, Rita e Elton,
à minha irmã Daínha e a tia Maria
pela compreensão e amor incondicional.

Ao Saulo, meu amado e eterno mestre,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos, me dando força para perseverar e seguir em frente. À N.S. do Perpétuo Socorro pelas infinitas bênçãos concedidas;

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Genética e Biotecnologia, CAPES, CNPq, FAPEMIG e a UFJF pela bolsa e financiamento do trabalho;

Aos meus pais, Rita e Elton, à minha irmã Daínya, e a tia Maria, (que assiste tudo lá de cima), pelo exemplo de vida, compreensão e amor;

Ao Saulo, meu amor, pelos ensinamentos, disposição em ajudar e por todos os momentos especiais;

Ao amigo e orientador Lyderson, pelos ensinamentos, confiança e oportunidade de trabalhar com uma plantinha muito especial!

Aos meus padrinhos Isaura e José Augusto (“Titaia” e “Titiu”) pela presença em minha vida, pelos conselhos, dedicação e carinho;

Aos professores e amigos, José Marcello, Fátima, Marcelo e Carlos pelos auxílios e disposição em ajudar;

Às amigas do lab. de genética da UFJF, ao grupo de ligação gênica (Ana Luiza, Victória, Ludymila, Paola e Flávia) pela parceria e risadas entre um experimento e outro, à Ju pela boa vontade, ânimo e bom humor, à Melvis (por mostrar um pouquinho da garra africana, por ampliar meu vocabulário e pelas boas risadas), à Cynthia, Shaiany e Camila pela amizade e trocas de experiências;

Aos colegas de bancada: Flávia, Vinícius, Dani, Letícia, Renata, Thalita, Rafaella, Paula, João, Joyce, Marízia, Natália, Romena, Ana Paula, Cristiane, Jéssica, Ana Luisa, Gabriela, Mateus, Pâmela e Francisco;

À Laura, secretária da PGC BIO e a Fernanda, técnica de laboratório, pela gentileza e simpatia em nos atender e ajudar;

E claro, à Natureza, por suas infinitas formas e cores, que a cada dia me faz querer desvendar seus mistérios.

Muito obrigada!

RESUMO

REIS, A. C. Evolução cromossômica no complexo Poliploide *Lippia alba* (Mill.) N. E. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

A poliploidia é considerada um dos principais fatores envolvidos na formação de novas espécies. *Lippia alba* é uma espécie herbácea de grande importância medicinal, sendo empregada popularmente no tratamento de problemas gástricos e respiratórios. A espécie, de ampla distribuição caracteriza-se por apresentar vasta plasticidade morfológica e variados quimiotipos além de grande variação cariotípica. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar por meio de técnicas citogenéticas, diferentes citótipos coletados em ambientes naturais e contribuir para entender a dinâmica da formação de um possível complexo poliploide em *L. alba*. A partir de técnicas de bandeamento cromossômico e hibridização fluorescente *in situ* somadas às análises meióticas e de viabilidade polínica realizadas em cinco citótipos do complexo poliploide, foi possível verificar variações cromossômicas numéricas e estruturais. Os resultados sugerem que cruzamentos intraespecíficos e eventos de autoploidização originaram esta ampla variação cariológica em *L. alba*. A técnica de FISH, em especial a região de DNAr 5S, revelou indícios fortes de autoploidia, já que o número de sítios do complemento monoploide apresentou-se constante independente do nível de ploidia. Além disso, os altos índices de irregularidades meióticas encontrados nos acessos triploides, aneuploide, tetraploide e hexaploide também são indícios de pareamento e segregação cromossômica anormal, fenômeno típico de poliploides recém-formados. Em adição, os resultados de viabilidade polínica com o corante FDA corroboram os dados meióticos e incrementam a hipótese de formação de um complexo poliploide em *L. alba*.

Palavras-chave: *Lippia alba*; autoploidia; citótipos; carilogia.

ABSTRACT

REIS, A. C. Chromosome evolution in polyploid complex *Lippia alba* (Mill.) N. E. Dissertation (Master in Biological Science) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

The polyploidy is considered one of the most important factors in plant speciation, *Lippia alba* is an important medicinal herb being popularly used mainly in the treatment of gastric and respiratory problems. Once your popular use is employed as palliative for various human diseases. The species, of widely distribution possess extensive morphological plasticity and different chemotypes in addition to great karyotype variation. The present study aimed to characterize by means of cytogenetic techniques different cytotypes collected in natural environment and help to understand the dynamic of possible polyploid complex formation of the in *L. alba*. By means of chromosome banding and fluorescence *in situ* hibridization techniques in addition to meiotic and pollen viability analyses accomplished in five cytotypes of polyploid complex, it was possible to observe numerical and structural variations. The results suggest that intraspecific crosses autoploidization events caused the wide karyological variation in *L. alba*. The FISH technique, specially the rDNA 5S region, revealed important indications of autoploidy, once the number of marks of monoplid complement remained constant regardless of chromosome number. Moreover, the high rates of meiotic irregularities observed in triploid, aneuploid, tetraploid and hexaploid accessions also indicates abnormal paring and chromosomal segregation , a typical phenomenon of newly formed polypoids. In addition, the results of pollen viability by means of FDA test corroborate the meiotic data and support the hypothesis of of a polyploid complex formation in *L. alba*.

Key-words: *Lippia alba*; autoploidy; cytotypes; karyology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Detalhe da inflorescência de <i>L. Alba</i>	14
Figura 2.	Metáfase e cariograma do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=30 cromossomos	27
Figura 3.	Metáfase e cariograma do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=38 cromossomos	28
Figura 4.	Metáfase e cariograma do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=45 cromossomos	29
Figura 5.	Metáfase e cariograma do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=60 cromossomos	30
Figura 6.	Metáfase e cariograma do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=90 cromossomos	31
Figura 7.	Correlação entre assimetria cariotípica e número cromossômico de cinco citótipos de <i>L. alba</i>	32
Figura 8.	Correlação entre heterogeneidade cromossômica e assimetria cariotípica em cinco citótipos de <i>L. alba</i>	33
Figura 9.	Bandeamento cromossômico em cinco citótipos de <i>L. alba</i>	34
Figura10.	FISH em cinco citótipos de <i>L. alba</i>	36
Figura 11.	Cariograma e Idiograma evidenciando as marcas CMA ⁺ e os sítios ribossomais do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=30	37
Figura12.	Cariograma e Idiograma evidenciando as marcas CMA ⁺ e os sítios ribossomais do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=38	38
Figura13.	Cariograma e Idiograma evidenciando as marcas CMA ⁺ e os sítios ribossomais do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=45	39

Figura 14.	Cariograma e Idiograma evidenciando as marcas CMA ⁺ e os sítios ribossomais do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=60	40
Figura 15.	Cariograma e Idiograma evidenciando as marcas CMA ⁺ e os sítios ribossomais do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=90	41
Figura16.	Anormalidades meióticas em cinco citótipos de <i>L. alba</i>	45
Figura 17.	Pareamento de homólogos em diacinese de cinco citótipos de <i>L. alba</i>	46
Figura 18.	Figura ilustrativa do teste de FDA	47
Figura 19.	Média dos diâmetros dos grãos de pólen viáveis e inviáveis para seis acessos de <i>Lippia alba</i> .	48
Figura 20.	Relação entre a meiose e viabilidade polínica em seis acessos de <i>Lippia alba</i> .	48
Figura 21.	Esquema representando a formação dos citótipos de <i>L. alba</i> .	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Mistura de hibridização	22
Tabela 2.	Dados morfométricos do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=30 cromossomos	26
Tabela 3.	Dados morfométricos do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=38 cromossomos	28
Tabela 4.	Dados morfométricos do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=45 cromossomos	29
Tabela 5.	Dados morfométricos do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=60 cromossomos	30
Tabela 6.	Dados morfométricos do citótipo de <i>L. alba</i> com 2n=90 cromossomos	31
Tabela 7.	Assimetria cariotípica, heterogeneidade cromossômica e número cromossômico dos citótipos de <i>L. alba</i>	32
Tabela 8.	Informações cariotípicas de cinco citótipos de <i>L. alba</i>	42
Tabela 9.	Irregularidades meióticas em 6 acessos de <i>L. alba</i>	44
Tabela 10.	Viabilidade Polínica pelo teste de FDA para seis acessos de <i>Lippia alba</i> .	47

LISTA DE SIGLAS ABREVIATURAS

A	Grau de assimetria do Cariótipo
Ai	Assimetria de cada Cromossomo
AT	Adenina e Timina
bc	Braço Curto
bl	Braço Longo
CG	Citosina e Guanina
CMA ₃	Cromomicina A ₃
cr	Comprimento Relativo do Cromossomo
ct	Comprimento Total do Cromossomo
ddH ₂ O	Água Destilada e Deionizada
DAPI	4`6-diamino-2-phenylindole
DNA	"Deoxyribonucleic acid" - Ácido Desoxirribonucléico
DNAr	DNA ribossomal
FDA	Fluoresceína diacetato
FISH	"Fluorescence <i>in Situ</i> Hybridization"- Hibridização Fluorescente <i>in Situ</i>
GISH	" <i>Genomic in Situ</i> Hybridization"- Hibridização Genômica <i>in Situ</i>
ic	Índice Centromérico
HCl	Ácido Clorídrico
m	Metacêntrico
n	Número Haploide de Cromossomas
pg.	Picogramas
r	Razão entre os braços
RNA	"Ribonucleic acid" - Ácido Ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
RON	Região Organizadora de nucléolo
SSC	(NaCl 3M/Citrato Trissódico.2H ₂ O 0,3M)
sm	Submetacêntrico
st	Subtelocêntrico
t	Telocêntrico
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
8-HQ	8-Hidroxiquinoleína
°C	Graus Celsius
Σ	Somatório

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1- Poliploidia e suas consequências na evolução de novos táxons	2
1.2- Formação de poliploides.....	4
1.3- Reprodução sexuada e produção de gametas não reduzidos em poliploides	6
1.4- Alterações cromossômicas após poliploidização	7
1.5- detecção de rearranjos cromossômicos em poliploides.....	10
1.6- <i>Lippia alba</i> e a família Verbenaceae	11
1.7- Distribuição e morfologia de <i>Lippia alba</i>	12
1.8 Importância econômica e variação química em <i>Lippia alba</i>	14
1.9- Estudos cromossômicos em <i>L. alba</i>	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 - Geral	17
2.3 - Específicos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Material biológico.....	18
3.2 Análises citogenética	18
3.2.1 - Mitose	19
3.2.2 - Morfometria Cromossômica	19
3.2.3 - Bandeamento Cromossômico DAPI/CMA ₃	20
3.2.4 - Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	21
3.2.5 Meiose	22
3.3- Viabilidade Polínica pelo teste de Diacetato de Fluoresceína – FDA	24
3.3.1- Relação entre diâmetro e a viabilidade polínica.....	24
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Morfometria cromossômica	26
4.2- Bandeamento cromossômico DAPI/CMA ₃	33
4.3- Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	35
4.4- Análise meiótica	42
4.5 - Análises de viabilidade polínica e do diâmetro dos grãos de pólen.	46

5-DISCUSSÃO.....	49
6-CONCLUSÕES.....	63
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A poliploidia é considerada a principal força na evolução e diversificação das angiospermas. Estima-se que cerca de 70% das plantas com flores são poliploides (SOLTIS e SOLTIS, 2009). A autopoliploidia consiste na duplicação de todo o genoma de um organismo, e estudos apontam para uma facilidade na adaptação e vantagem na sobrevivência do indivíduo poliploide em comparação com seu genitor diploide (SOLTIS E SOLTIS, 1995; PARISOD, HODEREGGER e BROCHMANN, 2010). A maioria dos poliploides é formada por fecundação de gametas não-reduzidos, originando plantas com o dobro do número cromossômico (BRETAGNOLLE e THOMPSON, 1995). Conseqüentemente, vários citótipos com diferentes níveis de ploidia podem surgir, decorridos de cruzamentos e poliploidização entre os morfotipos (SOLTIS et al. 2007). Segundo Burton e Husband (2001) cruzamentos intraespecíficos envolvendo citótipos são considerados comuns quando os mesmos coexistem em uma população.

Neste contexto, estudos indicam a presença de um possível complexo poliploide para *L. alba*, formado naturalmente em diferentes localidades do Brasil. A espécie destaca-se com grande plasticidade fenotípica e genômica, sendo a delimitação e caracterização dos diferentes citótipos de suma relevância, ecológica e medicinal, uma vez que *L. alba* é rotineiramente usada na medicina popular para diversas indisposições humanas (GOMES et. al, 1993; TAVARES et al., 2005; SOUSA et al., 2009; VALE, 2010; PIERRE, et al 2011).

A fim de investigar a origem, caracterizar e documentar os principais mecanismos envolvidos no processo de autopoliploidia e formação dos citótipos, estudos citogenéticos foram realizados em representantes de diferentes citótipos. Técnicas de bandeamento cromossômico DAPI/CMA₃, mapeamento dos genes ribossomais com a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), morfometria cromossômica, assim como análises do comportamento meiótico e viabilidade polínica foram avaliadas.

1.1- A poliploidia e suas consequências na evolução de novos táxons

A poliploidia é considerada um importante fator na evolução de eucariotos, sendo crucial, sobretudo, no processo de evolução e especiação em vegetais (MA e GUSTAFSON, 2005; SOLTIS e SOLTIS, 2009; PARISOD, HODEREGGER e BROCHMANN, 2010). Segundo Schifino (2004), a especiação por poliploidia é predominante entre espécies simpátricas, e pode levar a alterações na regulação e expressão gênica, rearranjos cromossômicos, mudanças na morfologia, sistema de reprodução e ecologia do organismo. Estima-se que aproximadamente 50 a 70% das angiospermas sejam poliploides (MASTERSON, 1994; WENDEL, 2000; SOLTIS, 2005) e que muitas das plantas cultivadas e naturais atuais sejam na verdade, paleopoliploides oriundos de cruzamentos ocorridos em tempos remotos (GASTONY, 1991). Um exemplo clássico de paleopoliploide é o milho, *Zea mays*, que embora muitas vezes seja considerada uma espécie diploide, possui sua constituição nuclear formada por cruzamentos interespecíficos seguidos de duplicações genômicas, sendo portanto, um alopoliploide segmental (GAUT e DOEBLEY, 1997). Além de *Zea*, os gêneros *Arabidopsis*, *Glicine*, *Gossypium* e *Sorghum* também são exemplos de paleopoliploides que sofreram processos de diploidização e comportam-se como indivíduos diploides atualmente (MA e GUSTAFSON, 2005; LIU et al., 2006). As espécies ou organismos que passaram pelo processo de poliploidia podem ser divididos em duas principais categorias, os autopoliploides e os alopoliploides. A autopoliploidia corresponde a um mecanismo de duplicação de todo o complemento cromossômico de um organismo, já os alopoliploides são originados por duplicação de genomas diferentes, depois de hibridações interespecíficas. Adicionalmente, uma terceira classe, os alopoliploides segmentais também ocorrem, sendo formados pela duplicação genômica do híbrido produzido entre espécies próximas, que apresentam certo grau de homeologia cromossômica (STEBBINS, 1971).

Na natureza, alopoliploidias são mais frequentes e contribuem notavelmente para a formação de novas espécies. Autopoliploides são comumente encontrados em ambientes com climas instáveis, ao passo que seus citótipos diploides são geralmente encontrados em áreas homogêneas (SOLTIS e SOLTIS, 1995;

PARISOD, HODEREGGER e BROCHMANN, 2010). Teoricamente, a redundância genética proporcionada pela duplicação genômica implicaria em uma certa flexibilidade às possíveis pressões de seleção. Os genes duplicados têm possibilidades de sofrer mutações espontâneas e então adquirir uma nova função, neofuncionalização, ou então, complementar funções de outros genes, além de apresentar uma menor expressão, fenômeno também conhecido como subfuncionalização (LYNCH, et al., 2001; BUGGS et al. 2010a,b). Tais mecanismos conferem inovações aos portadores e podem influenciar no valor adaptativo dos indivíduos. Além disso, o aumento da ploidia pode mascarar o efeito de mutações deletérias, pois os vários genomas podem encobrir tais mutações (OTTO e WHITTON, 2000; CHEN, HÁ e SOLTIS, 2007; OTTO, 2007).

Alguns estudos sugerem que os autopoliploides se adaptam mais facilmente que seus progenitores diploides, o que torna o processo adaptativo mais eficiente aos organismos que passaram por duplicação genômica, acarretando, conseqüentemente, um aumento populacional de citótipos poliploides (OTTO e WHITTON 2000; PARISOD, HODEREGGER e BROCHMANN, 2010). No entanto, nem sempre os autopoliploides toleram condições ambientais severas e apresentam nichos ecológicos mais amplos que seus progenitores diploides (LEVIN, 2002). Rivero-Guerra (2008), por exemplo, trabalhando com *Santolina pectinata* observou que os citótipos autotetraploides dessa espécie eram restritos a certos habitats, enquanto os indivíduos diploides apresentavam distribuição mais ampla.

O processo de poliploidização também pode alterar aspectos relacionados à ecologia das populações. Estudos com *Heuchera grossulariifolia* no norte dos EUA revelaram que as flores de autotetraploides eram visitadas por espécies de polinizadores diferentes das espécies que frequentavam seus parentais diploides, e o mesmo era verdade para as interações de herbivoria (THOMPSON, NUISMER e MERG, 2004). Segundo Thompson et al. (2004) esta diferença de polinizadores pode gerar um isolamento reprodutivo parcial e assim, contribuir para a coexistência de vários níveis de ploidia intraespecíficos.

1.2 Formação de poliploides

Embora menos documentada que no caso das plantas cultivadas, várias espécies vegetais constituem poliploides naturais formados recentemente, há cerca de 150 anos. Dentre estas podemos citar: *Spartina anglica* (ABBOTT E LOWE, 2004; AINOUCHE, et al., 2004; MARCHANT, 1968, 1967), *Senecio cambrensis* e *S. eboracensis* (ABBOTT E LOWE, 2004; ROSSER, 1955), *Cardamine schultzii* (URBANSKA et al., 1997), *Tragopogon mirus* e *T. miscellus* (SOLTIS et al., 2004). Segundo DeWet (1980) os poliploides podem ser originados na natureza por meio de duas maneiras: através da duplicação cromossômica somática (poliploides assexuais), método bastante empregado em programas de melhoramento e raríssimo de ocorrer naturalmente, ou por meio de uma não redução gamética durante a gametogênese (RAMANNA e JACOBSEN, 2003). A produção de gametas não reduzidos é o principal processo na formação de poliploides (BRETAGNOLLE e THOMPSON, 1995; RAMSEY e SCHEMSKE, 1998).

Na poliploidização somática, não ocorre a divisão da célula após a fase S em tecidos meristemáticos de zigotos ou embriões juvenis durante as primeiras divisões celulares, originando indivíduos com número cromossômico duplicado, completamente poliploides (CARPUTO, FRUSCIANTE e PELOQUIN, 2003). Os exemplos de poliploidização somática mais conhecidos na literatura são em *Solanum* (JORGENSEN 1928), *Mimulus* (HIESEY, NOBS e BJORKMAN, 1971) e *Primula kewensis* (CARPUTO, FRUSCIANTE e PELOQUIN, 2003; ALESSIA et al; 2008). Pouco se sabe sobre o surgimento de poliploides somáticos na natureza e segundo Harlan e De Wet (1975) este fenômeno é irrelevante no surgimento de novas espécies.

Dentre os mecanismos sexuais de surgimento de poliploides, a poliploidização unilateral envolve cruzamentos de gametas diploides com gametas reduzidos ($2n+n$) originando organismos triploides ($3x$) (BRETAGNOLLE e THOMPSON, 1995). Normalmente a formação de indivíduos $3x$ é interrompida logo após a fecundação, devido a falhas no desenvolvimento do endosperma. De acordo com Bretagnolle e Thompsom (1995) o triploide se torna viável apenas quando há um Balanço Numérico do Endosperma (EBN) e neste caso, o gameta não reduzido

deve ser feminino. O conceito de desenvolvimento normal do endosperma depende de um balanço entre os fatores genéticos do óvulo e da célula espermática. Para que o triploide seja viável deve existir uma razão 2:1 entre os genomas materno e paterno (LEVIN, 2002). Caso contrário, ocorre o chamado bloco triploide, ou seja, um efeito de aborto maciço das sementes devido a falhas no desenvolvimento do endosperma, tecido crucial para o desenvolvimento do embrião (BRETAGNOLLE e THOMPSON 1995).

Em casos de triploides, sua fertilidade é mais baixa que de seus parentais diploides e tetraploides já que usualmente os gametas masculinos desses citótipos são estéreis e os femininos parcialmente estéreis (SATO, 1993). Segundo Otto e Whitton (2000) organismos 3x são considerados um obstáculo para a evolução, já que são inférteis e tendem a produzir gametas aneuploides devido a pareamento e segregação meióticos incorretos. No entanto, Ramsey e Schemske (1998) defendem que triploides são pontes para a formação de novos poliploides, e que nem sempre o EBN é crucial para seu estabelecimento. Alguns indivíduos mesmo com um desbalanceamento numérico do endosperma são capazes de sobreviver e originar outras espécies por meio de cruzamentos com organismos diploides, tetraploides e outros triploides podendo originar diferentes citótipos (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998).

Além da poliploidização unilateral, um tipo menos frequente de surgimento de poliploides de forma sexuada também ocorre, a poliploidização bilateral. Neste caso, indivíduos tetraploides são originados pela fusão de dois gametas não reduzidos (MENDIBURU e PELOQUIN, 1971). Estudos demonstraram que a formação de gametas não reduzidos tem relação direta com as condições ambientais. Temperaturas baixas ou altas e a sazonalidade, por exemplo, podem aumentar a frequência de gametas $2n$ e contribuir para formação de neopoliploides em regiões de climas instáveis (STEBBINS, 1971; EHRENDORFER, 1980; RAMANNA e JACOBSEN, 2003).

Embora a produção de gametas $2n$ seja uma anormalidade meiótica, devido a disfunções nas segregações cromossômicas, a produção de células germinativas com número somático resulta em fluxo gênico entre plantas de ploidias diferentes e possibilita em médio prazo o aumento da heterozigosidade a nível populacional (GROOSE et al., 1989).

1.3- Reprodução sexuada e produção de gametas não reduzidos em poliploides

A produção de gametas não reduzidos na formação de poliploides tem sido objeto de estudo há anos e discutido e revisado por inúmeros autores (BRETAGNOLLE e THOMPSON, 1995; RAMANNA e JACOBSEN, 2003; YAN et al. 1997, LEVIN, 2002; KOVALSKY e NEFFA, 2012). Diversas espécies conhecidas são oriundas de poliploidização sexual resultantes de gametas não reduzidos, como a batata, alfafa, beterraba, trevo vermelho entre outras (MENDIBURU e PELOQUIN, 1971; VERONESI, MARIANI e BINGHAN, 1996), sendo um processo importantíssimo para a formação de poliploides. Segundo Bretagnolle e Thompson (1995), em plantas, a frequência de gametas $2n$ é amplamente variável, podendo ser alterada não só entre as diferentes espécies como também entre indivíduos co-específicos (LEVIN, 2002). Em diferentes espécimes de *Trifolium pratense*, por exemplo, a frequência de pólenes $2n$ produzidos variou de 1 a 84% (PARROT e SMITH, 1984).

As principais causas de formação de gametas diploides são anormalidades na micro e na megasporogênese, devido a não formação do fuso meiótico ou seu mau funcionamento, ou problemas durante a citocinese (BRETAGNOLLE e THOMPSON, 1995). A não redução gamética acontece quando não há a separação dos cromossomos corretamente, seja na primeira ou na segunda divisão da meiose.

