

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Shaiany Sabrina Lopes Gomes

**CITOGENÉTICA, QUANTIDADE DE DNA E INDUÇÃO DE
POLIPLOIDIA *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**

Juiz de Fora
2013

Shaiany Sabrina Lopes Gomes

**Citogenética, Quantidade de DNA e indução de poliploidia em
Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen**

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 obtenção do grau de Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Juiz de Fora
2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gomes, Shaiany Sabrina Lopes.

Citogenética, quantidade de DNA e indução de poliploidia em *Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen / Shaiany Sabrina Lopes Gomes. -- 2013.
118 p. : il.

Orientador: Lyderson Facio Viccini

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2013.

1. *Pfaffia glomerata*. 2. ginseng brasileiro. 3. FISH. 4. quantidade de DNA. 5. poliploide. I. Viccini, Lyderson Facio, orient. II. Título.

Dedicatória

Aos meus pais José Pinto Gomes (*in memoriam*) e Engracia Maria Lopes,
exemplos de perseverança, amor infinito, incentivo e dedicação integral.

AGRADECIMENTOS

Minha sincera gratidão,

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida, guiando minhas escolhas para o melhor desfecho possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro no projeto e congressos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biotecnologia, pela oportunidade de realizar o curso para obtenção do Título de Mestre.

Aos professores do Programa de Pós-graduação, pelos ensinamentos.

Ao Professor Doutor Lyderson Facio Viccini, pela orientação neste projeto. Por sua inteira disponibilidade traduzida em ajuda, paciência e grandes ensinamentos. Pela confiança em mim depositada e por ser um exemplo de profissional.

Ao Professor Doutor José Marcello Salabert de Campos pelos conselhos ao longo da minha formação e pelo aprendizado.

Ao Professor Doutor Carlos Magno da Costa Maranduba pelos conselhos e boas conversas.

Ao Professor Doutor Wagner Campos Otoni por ceder o material vegetal para o estudo e mostrar-se sempre disposto a colaborações.

À professora Doutora Nádia Rezende Barbosa Raposo pela atenção, suporte e orientação na análise química.

À Doutora Pâmela Souza, que apesar do pouco tempo de convívio, tem se mostrado atenciosa e amiga.

Ao Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos pela colaboração no processo de transformação das bactérias *E. coli*.

Aos colegas do curso de Pós-graduação pelos momentos compartilhados em sala de aula, laboratórios ou fora deles.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia da UFJF, pelo convívio e troca de saberes. Em especial agradeço aos colegas de trabalho

Aryane Campos Reis e Saulo Marçal de Sousa pela parceria nos experimentos. E ao futuro farmacêutico Francisco, que sempre esteve disposto a esclarecer minhas numerosas dúvidas de Química.

Aos alunos de Iniciação Científica pela colaboração na execução dos experimentos e pelas boas risadas compartilhadas.

À amiga Camila Siqueira Neves presente em todos os momentos, sejam eles de estudo, de trabalho, de angústias, de ansiedade, de vitórias, de festejos e conquistas... Momentos únicos vividos durante esses dois anos que ficarão guardados comigo como prova de uma grande amizade.

Aos amigos que tanto prezo Rachid e Cristiane, que mesmo distantes, estiveram presentes com conversas de incentivo ou desespero coletivo durante esta caminhada!

À minha madrinha Andressa Demolinari por seu carinho e amizade.

Às minhas irmãs Schubertiana Lopes e Luzimar Gomes pelo incentivo e por acreditarem na minha caminhada.

Aos meus pais, José Pinto Gomes (*in memoriam*) e Engracia Maria Lopes, pela benção da vida e pelo amor incondicional a mim dedicado. Em especial, agradeço à minha MÃE por estar sempre comigo me apoiando a cada passo. Por ser a minha motivação, a minha força e o meu porto seguro!

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o êxito desta pesquisa.

"O sucesso é a soma de pequenos esforços –
repetidos dia sim, e no outro dia também."

Robert Collier

RESUMO

GOMES, S. S. L. CITOGENÉTICA, QUANTIDADE DE DNA E INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

O gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae) compreende 33 espécies distribuídas na Região Neotropical. Graças a algumas substâncias químicas encontradas no gênero que se assemelham às aquelas encontradas no gênero *Panax* (ginseng coreano), a espécie *Pfaffia glomerata* é conhecida como “ginseng brasileiro”. Tal planta é utilizada como tônico, afrodisíaco, rejuvenescedor, anti-fadiga, anti-estresse e contra distúrbios gástricos. Suas propriedades medicinais são atribuídas a compostos encontrados principalmente em suas raízes tuberosas, sendo a β -ecdisona a mais visada pela indústria farmacêutica e cosmética. Apesar de sua importância econômica e medicinal, são poucos os estudos que investigam características genéticas da espécie. Neste trabalho foram feitas análises citométricas e cromossômicas de fáfias diploide e poliploide induzida. A poliploidização se deu por duplicação cromossômica *in vitro* com uso de agentes antimitóticos (colchicina e orizalina) em diferentes concentrações e tempo de exposição. A quantidade de DNA encontrada foi de 2,41 pg ($2n=34$) e 4,79 pg ($2n=68$). O genoma de *P. glomerata* diploide e tetraploide foi analisado por técnicas de coloração convencional e coloração diferencial dos cromossomos por bandamento com CMA₃/DA/DAPI e FISH para DNAr. Embora os cromossomos da espécie sejam pequenos, foi possível identificar suas constrições primárias e encontrar um par de cromossomos com satélite no representante diploide e dois pares no poliploide. Foram montados cariogramas e idiogramas, sendo que as fórmulas cariotípicas foram: 16M + 1SM para o genoma $2n=34$ e 32M + 2SM para o genoma $2n=68$. Os núcleos interfásicos mostraram-se reticulados. Através do bandamento com CMA₃/DA/DAPI observou-se que todos os cromossomos possuem bandas centroméricas DAPI⁺, indicando uma região heterocromática ao redor dos centrômeros. Foi localizada uma banda CMA⁺ no braço curto de um dos cromossomos, sendo registrada diferença na extensão da banda entre os homólogos. O emprego da FISH com as sequências de DNAr 45S e 5S, gerou para cada tipo de sonda, dois sinais em um par de homólogos para o genoma diploide e quatro sinais no genoma poliploide. Os cromossomos homólogos apresentaram heteromorfismo para as regiões de DNAr investigadas. O teor de β -ecdisona presente no extrato metanólico das raízes de fáfia com quatro meses de cultivo, foi de 0,32% para a planta diploide e 0,48% para a poliploide sugerindo um aumento de 50% na produção do composto no poliploide quando comparado com seu diploide. A estrutura do grão de pólen, determinada por acetólise Erdtman, mostrou-se estável entre acessos diploides da espécie. Este é o primeiro relato da quantidade de DNA no gênero *Pfaffia*. Também são inéditos os dados obtidos por FISH com sondas para DNAr 45S e 5S para a *P. glomerata* diploide e poliploide. Os resultados da quantificação do teor de β -

ecdisona sugerem a duplicação cromossômica como alternativa para incremento do valor econômico da espécie.

Palavras-chave: *Paffia glomerata*, “ginseng brasileiro”, FISH, quantidade de DNA, poliploide, colchicina.

ABSTRACT

GOMES, S. S. L. CYTOGENETICS, DNA content AND INDUCTION POLYPLOIDY IN *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen Dissertation (Master in Biological Sciences) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

The genus *Pfaffia* (Amaranthaceae) comprises 33 species distributed in the neotropics. Thanks to some chemicals found in the genus that resemble those found in the genus *Panax* (Korean ginseng), the species *P. glomerata* is known as "Brazilian ginseng". *P. glomerata* is commonly used as tonic, aphrodisiac, rejuvenator, anti-fatigue, anti-stress and against gastric disorders. Its medicinal properties are attributed to the compounds mainly found in their tuber roots, being the β -ecdysone the most explored by the pharmaceutical and cosmetic industries. Despite its economical and medicinal importance, few studies have been done to investigate the genetic aspects of the species. In this work, cytometric and chromosomal analyzes were made with diploid and induced polyploid of *P. glomerata*. The polyploidization occurred by *in vitro* chromosome doubling, using antimitotic agents (colchicine and oryzalin) at different concentrations and exposure times. Flow cytometry analysis showed 2.41 pg ($2n = 34$) and 4.79 pg ($2n = 68$) of DNA amounts. Both *P. glomerata* diploid and tetraploid were analyzed by conventional staining techniques and chromosomal differential staining by CMA3/DA/DAPI banding and rDNA FISH. In spite of the small sizes of chromosomes, it was possible to identify their primary constrictions and a pair of satellites chromosomes in the diploid and two pairs in the polyploid. Karyograms and idiograms were assembled. Karyotypic formulas were $16M + 1SM$ considering the $2n = 34$ genome and $32M + 2SM$ considering $2n = 68$. The interphase nuclei seem to be reticulated. The fluorochrome CMA3/DA/DAPI banding revealed all chromosomes with centromeric DAPI⁺ bands indicating a heterochromatic region around the centromeres. A CMA⁺ band, with different extension between the homologous was observed on the short arm of one chromosome pair. The FISH technique with rDNA 45S and 5S sequences revealed two signals to each probe for the diploid genome and four signals in the polyploid genome. Homologous chromosomes are heteromorphic when considering the rDNA regions here investigated. The content of β -ecdysone present in the methanol extract of the roots of *P. glomerata* with four months of cultivation was 0.32% for the diploid and 0.48% for the tetraploid suggesting an increase of 50% on the tetraploid comparing with the diploid. Pollen structure was determined by Erdtman acetolysis, and no differences were observed between diploid accessions. This is the first report of DNA amount in the genus *Pfaffia* and data obtained with FISH using 45S and 5S rDNA probes have not been published elsewhere. The β -ecdysone

quantification suggests that chromosome duplication is an alternative to increase the economical value of the species.

Key-words: *Pfaffia glomerata*, "Brazilian ginseng"; FISH, DNA amount; polyploidy; colchicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Acessos de <i>Pfaffia glomerata</i> em diferentes estágios de desenvolvimento	38
Figura 2.	Acessos de <i>Pfaffia glomerata</i> em casa de vegetação após seis meses de cultivo em substrato Plantmax®	39
Figura 3.	Histograma representativo da quantidade de DNA de <i>Pfaffia glomerata</i> . Resultado obtido por análise simultânea de folhas de <i>Pfaffia glomerata</i> e <i>Solanum lycopersicum</i> (2C=1,96 pg, DOLEŽEL et al., 1998) coradas com iodeto de propídeo. Os picos “A” e “B” representam G ₀ /G ₁ de <i>S. lycopersicum</i> e <i>P. glomerata</i> respectivamente. Os picos “a” e “b” ilustram G ₂ de <i>S. lycopersicum</i> e <i>P. glomerata</i> respectivamente	47
Figura 4.	Metáfase mitótica de <i>Pfaffia glomerata</i> corada com Giemsa. A seta indica a constrição secundária distendida	52
Figura 5.	Técnica de bandeamento cromossômico aplicada aos cromossomos de <i>Pfaffia glomerata</i>	58
Figura 6.	Técnica de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sondas para DNAr 45s e 5S aplicada aos cromossomos de <i>Pfaffia glomerata</i>	58
Figura 7.	Características cariotípicas de <i>P. glomerata</i>	60
Figura 8.	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) em metáfase mitótica de <i>Pfaffia glomerata</i> . Sítios de DNAr 5S (marcações pseudo colorizadas em verde) e 45S (marcações em vermelho)	62
Figura 9.	Pólenes maduros de <i>Pfaffia glomerata</i> obtidos pela técnica de acetólise. A coluna da esquerda mostra em detalhes o retículo de cada pólen. A coluna da direita ilustra os grãos de pólen de cada população em corte ótico	65
Figura 10	Histograma representativo da quantidade de DNA obtida por análise simultânea de folhas de <i>Pfaffia glomerata</i> e <i>Pisum sativum</i> coradas com iodeto de propídeo, com uso do tampão de lise celular LB01.....	85
Figura 11	Histograma representativo da quantidade de DNA obtida por análise simultânea de folhas do poliploide induzido <i>in vitro</i> de <i>Pfaffia glomerata</i> e do padrão de referência <i>Pisum sativum</i> coradas com iodeto de propídeo, com uso do tampão de lise celular LB01	85

Figura 12	Metáfase mitótica do poliploide induzido de <i>P. glomerata</i> corada com Giemsa	87
Figura 13	Bandeamento cromossômico em <i>P. glomerata</i> poliploide induzido	91
Figura 14	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sonda para DNAr 45s e 5S em cromossomos de <i>P. glomerata</i> poliploide induzido..	91
Figura 15	Características cariotípicas do poliploide induzido in vitro de <i>P. glomerata</i>	92
Figura 16	Cromatograma obtido por HPLC para a substância química de referência - padrão de β -ecdisona (Sigma Aldrich)	94
Figura 17	Cromatograma obtido por HPLC para a amostra do extrato metanólico de raízes de <i>P. glomerata</i> $2n=34$ na concentração de 1 mg.ml^{-1} . O pico indica a presença de β -ecdisona	94
Figura 18	Cromatograma obtido por HPLC para a amostra do extrato metanólico de raízes de <i>P. glomerata</i> $2n=68$ na concentração de 1 mg.ml^{-1} , mostrando a presença de β -ecdisona	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de indivíduos e procedência de quatro populações de <i>Pfaffia glomerata</i>	37
Tabela 2	Solução para hibridização <i>in situ</i> fluorescente em cromossomos de <i>Pfaffia glomerata</i>	44
Tabela 3	Média das estimativas da quantidade de DNA (pg) de acessos de <i>Pfaffia glomerata</i> obtidas a partir de três repetições	48
Tabela 4	Relação de distância entre as populações de <i>Pfaffia glomerata</i> expressa em quilômetros (Km)	50
Tabela 5	Dados morfométricos médios dos cromossomos de <i>Pfaffia glomerata</i>	55
Tabela 6	Valores médio obtidos por análise da morfometria polínica de <i>Pfaffia glomerata</i>	63
Tabela 7	Morfometria polínica de acessos de <i>Pfaffia glomerata</i> de quatro populações brasileiras	64
Tabela 8	Solução para hibridização <i>in situ</i> fluorescente em cromossomos de <i>Pfaffia glomerata</i>	79
Tabela 9	Efeito de diferentes concentrações de colchicina e orizalina na indução <i>in vitro</i> de poliploidia em <i>Pfaffia glomerata</i>	83
Tabela 10	Quantidade de DNA para o acesso 22 diploide e poliploide de <i>P. glomerata</i>	84
Tabela 11	Dados morfométricos médios do cariótipo poliploide induzido de <i>Pfaffia glomerata</i>	88
Tabela 12	Tempo de retenção (TR) e área do pico (mA) obtidos através dos cromatogramas gerados para a substância química de referência (SQR) e para os extratos metanólicos de raízes de <i>P. glomerata</i>	93

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Grau de Assimetria do Cariótipo
Ai	Assimetria de cada Cromossomo
Alt.	Altitude
AMD	Actinomicina D
ANOVA	Análise de Variância
AT	Adenina e Timina
BC	Braço Curto
BL	Braço Longo
BR	Brometo de Etídeo
CC	Classificação do Cromossomo
CG	Citosina e Guanina
CLH	Comprimento do Lote Haploide
Cm	Centímetro
CMA ₃	Cromomicina A ₃
CR	Comprimento Relativo do Cromossomo
CT	Comprimento Total do Cromossomo
CV	Coefficiente de Variação
ddH ₂ O	Água Destilada e Deionizada
DA	Distamicina
DAPI	4`6-diamino-2-phenylindole
DE	Diâmetro Equatorial
DNA	"Deoxyribonucleic Acid" - Ácido Desoxirribonucléico
DNAr	DNA Ribossomal
DP	Diâmetro Polar
ET	Espessura Total da Exina
FISH	"Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization"- Hibridização Fluorescente <i>In Situ</i>
G	Grama
GISH	" <i>Genomic In Situ</i> Hybridization"- Hibridização Genômica <i>In Situ</i>
IC	Índice Centromérico
IP	Iodeto de Propídeo
HCl	Ácido Clorídrico
HIS	" <i>In Situ</i> Hybridization"- Hibridização <i>In Situ</i>
HPLC	"High Performance Liquid Chromatograph"- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
M	Metacêntrico
M	Molar
M	Metro
mA	Miliabsorvância
Mb	Mega Pares de Bases de Nucleotídeos
MG	Miligrama
Mm	Milímetro
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
N	Número Haploide de Cromossomas
Ng	Nanogramas

NIQUA	Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica
Nm	Nanômetro
L	Litro
Lat.	Latitude
Long.	Longitude
P	População
pg.	Picogramas
R	Relação entre Braços
RAPD	<i>"Random Amplified Polymorphic DNA"</i> – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
RNA	<i>"Ribonucleic acid"</i> - Ácido Ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
RON	Região Organizadora de nucléolo
SSC	NaCl 3M/Citrato Trissódico.2H ₂ O 0,3M
SM	Submetacêntrico
SQR	Substância Química de Referência
TRITC	<i>"Rhodamine isothiocyanate Tetramil"</i> - Tetramil Rodamina Isotiocianato
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFV	Universidade Federal de Viçosa
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
8-HQ	8-Hidroxiquinoleína
°C	Graus Celsius
Σ	Somatório

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	PLANTAS MEDICINAIS E SUA IMPORTÂNCIA	20
1.2	FAMÍLIA AMARANTHACEAE E O GÊNERO <i>Pfaffia</i>	22
1.3	<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) PEDERSN: CARACTERIZAÇÃO, OCORRÊNCIA, ASPECTOS BIOLÓGICOS E APLICAÇÃO NA MEDICINA POPULAR	23
CAP I	CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA, POLÍNICA E QUANTIDADE DE DNA EM <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen	28
1	INTRODUÇÃO	28
1.1	ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO	29
1.2	CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR NA CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS	31
1.3	ESTUDO DOS GRÃOS DE PÓLEN	34
2	OBJETIVOS	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	37
3.2	ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO	39
3.3	ANÁLISE CITOGENÉTICA	40
3.3.1	Preparo de lâminas	40

3.3.2	Morfometria cromossômica	41
3.3.3	Bandeamento cromossômico com CMA ₃ /DA/DAPI	41
3.3.4	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	42
3.4	ESTUDO DOS GRÃOS DE PÓLEN	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA DE <i>Pfaffia glomerata</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO	46
4.2	MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA	51
4.3	LOCALIZAÇÃO DE BANDAS CMA ₃ e DAPI E DE SÍTIOS DE DNAr 45S E 5S EM <i>Pfaffia glomerata</i>	56
4.4	ESTRUTURA DOS GRÃOS DE PÓLEN	63
5.	CONCLUSÕES	67
CAP II CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POLIPLOIDES		
	INDUZIDOS DE <i>Pfaffia glomerata</i>	69
1	INTRODUÇÃO	69
1.1	POLIPLOIDIA COMO FERREMENTA PARA O MELHORAMENTO DE PLANTAS	70
1.2	CONTRIBUIÇÕES DE ANÁLISES CITOLÓGICAS PARA O MELHORAMENTO DE PLANTAS	71
2	OBJETIVOS	72
3	MATERIAL E MÉTODOS	73
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	73
3.2	INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA <i>IN VITRO</i>	74
3.3	DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA POR CITOMETRIA DE FLUXO	74

3.4	ANÁLISE CITOGENÉTICA	75
3.4.1	Morfometria cromossômica	76
3.4.2	Bandeamento cromossômico com CMA ₃ /DA/DAPI	76
3.4.3	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	77
3.5	QUANTIFICAÇÃO DE β-ECDISONA	80
3.5.1	Preparo do extrato metanólico de raízes	80
3.5.2	Análise do extrato metanólico por HPLC	81
4	RESULTADOS E DUSCUSSÃO	82
4.1	EFEITO DO CULTIVO EM MEIO CONTENDO COLCHICINA OU ORIZALINA	82
4.1	NÍVEL DE PLOIDIA E QUANTIDADE DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO	84
4.3	CARATERIZAÇÃO CITOGENÉTIA DO POLIPLOIDE INDUZIDO	86
4.4	QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE β-ECDISONA NAS RAÍZES TUBEROSAS	93
5	CONCLUSÕES	97
6	REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Plantas medicinais e sua importância

De acordo com a Organização Mundial de Saúde uma planta medicinal é qualquer planta que possua em um ou em vários de seus órgãos substâncias usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos exclusivamente a partir de matérias-primas ativas vegetais (ANVISA, 2013).

A demanda por medicamentos à base de plantas medicinais vem crescendo mundialmente e os motivos são variados. Nos países desenvolvidos, a fitoterapia é vista como alternativa mais saudável, ou menos danosa, para o tratamento de patologias. Nos países em desenvolvimento, o baixo custo em relação aos medicamentos farmacológicos (FREITAS, 2007), alia-se ao seu reduzido efeito colateral (MATTOS et al., 2007).

Como consequência da valorização mundial do uso de plantas medicinais, aumentou-se também a exploração exercida sobre alguns destes recursos naturais e a tendência é que este quadro se agrave, pois o extrativismo comercial das plantas fitoterápicas aparece como alternativa de renda para as populações que vivem em áreas de proteção ambiental (MONTANARI JÚNIOR, 2002; CORRÊA JÚNIOR et al., 2006).

Neste contexto, a América Latina merece destaque por possuir mais de 60% da biodiversidade mundial. Na lista dos 25 países mais ricos em biodiversidade vegetal, oito deles são da América Latina (Brasil, México, Colômbia, Equador, Venezuela, Panamá, Paraguai e Argentina). Considerando a biodiversidade como fonte de inspiração para a inovação e também para isolamento de substâncias biologicamente ativas (BARREIRO e MANSSOUR, 2008), torna-se claro que o uso sustentado da biodiversidade é importante para tais países (GUPTA, 2001).

Na busca por novas fontes de princípios ativos, a etnobotânica tem papel muito importante, uma vez que boa parte das plantas nas quais foram identificados princípios ativos foram determinadas com base no seu uso popular (ELISABETSKY e SOUZA, 2004; GURIB-FAKIM, 2006; MANZALI DE SÁ, 2006). Este fato tem sua importância aumentada se considerarmos que, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, 80% da população do planeta, principalmente nos países em desenvolvimento, faz uso de fitoterápicos como forma de atenção primária à saúde. No Brasil, a fitoterapia é prática terapêutica incentivada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2007), devido à sua comprovada eficiência e baixo custo operacional para os cofres públicos.

Grande parcela dos brasileiros recorre às plantas medicinais como terapia alternativa para combater uma série de doenças. A fim de atender a essa demanda, fitoterápicos são comercializados em feiras livres, mercados populares ou mesmo cultivados em quintais residenciais (MENGUE et al., 2001; RITTER et al., 2002; MENDONÇA-FILHO e MENEZES, 2003; PEREIRA et al., 2004; VENDRUSCOLO et al., 2005; CARLINI et al., 2006; AGRA et al., 2007; BIAVATTI et al., 2007).

Assim, as plantas com potencial medicinal ganham cada vez mais espaço em estudos farmacológicos, químicos e taxonômicos que visam o maior aproveitamento de seus princípios ativos, além do uso consciente (MING, 1999; LORENZI e MATOS, 2002; AGRA et al., 2007).

Tais estudos justificam-se pelo fato de que a qualidade das plantas medicinais é dependente da identificação correta da espécie e, posteriormente, do seu plantio, colheita, beneficiamento e do preparo dos medicamentos ou extratos vegetais (CASTRO et al., 2004). Diversos fatores influenciam na qualidade final do produto, como: características genéticas da planta, variações climáticas, tipo de solo, época de plantio, condições de secagem, tempo de armazenamento, entre outros (KAMADA et al., 1999; CASTRO et al., 2004).

Dentre as várias espécies brasileiras com aplicação medicinal, destaque vem sendo dado à *Pfaffia glomerata*, que conta com algumas substâncias químicas, principalmente ecdisteroides muito similares àqueles encontrados no

gênero *Panax* ("ginseng coreano" - Araliaceae). Em função disso, tem sido chamada popularmente de "ginseng brasileiro". Também é conhecida como para-tudo, suma, corango ou simplesmente "fáfia" (BERG, 1982; LORENZI e MATOS, 2002; CORRÊA JÚNIOR et al., 2003).

1.2 Família Amaranthaceae e o gênero *Pfaffia*

A família Amaranthaceae Juss., classificada com base em características morfológicas e dados moleculares, pertence à ordem Caryophyllales (JUDD et al., 1999; BARROSO et al., 2002; APG, 2003; JUDD et al., 2008; SOUZA e LORENZI, 2008). Possui distribuição cosmopolita, exceto nas regiões mais frias do Hemisfério Norte, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais da América e África (VASCONCELLOS, 1982; SIQUEIRA, 2004). É formada por 170 gêneros e 2000 espécies (SOUZA e LORENZI, 2008). Para o Brasil são citados 19 gêneros nativos e aproximadamente 145 espécies (MARCHIORETTO et al., 2012).

Os representantes da família variam muito quanto à morfologia. O hábito é variado, predominantemente são ervas, subarbustos, arbustos ou trepadeiras, anuais ou perenes (SIQUEIRA, 2002; SOUZA e LORENZI, 2005). Ocorrem em diversos ambientes, como campos rupestres, cerrados, beira de matas, restingas, terrenos baldios e cultivados, sendo mais comuns em ambientes abertos, embora algumas espécies sejam encontradas no interior de florestas, principalmente em locais sob influência antrópica (SIQUEIRA, 2002; SOUZA e LORENZI, 2005).

Dentro de Amaranthaceae está o gênero *Pfaffia*, com cerca de 33 espécies e que, após revisão taxonômica do gênero no Brasil, registra 20 espécies de origem nativa (MARCHIORETTO et al., 2010).

O gênero distribui-se na Região Neotropical, estendendo-se do sul do México através dos trópicos, incluindo a Bacia Amazônica até Baía Blanca, Argentina (BORSCH, 1995). Ocorre em ambientes tais como bordas de

florestas, margens de rios e campos rupestres (SIQUEIRA, 1988; MIOTTO e SIQUEIRA, 2009).

As “fáfias” são consideradas de importância ornamental, alimentar e medicinal, especialmente aquelas denominadas como “ginseng brasileiro”, entre as quais estão *P. glomerata*, *P. gnaphalioides* (L. f.) Mart., *P. iresinoides* (Kunth) Spreng., *P. paniculata* (Mart.) O. Kuntze [(*Hebanthe paniculata* (Mart.)] e *P. tuberosa* (Spreng.) Hicken.

Com base em dados etnobotânicos, as raízes e folhas dessas plantas têm sido utilizadas como estimulantes gerais (SIQUEIRA, 1987; SILVA JÚNIOR e OSAIDA, 2005). O uso dessas espécies despertou o interesse no Japão e na Europa, que importam grandes quantidades da planta (CORRÊA JÚNIOR et al., 2002). Dados recentes demonstram que, de janeiro a maio de 2012, foram exportadas quase duas toneladas de raízes de “ginseng brasileiro” (MDIC, 2012).

Plantas do gênero *Pfaffia* tiveram suas propriedades medicinais comprovadas cientificamente depois de estudadas no Japão e submetidas à análise no “Laboratório Rhoto Pharmaceutical Co. Ltda” (MASCHIO, 1993). A partir de então, vários estudos sobre constituintes químicos de diversas espécies do gênero foram desenvolvidos (SHIOBARA et al., 1993; PARIS et al., 2000; VIGO et al., 2003; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008; LEAL, et al., 2010).

Dentre as várias espécies de “fáfia”, merece destaque *Pfaffia glomerata*, que há séculos tem sido utilizada pela população brasileira como planta medicinal, desde nossos ancestrais indígenas da Amazônia (LORENZI e MATOS, 2002).

1.3 *Pfaffia glomerata*: caracterização, ocorrência, aspectos biológicos e aplicação na medicina popular

Pfaffia glomerata é uma espécie muito variável e difundida no sul da América tropical e subtropical (Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai)

(MARCHIORETTO et al., 2010). Particularmente no Brasil, é nativa nos estados do Paraná, Mato Grosso e São Paulo (SIQUEIRA e GRANDI, 1986; CORRÊA JÚNIOR, 2003).