Segundo Mok e Peloquin (1975) quando não há segregação dos homólogos na anáfase I, mas a segunda divisão é normal, nomeia-se a não divisão como Restituição na Primeira Divisão (RPD). Contudo, quando por ventura ocorre erro apenas durante o desenvolvimento da segunda divisão meiótica, dá-se o nome de Restituição na Segunda Divisão (RSD). Dentre as irregularidades meióticas observadas, a formação de díades e tríades são indícios fortes de não restituição meiótica e gametas não reduzidos (RAMANNA, 1992; ORTIZ, 1997; YAN et al., 1997).

O ambiente também pode influenciar diretamente na produção de gametas com o dobro de material genético. Fatores como temperatura, estresses hídrico e nutricional podem alterar a produção de pólenes não reduzidos (RAMSEY e

SCHEMKE, 1998). Acredita-se que tais fatores externos podem influenciar na expressão de genes meióticos e induzir anormalidades durante a divisão (VEILLEUX e LAUER, 1981). No entanto, estudos que investiguem a influência ambiental com bases genéticas são poucos e os mecanismos envolvidos devem ainda ser elucidados.

Na literatura, registros de plantas que produzem grãos de pólen não reduzidos podem ser facilmente encontrados (YAN et al., 1997; LAVIA et al., 2011; LARROSA, et al., 2012). No entanto, embora óvulos não reduzidos também possam ocorrer, os trabalhos são mais escassos. Segundo Ramsey e Schemske (1998) os índices de não redução na micro e na megasporogênese são similares e não há correlações entre a frequência de pólen e óvulos $2n$. Isso sugere que os processos de formação de gametas masculinos e femininos sejam governados por diferentes mecanismos de controle genético (BRETAGNOLLE e THOMPSON, 1995; BROWNFIELD e KOHLER, 2010).

Dentre as maneiras de detectar pólen $2n$, o screening que examina o tamanho do grão é bastante usado (KELLY, RASCH e KALISZ, 2002). A identificação dos pólenes diploides pode ser feita medindo-se o seu volume e seu diâmetro, já que o aumento na quantidade de DNA acarreta 30% a 40% de aumento no tamanho do grão (efeito gigas) (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; LEVIN, 2002). A presença de “pólenes gigantes” é um forte indicativo de não redução gamética. Outra forma de verificar pólenes não reduzidos é através da quantificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo (PAN et al., 2004; DOLEZEL, GREILHUBER e SUDA, 2007). Esta técnica tem a vantagem de examinar muitos grãos de vários indivíduos de uma só vez, com facilidade e rapidez.

1.4 Alterações cromossômicas após a poliploidização

Os vegetais, mais especificamente as angiospermas, são marcados por apresentarem uma extraordinária plasticidade genômica, sendo capazes de sofrer modificações nucleares e citológicas para se adequarem às condições celulares

impostas (SOLTIS e SOLTIS, 2009). Logo após um evento de poliploidização, seja ela natural ou induzida, há um “choque genômico” produzido pela interação dos genótipos envolvidos, e os organismos para superarem o impacto da duplicação tendem a reorganizar o seu “novo” material genético. Dentre as inúmeras modificações genômicas sofridas, os rearranjos estruturais (deleções, inserções, duplicações e translocações), a ativação de elementos móveis e as mudanças epigenéticas são os principais eventos observados que podem afetar o transcriptoma, o metaboloma e o proteoma (LEITCH e LEITCH, 2008). Essas alterações acontecem imediatamente após a poliploidização, sendo uma resposta rápida e altamente variável nas diferentes espécies (LEITCH e LEITCH, 2008).

Uma das principais consequências imediatas após a poliploidização é a eliminação de material genético (LEITCH e BENNETT, 2004). Em autoploidos sintéticos de *Phlox drummondii*, por exemplo, foi registrada uma perda de cerca de 17% de sequências de DNA na prole F1, aumentando para 25% na terceira geração (RAINA et al., 1994). No entanto, a eliminação nem sempre é aleatória já que segmentos particulares podem ser excluídos do genoma de aloploidos recém-formados (HAN, et al., 2005). No trabalho de Han e colaboradores (2005), observou-se por meio de técnicas citogenéticas e moleculares, sucessivas perdas de cópias da sequência pGc1R-1, uma região repetitiva *in tandem* encontrada em alotetraploides do complexo *Triticum-Aegilops* totalizando cerca de 70 a 90% de eliminação. Estudos sugerem que esta redução de material genético é um pré-requisito para que ocorra o processo de diploidização, ou seja, uma regularização do pareamento na meiose (FELDMAN et al., 1997). Tal eliminação poderia acentuar as divergências entre cromossomos homeólogos e contribuir para a formação de bivalentes na diacinese (FELDMAN et al., 1997).

As eliminações de sequências são importantes para o estabelecimento de poliploides, e implicam diretamente na constituição e na estrutura genômica, causando mudanças na morfometria cromossômica e no cariótipo como um todo (MA e GUSTAFSON, 2005). As deleções de segmentos cromossômicos são comuns pelo fato de poliploides apresentarem múltiplas cópias de um determinado segmento. A ausência de uma fração cromossômica, embora tolerável em um poliploide, poderia ser letal em um diploide (SCHUBERT e LYSACK, 2011). As inversões, ao contrário, não afetam a quantidade de conteúdo nuclear, mas podem mudar o padrão de expressão dos genes ali encontrados, o que é conhecido como

“efeito de posição”. Nas translocações também não há perda nem ganho de material genético, mas apenas uma redistribuição dos fragmentos translocados entre os cromossomos (LEVIN, 2002). As translocações podem ser intragenômicas e em casos de alopoliploides intergenômicas, como observado em *Avena maroccana*, *Avena sativa* e em *Nicotiana*, onde foram encontradas nove regiões de translocações entre os genomas parentais (LEITCH e BENNETT, 1997). Segundo Schubert e Lysak (2011) as translocações recíprocas são mais frequentes e geram duplicações e deleções de sequências, mimetizando uma translocação não recíproca, pois originam gametas desbalanceados que eventualmente podem influenciar na sobrevivência dos indivíduos por eles formados.

Segundo McClintock (1984), os mecanismos que levam a estes rápidos rearranjos estruturais pós-hibridação, devem-se a ativação de elementos transponíveis que se encontram dispersos nos genomas parentais. A atividade desses elementos móveis aumenta a chance de ocorrer quebras cromossômicas (WEIL e WESSLER, 1993) que resultariam em alterações genômicas secundárias, como duplicações gênicas e amplificação de regiões (JIN e BENNETZEN, 1994). Além de alterações estruturais, os elementos móveis também tem a capacidade de alterar o perfil de expressão gênica, pois eventualmente pode ocorrer a inserção de genes em regiões codificantes, acarretando em um aumento de sua transcrição. Alternativamente, estes genes podem ser agrupados em regiões de pouca ou nenhuma atividade transcricional, resultando em silenciamento gênico (BARKAN e MARTIENNSSEN, 1991; RAIZADA, BENITO e WALBOT, 2001; HEGARTY et al., 2008).

Rearranjos estruturais observados em poliploides recém-formados podem assim constituir uma forma de reorganização do genoma e redução das instabilidades imediatas causadas pela duplicação do material genético. Nos vegetais, em especial, é surpreendente e fascinante esta plasticidade genômica que tem implicações diretas na sobrevivência e na perpetuação das espécies (KEELER e DAVIS, 1999; LEITCH e LEITCH, 2008; SOLTIS e SOLTIS, 2009; CHESTER et al., 2010).

1.5 Detecção de rearranjos cromossômicos em poliploides

A citogenética proporciona informações valiosas a nível cromossômico. Dados sobre número, tamanho, forma e constituição dos cromossomos são indispensáveis para o estudo da caracterização de espécies, contribuindo tanto para a citotaxonomia quanto para o conhecimento evolutivo. A partir de estudos de cariótipos de espécies próximas é possível fazer comparações e traçar o caminho evolutivo de um determinado grupo (STEBBINS, 1971). Dentre as técnicas mais utilizadas para o estudo cromossômico de plantas destacam-se os bandeamentos com fluorocromos base-específicos DAPI/CMA₃, bandeamento C, coloração com nitrato de prata e mais recentemente metodologias moleculares com o emprego da hibridização *in situ* fluorescente (FISH e GISH). A localização de sequências específicas de DNA por meio da técnica de FISH é bastante utilizada na citotaxonomia como mais um parâmetro para comparar cariótipos (SUMNER, 2003). O mapeamento físico dos genes ribossomais 5S e 45S fornece informações valiosas para o estudo evolutivo, sendo marcadores universais amplamente utilizados em espécies vegetais (CHESTER, et al., 2010; FUKUSHIMA, 2011; VIANA e SOUZA, 2012).

Estas metodologias geram um perfil de bandas e de localizações de regiões específicas ao longo dos cromossomos, que facilitam a distinção dos cromossomos e o agrupamento de homólogos. Com isso, tais abordagens permitem investigações mais apuradas acerca do genoma e dão subsídios para revelar possíveis mudanças ocorridas no cariótipo ao longo do tempo, possibilitando documentar rearranjos estruturais que ocasionalmente ocorrem em espécies vegetais, principalmente aquelas que passaram por eventos de poliploidia.

As colorações DAPI/CMA usadas simultaneamente permitem delimitar os sítios ricos em AT e em CG, respectivamente. A partir do padrão de marcas encontrado na espécie, torna-se possível detectar anomalias cromossômicas estruturais. No trabalho de Souza et al. (2009), por exemplo, as marcas DAPI⁻/CMA⁺ combinadas com outras técnicas foram utilizadas para o estudo da evolução cariotípica em *Nothoscordum gracile*.

Em espécies poliploides de *Hepatica nobilis*, por exemplo, foi observado perda de sítios de DNAr pela FISH (WEISS-SCHNEEWEIS et al., 2007). Em *Vicia faba*, a FISH revelou sinais de regiões teloméricas próximos ao centrômero de um dos pares de cromossomos, sugerindo que uma fusão cêntrica tenha os originado (FUCHS et al., 1998). Inversões peri e paracêntricas em *Lotus* também puderam ser detectadas pela hibridização *in situ* (PEDROSA et al., 2002). Translocações também são comuns, aparecem entre genomas de híbridos e são facilmente detectadas pela GISH, como ocorrem em *Primula*, *Tragopogon*, *Festuca* e *Lolium*, *Poa*, dentre outros (BRYSTING, HOLST-JENSEN e LEITCH, 2000; GUGGISBERG et al., 2008; LIM et al., 2008; KSIAZCZYK, TACIAK e ZWIERZYKOWSKI, 2008).

Além das colorações que evidenciam padrões de bandas e marcas específicas, o comprimento e a razão entre os braços cromossômicos também são parâmetros úteis para o estudo do cariótipo (STEBBINS, 1971). A partir da morfometria dos cromossomos é possível detectar algumas anomalias como deleção, adição e fusão cromossômica, além de auxiliar na distinção de homólogos e evidenciar aneuploidias. Em híbridos de *Tragopogon*, por exemplo, foi observado por meio da forma cromossômica combinada com a técnica de GISH, indivíduos trissômicos e dissômicos para um dado cromossomo (LIM et al., 2008).

Assim, a partir das informações citogenéticas pode-se examinar com clareza as alterações cromossômicas estruturais e numéricas, as quais possuem papel crucial na evolução das espécies vegetais, auxiliando nas hipóteses da evolução cariotípica do táxon (STACE, 1978). Em *L. alba*, uma espécie medicinal ainda pouco estudada, a caracterização cariotípica de diferentes acessos pode ser de grande importância, uma vez que indivíduos com diferentes níveis de ploidia foram identificados (VALE, 2010; PIERRE et al., 2011).

1.6- *Lippia alba* e a família Verbenaceae

A família Verbenaceae é considerada um dos cinco principais grupos dentre as dicotiledôneas (GIULIETTI, 1987). Os representantes de Verbenaceae podem ser

encontrados nos mais diversos ambientes, inclusive em habitats de campos rupestres. Dentre os gêneros de Verbenaceae, *Lippia* destaca-se por possuir, cerca de 100 espécies, distribuídas em regiões neotropicais em países como o Brasil, México, Paraguai, e Argentina, além de espécies endêmicas na África (SALIMENA, 2000; O'LEARY, et. 2012). O porte das espécies varia desde ervas, arbustos até a formação de arvoretas (MOLDENKE, 1973). Entretanto, devido à presença de divergências na classificação do gênero, alguns autores sugerem revisões taxonômicas para o grupo (SALIMENA, 2000; SCHOCKEN, 2007).

Dentre as espécies do gênero *Lippia*, *L. alba* (Mill) N.E.Br em particular, destaca-se por apresentar diversas atividades fitoterápicas, sendo conhecida popularmente como erva cidreira. A espécie é utilizada na medicina popular com ações sedativa, antiespasmódica e estomáquica (GOMES et al 1993) além de ser administrada em tratamentos de gripes, bronquites, infecções cutâneas, diarreia, desintéria, afecções hepáticas e desordens menstruais (MORTON, 1981; GIRÓN e CÁCERES, 1994; DI STASI, et al., 1994; TAVARES, 2005) dentre outras. Esta espécie caracteriza-se por apresentar uma grande variação química, que pode variar qualitativamente e quantitativamente dependendo de fatores como época do ano, época de floração, idade da planta, quantidade de água entre outros (YAMAMOTO, 2006).

Além disso, uma característica particular e já relatada em estudos anteriores é a ocorrência de plasticidade morfológica e genômica em *L. alba* (VALE, 2010; PIERRE et al., 2011). No entanto, questões sobre a natureza e extensão de tais variações ainda necessitam ser elucidadas.

1.7- Distribuição e morfologia de *Lippia alba*

A delimitação de *L. alba* é bastante dificultada devido sua ampla variação morfológica, química e genômica (SALIMENA, 2000; SCHOCKEN, 2007; SOUSA, et al, 2009; VALE 2010; PIERRE, 2011). Desta forma, a utilização de diferentes abordagens para melhorar sua classificação é de fundamental importância para que a grande variabilidade encontrada dentro da espécie seja bem entendida.

Os locais de prevalência de *L. alba* variam, com distribuição em regiões de climas tropicais até regiões de clima temperado. A espécie é comumente encontrada em margens de rios, açudes, lagos e lagoas onde os solos são arenosos (CORREA, MING e SCHEFFER, 1994; STEFANINI, RODRIGUES E MING, 2001). Em relação ao porte, *L. alba* apresenta cerca de dois metros de altura e hábito arbustivo. Possui muitas ramificações laterais e ciclo de vida perene, com um rápido crescimento (PIERRE, 2008). Os indivíduos de *L. alba* possuem flores alógamas, sendo os insetos seus principais polinizadores (SANDERS, 2001). Além disso, florescem o ano todo. Sua filotaxia é oposta dística com folhas simples de limbo inteiro com a disposição de um par por nó. As folhas são classificadas como serrilhadas e oblongas agudas segundo Schocken (2007). As flores se encontram em inflorescências que podem ser de coloração violácea rosa ou branca (SALIMENA, 2002).

Esta espécie pode ser subdividida em 4 variedades de acordo com seus padrões morfológicos, como altura da planta, forma da base foliar, densidade de tricomas e cor da corola. As variedades descritas são: *L. alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britton e P. Wilson *var. alba*, *L. alba var. carterae* Moldenke, *L. alba var. globiflora* (L'Hér.) Moldenke e *L. alba var. lanceolata* (Griseb.) Múlgura. No entanto, tais critérios de divisão, muitas das vezes, são incoerentes, causando identificações incorretas e incertezas ao classificar os indivíduos, já que alguns caracteres se sobrepõem e acabam por prejudicar a distinção das variedades (VALE, 2010). Adicionalmente, levando-se em consideração que o fenótipo é resultante das interações do genótipo com o ambiente, dependendo das condições ambientais submetidas, os indivíduos podem apresentar sua morfologia alterada, fato que compromete ainda mais uma classificação baseada somente em características estruturais visíveis.



Figura1: Detalhe da inflorescência de *L. alba*.

1.8 Importância econômica e variação química em *Lippia alba*

As plantas medicinais têm sido um importante recurso terapêutico desde os primórdios da antiguidade até nossos dias. No passado, representavam a principal fonte terapêutica conhecida. A partir de plantas descritas e usadas pelo conhecimento popular, foram descobertos diversos medicamentos usados até hoje pela medicina (GURIB-FAKIM, 2006).

Os representantes de Verbenaceae são caracterizados por constituírem uma importante flora dotada de óleos essenciais, possuindo vários quimiotipos (CRAVEIRO, et al., 1981). A presença de metabólitos secundários derivados de rotas biossintéticas, constitui um importante marcador químico, que facilita o reconhecimento da espécie. Tais compostos possuem a função de proteger as plantas contra predadores e em condições adversas sua síntese pode ser estimulada. A produção desses metabólitos está intimamente associada ao ambiente, às diferentes etapas de crescimento e desenvolvimento vegetal, às condições de estresses nutricional e/ou hídrico e às interações entre plantas e planta-animal (SANTOS, 2000).

L. alba, em especial, apresenta diversas atividades farmacológicas e é bastante utilizada na medicina popular, sendo cobijada por empresas de perfumaria, indústrias farmacêuticas e de defensivos agrícolas, pelo fato de apresentar atividades antifúngica e inseticida (SANTOS-MENDES, 2001). Conhecida regionalmente por erva-cidreira, falsa-melissa, chá-de-tabuleiro, erva-cidreira-do-campo, salva-do-brasil, salva-limão e erva-cidreira-brava, *L. alba* destaca-se dentro do gênero por apresentar inúmeras propriedades medicinais. A forma de utilização pode ser por meio de infusões, tinturas, banhos, cataplasma e inalação (PIERRE, 2004).

Devido a grande variação de compostos químicos em órgãos vegetativos em *L. alba*, existe um grande interesse em se estudar a espécie fitoquimicamente, bem como suas ações terapêuticas (RICCIARDI, RICCIARDI e BANDONI, 2000). Os constituintes químicos mais comumente encontrados em *L. alba* são: linalol, citral (netral e geraniol), limoneno, carvona, cariofileno, β -mirceno, canfora, 1-8cineol, germacreno e α -fencheno (SCHOCKEN, 2007). No entanto, a espécie é comumente usada por pessoas que desconhecem sua procedência podendo comprometer a saúde do usuário, uma vez que a composição do vegetal influencia diretamente na sua ação.

1.9- Estudos cromossômicos em *L. alba*

O número básico da família Verbenaceae permanece indefinido. Segundo Sanders (2001), os diferentes números cromossômicos observados na família devem-se à aneuploidias ascendentes e descendentes que ocorreram naturalmente entre as espécies, sugerindo como número básico $x=5$. Para o gênero *Lippia*, o número básico ainda é desconhecido uma vez que poucas espécies foram estudadas até o momento. Contudo, informações citogenéticas de 28 espécies de *Lippia* mostraram que o número cromossômico do gênero varia de $2n=20$ para *L. rubella* a $2n= 56$ cromossomos para *L. rotundifolia* e *L. lacunosa*. Esta ampla variação numérica, sugere que eventos de poliploidia podem ter ocorrido durante a

evolução de *Lippia* (VICCINI et al., 2006; CAMPOS, et al., 2011, SOUSA, TORRES e VICCINI, 2012).

Em relação aos aspectos citogenéticos de *L. alba* em especial, o número cromossômico previamente relatado é de $2n=30$ (BOSE e CHOUDHY, 1960). Entretanto, Pierre (2004) ao estudar 3 diferentes acessos da espécie em questão, observou dois números cariotípicos distintos além do número já relatado na literatura, sendo um acesso com $2n=60$, e um citótipo mixoploide com variação de 12 a 60 cromossomos. Adicionalmente, a autora observou que além da variação genômica também havia diferenças na composição dos óleos essenciais dos diferentes quimiotipos (linalol, citral e carvona). Tais observações sugeriram que esta variação nos constituintes químicos tivesse uma relação direta com os respectivos números cromossômicos de cada citótipo. Entretanto, apesar de não ter havido um controle das condições ambientais onde os acessos foram mantidos, Sousa et al. (2009) ao estudar cinco acessos de *L. alba* constataram diferentes constituintes químicos em acessos que possuíam o mesmo número cromossômico ($2n=30$)

Com o intuito de incrementar o conhecimento cariotípico da espécie, Sousa et al. (2009) realizaram técnicas de bandeamento C e DAPI/CMA, evidenciando um padrão de heterocromatina centromérica e DAPI positiva. A técnica de hibridização *in situ* (FISH) também foi realizada por Brandão et al. (2007), revelando 6 marcas para sondas ribossomais 45S e mostrando que *L. alba* apresenta 6 regiões organizadoras de nucléolos (RONs) e 2 sítios de DNAr 5S. Em contrapartida, Sousa et al. (2009) ao aplicar a técnica de bandeamento Ag-NOR, observou apenas quatro marcas em metáfases de todos acessos estudados e um número máximo de 4 nucléolos interfásicos, sugerindo com isso que um dos pares de RONs nesta espécie seja inativo.

Vale (2010) investigando 32 acessos de *L. alba*, constatou uma grande diversidade fenotípica entre acessos mantidos sob as mesmas condições de ambiente, que poderia estar associada a ampla variação observada no tamanho do genoma. A mesma autora observou acessos que possuíam até três vezes mais DNA que o genoma considerado diploide. Embora a autora tenha indicado possíveis variações no número cromossômico, sobretudo relacionadas às variações encontradas no tamanho do genoma, investigações citogenéticas mais detalhadas desta variação não foram realizadas e são de fundamental importância para compreender a evolução cromossômica em *Lippia alba*.

2 OBJETIVOS

2.1 - GERAL

O presente trabalho objetiva estudar citogeneticamente diferentes citótipos de *Lippia alba* a fim de contribuir para o esclarecimento da evolução cariotípica da espécie.

2.2 - ESPECÍFICOS

- Caracterizar citótipos de *Lippia alba* portadores de diferentes números cromossômicos por meio da morfologia cromossômica, bandeamento DAPI/CMA₃ e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) das regiões de DNA ribossomal 5S e 45S;
- Avaliar o comportamento meiótico de cada citótipo, qualificando e quantificando possíveis irregularidades encontradas em cada acesso;
- Estudar a viabilidade polínica dos acessos e relacioná-la ao número cromossômico observado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material Biológico

Para a escolha dos espécimes de *L. alba* a serem investigados, foi realizado um *screening* dentre diferentes acessos oriundos de diversas partes do Brasil, a fim de se identificar indivíduos com diferentes números cromossômicos. A partir de informações prévias sobre a quantidade de DNA obtidas via citometria de fluxo (VALE 2010) e da definição do número cromossômico dos indivíduos, seis acessos representativos da variação numérica observada foram aleatoriamente escolhidos. Dos indivíduos investigados, foram utilizados dois acessos com média de 2,55 pg de DNA (BGEN-95 e BGEN-96, número de tombo 62382 CESJ, coletados em Santana de São Francisco-SE); um acesso com 3,46 pg de DNA (BGEN-16, número de tombo 48395 CESJ, coletado em DF); um acesso com 3,85 pg de DNA (BGEN-28, número de tombo 48465 CESJ, coletado em Piracicaba, SP); um acesso com 4,84 pg de DNA (BGEN-64, coletado em Posse, GO) e um acesso com 6,90 pg de DNA (BGEN- 42, coletado em Brasília). Para àqueles indivíduos que ainda não possuem registro aguarda-se o período fértil para a realização do processo de tombamento de exsicatas no herbário CESJ da UFJF.

Todos os acessos de *L. alba* foram mantidos em casa de vegetação na Estação Experimental de Plantas/ICB/UFJF à 28°C, fotoperíodo natural e 15min de irrigação diária por aspersão. Os acessos foram mantidos em vasos plásticos de 10L contendo mistura solo:Plantmax®:areia na proporção 2:1:1.

3.2 Análises Citogenética

3.2.1 Mitose

Meristemas radiculares para o preparo das lâminas foi obtido a partir de estacas mantidas em sistema de hidroponia. Cerca de três estacas dos acessos BGEN-16, BGEN-28, BGEN-42, BGEN-64, BGEN-95 e BGEN-96 foram coletadas na casa de vegetação no período matinal, devidamente identificadas e depositadas em recipientes contendo água purificada sob o abrigo de luz. Aproximadamente uma semana depois, raízes contendo cerca de um centímetro foram pré-tratadas com 8-hidroxiqiloneína (HQ) 3 mM. O tempo de bloqueio variou entre os diferentes acessos, mas a maioria deles necessitou, aproximadamente, de 9 horas de tratamento à 4°C para que os cromossomos se encontrassem com morfologia adequada para as análises. Decorrido o período de bloqueio, as raízes foram lavadas em água purificada, devidamente fixadas em etanol e ácido acético (3:1) e então armazenadas à -20°C por no mínimo 24 horas.

Para a remoção da parede celular, os meristemas radiculares foram tratados com solução enzimática Pectinase e Celulase (Onozuka®) nas concentrações de 20% e 2%, respectivamente, por cerca de 5 horas a 37°C. As lâminas foram confeccionadas a partir da técnica de dissociação celular com secagem ao ar (CARVALHO e SARAIVA, 1993, 1997).

3.2.2 - Morfometria cromossômica

Idiogramas e kariogramas de *L. alba* (BGEN-16, BGEN-28, BGEN-42, BGEN-64, BGEN-95) foram confeccionados baseando-se na média de cinco metáfases segundo o critério de disposição dos cromossomos em ordem decrescente do braço curto. Os cromossomos foram medidos com o auxílio do software Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics) após digitalização das imagens obtidas via câmera Olympus DP72 em microscópio Olympus BX51. Foram calculados os comprimentos do braço curto (bc); do braço longo (bl); comprimento total (ct); a razão entre os braços ($r = bl/bc$) e o índice centromérico (ic). Os homólogos foram classificados em

metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e telocêntricos (t) (LEVAN, FREDGA e SANDERBERG, 1964).

Adicionalmente, foram calculados a assimetria de cada cromossomo (A_i) e o grau de assimetria do cariótipo (A), de acordo com a expressão proposta por Watanabe et al. (1999) em que A varia de 0 (completamente simétrico) a 1 (completamente assimétrico).

$$A_i = (bl - bc) / (bc + bl) \quad \text{e} \quad A = (1 / n) \sum A_i$$

Para verificar as relações entre assimetria cariotípica e número cromossômico assim como entre assimetria cariotípica e heterogeneidade cromossômica, foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson (r) de acordo com a expressão.

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \times \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

3.2.3 - Bandeamento cromossômico DAPI/CMA₃

Para a realização dos bandeamentos cromossômicos foram selecionadas lâminas contendo metáfases bloqueadas de todos os acessos com no mínimo 3 dias de envelhecimento. A metodologia empregada baseou-se naquela descrita por Schweizer (1976) com pequenas alterações. Aproximadamente 30 μ L de CMA₃ (cromomicina A₃) 0,5mg/mL foram adicionados nas regiões de interesse da lâmina, que foram cobertas com lamínula plástica e mantidas por uma hora em câmara escura. Após a remoção do excesso de corante com água destilada, 30 μ L de distamicina foram adicionados e a lâmina incubada no escuro por 30 minutos. Posteriormente, o excesso de distamicina foi retirado com água destilada, adicionando-se em seguida 30 μ L de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) 2 μ g/mL. Após trinta minutos de reação, a lâmina foi lavada em água destilada e montada em meio antifade (glicerol/DABCO) pH 8,0.

As lâminas foram armazenadas na ausência de luz à 4°C por cerca de dez dias. Por fim, seguiu-se a análise em microscópio de epifluorescência Olympus BX51 com os filtros UMWU2 (480 nm) para o DAPI e UMWB2 (360 nm) para o CMA. No mínimo 30 metáfases de cada indivíduo foram avaliadas, e figuras informativas foram fotografadas com o sistema de captura de imagem acoplado ao microscópio com o software CellSens (Olympus™).

3.2.4 - Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

Para a realização da FISH, a região de DNAr 5S foi amplificada com *primers* específicos usando DNA genômico de *Zea mays* como molde sendo os produtos do PCR ligados ao vetor pGEM-T. A sequência de DNAr 45S foi obtida de espaçadores 18S, 5.8S e 25S de *Triticum aestivum* (GERLACH e BEDBROOK, 1979). Bactérias *E. coli* competentes Onminimax™ foram transformadas por eletroporação, no aparelho Elektroporator 4307/2510 Mit Netzteil (Eppendorf™). Para isso, 1 µL da solução contendo os plasmídeos vetores foi homogeneizada em uma alíquota com 40µL de *E. coli* competentes na cubeta de eletroporação. O mix foi submetido a um pulso de 1900 voltz para permitir a passagem do DNA através da membrana celular. As bactérias transformadas foram multiplicadas em meio de cultura LB contendo ampicilina 100mg/L *overnight* a 37°C e 180 rpm. As regiões de DNA ribossomal foram extraídas com o kit GE Heathtare Illustra™ PlasmidPrep MiniSpin e então marcadas com digoxigenina por meio da reação de nick translation com o kit DigNick (Roche®).

O processo de hibridização foi adaptado de Jiang et al. (1995). As lâminas foram hidrolisadas em HCl 1M por dez minutos, desnaturadas por 1 minuto a 85°C e então submetidas a desidratação em uma série alcóolica crescente. A mistura de hibridização (Tabela 1) contendo formamida deionizada 100%; 20xSSC pH7; sonda; dextran sulfato 50% e água foi desnaturada por dez minutos a 90°C e adicionada nas lâminas nas regiões de interesse.

A hibridização foi realizada durante 48h a 37°C em câmara úmida. Os banhos pós-hibridização foram realizados em 2xSSC e 1xPBS. Para a detecção, anti-DIG

conjugada com Rhodamina (Sigma[®]) foi adicionada às lâminas junto com o reagente de bloqueio 5xTNB buffer e água. Após a detecção, as lâminas foram lavadas em 1xTNT e 1xPBS e montadas em 20 µL de Vectashield contendo DAPI[®]. As lâminas com os sinais DNAr 5S detectados foram re-hibridizadas com as sondas 45S e para a distinção dos sinais, as marcas 5S foram pseudocoloridas de verde com auxílio do software CellSens[®] (Olympus).

A visualização dos sinais foi realizada em microscopia de fluorescência Olympus BX51. No mínimo 30 metáfases de cada indivíduo foram avaliadas para cada sonda, e as imagens foram fotografadas com câmera Olympus DP72 acoplada ao microscópio.

Tabela 1: Mistura de hibridização.

Reagente	Quantidade
Formamida deionizada 100%	10 µL
Dextran sulfato 50%	4 µL
20 x SSC	2 µL
Sonda	1 µL
Água MILIQ	2 µL

3.2.5 Meiose

Para a análise meiótica, botões florais de variados tamanhos foram coletados no período da manhã na EEP da UFJF, fixados imediatamente em solução fixadora Carnoy (etanol e ácido acético 3:1) e armazenados a -20°C por pelo menos 24 horas. As preparações citogenéticas foram realizadas segundo Viccini et al (2006) com algumas adaptações. Após o procedimento de fixação, os botões umedecidos com ácido acético 45%, foram abertos para a retirada das anteras, com auxílio de microscópio estereoscópico e agulhas. Em seguida, as anteras foram transferidas para um microtubo adaptado com tela de poliéster (60µm de malha), onde foram lavadas com água destilada, e posteriormente, imersas em solução enzimática Ultrazym (Novo Nordisk[®]) durante 6 horas a 30°C em banho-maria visando a

remoção da parede celular. Decorrido o período de digestão, as anteras foram novamente lavadas com água destilada, e o microtubo adaptado imerso em outro volume de solução fixadora. As anteras foram imediatamente maceradas com um estilete adaptado de modo que as células fossem recolhidas na solução fixadora. A suspensão celular resultante foi centrifugada três vezes a uma velocidade de 2500 rpm durante quatro minutos, sendo observado ao final das centrifugações a formação de um *pellet*. Entre cada ciclo de centrifugação, o fixador foi trocado. As suspensões celulares obtidas foram estocadas a -20°C por pelo menos 24 horas até o momento de preparação das lâminas.

As lâminas obtidas foram confeccionadas de acordo com a técnica de secagem ao ar (CAIXETA e CARVALHO, 2003), a partir de gotejamento de 3 a 4 gotas da suspensão celular a uma distância mínima de 30 cm da lâmina. Em seguida, após sua secagem, as lâminas foram mergulhadas em solução de ácido acético 45% por onze segundos para o clareamento do citoplasma e coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato pH 6,8 por cerca de 4 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas duas vezes em recipientes contendo água destilada para a retirada do excesso de corante.

Além da técnica de secagem ao ar, também foi realizada a técnica de esmagamento, pois trata-se de uma metodologia mais rápida para a quantificação de anormalidades meióticas. Neste procedimento, os botões florais fixados foram abertos com auxílio de agulhas para a retirada das anteras e estas foram maceradas com bisturi para a expulsão dos meiócitos. Em seguida, foi adicionada uma gota de carmin acético 45% e o material foi esmagado entre lâmina e lamínula. A lâmina então foi rapidamente flambada e selada com esmalte incolor.

Para a quantificação das fases e irregularidades meióticas, cerca de 100 células nos estágios de metáfase I; anáfase I; metáfase II; anáfase II e telófase II foram analisadas para cada acesso totalizando 4.424 meiócitos analisados.

Figuras representativas de cada irregularidade foram digitalizadas por meio de uma câmera Olympus DP72 de vídeo acoplada ao microscópio, e digitalizadas por meio do software Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics).

3.3 Viabilidade polínica pelo teste de diacetato de fluoresceína - FDA

Para a avaliação de viabilidade polínica pelo teste de FDA (HESLOP-HARRISON e HESLOP HARRISON, 1970), flores frescas coletadas no período matinal foram abertas com agulhas para a retirada das anteras e estas foram dissecadas para a liberação dos pólenes. Em seguida, uma gota de solução de fluoresceína diacetato dissolvida em acetona 2mg/mL combinada com sacarose 10% foi adicionada aos grãos. O material biológico foi comprimido entre lâmina e lamínula e selado com esmalte incolor. Em seguida, cerca de 1000 pólenes foram analisados para cada acesso em microscópio de epifluorescência Olympus BX 51. Pólenes com fluorescências intensas foram considerados viáveis, enquanto os grãos que não fluoresceram foram considerados estéreis.

3.3.1 Relação entre diâmetro e viabilidade polínica

Para relacionar o diâmetro dos pólenes e a viabilidade, foram confeccionadas lâminas contendo pólenes corados com FDA e as medidas do diâmetro foram tomadas da seguinte maneira: 50 pólenes viáveis (FDA⁺) e 50 inviáveis (FDA⁻) foram mensurados em pelo menos cinco campos diferentes. Em cada campo foram mensurados no máximo dez grãos viáveis e dez grãos inviáveis. Cem pólenes tiveram seus diâmetros avaliados para os acessos de *Lippia alba* em estudo. Em seguida, empregou-se o teste *T* de *Student* para a comparação das médias dos diâmetros dos pólenes viáveis e inviáveis ($p < 0,05$). Para os acessos com dados homocedásticos foi usada a seguinte expressão:

$$T = \frac{N_1 - N_2}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

m_1 = média dos pólenes viáveis;
 m_2 = média dos pólenes inviáveis;
 n_1 = número amostral de pólenes viáveis;
 n_2 = número amostral de pólenes inviáveis;
 S = variância.

$$S = \mathbf{J} \frac{(n_1 - 1)S_1 + (n_2 - 1)S_2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Para os acessos com dados heterocedásticos foi usada a expressão:

$$T = \frac{N_1 - N_2}{\mathbf{J} \frac{S_1}{n_1} + \frac{S_2}{n_2}}$$

4 RESULTADOS

4.1- Morfometria cromossômica

A contagem cromossômica realizada para os acessos revelaram cinco diferentes números cromossômicos ($2n=30$, $2n=60$, $2n=38$, $2n=45$ e $2n=90$), sendo os três últimos números observados pela primeira vez para a espécie. As medidas cromossômicas realizadas para os diferentes citótipos mostraram cariótipos simétricos com a maioria dos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. O indivíduo com $2n=30$ cromossomos, apresentou 11 cromossomos metacêntricos e 4 submetacêntricos (cromossomos II, VIII, X, XV) (Tabela 2, Figura 2). Este indivíduo apresentou a maior simetria cariotípica, com $A=0,18$ (Tabela 7).

Tabela 2: Dados morfométricos do citótipo de *L. alba* com $2n=30$ cromossomos

Crom.	bc	bl	Tamanho absoluto	Razão (bl/bc)	ic	Tamanho Relativo	Classificação
I	1,28	1,52	2,80	1,18	45,71	9,33	m
II	0,97	1,74	2,71	1,79	35,79	9,03	sm
III	0,85	1,00	1,85	1,17	45,94	6,16	m
IV	0,85	0,97	1,82	1,14	46,70	6,06	m
V	0,81	1,31	2,12	1,61	38,20	7,06	m
VI	0,81	1,03	1,84	1,27	44,02	6,13	m
VII	0,79	1,21	2,00	1,53	39,40	6,68	m
VIII	0,78	1,82	2,60	2,31	30,13	8,68	sm
IX	0,74	1,03	1,77	1,40	41,64	5,88	m
X	0,73	1,31	2,04	1,79	35,78	6,80	sm
XI	0,73	1,20	1,93	1,64	37,82	6,43	m
XII	0,73	0,97	1,70	1,32	42,94	5,66	m
XIII	0,73	0,81	1,54	1,10	47,40	5,13	m
XIV	0,64	0,88	1,52	1,37	42,10	5,06	m
XV	0,61	1,15	1,76	1,88	34,65	5,86	sm

bc=braço curto; bl=braço longo; ic=índice centromérico.

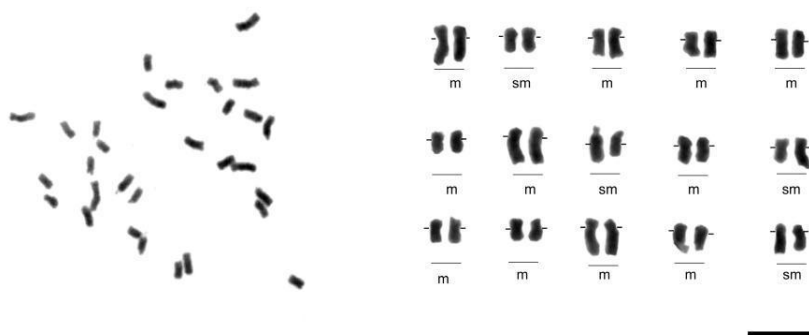


Figura 2: Metáfase e cariograma do citótipo de *L. alba* com $2n=30$ cromossomos. Barra=5 μ m.

O citótipo com $2n=38$, foi o indivíduo que apresentou o cariótipo mais atípico, com trissomias, tetrassomias e pares de homólogos. Os homólogos extras (formando as trissomias e tetrassomias) foram agrupados nos cromossomos III, IV, V, IX, XI e XII, tendo este citótipo a fórmula cariotípica $5m+9sm+1st$ (Tabela 3, Figura 3). Com relação ao grau de assimetria, o citótipo apresentou 0,31 de assimetria cariotípica e 4,67 de heterogeneidade cromossômica (Tabela 7).

As metáfases do acesso com $2n=45$ cromossomos também evidenciaram a maioria dos cromossomos submetacêntricos: $2m+13sm$, sendo este citótipo o mais assimétrico com $A=0,36$ e $Ai=5,43$, semelhante aos índices observados para o hexaploide ($A=0,36$ e $Ai=5,42$), que possui $1m+14sm$ (Tabelas 4 e 6, Figuras 4 e 6). Já o indivíduo com $2n=60$ cromossomos revelou 8 cromossomos metacêntricos e 7 submetacêntricos, com assimetria cariotípica correspondente a $A=0,24$ e a heterogeneidade cromossômica $Ai=3,73$ (Tabelas 5 e 7, Figura 5).

Adicionalmente, foi observada uma correlação positiva entre a assimetria cariotípica e uma possível ordem de surgimento dos citótipos (Figura 7). Neste caso, os indivíduos que apresentaram os cariótipos mais assimétricos teriam surgido posteriormente em relação àqueles com cariótipos mais simétricos. Também foi observada correlação entre a heterogeneidade cromossômica de cada citótipo com sua assimetria cariotípica (Figura 8).

Tabela 3: Dados morfométricos do citótipo de *L. alba* com 2n=38 cromossomos.

Crom.	bc	bl	Tamanho absoluto	Razão (bl/bc)	ic	Tamanho Relativo	Classificação
I	0,85	1,98	2,83	2,32	30,03	10,38	sm
II	0,76	1,91	1,67	1,19	45,50	6,12	m
III	0,70	1,36	2,07	1,92	34,13	7,59	sm
IV	0,68	1,09	1,77	1,59	38,59	6,51	m
V	0,64	1,25	1,89	1,94	33,95	6,94	sm
VI	0,61	1,60	2,22	2,60	27,70	8,14	sm
VII	0,61	0,98	1,59	1,59	38,55	5,85	m
VIII	0,61	0,67	1,28	1,09	47,45	4,69	m
IX	0,60	1,27	1,88	2,11	32,09	6,89	sm
X	0,59	1,24	1,83	2,11	32,15	6,73	sm
XI	0,56	1,11	1,67	1,97	33,59	6,15	sm
XII	0,55	1,25	1,79	2,32	30,08	7,24	sm
XIII	0,54	1,25	1,79	2,32	30,08	4,58	sm
XIV	0,51	0,76	1,27	1,49	40,15	4,66	m
XV	0,36	1,12	1,48	3,12	24,24	5,44	st

bc=braço curto; bl=braço longo; ic=índice centromérico.

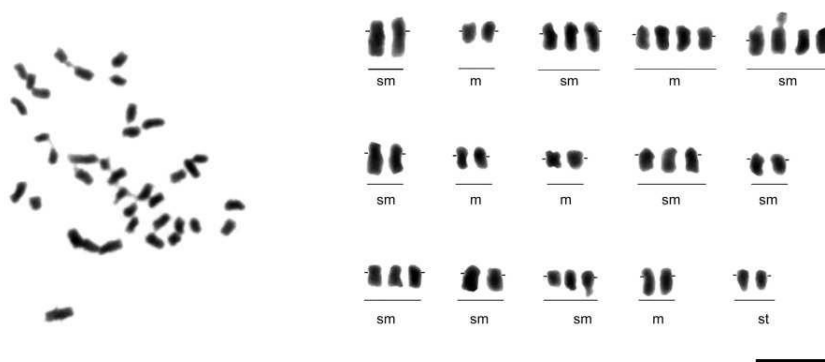


Figura 3: Metáfase e cariógrama do citótipo de *L. alba* com 2n=38 cromossomos. Barra=5µm.

Tabela 4: Dados morfométricos do citótipo de *L. alba* com 2n=45 cromossomos.

Crom.	bc	bl	Tamanho absoluto	Razão (bl/bc)	ic	Tamanho Relativo	Classificação
I	0,73	1,54	2,27	2,10	32,25	8,26	sm
II	0,69	1,17	1,86	1,70	37,03	6,77	sm
III	0,68	1,11	1,79	1,61	38,21	6,53	m
IV	0,67	1,62	2,30	2,39	29,42	8,36	sm
V	0,63	1,76	2,40	2,77	26,49	8,74	sm
VI	0,61	1,43	2,04	2,34	29,85	7,43	sm
VII	0,59	1,22	1,82	2,05	32,78	6,62	sm
VIII	0,58	1,40	1,98	2,38	29,53	7,22	sm
IX	0,58	1,04	1,63	1,78	35,95	5,93	sm
X	0,54	1,21	1,75	2,25	30,74	6,39	sm
XI	0,53	1,12	1,65	2,12	31,99	6,02	sm
XII	0,50	0,73	1,23	1,45	40,81	4,48	m
XIII	0,46	1,11	1,57	2,37	29,59	5,73	sm
XIV	0,44	1,11	1,55	2,50	28,54	5,65	sm
XV	0,40	1,20	1,60	3,00	25,00	5,82	sm

bc=braço curto; bl=braço longo; ic=índice centromérico.

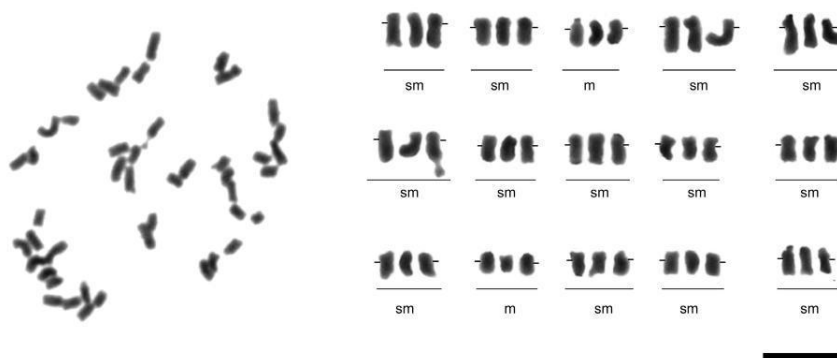


Figura 4: Metáfase e cariograma do citótipo de *L. alba* com 2n=45 cromossomos. Barra=5 μ m.

Tabela 5: Dados morfométricos do citótipo de *L. alba* com 2n=60 cromossomos.

Crom.	bc	bl	Tamanho absoluto	Razão (bl/bc)	ic	Tamanho Relativo	Classificação
I	1,28	1,81	3,09	1,41	41,42	8,98	m
II	1,16	1,55	2,71	1,33	42,80	7,87	m
III	1,12	1,89	3,02	1,68	37,25	8,77	m
IV	1,03	1,61	2,64	1,56	38,94	7,68	m
V	0,94	1,06	2,00	1,12	47,00	5,81	m
VI	0,91	2,07	2,98	2,27	30,53	8,66	sm
VII	0,86	1,31	2,17	1,51	39,77	6,32	m
VIII	0,82	1,46	2,28	1,78	35,96	6,62	sm
IX	0,78	1,13	1,91	1,43	40,99	5,56	m
X	0,75	1,56	2,31	2,07	32,51	6,73	sm
XI	0,70	1,58	2,28	2,25	30,70	6,62	sm
XII	0,68	1,52	2,21	2,22	30,99	6,42	sm
XIII	0,67	1,15	1,83	1,71	36,88	5,31	sm
XIV	0,64	1,12	1,76	1,75	36,36	5,11	sm
XV	0,63	1,91	1,54	1,43	41,10	4,49	m

bc=braço curto; bl=braço longo; ic=índice centromérico.

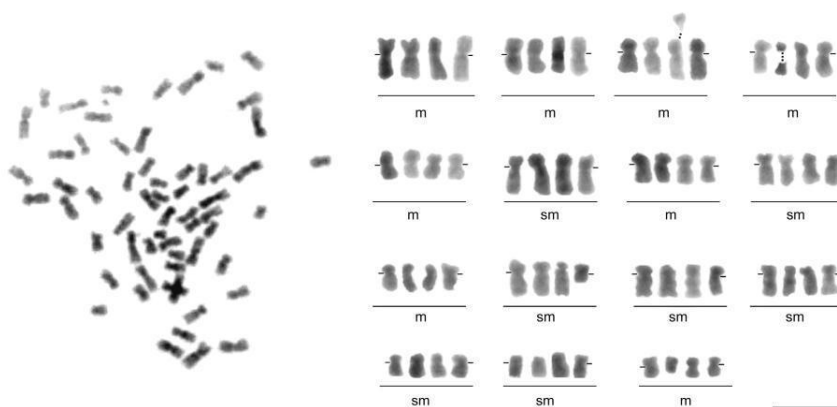


Figura 5: Metáfese e cariótipo do citótipo de *L. alba* com 2n=60 cromossomos. Barra=5µm.