Pedersen (1987), quando descreveu a espécie para a “Flora de Entre Rios (Argentina)”, ressaltou que *P. glomerata* é uma planta bastante variável, apresentando hábito subarbuscivo ao longo da beira de rios e herbáceo, de menor porte, no interior de montes. Entretanto, Ribeiro e Pereira (1994) e Bentes (2000) relataram que esta espécie se desenvolve sem problemas em solos drenados, tanto argilosos, quanto arenosos. Adapta-se bem em altitudes de até 1000 m, assim como em regiões com precipitação pluviométrica entre 1200–1500 mm anuais (CORRÊA JÚNIOR et al., 2002). Sua ampla distribuição geográfica com condições climáticas e edáficas diferentes contribui para a ocorrência de considerável variação morfológica (MAGALHÃES, 2000).

A espécie possui como sinônimos *P. glauca* (Mart.) Spreng., *P. luzulaeflora* (Mart.) D. Dietr., e *P. stenophylla* (Spreng.) Stuchlik (BERG, 1982; SIQUEIRA, 1988), *P. dunaliana* (Moq.) Schinz (SIQUEIRA, 1988), além de *Iresine glomerata* (Spreng.) Pedersen; *Gomphrena stenophylla* Spreng.; *Sertuenera glauca* Mart.; *Sertuenera luzulaeflora* Mart.; *Gomphrena luzulaeflora* (Mart.) Moq.; *Gomphrena glauca* (Mart.) Moq. (BERG, 1982).

O interesse comercial por *Pfaffia glomerata* está associado principalmente às suas raízes tuberosas, que são usadas na medicina popular como anti-reumáticas, anti-inflamatórias, analgésicas (NICOLOSO, 1999), anti-tumorais, anti-diabetes, tônico afrodisíaco (MAGALHÃES, 2000), anti-cancerígeno, no combate a distúrbios gástricos (FREITAS et al., 2004) e de doenças relacionadas à memória, ao estresse e ao envelhecimento (TASCETTO e PAGLIARINI, 2001). Essas propriedades são atribuídas às substâncias como ácido oleanólico, β -glicopiranosil oleanolato, ecdisterona, rubrosterona, ecdisteroides, ácido glomérico (triterpenoide), ácido pfamérico (nortriterpenoide) e saponinas triterpênicas encontradas nos tecidos da planta (PARIS et al., 2000; VIGO et al., 2003; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008).

Em virtude de seu potencial medicinal e econômico, a espécie tem sofrido intensa exploração predatória nos seus habitats (MING e CORRÊA, 2001). Este fato, aliado à diminuição do seu ambiente natural (consequência da agricultura, expansão urbana, inundações com barragens) coloca em risco suas populações nativas (SEMA-PR, 1995; CORRÊA JÚNIOR, 2003; RIO GRANDE DO SUL, 2003).

Devido à grande semelhança morfológica existente entre algumas espécies de *Pfaffia*, ocorrem problemas na identificação do material que é comercializado em feiras populares e até mesmo o que é usado como matéria prima em medicamentos manipulados. As raízes de várias espécies de *Pfaffia* são comercializadas como “ginseng brasileiro” podendo levar ao uso indevido e consequente ocorrência de efeitos indesejáveis para a população. Estudos têm sido realizados com o objetivo de definir e validar métodos de controle de qualidade, como por exemplo, a quantificação das saponinas em *Pfaffia glomerata* por espectrofotometria (VIGO et al., 2003). Alguns autores enfatizam a necessidade de pesquisas que contribuam para o maior conhecimento da *P. glomerata*, visando fornecer subsídios à conservação e ao manejo sustentável da espécie (MAGALHÃES, 2000; CORRÊA JÚNIOR et al., 2008).

O uso popular acabou por despertar também o interesse do meio científico pelo “ginseng brasileiro”. Sobre a composição química de *Pfaffia glomerata*, as principais substâncias responsáveis pela atividade biológica da espécie são os ecdisteroides, sendo a β -ecdisona, esteroide análogo a um hormônio de insetos, o mais importante empregado nas formulações cosméticas e na indústria farmacêutica (SHIOBARA et al., 1993; CORRÊA JÚNIOR. et al., 2002; VIGO et al., 2004).

A β -ecdisona tem sido relatada em várias espécies de *Pfaffia*, incluindo *Pfaffia glomerata* (SHIOBARA et al., 1993; GOMES et al., 2010; SERRA, FELIPE e CORTEZ, 2012), *P. paniculata* (Mart.) Kuntze, *P. stenophylla* (Spreng) Stuchlik e *Pfaffia iresinoides* (Kunth) Spreng (FESTUCCI-BUSTELLI et al., 2008). Estas substâncias podem ser usadas como agroquímicos ou fitoterápicos e podem estar envolvidas em processos bioquímicos e fisiológicos tanto em plantas como em animais (FESTUCCI-BUSTELLI et al., 2008).

Foi demonstrada atividade antimicrobiana para extratos de *Pfaffia glomerata* (SCHNEIDER et al., 2008; MOURA et al., 2011) e efeito contra o molusco *Biomphalaria glabrata* e *Leishmania brasiliensis* (ALVIM et al., 1999). Pesquisas psicofarmacológicas visando confirmar o uso da planta como tônico afrodisíaco (MARQUES et al., 2004, FREITAS et al., 2004) e no combate a doenças relacionadas ao envelhecimento, perda de memória e estresse, também já foram conduzidas (MICHIRO et al., 1999; PARIS et al., 2000). O extrato hidroalcoólico das raízes de *P. glomerata* apresenta atividade adaptógena (revigorante) (NICOLODI et al., 2002), enquanto o extrato aquoso das mesmas inibe a secreção ácida e protege a mucosa gástrica contra úlceras (FREITAS et al., 2004; OTOFUJI, 2005). Adicionalmente, o extrato padronizado das raízes é capaz de promover o aprendizado e melhorar a memória de camundongos idosos (MARQUES et al., 2004).

O extrato metanólico, obtido das raízes tuberosas também foi testado quanto à propriedade hipoglicemiante (ALVIM et al., 1999; SANCHES et al., 2001). O efeito de suas raízes no controle do diabetes foi investigado em ratos, revelando efeitos significativos nos parâmetros farmacológicos testados (COSTA et al., 2000). A propriedade anti-diabética também foi avaliada (MONTANARI JÚNIOR, 2005).

O crescimento da importância econômica das raízes de *P. glomerata* gerou interesse nos agricultores que passaram a ver na espécie uma nova opção agrícola. Este fato, por sua vez, fez com que pesquisadores da área agrônômica também voltassem sua atenção para o “ginseng brasileiro”. Assim, ao longo dos últimos anos, propagação e cultivo *in vitro* (OLIVEIRA, 1998; RUSSOWSKI e NICOLOSO, 2003; GUPTA et al., 2011; IAREMA et al., 2012), aclimatização (SKREBSKY et al., 2006), ciclo, produtividade (CORRÊA JÚNIOR. et al., 2002), manejo da cultura e reprodução da espécie (NICOLOSO et al., 1999; NICOLOSO et al., 2001) vêm sendo bastante estudados.

Sobre a variação fenotípica, Figueiredo et al. (2002) analisaram 23 acessos oriundos das várias regiões do Brasil, avaliando o peso fresco e seco da parte aérea e da raiz, o número de folhas, o índice de colheita e o teor de β -

ecdisona, tendo encontrado diferença significativa para todas as variáveis, entre todos os acessos.

A diversidade genética de quatro populações brasileiras de *Pfaffia glomerata* foi avaliada por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), caracteres morfológicos e teor de β -ecdisona, indicando que não é recomendável utilizar apenas um tipo de característica, seja ela fenotípica ou molecular, para estimar a diversidade genética, uma vez que as correlações entre as distâncias genéticas de cada característica foram baixas para *P. glomerata* (KAMADA, 2006; KAMADA et al., 2009).

Do ponto de vista citogenético, o número de cromossomos, o comportamento meiótico e a fertilidade do pólen de populações de *P. glomerata* foram estudados através de citogenética clássica (TASCETTO e PAGLIARINI, 2001; 2003). Esses autores encontraram $2n=32$, 33 e 34 cromossomos, com um par de constrições secundárias e núcleo interfásico arreticulado. Entretanto, não foram apresentados detalhes do cariótipo de *P. glomerata*.

Apesar das numerosas informações geradas para a espécie, trabalhos que incluam técnicas de bandeamento cromossômico com fluorocromos 4'-diamino-2-phenylindole (DAPI) e cromomicina (CMA_3), estudos de citogenética molecular como hibridação fluorescente *in situ* (FISH), e determinação da quantidade de DNA ainda não foram realizados com a espécie *Pfaffia glomerata*.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi obter um representante poliploide do “ginseng brasileiro” por indução de duplicação cromossômica *in vitro*. Buscou-se também caracterizar cromossomicamente representantes diploide e poliploide induzido da espécie, além de comparar o teor de β -ecdisona nas raízes de *Pfaffia glomerata* com diferentes ploidias.

CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA, POLÍNICA E QUANTIDADE DE DNA EM *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país rico em plantas que se destacam por suas propriedades medicinais capazes de auxiliar no tratamento de uma grande variedade de doenças, tais benefícios devem-se aos constituintes químicos sintetizados por tais vegetais. Um grupo importante de plantas utilizadas na medicina popular brasileira é o das “fáfias”, espécies do gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae), que têm sido utilizadas como alternativa ao “ginseng coreano”, *Panax ginseng* (Araliaceae) (RATES e GOSMANN, 2002).

Pfaffia glomerata, uma das plantas reconhecidas como “ginseng brasileiro”, ganhou espaço no comércio nacional principalmente por ser considerada fonte do esteroide β -ecdisona (CORRÊA JÚNIOR, 2003).

Trata-se de uma planta perene, que geralmente ocorre em orlas de matas e beiras de rios, podendo ser propagada por estacas e sementes. Suas flores são hermafroditas e quanto à sua reprodução não está claramente definida como planta alógama ou autógama (MONTANARI JÚNIOR, 2005).

A planta vem sendo bastante submetida à coleta predatória, com sério risco de extinção, o que gerou interesse por seu cultivo manejado. A partir de então, estudos indicaram a existência de vários morfotipos e também uma variação, conforme o acesso estudado, na concentração de β -ecdisona, seu princípio ativo presente principalmente nas raízes tuberosas (KAMADA et al., 2009). Tais indicações sugerem uma variação genética entre acessos de *P. glomerata*.

Estudos de citogenética vegetal são valiosos no intuito de fornecer informações a respeito das plantas e mostram-se como ferramenta útil na solução de problemas envolvendo prováveis relações entre famílias, gêneros, espécies e variedades. Seus resultados também podem auxiliar na identificação correta de espécies e servir de subsídio para classificação de grupos vegetais.

Dessa forma, com o intuito de contribuir para o conhecimento da espécie, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar *P. glomerata* a partir de estudos citológicos por citometria de fluxo, citogenética e palinologia.

1.1 Estimativa da quantidade de DNA por Citometria de Fluxo

As estimativas da quantidade de DNA e nível de ploidia, por meio da técnica de citometria de fluxo, contribuem em estudos de problemas taxonômicos, evolutivos (MOSCONE et al., 2003; SUDA et al., 2006; DOLEŽEL et al., 2007; KRON et al., 2007; CAROVIC-STANKO et al., 2010; LEPERS-ANDRZEJEWSKI et al., 2011) e também na caracterização e seleção de plantas de interesse econômico (OCHATT, 2008). Tal método tem se mostrado eficiente na pesquisa do genoma de plantas principalmente pela reprodutibilidade, precisão e rapidez, além de requerer pequenas quantidades de tecido vegetal por amostra (BENNET e LEITCH, 1995; DOLEŽEL et al., 1998; DOLEŽEL, 2007).

A técnica foi inicialmente desenvolvida para contagem e análise rápida de células sanguíneas. A partir da década de 80 começou a ser adaptada para células vegetais (DOLEŽEL, 1997). O procedimento envolve a análise das propriedades óticas de partículas em fluxo, movendo-se em relação ao ponto de medida. As partículas permanecem hidrodinamicamente contidas no centro de um fluxo estreito de líquido e passam por um foco de luz intensa, o que permite a excitação dos fluorocromos presentes nessas partículas. Os pulsos de luz e de fluorescência são colhidos por um sistema de detecção ótica, separados por filtros e convertidos em pulsos elétricos por sensores óticos (DOLEŽEL, 1997).

Quando o material de estudo é de origem vegetal, o processo consiste no isolamento dos núcleos (em geral de tecido foliar) em uma suspensão contendo um tampão de lise celular, coloração dos núcleos suspensos com um fluorocromo e leitura da fluorescência emitida pelos mesmos em um citômetro de fluxo. A fluorescência é proporcional ao conteúdo de DNA, visto que o fluorocromo usado é intercalante de bases nitrogenadas. Um padrão interno, isto é, um material cuja quantidade de DNA é conhecida, permite que os valores relativos sejam convertidos em valores absolutos. Normalmente, são verificados dois picos de fluorescência, aquele dos núcleos 2C (células em G0 e G1) e aquele dos núcleos 4C (células em G2). Os tipos de fluorocromos mais

empregados são o DAPI (diamidino- 2-fenilindol), IP (iodeto de propídio) e BR (brometo de etídio), em concentrações variáveis (BENNET e LEITCH, 1995).

A quantidade de DNA nuclear de um dado organismo, normalmente referida como valor C, expressa o tamanho do seu genoma. O valor C define a quantidade de DNA do lote haploide, não replicado, de um indivíduo. Essa quantidade é expressa em picogramas (pg), ou em mega pares de bases de nucleotídeos, sendo 1 pg = 978 Mb (CROS et al., 1994; DOLEŽEL, 1997).

Apesar de a quantidade de DNA dentro de uma espécie ou dentro de um mesmo indivíduo ser aceita como constante, podem ocorrer exceções. Em muitos casos, ocorre variação intra-específica devido a aneuploidias, presença de cromossomos supranumerários, perdas ou duplicações de segmentos cromossômicos e até mesmo, duplicações do genoma inteiro, como tem sido relatado para *Lippia alba*, que apresenta diferenças em relação ao valor 2n de cromossomos (PIERRE, 2004; 2011). Essas diferenças podem ter grande efeito na quantidade de DNA do genoma de uma espécie (CECCARELLI et al., 1995; OHRI, 1998).

O conteúdo de DNA nuclear em plantas tem sido considerado como um relevante parâmetro para a caracterização genômica, com aplicabilidade em estudos evolutivos, de biodiversidade (KNIGHT e BEAULIEU, 2008) e trabalhos envolvendo marcadores moleculares (BENNET e LEITCH, 2005). O conhecimento do tamanho do genoma de plantas também fornece informações úteis para inúmeras áreas da Ciência, como Biologia Celular, Ecologia, Fitogeografia, Sistemática, Taxonomia e Melhoramento genético (DOLEŽEL et al., 2007; KOLAR et al., 2009).

O gênero *Pfaffia* não conta, até o momento, com qualquer estimativa da quantidade de DNA de seus representantes, seja por citometria de fluxo ou outra metodologia (BENNETT e LEICH, 2012).

Mesmo que a citometria de fluxo seja capaz de detectar variações intra-específicas no conteúdo de DNA de uma espécie, quando, por exemplo, a variação for proveniente de duplicação ou perda de segmentos de um cromossomo, essa metodologia não permite identificar qual dos cromossomos

apresenta tal variação (DOLEŽEL, 1997). Para esse fim, é necessário o emprego de metodologias auxiliares, capazes de identificar em qual par cromossômico está presente a variação. A citogenética neste aspecto é uma ferramenta bastante útil que permite observar irregularidades nos cromossomos traduzidas em alterações numéricas e estruturais dos mesmos (SYBENGA, 1992).

1.2 Citogenética clássica e molecular na caracterização de espécies vegetais

A coloração convencional dos cromossomos fornece parâmetros morfológicos, tais como tamanho dos braços, posição dos centrômeros e localização das constrições secundárias. Entretanto, os padrões cromossômicos revelados por técnicas tradicionais, muitas vezes, são insuficientes para caracterizar de forma detalhada um cariótipo, especialmente quando os cromossomos são pequenos e semelhantes entre si. Dessa forma, para um estudo mais refinado dos cariótipos as técnicas de bandeamento cromossômico surgiram como uma ferramenta útil.

A partir da década de 1980, as técnicas de coloração diferenciada têm permitido uma distinção longitudinal dos cromossomos através do bandeamento C e bandeamento com fluorocromos 4'6-diamino-2-phenylindole (DAPI) e cromomicina (CMA₃). Estas metodologias geram blocos de coloração diferenciada (bandas) que possibilitam maior detalhamento da estrutura e morfologia dos cromossomos individuais em comparação com resultados de coloração convencional (BRASILEIRO-VIDAL e GUERRA, 2002; ZANELA, 2009).

A heterocromatina, definida por Heitz (1928) como segmentos cromossômicos que permanecem condensados durante todo o ciclo celular, é um dos caracteres mais importantes para a descrição dos cromossomos (COELHO, 2009).

Preparações cromossômicas com os fluorocromos DAPI e CMA₃ produzem padrões de bandeamento de acordo com sua afinidade pelas bases

do DNA (SCHWEIZER, 1976). O fluorocromo DAPI destaca regiões heterocromáticas ricas em bases nitrogenadas adenina e timina (AT), enquanto a cromomicina A₃ (CMA₃) apresenta alta afinidade por regiões heterocromáticas ricas guanina e citocina (GC). Para aumentar o nível de contraste entre os fluorocromos, podem ser empregados antibióticos que funcionam como contra-corantes favorecendo a distinção entre as bandas cromossômicas, podem ser usadas, por exemplo, distamicina (DA) e ou actinomicina D (AMD) (ZANELA, 2009).

Os resultados obtidos com o uso desses corantes fluorescentes permitem também um melhor entendimento sobre a origem e evolução dos cariótipos de plantas, já que viabilizam uma comparação entre os padrões de bandas fluorescentes e sua distribuição nos diferentes cromossomos. Tais metodologias contribuíram para o entendimento da evolução de espécies dentro de grupos taxonômicos no caso do gênero *Selaginella* (Pteridophyta) (MARCON et al., 2005) e da espécie *Clivia mirabilis* (MURRAY et al., 2011). Oferece ainda, auxílio na caracterização de espécies e variedades de plantas como no estudo de Citrus (GUERRA, 1993), cultivares de mandioca (GUERRA e CARVALHO, 2002), *Lilium* (SILJAK-YAKOVLEV et al., 2003), *Crinum* (Amaryllidaceae) (AHMED et al., 2004), *Crotalaria juncea* (Fabaceae) (MONDIN et al., 2007), Alismataceae e Limnocharitaceae (FEITOZA et al., 2010). As técnicas de coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI também podem ser usadas para rever a delimitação e propor uma classificação mais estável para grupos taxonômicos como realizado no gênero *Christensonella* (Orchidaceae) (KOEHLER et al., 2008).

A hibridização *in situ* (HIS) é uma das técnicas mais recentes na citogenética e tem sido aplicada na caracterização de espécies vegetais a fim de localizar regiões cromossômicas específicas em plantas silvestres ou cultivadas.

Com esta ferramenta é possível localizar por, meio de sondas, diretamente nos cromossomos, sequências definidas de ácidos nucléicos (DNA ou RNA), genes ribossômicos e sequências repetitivas arranjadas em tandem, tais como as teloméricas e as centroméricas, possibilitando dessa maneira a

construção de mapas físicos dos cromossomos, auxiliando na análise e investigação da estrutura, função e evolução dos mesmos (LEITCH et al., 1994; BRASILEIRO-VIDAL e GUERRA, 2002).

As sondas feitas a partir de sequências repetitivas são as mais utilizadas, pois oferecerem maior facilidade de detecção e sinais mais visíveis. Das sondas de sequências repetitivas, a mais aplicada é a sequência de DNAr 45S, pois é um arranjo altamente conservado e portanto aplicável a todas as espécies de plantas (FLAVELL, 1989; HESLOP-HARRISON, 2000). Também bastante utilizada é a sequência de DNAr 5S (LAWRENCE e APPELS, 1986).

É válido ressaltar, que pela sua relação com as regiões organizadoras de nucléolo (RONs), a localização, o polimorfismo e o número de sítios de DNAr 45S são ferramentas úteis nos estudos de citotaxonomia e evolução cromossômica (HESLOP-HARRISON, 2000; RAINA et al., 2001).

Graças à sua versatilidade, essa técnica pode ser útil em estudos com as mais variadas abordagens. A FISH permite distinguir estruturalmente citótipos similares, inclusive com mesmo número e morfologia cromossômica similar como em *Citrus* (CARVALHO et al., 2005) e grupos aparentemente monofiléticos, como *Passiflora* (MELO e GUERRA, 2003).

Sequências de DNA ribossomal, podem fornecer dados para descrição dos cariótipos e posteriores comparações sobre a evolução das plantas. Tais sequências já foram investigadas em cariótipos de *Silene* (SIROKÝ et al., 2001), *Passiflora* (MELO e GUERRA, 2003), Asteraceae (BAEZA e SCHRADER, 2005), *Lippia alba* e *Lantana camara* (BRANDÃO et al., 2007), *Oryza*, (CHUNG et al., 2008) Alismataceae e Limnocharitaceae (FEITOZA et al., 2010), *Clivia mirabilis* (MURRAY et al., 2011) e *Catharanthus roseus* (GUIMARÃES et al., 2012).

É possível também, mapear nos cariótipos as regiões teloméricas à semelhança do que foi realizado para Alliaceae (SYKOROVÁ et al., 2006) e mesmo identificar genes específicos, como feito no estudo de *Phaseolus vulgaris* (PEDROSA et al., 2003).

Adicionalmente, a partir da localização de regiões organizadoras do nucléolo (RONs) por hibridização *in situ* fluorescente, é possível a determinação da origem poliploide de espécies vegetais como no caso do subgênero *Rosa* (FERNÁNDEZ-ROMERO et al., 2001) e dos gêneros *Hordeum* (TAKETA et al., 2005) e *Iris* (LIM et al., 2007).

Em alguns dos estudos citados acima ficou claro que o uso de metodologias para coloração diferencial de cromossomos é uma ferramenta importante para a diferenciação, caracterização e até mesmo a visualização dos processos evolutivos das espécies. No entanto, para a espécie *P. glomerata* ainda não existem dados publicados sobre sua caracterização cromossômica através de bandeamento com os fluorocromos CMA₃ e DAPI ou mesmo a partir da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

1.3 Estudo dos grãos de pólen

Para a caracterização da biodiversidade vegetal, também pode ser empregada a Palinologia (EDLUND, 2004), que é o estudo dos grãos de pólen, estruturas microscópicas das fanerógamas que transportam a célula reprodutora masculina e que, portanto estão diretamente relacionados com a reprodução e à perpetuação da espécie. O fato da morfologia polínica não estar sujeita às alterações ambientais sendo desta forma bastante estável, torna o estudo dos grãos de pólen altamente eficaz para a Taxonomia Vegetal, colaborando para o entendimento das relações entre os diferentes grupos de plantas, na tentativa de traçar as linhas evolutivas entre os táxons. (VISHNUMITRE e SHARMA 1962; SALGADO-LABOURIAU, 1973).

O exame de polens maduros permite avaliar algumas características anatômicas e fisiológicas importantes, fundamentais para a sua completa maturação e desenvolvimento, tais como: número de núcleos e poros, tamanho do pólen e quantidade de amido (ZANOTTO et al., 2009). Portanto, a variação na estrutura do grão de pólen de uma determinada pode fornecer indícios de variabilidade genética dentro de uma mesma espécie.

Tais estruturas foram estudadas pela primeira vez por Malpighi, em 1670. Este cientista italiano fez observações no pólen principalmente em

relação à sua cor e forma. Alguns outros caracteres morfológicos também possuem grande importância na descrição dos pólenes, destacando-se as aberturas (ERDTMAN, 1966; BARTH e MELLHEM, 1988; PUNT et al., 2007), a estrutura e ornamentação da parede, além da unidade polínica (BARTH e MELLHEM, 1988; BLACKMORE, 2007).

A técnica de preparação polínica mais utilizada nos estudos dos grãos de pólen é a acetólise de Erdtman 1952 (modificada em MELHEM et al., 2003), que consiste na hidrólise ácida aplicada aos grãos de pólen através de uma mistura de anidrido acético e ácido sulfúrico com proporção de 9:1. Nesta técnica objetiva-se a eliminação do conteúdo celular, o que proporciona a visualização e o reconhecimento dos caracteres morfológicos.

Em alguns casos, quando os grãos de pólen são muito frágeis e não resistem à acetólise convencional, utiliza-se a técnica de acetólise láctica de Raynal e Raynal (1971), a qual consiste na diminuição de anidrido acético e no acréscimo de ácido láctico, tornando a mistura acetolítica mais fraca.

Independente da técnica utilizada para a preparação dos grãos de pólen, na maioria das vezes são montadas lâminas com gelatina glicerinada para a observação por microscopia de luz, e tomadas as medidas necessárias. Normalmente são medidos os diâmetros dos grãos de pólen (vertical e horizontal), suas aberturas e sua exina (MELHEM e MATOS, 1972; SALGADO-LABOURIAU, 1973). Assim, pode-se realizar uma análise estatística descritiva com base nas medidas para comparar os grãos de pólen dos diferentes materiais estudados.

Trabalhos que se valem de palinologia são bastante relevantes para organização de grupos taxonômicos, estudos filogenéticos e descrição de floras locais (SIMPSON et al., 2003; JUDD e OLMSTEAD, 2004; DOYLE, 2005). Há registros de estudos com de espécies da caatinga (GOMES JÚNIOR., 1966; LIMA et al., 2006; 2008; BURIL et al., 2010; BURIL, ALVES e SANTOS, 2011), do semi-árido (DU BOCAGE et al., 2008; SANTOS e ROMÃO, 2008) e da restinga fluminense (SOUZA, MENDONÇA e CONÇALVES-ESTEVEES, 2010). Muitas vezes o foco dos trabalhos é auxiliar na taxonomia e filogenia de

determinado grupo, como realizado para *Gesneriaceae* (FOURNY et al., 2010) e em *Passiflora* (DETTKE e SANTOS, 2009).

Para *Amaranthaceae* os primeiros estudos polínicos foram conduzidos por Martius em 1826. Em publicações posteriores os autores classificaram a família como euripalinológica graças a sua morfologia polínica variável (tamanho, abertura, escultura) (ERDTMAN, 1952; LIVINGSTONE, 1972; LLIVINGSTONE et al., 1973; SRIVASTAVA et al., 1977; MARKGRAF e D'ANTONI, 1978; BLACKMORE e BARNES, 1991; TOWNSEND, 1993). Existem também estudos focados na a flora de *Amaranthaceae* do Brasil (BARTH et al. 1976; CRUZ e MELHEM, 1979; BAUERMANN et al., 2009).

Com relação ao gênero *Pfaffia*, recentemente foram descritos os pólenes de três espécies: *Pfaffia gnaphaloides*, *P. tuberosa* e *P. glomerata*, juntamente com *Hebanthe eriantha* (BASTOS, BAUERMANN e MARCHIORETTO, 2010).

2 OBJETIVOS

Em função da carência de informações para a espécie *Pfaffia glomerata*, sua relevância medicinal e econômica, o presente estudo teve como objetivos caracterizar a espécie a partir de estudos de quantidade de DNA, citogenética e palinologia. Os objetivos específicos foram:

- Estimar, por citometria de fluxo, o conteúdo de DNA nuclear de 61 acessos de *Pfaffia glomerata*;
- Caracterizar citogeneticamente os cromossomos de *Pfaffia glomerata*, utilizando técnicas de coloração cromossomal com Giemsa, bandeamento CMA₃/DA/DAPI e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas para DNAr 45S e 5S;
- Aplicar a técnica de acetólise para caracterizar morfologicamente o grão de pólen de diferentes acessos de *Pfaffia glomerata*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Sessenta e um acessos de *P. glomerata* provenientes de quatro populações de diferentes localidades do Brasil (Tabela 1) foram cedidos *in vitro* (Figura 1A) pelo Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Viçosa. Exemplares Voucher foram depositados no Herbário Leopoldo Krieger da UFJF conforme as técnicas usuais.

Tabela 1 - Número de indivíduos e procedência de quatro populações de *Pfaffia glomerata*

População	Nº. de indivíduos	Local de coleta	Coordenadas geográficas
P1	19	Rio Ivaí, Querência do Norte, Paraná, Brasil	Lat 23 ⁰ 13' 09,2" Long 53 ⁰ 34' 07,6" Alt. 233 m.
P2	18	Ilha do Mineiro, Querência do Norte, Paraná, Brasil	Lat 23 ⁰ 07' 27" Long 53 ⁰ 38' 49,9" Alt. 239m.
P3	16	Porto Primavera, Baitaporã, Mato Grosso do Sul, Brasil	Lat 22 ⁰ 33' 24,1" Long 53 ⁰ 06' 13,9" Alt. 239 m.
P4	11	Parque Estadual de Ilha Grande, Vila Alta, Paraná, Brasil	Lat 23 ⁰ 23' 09,7" Long 53 ⁰ 50' 02,1" Alt. 232 m.