Tabela 6: Dados morfométricos do citótipo de *L. alba* com $2n=90$ cromossomos.

Crom.	bc	bl	Tamanho absoluto	Razão (bl/bc)	ic	Tamanho Relativo	Classificação
I	0,70	1,26	1,96	1,79	35,76	8,73	sm
II	0,64	1,07	1,72	1,66	37,50	7,63	m
III	0,55	1,22	1,78	2,19	31,27	7,92	sm
IV	0,53	1,31	1,85	2,47	28,73	8,21	sm
V	0,51	1,23	1,75	2,38	29,53	7,79	sm
VI	0,51	1,06	1,57	2,07	32,52	6,98	sm
VII	0,51	0,91	1,42	1,78	35,91	6,30	sm
VIII	0,46	0,89	1,36	1,94	33,94	6,03	sm
IX	0,45	0,81	1,26	1,77	36,05	5,62	sm
X	0,42	1,13	1,55	2,69	27,09	6,88	sm
XI	0,40	1,00	1,40	2,50	28,53	6,22	sm
XII	0,40	1,25	1,66	3,09	24,44	7,38	sm
XIII	0,36	0,92	1,28	2,56	28,05	5,69	sm
XIV	0,35	1,00	1,40	2,50	28,53	6,22	sm
XV	0,33	0,72	1,05	2,17	31,53	4,66	sm

bc=braço curto; bl=braço longo; ic=índice centromérico.

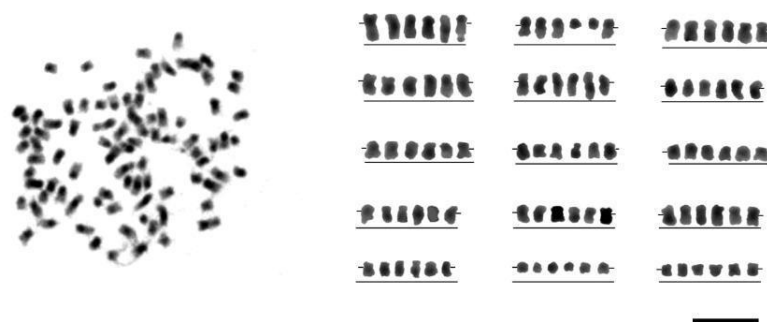


Figura 6: Metáfase e cariograma do citótipo de *L. alba* com $2n=90$ cromossomos. Barra=5 μ m.

Tabela 7: Assimetria cariotípica (A); grau de heterogeneidade cromossômica (A_i) e número cromossômico de cinco citótipos de *L. alba*.

Acessos	A	A_i	Nº crom
BGEN-95	0,18	2,87	2n=30
BGEN-16	0,31	4,67	2n=38
BGEN-28	0,36	4,53	2n=45
BGEN-64	0,24	3,73	2n=60
BGEN-42	0,36	4,52	2n=90

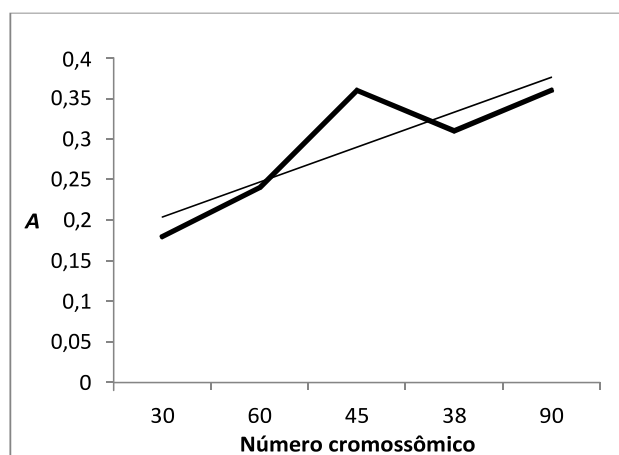


Figura 7: Correlação entre assimetria cariotípica (A) e o número cromossômico de cinco citótipos de *Lippia alba*.

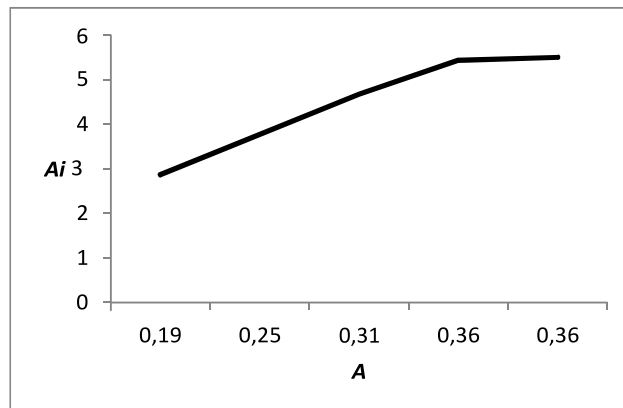


Figura 8: Correlação entre heterogeneidade cromossômica e assimetria cariotípica (A) em cinco citótipos de *Lippia alba*.

4.2- Bandeamento cromossômico DAPI/CMA₃

Em *L. alba*, no citótipo com $2n=30$ foi possível observar 6 marcas CMA positivas, sendo quatro localizadas nos braços longos (bl) e duas presentes no braço curto (bc), todas situadas na porção terminal (Figura 9a₂). Já o citótipo com 38 cromossomos, BGEN-16, foi possível observar 11 regiões CMA⁺, sendo 8 sítios localizados na constrição secundária e 3 subterminais, em braços curtos próximos aos telômeros (Figura 9b₂). No acesso com 45 cromossomos, foi possível notar a presença de 12 bandas CMA⁺, sendo 9 terminais, (6 bl e 3 bc) e 3 cromossomos com sítios subterminais no braço curto (Figura 9c₂). No indivíduo com 60 cromossomos, foram encontrados 12 sítios CMA⁺, sendo que destes, 8 estão localizados nas porções terminais dos cromossomos e 4 localizados na região subterminal, todos em bc (Figura 9d₂). No citótipo com $2n=90$, foi possível observar 10 marcas ricas em CG, todas terminais (Figura 9e₂).

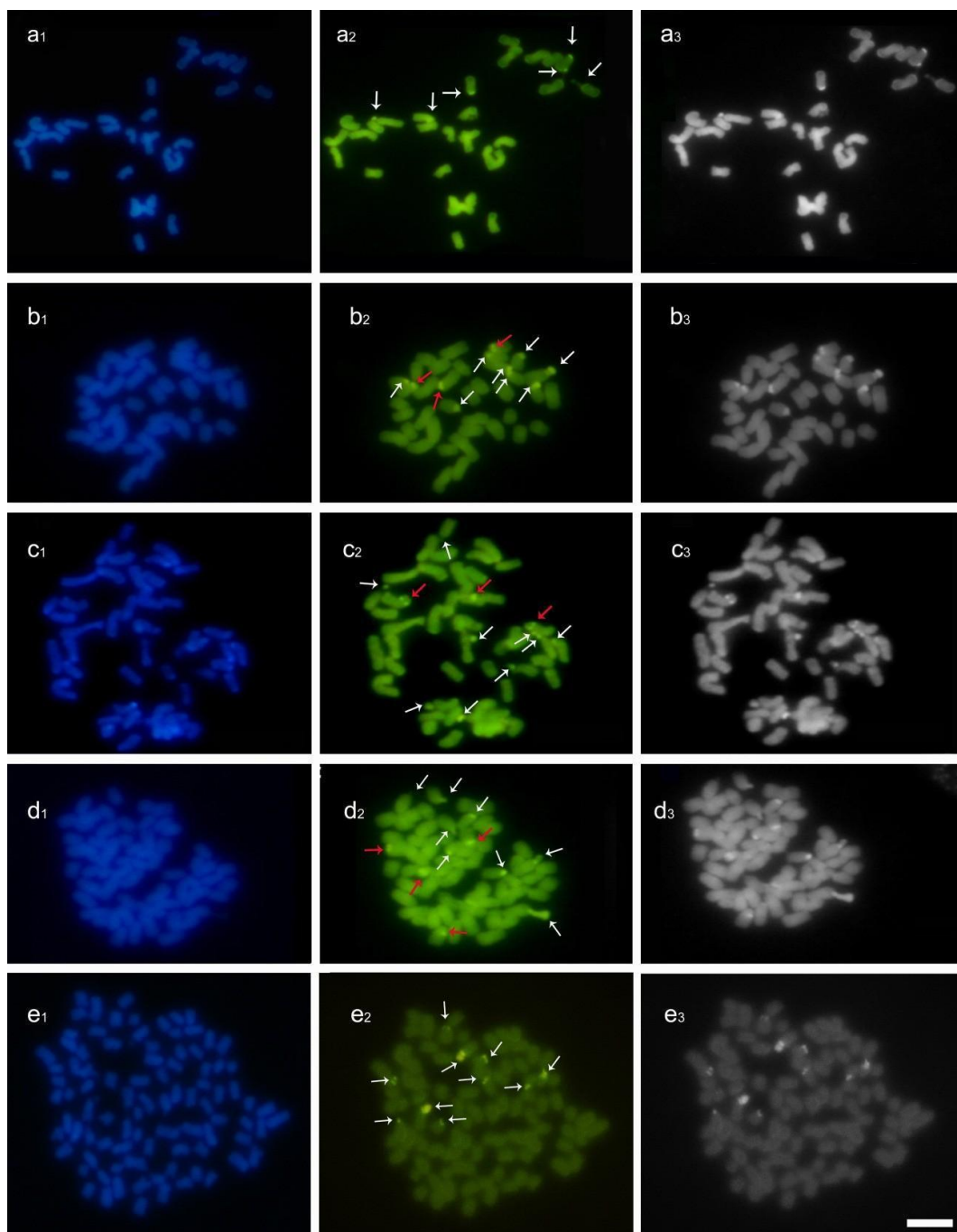


Figura 9: Bandejamento cromossômico DAPI/CMA dos citótipos de *L. alba* com $2n=30$ (a₁, a₂, a₃); 38 (b₁, b₂, b₃); 45 (c₁, c₂, c₃); 60 (d₁, d₂, d₃) e 90 (e₁, e₂, e₃) cromossomos. Setas brancas: sítios terminais, setas vermelhas sítios subterminais. Barra=5 μ m.

4.3- Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

Com relação aos genes ribossomais 5S e 45S, o citótipo com $2n=30$ apresentou 2 sítios subterminais de DNAr 5S localizados no braço curto dos cromossomos e 6 sítios positivos para a região ribossomal 45S, todas localizadas na porção terminal dos cromossomos, sendo dois pares situadas nos braços longos e apenas um par no braço curto (Figuras 10a e 11). Para o indivíduo com $2n=38$ cromossomos, foi possível observar 3 regiões de DNAr 5S subterminais nos braços curtos e 8 sítios de DNAr 45S, nos quais 2 estão presentes em braços longos e 6 em braços curtos (Figuras 10b e 12). Já o citótipo com $2n=45$ apresentou 3 homólogos com as regiões 5S subterminais nos braços curtos, e 9 sítios 45S, sendo 6 situados em braços longos e 3 em braços curtos (Figuras 10c e 13). No acesso com $2n=60$ cromossomos, por sua vez, foram encontrados 4 cromossomos com as regiões dos genes ribossomais 5S e 8 sítios 45S positivos, todos nos braços curtos (Figuras 10d e 14). Por fim, o indivíduo com 90 cromossomos, apresentou 6 marcas de DNAr 5S subterminais todas nos braços curtos dos cromossomos, como o observado nos demais citótipos, e 10 marcas 45S terminais, 4 delas localizadas em braços longos e 6 em braços curtos (Figuras 10e e 15).

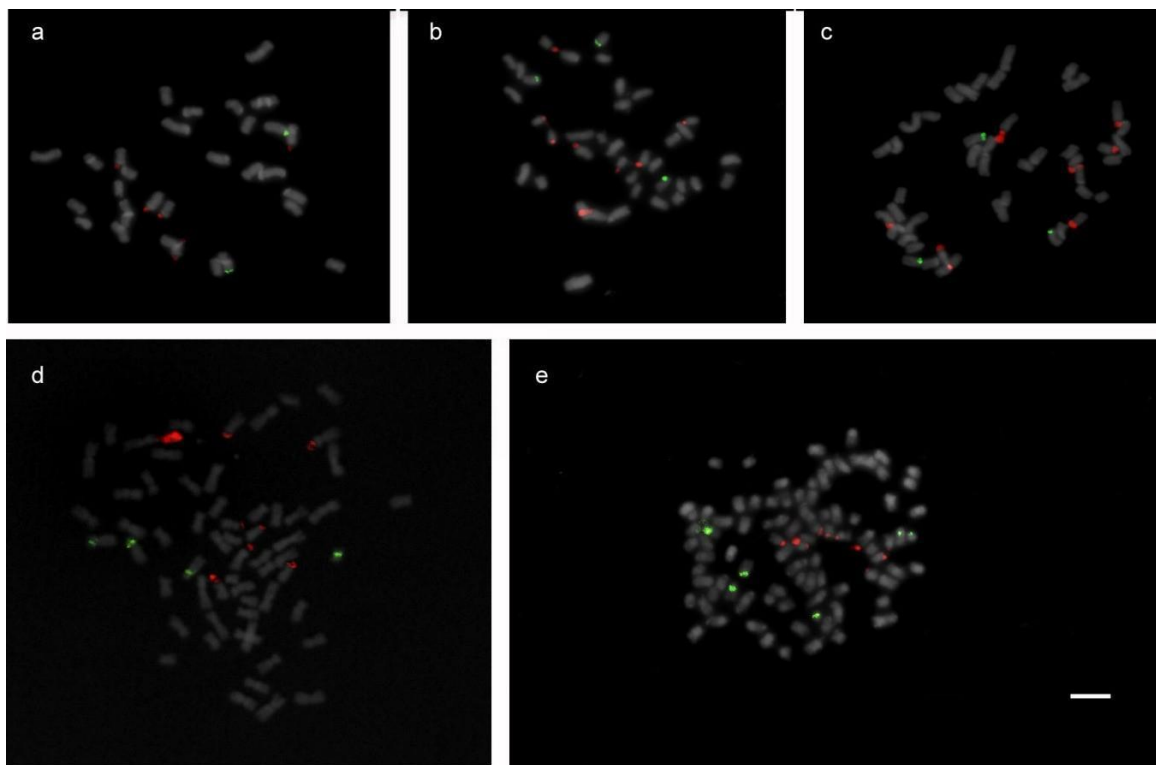


Figura 10: Hibridização fluorescente *in situ* nos citótipos de *L. alba* com 2n=30 (a); 2n=38 (b); 2n=45 (c); 2n=60 (d) e 2n=90 (e). Sinais em verde correspondem à região 5S e sinais em vermelho à região 45S. Barra=5µm.

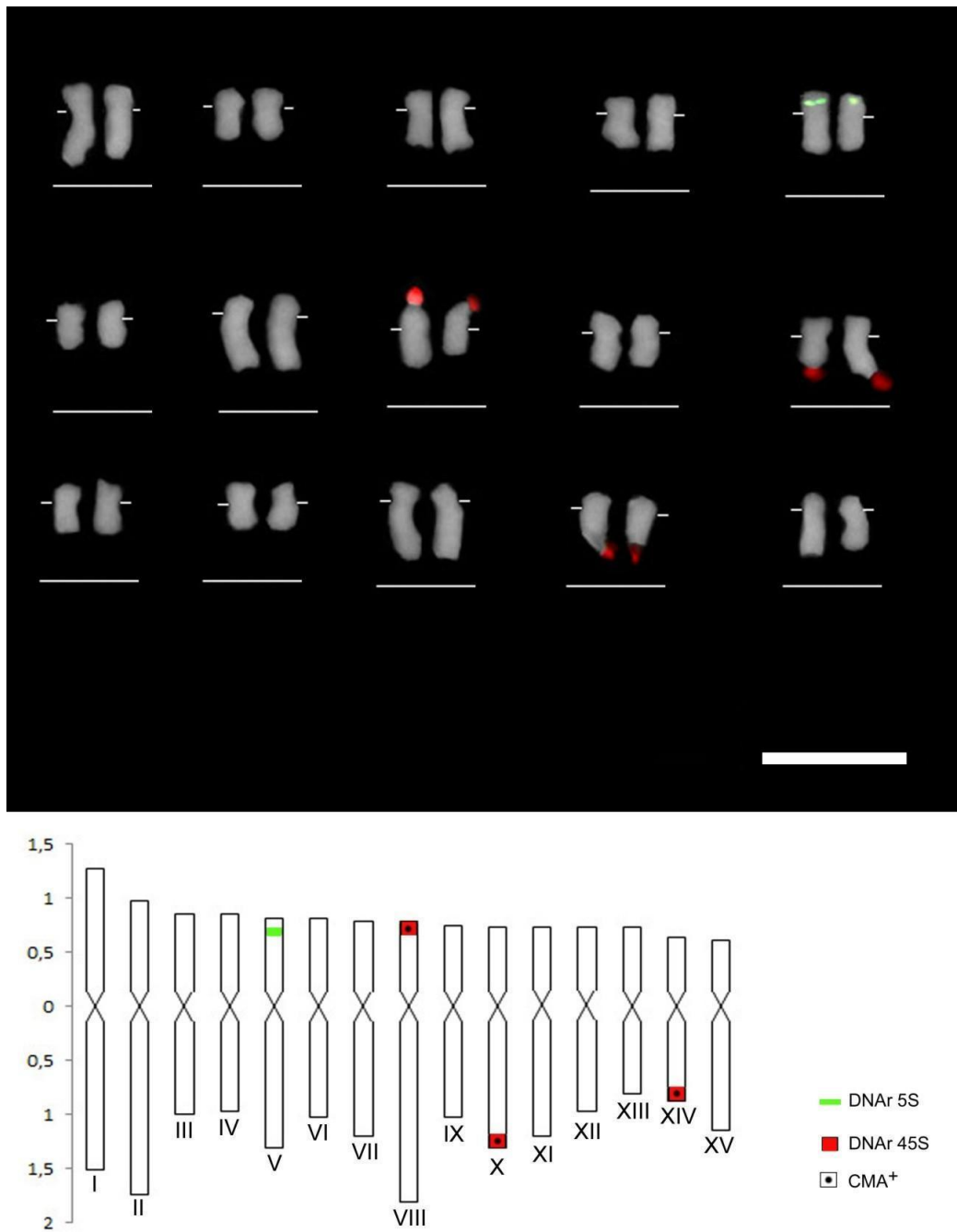


Figura 11: Cariograma e idiograma evidenciando as marcas CMA⁺ e os sítios ribossomais do citótipo de *L. alba* com 2n=30 cromossomos. Barra=5µm.

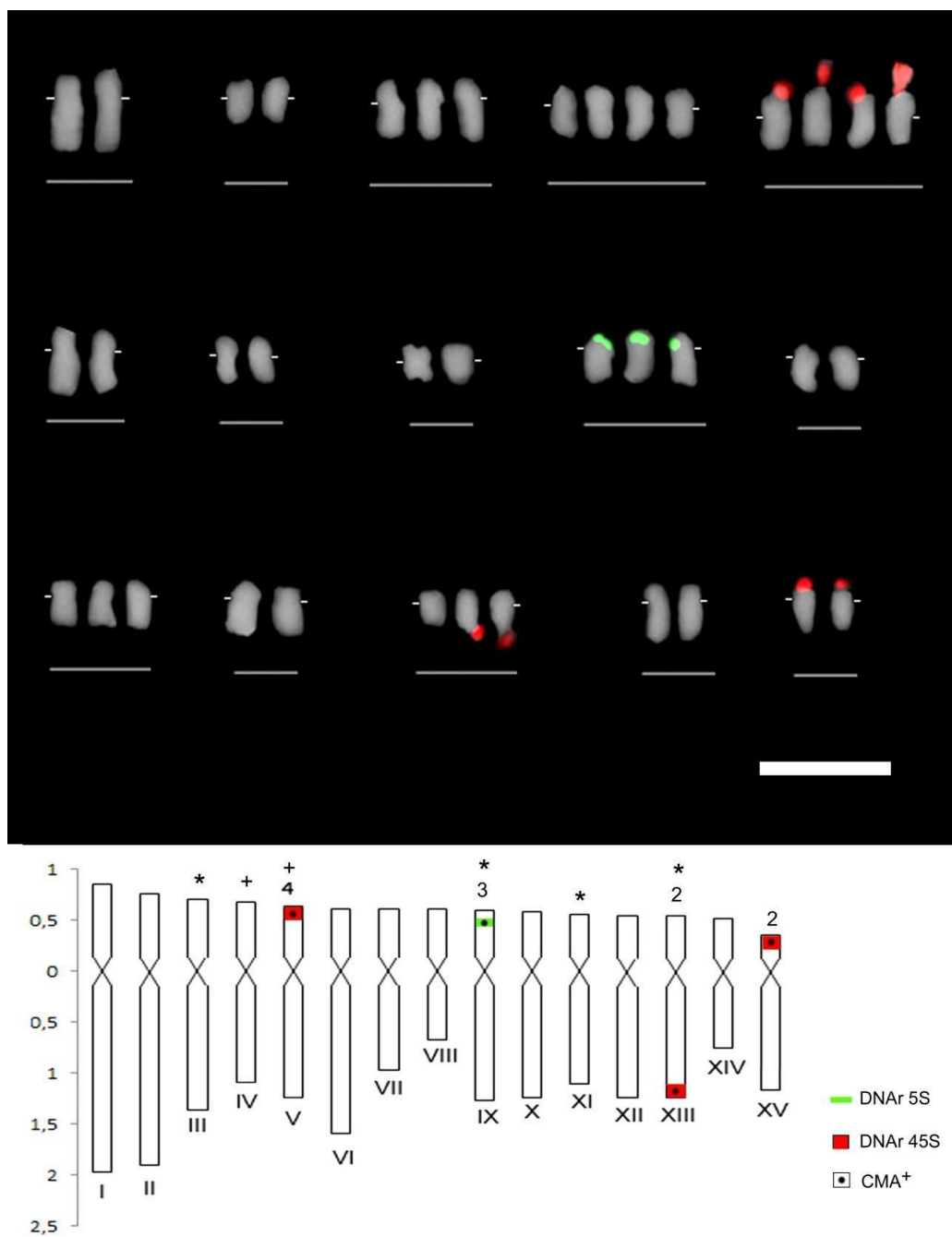


Figura 12: Cariograma e idiograma evidenciando as marcas CMA⁺ e os sítios ribossomais do citótipo de *L. alba* com 2n=38 cromossomos. Os números acima dos cromossomos representam a quantidade de homólogos positivos para CMA e os genes ribossomais. * e + representam grupos com 3 e 4 homólogos, respectivamente. Barra=5µm.

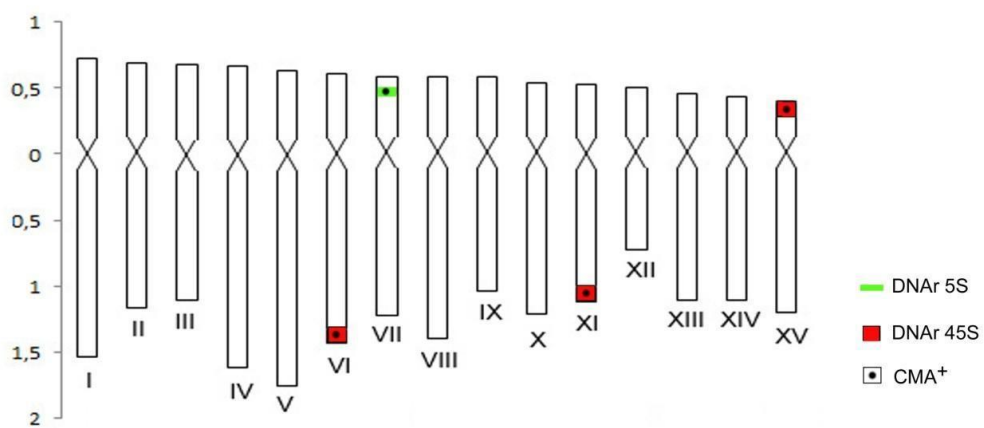
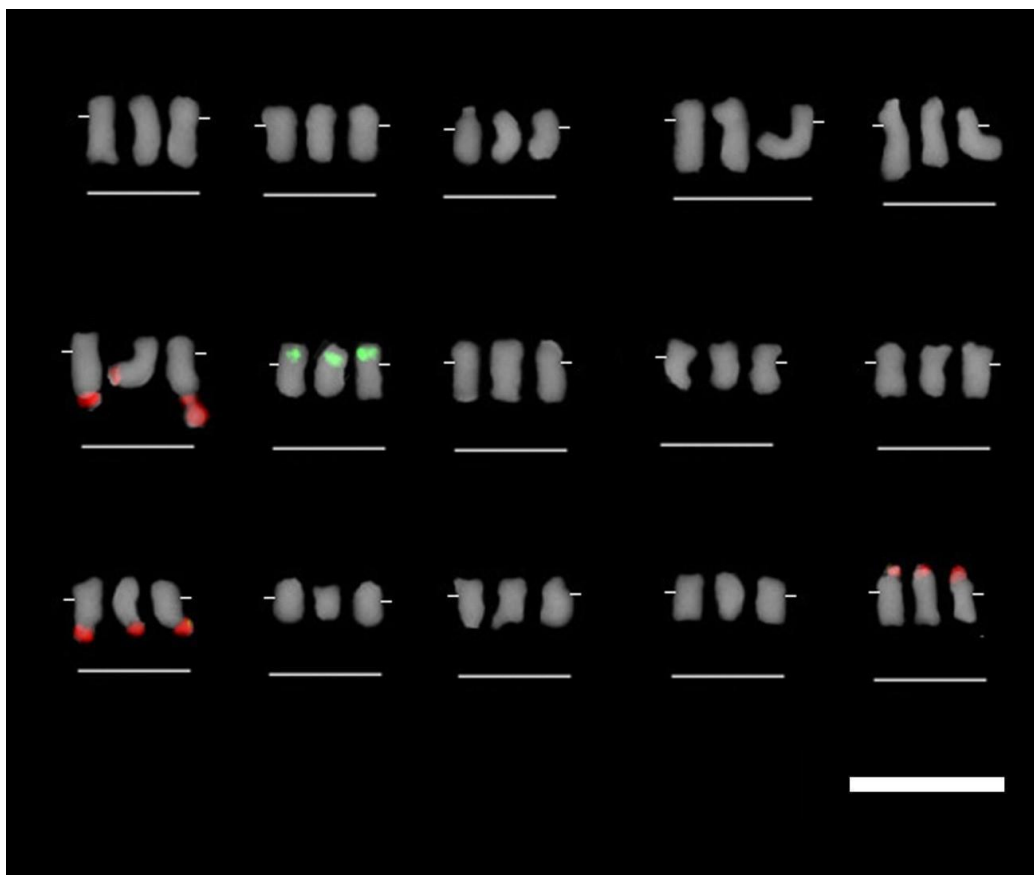


Figura 13: Cariograma e idiograma evidenciando as marcas CMA⁺ e os sítios ribossomais do citótipo de *L. alba* com $2n=45$ cromossomos. Barra=5 μ m.

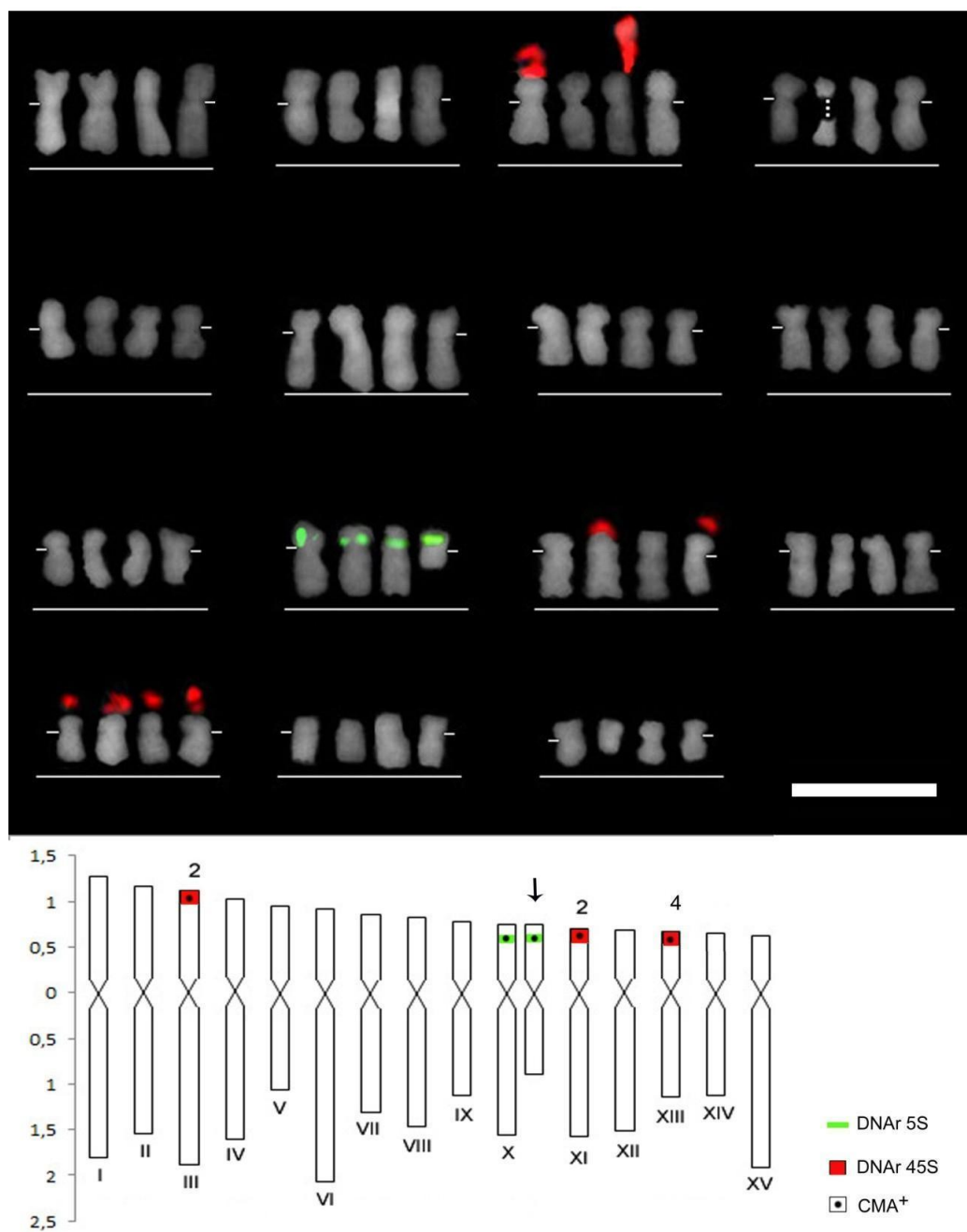


Figura 14: Cariograma e idiograma evidenciando as marcas CMA⁺ e os sítios ribossomais do citótipo de *L. alba* com 60 cromossomos. Os números acima dos cromossomos representam a quantidade de homólogos positivos para o CMA e os genes ribossomais. A seta indica heteromorfismo no cromossomo X. Barra=5µm.

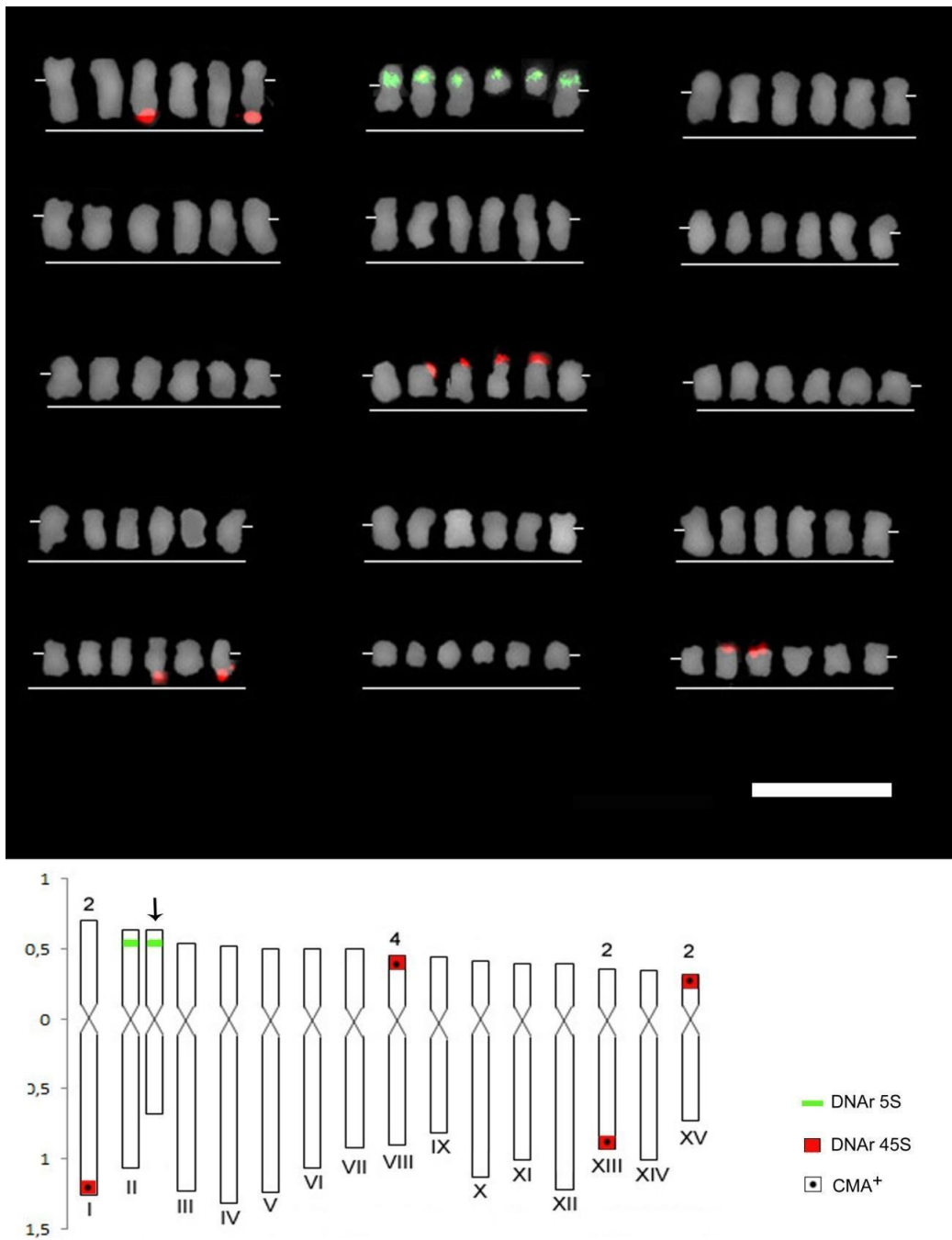


Figura 15: Cariograma e idiograma evidenciando as marcas CMA⁺ e os sítios ribossomais do citótipo de *L. alba* com 90 cromossomos. Os números acima dos cromossomos representam a quantidade de homólogos positivos para o CMA e para os genes ribossomais. A seta indica heteromorfismo para o cromossomo II. Barra=5µm.

Na tabela 8, a seguir estão sumarizadas de forma comparativa as informações cariotípicas obtidas neste trabalho com aqueles relatados na literatura (PIRRE, 2004; BRANDÃO et al., 2007; PIERRE, 2008; SOUSA et al., 2009).

Tabela 8: Informações cariotípicas de cinco citótipos de *L. alba*.

	Acessos de <i>Lippia alba</i>				
	2n=30	2n=38	2n=45	2n=60	2n=90
Fórmula cariotípica	6m+9sm ^(a) 10m+5sm ^(d) 10m+5sm ^(b) 11m+4sm ^(e)	5m+9sm+1st ^(e)	2m+13sm ^(e)	15m+14sm+1ac ^(a)	1m+14sm ^(e)
Sítios CMA ⁺	6 ^(d) 6 ^(e)	11 ^(e)	12 ^(e)	8m+7sm ^(e) 6 ^(c) 12 ^(e)	10 ^(e)
Sítios DAPI ⁺	Centromérica, telomérica ^(d)			Pericentromérica e proximal ^(c)	
Sítios DNAr 45S	6 ^(c) 6 ^(b) 6 ^(e)	8 ^(e)	9 ^(e)	10 ^(c) 8 ^(e)	10 ^(e)
Sítios DNAr 5s	2 ^(b) 2 ^(e)	3 ^(e)	3 ^(e)	4 ^(e)	6 ^(e)
Bandas C	Centromérica ^(d) Centromérica ^(b)				
RON	4 ^(d)			8 ^(c)	

Informações relatadas por ^(a) Pierre 2004; ^(b) Brandão et al., 2007; ^(c) Pierre 2008; ^(d) Sousa, et al., 2009; ^(e) Dados obtidos no presente trabalho. RON: Região organizadora de nucléolos.

4.4 Análise Meiótica

Para a quantificação das irregularidades meióticas, meiócitos nas fases de metáfase I, anáfase I, metáfase II, anáfase II e telófase II foram avaliadas para todos os 6 acessos investigados, somando 4.426 células analisadas. Os indivíduos com 2n=30 cromossomos (BGEN-95 e BGEN-96) apresentaram 95,66% e 63,47% de células normais respectivamente, sendo o último acesso caracterizado por possuir mais irregularidades na fase de telófase II. Neste espécime foi observado grande quantidade de díades e tríades (Tabela 9; Figura 16g).

O indivíduo com 2n=38 cromossomos apresentou cerca de 62% de irregularidades durante a divisão, correspondendo a 426 células anormais de 686 meiócitos analisados, inclusive com a formação de univalentes e trivalentes na

diacinese (Tabela 9; Figura 17b). No indivíduo com 45 cromossomos, 60% das células analisadas apresentaram comportamento aparentemente normal durante a microsporogênese, sendo a fase de telófase II a mais irregular (11% de anormalidade, Tabela 9). Também foram observados erros durante o pareamento de homólogos na prófase I, com presença de univalentes, bivalentes e trivalentes em diacinese (Figura 17c). No citótipo com 60 cromossomos, cerca de 40% dos meiócitos resultariam em gametas anormais, com excesso de cromossomos em alguns gametas e carência em outros. Tais falhas de pareamento também foram ressaltadas no indivíduo com 90 cromossomos, o qual apresentou univalentes, multivalentes, e cadeias cromossômicas durante o estágio de diacinese (Figura 17e). Neste citótipo, aproximadamente 50% dos meiócitos analisados foram considerados anormais (Tabela 9).

Dentre as irregularidades meióticas observadas, destacam-se a presença de cromossomos tardios nas metáfases e atrasados em anáfases, pontes cromossômicas, presença de tríades e políades dentre outras (Figura 16).

Tabela 9: Irregularidades meióticas em seis acessos de *L. alba*.

		Acessos de <i>Lippia alba</i>																	
		BGEN-95 (2n=30)			BGEN-96 (2n=30)			BGEN-16 (2n=38)			BGEN-28 (2n=45)			BGEN-64 (2n=60)			BGEN-42 (2n=90)		
FASES		N	A	T	N	A	T	N	A	T	N	A	T	N	A	T	N	A	T
Metáfase I		166	6	172	92	5	97	32	85	117	205	90	295	54	57	111	79	46	125
Anáfase I		102	1	103	101	2	103	99	84	183	127	124	251	77	52	129	63	28	91
Metáfase II		55	1	56	-	-	-	42	59	101	25	56	81	47	51	98	35	57	92
Anáfase II		230	-	230	124	15	139	52	117	169	92	76	168	114	19	133	45	59	104
Telófase II		153	24	177	100	218	318	35	81	116	263	137	400	85	27	112	84	97	181
Total		706	32	738	417	657	657	260	426	686	712	483	1195	334	221	555	306	287	593
Percentual		95,66	4,34		63,47	36,53		37,9	62,0		59,58	40,42		60,18	39,82		51,6	48,4	

N: normais; A: anormais; T=total

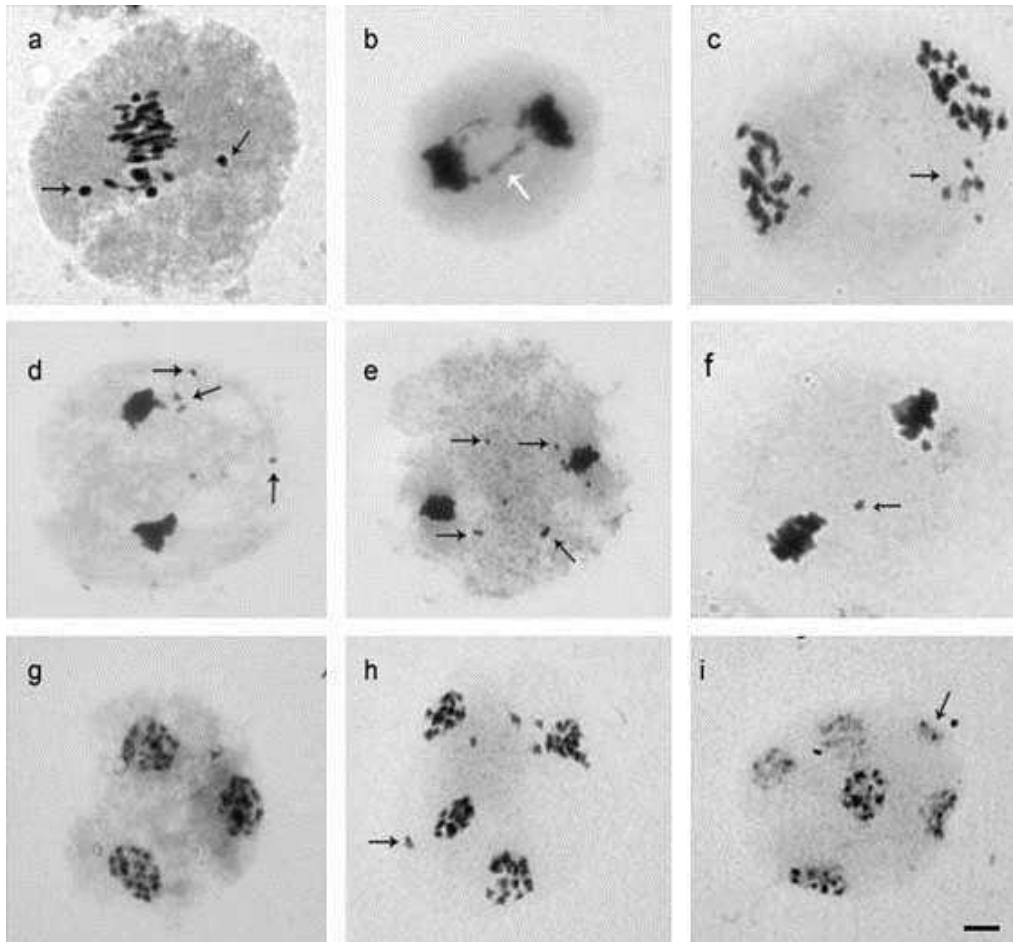


Figura 16: Anormalidades meióticas em cinco citótipos de *L. alba*. a) metáfase I com cromossomos adiantados; b) anáfase I com ponte cromossômica (seta branca); c) e d) anáfase I com cromossomos perdidos; e) e f) metáfase II com perda cromossômica; g) tríade; h) tétrade com perda cromossômica; i) políade. Barra=5 μ m.

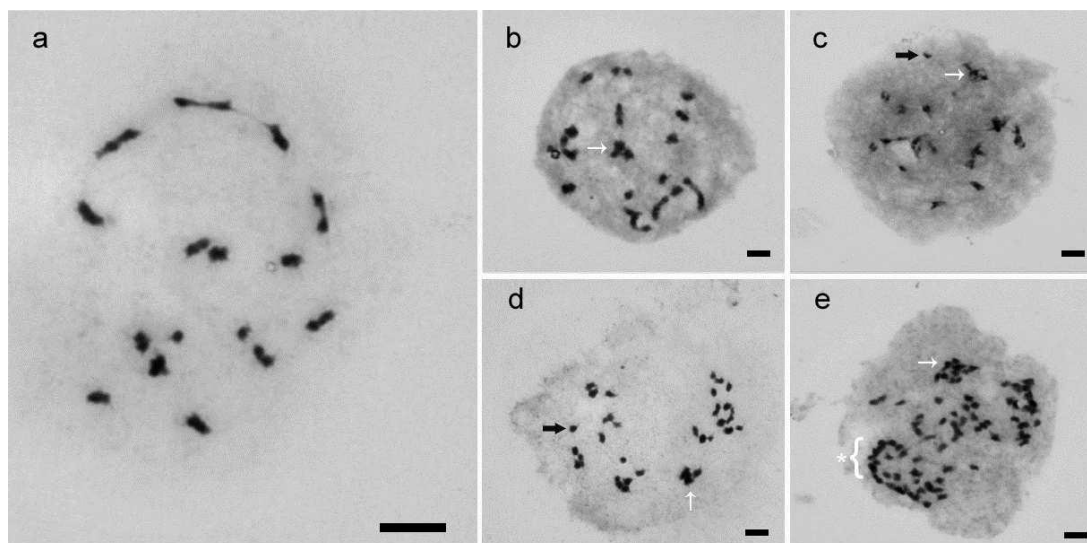


Figura 17: Pareamento de homólogos em diacinese dos citótipos de *L. alba* com: a) $2n=30$; b) $2n=38$; c) $2n=45$; d) $2n=60$ e e) $2n=90$ cromossomos. Setas pretas: univalentes; setas brancas: multivalentes; *: cadeia cromossômica. Barra=5 μ m.

4.5 - Análises de viabilidade polínica e do diâmetro dos grãos de pólen

A partir da coloração com FDA, também chamada de técnica de FCR (Fluoro Chromatic Reaction) foi possível estimar a viabilidade dos pólenes em todos os acessos trabalhados. Nos acessos com $2n=30$ (BGEN-95 e BGEN-96) foi possível notar maior número de grãos viáveis com aproximadamente 70 e 75% de grãos FDA⁺ respectivamente (Tabela 11; Figura 18). O acesso com 38 cromossomos apresentou apenas 34,18% de pólenes viáveis, com a maioria de grãos FDA⁻ (Tabela 11). O acesso com 45 cromossomos apresentou aproximadamente 60% de inviabilidade gamética, enquanto que o acesso com 60 cromossomos apresentou aproximadamente 70% de grãos apropriados à fecundação (Tabela 11). O indivíduo com $2n=90$ apresentou baixa viabilidade polínica e apenas 25% dos grãos de pólen produzidos estariam aptos para a fecundação (Tabela 11).