Todos os acessos foram mantidos *in vitro* com meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) sem adição de hormônios reguladores conforme as técnicas usuais (Figura 1A). O material permaneceu em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 40 µmolesm⁻²s⁻¹, fornecida por lâmpada fluorescente branca.

O processo de aclimatização consistiu na retirada das plantas dos tubos de ensaio, lavagem das raízes com água corrente para retirada dos resíduos de meio de cultura e em seguida transferência para copos plásticos, contendo Plantmax® como substrato (Figura 1B).



Figura 1. Acessos de *Pffafia glomerata* em diferentes estágios de desenvolvimento. (A) Acessos *in vitro* em meio MS sem adição de hormônios. (B) Acesso em processo de aclimatização em substrato Plantmax®.

O plantio foi realizado após às 16h para evitar transpiração excessiva. Cada vaso foi protegido com sacos plásticos, propiciando a formação de um micro clima favorável ao estabelecimento das plântulas. O material foi mantido em casa de vegetação com temperatura média de 28°C e irrigação diária, por no mínimo 30 dias. Em seguida, as plantas foram transferidas para vasos de plástico preto (12 x 22 x 0,5 cm) contendo Plantmax® como substrato. O cultivo ocorreu em casa de vegetação com controle de temperatura, fotoperíodo, umidade e irrigação (Figura 2).



Figura 2. Acessos de *Pfaffia glomerata* em casa de vegetação após seis meses de cultivo em substrato Plantmax®.

Decorridos pelo menos dois meses, foram retiradas estacas das plantas para enraizamento e obtenção de meristemas radiculares para posteriores estudos citogenéticos.

3.2 Estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo

Para determinar a quantidade de DNA dos acessos mantidos *in vitro*, aproximadamente 25 mg de tecido foliar de *Pfaffia glomerata* e o mesmo peso de tecido foliar do padrão interno de referência (*Solanum lycopersicum* cv. Stupické) foram macerados com auxílio de uma lâmina de bisturi em uma placa de Petri contendo 1 mL do tampão LB01 gelado, a fim de liberar os núcleos em suspensão (DOLEŽEL et al., 1989). O tecido macerado foi aspirado através de duas camadas de gaze com auxílio de uma pipeta plástica e posteriormente filtrado em uma malha de 50 μ m, sendo coletado em um tubo de poliestireno. A coloração dos núcleos se deu pela adição de 25 μ L de uma solução de 1

mg/mL de iodeto de propídeo (IP) à suspensão. Adicionalmente 5 µL de RNase foram adicionados a cada amostra. Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados usando uma escala logarítmica para os histogramas obtidos. A análise foi realizada no citômetro FacsCalibur e os histogramas foram obtidos pelo software Cell Quest. A avaliação estatística foi realizada por meio do software WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA em picogramas foi estimado como mostrado a seguir:

Amostra (2C)=(valor observado no canal do pico da espécie/valor observado no canal do pico do padrão)xquantidade de DNA do padrão interno.

Três amostras de cada acesso foram processadas. A análise de variação no conteúdo de DNA entre os acessos foi obtida por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%.

3.3 Análise citogenética

3.3.1 Preparo das lâminas

Para a obtenção de núcleos interfásicos e cromossomos metafásicos, estacas de *Pfaffia glomerata*, mantida na casa de vegetação da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), foram submetidas a enraizamento em água da torneira à temperatura ambiente. Foram avaliados citogeneticamente os acessos 13, 35, 46, 70, 22, 61 para representar as quatro populações disponíveis para o estudo. Raízes com aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram coletadas e tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) à 0,002 M por 4 h e 45 min, à 9°C. Em seguida, foram fixadas em solução de Carnoy (3 etanol:1 ácido acético glacial) e armazenadas em refrigerador, por no mínimo 24 h.

As raízes tratadas passaram por lavagens em água destilada. Posteriormente, foram digeridas em uma solução enzimática de 2% (p/v) celulase Onozuka R-10 (Serva)/20% (v/v) pectinase (Sigma) em estufa a 37°C por 4h e 30 min. Os meristemas radiculares foram separados para preparo de lâminas de microscopia segundo a técnica de secagem ao ar (CARVALHO,

1995). Após a secagem, as lâminas foram coradas em solução Giemsa 2% (Merck), exceto aquelas destinadas às técnicas de citogenética molecular. A observação do material foi realizada em microscópio de luz (Olympus BX 51) com aumento de até 1000x.

3.3.2 Morfometria cromossômica

Para confirmar o número de cromossomos na espécie, foram observadas 50 metáfases do material em estudo. Para cada técnica aplicada, 10 metáfases espalhadas foram avaliadas.

Para a montagem do idiograma os cromossomos foram ordenados pelo tamanho decrescente do braço curto e os seguintes parâmetros foram usados: Comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo ($CT=BL+BC$); relação entre braços ($r=BL/BC$); índice centromérico ($IC=BC100/CT$); comprimento relativo do cromossomo ($CR=100CT/CLH$). A classificação dos cromossomos, considerando a razão de braços, foi baseada em Levan et al. (1964).

O grau de assimetria do cariótipo foi estimado conforme proposto por proposto por Watanabe et al. (1999): $A_i=(BL-BC)/(BL+BC)$ e $A=(1/n)\sum A_i$, onde n é o número haploide de cromossomos e "A" varia de zero (cariótipo completamente simétrico) a um (cariótipo totalmente assimétrico).

3.3.3 Bandeamento cromossômico com CMA₃/DA/DAPI

Para a coloração com CMA₃/DA e DAPI foi usado o procedimento descrito por Schweizer (1976). As lâminas passaram por um envelhecimento de pelo menos três dias antes das técnicas de coloração e foram banhadas em HCl, 1 M por 10 min antes do início do protocolo convencional.

Sobre as lâminas secas foram aplicados 30 µl de tampão com CMA₃, preparada em de concentração de 0,1 mg/mL, em tampão McIlvaine contendo

0,5 mM de $MgCl_2$ e mantidas em geladeira. A seguir o material foi coberto com lamínulas plásticas e mantido à temperatura ambiente no escuro por 1 h. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada e secas ao ar, no escuro. Nas lâminas já secas, foram adicionados 30 μ l da solução de distamicina, 0,1 mg/ml, as quais foram incubadas durante 30 min, no escuro, e em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas passaram por uma rápida lavagem com água destilada e novamente foram secas ao ar.

Foram aplicados 30 μ l da solução de DAPI e mais uma lamínula plástica foi usada, as preparações citológicas permaneceram mais 30 min no escuro. Em seguida, as lâminas passaram por uma rápida lavagem com água destilada e novamente foram secas ao ar e no escuro.

As lâminas foram montadas em meio antifade (30 μ l). Passados pelo menos sete dias em refrigerador, o material foi analisado em microscópio de fluorescência (Olympus BX 51) com filtro específico para o fluorocromo DAPI com comprimento de onda de 360 a 390 nm e filtro apropriado para o CMA₃ com comprimento de onda de 430 a 480 nm, as melhores imagens foram capturadas para análise posterior.

3.3.4 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

As sondas para a localização de regiões de DNAr no genoma de *P. glomerata* foram obtidas a partir de cepas de *Escherichia coli* transformadas para este fim. Células de *Escherichia coli* foram transformadas por eletroporação com os plasmídeos vetores contendo as regiões do gene ribossomal 5S (oriunda de DNA genômico de milho) e DNAr 45S (produzida a partir do genoma de trigo) cedidas pelo Laboratório do Dr. Jiming Jiang (University of Madison, Wisconsin, USA)

Para o processo de eletroporação foi usado o aparelho Electroporator 2510 (Eppendorf). Células competentes TOP 10 (100 μ L) foram retiradas do freezer -80°C e 1 μ L de DNA plasmidial (100 ou 10 ng) foi adicionado ao material que permaneceu no gelo por 10 min. O material foi transferido para

uma cuvetta de 1 mm com 40 mm de células competentes e submetido a um pulso elétrico nas seguintes condições: 1,7 kV, 200 W e 25 µF.

Após a incubação das células à 42°C por 1 minuto e 30 segundos, o mesmo foi colocado novamente em gelo por 1 minuto, sendo adicionados 400 µL de LB para incubação a 37°C por 30 minutos.

Terminada a incubação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina, para crescimento de colônias com os plasmídeos de interesse (sonda de DNAr 45S ou 5S). Esta etapa ocorreu a 37°C *overnight*.

Para calcular a eficiência da transformação foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{CFU}/\mu\text{g} = \frac{\text{CFU}}{\text{pg}} \times \frac{1.10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{\text{volume transformado}}{\text{volume plaqueado}} \times \text{fator de diluição}$$

Bactérias *Escherichia coli* transformadas, por eletroporação com os plasmídeos vetores contendo as regiões do gene ribossomal 5S (oriunda de DNA genômico de milho) e DNAr 45S (produzida a partir do genoma de trigo), foram multiplicadas em meio de cultura LB com ampicilina 100 mg/L *overnight* a 37°C a 180 rpm. As regiões de DNA ribossomal foram extraídas com o kit GE Heathtare Ilustra™ PlasmidPrep MiniSpin e em seguida marcadas com digoxigenina por meio da reação de nick translation com os kits BioNick e DigNick (Roche), sempre conforme as instruções do fabricante.

O processo de hibridização foi adaptado de Jiang et al. (1995). Para a hibridização *in situ* fluorescente, as lâminas foram previamente banhadas em solução de HCl 1 N, por 10 min.

Em seguida em cada lâmina adicionou-se 100 µL de formamida 30%/2x SSC diretamente nos cromossomos. Lamínulas plásticas de 22x40 mm foram usadas para cobrir o material. A lâmina foi desnaturada em estufa (80-85°) por 30 segundos, em seguida passou por uma série alcoólica de banhos em etanol 70% gelado, etanol 90% e 100% por 5 min cada. Em seguida, a lâmina foi seca

ao ar e mantida em uma placa de Petri e ao abrigo da luz até a aplicação da sonda.

A mistura de hibridização foi montada conforme a tabela 2. O mix foi pipetado e centrifugado brevemente e passou por desnaturação em estufa a 90°C por 10 min sendo imediatamente imerso no gelo até o momento da aplicação nas lâminas.

Tabela 2 – Solução para hibridização *in situ* fluorescente em cromossomos de *Pfaffia glomerata*

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

Foram então adicionados 19 µL do mix já desnaturado em cada lâmina também desnaturada. Uma lamínula de vidro foi colocada e selada. Para completar o processo de hibridização, a lâmina foi mantida em uma câmara úmida em estufa a 37°C por, no mínimo, 48 h.

Passado o período de incubação, a lamínula foi removida em um banho com solução de 2x SSC. Posteriormente, as lâminas foram banhadas por 5 min em 2x SSC; por 10 min em 2x SSC a 42°C e por 5min em 1x PBS, sendo então secas ao ar.

A detecção das sondas ocorreu por meio de anticorpos marcados com fluorocromo (Digoxigenina) visível sob a luz do microscópico de fluorescência (Olympus BX 51). Foram misturados 20 µL de TNB Buffer 5x, 80 µL de ddH₂O, 1 µL de Rhodamina anti-DIG e 1 µL de TRITC acoplado a Streptavidina, para cada lâmina.

Foram adicionados 100 µL do mix de anticorpos com fluorocromo diretamente sobre os cromossomos e uma lamínula plástica foi usada para

cobrir a região de interesse. As lâminas foram novamente incubadas em uma câmara úmida e escura em estufa a 37°C por 1 h. Em seguida, foram realizados três banhos, de 5 min cada, em TNT 1x. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS 1x por mais 5 min e contracoradas com 20 µL de Vectashield/DAPI.

O material foi mantido em câmara úmida e escura na geladeira até o momento da análise em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51). Pelo menos 10 figuras representativas da espécie foram digitalizadas por meio da câmera Olympus U-TVO-63XC (SN1A48982 – T7 TOKYO, JAPAN) e analisadas utilizando o software Imagepro-plus (Media Cybernetics).

3.4 Estudo dos grãos de pólen

Foram utilizados grãos de pólen de 39 acessos de *Pfaffia glomerata* provenientes de quatro populações de diferentes localidades do Brasil (Tabela 1).

A amostragem de 39 acessos foi determinada de maneira a representar cerca de 50% de cada população. A coleta das inflorescências foi feita na fase de antese das flores, a fim de se obter grãos de pólen já maduros.

Para a caracterização dos grãos de pólen, foi utilizado o método de acetólise de Erdtman (1960), com as modificações propostas por Melhem et al. (2003). O material foi submetido à hidrólise ácida, que consiste em anidrido acético e ácido sulfúrico na proporção de 9:1, eliminando seu conteúdo celular para observação da parede externa do pólen (exina). O material foi montado em lâminas permanentes com gelatina glicerizada.

Para cada acesso foram tomadas aleatoriamente as medidas de 25 grãos polínicos, distribuídos em 5 lâminas, sendo avaliados exatamente 5 grãos de pólen por cada lâmina. As análises ocorreram em microscópio de luz (OLYMPUS BX 51) com objetiva de 1000x, sendo as imagens capturadas no máximo uma semana após a aplicação da técnica de acetólise (SALGADO-

LABOURIAU, 1973), com o auxílio da por meio da câmera Olympus U-TVO-5XC-3 (7H01095, JAPAN).

As descrições polínicas e nomenclaturas utilizadas foram baseadas nos trabalhos de Erdtman (1966), Thanikaimoni (1970); Barth e Melhem (1988) e Punt et al. (2007). Foram avaliados o tamanho, a forma, o número de aberturas e o padrão de ornamentação da exina.

A análise estatística para comparação das médias entre os acessos foi feita por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo

O padrão interno utilizado, *Solanum lycopersicum* (2C = 1,96 pg DNA), mostrou-se eficiente para mensurar o conteúdo de DNA de *P. glomerata*. Um histograma representativo da espécie pode ser analisado na figura 3. Verificou-se que a quantidade de DNA não apresentou diferença estatística significativa entre os acessos de *Pfaffia glomerata* das quatro populações investigadas (Tabela 3).

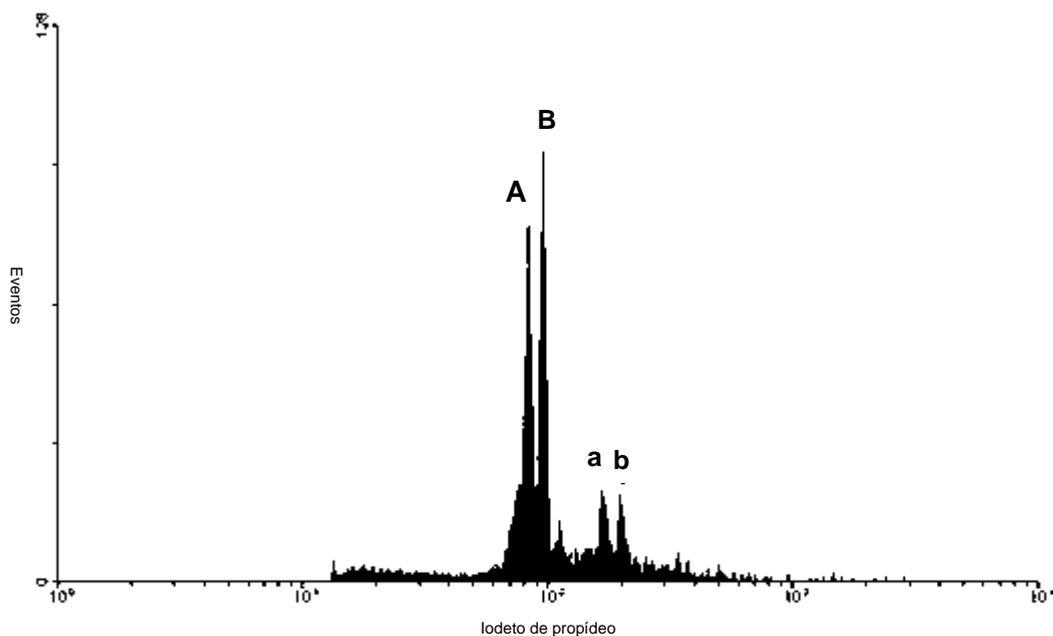


Figura 3. Histograma representativo da quantidade de DNA de *Pfaffia glomerata*. Resultado obtido por análise simultânea de folhas de *Pfaffia glomerata* e *Solanum lycopersicum* ($2C=1,96$ pg, DOLEŽEL et al., 1998) coradas com iodeto de propídeo. Os picos “A” e “B” representam G_0/G_1 de *S. lycopersicum* e *P. glomerata* respectivamente. Os picos “a” e “b” ilustram G_2 de *S. lycopersicum* e *P. glomerata* respectivamente.

Tabela 3 - Média das estimativas da quantidade de DNA (pg) de acessos de *Pfaffia glomerata* obtidas a partir de três repetições

Acesso	Quantidade de DNA (pg)	CV* (%)	Acesso	Quantidade de DNA (pg)	CV* (%)
PGL 10	2,42	0,67	PGL 44	2,44	0,60
PGL 11	2,40	0,60	PGL 45	2,41	0,63
PGL 13	2,42	0,67	PGL 46	2,44	0,49
PGL 14	2,39	0,62	PGL 47	2,43	0,50
PGL 15	2,38	0,74	PGL 48	2,42	0,52
PGL 16	2,44	0,68	PGL 49	2,40	0,54
PGL 17	2,39	0,67	PGL 50	2,46	0,69
PGL 18	2,45	0,71	PGL 51	2,40	0,56
PGL 19	2,44	0,62	PGL 52	2,38	0,60
PGL 20	2,43	0,42	PGL 53	2,45	0,68
PGL 21	2,60	1,01	PGL 54	2,42	0,63
PGL 22	2,40	0,59	PGL 55	2,41	0,59
PGL 23	2,42	0,58	PGL 56	2,39	0,62
PGL 24	2,39	0,66	PGL 57	2,41	0,62
PGL 25	2,42	0,57	PGL 58	2,37	0,61
PGL 26	2,39	0,61	PGL 59	2,37	0,65
PGL 27	2,45	0,55	PGL 60	2,37	0,77
PGL 28	2,42	0,58	PGL 61	2,41	0,73
PGL 30	2,41	0,57	PGL 62	2,38	0,65
PGL 31	2,39	0,56	PGL 63	2,40	0,69
PGL 32	2,39	0,60	PGL 64	2,43	0,62
PGL 33	2,38	0,53	PGL 65	2,39	0,68
PGL 34	2,40	0,54	PGL 66	2,37	0,69
PGL 35	2,41	0,58	PGL 67	2,42	0,72
PGL 36	2,40	0,62	PGL 68	2,39	0,73
PGL 37	2,42	0,58	PGL 69	2,39	0,63
PGL 38	2,43	0,60	PGL 70	2,41	0,74
PGL 40	2,37	0,52	PGL 72	2,38	0,72
PGL 41	2,44	0,55	PGL 73	2,42	0,79
PGL 42	2,40	0,51	PGL 74	2,40	0,44
PGL 43	2,42	0,53			

*CV = coeficiente de variação do pico G1 de *Pfaffia glomerata*.

Com base em análise estatística, quantidades significativamente diferentes de DNA não foram apontadas através da análise de variância (ANOVA). O coeficiente de variação (CV) médio foi de 0,63%.

A variação observada nos resultados para os valores de 2C foi de 2,37 a 2,60 pg (Tabela 3). O valor médio de quantidade de DNA para a espécie *Pfaffia glomerata* foi de 2,41 pg com CV médio 0,63%.

A técnica de citometria de fluxo foi realizada com o intuito de caracterizar os acessos de *Pfaffia glomerata* quanto ao nível de ploidia e ainda determinar a quantidade de DNA diploide para a espécie.

Os coeficientes de variação (CVs) obtidos para as amostras coradas com iodeto de propídeo (IP) foram inferiores a 3% (Tabela 3). Coeficientes de variação abaixo de 3% indicam alto nível de resolução (DOLEŽEL, 1997) e que o preparo das suspensões nucleares permitiu a obtenção de núcleos intactos e com coloração uniforme (DOLEŽEL, 1991), o que sugere confiabilidade aos resultados obtidos no presente trabalho.

Grupos morfológicos podem ser visualmente formados entre os acessos cultivados na casa de vegetação da UFJF. Variações entre acessos de *P. glomerata* foram mencionados por outros autores, Magalhães (2000) atribui essa plasticidade fenotípica à sua ampla distribuição geográfica. Em um estudo dos constituintes de 23 acessos do “ginseng brasileiro” foi encontrada diferença significativa para todas as variáveis analisadas, entre todos os acessos. (FIGUEIREDO et al., 2002).

No entanto, esse agrupamento não se repetiu quando a característica avaliada foi a quantidade de DNA. Um único nível de ploidia foi observado, com todos os acessos sem grandes variações no conteúdo 2C de DNA, não sendo possível, portanto, explicar a variação morfológica com base em diferença significativa no tamanho do genoma de *P. glomerata*. Como foi identificado apenas um nível de ploidia, ao longo do texto *P. glomerata* será referida como diploide.

Diante da homogeneidade dos resultados de citometria de fluxo, o que poderia explicar a considerável distinção morfológica entre os acessos avaliados, seria uma recente fragmentação das áreas em que ocorreram as coletas, não permitindo que, em curto prazo, houvesse mudanças significativas na quantidade de DNA, sendo que a distância mínima entre as 4 populações é de 33 Km e a máxima é de 119 Km (Tabela 4). Outra possibilidade é a expressão diferenciada de genes nos diferentes acessos, sem que necessariamente alguma diferença significativa no conteúdo de DNA pudesse ser registrada. Nesse caso, expressão diferenciada pode ser consequência, por exemplo, de modificações na heterocromatina como acetilações e metilações (BRASZEWKA-ZALEWSKA et al., 2010). Essas alterações são capazes de influenciar na expressão gênica e fenotípica sem que a sequência de DNA seja alterada (GRAFI; ZEMACH; PITTO, 2007). Desta forma, os dados citométricos obtidos nesta investigação, corroboram os resultados de Kamada (2006) no qual foram analisadas as mesmas populações investigadas neste trabalho. Ambos os estudos apontam para uma semelhança genética entre os acessos em detrimento das diferenças morfológicas observadas.

Tabela 4 – Relação de distância entre as populações de *Pfaffia glomerata* expressa em quilômetros (Km)

Populações	Distâncias (Km)	Populações	Distâncias
P1-P2	13	P2-P3	84
P1-P3	88	P2-P4	35
P1-P4	33	P3-P4	119

Para a família Amaranthaceae, que inclui o gênero *Pfaffia*, a quantidade 2C de DNA descrita até o momento varia de 0,85 (gênero *Atriplex*) à 9,70 pg, sendo *Celosia whiteii* a espécie com o maior genoma registrado para a família (BENNETT e LEITCH, 2012). Dessa maneira, o valor encontrado de 2,41 pg está dentro dos valores descritos para Amaranthaceae e bastante próximo do

valor 2C de DNA citado como médio (2,57 pg) para esse grupo (BENNETT e LEITCH, 2012).

Em espécies de interesse econômico/medicinal, é extremamente válido o conhecimento do nível de ploidia, uma vez que esse dado é útil para delinear estratégias de melhoramento genético e facilitar a triagem dos indivíduos alvo. Outro ponto positivo é que esta técnica tem auxiliado na taxonomia e sistemática de vários grupos de plantas, principalmente as que apresentam semelhanças ou diferenças morfológicas devido à variação fenotípica (DOLEŽEL et al., 2007).

É importante ressaltar que não há ainda na literatura relatos da estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo ou qualquer outra metodologia, para o gênero *Pfaffia* (BENNETT e LEITCH, 2012).

4.2 Morfometria cromossômica

Os poucos relatos disponíveis na literatura científica do número cromossômico de *Pfaffia glomerata* foram obtidos pelo mesmo grupo de pesquisa e relatam $2n=32$, 33 e 34 cromossomos (TASCETTO e PAGLIARINI, 2001; 2003).

As metáfases coradas com Giemsa (Figura 4) e analisadas neste estudo apresentaram número cromossômico constante $2n=34$ para *Pfaffia glomerata*. O comprimento médio dos cromossomos variou de 1,97 μm (cromossomo 3) a 1,17 μm (cromossomo 17). Já o comprimento relativo dos mesmos ficou entre 6,79% (cromossomo 3) e 3,86% (cromossomo 17).

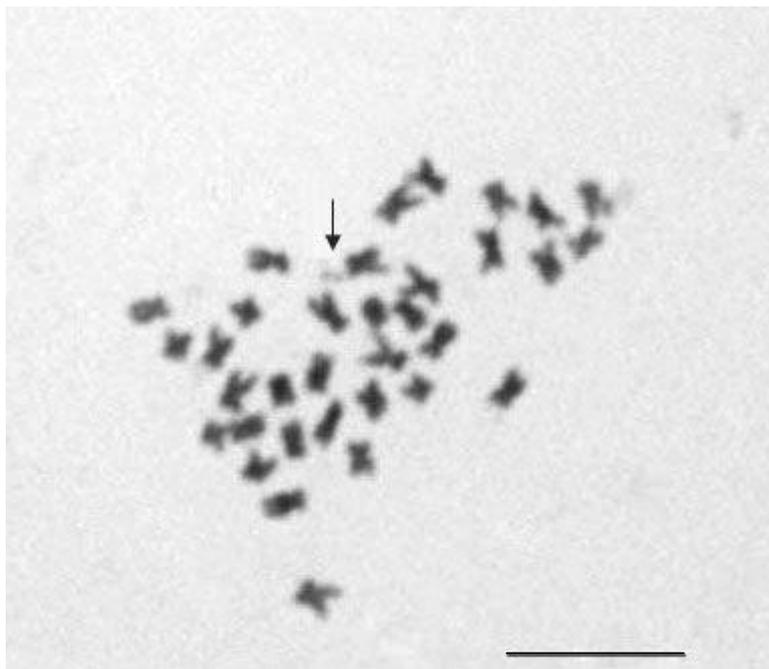


Figura 4. Metáfase mitótica de *Pfaffia glomerata* corada com Giemsa. A seta indica a constrição secundária distendida. Barra=5 μm .

Os cromossomos apresentaram morfologia e tamanhos bastante semelhantes com fórmula cariotípica representada por: 16M (metacêntricos) e 1SM (submetacêntrico), sendo o par de número 15 submetacêntrico. Dentre os 17 pares, somente um deles apresentou um par constrição secundária proximal, com apenas uma destas, visível em quase todas as metáfases observadas, formando um satélite longamente distendido (Figura 4).

O comprimento do lote haploide (CLH) foi 28,54 μm . Detalhes dos dados morfométricos dos cromossomos de *P. glomerata* podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados morfométricos médios dos cromossomos de *Pfaffia glomerata*

Cromossomo	BC (μm)	BL (μm)	CT (μm)	R	IC	CR (%)	CC
1	0,84	1,03	1,87	1,22	44,99	6,43	M
2	0,84	1,02	1,86	1,21	45,16	6,41	M
3	0,83	1,14	1,97	1,38	42,01	6,79	M
4	0,83	1,06	1,89	1,28	43,80	6,49	M
5	0,82	0,98	1,80	1,20	45,56	6,20	M
6	0,78	0,91	1,69	1,16	46,31	5,83	M
7	0,76	1,20	1,96	1,58	38,70	6,76	M
8	0,75	1,16	1,91	1,56	39,08	6,57	M
9	0,74	0,87	1,61	1,18	45,85	5,56	M
10	0,73	0,83	1,56	1,14	46,77	5,38	M
11	0,73	0,79	1,52	1,08	48,03	5,23	M
12	0,69	0,72	1,41	1,04	48,94	4,86	M
13*	0,68	0,83	1,51	1,22	44,97	5,21	M
14	0,66	1,04	1,70	1,57	38,85	5,85	M
15	0,65	1,16	1,81	1,78	35,95	6,23	SM
16	0,61	0,73	1,34	1,20	45,52	4,61	M
17	0,50	0,62	1,12	1,24	44,64	3,86	M
CLH	28,54						

* medida sem considerar o satélite; Comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo (CT=BL+BC); relação entre braços ($r=BL/BC$); índice centromérico (IC=BC100/CT); comprimento do lote haplóide (CLH); comprimento relativo do cromossomo (CR=100CT/CLH); metacêntrico (M); submetacêntrico (SM).