Adicionalmente, os diâmetros de pólenes viáveis e inviáveis foram mensurados para estimar uma possível correlação com a viabilidade como descrito por Kelly, Rasch e Kalisz (2002). De acordo com o teste de *Student* ($p=0,05$), houve diferença significativa entre as médias dos pólenes viáveis e a média dos pólenes inviáveis

(Figura 19), sendo os grãos aptos à fecundação maiores que os grãos inviáveis cerca de 10 μm em média.

Em adição, foi possível observar que a quantidade de pólenes viáveis (FDA⁺) foi diretamente proporcional ao índice de regularidade meiótica em todos os citótipos analisados exceto para os acessos BGEN-64 e BGEN-96 (Figura 20).

Tabela 10: Viabilidade polínica pelo teste FDA para seis acessos de *Lippia alba*.

	Números cromossômicos (2n)					
	30	30	38	45	60	90
Viáveis	1091	784	351	428	675	239
Inviáveis	487	255	676	611	350	920
Total	1578	1039	1027	1039	1025	1249
Viabilidade (%)	69,14	75,45	34,18	41,20	65,85	26,74
MDPV	31,51	40,05	43,64	46,8	42,10	43,40
MDPI	23,71	30,35	29,18	36,67	31,64	30,21

MDPV = média do diâmetro de pólenes viáveis; MDPI = média do diâmetro de pólenes inviáveis em μm .

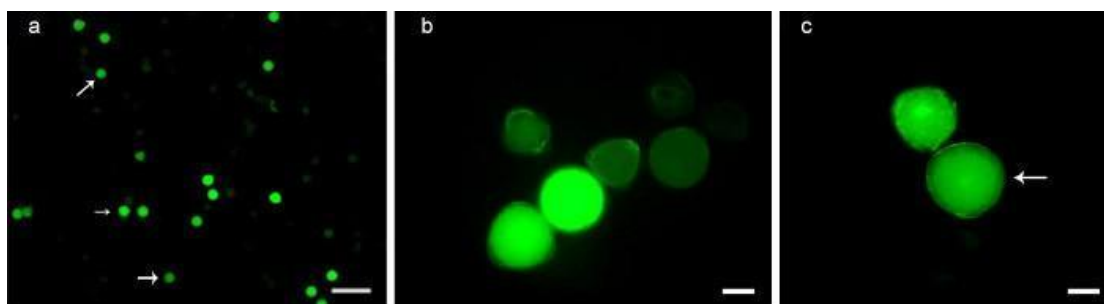


Figura 18: a) Figura ilustrativa do teste de FDA (as setas indicam pólenes viáveis), barra=100 μm ; b) detalhe de grãos de pólenes viáveis (fluorescentes) e inviáveis (não fluorescentes); c) a seta indica pólen gigante. Barra=5 μm .

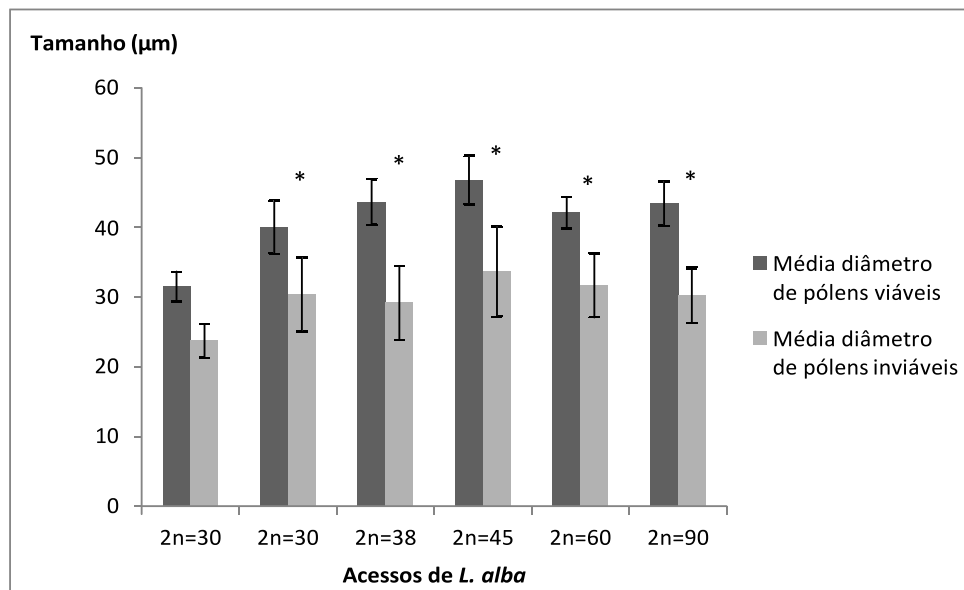


Figura 19: Média do diâmetro dos grãos de pólenes viáveis e inviáveis para seis acessos de *Lippia alba*.

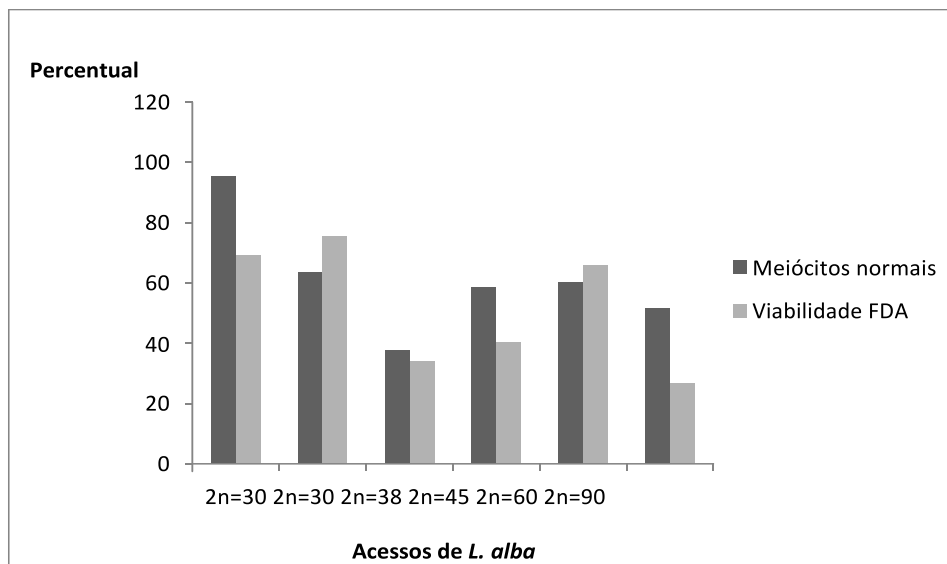


Figura 20: Relação entre a meiose e viabilidade polínica em seis acessos de *Lippia alba*.

5 DISCUSSÃO

Com base nos resultados apresentados, é notável a grande diversidade genômica e cariotípica encontrada em *L. alba*. A presença de citótipos com diferentes números cromossômicos permite levantar a hipótese da formação de um complexo poliploide originado naturalmente, uma vez que, todos os acessos estudados procedem de ambientes naturais, sem manipulação ou interferência antrópica. Embora seja uma espécie medicinal de destaque dentro do gênero *Lippia* e muito estudada do ponto de vista químico, este constitui o primeiro relato detalhado desta variação. É possível que cruzamentos e poliploidizações tenham ocorrido espontaneamente, e que indivíduos com menor número cromossômico ($2n=30$) tenham gerado os demais citótipos. No entanto vale a pena ressaltar que em *L. alba*, o citótipo com 30 cromossomos primeiramente relatado por Bose e Choudhy em 1960 e considerado diploide, provavelmente também foi originado por meio de poliploidia (paleopoliploide), com atual comportamento diploidizado, uma vez que trabalhos realizados com diferentes espécies do gênero sugerem que o número cromossômico básico para *Lippia* seja $X=5$ (SANDER, 2001; VICCINI et al., 2006; CAMPOS et al., 2011; SOUSA et al. 2012). Como não há evidências até o momento do grau de paleopoliploidia dos indivíduos com $2n=30$, a fim de parametrizar a discussão dos dados aqui apresentados este número cromossômico será referenciado como diploide e todos os demais números como derivados desta combinação cromossômica.

Em plantas, a presença de diferentes citótipos pode estar ligada a uma adaptação imposta pelo ambiente onde eles ocorrem. Tais variações intraespecíficas também podem ser encontradas em populações naturais de *Andropogon gerardii*, Poaceae (KEELER e DAVIS, 1999); *Paspalum quadrifarium*, Poaceae (SPERANZA, VAIO e MAZZELLA, 2003); *Senecio carniolicus*, Asteraceae, (SUDA et al., 2007); *Solidago altissima*, Asteraceae (HALVERSON, et al. 2008); *Medicago sativa*, Fabaceae (HAVANANDA, BRUMMER e DOYLE, 2011); *Turnera sidoides*, Turneraceae (KOVALSKY e NEFFA, 2012); *Phragmites australis*, Poaceae (NAKAGAWA, OHKAWA e KANEKO, 2013) dentre outras e podem não constituir um evento totalmente isolado na evolução dos vegetais. No entanto, apesar de existir

um número considerável de complexos poliploides descritos, alopoliploides constituem a maior parte de poliploides formados (PARISOD, HOLDEREGGER e BROCHMANN, 2010), o que faz de *L. alba*, um caso importante a ser estudado. Dentre as possibilidades de se investigar morfotipos, a análise do conjunto cromossômico bem como a viabilidade da meiose, gametas e sementes constituem dados imprescindíveis para a caracterização e compreensão da dinâmica estabelecida entre os diferentes citótipos e sua formação (LEVAN, 2002).

Descrições cariotípicas de complementos cromossômicos fundamentam aspectos para a taxonomia e estudo de evolução cromossômica entre espécies relacionadas (STEBBINS, 1971). No gênero *Boronia*, por exemplo, informações sobre comprimentos cromossômicos; número fundamental (NF); assimetria cariotípica e posições de sítios específicos em metáfases, como constrições secundárias e genes ribossomais 5S e 45S permitiram detectar rearranjos cromossômicos e inferir sobre a evolução do grupo (VAZELA, et al., 2002; SHAN, YAN e PLUMMER, 2003).

Em *L. alba* relatos prévios da morfometria cromossômica já foram realizados para acessos com $2n=30$ e $2n=60$ por Pierre et al. (2011). Os autores descreveram 6 cromossomos metacêntricos e 9 submetacêntricos para o acesso diploide ($2n=30$), e em contrapartida, 15 metacêntricos, 14 submetacêntricos e um par acrocêntrico para o tetraploide. Contudo, em um estudo anterior Sousa et al. (2009) classificaram os 15 pares do citótipo diploide como sendo 10 metacêntricos (1-10) e 5 submetacêntricos (11-15). No presente trabalho, os dados morfométricos diferem das informações anteriores, pois o citótipo com $2n=30$ apresentou 11 pares metacêntricos e 4 submetacêntricos, enquanto que 8 cromossomos metacêntricos e 7 submetacêntricos foram classificados no citótipo tetraploide. Esta contrariedade morfométrica entre os relatos da literatura e os dados atuais reflete a variação cariotípica e genômica na espécie. Além disso, pode ser uma evidência de que rearranjos e alterações estruturais estejam ocorrendo e ocasionando diferenças na classificação morfométrica dos cromossomos. No cariograma do acesso com 30 cromossomos, evidência destes rearranjos pode ser notada, observando-se, por exemplo, o par de homólogos VIII, onde se visualiza uma possível deleção no braço longo de um dos homólogos. Deve-se acrescentar, todavia que devido à similitude

entre os cromossomos, pequenas diferenças nas medidas podem levar a classificações diferentes entre os cariogramas.

Pela primeira vez foi observado o cariótipo de um indivíduo triploide ($2n=45$) e de um indivíduo aneuploide com $2n=38$ cromossomos, que apresentou agrupamentos incomuns devido ao excesso de alguns cromossomos que constituem seu cariótipo. Este padrão pode ser explicado por cruzamentos entre citótipos, em que o indivíduo formado apresenta cópias extras de cromossomos herdados de parentais com ploidias diferentes (KEELER e DAVIS, 1999). Em *Lippia alba* é possível que cruzamentos entre os citótipos diploide e triploide ($n=15 + n=23$) tenham resultado na formação de um citótipo intermediário com aneuploidias envolvendo seis cromossomos (III, IV, V, IX, XI e XIII). Com relação ao indivíduo triploide, a presença de apenas 2 cromossomos metacêntricos e 13 submetacêntricos sugere ocorrências de rearranjos cromossômicos posteriores aos eventos que lhe deram origem, se considerarmos o conjunto haploide original ($2n=2x=30$) aqui estudado como referência, uma vez que o mesmo possui 11 pares de cromossomos metacêntricos e 4 submetacêntricos. Possivelmente, perdas de segmentos cromossômicos e translocações ocorridas ao longo do tempo originaram os 9 cromossomos submetacêntricos encontrados neste indivíduo. Estas possíveis modificações genômicas foram mais evidentes nos citótipos com maiores níveis de ploidias.

As informações obtidas a partir das medidas morfométricas do citótipo tetraploide ($2n=60$) apontam para uma possível deleção do braço longo ou translocação não recíproca em um dos homólogos do cromossomo X, uma vez que este apresenta uma considerável redução em seu comprimento. Considerando os grupos cromossômicos aqui investigados, esta mesma alteração estrutural foi observada no indivíduo com 90 cromossomos. Neste acesso, 2 homólogos apresentaram redução do braço longo no cromossomo II. A técnica de FISH corrobora os dados da morfometria cromossômica uma vez que um dos cromossomos com a marca 5S apresentou-se menor que os demais. No entanto, embora a mesma alteração estrutural esteja presente em ambos os citótipos nos cromossomos portadores do gene ribossomal 5S, é possível que os eventos tenham ocorrido independentemente, já que se trata de citótipos alopátricos (o acesso com $2n=60$ foi coletado em Goiás e o acesso com $2n=90$ coletado em Brasília).

Embora não tenhamos informações com relação ao tempo em que estes possíveis cruzamentos tenham ocorrido, as análises de simetria cariotípica e heterogeneidade cromossômica corroboram de certa forma as informações da literatura de que, em geral há aumento da heterogeneidade cromossômica e da assimetria cariotípica com o aumento do nível de ploidia (STEBBINS, 1971; LIU et al., 2006; SOUSA et al., 2012) . Esta relação, contudo, nem sempre é verdadeira. Em um estudo realizado com espécies de *Boronia*, por exemplo, os autores constataram que as espécies com menor número cromossômico apresentavam maior índice de assimetria cariotípica e seriam derivadas de espécies com número somático superior, sendo as disploidias descendentes o principal mecanismo de evolução no gênero (SHAN, YAN e PLUMMER, 2003). Em *L. alba*, o indivíduo com 30 cromossomos mostrou ser o cariótipo mais simétrico, com grande parte do conjunto haploide representado por cromossomos metacêntricos, embora o tetraploide também tenha apresentado um alto grau de simetria cromossômica. Nos citótipos com 38, 45 e 90 cromossomos foi observado um índice mais elevado de assimetria, que pode estar relacionado com uma formação mais recente destes indivíduos se comparado com os diploides e tetraploides. Um dado que corrobora esta hipótese é o fato de que entre os 90 acessos pertencentes à coleção da UFJF, cerca de 80% possuem $2n=30$ ou 60 cromossomos. Cariótipos mais primitivos são mais simétricos se comparado com cariótipos mais derivados e recentes, já que o acúmulo de alterações cromossômicas ao longo da história evolutiva gera cariótipos mais divergentes (STEBBINS 1971; SHAN, YAN e PLUMMER, 2003; PERUZZI, LEITCH e CAPARELLI, 2009; VIANA e SOUZA, 2012).

Outra ferramenta útil para se inferir sobre a evolução cariotípica de uma espécie envolve a observação do padrão de bandas cromossômicas e de sítios específicos, como as regiões dos genes ribossomais 5S e 45S. Dentre os bandeamentos cromossômicos mais utilizados em plantas, destacam-se o bandeamento C, a coloração com nitrato de prata e os bandeamentos base-específicos com fluorocromos (WEISS-SCHNEEWEISS et al. 2008; MEYER, HOOT e ARROYO, 2010).

Em *L. alba*, o bandeamento DAPI/CMA revelou números de marcas variáveis nos diferentes acessos, como o esperado, já que trata-se de uma espécie com grande plasticidade genômica e cariotípica. Em *Citrus*, por exemplo, uma grande

variabilidade cariotípica também foi observada através do perfil de bandas CMA⁺ em 17 acessos de mandarins (*Citrus spp.*) e segundo os autores, tais polimorfismos demonstram a diversidade do grupo (YAMAMOTO E TOMINAGA, 2003).

Em *L. alba*, o espécime diploide apresentou 6 bandas CMA⁺, confirmando os relatos prévios da literatura (SOUSA, 2006; PIERRE, 2008; SOUSA et al., 2009). Entretanto, não foram observadas bandas DAPI⁺ para este citótipo nas regiões centroméricas como descrito por Sousa et al. (2009). Bandas DAPI intersticiais são encontradas preferencialmente em regiões repetitivas ricas em AT, e podem estar relacionadas ao mecanismo de expansão de microssatélites e retrotransposição de repetições curtas (BOGUNIC et al., 2011). Observações anteriores sobre o citótipo tetraploide, relataram apenas 6 regiões CMA⁺ (PIERRE 2008). Além disso, sequências DAPI⁺ foram observadas em regiões teloméricas e próximas aos centrômeros, similares ao padrão de bandeamento C realizado pela mesma autora. Segundo Schweizer (1976) marcas CMA⁺ correspondem à região organizadora de nucléolo (RON), a qual é composta por cerca de 75% de bases guanina e citosina e onde normalmente se localizam os genes ribossomais 45S. Dessa maneira, é possível que as marcas CMA⁺ observadas correspondam na verdade às regiões de DNAr 45S.

Nos demais citótipos, não foi observado uma relação direta entre o número de marcas CMA⁺ e o nível de ploidia. A provável ocorrência de perdas de sequências repetitivas, como os *loci* de DNAr ao longo da evolução dos diferentes citótipos pode explicar a diversidade de perfis CMA⁺, como relatado por Mlinarec et al. (2012) ao investigar a ocorrência dos sítios de DNAr em espécies de *Anemone* e *Pulsatilla*.

Os genes que codificam RNAs ribossomais são sequências formadas por repetições *in tandem* que podem variar em número e tamanho entre as diferentes espécies. O sítio de DNAr 45S em espécies vegetais é formado por inúmeras unidades de regiões 5.8S, 18S e 25S, as quais são interligadas por DNA espaçadores intergênicos, ITS. Particularmente, as regiões de DNAr 45S estão, na maioria dos casos, co-localizadas com as regiões organizadoras de nucléolo (RON), ocupando porções específicas nos cromossomos. No entanto, Em *Crotalaria juncea*, por exemplo, um *locus* adicional de DNAr 45S foi mapeado em outra porção do genoma, apresentando, inclusive, atividade transcricional, já que metáfases dessa espécie mostraram-se positivas para a coloração de nitrato de prata (MONDIN,

SANTOS-SEREJO e AGUIAR-PERECIN, 2007; ANDRADE, 2011). Estudos recentes sugerem que a expressão dos genes DNAr 45S pode ocorrer sem que haja a formação de constrições secundárias (MONDIN, SANTOS-SEREJO e AGUIAR-PERECIN, 2007; ANDRADE, 2011). Já o RNAr 5S, em contrapartida, é transcrito apenas pelo DNAr 5S que se localiza em outras partes do genoma (HESLOP-HARRISON, 2000; NEVES et al., 2005). Na citogenética, o mapeamento físico das regiões de DNAr são de grande importância para os estudos de caracterização cariotípica, e constituem um parâmetro bastante informativo em abordagens de evolução cromossômica, uma vez que são marcadores universais amplamente utilizados em espécies vegetais (LEVIN, 2002; FUKUSHIMA, 2011; OHMIDO et al. 2010; VIANA e SOUZA, 2012; WAN et al., 2012). No presente trabalho, no indivíduo diploide estudado, os 2 sítios de DNAr 5S e os 6 *loci* 45S confirmam os resultados obtidos por Brandão et al. (2007) e Pierre (2008), evidenciando a constância e estabilidade dos genes ribossomais entre indivíduos com 30 cromossomos. Para o tetraploide (2n=60), o perfil de marcas obtidas foi diferente dos relatos existentes na literatura. Nenhuma alteração estrutural foi observada e documentada para este citótipo em trabalhos anteriores (PIERRE, 2008). Além disso, foi possível observar que as regiões 45S identificadas por hibridização *in situ* correspondem às marcas CMA⁺ terminais, obtidas pelo bandeamento cromossômico, ao passo que os sítios subterminais CMA⁺ nos demais citótipos estão co-localizados com os genes ribossomais 5S. A co-localização de bandas CMA⁺ com sítios 45S já foi relatada e pode ser observada em diversos grupos vegetais, como em Passifloraceae, Pinaceae e Verbenaceae, (SOUSA, et al., 2009; BOGUNIC´et. al, 2011; VIANA e SOUZA, 2012). Segundo Roa e Guerra (2012), em angiospermas os sítios de DNAr 45S ocorrem preferencialmente nos braços curtos dos cromossomos. Todavia, no complemento haploide de *L. alba* (2n=30), 2 sítios 45S foram encontrados em braços longos e apenas 1 sítio no braço curto. Foi possível observar marcas desta natureza nos citótipos de 30, e 45 cromossomos, evidenciando a similaridade entre os cariótipos e reforçando a hipótese de que o genoma de uma única espécie possa ter participado do processo de formação dos mais citótipos. O tetraploide, por sua vez, apresentou todos os sítios em braços curtos, além de um número inferior de marcas que o esperado. Provavelmente, após o processo de duplicação cromossômica, houve rearranjos genômicos, tais como translocações e deleções

alterando as posições dos sítios. Outra possibilidade para explicar as disposições dos genes ribossomais, seria a ocorrência de poliploidização a partir de um indivíduo diploide portador de uma alteração estrutural. No indivíduo com $2n=90$ cromossomos, observou-se 4 sítios de DNAr 45S localizados em braços longos e 6 em braços curtos, totalizando dez marcas de DNAr 45S, número próximo ao observado no indivíduo tetraploide. Considerando os diferentes níveis de plodia observados, este número reduzido de sítios 45S pode ser explicado por sucessivas perdas de material genético que ocorrem em organismos que contém vários níveis de ploidia (CHESTER, et al., 2010; SOLTIS e SOLTIS, 1995). Em citótipos autotetraploides de *Biblis liniflora*, e *Paspalum quadrifarium*, por exemplo, o número de genes de RNA ribossomal não representa exatamente o dobro de genes observados nos citótipos diploides, sugerindo a ocorrência de deleções e dispersões dos sítios de DNAr pós poliploidização (VAIO, et al., 2005; FUKUSHIMA et al., 2011; ROA E GUERRA, 2012). A perda de material genético não é exclusiva ou restrita apenas aos genes ribossomais. Quando o produto gênico de uma das cópias é majoritário em relação à outra, menos expressa, esta pode se tornar inativa e ser perdida (FREELING et al. 2012). Este efeito de dominância é comum em aloploiploides de *Tragopogon miscellus* e em híbridos de *Arabidopsis* (BUGGS et al., 2010 a; BUGGS et al., 2010b).

Os dados obtidos com a técnica de FISH, sobretudo da região de DNAr 5S, constituem fortes indícios de autoploiploidia, uma vez que o número de marcas do complemento monoploide se manteve constante, independentemente do nível de ploidia. Foram observados dois sítios no diploide, três no aneuploide e triploide, quatro do tetraploide e seis no hexaploide. Além disso, todas as marcas de DNAr 5S estão presentes nas porções cromossômicas subterminais dos braços curtos em todos os citótipos, em contraste com o gene ribossomal 45S, que mostrou-se altamente variável. Na literatura, o mapeamento dos genes ribossomais mostra que mudanças posicionais e numéricas são bastante comuns, em especial quando se trata de poliploides (ROA e GUERRA, 2012). Adicionalmente, a literatura relata que a região de DNAr 45S apresenta mais polimorfismos se comparada ao gene 5S, e estudos sugerem que tal mobilidade no genoma deve-se a sua posição estratégica ocupada nos cromossomos (VAIO et al. 2005; WEISS-SCHNEEWEISS et al. 2007, 2008; ROA e GUERRA, 2012; MLINAREC et al., 2012). Na prófase I da meiose, a

configuração de “*bouquet*”, adotada pelos bivalentes no zigóteno, facilitaria a troca de material genético entre os cromossomos homólogos e a ocorrência de translocações, culminando com a variabilidade e dispersão do sítio (CRONN et al. 1996; MLINAREC, et al., 2012; ROA E GUERRA, 2012).

Reforçando a hipótese de autoploidia, é interessante comentar que dados relativos à estimativa da quantidade de DNA em um conjunto de 38 acessos evidenciaram claramente a proporcionalidade entre o aumento da quantidade de DNA e o aumento do número cromossômico (dados não publicados). No caso de ocorrência da hipótese alternativa, na qual o genoma de outra espécie estaria participando do processo de formação dos poliploides em *Lippia alba*, essa proporcionalidade não seria esperada a menos que esta outra espécie apresentasse um genoma do mesmo tamanho. Considerando a variação na quantidade de DNA relatada para o gênero (CAMPOS et al., 2011) e que a área de ocorrência de *Lippia alba* difere da maioria das outras espécies do gênero esta hipótese torna-se pouco provável.

Com a visualização de marcadores ribossomais foi possível mapear rearranjos cromossômicos estruturais nos citótipos tetraploide e hexaploide, os quais foram sugeridos pelos dados obtidos pela morfometria cromossômica. Nestes indivíduos, o tamanho reduzido do cromossomo portador do sítio 5S sugere a ocorrência de uma possível deleção do braço longo dos cromossomos X e II respectivamente. Outra possibilidade menos provável por ser menos parcimoniosa, seria a translocação do gene ribossomal para outro cromossomo via elementos transponíveis seguido de perda do sítio original.

Os rearranjos cromossômicos têm implicação direta na fertilidade dos indivíduos. A presença de translocações, inversões, duplicações e deleções pode resultar em pareamentos incorretos de bivalentes e conseqüentemente, levar a irregularidades meióticas. Em plantas poliploides recém-formadas, a presença de univalentes e multivalentes está diretamente relacionada à baixa fertilidade, e para contornar tal adversidade, comportamentos diploides acabam sendo mais eficientes e são selecionados ao longo do processo evolutivo (LEVIN, 2002; RAMSEY e SCHEMSKE, 2002; CIFUENTES, et al., 2010; GAETA e PIRES, 2010; HE, et al. 2011; LARROSA, et al., 2012).

Em aloploidos, o comportamento diploide ocorre logo após a poliploidização, quando há uma acentuação das divergências entre os cromossomos homeólogos, envolvendo grandes rearranjos cromossômicos e a atividade do gene *Ph* (*Pairing homeologous*) (CIFUENTES et al., 2010). Em híbridos de *Gilia*, por exemplo, os descendentes, considerados altamente estéreis, ao longo de várias gerações foram adquirindo aos poucos estabilidade reprodutiva e na nona geração quase 100% da prole apresentava comportamento meiótico normal com formação de bivalentes em diacinese e produzindo gametas férteis (GRANT, 1966).

Em autoploidos, as configurações de multivalentes na meiose também influenciam na fertilidade dos indivíduos, e podem ser positivamente correlacionadas à frequência de quiasmas de seus parentais diploides (SRIVASTAVA, LAVANIA e SYBENGA, 1992; LEVAN, 2002). Modelos teóricos foram estabelecidos para autotetraploides visando estimar a frequência de multivalentes na prófase I. Nestes indivíduos, os pareamentos entre os homólogos acontecem de maneira aleatória, sendo esperado cerca de 2/3 das configurações de quadrivalentes na meiose (GILLIES, 1989 citado por CIFUENTES, et al., 2010; LEVAN, 2002;). Em autoploidos o processo de diploidização foi observado em espécies de *Hordeum*, *Elymus elongatus*, *Phleum pratense*, *Lotus corniculatus* e *Agropyron elongatum* dentre outras (GUPTA e FEDAK, 1985; CHARPENTIER, FELDMAN, e CAUDERO, 1986; EILAM, et al., 2010). Em um estudo com citótipos de *A. thaliana*, por exemplo, a diploidização citológica do autotetraploide ocorreu na 13ª geração (SANTOS et al., 2003).

Em *L. alba*, as informações obtidas pela análise meiótica revelaram que todos os acessos investigados apresentam alta frequência de anormalidades meióticas e multivalentes em diacinese, exceto para o acesso BGEN=95 que possui $2n=30$ cromossomos. Este acesso revelou 95,66% de células com comportamento normal, o que corresponde a 706 de 738 meiócitos analisados. Além disso, este acesso apresentou 15 bivalentes na meiose, comprovando sua herança dissômica. Já o acesso BGEN-96, apesar de pertencer ao grupo dos indivíduos diploides, apresentou grande percentual de irregularidade nas divisões, observada principalmente na fase de telófase II. Aproximadamente 50% das células em telófase II mostraram-se na configuração de tríades e díades. Tais configurações podem resultar em gametas não reduzidos e podem constituir matéria-prima para a

formação de poliploides (RAMANNA, 2003; KOUTECKÝ, et al., 2011; KOVALSKY e NEFFA, 2012) reforçando a hipótese apresentada no presente trabalho.

No acesso triploide, a microesporogênese revelou 40% de anormalidade, e assim como o acesso BGEN-96 a fase de telófase II foi a que mais se mostrou irregular, com presença de políades. Em indivíduos triploides, a presença de univalentes e trivalentes na diacinese, como o observado, acaba por gerar gametas desbalanceados, que podem eventualmente originar plantas com diferentes níveis de ploidia, inclusive aneuploides. Em populações naturais de *Centaurea stoebe*, a presença de indivíduos com um número intermediário entre os citótipos diploide e triploide suporta a hipótese de intercruzamentos, formando um indivíduo aneuploide que contém 3 cromossomos extras (MRAZ, et al., 2012). Neste caso, a presença de cromossomos adicionais tem implicações drásticas na meiose já que o mau pareamento iniciado na prófase I também resulta em gametas desbalanceados e alto índice de aborto de sementes, efeito provocado pela dosagem gênica anormal. Isto pode justificar a grande quantidade de irregularidades (62%) e a presença de univalentes e multivalentes em diacinese do citótipo com $2n=38$ em *L. alba*. Por outro lado, a meiose nos indivíduos tetraploides mostrou-se mais regular (70%), divergindo das informações anteriores, em que apenas 10% dos meiócitos analisados apresentavam gametogênese normal (PIERRE, et al., 2011). Esta divergência retrata as variações genômicas encontradas entre indivíduos do mesmo citótipo, sugerindo eventos de poliploidização independentes. Já no hexaploide, a grande porcentagem de células alteradas pode ser consequência de problemas no pareamento. Devido ao grande número de homólogos, a presença de multivalentes e cadeias cromossômicas na prófase I induzem as alterações nas demais fases do ciclo, assim como a produção de gametas não reduzidos e desbalanceados (HAMANT, MA e CANDE, 2006).

Dentre as maneiras de se estudar a fertilidade de poliploides, o “*screening*” de pólen viáveis é bastante utilizado e eficaz (CARPUTO, FRUSCIANTE e PELOQUIN, 2003). A coloração com FDA, evidencia grãos de pólen vivos e não apenas a presença/ausência de material celular, sendo mais eficaz na avaliação de viabilidade de pólen. Este método proposto por Heslop-Harrison e Heslop-Harrison (1970) é um dos melhores testes para avaliar a viabilidade de pólen e sua capacidade de germinação, sendo amplamente utilizado nas angiospermas

(SHIVANNA, LINSKENS e CRESTI, 1991; PACINI et al. 1997). O teste consiste em avaliar a integridade da membrana plasmática e a presença de uma enzima citoplasmática. A molécula de diacetato de fluoresceína atravessa a membrana plasmática e é hidrolisada por esterases ativas nos grãos de pólen viáveis, e após a clivagem da porção acetato, a molécula fluoresce. Nos pólen viáveis que possuem membrana intacta e esterases ativas há um acúmulo de fluoresceína que pode ser observado em microscopia de fluorescência.

Nos acessos diploides (BGEN-95 e BGEN-96) foi possível notar maior número de grãos viáveis com aproximadamente 70 e 75% de grãos FDA⁺ respectivamente. Estes resultados corroboram os dados obtidos na análise meiótica, na qual foi observada 95% de regularidade no acesso BGEN-95. Embora o indivíduo BGEN-96 tenha apresentado 50% de regularidade meiótica, sua viabilidade polínica foi alta (95%), sugerindo que as anormalidades encontradas na divisão não comprometem o desenvolvimento dos grãos, ainda que possa haver gametas aneuploides e não reduzidos. Adicionalmente, a média dos pólen do indivíduo BGEN-96, que apresentou grande porcentagem de tríades, é maior cerca de 10 µm (30%) em relação aos pólen do acesso BGEN-95. Este aumento do tamanho dos pólen pode ser um indicativo de pólen não reduzidos (RAMSEY, 2007). Segundo Ramsey e Schemske (1998), os pólen não reduzidos apresentam o diâmetro 30% a 40% maior que os pólen haploides. Desta maneira, pode-se inferir que o acesso BGEN-96 produz grande quantidade de gametas não reduzidos, que eventualmente servem de matéria-prima para origem de indivíduos poliploides e podem justificar o alto índice de anormalidade meiótica encontrada para um acesso com 2n=30 cromossomos.

De forma geral, os demais acessos apresentaram baixa viabilidade polínica, Ramsey e Schemske (2002), por exemplo, registraram cerca de 20% de redução na viabilidade de pólen de poliploides recém-formados e aproximadamente 50% de inviabilidade nas sementes produzidas por tais plantas (OTTO, 2007). O indivíduo com 38 cromossomos apresentou apenas 34,18% de pólen viáveis, com a maioria de grãos FDA⁻. O acesso triploide apresentou aproximadamente 60% de inviabilidade gamética. Indivíduos triploides são comumente estéreis, no entanto, muitas espécies de triploides podem produzir gametas desbalanceados ou não reduzidos que servem de via para originar outros poliploides, o que é conhecido por

ponte triploide (RAMSEY e SCHEMSKE, 2002; LAVIA et al., 2011). Já no citótipo tetraploide, a viabilidade polínica foi de 65%, de forma semelhante ao que foi observado na análise meiótica, que apresentou 60% de regularidade. Neste caso, provavelmente, as anormalidades observadas durante meiose não comprometeram a viabilidade dos pólenes, já que observou-se maior viabilidade dos grãos em comparação com a normalidade de divisões. No caso do indivíduo hexaploide observou-se baixa viabilidade polínica já que apenas 25% dos grãos de pólenes produzidos estaria apto à fecundação.

De maneira geral, as análises meióticas corroboram os dados obtidos de viabilidade de pólenes com FDA. A alta frequência de anormalidades encontradas durante a divisão sugere que grande parte dos grãos produzidos seja inviável e/ou desbalanceados, o que pode afetar na fertilidade dos acessos e contribuir para a formação de citótipos poliploides (RAMSEY e SCHEMSKE, 2002; GAETA e PIRES, 2010). Além disso, pode-se sugerir que os citótipos triploide, aneuploide e hexaploide tenham originado posteriormente em relação aos diploides e tetraploides, já que apresentaram maiores índices de irregularidades na gametogênese.

Adicionalmente, os diâmetros de pólenes viáveis e inviáveis foram mensurados para estimar uma possível correlação com a viabilidade como descrito por Kelly et al., (2002). De acordo com o teste de *Student* ($p=0,05$), houve diferença significativa entre as médias dos pólenes viáveis e a média dos pólenes inviáveis (Figura 19), confirmando que os grãos aptos à fecundação são maiores que os grãos inviáveis cerca de 10 μm em média. Além disso, foram observados grãos de pólenes “gigantes”, com os diâmetros 30 a 40% superiores nos citótipos aneuploide, triploide e hexaploide, evidenciando seu potencial para a produção de gametas não reduzidos.

Embora os citótipos poliploides possuam alto índice de anormalidades meióticas e inviabilidade de gametas, *L. alba* não aparenta ter desvantagens ou problemas na reprodução vegetativa, compensando possíveis problemas reprodutivos (PIERRE, et al., 2011). Ao contrário, a espécie apresenta alta capacidade de reproduzir de forma assexuada o que pode explicar também a manutenção de indivíduos cromossomicamente desbalanceados na natureza. Em muitos casos o modo de reprodução assexuada, o modo de reprodução assexuada pode ser correlacionado com eventos de poliploidia (OTTO e WHITTON 2000).

O conjunto de dados obtidos com as técnicas de bandeamento cromossômico e hibridização *in situ*, somado aos resultados alcançados com as análises meióticas e palinológicas sugerem que cruzamentos intraespecíficos e sucessivos eventos de autoploidização originaram esta ampla variação cariológica em *L. alba*. As informações geradas com a técnica de FISH, em especial a região de DNAr 5S, são indícios fortes de autoploidia, já que o número de sítios do complemento monoploide é constante. Além disso, os altos índices de irregularidades meióticas encontrados nos triploides, aneuploide, tetraploide e hexaploide também são indícios de pareamento e segregação cromossômica anormal, fenômeno típico de espécies poliploides (SRIVASTAVA, LAVANIA e SYBENGA, 1992; DIAO et al., 2009; HE et al., 2011). Além disso, os resultados de viabilidade polínica com o FDA corroboram as anormalidades meióticas observadas e incrementam os indícios de autoploidia.

Embora no presente trabalho apenas um representante de cada citótipo tenha sido estudado, segundo Burton e Husband (2001) cruzamentos intraespecíficos envolvendo citótipos de diferentes ploidias são comuns quando os mesmos ocorrem em simpatria. Vale considerar que apesar dos citótipos investigados no presente trabalho não terem sido coletados em uma única localidade, outros acessos simpátricos e que compõem o Banco de Germoplasma de Espécies Nativas da UFJF (BGEN-UFJF) apresentam a mesma variação numérica aqui relatada. Com esta informação, duas possibilidades podem ser consideradas. A primeira é que podem ter ocorrido eventos de cruzamentos e poliploidização independentes; e a segunda de que os citótipos atuais sejam consequência de eventos que ocorreram no passado e que posteriormente eles se espalharam para outras regiões. Estas possibilidades, acrescidas das variáveis tempo de ocorrência e rearranjos estruturais podem ajudar também a explicar a ocorrência de marcas cromossômicas localizadas em cromossomos diferentes quando se compara os kariogramas dos diferentes citótipos. Uma hipótese possível para a origem dos diferentes citótipos pode ser vista na figura 21, em que um citótipo com $2n=30$ teria originado um indivíduo tetraploide por meio de um cruzamento bilateral envolvendo gametas não reduzidos ($2n-2n$). Indivíduos triploides surgiriam através da fecundação de gametas não reduzidos com gametas reduzidos ($2n-n$). Além disso, pode ter ocorrido um eventual cruzamento entre o citótipo diploide com tetraploide originando o triploide com 45

cromossomos. Cruzamentos entre diploides ($n=15$) e triploides ($n=23$) teriam originado um aneuploide com $2n=38$ cromossomos. Por fim, o acesso hexaploide pode ter surgido por meio de duplicação do conjunto cromossômico triploide ($2n=45$) ou por meio de cruzamento unilateral do citótipo com $2n=60$ ou alternativamente através de cruzamentos entre os citótipos diploide e tetraploide (ambos produzindo gametas não reduzidos). Nesta hipótese é possível perceber que os indivíduos com $2n=30$ participariam de quase todas as combinações de cruzamentos para originar os outros citótipos. Interessante notar que no BGEN-UFJF a maioria dos acessos de *Lippia alba* apresentam este número, reforçando a possibilidade de que as demais variações numéricas tenham surgido a partir de um genoma composto por 30 cromossomos.

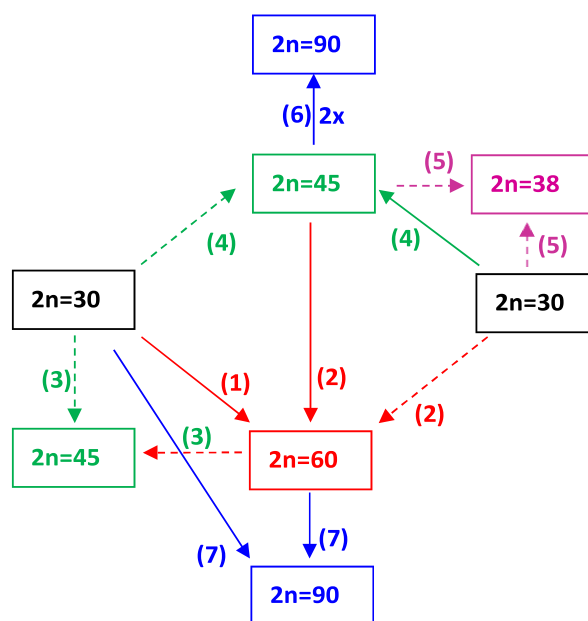


Figura 21: Esquema representando a hipótese de formação dos citótipos de *L. alba*. Os citótipos estão representados por diferentes cores nos retângulos. (1) representa a formação do citótipo tetraploide por meio de duplicação cromossômica; (2) formação do tetraploide por meio de cruzamentos entre diploides e triploides; possibilidades de formação do citótipo triploide: (3) através de cruzamento entre tetraploides e diploides, ou (4) por meio de cruzamentos entre diploides; (5) origem do citótipo aneuploide por meio de cruzamentos entre diploide e triploide; possibilidades de formação do citótipo hexaploide: (6) por duplicação do genoma triploide, ou (7) cruzamentos entre tetraploides e diploides. Setas contínuas: gametas não reduzidos; setas pontilhadas: gametas reduzidos.

6 CONCLUSÕES

- *L. alba* apresenta ampla variação cariotípica e genômica dentro e entre citótipos em decorrência de rearranjos cromossômicos;
- Os dados sugerem ocorrência de autoploidia na formação de citótipos com $2n=38, 45, 60$ e 90 cromossomos;
- Cruzamentos entre os citótipos e a ocorrência de gametas não reduzidos podem explicar o mecanismo de surgimento dos diferentes citótipos.
- A ocorrência de rearranjos cromossômicos pós-duplicação pode explicar as diferenças morfológicas observadas nos kariogramas dos diferentes citótipos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT R. J; LOWE, A.J. 2004. Origins, establishment and evolution of new polyploid species: *Senecio cambrensis* and *S. eboracensis* in the British Isles. **Biological Journal of the Linnean Society**, **82**: 467–74.

AINOUCHE, M.L.; SALMON, A.; BAUMEL, A.; YANNIC, G. 2004. Hybridization, polyploidy and speciation in *Spartina* (Poaceae). **New Phytologist**, **161**: 165–72.

ALESSIA GUGGISBERG, CÉLIA BAROUX , UELI GROSSNIKLAUS, ELENA CONTI. 2008. Genomic Origin and Organization of the Allopolyploid *Primula egaliksensis* Investigated by in situ Hybridization. **Annals of Botany**, **101**: 919-927.

ALEXANDER, M. P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, **44**:117-122.

BARKAN, A.; MARTIENNSSEN, R.A. 1991. Inactivation of maize transposon Mu suppresses a mutant phenotype by activating an outward-reading promoter near the end of Mu1. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, **88**: 3502–3506.

BRETAGNOLLE, F.; THOMPSON, J.D. 1995. Gametes with somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. **New Phytologist**, **129**: 1–22.

BOGUNIC, F.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; MURATOVIC, E.; BALLIAN, D. 2011. Different karyotype patterns among allopatric *Pinus nigra* (Pinaceae) populations revealed by molecular cytogenetics. **Plant Biology** **13**: 194–200

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

BRANDÃO, A.D.; VICCINI L.F.; SALIMENA, F.R.G.; VANZELA, A.L.L. RECCO PIMENTEL, S.M. 2007. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **Journal of Plant Research**, **120**: 317-321.

BROWNFIELD, L., KÖHLER, C. 2010.) Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. **Journal of Experimental Botany Advance**, **62**: 1659-1668.

BRYSTING, A.K.; HOLST-JENSEN, A.; LEITCH, I. 2000. Genomic Origin and Organization of the Hybrid *Poa jemtlandica* (Poaceae) Verified by Genomic *in situ* Hybridization and Chloroplast DNA Sequences. **Annals of Botany**, **85**: 439-445.

BUGGS, R.; ELLIOTT, N.M.; ZHANG, K.O.H. J., VICCINI L.F.; SOLTIS. D.E.; SOLTIS, P.S. 2010. Tissue-specific silencing of homoeologs in natural populations of the recent allopolyploid *Tragopogon mirus*. **New Philologist**, **186**:175-183. a

BUGGS, R.J.; CHAMALA, S. W.U. W.; GAO, L.; MAY, G.D.; SCHNABLE, P.S.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; BARBAZUK, W.B. 2010. Characterization of duplicate gene evolution in the recent natural allopolyploid *Tragopogon miscellus* by next-generation sequencing and Sequenom iPLEX MassARRAY genotyping. **Molecular Ecology**, **19**:132-146. b

BURTON, T.L.; HUSBAND, B.C.2001. Fecundity and offspring ploidy in matings among diploid, triploid and tetraploid *Chamerion angustifolium* (Onagraceae): consequences for tetraploid establishment. **Heredity**, **87**: 573-582

CAMPOS, J.M.S.; SOUSA, S.M.; SILVA, P.S.; PINHEIRO, L.C.; SAMPAIO, F.; VICCINI, L.F. 2011. Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, **291**:133-140

CARPUTO, D.; FRUSCIANTE, L.; PELOQUIN, S.J. 2003. The Role of 2n Gametes and Endosperm Balance Number in the Origin and Evolution of Polyploids in the Tuber-Bearing Solanums. **Genetics** **163**: 287–294

CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. 1993. A New Heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. **Heredity**, **70** (4): 515-519.

CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. 1997. High-resolution HKG- banding in maize mitotic chromosomes. **Journal of Plant Research**, **110** (5): 417-420.

CHARPENTIER, A.; FELDMAN, M.; CAUDERON, Y. 1986. "Genetic control of meiotic chromosome pairing in tetraploid *Agropyron elongatum*. I. Pattern of pairing in natural and induced tetraploids and in F1 triploid hybrid," **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, **28** (5): 783-788, 1986.

CHESTER, M.; LEITCH, A. R.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D. E. 2010. Review of the Application of Modern Cytogenetic Methods (FISH/GISH) to the Study of Reticulation (Polyploidy/Hybridisation). **Genes**, **1**: 166 -192

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

CAIXETA, E. T. ; CARVALHO, C. R . Chromomere mapping in maize pachytenes. **Caryologia (Firenze)**, **56**: 53-56, 2003.

CHEN, Z.J.; HA, M.; SOLTIS, D. 2007. Polyplody: genoma obesity and its consequences. **New Phytologist**, **173**: 717-720.

CIFUENTES, M.; GRANDONT, L.; MOORE, G.; CHEVRE, A.M.; JENCZEWSKI, E. 2010. Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. **New Phytologist**, **186**: 29-36.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. 1981. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Edições UFC. Fortaleza.

CRONN R.C., ZHAO X., PATERSON A.H., WENDEL J.F. 1996. Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and all polyploid cottons. **Journal of Molecular Evolution**, **42**: 685–705.