Os resultados do presente estudo indicam o número cromossômico igual a 34 para *Pfaffia glomerata* e que a espécie apresenta cromossomos relativamente pequenos (1,12 a 1,97 μm), sendo apenas um par deles com constrição secundária, provavelmente relacionada com região organizadora de nucléolo (RON). Tais dados reforçam as observações de Taschetto e Pagliarini (2003), que analisaram metáfases somáticas de 10 populações de *P. glomerata*, coletadas em diferentes regiões do Brasil e Argentina, nas quais também observaram apenas uma região organizadora de nucléolos.

A presença de um par cromossômico com satélite polimórfico, gerado pela ocorrência de uma constrição secundária proximal longamente distendida em um dos homólogos (Figura 4) sugere uma inversão paracêntrica heterozigota ou uma duplicação em tandem da RON, como já observado para uma espécie de Iridaceae (*Eleutherine bulbosa*) (GUERRA, 1988). Constrições secundárias e satélites polimórficos entre cromossomos homólogos, ou mesmo o polimorfismo entre células, pode ser explicado por prováveis eventos de mutação envolvendo rearranjos de heterocromatina presente em regiões de constrição secundária, satélites e RONS ou modificação de heterocromatina (BRASZESWKA-ZALEWSKA et al., 2010).

A contagem obtida no presente trabalho, de $2n=34$ cromossomos, coincide com um dos números citados por Taschetto e Pagliarini (2003), que indicaram 32 e 34 cromossomos para populações diferentes, sugerindo a existência de citótipos populacionais. É possível que a coloração dos cromossomos com corantes diferentes ou mesmo o preparo das lâminas expliquem a variação apontada no trabalho de Taschetto e Pagliarini (2003) e não observada neste estudo, uma vez que em um trabalho foi empregada coloração com Feulgen e no outro com Giemsa.

Este número $2n$ encontrado está também em concordância com estudos citogenéticos anteriores realizados para outras espécies de Amaranthaceae. Um levantamento realizado para o gênero *Amaranthus* chegou ao número cromossômico de oito espécies portuguesas: *Amaranthus hybridus*. $2n=32$; *A. paniculatus*, $2n=34$; *A. reiroflexus* $2n=34$; *A. blitoides* $2n=32$; *A. albus*, $2n=32$; *A. graecizans* $2n=32$; *A. deflexus* $2n=34$; *A. lividus* $2n=34$ (QUEIRÓS, 1989). Outros estudos citam *Amaranthus edulis* e *A. hypochondriacus* com $2n=32$ e *Amaranthus tricolor* L. com $2n=34$ (OHRI, NAZEER e PAL, 1981) e ainda *Amaranthus viridis* com $2n=34$ (DALGAARD, 1986). Já *Amaranthus caudatus* L. é descrita como um tetraploide, cujo número cromossômico varia entre $2n=4x=32$ e $2n=4x=34$ (PAL e KHOSHOO, 1973).

Ainda em Amaranthaceae, no gênero *Celosia* a variação no número cromossômico é considerável: *C. trigyna* L. ($2n=18$), *C. whiteii* Grant ($2n=108$),

C. argentea L. ($2n=36$; $2n=34$), *C. cristata* L. ($2n=36$) e *C. plumosa* ($2n=36$) (NATH, OHRI e PAL, 1992).

É válido ressaltar que foi sugerido dentro da família um número cromossômico básico inicial de $x=8$ com $n=16$, podendo ter ocorrido ao longo da evolução uma trissomia que originou $n=17$ (PAL et al., 1982), justificando cariótipos com $2n=34$, como o observado para *Pfaffia glomerata* e para diversas outras espécies de Amaranthaceae já citadas. Esse fato aponta para uma tendência de poliploidia na família. Considerando o número básico citado para a família Amaranthaceae ($x=8$), *P. glomerata* ($2n=34$) poderia ser um tetraploide que passou por processos de disploidia ascendente elevando o número cromossômico $n=16$ para $n=17$, gerando $2n=4x=34$ cromossomos.

Diante desses números, podemos sugerir a possibilidade de que a espécie *Pfaffia glomerata* tenha surgido de um evento de poliploidização natural, e com o tempo a mesma adotou comportamento meiótico diploide. Nesse caso, *Pfaffia glomerata* seria na realidade uma espécie paleopoliploide. Ou seja, em um dado momento de sua história evolutiva *P. glomerata* pode ter tido o seu genoma duplicado, tendo eliminado possíveis problemas de pareamento naturalmente observados nos poliploides a fim de restaurar sua fertilidade (STEBBINS, 1971; WOLFE, 2001). Ou ainda, a espécie pode ter evoluído de outra espécie que já era um paleopoliploide de comportamento diploide estável.

Entretanto, para que seja feita alguma afirmação sobre a ploidia de *P. glomerata* é preciso mais dados sobre a evolução da espécie, uma vez que em poliploides de longa data há uma tendência natural de ocorrer o silenciamento de característica cariológicas capazes de apontar o caráter poliploide (STEBBINS, 1971).

Com relação à classificação dos cromossomos, Taschetto e Pagliarini (2003) já haviam relatado que todas as 10 populações estudadas continham cromossomos submetacêntricos e metacêntricos, sem ocorrência de acrocêntricos ou telocêntricos, mas não apresentaram um cariógrama ou

idiograma. Tal afirmativa foi corroborada pelos dados morfométricos obtidos neste trabalho.

De acordo com a classificação morfológica dos cromossomos, feita com base na relação de braços (r), onde cromossomos com r entre 1,01 e 1,79 são metacêntricos, r entre 1,70 e 3,00 são submetacêntricos, r entre 3,01 e 7,00 são acrocêntricos e r entre 7,01 e 8,00 são considerados telocêntricos (LEVAN et al., 1964), *P. glomerata* tem 16 pares de cromossomos classificados como metacêntricos (M) e apenas um par submetacêntrico (SM) (Tabela 5).

A medida do grau de assimetria da espécie foi de 0,12. Quanto mais próximo de zero este valor, maior o grau de simetria atribuído ao cariótipo (WATANABE et al., 1999). Assim, há considerável simetria entre os cromossomos de *P. glomerata*. Cariótipos simétricos são compostos por cromossomos com tamanhos aproximadamente iguais e com posição centromérica mediana ou submediana (STEBBINS, 1971).

Há poucas informações disponíveis sobre a morfologia dos cromossomos de espécies de Amaranthaceae e menos ainda quando se trata do gênero *Pfaffia*. Provavelmente essa carência decorre do fato de os mesmos serem bastante pequenos, característica que dificulta o pareamento e a classificação cromossômica quanto à posição centromérica. Portanto, o registro dos dados morfométricos dos cromossomos de *Pfaffia glomerata* tem grande relevância, abrindo caminho para mais estudos dentro do gênero e da família.

4.3 Localização de bandas CMA₃ e DAPI e de sítios de DNAr 45S e 5S

Apesar de ser uma ferramenta bastante empregada para caracterizar regiões heterocromáticas ricas em bases GC em diversas espécies vegetais, tais como *Citrus* (GUERRA, 1993), *Hypochoeris* (CERBAH et al., 1998), *Clivia* (RAN et al., 1999), *Pinus densiflora* (HIZUME et al., 2001), *Crinum* (AHMED, 2004), *Selaginella* (MARCON et al., 2005, ZANELA, 2009) *Solanum* (MELO et al., 2011), Amaryllidaceae (FELIX et al., 2011), Orchidaceae (MOARES; LEITCH e LEITCH, 2012), entre outras, a técnica de bandeamento com

CMA₃/DA foi pela primeira vez aplicada no genoma de *Pfaffia* durante este estudo, assim como coloração com DAPI e a hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

Foi possível observar que todos os cromossomos apresentam blocos de heterocromatina constitutiva ricas em AT, já que todos os cromossomos contam com fortes bandas centroméricas DAPI positivas (Figura 5A). E o padrão de condensação dos núcleos interfásicos é do tipo reticulado (Figura 5B).

Na coloração CMA₃/DA/DAPI, ficou evidente apenas uma banda CMA₃+/DAPI- em um dos 34 cromossomos de *Pfaffia glomerata* (Figura 5C).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda para DNAr 45S permitiu a identificação de dois sítios localizados em um par de homólogos (Figura 6A). As marcas localizaram-se na região terminal dos dois braços curtos de um par cromossômico. Um dos sinais é pequeno e de difícil visualização, indicando ser um sítio polimórfico (Figuras 6A).

A hibridização com a sonda para DNAr 5S, resultou também na visualização de dois sítios localizados em único par cromossômico (Figura 6B).

Os núcleos interfásicos mostraram-se reticulados quando corados com DAPI. Núcleos reticulados são gerados por variações no padrão de condensação dos cromossomos (PÔRTO et al., 1997). Uma de suas características é a presença de numerosas regiões de cromatina densa intercalada com regiões de cromatina frouxa, fibrilas e grânulos, que ficam mais fortemente corados com DAPI. Este resultado é discordante com o descrito por Taschetto e Pagliarini (2003), onde o núcleo interfásico de *P. glomerata* corado com Feulgen é apresentado como arreticulado. Uma explicação para essa diferença pode estar no fato de corantes fluorescentes serem mais sensíveis à diferença de condensação da cromatina.

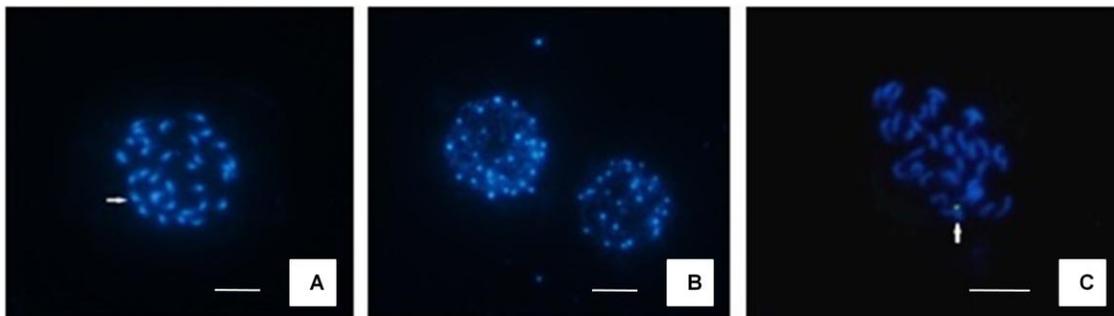


Figura 5. Técnica de bandeamento cromossômico aplicada aos cromossomos de *Pfaffia glomerata*. (A) metáfase corada com DAPI; a seta indica uma das bandas centroméricas. (B) núcleo interfásico reticulado com blocos de heterocromatina indicados pela seta. (C) coloração com CMA/DA/DAPI, banda CMA⁺ indicada pela seta. Barra=5 μ m.

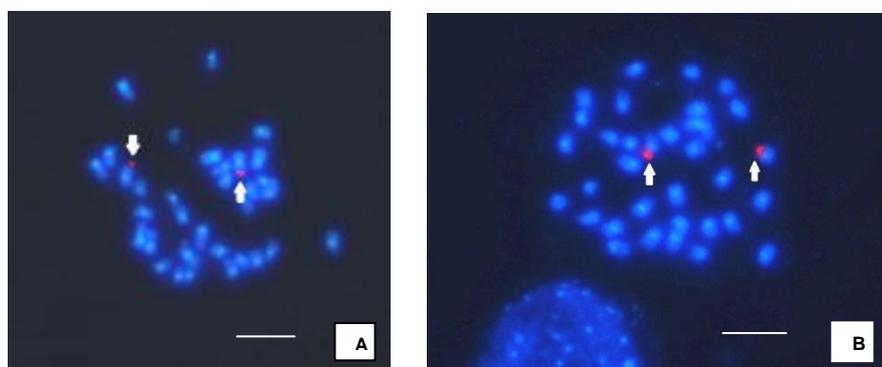


Figura 6. Técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas para DNAr 45s e 5S aplicada aos cromossomos de *Pfaffia glomerata*. (A) marcação com sonda para DNAr 45S. (B) marcação com sonda para DNAr 5S. As setas indicam os pontos de fluorescência. Os cromossomos com as marcas podem ser visualizados em detalhe. Barra=5 μ m.

É bastante recorrente que o fluorocromo CMA₃ marque as constrições secundárias em diversas espécies e uma explicação para essa interação pode estar no fato de que, na maioria dos genomas, as regiões organizadoras de nucléolo (sítios de DNA que codificam RNA ribossomal) estão localizadas nas constrições secundárias. Pelo fato de tais genes serem ricos em bases nitrogenadas GC (SUMNER, 1990), o fluorocromo cromomicina apresenta alta afinidade por essas regiões cromossômicas.

Diante disso, é provável que a única marcação represente uma das constrições secundárias de *Pfaffia glomerata* e que a constrição do cromossomo homólogo pode não ter emitido sinal forte o suficiente para ser capturado pela câmera. A ausência de um segundo sinal nítido para região

positiva corada com CMA₃ justifica-se por um menor estiramento da constrição secundária no cromossomo homólogo ao que se mostrou marcado com CMA₃. Por ser uma região característica de DNA repetitivo, pode haver ainda polimorfismo de tamanho nas constrições secundárias devido a um número variável de repetições entre os homólogos (SATO, 1981). Portanto, o cromossomo com pequeno número de repetições não seria visivelmente marcado com o fluorocromo cromomicina. Além da duplicação em um dos homólogos, uma deleção no outro cromossomo do par também poderia explicar o resultado observado.

Diferenças no tamanho de marcações principalmente em regiões de satélite, que é o caso daquelas que costumam ser positivas CMA₃, podem ser creditadas ao alto grau de polimorfismo observado em DNA repetitivo, que varia muito entre populações, indivíduos ou mesmo entre cromossomos homólogos (ROCCHI, 1982). Já foram detectados polimorfismos para tamanho de sítios de hibridização em regiões de DNAr em inúmeras espécies, algumas delas são: *Allium* (SCHUBERT e WOBUS, 1985), *Brachyscome* (HOUBEN et al., 2000), *Boronia* (SHAN et al., 2003), *Hypochaeris* (RUAS et al., 2005) e para *A. aurea*, *A. hookeri*, *A. ligtu*, *A. pelegrina* e *A. presliana* (BAEZA et al., 2007).

Alguns autores relataram a existência de correspondência entre as regiões evidenciadas pelo bandeamento CMA+ com regiões que apresentam sinais positivos de hibridização *in situ* fluorescente para sequências de DNAr 45S, (CERBAH et al., 1998; FORNI-MARTINS e GUERRA, 1999; RAN et al., 1999; SILJAK-YAKOVLEV et al., 2003; MARCON et al., 2005). Nos resultados obtidos para *P. glomerata* provavelmente também ocorreu uma co-localização da banda CMA₃/DA+ com um dos sítios de DNAr 45S.

Os Resultados obtidos com o bandeamento com fluorocromos e a técnica de FISH, aliados aos gerados pela coloração convencional dos cromossomos de *Pfaffia glomerata*, permitiram a montagem do kariograma e idiograma da espécie (Figura 7).

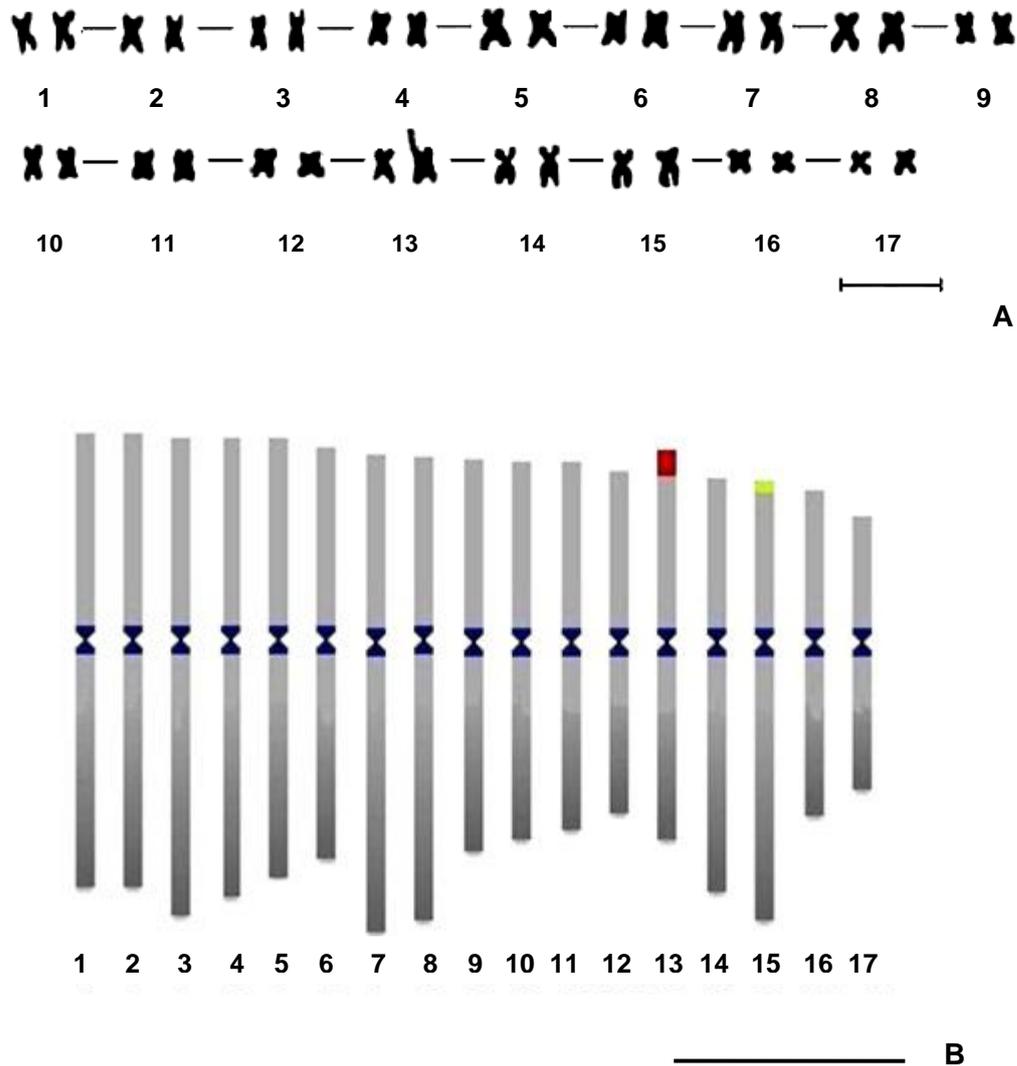


Figura 7. Características cariotípicas de *P. glomerata*. (A) Cariograma ($2n = 34$). É possível observar o satélite nono par cromossômico de número 13. Barra = 5 μm . (B) Idiograma. Bandas centroméricas DAPI⁺ em azul; Sítios de DNAr 5S em verde; Sítio de DNAr 45S colocalizado com banda CMA₃⁺ em vermelho. Barra=1 μm .

Admitindo-se que as marcas CMA⁺ e de DNAr 45S sejam constrições secundárias ricas em CG, pode-se dizer que o “ginseng brasileiro” conta com um par de satélites localizados no braço menor do cromossomo 13 (Figura 7), confirmando uma descrição prévia para a espécie feita por Taschetto e Pagliarini (2003) que relataram um par dessas estruturas para o cariótipo da espécie sem especificar sua localização.

A presença de satélites já foi relatada em outras espécies de *Amaranthaceae*, aparecendo geralmente também em um único par de homólogos (KOLANO et al., 2001). Vários autores descrevem essa característica cromossômica, observada através da aplicação de diversas técnicas de citogenética. Bandas CMA₃+ de diferentes intensidades já foram descritas em plantas do gênero *Amaranthus*, sugerindo blocos de heterocromatina ricos em GC com tamanhos diferentes co-localizados com os sítios de DNAr 45S em um cultivar de *Amaranthus caudatus* (KOLANO et al., 2001).

Por ser uma técnica bastante precisa e específica, a FISH tem sido muito empregada para evidenciar todos os cístrons ribossomais das RONS, ativos ou inativos, em genomas de plantas (BESENDORFER et al., 2002).

Quando foi usada sonda para hibridização fluorescente de DNAr 45S, ambas as constrições puderam ser observadas em metáfases mitóticas (Figura 6A) e núcleos interfásicos também exibiram esse padrão de marcação. Entre as duas marcas, uma apresentou coloração mais forte que a outra, o que reforça a teoria de que os sítios de DNAr 45S, em *P. glomerata*, ocorrem em número de cópias acentuadamente diferentes nos homólogos, gerando polimorfismo para as constrições secundárias relacionadas à RON.

Devido à grande semelhança entre os cromossomos de *P. glomerata*, não foi possível identificar em qual par estão as marcas obtidas para a sonda para DNAr 5S. Ao passo que sonda para DNAr 45S e as bandas CMA₃+, provavelmente estão no braço curto do cromossomo 13. Essa inferência baseia-se no fato de as marcações aparecerem em um único par de homólogos, o que indicaria ser a constrição secundária relacionada com a organização nucleolar, a mesma observada no cariograma corado com Giemsa (Figura 7A), onde é visualizada uma região de satélite no cromossomo 13, gerada por uma constrição secundária proximal.

Resultados obtidos a partir da técnica de FISH aplicada em uma mesma metáfase, ora com a sonda para DNAr 45S, ora com a sonda para DNAr 5S (Figura 8) mostram que os genes que codificam a menor subunidade

ribossômica (DNAr 5S) não estão presentes no mesmo cromossomo que aqueles responsáveis pela maior subunidade ribossômica (DNAr 45S).

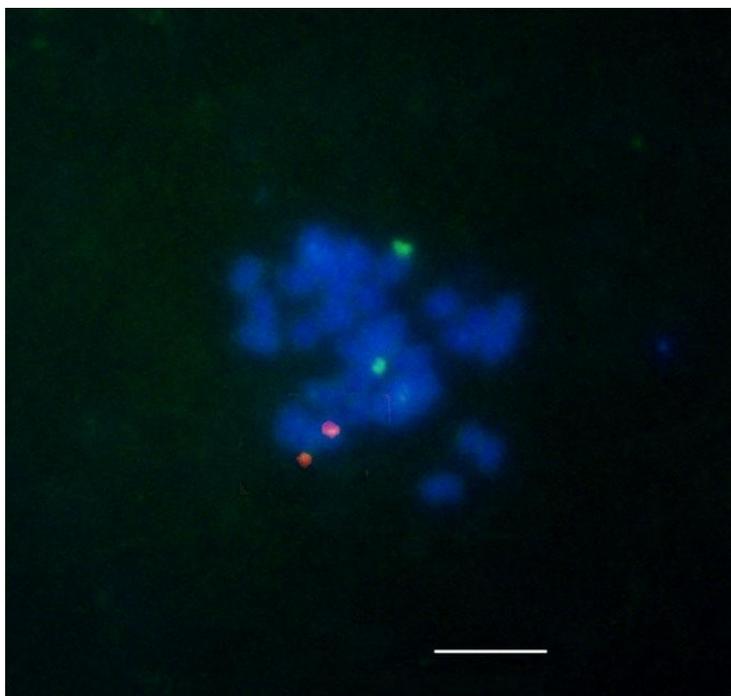


Figura 8 – Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em metáfase mitótica de *Pfaffia glomerata*. Sítios de DNAr 5S (marcações pseudocolorizadas em verde) e 45S (marcações em vermelho). Barra=5 μ m.

Trabalhos envolvendo análises com a técnica de bandeamentos com fluorocromos e de hibridização *in situ* fluorescente, para as *Amaranthaceae*, ainda são escassos na literatura e devido a isto, não existem dados de espécies próximas o suficiente para que sejam feitas comparações com os resultados relatados no presente estudo. Mesmo assim, as informações obtidas para marcação com DAPI, CMA₃ e FISH, embora sejam para apenas uma espécie, podem contribuir como marcadores cromossômicos comparativos para novos estudos citogenéticos com diferentes espécies e populações visando uma possível caracterização evolutiva no gênero e na família, ou podem ainda ser úteis em programas de melhoramento genético do “ginseng brasileiro”, dado seu potencial medicinal/econômico.

4.4 Estruturas dos grãos de pólen

Os grãos de pólen maduros foram observados isolados em mônades e classificam-se como fixiformes (forma polínica definida) do tipo esferoide, (diâmetro polar médio de 12,96 μm e diâmetro equatorial médio de 12,95 μm). Os valores médios de cada parâmetro para a espécie estão expressos na tabela 6, enquanto a tabela 7 mostra os valores obtidos para cada acesso analisado com sua respectiva população. A exoexina mostrou-se mais espessa que a endoexina. Cada pólen apresenta, em sua superfície reticulada, inúmeras aberturas classificando-se como pantoporado (Figura 9).

Tabela 6. Valores médio obtidos por análise da morfometria polínica de *Pfaffia glomerata*

DP (μm)	DE (μm)	DP/DE (μm)	EndoE (μm)	ExoE (μm)	ET (μm)
12,96	12,95	1,00	0,74	0,86	1,60

DP = diâmetro polar, DE = diâmetro equatorial, DP/DE = razão do diâmetro polar pelo diâmetro equatorial, EndoE = espessura da endoexina, ExoE = espessura da exoexina, ET = espessura total da exina.

Tabela 7. Morfometria polínica de acessos de *Pfaffia glomerata* de quatro populações brasileiras

População	Acesso	DP	DE	DP/DE	EndoE	ExoE	ET
P1	PGL	12,94	12,98	1,00	0,71	0,88	1,59
P1	PGL	12,95	12,97	1,00	0,73	0,84	1,57
P1	PGL	12,96	12,93	1,00	0,76	0,86	1,62
P1	PGL	12,98	12,97	1,00	0,74	0,83	1,57
P1	PGL	12,97	12,96	1,00	0,72	0,87	1,59
P1	PGL	12,93	12,96	1,00	0,71	0,88	1,59
P1	PGL	12,97	12,94	1,00	0,77	0,85	1,62
P1	PGL	12,96	12,96	1,00	0,73	0,85	1,58
P1	PGL	12,98	12,98	1,00	0,75	0,84	1,59
P1	PGL	12,95	12,94	1,00	0,73	0,87	1,60
P2	PGL	12,97	12,97	1,00	0,72	0,86	1,58
P2	PGL	12,94	12,95	1,00	0,76	0,86	1,62
P2	PGL	12,98	12,93	1,00	0,71	0,88	1,59
P2	PGL	12,96	12,95	1,00	0,73	0,85	1,58
P2	PGL	12,94	12,93	1,00	0,77	0,83	1,60
P2	PGL	12,96	12,96	1,00	0,74	0,84	1,58
P3	PGL	12,95	12,98	1,00	0,75	0,88	1,63
P3	PGL	12,97	12,98	1,00	0,76	0,87	1,63
P3	PGL	12,94	12,97	1,00	0,72	0,85	1,57
P3	PGL	12,93	12,97	1,00	0,73	0,85	1,58
P3	PGL	12,98	12,93	1,00	0,74	0,85	1,59
P3	PGL	12,94	12,94	1,00	0,73	0,84	1,57
P3	PGL	12,97	12,96	1,00	0,77	0,87	1,64
P2	PGL	12,95	12,97	1,00	0,76	0,83	1,59
P2	PGL	12,93	12,95	1,00	0,75	0,87	1,62
P2	PGL	12,96	12,93	1,00	0,72	0,88	1,60
P2	PGL	12,98	12,94	1,00	0,72	0,85	1,57
P3	PGL	12,94	12,95	1,00	0,74	0,83	1,57
P3	PGL	12,96	12,96	1,00	0,77	0,86	1,63
P3	PGL	12,97	12,97	1,00	0,75	0,85	1,60
P4	PGL	12,95	12,94	1,00	0,71	0,88	1,59
P4	PGL	12,93	12,93	1,00	0,74	0,84	1,58
P4	PGL	12,96	12,96	1,00	0,74	0,87	1,61
P4	PGL	12,98	12,97	1,00	0,76	0,83	1,59
P4	PGL	12,97	12,95	1,00	0,77	0,86	1,63
P4	PGL	12,97	12,93	1,00	0,73	0,88	1,61
P4	PGL	12,93	12,96	1,00	0,76	0,84	1,60
P4	PGL	12,96	12,96	1,00	0,73	0,85	1,58
P4	PGL	12,94	12,95	1,00	0,75	0,87	1,62

DP = diâmetro polar, DE = diâmetro equatorial, DP/DE = razão do diâmetro polar pelo diâmetro equatorial, EndoE = espessura da endoexina, ExoE = espessura da exoexina, ET = espessura da exina total. Os valores são dados em μm .

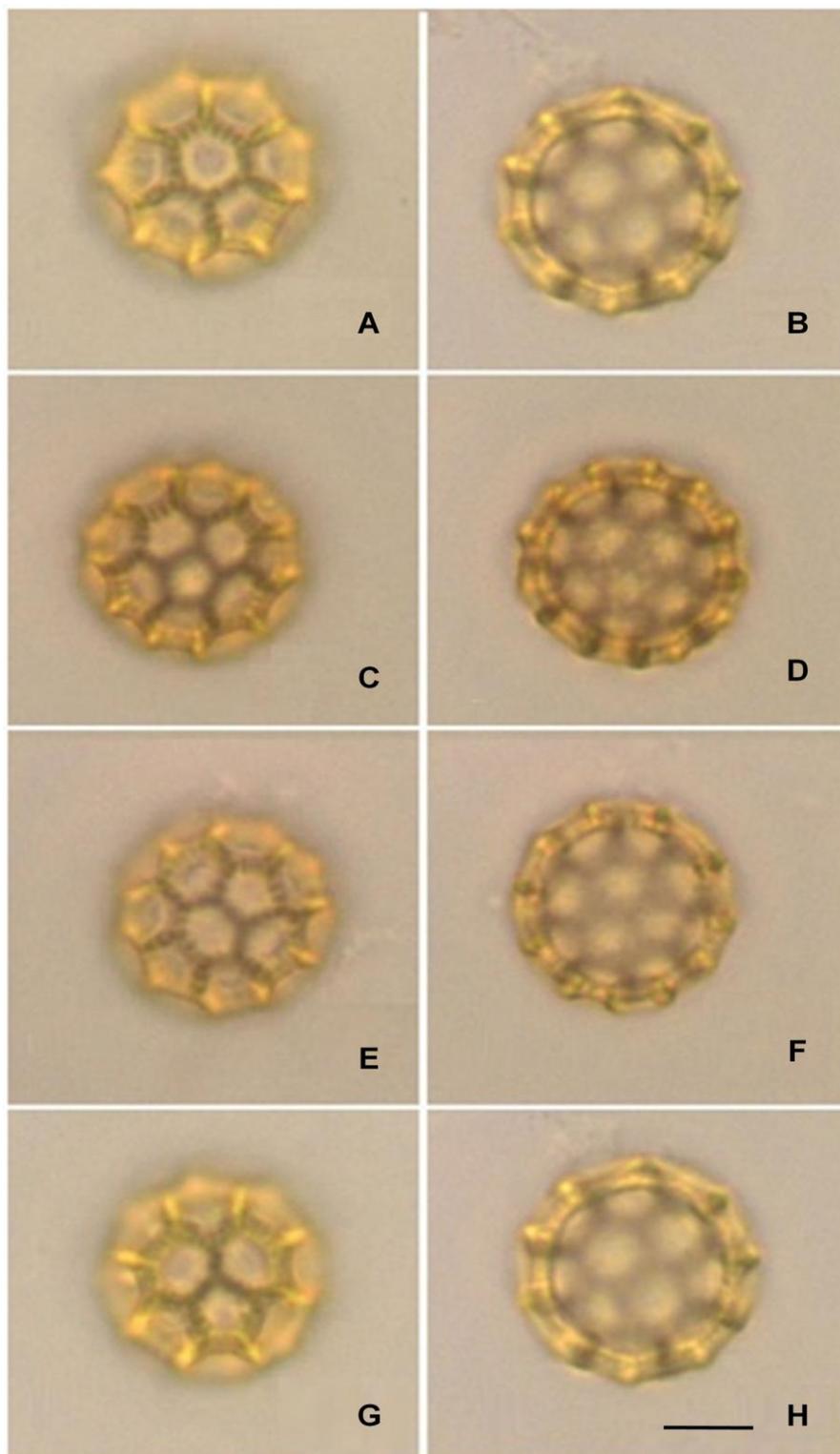


Figura 9 – Pólen maduros de *Pfaffia glomerata* obtidos pela técnica de acetólise. A coluna da esquerda mostra em detalhes o retículo de cada pólen. A coluna da direita ilustra os grãos de pólen de cada população em corte ótico. (A e B) população 1. (C e D) população 2. (E e F) população 3. (G e H) população 4. Barra=5 μ m.

Nenhum dos parâmetros polínicos avaliados neste estudo foi capaz de diferenciar ou agrupar os acessos ou as populações *Pfaffia glomerata*, visto que os resultados não apresentaram significância na variação qualitativa ou quantitativa dos dados. A homogeneidade na estrutura dos pólen dos diferentes acessos não indica variabilidade genética capaz de afetar morfologicamente os grãos polínicos das populações de *Pfaffia glomerata* avaliadas. Além disso, assim como ocorreu no estudo citométrico de *Pfaffia glomerata*, a morfologia dos pólen neste estudo não evidencia possíveis variações no nível de ploidia das plantas.

Dentro da família Amaranthaceae existem vários tipos de pólen, sendo esta classificada como euripalinológica (ERDTMAN, 1952; MARKGRAF e D'ANTONI, 1978; BLACKMORE e BARNES, 1991). *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera rufa* apresentam grãos de pólen esferoidais de tamanho pequeno, como encontrado no presente estudo para *P. glomerata*. Na família existem, contudo pólen de tamanho médio como ocorre com *Gomphena*, que exibe estrutura polínica esferoidal de tamanho médio, reticulado e pantoporado (TAKEDA et al., 2000).

Para o gênero *Pfaffia*, há descrição da estrutura polínica de *P. tuberosa*, também conhecida por “ginseng brasileiro”. Seus grãos de pólen pequenos organizam-se em mônades com âmbito circular, formato esférico, pantoporado do ponto de vista das aberturas (RADAESKI et al., 2011), apresentando-se muito semelhantes aos descritos neste trabalho para *P. glomerata*.

As espécies *P. gnaphalioides* e *P. tuberosa* são citadas, respectivamente por apresentarem o menor (12,68 μm) e maior (21,13 μm) grão de pólen no gênero *Pfaffia* (BASTOS, BAUERMANN e MARCHIORETTO, 2010). Nesse mesmo trabalho foi descrito a morfologia polínica de uma espécie do gênero *Hebanthe* (*H. eriantha*).

Segundo BASTOS, BAUERMANN e MARCHIORETTO (2010), *P. glomerata* apresenta grãos de pólen em mônades, pequenos, com forma esférica e pantoporados, poros circulares distribuídos uniformemente por toda

a superfície do pólen. Todas essas características são compatíveis com as encontradas no presente estudos para todos os acessos avaliados.

Tomando-se o diâmetro equatorial como medida de referência, o grão de pólen de *Pfaffia glomerata* é considerado pequeno, característica que pode estar relacionada com o tipo de ambiente em que a espécie se desenvolve. Em um estudo com espécies de *Arecaceae*, os autores correlacionaram grãos de pólen menores com ambientes de formações florestais e solo úmido (BAUERMANN et al., 2010), ambiente similar ao de ocorrência do “ginseng brasileiro” nativo de bordas de florestas e margens de rios (SIQUEIRA, 1988; MAGALHÃES, 2000).

5 CONCLUSÕES

As técnicas de dissociação celular e secagem ao ar associadas com a coloração convencional com Giemsa permitiram a obtenção de células pro-metafásicas e metafásicas com cromossomos individualizados, onde as constrições primárias e secundárias mostraram-se bem definidas.

O bandeamento com CMA₃/DA/DAPI e a técnica de FISH foram bem sucedidos na espécie e forneceram dados inéditos que enriquecem sua caracterização e possibilitam futuras correlações com outros acessos ou espécies relacionadas à *Pfaffia glomerata*.

Esses resultados possibilitaram o pareamento dos homólogos e a classificação dos pares de cromossomos com relação à posição centromérica, que culminaram com a montagem do kariograma e idiograma, ainda inéditos para a espécie de *Pfaffia* em estudo.

Por meio da quantificação de DNA por citometria de fluxo, o tamanho do genoma do “ginseng brasileiro” foi determinado pela primeira vez. O conteúdo absoluto de DNA foi 2,41 pg. De acordo com os dados citométricos, não houve diferença significativa entre os 61 acessos analisados.

O pólen de *P. glomerata* pôde ser bem visualizado a partir da técnica de acetólise, e como esperado, assemelha-se bastante ao pólen de espécies próximas à estudada aqui, como é o caso de *P. tuberosa*.

Os dados citométricos, citogenéticos e palinológicos mostram-se úteis para comparações taxonômicas dentro da família Amaranthaceae em futuros estudos de manipulação cromossômica visando seu uso comercial.

No entanto, as variadas técnicas empregadas na caracterização de *Pfaffia glomerata* não apontam variabilidade dentro das quatro populações avaliadas, apesar da variação morfológica entre os acessos que compõem tais populações ter persistido mesmo quando as plantas foram cultivadas em casa de vegetação. Assim, fazem-se desejáveis trabalhos que investiguem uma possível variabilidade na espécie em nível genômico, com técnicas ainda mais detalhistas e refinadas.

CAPITULO II – INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POLIPLOIDES EM *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

1 INTRODUÇÃO

O “ginseng brasileiro” de nome científico *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, é uma espécie nativa da América do Sul e de ocorrência comum nos Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás (SIQUEIRA, 1989). Devido à sua variada aplicação no cenário medicinal a “fáfia” é umas das plantas visadas pelo extrativismo vegetal. (ALEXIADES e SHANLEY, 2004). Além disso, a redução de áreas protegidas compromete a diversidade genética principalmente pelo efeito sobre as populações selvagens (REIS et al., 2003; TICKTIN, 2004; ALEXIADES e SHANLEY, 2004).

Com o objetivo de preservar a espécie, várias pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de incentivar e facilitar seu cultivo, diminuindo dessa forma, a coleta predatória (CORRÊA JÚNIOR, 2003; RUSSOWSKI e NICOLOSO, 2003; MONTANARI JÚNIOR, 2005; SANTOS, 2006; GUPTA et al., 2011). Neste contexto, ganham importância estudos que buscam aumento da quantidade dos constituintes de interesse farmacológico da *Pfaffia glomerata*, oferecendo possibilidades de incremento do valor econômico e da qualidade dos seus produtos.

Considerando que a poliploidização pode resultar em aumento no tamanho de células, órgãos e na produção de biomassa (ADANIYA e SHIRA, 2001; GAO et al., 2002), além de incrementar a produção de substâncias químicas de interesse econômico em plantas (DHAWAN e LAVANIA, 1996; ZHANG et al. 2007; ZHANG et al., 2008; CHEN et al., 2009; MISHRA et al., 2010; TANG et al., 2010), o desenvolvimento de cultivares melhorados geneticamente, como por exemplo, através da indução *in vitro* de duplicação cromossômica, pode ser uma boa estratégia a fim de contribuir para a

conservação de *P. glomerata* e aumentar os lucros a partir de seus constituintes químicos.

1.1 Poliploidia como ferramenta para o melhoramento de plantas

A poliploidia implica na existência de mais de dois genomas no mesmo núcleo. Este fenômeno é considerado de grande importância na evolução e especiação dos organismos, e quando induzida pode ser uma poderosa ferramenta para o melhoramento genético de plantas (RANNEY, 2006).

O método de duplicação de cromossomos baseia-se na aplicação de substâncias antimitóticas como colchicina e orizalina, em explantes, tais como ápices caulinares e ou suspensões de células embriogênicas, sob condições assépticas (VAN DUREN et al., 1996; GANGA e CHEZHIYAN, 2002; BAKRY et al., 2007). A colchicina tem sido empregada com grande sucesso em diversas espécies (ISHIGAKI et al., 2009; QUESENBERRY et al., 2010; SOUZA-KANESHIMA et al., 2010; PEREIRA et al., 2012). Após o processo de indução da poliploidia, torna-se necessário confirmar o nível de ploidia o que normalmente é feito utilizando-se a citometria de fluxo e a contagem do número de cromossomos (SWENNE et al., 1981; PINHEIRO et al., 2000; CAMPOS et al., 2009; ISHIGAKI et al., 2009).

A duplicação cromossômica tem sido empregada há décadas em programas de melhoramento de inúmeras espécies cultivadas: alfafa, maçã, café, algodão, amendoim, trigo (BURNS e BOTINNO, 1991), cebola (GRZEBELUS e ADAMUS, 2004), melancia (JASKANI et al., 2004), banana (VAN DUREN et al., 1996; SILVA et al., 2001; GANGA e CHEZHIYAN, 2002; BAKRY et al., 2007; COSTA et al., 2011), *Scutellaria baicalensis* (GAO et al., 2002), *Citrus sinensis* (ZHANG et al., 2007), *Papaver somniferum* (MISHRA et al., 2010), *Gerbera jamesonii* (GANTAIT, et al., 2011), maracujá amarelo (RÊGO et al., 2011) entre outras espécies (ABREU et al., 2006; BUSTAMENTE, 2009; CAMPOS et al., 2009).

Um grande desafio para minimizar a exploração exacerbada de *Pfaffia glomerata* é o desenvolvimento de metodologias que possibilitem maior produção de biomassa e que, por consequência, tornem mais abundantes seus constituintes farmacológicos, entre eles, a β -ecdisona, seu principal componente de valor comercial. Uma possibilidade para atingir o ganho de biomassa em vegetais é a duplicação do genoma (GAO et al., 2002; MISHRA et al., 2010). Os efeitos morfofisiológicos da poliploidia variam de acordo com a espécie alvo. No entanto, um efeito comum é o aumento do tamanho das partes vegetativas das plantas, o que torna os poliploides bem mais vigorosos em relação aos diploides correspondentes (ANDERSON, 1972; ALLARD, 1971), com possibilidade de aumento da produção de metabólitos secundários de alto valor comercial (DHAWAN e LAVANIA, 1996). Há evidências, porém, de que o tamanho de células, tecidos e órgãos nem sempre acompanha o nível de ploidia, além de não ser igual para todas as estruturas (MEDRI et al., 1980).

Dessa forma, a indução de poliploidia em *Pfaffia glomerata* pode contribuir para aumentar o teor dos princípios ativos de interesse econômico, como é o caso da β -ecdisona, tornando o processo de produção mais eficiente.

1.2 Contribuições de análises citológicas para o melhoramento de plantas

Análises citogenéticas e por citometria de fluxo oferecem possibilidades de seleção e aprimoramento de características genóticas importantes para o incremento da produtividade em espécies cultivadas.

Em programas de melhoramento, a confirmação no nível de ploidia em larga escala, tem se valido da análise do conteúdo de DNA nuclear por meio da técnica de citometria de fluxo (DOLEŽEL, 1997). Este método, combinado com a contagem cromossômica, tem se mostrado eficiente na triagem e caracterização de indivíduos de diferentes ploidias.

Quando comparada à contagem dos cromossomos, a citometria de fluxo oferece vantagens como a possibilidade de análise de uma grande amostragem em pouco tempo e partindo de pequenas quantidades de material vegetal de diversos tipos de tecidos. Além disso, para a determinação do

conteúdo de DNA, as plantas podem se encontrar ainda em fase inicial do processo de duplicação cromossômica, uma vez que se trata de um método não destrutivo que utiliza pequenas quantidades de tecido jovem para análise (DOLEŽEL, 1997).

Dentro da citogenética, a contagem do número cromossômico é um dos parâmetros mais utilizados para a caracterização citológica de uma espécie (PEDROSA, et al., 1999) que passou por poliploidização. A contagem dos cromossomos de uma espécie é um método bastante preciso, desde que o preparo das lâminas seja bem sucedido, pois indica o número exato de cromossomos presente em cada célula. Sua desvantagem está no fato de ser um método artesanal e por isso exige perícia nas preparações, além de demandar tempo para se obter dados conclusivos.

Uma maneira de enriquecer os dados citogenéticos e facilitar a determinação de possíveis diferenças entre a planta parental e o poliploide é a análise mais detalhada dos cariótipos por técnicas de coloração diferencial dos cromossomos (GILL, et al., 1991; SUMNER, 2003). Dentre essas metodologias destacam-se coloração com fluorocromos base-específicos (CMA₃/DA e DAPI) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (BENNETT e LEITCH, 1995).

Desse modo, é desejável que o emprego de citogenética seja associado à citometria de fluxo quando o objetivo é avaliar um grande número de plantas, que é o caso de trabalhos de melhoramento, onde a amostragem costuma ser consideravelmente grande.

Nessa linha, estudos que se utilizam das técnicas destacadas acima com a finalidade de investigar plantas com diferentes ploidias podem ser citados: em *Passiflora* (MELO e GUERRA, 2003), *Solanum* L. (MELO, 2009), mandioca (HASHIMOTO, 2009), entre outros.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi estudar comparativamente indivíduos da espécie *Pfaffia glomerata* diploides e poliploides induzidos por exposição aos antimitóticos colchicina e orizalina. Os objetivos específicos foram:

- Obter, por indução de duplicação cromossômica *in vitro*, um representante poliploide de *Pfaffia glomerata*;
- Estimar, por citometria de fluxo, o conteúdo de DNA nuclear de plantas diploide e poliploide de *P. glomerata*;
- Caracterizar citogeneticamente os cromossomos do poliploide de *P. glomerata*, utilizando técnicas de coloração convencional com Giemsa combinada com bandeamento CMA₃/DA/DAPI e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas para DNAr 45S e 5S;
- Quantificar, por HPLC, o teor de β-ecdisona nas raízes de *Pfaffia glomerata* diploide e poliploide;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

O evento de poliploidização do acesso 22 de *Pfaffia glomerata*, $2n=34$, foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os possíveis poliploides e seus diploides correspondentes foram mantidos *in vitro* em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 7 g/L de ágar granulado (Merck®, Alemanha), 100 mg/L de mio-inositol e 30 g/L de sacarose.

No Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) o material *in vitro* foi aclimatizado. O processo de aclimatização consistiu na retirada das plantas dos tubos de ensaio, lavagem das raízes com água corrente para retirada dos resíduos de meio de cultura e em seguida transferência para copos plásticos, contendo Plantmax® como substrato. O plantio foi realizado após às 16h para evitar transpiração excessiva. Cada vaso foi protegido com sacos plásticos, favorecendo a formação de um micro clima indicado para o estabelecimento das plântulas. O material foi mantido em casa de vegetação com temperatura média de 28°C e

irrigação diária, por no mínimo 30 dias. Em seguida, as plantas foram transferidas para vasos de plástico preto (12 x 22 x 0,5 cm) contendo Plantmax® como substrato. O cultivo ocorreu em casa de vegetação com controle de temperatura, fotoperíodo, umidade e irrigação.

Para análise por citometria de fluxo e estudos citogenéticos as plantas foram cultivadas em triplicata em vasos plásticos contendo substrato Plantmax™. O cultivo se deu na casa de vegetação da UFJF com controle de temperatura, fotoperíodo, umidade e irrigação.

Dois meses após o plantio foram retiradas estacas das plantas para enraizamento em água destilada a fim de se obter de raízes para os estudos citogenéticos.

3.2 Indução de poliploidia *in vitro*

Gemas nodais de folhas de *P. glomerata* do acesso 22 foram submetidas *in vitro* a agentes antimicrotubulares (colchicina e orizalina). Os explantes de *P. glomerata* foram expostos ao meio de cultura MS contendo colchicina ou orizalina, em concentrações de 10, 15, 20, 25 ou 30 μM , com tempo de exposição de 1 a 2 semanas. O controle consistiu em meio MS não suplementado com colchicina ou orizalina.

3.3 Determinação do nível de ploidia por citometria de fluxo

Para determinar a quantidade de DNA dos acessos mantidos *in vitro*, aproximadamente 25 mg de tecido foliar de *Pfaffia glomerata* e o mesmo peso de tecido foliar do padrão interno de referência *Pisum sativum* cv Citrad (9,09 pg de DNA) foram macerados com auxílio de uma lâmina de bisturi em uma placa de Petri contendo 1 mL do tampão LB01 gelado a fim de liberar os núcleos em suspensão (DOLEŽEL et al., 1989). O tecido macerado foi aspirado através de duas camadas de gaze com auxílio de uma pipeta plástica e posteriormente filtrado em uma malha de 50 μm , sendo coletado em um tubo de poliestireno. A

coloração dos núcleos se deu pela adição de 25 μ L de uma solução de 1 mg/mL de iodeto de propídeo (IP) à suspensão. Adicionalmente 5 μ L de RNase foram adicionados a cada amostra. Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados usando uma escala logarítmica para os histogramas obtidos. A análise foi realizada no citômetro FacsCalibur e os histogramas foram obtidos pelo software Cell Quest. A avaliação estatística foi realizada por meio do software WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA (em pg) foi estimado como mostrado a seguir:

Amostra (2C)=(valor observado no canal do pico da espécie/valor observado no canal do pico do padrão)xquantidade de DNA do padrão interno.

Três amostras de cada acesso foram processadas. A análise de variação no conteúdo de DNA entre os acessos foi obtida por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%.

3.4 Análise citogenética

Para a obtenção de núcleos interfásicos e cromossomos metafásicos, estacas de *Pfaffia glomerata* poliploide, mantida na casa de vegetação da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), foram submetidas a enraizamento em água destilada à temperatura ambiente. Raízes com aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram coletadas e tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) à 0,002 M por 4:45 h, à 9°C. Em seguida, foram fixadas em solução de Carnoy (3 etanol:1 ácido acético glacial) e armazenadas em refrigerador, por no mínimo 24 h.

As raízes tratadas passaram por lavagens em água destilada. Posteriormente, foram digeridas em uma solução enzimática de 2% (p/v) celulase Onozuka R-10 (Serva)/20% (v/v) pectinase (Sigma) em estufa a 37°C por 4:30 h. Os meristemas radiculares foram separados para preparo de lâminas de microscopia segundo a técnica de secagem ao ar (CARVALHO, 1995). Após a secagem, as lâminas foram coradas em solução Giemsa 2% (Merck), exceto aquelas destinadas às técnicas de citogenética molecular. A

análise do material se deu em microscópio de luz (Olympus BX 51) com aumento de até 1000x.

3.4.1 Morfometria cromossômica

Para confirmar o número de cromossomos na planta duplicada, foram observadas 50 metáfases do material em estudo. Para cada técnica aplicada, 10 metáfases espalhadas foram avaliadas.

Para a montagem do idiograma os cromossomos foram ordenados pelo tamanho decrescente do braço curto e os seguintes parâmetros foram usados: Comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo ($CT=BL+BC$); relação entre braços ($r=BL/BC$); índice centromérico ($IC=BC100/CT$); comprimento relativo do cromossomo ($CR100CT/CLH$). A classificação dos cromossomos, considerando a razão de braços, foi baseada em Levan et al. (1964).

O grau de assimetria do cariótipo foi estimado conforme proposto por Watanabe et al. (1999): $A_i=(BL-BC)/(BL+BC)$ e $A=(1/n)\sum A_i$, onde n é o número haploide de cromossomos e "A" varia de zero (cariótipo completamente simétrico) a um (cariótipo totalmente assimétrico).

3.4.2 Bandeamento cromossômico com CMA₃/DA/DAPI

Para a coloração com CMA₃/DA e DAPI foi usado o procedimento descrito por Schweizer (1976). As lâminas passaram por um envelhecimento de pelo menos três dias antes das técnicas de coloração e foram banhadas em HCl, 1 M por 10 min antes do início do protocolo convencional.

Sobre as lâminas secas foram aplicados 30 µl de tampão com CMA₃, preparada em de concentração de 0,1 mg/mL, em tampão McIlvaine contendo 0,5 mM de MgCl₂ e mantidas em geladeira. A seguir o material foi coberto com lamínulas plásticas e mantido à temperatura ambiente no escuro por uma hora.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada e secas ao ar, no escuro. Nas lâminas já secas, foram adicionados 30 µl da solução de distamicina, 0,1 mg/ml, as quais foram incubadas durante 30 min, no escuro, e em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas passaram por uma rápida lavagem com água destilada e novamente foram secas ao ar.

Foram aplicados 30 µl da solução de DAPI e mais uma lamínula plástica foi usada, as preparações citológicas permaneceram mais 30 min ao abrigo de luz. Em seguida, as lâminas passaram por uma rápida lavagem com água destilada e novamente foram secas ao ar e no escuro.

As lâminas foram montadas em meio antifade (30 µl). Passados pelo menos sete dias em refrigerador, o material foi analisado em microscópio de fluorescência (Olympus BX 51) com filtro específico para o fluorocromo DAPI com comprimento de onda de 360 a 390 nm e filtro apropriado para o CMA₃ com comprimento de onda de 430 a 480 nm, as melhores imagens foram capturadas para análise posterior.

3.4.3 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A sondas para a localização de regiões de DNAr no genoma de *P. glomerata* poliploide foram obtidas a partir de cepas de *Escherichia coli* transformadas para este fim. Células de *Escherichia coli* foram transformadas por eletroporação com os plasmídeos vetores contendo as regiões do gene ribossomal 5S (oriunda de DNA genômico de milho) e DNAr 45S (produzida a partir do genoma de trigo) sedidas pelo Laboratório....

Para o processo de eletroporação foi usado o aparelho Electroporator 2510 (Eppendorf). Células competentes TOP 10 (100 µL) foram retidas do freezer -80°C e 1 µL de DNA plasmidial (100 ou 10 ng) foi adicionado ao material que permaneceu no gelo por 10 min. O material foi transferido para uma cuveta de 1 mm com 40 mm de células competentes e submetido a um pulso elétrico nas seguintes condições: 1,7 kV, 200 W e 25 µF.

Após a incubação das células à 42°C por 1 minuto e 30 segundos, o mesmo foi colocado novamente em gelo por 1 minuto, sendo adicionados 400 µL de LB para incubação a 37°C por 30 minutos.

Terminada a incubação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina, para crescimento de colônias com os plasmídeos de interesse (sonda de DNAr 45S ou 5S). Esta etapa ocorreu a 37°C *overnight*.

Para calcular a eficiência da transformação foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{CFU}/\mu\text{g} = \frac{\text{CFU}}{\text{pg}} \times \frac{1.10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{\text{volume transformado}}{\text{volume plaqueado}} \times \text{fator de diluição}$$

Bactérias *Escherichia coli* transformadas, por eletroporação com os plasmídeos vetores contendo as regiões do gene ribossomal 5S (oriunda de DNA genômico de milho) e DNAr 45S (produzida a partir do genoma de trigo), foram multiplicadas em meio de cultura LB com ampicilina 100 mg/L *overnight* a 37°C a 180 rpm. As regiões de DNA ribossomal foram extraídas com o kit GE Heathtare Illustra™ PlasmidPrep MiniSpin e em seguida marcadas com digoxigenina por meio da reação de nick translation com os kits BioNick e DigNick (Roche), sempre conforme as instruções do fabricante.

O processo de hibridização foi adaptado de Jiang et al. (1995). Para a hibridização *in situ* fluorescente, as lâminas foram previamente banhadas em solução de HCl 1 N, por 10 min.

Em seguida em cada lâmina adicionou-se 100 µL de formamida 30%/2x SSC diretamente nos cromossomos. Lamínulas plásticas de 22x40 mm foram usadas para cobrir o material. A lâmina foi desnaturada em estufa (80-85°) por 30 segundos, em seguida passou por uma série alcoólica de banhos em etanol 70% gelado, etanol 90% e 100% por 5 min cada. Em seguida, a lâmina foi seca ao ar e mantida em uma placa de Petri e ao abrigo da luz até a aplicação da sonda.

A mistura de hibridização foi montada conforme a tabela 8. O mix foi pipetado e centrifugado brevemente e passou por desnaturação em estufa a 90°C por 10 min sendo imediatamente imerso no gelo até o momento da aplicação nas lâminas.

Tabela 8 – Solução para hibridização *in situ* fluorescente em cromossomos de *Pfaffia glomerata*

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

Foram então adicionados 19 µL do mix já desnaturado em cada lâmina também desnaturada. Uma lamínula de vidro foi colocada e selada. Para completar o processo de hibridização, a lâmina foi mantida em uma câmara úmida em estufa a 37°C por, no mínimo, 48 h.

Passado o período de incubação, a lamínula foi removida em um banho com solução de 2x SSC. Posteriormente, as lâminas foram banhadas por 5 min em 2x SSC; por 10 min em 2x SSC a 42°C e por 5min em 1x PBS, sendo então secas ao ar.