DEWET, J.M.J. 1980. Origins of polyploids. In: Polyploidy biological relevance (ed. Lewis WH) pp3-16. Plenum Press, New York.

DI STASI, L. C.; HIRUMA, C. A.; GUIMARAES, E. M.; SANTOS, C. M. 1994. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, **65**: 529- 540.

DIAO, W.; BAO, S.; JIANG, B.; CUI, L.; QIAN, C.; CHEN, J. 2009. Cytogenetic studies on microsporogenesis and male gametophyte development in autotriploid cucumber (*Cucumis sativus* L.): implication for fertility and production of trisomics. **Plant Systematics and Evolution**, **279**: 87- 92

DOLEZEL J.; GREILHUBER J.; SUDA, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flowcytometry. **Nature Protocols**, **2(9)**: 2233-2244.

EILAM, T.; ANIKSTER, Y.; MILLET, E.; MANISTERSKI, J.; FELDMAN, M. 2010. Genome Size in Diploids, Allopolyploids, and Autopolyploids of Mediterranean Triticeae. *Journal of Botany*. doi:10.1155/2010/341380

EHRENDORFER, F. 1980. Polyploidy and distribution. In W.H. Lewis (Ed), "Polyploidy, biological relevance", 45-60. Plenum Press, New York.

FELDMAN, M.; LIU, B.; SEGAL, G.; ABBO, S.; LEVY, A.A. 1997. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. **Genetics**, **147**: 1381–1387.

FUCHS, J.; STREHL, S.; BRANDES, A.; SCHWEIZER, D.; SCHUBERT, I. 1998. Molecular Cytogenetic Characterization of the *Vicia faba* genome – heterochromatin differentiation, replication patterns and sequence localization. **Chromosome Research**, **6**: 219-230.

FUKUSHIMA, K.; IMAMURA K.; NAGANO, K.; HOSHI, Y. 2011. Contrasting patterns of the 5S and 45S rDNA evolutions in the *Byblis liniflora* complex (Byblidaceae). **Journal Plant Research**, **124 (2)**:231-44.

GAETA, R.T.; PIRES, J.C. 2010. Homoeologous recombination in allopolyploids: the polyploid ratchet. **New Phytologist** **186**: 18–28.

GASTONY, G.J. 1991. Gene silencing in a polyploid homosporous fern: paleopolyploidy revisited. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **88**:1602–1605.

GAUT, B.S.; DOEBLEY, J.F. 1997. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, **9**: 6809-6814.

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

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

GIRÓN, L.M.; CÁCERES, A. 1994. Técnicas Básicas para el Cultivo y Procesamiento de Plantas Medicinales. CEMAT. **Guatemala**: 51-52.

GIULIETTI, A. M. 1987. **Análise crítica da evolução da morfologia e da sistemática das Eriocaulaceae**. Tese de Titular. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

GRANT, V. 1966. Selection for Vigor and Fertility in the Progeny of a highly Sterile Species hybrid in *Gilia*. **Genetics** **53**: 757-775.

GROOSE, R.W.; TALBERT, L.E.; KOJIS, W.P.; BINGHAM, E.T. 1989. Progressive heterosis in autotetraploid alfalfa: studies using two types of inbreds. **Crop Science**, **29**:1173-1177.

GUGGISBERG, A.; BAROUX, C.; GROSSNIKLAUS, U.; CONTI, E. 2008. Genomic origin and organization of the allopolyploid *Primula egaliksensis* investigated by *in situ* hybridization. **Annals of Botany**, **101 (7)**: 919–927.

GUPTA, P.K; FEDAK, G. 1985. Genetic control of meiotic chromosome pairing in polyploids in the genus *Hordeum*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, **27(5)**: 515–530, 1985.

GURIB-FAKIM, A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow molecular **Aspects of Medicine**, **27**: 1-93.

HALVERSON, K.; HEARD, S.B.; NASON, J.D.; STIREMAN, J.O.2008. Origins, Distribution, and Local Co-occurrence of Polyploid Cytotypes in *solidago altissima* (Asteraceae). **American Journal of Botany** **95(1)**: 50–58.

HAMANT, O.; MA, H.; CANDE, W.Z.2006 Genetics of Meiotic Prophase I in Plants. **The Annual Review of Plant Biology**, **57**: 267–302

HAN, F.; FEDAK, G.; GUO, W.; LIU, B.2005. Rapid and Repeatable Elimination of a Parental Genome-Specific. **Genetics Society of America**, **170**: 239–1245.

HARLAN, J. R.; J. M. DE WET. 1975 O Winge and a prayer: the origins of polyploidy. **Botanical Review**, **41**: 361-390.

HAVANANDA, T.; BRUMMER, E.C.; DOYLE, J.J. 2011.Complex Patterns of Autopolyploid Evolution in Alfalfa and Allies (*Medicago sativa*; leguminosae). **American Journal of Botany** **98(10)**: 1633–1646.

HE, J.; SHAHID, M.Q.; CHEN, Z.; CHEN, X.; LIU, X.; LU, Y. 2011. Abnormal PMC microtubule distribution pattern and chromosome behavior resulted in low pollen fertility of an intersubspecific autotetraploid rice hybrid. **Plant Systematics and Evolution**, **291**: 257-265.

HEGARTY, M.J.; BARKER, G.L.; BRENNAN, A.C.; EDWARDS, K.J.; ABBOTT, A.J.; HISCOCK, S.J. 2008. Changes to gene expression associated with hybrid speciation in plants: further insights from transcriptomic studies in *Senecio*. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, **363**: 3055–3069.

HESLOP-HARRISON J.; HESLOP-HARRISON Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Stain Technology**, **45 (1)**: 115-20

HESLOP-HARRISON, J.S. 2000. Comparative genome organization in plants: from sequences and markers to chromatin and chromosomes. **Plant Cell**, **12**: 617- 635.

HIESEY, W. M.; M. A. NOBS; BJORKMAN, O. 1971. Experimental Studies on the Nature of Species. V. Biosystematics, Genetics, and Physiological Ecology of the Erythranthe Section Mimulus. Pub. 628, Carnegie Institute, Washington, DC.

JIANG J; GILL, BS; WANG G-L; RONALD, PC; WARD, DC. 1995. Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice with bacterial artificial chromosomes. **Proc. Nat. Acad. Sci.** **92**:4487-4491.

JIN, Y.-K.; BENNETZEN, J.L. 1994. Integration and nonrandom mutation of a plasma membrane proton ATPase gene fragment within the Bs1 retroelement of maize. **Plant Cell** **6**: 1177–1186.

JORGENSEN, C. A., 1928. The experimental formation of heteroploid plants in the genus *Solanum*. **Journal of Genetics**, **11**: 133-210.

KEELER, K. H.; DAVIS, G. A. 1999. Comparison of Common Cytotypes of *Andropogon gerardii* (Andropogoneae, Poaceae). **American Journal of Botany**, **86(7)**: 97-979.

KELLY, J. K.; RASCH, A.; KALISZ, S. 2002. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. **American Journal of Botany**, **89(6)**: 1021-1023.

KOUTECKÝ, P.; BADUROVÁ, T.; ŠTECH, M.; KOŠNAR, J.; KARÁSEK, J. 2011. Hybridization between diploid *Centaurea pseudophrygia* and tetraploid *C. jacea* (Asteraceae): the role of mixed pollination, unreduced gametes, and mentor effects. **Biological Journal of the Linnean Society**, **104**: 93–106.

KOVASLKY, I.E.; NEFFA, V.G.S. 2012. Evidence of 2n microspore production in natural diploid population of *Turnera sidoides* subsp. *carnea* and its relevance in the evolution of the *T. sidoides* (Turneraceae) autopolyploid complex. **Journal Plant Research**, **125 (6)**:725-734.

KSIAZCZYK, T.; TACIAK, M.; ZWIERZYKOWSKI, Z. 2008. Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH. **Journal of Applied Genetics**, **51(4)**: 449–460

ANDRADE, L. M. 2011. **Arquitetura de Cromatina na região organizadora de nucléolo e seu papel no controle da expressão dos genes ribossomais**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba, Brasil. 18p.

LARROSA, F.H.; MAUNE, J.F.; ERAZZU, L.E.; CAMADRO, E.L. 2012. Meiotic abnormalities underlying pollen sterility in wild potato hybrids and spontaneous populations. **Plant Biology**, **14**: 223–233.

LAVIA, G.I.; ORTIZ, A.M.; ROBLEDO, G.; FERNANDEZ, A.; SEIJO, G. 2011. Origin of triploid *Arachis pintoii* (Leguminosae) by autopolyploidy evidenced by FISH and meiotic behavior **Annals of Botany**, **108**: 103–111.

LEITCH, I.J. AND BENNETT, M.D. 1997. Polyploidy in angiosperms, **Trends Plant science**, **2**: 470–476

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. 2004. Genome downsizing in polyploidy plants, **Biological Journal of the Linnean Society**, **82**: 651-663.

LEITCH, A. R.; I. J. LEITCH. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. **Science**, **320**: 481-483.

LEVAN A, FREDGA A, SANDERBERG AA. 1964. Nomenclature for centromeric position in chromosomes. **Hereditas**, **52 (3)**: 201-220

LEVIN D.A. 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. New York, NY, USA: Oxford University Press.

LIM, K. Y.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; TATE, J., MATYASEK, R.; SRUBAROVA, H., KOVARIK, A.; CHRIS PIRES, J., XIONG, Z.; LEITCH, A.R. 2008. Rapid Chromosome Evolution in Recently Formed Polyploids in *Tragopogon* (Asteraceae). **PlosOne**, **3 (10)**: 1-13.

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

LYNCH, M.; O'HELY, M. WALSH, B. FORCE, A. 2001. The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate. **Genetics**, **159**: 1789-1804.

MA, X. F.; Gustafson, J.P. 2005 Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. **Cytogenetics and Genome Research**, **109**: 236-249.

MERCHANT, C.J. 1967. Evolution in *Spartina* (Gramineae). I. The history and morphology of the genus in Britain. **Journal of the Linnean Society**, **60**: 1–24

MERCHANT, C.J. 1968. Evolution in *Spartina* (Gramineae). II. Chromosomes, basic relationships and the problem of *Spartina X townsendii* agg. **Journal of the Linnean Society**, **60**: 381–409

MASTERSON, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science**, **264**: 421–423.

McCLINTOCK, B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. **Science** **226**: 792–801.

MEYER K.M., HOOT S.B., ARROYO M.T.K. 2010. Phylogenetic affinities of South American Anemone (Ranunculaceae) including the endemic segregate genera, *Barneoudia* and *Oreithales*. **International Journal of Plant Sciences**, **171(3)**: 323–331.

MENDIBURU, A.O.; PELOQUIN, S.J. 1971. High yielding tetraploides from 4x-2x and 2x-2x matings. **American Potato Journal** **48**: 300–301.

MLINAREC, J.; SATOVIC, K.; MIHELJ D.; MALENICA, N.; BESENDORFER, V. 2012. Cytogenetic and Phylogenetic studies of Diploid and Polyploid Members of Tribe Anemoninae (Ranunculaceae). **Plant Biology** **14**: 525–536.

MOK, D.W.S.; PELOQUIN, S.J. 1975. The inheritance of three mechanisms of diplandroids (2n pollen) formation in diploid potato. **Heredity**, **35**: 295–302.

MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. 2007. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. **Genetics and Molecular Biology**, **30 (1)**: 65–72.

MOLDENKE, H.N. 1973. Flora of Panama. Verbenaceae. **Acta Mo Bot Gnd. 60**: 41-148.

MORTON. 1981. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. **Springfield. Mincis. USA,1**: 745- 750.

MRAZ, P.; SPANIEL, S.; KELLER, A.; BOWMANN, G.; FARKAS, A.; SINGLIAROVA, B.; ROHR, R.P.; BROENNIMANN, O.; MULLER-SCHARER, H. 2012. Anthropogenic disturbance as a driver of microspatial and microhabitat segregation of cytotypes of *Centaurea stoebe* and cytotype interactions in secondary contact zones. **Annals of Botany 110**: 615–627.

NAKAGAWA, M.; OHKAWA, T.; KANEKO, Y. 2013. Flow cytometric assessment of cytotype distributions within local populations of *Phragmites australis* (Poaceae) around Lake Biwa, the largest lake in Japan. **Plant Species Biology, 28**: 94–100.

NEVES, N.; DELGADO, M.; SILVA, M.; CAPERTA, A.; MORAIS-CECÍLIO L.; VIEGAS, W. 2005. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. **Cytogenetics and Genome Research, 109**: 104 -111.

OHMIDO N., ISHIMARU A., KATO S., SATO S., TABATA S., FUKUI K. 2010. Integration of cytogenetic and genetic linkage maps of *Lotus japonicus*, a model plant for legumes. **Chromosome Research, 18**: 287–299.

O'LEARY, N., DENHAM, S. S., SALIMENA, F. AND MÚLGURA, M. E. 2012. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society, 170**: 197- 219.

ORTIZ, R. 1997. Occurrence and inheritance of 2n pollen in *Musa*. **Annals of Botany, Bristol, 79**: 449-453.

OTTO, S.P.; WHITTON, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genetics, 34*: 401-437.

OTTO, P. S. 2007. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. **Cell**, **131**: 452-462.

PACINI, E.; FRANCHI, G.G.; LISCI, M.; NEPI, M. 1997. Pollen viability related to type of pollination in six angiosperm species. **Annals of Botany**, **80**: 83–87.

PAN, G., ZHOU, Y., FOWKE, L.C., WANG, H.; 2004. An efficient method for flow cytometric analysis of pollen and detection of 2n nuclei in *Brassica napus* pollen. **Plant Cell Reports**, **23**:196–202

PARISOD, C.; HOLDEREGGER, R.; BROCHMANN, C.2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. **New Phytologist**, **186**: 5-17.

PARROTT, WA; SMITH RR .1984. Production of 2n pollen in red clover. **Crop Science**, **24**: 469-472.

PEDROSA, A.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; SCHWEIZER, D.; BACHMAIR, A. 2002. Chromosomal mapp of the model legume *Lotus japonicus*. **Genetics**, **161**: 1661-1672.

PERUZZI L., LEITCH I.J., CAPARELLI K.F. 2009. Chromosome diversity and evolution in Liliaceae. **Annals of Botany**, **103**: 459–475.

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

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

PIERRE, P.M.O.; SOUSA, S.M.; DAVIDE, L.C.; MACHADO, M.A.; VICCINI, L.F. 2011. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **83(3)**: 993-1005.

RAINA, S.N.; PARIDA, A.; KOUL, K. K.; SALIMATH, S.; BISHT, M.S.; RAJA, V.; KHOSHOO, T.N. 1994. Associated DNA changes in polyploids. **Genome**, **37**: 560-564.

RAIZADA, M.N.; BENITO, M.I; WALBOT, V. 2001. The MuDR transposon terminal inverted repeat contains a complex plant promoter directing distinct somatic and germinal programs. **Plant Journal**, **25**: 79–91.

RAMANNA, M. S; JACOBSEN, E. 2003. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement - A review. **Euphytica**, **133**: 3-18

RAMANNA, M.S. 1992. The use of 2n gametes in breeding polysomic polyploid species; some achievements and perspectives. **Journal Article: Proc. Workshop Gametes with somatic chromosome number in the evolution of and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives**. Perugia, Italy: 91-100

RAMSEY, J. 2007. Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). **Heredity**, **98**: 143-150

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. 1998. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, **29**: 467–501.

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

ROA, F.; GUERRA, M. 2012. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. **BioMedCentral Evolutionary Biology**, no prelo, doi:10.1186/1471-2148-12-225.

ROSSER, E.M. 1955. A new British species of *Senecio*. **Watsonia** **3**: 228–32

RICCIARDI, G.; RICCIARDI, A. y BANDONI, A., “Fitoquímica de Verbenaceas (*Lippias* y *Aloysias*) del Nordeste Argentino.”; Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, UNNE; Exactas N° 039; (2000)

RIVERO-GUERRA, A.O. 2008. Cytogenetics, geographical distribution, and pollen fertility of diploid and tetraploid cytotypes of *Santolina pectinata* Lag. (Asteraceae: Anthemideae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, **156**: 657-667.

SALIMENA, F.R.G. 2002. Two new species of *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae) from South America. **Hickenia**, **3 (37)**: 145-149.

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

SANDERS, R. W.; 2001. The genera of Verbenaceae in Southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**, **5 (2)**: 303-358.

SANTOS JL, ALFARO D, SANCHEZ-MORAN E, ARMSTRONG SJ, FRANKLIN FC, JONES GH. 2003. Partial diploidization of meiosis in autotetraploid *Arabidopsis thaliana*. **Genetics** **165**: 1533–1540.

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

SATO, T.; MACIERA, M.; LUMARET, R.; JACQUARD, P. 1993. Flowering characteristics and fertility of interploidy progeny from normal and 2n gametes in *Dactylis glomerata* L. **New Phytologist**, **124**: 309-319.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. 2004. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**, **10**: (2) 151-157.

SCHOCKEN, N. R. L. **Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill.). N. E. Brown.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SCHUBERT, I.; LYSAK, M.A. 2011. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. **CellPress**, **27**: (6) 207-216

SCHWEIZER, D. 1976. Reverse Fluorescent Chromosome Banding with Chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, **58**: 307-324.

SHIVANNA, KR.; LINSKENS, HF.; CRESTI, M. 1991. Responses of tobacco pollen to high humidity and heat stress: viability and germinability *in vitro* and *in vivo*. **Sexual Plant Reproduction**, **4**: 104-109.

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

SOLTIS, D.E., SOLTIS, P. S. 1995. The dynamic nature of polyploid genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **92** (18): 8089-8091.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; SCHEMSKE, D.W.; HANCOCK, J.F.; THOMPSON, J.N.; HUSBAND, B.C.; JUDD, W.S. 2007. Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? **Taxon** **56**, 13-30.

SOLTIS DE, SOLTIS PS, PIRES JC, KOVARIK A, TATE J, MAVRODIEV E. 2004. Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. **Biological Journal of the Linnean Society** **82**: 485-501.

SOLTIS, P. S. 2005. Ancient and recent polyploidy in angiosperms. **New Phytologist**, **166**: 5–8.

SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. 2009. The Role of Hybridization in Plant Speciation. **Plant Biology**, **60**: 61-588.

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

SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; TORRES, G. A.; VICCINI, L. F. 2009. Chromosome banding in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Biologia (Bratislava)**, **64 (4)**: 711-715 .

SOUSA S.M.; TORRES, G. A.; VICCINI, L. F. 2012. Karyological studies in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **84**: 1029-1037.

SOUZA, L. G.R.; CROSA, O.; WINGE, H.; GUERRA, M. 2009. The Karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): A populational and cytomolecular analysis. **Genetics and Molecular Biology**, **32 (1)**: 111-116.

SPERANZA, P.; VAIO, M.; MAZZELLA, Z. 2003. Karyotypes of two cytotypes of *Paspalum quadrifarium* Lam. (Poaceae). An alternative technique for small chromosomes in plants. **Genetics and Molecular Biology**, **26, (4)**: 499-503.

SRIVASTAVA, S.; LAVANIA, U.C.; SYBENGA, J. 1992. Genetic variation in meiotic behaviour and fertility in tetraploid *Hyoscyamus muticus*: correlation with diploid meiosis. **Heredity**, **68**: 231 – 239.

STACE H.M. 1978. Cyto-evolution in the genus *Calotis* R. Br. (Compositae: Astereae). **Australian Journal of Botany** **26**: 287–307.

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

STEFANINI, M. B.; RODRIGUES, S.D. e MING, L. C. 2001. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. **Horticultura Brasileira**, **20**: 18-23.

SUDA, J.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; TRIBSCH, A.; SCHNEEWEISS, G.M.; PAVEL TRAVNICEK, P.; SCHONSWETTER, P. 2007. **American Journal of Botany**, **94(8)**: 1391–1401.

SUMNER, A.T. 2003. Chromosomes: organization and function. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. 2005. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **15(1)**: 1-5.

THOMPSON, J.N.; NUISMER, S.L.; MERG, K. 2004. Plant Polyploidy and the Evolutionary Ecology of plant/animal Interactions. **Biological Journal of the Linnean Society**, **82**: 511–519.

TRONCOSO, N. S. 1974. Los generos de Verbenaceas de sudamerica extra-tropical (Argenti-na, Chile, Bolívia, Paraguai, Uruguai y sur de Brasil). **Darwiniana** **18 (3-4)**: 295-412.

URBANSKA K.M.; HURKA, H.; LANDOLT, E.; NEUFFER, B.; MUMMENHOFF, K. 1997. Hybridization and evolution in *Cardamine* (Brassicaceae) at Urnerboden, Central Switzerland: biosystematic and molecular evidence. **Plant Systematics and Evolution**, **204**: 233–56

VAIO, M.; SPERANZA, P.; VALLS, J.F.; GUERRA, M.; MAZZELLA, C. (2005) Location of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). **Annals of Botany**, **96**: 191–200.

VALE, A.A. **Plasticidade Fenotípica em acessos de *Lippia alba* (Verbenaceae)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil.

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.

VEILLEUX, R.E.; LAUER, F.I. 1981. Variation for 2n pollen production in clones of *Solanum phureja* Juz. And Buk. **Theoretical and Applied Genetics**, **59**: 95-100.

VERONESI, F., A. MARIANI, A.; BINGHAM, E.T. 1996. Unreduced gametes in diploid *Medicago* and their importance in alfalfa breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, **72**: 17- .41.

VICINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; SOUZA DA COSTA, D. C.; DA COSTA ROMANEL, E.; SOUSA, S. M.; PEREIRA PEIXOTO, P. H.; GONÇALVES SALIMENA, F. R. 2006. Chromosome numbers in *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, **256**: 171-178.

VIANA. A.J.C.; SOUZA, M.M. 2012. Comparative Cytogenetics between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensis*. **Plant Biology** **14**: 820–827.

WAN, T.; ZHANG, X.; GREGAN, J.; ZHANG, Y.; GUO P.; GUO, Y. 2012. A dynamic evolution of chromosome in subgenus *Potamogeton* revealed by physical mapping of rDNA loci detection. **Plant Systematics and Evolution**, **298 (6)**: 1195-1210.

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

WEIL, C.F.; WESSLER, S.R. 1993. Molecular evidence that chromosome breakage by Ds elements is caused by aberrant transposition. **Plant Cell** **5**: 512–522.

WEISS-SCHNEEWEISS H, SCHNEEWEISS GM, STUESSY TF, MABUCHI T, PARK JM, JANG CG, SUN BY. 2007. Chromosomal stasis in diploids contrasts with genome restructuring in auto- and allopolyploid taxa of *Hepatica* (Ranunculaceae). **New Phytologist** **174**: 669–682.

WEISS-SCHNEEWEISS H., TREMETSBERGER K., SCHNEEWEISS G.M., PARKER J.S., STUESSY T.F. 2008. Karyotype diversification and evolution in diploid and polyploid South American *Hypochaeris* (Asteraceae) inferred from rDNA localization and genetic fingerprint data. **Annals of Botany**, **101**: 909–918.

WENDEL, J.F. 2000. Genome evolution in polyploids. **Plant Molecular Biology**, **42**: 225-249.

YAMAMOTO, M.; TOMINAGA, S. 2003. High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. **Euphytica**, **129**: 267-274.

YAMAMOTO, P.Y. **Interação Genótipo X Ambiente na Produção e Composição de Óleos Essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E.Br.** Dissertação de Mestrado. Instituto Agronômico (IAC), Campinas, 2006

YAN, G.; FERGUSON, A.R.; McNEILAGE, M.A.; et al. 1997. Numerically unreduced (2n) gametes and sexual polyploidization in Actinidia. **Euphytica, Wageningen, 96: 267-272.**