A detecção das sondas ocorreu por meio de anticorpos marcados com fluorocromo (Digoxigenina) visível sob a luz do microscópico de fluorescência (Olympus BX 51). Foram misturados 20 µL de TNB Buffer 5x, 80 µL de ddH₂O, 1 µL de Rhodamina anti-DIG e 1 µL de TRITC acoplado a Streptavidina, para cada lâmina.

Foram adicionados 100 µL do mix de anticorpos com fluorocromo diretamente sobre os cromossomos e uma lamínula plástica foi usada para cobrir a região de interesse. As lâminas foram novamente incubadas em uma câmara úmida e escura em estufa a 37°C por 1 h. Em seguida, foram realizados três banhos, de 5 min cada, em TNT 1x. Posteriormente, as lâminas

foram lavadas em PBS 1x por mais 5 min e contracoradas com 20 μ L de Vectashield/DAPI.

O material foi mantido em câmara úmida e escura na geladeira até o momento da análise em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51). Pelo menos 10 figuras representativas da espécie foram digitalizadas por meio da câmera Olympus U-TVO-63XC (SN1A48982 – T7 TOKYO, JAPAN) e analisadas utilizando o software Imagepro-plus (Media Cybernetics).

3.5 Quantificação de β -ecdisona

O extrato metanólico de raízes secas de *Pfaffia glomerata* foi submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), no aparelho SCL-10 AVP (Shimadzu, Japão). O sistema cromatográfico consistiu em um degazeificador DG14-14A, uma bomba quaternária FCV-10 ALVP e LC-10ATVP, um auto-injetor SIL-10AF, um detector diodo e um array SPD-MP10 AVP. A coluna empregada foi do tipo ACE C18 (5,0 μ m x 4,6 mm x 150 mm) e fase móvel de acetonitrila:água (16:84 v/v), com fluxo de 1,2 mL min⁻¹.

O padrão comercial de β -ecdisona (CAS 5289-74-7, Sigma Aldrich-Brasil), com pureza de 94% foi adotado como substância química de referência (SQR).

Esta quantificação contou com a parceria do Laboratório da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) - NIQUA (Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica) sob a orientação da Profa. Nádia Rezende Barbosa Raposo.

3.5.1 Preparo do extrato metanólico de raízes

Os extratos metanólicos de *Pfaffia glomerata* diploide e poliploide foram obtidos a partir de raízes coletadas de indivíduos com 4 meses de cultivo em vasos plásticos contendo substrato PlantmaxTM. As plantas foram mantidas na

casa de vegetação da UFJF com controle de temperatura, fotoperíodo, umidade e irrigação.

As raízes foram lavadas em água corrente, com o auxílio de uma escova de cerdas macias, foram pesadas e o peso fresco foi documentado. O material foi cortado em lâminas finas com o auxílio de um bisturi e desidratado em estufa a 45°C. Foram realizadas pesagens diárias das raízes até a estabilização do peso seco ser atingida no 5º dia do processo de desidratação.

A extração metanólica se deu conforme descrito por Silva (2008), com adaptações. Um pistilo e um cadinho foram usados para macerar as raízes já secas que foram submersas no solvente metanol (10% p/v) (Vetec).

A extração foi estática em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. O solvente foi trocado a cada 2 dias completando 3 rodadas de extração.

O líquido extraído passou por filtro de papel e foi reduzido por rotaevaporação, a 45°C (Büchi Rotavapor R-114).

Após a rotaevaporação, os extratos prontos foram armazenados em vidros âmbar previamente pesados, e permaneceram em um dessecador contendo sílica gel para evaporação de possíveis resíduos do solvente. Os vidros foram então novamente pesados para determinação do rendimento (resíduo) obtido, vedados e armazenados em geladeira para posterior análise química.

3.5.2 Análise do extrato metanólico por HPLC

Para a quantificação do teor de β -ecdisona presente no extrato metanólico das raízes de *P. glomerata* com $2n=34$ e $2n=68$, 20 μ L do extrato foram injetados no aparelho, juntamente com a SQR. As análises foram feitas em duplicata, com a duração de 10 min para cada corrida sob comprimento de onda de 248 nm, indicado para observar o pico correspondente à β -ecdisona.

O teor de β -ecdisona no extrato foi determinado através da área do pico gerado pela substância química de referência, comparada com a área do pico

das amostras, conforme a equação, onde Pt% equivale a pureza da SQR, em porcentagem.

$$\text{Teor} = \frac{\text{Área da amostra}}{\text{Área do padrão}} \times \frac{[\text{Padrão}]}{[\text{Amostra}]} \times \text{Pt}\%$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do cultivo em meio contendo colchicina ou orizalina

Os explantes de *P. glomerata* apresentaram diferentes taxas de sobrevivência em resposta aos tratamentos de indução com colchicina e orizalina (Tabela 9). Aqueles cultivados em meio MS sem agente antimitótico apresentaram 100% de sobrevivência. A exposição dos explantes à orizalina nos dois tempos (uma ou duas semanas) reduziu a sobrevivência dos explantes em relação aos expostos a colchicina.

Dentre os explantes submetidos aos diferentes tratamentos testados, foram produzidos brotos com diferentes níveis de ploidia (Tabela 9). No tratamento controle (MS) foram produzidos brotos diploides (Tabela 9). Nos demais tratamentos foram obtidos brotos diploides, poliploides e tetraploides. Nos tratamentos com orizalina foram obtidos apenas brotos diploides e mixoploides. A exposição dos explantes durante uma semana em meio adicionado de colchicina na concentração de 15, 20, 25 e 30 μM ou duas semanas à 25 μM de colchicina produziu brotos tetraploides em baixa frequência (Tabela 9). O maior número total de plantas mixoploides foi observado nos tratamentos com colchicina durante duas semanas.

Tabela 9 – Efeito de diferentes concentrações de colchicina e orizalina na indução *in vitro* de poliploidia em *Pfaffia glomerata*

Tratamentos	Concentração (µM)	Tempo de exposição (Semanas)	Sobrevivência média dos explantes (%)	Número total de plantas regeneradas		
				Ploidia		
				2x	4x	Mixo
Controle*			100±0,0	+ ¹	- ²	-
Colchicina	10		100±0,0	11	-	4
	15		100±0,0	1	1	1
	20	1	100±0,0	4	1	3
	25		100±0,0	5	1	1
	30		92±17,9	0	2	1
Orizalina	10		68±39,0	3	-	1
	15		64±21,9	2	0	3
	20	1	48±11,0	-	-	4
	25		24±8,9	-	-	-
	30		20±20,0	-	-	4
Colchicina	10		100±0,0	7	-	2
	15		100±0,0	4	-	3
	20	2	100±0,0	3	-	4
	25		100±0,0	3	1	2
	30		100±0,0	-	-	4
Orizalina	10		28±11,0	-	-	-
	15		28±17,9	-	-	-
	20	2	28±11,0	-	-	2
	25		20±0,0	1	-	-
	30		4±8,9	-	-	-

*Meio de cultura MS não suplementado com colchicina ou orizalina. ¹Todas as plantas regeneradas neste tratamento foram diploides. ²Ausência de plantas regeneradas.

4.2 Nível de ploidia e quantidade de DNA por citometria de fluxo

A determinação dos valores relativos da quantidade de DNA para *P. glomerata* com diferentes ploidias foi realizada por citometria de fluxo. A técnica foi eficiente em fornecer histogramas com boa resolução, permitindo diferenciar as fases G0/G1 e G2/M do ciclo celular. Os coeficientes de variação (CVs) foram 0,59% para *P. glomerata* diplóide e 0,49% para as amostras submetidas ao tratamento de duplicação do genoma. Os picos e os baixos valores de CV indicam que os núcleos foram isolados adequadamente e não sofreram danos significativos durante a extração, coloração e análise, visto que os CVs ficaram abaixo de 3% (BROWN et al., 1991; DOLEŽEL, 1997).

A citometria indicou 2,41 pg de DNA para a amostra diplóide e 4,79 pg de DNA para a poliploide, estes valores equivalem a aproximadamente 2,36 Mb e 4,68 Mb respectivamente (Tabela 10).

Tablea 10 – Quantidade de DNA para o acesso 22 diplóide e poliploide de *P. glomerata*

<i>P. glomerata</i>	Quantidade de DNA (pg)	Quantidade de DNA (Mb)	CV (%)
Diplóide	2,41	2.357	0,59
Poliploide	4,79	4.685	0,49

1 pg = 978 Mp (CROS et al., 1994; DOLEŽEL, 1997)

As figuras 10 e 11, mostram os histogramas obtidos para a *P. glomerta* diplóide e *P. glomerta* poliploide, respectivamente. Em ambos os histogramas é possível comparar a posição do pico G1 da planta alvo com o pico G1 do padrão interno referência, no caso ervilha (*Pisum sativum*) com 9,09 pg de DNA.

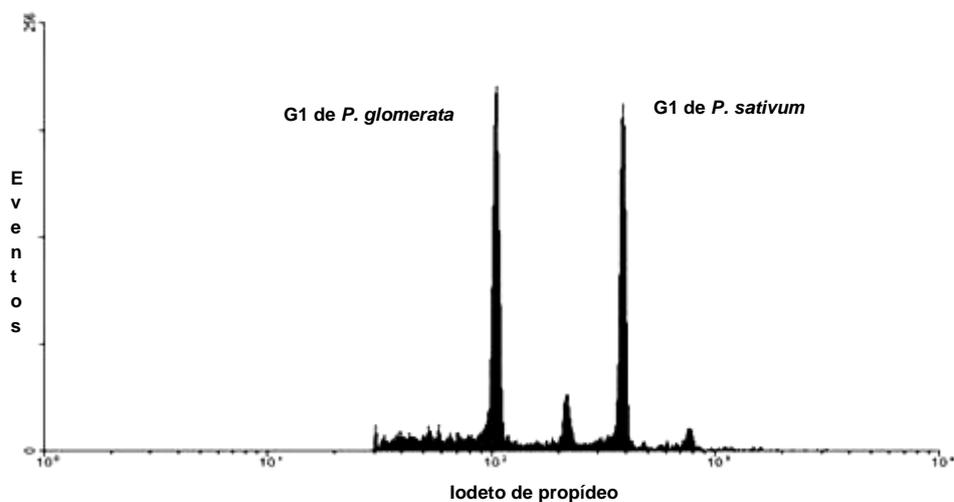


Figura 10- Histograma representativo da quantidade de DNA obtida por análise simultânea de folhas de *Pfaffia glomerata* e *Pisum sativum* coradas com iodeto de propídeo, com uso do tampão de lise celular LB01.

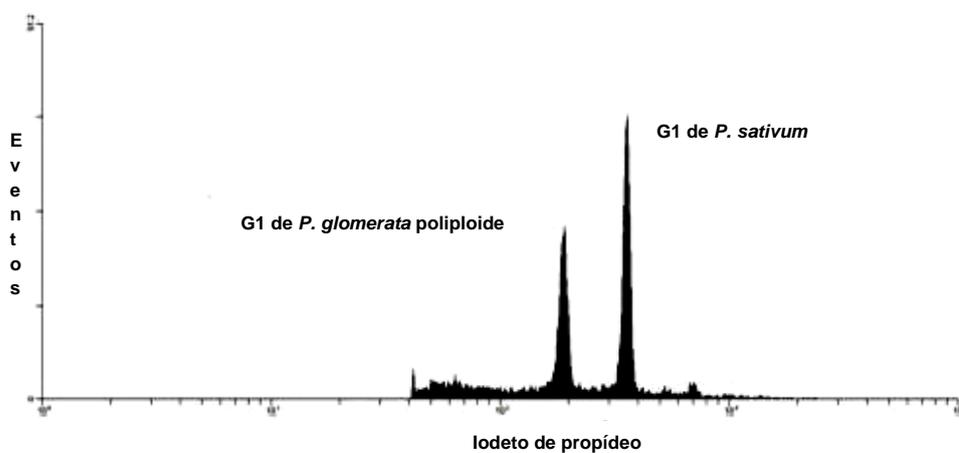


Figura 11- Histograma representativo da quantidade de DNA obtida por análise simultânea de folhas do poliploide induzido *in vitro* de *Pfaffia glomerata* e do padrão de referência *Pisum sativum* coradas com iodeto de propídeo, com uso do tampão de lise celular LB01.

Na área de biotecnologia e melhoramento vegetal a citometria de fluxo tem variadas aplicações, mas geralmente está associada detecção, seleção e controle da estabilidade do nível de ploidia em plantas de interesse econômico

(VAINOLA, 2000; HIRSCH et al., 2001; GEMES-JUHASZ et al., 2002; CAMPOS, 2009; ANTUNES, 2010).

De acordo com os resultados obtidos, a quantidade de DNA nuclear do polidiploide (4,79 pg) é praticamente o dobro da encontrada nos núcleos da planta diploide (2,41 pg). Esses valores são compatíveis com o resultado esperado após o processo de duplicação do material genético. Outros autores já relataram o aumento quantidade de DNA conforme o aumento no nível de ploidia (ISHIGAKI et al., 2010; PREREIRA, 2012).

Vale observar que o histograma representativo de *P. glomerata* submetida à duplicação cromossômica não exibiu pico equivalente ao encontrado na posição G1 da planta diploide, indicando que o indivíduo não se trata de um mixoploide (Figura 2).

Os resultados obtidos confirmam a eficiência do processo de duplicação e a utilidade da citometria de fluxo no monitoramento e identificação de piloploides de *Pfaffia glomerata*.

4.3 Caracterização citogenética do poliploide induzido

A fim de complementar os dados obtidos com a citometria de fluxo sobre o sucesso do evento de duplicação cromossômica em *Pfaffia glomerata*, foi realizado um estudo citogenético para obter características mais detalhadas do cariótipo duplicado.

A coloração com Giemsa mostrou metáfases mitóticas (Figura 12) com 68 cromossomos muito semelhantes entre si, tanto no tamanho quanto na morfologia. Foi possível identificar características morfológicas como constrições primárias (centrômeros) e secundárias. A fórmula cariotípica (FC) compreende 32M (metacêntricos) e 2SM (submetacêntricos).

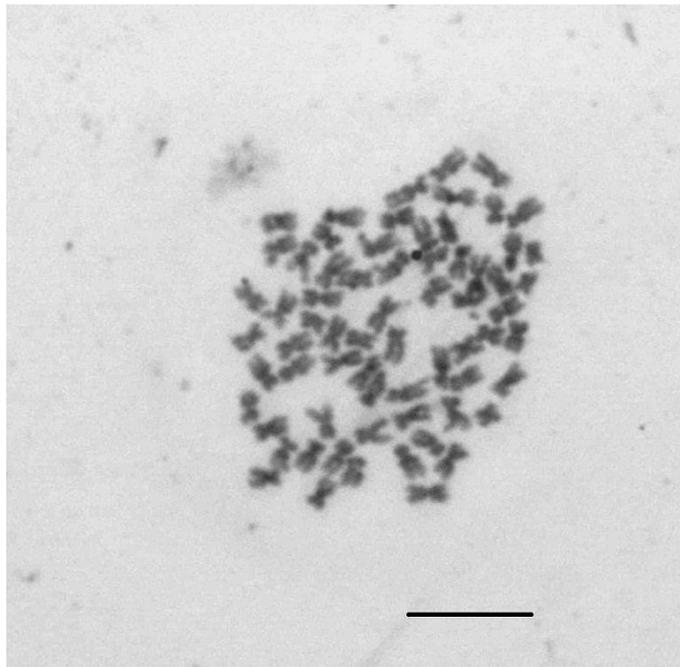


Figura 12. Metáfase mitótica do poliploide induzido de *P. glomerata* corada com Giemsa.

Barra = 5 μm .

As constrições secundárias apareceram em 4 cromossomos com satélites (Figura 12), no braço curto dos mesmos, provavelmente associadas à região organizadora do nucléolo (RON).

Os valores de comprimento absoluto dos cromossomos na planta duplicada variaram de 1,13 μm (cromossomo 17) a 1,94 μm (cromossomo 2), ao passo que o comprimento relativo ficou entre 3,89% (cromossomo 17) e 6,68% (cromossomo 2). O grau de assimetria do cariótipo ficou em 0,13, sendo classificado como simétrico de acordo com Watanabe et al. (1999). Como esperado, o grau de assimetria após a duplicação foi muito próximo do observado no material diploide.

Os dados morfométricos dos cromossomos do poliploide induzido de *P. glomerata* estão listados na tabela 11.

Tabela 11 - Dados morfométricos médios do cariótipo poliploide induzido de *Pfaffia glomerata*

Cromossomo	BC (µm)	BL (µm)	CT (µm)	r	IC	CR (%)	CC
1	0,85	1,02	1,87	1,20	45,45	6,44	M
2	0,84	1,10	1,94	1,31	43,30	6,68	M
3	0,84	1,05	1,89	1,25	44,44	6,51	M
4	0,82	1,10	1,92	1,34	42,71	6,61	M
5	0,81	0,92	1,73	1,14	46,82	5,96	M
6	0,78	0,93	1,71	1,19	45,61	5,89	M
7	0,76	1,15	1,91	1,51	39,79	6,58	M
8	0,75	1,15	1,90	1,53	39,47	6,54	M
9	0,74	0,94	1,68	1,27	44,05	5,79	M
10	0,74	0,84	1,58	1,14	46,84	5,44	M
11	0,73	0,89	1,62	1,22	45,06	5,58	M
12	0,70	0,76	1,46	1,09	47,95	5,03	M
13*	0,69	0,81	1,50	1,17	46,00	5,17	M
14	0,65	0,99	1,64	1,52	39,63	5,65	M
15	0,65	1,14	1,79	1,75	36,31	6,16	SM
16	0,60	0,82	1,42	1,37	42,25	4,89	M
17	0,51	0,62	1,13	1,22	45,13	3,89	M
CLH			28,69				

* medida sem considerar o satélite; Comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo (CT=BL+BC); relação entre braços (r=BL/BC); índice centromérico (IC=BC100/CT); comprimento do lote haplóide (CLH); comprimento relativo do cromossomo (CR=100CT/CLH); metacêntrico (M); submetacêntrico (SM).

A seguir serão discutidas, de forma comparativa, as características do cariótipo diploide descrito no capítulo I e do material duplicado.

O complemento cromossômico de *P. glomerata* (2n=68) pôde ser subagrupado em 17 conjuntos de dois pares de homólogos considerando-se sua similaridade morfológica e morfométrica. Este resultado está de acordo com o valor n=17 determinado para a *P. glomerata* que foi induzida ao evento de duplicação cromossômica *in vitro*.

As metáfases de fáfia com $2n=34$ (Figura 4 – capítulo I) revelaram na maioria das células um satélite desigual, ou seja, está estrutura foi visível apenas em um dos homólogos. Quando a mesma técnica foi aplica na planta poliploide, foi possível visualizar quatro satélites sendo que dois deles mostraram-se mais estendidos em comparação aos outros dois. Esses dados indicam que tanto as planta original quanto a duplicada contam, com satélites gerados por constrictões secundárias em trechos de cromatina com número variado de repetições de determinadas sequências de DNA, possivelmente relacionadas à organização de nucléolo (RON).

A coloração com o fluorocromo CMA_3 confirmou a presença de dois pares de satélites no poliploide (Figura 13A). As marcações com esse corante foram terminais em braços curtos de quatro cromossomos, sendo que duas dessas aparecem mais distendidas. Mais uma vez, os resultados indicam a duplicação bem sucedida, pois na planta $2n=34$ cromossomos, o fluorocromo CMA_3 revelou uma banda bastante visível e outra fraca, indicando constrictões secundárias com nível diferente de distensão ou número distinto de repetição de sequências entre os homólogos.

De forma similar ao registrado para a *P. glomerata* não duplicada, blocos $DAPI^+$ foram identificados na região centromérica de todos os cromossomos da planta poliploide (Figura 13B), sendo visíveis esses blocos como pontos fluorescentes também no núcleo interfásico (Figura 13), caracterizando também um núcleo com padrão heterocromático reticulado.

A aplicação da técnica de FISH com sonda para DNAr 45S revelou resultados similares aos detectados com o fluorocromo CMA_3 . *P. glomerata* com 68 cromossomos apresentou quatro sinais localizados com a sonda para DNAr 45S em posição terminal do braço curto de quatro cromossomos (Figura 14A). Após um processo de re-hibridização, foi possível detectar também os sítios para DNAr 5S, que consistiram também em quatro marcações em cromossomos diferentes dos quatros marcados com sonda para DNAr 45S (Figura 14B). Está estratégia possibilitou registrar que sequências de DNAr 45S não estão nos mesmos pares de homólogos que as sequências que codificam DNAr 5S.

Os dados morfométricos dos cromossomos da *P. glomerata* poliploide (Tabela 11) em conjunto com os resultados obtidos por bandeamento cromossômico e FISH serviram com referência para a construção do cariograma e do idiograma (Figura 15).

O número de constrições secundárias, RONS, satélites e sítios de hibridização de DNAr 45S e 5S mostrou-se associado ao nível de ploidia de *P. glomerata*. Este tipo de relação já foi relatado, por exemplo, para o gênero *Solanum* (MELO, 2009).

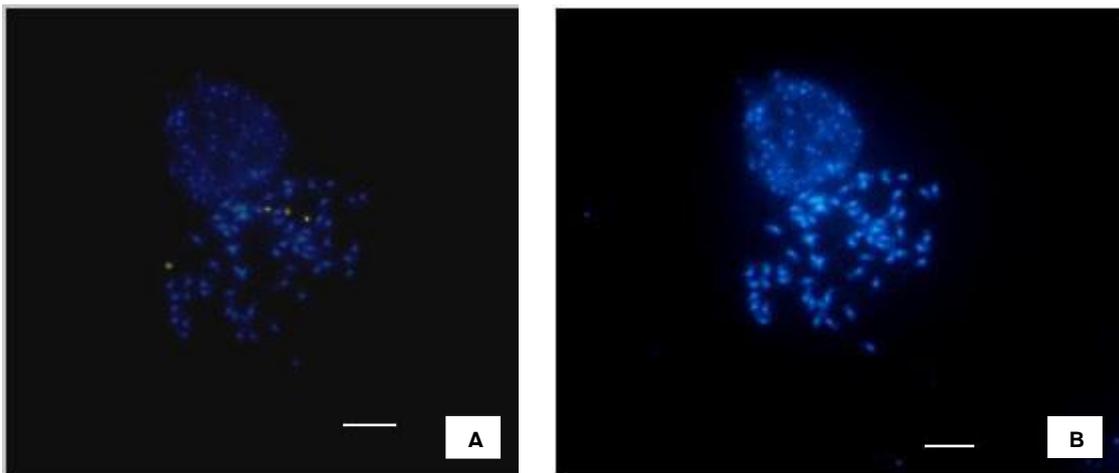


Figura 13 - Bandeamento cromossômico em *P. glomerata* poliploide induzido. (A) Coloração com CMA/DA/DAPI, bandas CMA⁺ em amarelo. (B) Metáfase corada com DAPI, evidenciando bandas centroméricas. Um núcleo interfásico reticulado pode ser observado nas imagens, com blocos de heterocromatina. Barr=5 µm.

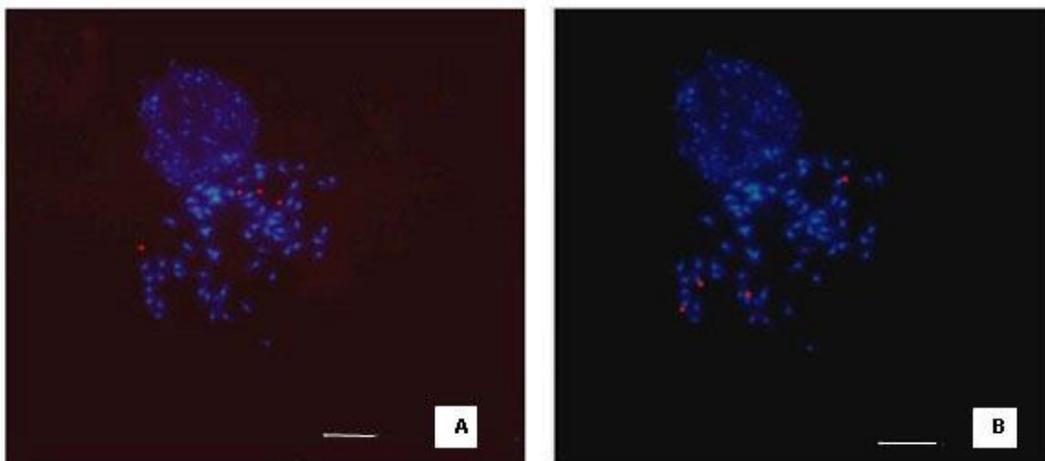


Figura 14 - Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda para DNAr 45s e 5S em cromossomos de *P. glomerata* poliploide induzido. (A) Marcação com sonda para DNAr 45S. (B) Marcação com sonda para DNAr 5S. Os cromossomos com DNAr podem ser visualizados em detalhe. Barra=5 µm.

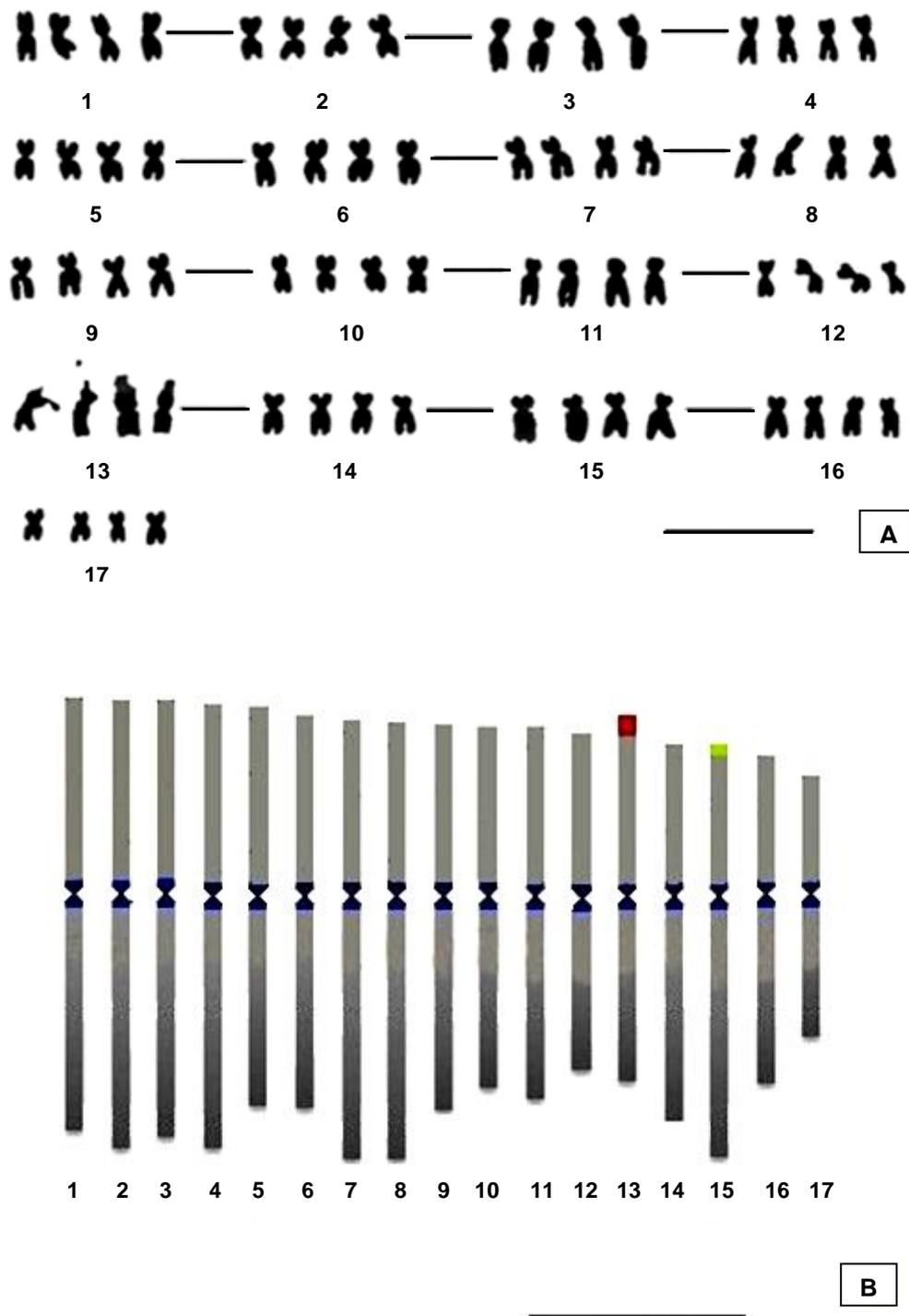


Figura 15. Características cariotípicas do poliploide induzido in vitro de *P. glomerata*. (A) Cariograma obtido a partir de cromossomos metafásicos. Barra = 5 μ m. (B) Idiograma de *P. glomerata* poliplóide. Bandas centrméricas DAPI⁺ (azul). DNAr 45s (vermelho) colocalizado com a banda para CMA. DNAr 5S (verde). Barra = 1 μ m.

Poliploides podem diferir em aptidão quando comparados aos seus genitores graças a fatores associados ao processo de duplicação de cromossomos (BURTON e HUSBAND, 2000). Havendo, contudo, respostas variadas em diferentes espécies submetidas ao processo de poliploidização (OSBOM et al., 2003; AINA et al., 2012).

Assim, o desempenho dos poliploides, principalmente aqueles que passaram pelo evento de duplicação recentemente, como é o caso de *P. glomerata*, pode ser afetado em diversos estágios de vida da planta (MACIEIRA et al., 1993). Estudos adicionais que acompanhem o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo do poliploide do “ginseg brasileiro” são de grande importância para se avaliar sua capacidade de desenvolvimento e também a produção dos princípios ativos de interesse.

4. 4 Quantificação do teor de β -ecdisona nas raízes tuberosas

Nas condições cromatográficas empregadas para dosagem do teor de β -ecdisona presente nas raízes de *P. glomerata*, o tempo médio de retenção e a área do pico para a SQR das amostras com $2n=34$ e $2n=68$, estão listados na tabela 12. Os picos gerados pelo aparelho são expostos abaixo (Figuras 16, 17, 18).

Tabela 12 - Tempo de retenção (TR) e área do pico (mA) obtidos através dos cromatogramas gerados para a substância química de referência (SQR) e para os extratos metanólicos de raízes de *P. glomerata*

Amostra	Tempo de retenção	Área do pico (mA)
Padrão de β -ecdisona	1,227	4118708
<i>P. glomerata</i> $2n=34$	1,237	390036,5
<i>P. glomerata</i> $2n=68$	1,237	1314953

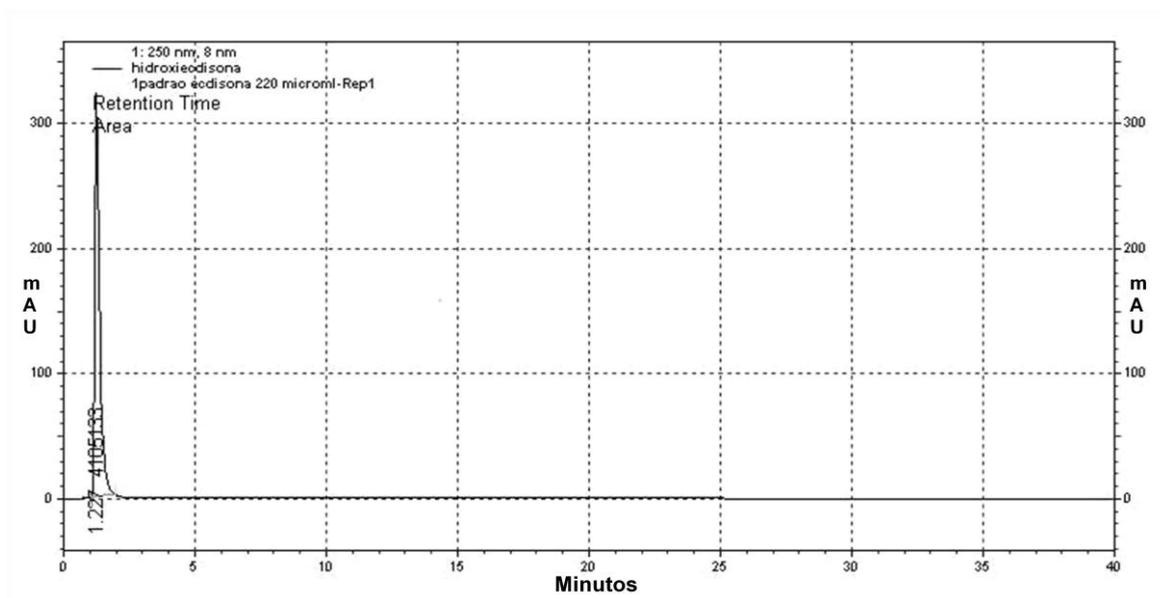


Figura 16 - Cromatograma obtido por HPLC para a substância química de referência - padrão de β -ecdisona (Sigma Aldrich).

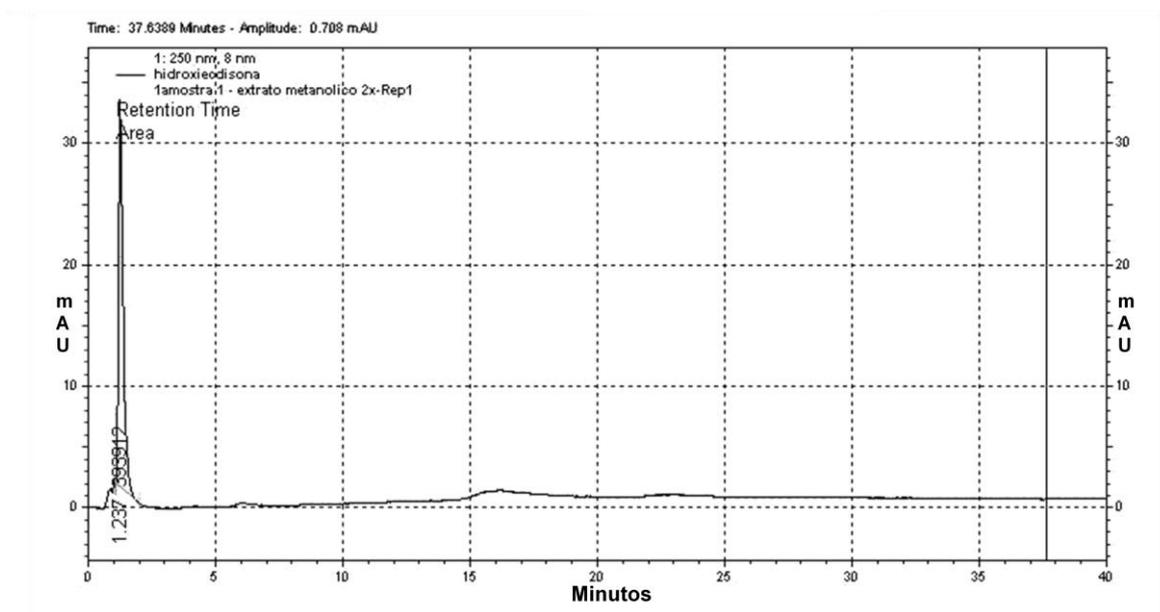


Figura 17 - Cromatograma obtido por HPLC para a amostra do extrato metanólico de raízes de *P. glomerata* 2n=34 na concentração de 1 mg.ml^{-1} . O pico indica a presença de β -ecdisona.

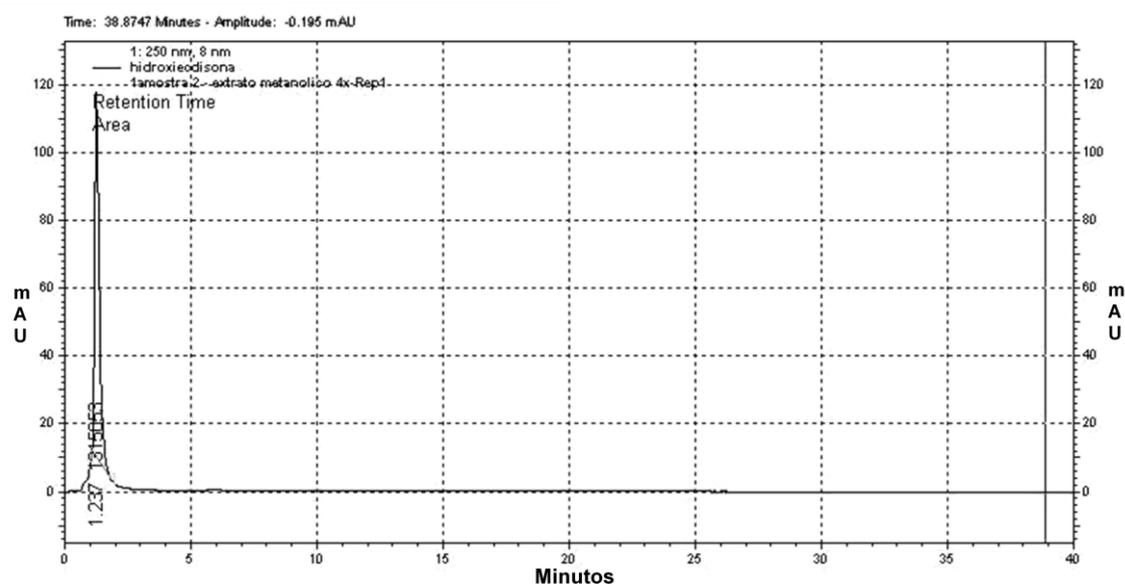


Figura 18 - Cromatograma obtido por HPLC para a amostra do extrato metanólico de raízes de *P. glomerata* 2n=68 na concentração de 1 mg.ml^{-1} , mostrando a presença de β -ecdisona.

Considerando a pureza do padrão igual a 94% (Sigma Aldrich), o teor de β -ecdisona presente nos extratos de *P. glomerata* 2n=34 foi igual a 1,86% sendo que para a planta poliploide este valor foi igual a 6,95%. De acordo com a massa seca de raiz (7,4 g para *P. glomerata* diploide e 4,53 g para *P. glomerata* poliploide) utilizada para o preparo do extrato e o rendimento dos mesmos, os resultados obtidos mostram que o teor de β -ecdisona presente na raiz da planta diploide e poliploide é 0,32% e 0,48%, respectivamente. Este resultado aponta para um aumento de 50% na produção do composto na planta poliploide em comparação com a diploide.

Pfaffia glomerata, é amplamente usada na medicina popular brasileira no combate de diversas patologias (SILVA JÚNIOR e OSAIDA, 2005). Os principais compostos responsáveis por sua atividade biológica são os ecdisteroides, sendo a β -ecdisona o esteróide mais importante empregado nas formulações fitoterápicas (CORRÊA JÚNIOR et al., 2002; GOMES et al., 2010).

A partir da comparação do tempo de retenção da SQR com os tempos de retenção das amostras (Tabela 5), foi possível concluir que o único pico que aparece nos cromatogramas indica a presença do composto β -ecdisona tanto

na planta $2n=34$, quanto na $2n=68$. Este resultado confirma *P. glomerata* como possível fonte do fitoesteroide β -ecdisona (SHIOBARA et al., 1993; CORRÊA JR et al., 2002; VIGO et al., 2004; KAMADA et al., 2009; GOMES et al., 2010; IAREMA et al., 2012).

A β -ecdisona foi detectada em ambas as amostras de “fáfia”, entretanto, apresentou-se em maior quantidade na planta poliploide, sendo 50% mais abundante na comparação com o valor obtido para a planta com $2n=34$. Assim, a utilização do sistema cromatográfico por HPLC com a fase móvel acetonitrila/água, mostrou-se eficaz na determinação de substância ecdsterioide presente nos extratos de *P. glomerata*, comprovando a qualidade do método conforme indicado por Zimmer et al. (2006).

Adicionalmente, quando são considerados os valores obtidos para as áreas dos picos das amostras (Tabela 5), é possível sugerir que a duplicação cromossômica foi bem sucedida em aumentar a produção do metabólito de interesse comercial.

A poliploidia geralmente está associada ao aumento do tamanho das células (ANDERSON, 1972, ROMERO-ARANDA et al., 1997; ZHANG et al. 2007). Nesse caso, como o nível de ploidia pode incrementar, em alguma escala o tamanho de folhas, o tamanho de células, o número de cloroplastos e estômatos por célula e a quantidade de enzimas e pigmentos fotossintéticos nas células de plantas poliploides (TANG et al., 2010; GANTAIT et al., 2011; AINA et al., 2012; OMIDBAIGI et al., 2010), uma possibilidade é que, após o processo de duplicação o aumento do teor de β -ecdisona seja consequência da expressão diferencial de genes que estejam direta ou indiretamente envolvidos em sua via biossintética.

Considera-se, portanto, que os resultados obtidos são de grande relevância para futuras pesquisas de melhoramento genético que busquem incrementar o valor comercial da planta.

5 CONCLUSÕES

A metodologia aplicada, envolvendo extração, coloração e análise, foi apropriada para estimar a quantidade de DNA nuclear tanto da *P. glomerata* diploide (2,41 pg), quanto da poliploide (4,79 pg). Assim, entende-se que o conteúdo de DNA aumentou proporcionalmente ao aumento do número cromossômico.

As preparações citogenéticas possibilitaram a preservação morfológica dos cromossomos e foram viáveis a identificação e o pareamento dos cromossomos de *P. glomerata* em grupos de 4 homólogos, sendo possível propor a fórmula cariotípica 2M + 32SM cromossomos para o poliploide induzido de *Pfaffia glomerata*.

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) localizou quatro sequências de DNAr 45s e outras quatro sequências de DNAr 5s no genoma duplicado de *P. glomerata*, indicando mais uma vez o sucesso da poliploidização.

A metodologia de HPLC foi capaz de dosar do teor de β -ecdisona presente nas raízes de *P. glomerata* parental e poliploide. Os teores obtidos sugerem que a duplicação pode ser uma boa estratégia biotecnológica para aumentar a produção deste composto na espécie estudada, visto que o extrato metanólico do poliploide apresentou maior teor do ecdisteroide.

Diante de todo o exposto, os resultados deste trabalho constituem uma base para pesquisas futuras visando o aumento do teor de princípios ativos e o uso comercial da espécie.

6 REFERÊNCIAS

- ABREU, J.C.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; BARBOSA, S. 2006. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **41**: 1629-1635.
- AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **17**: 114-140.
- AHMED, L.; BEGUM, R.; NOOR, S.S.; ZAMAN, M.A.; ALAM, S.S. 2004. Reversible fluorescent chromosome banding in three *Crinum* spp. (Amaryllidaceae). **Cytologia**, **69 (1)**: 69-74.
- AINA, O.; QUESENBERRY, K.; GALLO, M. 2012. *In vitro* induction of tetraploids in *Arachis paraguariensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **111**: 231-238.
- ALEXIADES, M.N.; SHANLEY, P. 2004. Forest products, livelihoods and conservation: case studies of non-timber forest product systems. In: ALEXIADES, M.N.; SHANLEY, P. (Eds.). **Productos forestales medios de subsistencia y conservación: estudios de caso sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables**, **3**: 499 p.
- ALLARD, R.W. 1971. Princípios do melhoramento genético das plantas. Tradução de A. BLUMENSCHNEIN, E. PATERNIANI, J. T. A. GURGEL e R. VENCOSKY. São Paulo, SP, Editora Edgard Blücher Ltda. 381p.
- ALVIM, N.R.; CUNHA, K.C.T.; CORTEZ, L.E.R.; BAZOTTE, R.B.; MARQUES, L.C.; CORTEZ, D.A.G. 1999. Efeitos biológicos da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e da *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum**, **21 (2)**: 349-352.
- ANDERSON, L.C. 1972. *Flaveria campestris* (asteraceae): a case of polyploidy or relic ancestral diploidy? **Evolution**, **26 (24)**: 671-673.
- ANTUNES, P. 2010. **Indução de plantas tetraplóides in vitro através de tratamento com agentes c-mitóticos no tamarilho (Cyphomandra betaceae) e no medronheiro (Arbutus unedo)**. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.
- ANVISA, 2013. Site acessado em 15-01-2013 <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+fitoterapicos>
- APG II. The Angiosperm Phylogeny Group 2003. An update of Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: **APG II. Botanical Journal of the Linnean Society**, **141**: 399-436.

BAEZA, C.; SCHRADER, O. 2005. Comparative karyotype analysis in *Haplopappus* Cass. and *Grindelia* Willd. (Asteraceae) by double FISH with rRNA specific genes. **Plant Systematics and Evolution**, **251**: 161-172.

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

BAKRY, F.; REBERDIERE, N.P. de la; PICHOT, S.; JENNY, C. 2001. In liquid medium colchicine treatment induces non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, **62**: 3-12.

BARROSO, G. M.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L.; GUIMARÃES, E.L. 2002. **Sistemática de Angiospermas do Brasil, Viçosa (UFV), 1 (2)**: 309.

BARREIRO, E. J.; MANSSOUR, C. A. M. 2008. Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. **Artmed Editora Ltda: Porto Alegre**, 71-135 p.

BARTH, O.M. e MELLHEM, T.S. 1988. **Glossário Ilustrado de Palinologia**. Campinas, Editora da Universidade Estadual de Campinas.

BARTH, O. M.; CORTE-REAL, S.; MACIEIRA, E. M. 1976. Morfologia do polén anemófilo e alergizante no Brasil: II. Polygonaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Leguminosae, Euphorbiaceae e Myrtaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo cruz, Rio de Janeiro**, **4**: 191-201.

BASTOS, J.R.; BAUERMANN S.G.; MARCHIORETTO, M.S. 2010. Morfologia polínica dos gêneros *Hebanthe* Mart. e *Pfaffia* Mart. nativos do Rio Grande do Sul. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, 37-42 p.

BAUERMANN, S. G.; EVALDT, A. C. P.; ZANCHIN, J. R.; BORDIGNON, S. A. DE. 2010. Diferenciação polínica de *Butia*, *Euterpe*, *Geonoma*, *Syagrus* e *Thrinax* e implicações paleoecológicas de *Arecaceae* para o Rio Grande do Sul. **Iheringia, Série Botânica**, **65 (1)**: 35-46.

BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M. E.; PAPES, D. 2002. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss (Aliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, **139**: 99-108.

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

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. 2005. Plant genome size research: A field in focus. **Annals of Botany**, **95**: 1-6.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. 2012. Angiosperm DNA C-values database (release 8.0, Dec. 2012) <http://www.kew.org/cvalues/>.

BENTES, L.B.; HIDALGO, A.F.; SILVA, J.F. 2000. Produção e crescimento de raízes de *Pfaffia glomerata* sob cultivo orgânico. **XVI Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais**, 33p.

BIAVATTI, M.W.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. 2007. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **17**: 640-653.

BLACKMORE, S.; BARNES, S.H. 1991. Pollen and spores, patterns of diversification. **Oxford: Clarendon Press**, 391p.

BERG, M.E.V.D. 1982. Plantas Mediciniais na Amazônia – **Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático**. Belém, CNPq/PTU.

BORSCH, T. 1995. Three new combinations in *Pfaffia* (Amaranthaceae) from the New World Tropics. **Novon** **5**: 230-233.

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.

BRASZEWKA-ZALEWSKA, A.; BERNAS, T.; MALUSZYNSKA, J. 2010. Epigenetic chromatin modifications in *Brassica* genomes. **Genome**, **210**: 203-210.

BRASIL. 2007. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. **Brasília: Ministério da Saúde/Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos**, 77 p.

BRASILEIRO-VIDAL, A. N.; GUERRA, M. 2002. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, A. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 277-298.

BROWN, S.C.; DEVAUX, P.; MARIE, D.; BERGOUNIOUX, C.; PETIT, P.X. 1991. Analyse de la pléidie par cytométrie en flux. **Biofutur**, **105**: 1-16.

BURIL, M.T.; ALVES, M.; SANTOS, F.A.S. 2011. Tipificação polínica em Leguminosae de uma área prioritária para conservação da Caatinga: Caesalpinioideae e Papilionoideae. *Acta Botanica Brasilica*, **25(3)**: 699-712.

BURIL, M.T.; SANTOS, F.A.S.; ALVES, M. 2010. Diversidade polínica das Mimosoideae (Leguminosae) ocorrentes em uma área de caatinga, Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, **24(1)**: 53-64.

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. 1991. **Genética**. 7^o ed. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

BURTON, T. L., HUSBAND, B. C., 2000: Fitness differences among diploids, tetraploids, and their triploid progeny in *Chamerion angustifolium*: mechanisms of inviability and implications for polyploid evolution. **Evolution**, **54**: 1182–1191.

BUSTAMANTE, F.O. 2009. **Variações cromossômicas associadas à poliploidização em híbridos de *Pennisetum* spp.: um estudo temporal e tecido específico**. 53p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE L.C.; SALGADO, C.C.; SANTOS, F.C.; COSTA, P.N.; SILVA, P.S.; ALVES, C.C.S.; VICCINI, L.F.; A. V. PEREIRA, A.V. 2009. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, **128 (1)**: 101-104.

CARLINI, E.A.; RODRIGUES, E.; MENDES, F.R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B. 2006. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16**: 690-695.

CAROVIC-STANKO, K.; LIBER, Z.; BESENDORFER, V.; JAVORNIK, B.; BOHANEK, B. KOLAC, I.; SATOVIC, Z. 2010. Genetic relations among basil taxa (*Ocimum* L.) based on molecular markers, nuclear DNA content, and chromosome number. **Plant Systematics and Evolution**, **285**: 13-22.

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

CASTRO, H.G. de; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H. da; MOSQUIM, P.R. 2004. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. **2. ed. Visconde do Rio Branco: UFV**, 113 p.

CECCARELLI, M.; MINELLI, S.; MAGGINI, F.; CIONINI, P.G. 1995. Genome size variation in *Vicia faba*. **Heredity**, v. 74, p. 180-187.

CERBAH, M.; COULAUD, J.; SILJAK-YAKOVLEV, S. 1998. rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). **Heredity**, **89 (4)**: 312-318.

CHEN, W.H.; TANG, C.Y.; KAO, Y.L. 2009. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **98**: 229-238.

CHUNG, M.C.; LEE, Y.I.; CHENG, Y.Y.; CHOU, Y.J.; LU, C.F. 2008. Chromosomal polymorphism of ribosomal genes in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**, **116**: 745-753.

COELHO, M.S.E. 2009. **Caracterização citogenética de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEG., *P. cincinnata* MAST. e seu híbrido interespecífico**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós- Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. 14 p.

CORRÊA JÚNIOR, R.C.; MING, L.C.; CORTEZ, D.A.G. 2002. Aspectos gerais da espécie Fáfia (*Pfaffia glomerata* Pedersen) e recomendações técnicas para seu cultivo. **CYTED-Centro Iberoamericano de Formacion**. Antigua, 11p.

CORRÊA JÚNIOR, C. 2003. **Estudo agrônômico de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]: Sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de beta-ecdisona em diferentes acessos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul**. Doutorado. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 73 p.

CORRÊA JÚNIOR C; CORTEZ DAG; MING LC; SOARES W. 2006. Fáfia - o ginseng brasileiro: aspectos agrônômicos e fitoquímicos. **Editora Clichetec Ltda**, Maringá, 22p.

COSTA, C.E.M.; BARONI, E.A.; COSTA, S.C. 2000. Efeito do ginseng brasileiro *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) no controle do diabetes experimental em ratos. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, 4 (2): 95-101**.

CROS, J.; GAVALDA, M. C.; CHABRILLANGE, N.; RÉCALT, C.; DUPERRAY, C.; HAMON, S. 1994. Variation in the total nuclear DNA content in african *Coffea* species (Rubiaceae). **Café Cacao Thé, 28 (1): 3 -10**.

CRUZ, M. A. V. E MELHEM, T. S. 1979. Grãos de Polen de Plantas Alergógenas. Amaranthaceae e Chenopodiaceae. **Hoehnea, 8: 47-56**.

DALGAARD, V. (1986). Estudios cromosomáticos sobre fanerógamas de Macaronesia. **Anales del Jardín Botánico 43(1): 83-111**.

DANIYA, S.; SHIRA, D. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinalis* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. **Scientia Horticulturae, 88: 277-287**.

DETTKE, G.A.; SANTOS, R.P. 2009. Tipos de aberturas dos grãos de pólen de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Acta Botanica Brasilica, 23 (4): 1119-1128**.

DHAWAN, O.P., LAVANIA, U.C. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. **Euphytica, 87: 81-89**.

DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum, 31: 113-120**.

DOLEŽEL, J. 1991. Flow cytometry analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis, 2: 143-154**.

DOLEŽEL, J. 1997. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal Applied Genetics, 38 (3): 285-302**.

DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, **31**: 113-120.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSAK, M. A.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. **Annals Botany** **82 (Suppl. A)**: 17 – 26.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J., SUDA, J. 2007. Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes chromosomes and genomes. **Editora Wiley- VCH**, 454.

DOYLE, J. A. 2005. Early evolution of angiosperm pollen as inferred from molecular and morphological phylogenetic analyses. **Grana**, **44**: 227-251.

DU BOCAGE, A.L.; SOUZA, M.A.; MIOTTO, T.S.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V. 2008. Palinotaxonomia de espécies de *Acacia* (Leguminosae – Mimosoideae) no Semi-Arido brasileiro. **Rodriguésia** **59 (3)**: 587-596.

EDLUND, A. F.; SWASON, R.; PREUSS, D. 2004. Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. **The Plant Cell**, **16**: 84-97.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G.C. 2004. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis, UFSC.

ERDTMAN, G. 1952. Pollen morphology and plant taxonomy – Angiosperms. **Almqvist e Wiksell**, Stockholm.

ERDTMAN, G. 1960. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, **54 (4)**: 561-564.

ERDTMAN, G. 1966. Pollen morphology and plant taxonomy - Angiosperms 2. ed. **Hafner, New York**. 553p.

FEITOZA, L.L.; MARTINS, M.I.G.; CASTRO, A.A.J.F.; FÉLIX, L.P.; CARVALHO, R. 2010. Cytogenetics of Alismataceae and Limnocharitaceae: CMA/DAPI banding and 45S rDNA sites. **Journal of Plant Research**, **286**: 199–208.

FEITOZA, L.L.; MARTINS, M.I.G.; CASTRO, A.A.J.F.; FÉLIX, L.P.; CARVALHO, R. 2010. Cytogenetics of Alismataceae and Limnocharitaceae: CMA/DAPI banding and 45S rDNA sites. **Journal of Plant Research**, **286**: 199–208.

FELIX, W.J.P.; FELIX, L.P.; MELO, N.F.; DUTILH, J.H.A.; CARVALHO. 2011. Cytogenetics of Amaryllidaceae species: heterochromatin evolution in different ploidy levels. **Plant Systematics and Evolution**, **292, (3-4)**: 215-221.

FERNÁNDEZ-ROMERO, M.D.; TORRES, A.M.; MILLÁN, T.; CUBERO, J.I. CABRERA, A. 2001. Physical mapping of ribosomal DNA on several species of the subgenus *Rosa*. **Theoretical and Applied Genetics**, **103**: 835–838.

FESTUCCI-BUSELLI R.A., CONTIM L.A.S., BARBOSA L.C.A., STUART J.J., OTONI W.C. 2008. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. **Botany**, **86**: 978-987.

FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. 2002. Comportamento de 23 acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos do Goytacazes – RJ. **XVII Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais. Cuiabá- MT.**

FLAVELL, R. B. 1989. Variation in structure and expression of ribosomal DNA loci in wheat. **Plant Molecular Genetics**, **31**: 963-968.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SILVA-SANTOS, J. E.; SANTOS, C.A.D., JUNIOR, C.C.; MING, L.C. CORTEZ, D.A.G.; MARQUES, M.C.A. 2004. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, **74 (9)**: 1167-1179.

FREITAS, A. 2007. Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo_fitoterapicos.pdf.

FORNI-MARTINS, E.R.; GUERRA, M. 1999. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. Species. **Caryologia**, **52**: 97-103.

FOURNY, A.C.S.; MENDONÇA, C.B.F.; LOPES, T.C.C.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V. 2010. Palinologia de espécies de Gesneriaceae Rich. & Juss. ocorrentes no estado do Rio de Janeiro, Brasil *Acta Botanica Brasilica*, **24(3)**: 812-824.

GANGA, M.; CHEZHIAN, N. 2002. Influence of the antimetabolic agents colchicine and oryzalin on in vitro regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, **77**: 572-575.

GANTAIT, S.; MANDAL, N.; BHATTACHARYYA, S.; DAS, P.K. 2011. Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **106**: 485-493.

GAO, S.L.; CHEN, B.J.; ZHU, D.N. 2002. *In vitro* production and identification of autotetraploids of *Scutellaria baicalensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **70**: 289-293.

GEMES-JUHASZ, A.; BALOGH, P.; FERENCZY, A.; KRISTOF. 2002. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Cell Reports**, **21**:105-111.

GOMES JÚNIOR., J.C. 1966. Contribuição ao conhecimento do pólen da Caatinga. **Arquivos de Botânica do Estado de São Paulo** **4(2)**: 89-93.

GOMES, A.C.M.M.; NICOLE, M.; MATTOS, J.K.; PEREIRA, A.I.V.; PEREIRA, P.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.; CAPDEVILLE, G.; MOITA, A.W.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2010. Concentration of β -ecdysone (20E) in susceptible and resistant accessions of *Pfaffia glomerata* infected with *Meloidogyne incognita* and histological characterisation of resistance. **Nematology**, **12 (5)**: 701-709.

GRAFI, G.; ZEMACH, A.; PITTO, L. 2007. Methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins in plants. **Biochimica and Biophysica Acta**, **1769**: 287-294.

GRZEBELUS, E.; ADAMUS, A. 2004. Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling of gynogenic onion (*Allium cepa* L.) embryos. **Plant Science**, **167**: 569-574.

GUERRA, M.S. 1988. *Introdução a Citogenética Geral*. Guanabara: Rio de Janeiro. 142p.

GUERRA, M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, **71**: 234-241.

GUERRA, M.; CARVALHO, R. 2002. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, **136**: 159-168.

GUIMARÃES, G.; CARDOSO, L.; OLIVEIRA, H.; SANTOS, C.; DUARTE, P.; SOTTOMAYOR, M. 2012. Cytogenetic characterization and genome size of the medical plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **AoB Plants**: pls002; doi:10.1093/aobpla/pls002.

GUPTA, M.P. 2001. Natural products research in Latin America. **Pharmaceutical Biology**, **39**: 80–91.

GUPTA, D.K.; NICOLOSO, F.T.; SCHETINGER, W.R.; ROSSATO, L.V.; HUANG, H.G.; SRIVASTAVA, S.; YANG, X.E. 2011. Lead induced responses of *Pfaffia glomerata*, an economically important Brazilian medicinal plant, under *in vitro* culture conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, **86 (3)**: 272-277.

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

HEITZ, E. 1928. Das heterochromatin der moose. I. Jabet. Wiss. **Botanica**, **69**: 762-818.

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

HIRSC, A.M.; TESTOLIN, R.; BROWN, S.; CHAT, J.; FORTUNE, F.D.; BUREAU, J.M.; DE NAY, D. 2001. Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia* (kiwifruit). **Plant Cell Reports**, **20**: 508-516.

HIZUME, M.; SHIBATA, F.; MARUYAMA, Y.; KONDO, T. 2001. Cloning of DNA sequences localized on proximal fluorescent chromosome bands by microdissection in *Pinus densiflora* Sieb. & Zucc. **Chromosoma**, **110**: 345-351.

HOUBEN, A.; WANNER, G.; HANSON, L.; VERLIN, D.; LEACH, C.; TIMMES, J. 2000. Cloning and characterization of polymorphic heterochromatic segments of *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosoma**, **109**: 206–213.

IAREMA, L.; CRUZ, A.C.F.; SALDANHA, C.W.; DIAS, L.L.C.; VIEIRA, R.F.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. 2012. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, **110 (2)**: 227-238.

ISHIGAKI, G. 2009. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multipleshoot clumps and seedlings. **Grassland Science**, **55 (3)**: 164– 170.

JASKANI, M.J. 2004. Induction and characterization of tetraploid watermelon. **Journal of the Korean Society Horticultural Science**, **45**: 60-65.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, **92**:4487-4491.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, **92**:4487-4491.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. 1999. Plant Systematics – A phylogenetic approach. **Sinauer Associates, Inc.**

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGUE, M.J. 2008. Plant systematics – A phylogenetic approach. **3^a ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 611 p.**

JUDD, W. S.; OLMSTEAD, R. G. 2004. A survey of tricolpate (Eudicot) Phylogenetic relationships. **American Journal of Botany**, **91 (10)**: 1627-1644.

KAMADA, T.; CASALI, V.W.D.; BARBOSA, L.C.A.; FORTES, I.C.P.; FINGER, F.L. 1999. Plasticidade fenotípica do óleo essencial em acessos de manjeriço (*Ocimum* spp.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **1 (2)**: 13-22.

KAMADA, T. 2006. **Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres**

morfológicos e teor de beta-ecdisona. Tese de Doutorado Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

KAMADA, T.; PICOLI, E.A.E.; VIEIRA, R.F. BARBOSA, L.C.A.; CRUZ, C.D.; OTONI, W.C. 2009. Variação de caracteres morfológicos e fisiológicos de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e correlação com a produção de β -ecdisona. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, **11 (3)**: 247- 256.

KNIGHT, C.A., BEAULIEU J.M. 2008. Genome size scaling through phenotype space. **Annals of Botany**, 1-8.

KOLANO, B.; PANDO, L.G.; MALUSZYNSKA, J. 2001. Molecular cytogenetics studies in *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus caudatus*. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, **70 (2)**: 85-90.

KOEHLER, S.; CABRAL J.S.; WHITTEN, W. M.; WILLIAMS, N.H.; SINGER , R.B.; NEUBIG, K.M.; GUERRA, M.; SOUZA, A.P.; AMARAL, M.C.E. 2008. Molecular phylogeny of the neotropical genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): species delimitation and insights into chromosome evolution. **Annals of Botany**, **102**: 491–507.

KOLAR, F.; STECH, M.; TRAYNICEK, P.; RAUCHOVA, J.; UUFUS, T.; VIT, P.; KUBESOVA, M., SUDA, J. 2009. Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. **Annals of Botany**, **103**: 963–974.

KRON, P.; SUDA, J.; Husband, B.C.. 2007. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. **(38)**: 847-876.

LAWRENCE, G.J.; APPELS, R. 1986. Mapping the nucleolus organizer region, seed protein loci and isozyme loci on chromosome 1R in rye. **Theoretical and Applied Genetics**, **71**: 742-749.

LEAL, P.F.; KFOURI, M.B.; ALEXANDRE, F.C.; FAGUNDES, F.H.R.; TOYAMA, M.H.; MEIRELES, M.A. 2012. Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, **54 (1)**: 38-45.

LEITCH, A.R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I.J. 1994. *In situ* hybridization: a practical guide. **Bios Scientific Publishers Limited**, 118 p.

LEPERS-ANDRZEJEWSKI, S.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BRONW, S.C.; WONG, M.; DRON, M. 2011. Diversity and dynamics of plant genome size: an example of polysomaty from a cytogenetic atudy of *Tahitian vanilla* (*Vanilla x Tatitensis*, Orchidaceae). **American Journal of Botany** **98(6)**: 986–997.

- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, **52**: 201-210.
- LIM, K.Y.; MATYASEK, R.; KOVARIK, A.; LEITCH, A. 2007. Parental origin and genome evolution in the allopolyploid *Iris versicolor*. **Annals of Botany**, **100**: 219-224.
- LIMA, L.C.L.; SILVA, F.H.M.; ARAUJO, S.S.; SANTOS, F.A.R. 2006. Morfologia polínica de espécies de *Mimosa* L. (Leguminosae) apícolas do Semiárido. In: Santos, F.A.R. (Ed.). 2006. **Apium plantae**, 87-102.
- LIMA, L.C.L.; SILVA, F.H.M., SANTOS, F.A.R. 2008. Palinologia de espécies de *Mimosa* L. (Leguminosae – Mimosoideae) do Semi-Arido brasileiro. **Acta Botanica Brasilica**, **22(3)**: 794-805.
- LIVINGSTONE, D. A. 1972. The pollen morphology of African Amaranthaceae. In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN ASSOCIATION OF STRATIGRAPHY PALYNOLOGISTS, 3, 1972, Toronto. **Proceedings Toronto: AASP**, p. 1-132.
- LIVINGSTONE, D.A. 2973. Stellate pore ornamentation in pollen grains of the Amaranthaceae. **Pollen et Spores**, **15 (3-4)**: 345-351.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J. A. 2002. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum**.
- MACIEIRA, N. O., JACQUARD, P., LUMARET, R., 1993. Competition between diploid and derivative autotetraploid *Dactylis glomerata* L. from Galicia: implications for the establishment of novel polyploid populations. **New Phytologist**, **124**: 321–328.
- MAGALHÃES, P. M. 2000. Agrotecnología para el cultivo de fáfia o “ginseng” brasileiro. In: MARTÍNEZ, J. V. A.; BERNAL, H. Y.; CÁCERES, A. (Org.). **Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas**. 1/1 ed. Santafé de Bogotá: Andrés Bello/CYTED 323-332 p.
- MANZALI DE SÁ, I. 2006. A interdisciplinaridade na pesquisa de plantas medicinais de uso tradicional. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, **5**: 7-12.
- MASCHIO, J. 1993. Japão provoca corrida da Pfaffia no Paraná. Folha de São Paulo 21 de fevereiro de 1993. **Agrofolha, Caderno 5**, página de rosto.
- MARCHIORETTO, M.S.; MIOTTO, S.T.S.; SIQUEIRA, J.C.S. 2010. O gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) no Brasil. **Hoehnea**, **37 (3)**: 461-511.
- MARCHIORETTO, M.S.; SENNA, L.; SIQUEIRA, J.C. 2012. Amaranthaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000042>).

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

MARKGRAF, V.; D'ANTONI, H.L. 1978. Pollen flora of Argentina. **Tucson: The University of Arizona Press**, 208 p.

MARQUES, L.C.; GALVÃO, S.M.P.; ESPINOLA, E. DIAS, R.F. MATTEI, R.; OLIVEIRA, M.G.M.; CARLINI, E.L.D. 2004. Psychopharmacological assesment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, **18 (7)**: 566-572.

MATTOS, S.H.; INNECCO, R.; MARCO, C.A.; ARAÚJO, A.V. 2007. Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais. Fortaleza: **Banco do Nordeste do Brasil**, 61-63 p.

MDIC - Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior – 2012. Disponível em: <http://aliceweb.mdic.gov.br//consulta-ncm/consultar>. Raízes de "ginseng", frescas, secas, incl.cortad.tritur.pó. acesso em: 10/10/2012.

MEDRI, M.E.; LLERAS, E.; VALOIS, A.C.C. 1980. Comparação anatômica entre folhas diplóides e poliplóides do guaraná [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke]. **Acta Amazônica**, **10 (2)**: 283-288.

MELHEM, T.S.; MATOS, M.E.R. 1972. Variabilidade de forma dos grãos de pólen de *Eriope crassipes* Benth. *Labiatae*. **Hoehnea**, **2**: 1-10.

MELHEM, T.S., CRUZ-BARROS, M.A.V., CORRÊA, A.M.S., MAKINO-WATANABE, H., SILVESTRE-CAPELATO, M.S.F. & GONÇALVES-ESTEVEZ, V.L. 2003. Variabilidade polínica em plantas de Campos do Jordão (São Paulo, Brasil). **Boletim do Instituto de Botânica de São Paulo** **16**:1-104.

MELO, C. A. F. 2009. **Estudo citogenético e molecular em nove espécies do género *Solanum* L. (Solanaceae A. Juss.)**. Dissertação de mestrado em Agronomia. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MELO, N.F.; GUERRA, M. 2003. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, **92**: 309-316.

MELO, C.A.F.; MARTINS, M.I.G.; OLIVEIRA M.B.M.; BENKO-ISEPPON, A.M.; CARVALHO, R. 2011. Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L. *Plant Systematics and Evolution*, **293 (1-4)**: 227-235.

MENDONÇA-FILHO, R.F.W.; MENENZES, F.S. 2003. Estudo da utilização de plantas medicinais pela população da Ilha Grande- RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **13**: 55-58.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. 2001. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **11**: 21-35.

MICHIRO, K.; YASUIRO, T.; TOSHIARU, H.; SHIGEYUKI, A.; MASAO, I.; MASASHI, K. 1999. Enhancing effect of brasilian *Pfaffia glomerata* on the declined reproductive ability of aged male golden hamsters. **Natural Medicines**, **53 (1)**: 42-45.

MING, L.C. 1999. Coleta de plantas medicinais. In: **Plantas medicinais: Arte e Ciência - um guaiade estudo interdisciplinar**, 69-86p.

MING, L. C.; CORRÊA JR., C. 2001. Collection of Fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] in northwest region of Paraná State, Brazil. **Proceedings of the World Conference on Medicinal and Aromatic Plants**, 242 p.

MIOTTO, T.S.; SIQUEIRA, J.C. 2009. Padrões de Distribuição Geográfica das espécies brasileiras de *Pfaffia* (Amaranthaceae). **Rodriguésia**, **60 (3)**: 667-681.

MISHRA, B.K.; PATHAK, S.; SHARMA, A.; TRIVEDI, P.K.; SHUKLA, S. 2010. Modulated gene expression in newly synthesized auto-tetraploid of *Papaver somniferum* L. **South African Journal of Botany**, **76**: 447-452.

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 rDNA gene sites. **Genetics and Molecular Biology**, **30 (1)**: 65-72.

MONTANARI JÚNIOR, I. 2002. Exploração econômica de plantas medicinais da Mata Atlântica. In: SIMÕES, L. L.; LINO C. F. (Org.). Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais. São Paulo: SENAC, 35-54 p.

MONTANARI JÚNIOR, I. 2005. **Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) visando o seu cultivo comercial**. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Vegetal) - Instituto Agrônômico de Campinas, 75 p.

MORAES, A.P.; LEITCH, I.J.; LEITCH. 2012. Chromosome studies in Orchidaceae: karyotype divergence in Neotropical genera in subtribe Maxillariinae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, **170 (1)**: 29-39.

MOSCONE, E.A.; BARANYI, M.; EBERT, I.; GREILHUBER, J.; EHRENDORFER, F.; HUNZIKER, A.T. 2003. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and Feulgen densitometry. **Annals of Botany** **92 (1)**: 21-29.

MOURA, C.L.; CASEMIRO, L.A.; MARTINS, C.H.G.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; CURY, A.H.V. 2011. Evaluation of the antimicrobial activity of the plant species *Pfaffia glomerata* against oral pathogens. **Investigação**, **11**: 24-28.

MURASHIGE, T. e SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, **15(3)**: 473-497.

MURRAY, B.G.; WONG C.; HAMMETT, K.R.W. 2011. The karyotype of *Clivia mirabilis* analyzed by differential banding and fluorescence in-situ hybridization. **Journal of Plant Research**, **293**: 193–196.

NATH, P.; OHRI, D.; PAL, M. 1992. Nuclear DNA content in *Celosia* (Amaranthaceae). **Plant Systematics and Evolution**, **182**: 253.

NICOLODI, J.C.; MORALES, C.; ROSÁRIO, F.C.; SICKA, G.E.; SOARES, L.; SILVA, A.A.J.; VIEIRA, R.A. 2002. Investigação preliminar da atividade adaptógena de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **XVII Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais. Cuiabá- MT**. FT 222.

NICOLOSO, F.T.R., FURTUNATO. P.; FURTUNATO, R.P. 1999. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, **29**: 277-283.

NICOLOSO, F.T.R., CASSOL, L.F.; FURTUNATO, P. 2001. Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). **Ciência Rural**, **31**: 57-60.

OCHATT, S. J. 2008. Flow cytometry in plant breeding. **Cytometry A** **73**: 581-598.

OHRI, D.; NAZEER, M.A.; PAL, M. 1981. Cytophotometric estimation of nuclear DNA in some ornamentals. **Nucleus**, **24**: 39-42.

OLIVEIRA, C.M.F. 1998. **Estudo sobre a reprodução da fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. Dissertação de mestrado. Agronomia - Produção Vegetal. Universidade Federal do Paraná, 87 p.

OMIDBAIGI, R.; MIRZAEI, M.; HASSANI, M.E.; MOGHADAM, M.S. 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. **International Journal of Plant Production**, **4**: 87-98.

OSBORN, T.C.; CHRIS PIRES, J.; BIRCHLER, J.A.; AUGER, D.L.; CHEN, Z.F.; LEE, H.; COMAI, L.; MADLUNG, A.; DOERGE, R.W.; COLOT, V.; MARTIENSSEN, R.A. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. **Trends in Genetics**, **19**: 141-147.

OTOFUJI, G.M. 2005. **Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 151 p.

PAL, M.; KHOSHOO, T.N. 1973. Evolution and improvement of cultivated amaranthus. VI. Cytogenetic relationships in grain types. **Theoretical and Applied Genetics**, **43**: 242-251.

PAL, M.; PANDEY, R.M.; KHOSHOO, T.N. 1982. Evolution and improvement of cultivated *Amaranthus*. IX. Cytogenetic relationship between the basic chromosome numbers. **Journal of Heredity**, **73**: 353-356.

PARIS, F.; NEVES, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I.; RATES, S.M.K. 2000. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (Amaranthaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, **73**: 261-269.

PEDERSEN, T.M. 1987. Amaranthaceae, Caryophyllaceae. In: A. Burkart (ed.). **Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)**, **6**: 160-203, 251-291.

PEDROSA, A.; VALLEJOS, C. E.; BACHMAIR, A.; SCHWEIZER, D. 2003. Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. **Theoretical and Applied Genetics**, **106**: 205–212.

PEREIRA, R.C.; DAVIDE, L.C.; TECHIO, V.H.; TIMBÓ, A.L.O. 2012. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, **42 (7)**: 1278-1285.

PEREIRA, R.C.; OLIVEIRA, M.T.R.; LEMOS, G.C.S. 2004. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **14**: 37-40.

PIERRE, P. M.O. 2004. **Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae)**. 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). **Annals of the Brazilian Academy of Science**, **83 (3)**: 1-13.

PINHEIRO, A.A.; POZZOBON, M.T.; CALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O.; CARNEIRO, V.T.C. 2000. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. **Plant Cell Reports**, **19 (3)**: 274-278.

PÔRTO, N.A; GUERRA, M.; FILHO, E.S.S. 1997. An hierarchy of activation of nucleolar organaizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Cytobios**, **92**: 43-51.

PUNT, W.; HOEN, H.P.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. 2007. Glossary of pollen and spores terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology**, **143**: 1-181.

QUEIRÓS, M. 1989. Estudos citotaxonómicos en *Amaranthus* de Portugal. **Lazaroa**, **11**: 9-17.

QUESENBERRY, K.; DAMPIER, J.; LEE Y.; SMITH, R.; ACUÑA, C. 2010. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. **Euphytica**, **17 (1)**: 43- 50.

RADAESKI, J.N.; EDVALT, A.C.P.; LIMA, G.L.; BAUERMANN, S.G. 2011. Grãos de pólen das formações campestres sul-brasileiras. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, 59-67.

RAINA, S. N.; MUKAI, Y.; KAWAGUCHI, K; GOEL, S.; JAIN, A. 2001. Physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S ribosomal RNA gene families en three important vetches (*Vicia* species) and their allied taxa constituting three species complexes. **Theoretical and Applied Genetics**, **103**: 839-845.

RANNEY, T. 2006. Polyploidy: From Evolution to New Plant Development. **Combined Proceedings International Plant Propagators' Society**, **56**: 137-140.

RAYNAL, I. A. e RAYNAL, J. 1971. Une technique de preparation des grains de pollen fragilis. **Adansonia**, **11**: 77-79.

RATES, S.M.K.; GOSMANN, G. 2002. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **12 (2)**: 85-93.

RAN, J.; MURRAY, B.G.; HAMMETT, K.R.W. 1999. Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and in situ hybridization. **Euphytica**, **106**: 139-147.

SUDA, J.; KRAHULCOVA, A.; TRAVNICEK, P.; KRAHULEC, F. 2006. Ploidy versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. **Taxon**, **55**: 447–450.

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

SYBENGA, J. 1992. Cytogenetics in plant breeding. **Springer-Verlag: Berlin Heidelberg**, 469.

SYKOROVÁ, E.; FAJKUS, J.; MEZNÍKOVÁ, M.; LIM, K. Y.; NEPLECHOVÁ, K.; BLATTNER, F. R.; CHASE, M. W.; LEITCH, A. R. 2006. Minisatellite telomeres occur in the family Alliaceae but are lost in *Allium*. **American Journal of Botany**, **93 (6)**: 814–823.

RIBEIRO, P.G.F.; PEREIRA, P.F. 1994. Influência do método de propagação e tipos de solo na produção de raízes de fáfia (*Pfaffia glomerata*). **XIII Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais**, 206.

RIO GRANDE DO SUL. Decreto nº 42.099 de 31 de dezembro de 2002. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. **Diário Oficial Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 42 (1).**

RITTER, M.R.; SOBIERAJSKI, G.R.; SCHENKEL, E.P.; MENTH, L.A. 2002. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia, 12:** 51-62.

ROCCHI, A. 1982. On the heterogeneity of heterochromatin. **Caryologia, 35:**169–189.

RUAS, C.; VANZELA, A.; SANTOS, M.; FREGONEZI, J.; RUAS, P.; MATZENBACHER, N.; AGUIAR-PEREIRA, M. 2005. Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. **Genetics and Molecular Biology, 28:** 129-139.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. 2003. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural, 33:** 57-63.

SALGADO-LABOURIAU, M.L. 1973. Contribuição à palinologia dos cerrados. **Academia Brasileira de Ciências, 285 p.**

SANCHES, N. R.; GALLETTO, R.; OLIVEIRA, C.E.; BAZOTTE, R. B.; CORTEZ, D.A.G. 2001. Avaliação do potencial anti-hiperglicemiante da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum, 23 (2):** 613-617.

SANTOS, V.N.C. 2006. **Banana-do-mato: investigação do perfil químico e bioatividade dos frutos maduros de *Bromelia antiacantha*.** 61p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biologia) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

SANTOS, F.A.R.; ROMÃO, C.O. 2008. Pollen morphology of some species of *Calliandra* Benth. (Leguminosae – Mimosoideae) from Bahia, Brazil. **Grana, 47:** 101-116.

SATO, S. 1981. Cytological studies on the satellited chromosomes of *Allium cepa*. **Caryologia, 34:** 431-440.

SCHWEIZER, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with Cromomicin and DAPI. **Chromosoma, 58:** 307-354.

SCHUBERT, I.; WOBUS, U. 1985. In hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. **Chromosoma, 92:** 143-148.

SEMA-PR (SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE-PARANÁ). 1995. **Lista Vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado do Paraná**. Curitiba-PR - SEMA-GTZ, 139 p.

SERRA, L.Z.; D.F.; FELIPE, CORTEZ, D.A.G. 2012. Quantification of β -ecdysone in different parts of *Pfaffia glomerata* by HPLC. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **22 (6)**: 1349-1354.

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

SHIOBARA, Y; INOUE, S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; OISHI, Y.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. 1993. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, **32 (6)**: 1527- 1530.

SILJAK-YAKOVLEV, S.; PECCENINI, S.; MURATOVIC, E.; ZOLDOS, V.; ROBIN, O.; VALLÈS, J. 2003. Chromosomal differentiation and genome size in three European mountain *Lilium* species. **Plant Systematic and Evolution**, **236**: 165-173.

SILVA JÚNIOR, A.; OSAIDA, C.C. 2005. Ginseng-brasileiro – novo estímulo para o campo e para o corpo. **Agropecuária Catarinense**, **18 (2)**: 41-44.

SILVA, S. de O.; SOUZA JÚNIOR, M.T.; ALVES, E.J.; SILVEIRA, J.R.S.; LIMA, M.B. 2001. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, **1**: 399-436.

SILVA, T.C. 2008. **Efeitos anti-neoplásicos da raiz de *Pfaffia paniculata* (Ginseng brasileiro) no modelo de hepatocarcinogênese murina e em cultura de células de hepatocarcinoma humano**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia.

SIMPSON, D. A.; FURNESS, C. A.; HODKINSON, T. R.; MUASYA, A. M.; CHASE, M. W. 2003. Phylogenetic relationships in Cyperaceae subfamily Mapanioideae inferred from pollen and plastid DNA sequence data. **American Journal of Botany**, **90 (7)**: 1071-1086.

SIQUEIRA, J. C. 1987. Importância alimentícia e medicinal das Amarantáceas do Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**, **9 (1)**: 99-110.

SIQUEIRA, J. C. 1988. Considerações taxonômicas sobre as espécies brasileiras do gênero *Pfaffia*. **Acta Biológica Leopoldensia**, **10 (2)**: 269-278.

SIQUEIRA, J.C. 2002. Amaranthaceae *In*: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G. e Giulietti, A. M. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo: FAPESP-HUCITEC**, 11-30 p.

SIQUEIRA, J.C. 2004. Amaranthaceae: padrões de distribuição geográfica e aspectos comparativos dos gêneros Africanos e Sulamericanos. **Pesquisas Botânica**, **55**: 177-185.

SIQUEIRA, J.C.; GRANDI, T.S.M. 1986. O gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) nos cerrados e campos rupestres de Minas Gerais. **Acta Biológica Leopoldensia**, **8 (2)**: 213-230.

SIROKÝ, J.; LYSÁK, M.A.; DOLEZEL, J.; KEJNOVSKÝ, E.; VYSKOT, B. 2001. Heterogeneity of rDNA distribution and genome size *Silene* spp. **Chromosome Research**, **9**: 387-393.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; MALDANE, R.J. 2006. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, **36**: 1416-1423.

SOUZA-KANESHIMA, A.M.; SIMIONI, C.; FELISMINO, M.F.; MENDES-BONATO, A.B.; RISSO-PASCOTTO, C.; PESSIM, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. 2010. Meiotic behaviour in the first interspecific hybrids between *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria decumbens*. **Plant Breeding**, **129 (2)**:186-191.

SOUZA, M.A.; MENDONÇA, C.B.F.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V. 2010. Palinologia de espécies de Nyctaginaceae Juss. Ocorrentes nas restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, **24(1)**: 104-110.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2005. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 291p.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2008. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Instituto Plantarum, Nova Odessa**, 704 p.

SRIVASTAVA, V., PAL, M.; NAIR, P. K. K. 1977. A study of the pollen grains of *Amaranthus spinosus* L. and *A. dubius* Mart. ex Thell and their hybrids. **Review of Paleobotany and Palynology**, **23 (4)**: 287-291.

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

SUDA, J.; KRAHULCOVA, A.; TRAVNICEK, P.; KRAHULEC, F. 2006. Ploidy versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. **Taxon**, **55**: 447-450.

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

SWENNE, AI. 1981. Induction par la colchicine de formes autotétraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). **Agronomie Tropicale**, **36 (2)**: 134-141.

SYBENGA, J. 1992. Cytogenetics in plant breeding. **Springer-Verlag: Berlin Heidelberg**, 469.

SYKOROVÁ, E.; FAJKUS, J.; MEZNÍKOVÁ, M.; LIM, K. Y.; NEPLECHOVÁ, K.; BLATTNER, F. R.; CHASE, M. W.; LEITCH, A. R. 2006. Minisatellite telomeres occur in the family Alliaceae but are lost in *Allium*. **American Journal of Botany**, **93 (6)**: 814–823.

TAKEDA, I.J.M.; FARAGO, P.V.; SOUZA, M.K. DE; GELINSKI, V.V. 2000. Catálogo Polínico do Parque Estadual de Vila Valha, paraná – 1 Parte. **Biological and Health Sciences**, **6 (1)**: 61-71.

TAKETA, S.; ANDO, H.; TAKEDA, K.; ICHII, M.; BOTHMER, R.V. 2005. Ancestry of American polyploidy *Hordeum* species with the I genome inferred from 5S and 18S-25S rDNA. **Annals of Botany**, **96**: 23-33.

TANG, Z.Q.; CHEN, D.L.; SONG, H.J.; HE, Y.C.; CAI, D.T. 2010. *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **102**: 213-220.

TASCETTO, O.M.; PAGLIARINI, M.S. 2001. Caracterização citogenética de populações de *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae). **III Simpósio de Recursos Genéticos para a America Latina e Caribe**, 442-443 p.

TASCETTO, O.M.; PAGLIARINI, M.S. 2003. Chromosome numbers in Brazilian and Argentine populations of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae). **Cytologia**, **68 (2)**: 147-152.

THANIKAIMONI, G. 1970. Les Palmiers: palynologie et systématique. **Tome XI. Institut Français de Pondichéry, Índia**, 164p.

TICKTIN, T. 2004. The ecological implications of harvesting nontimber forest products. **Journal of Applied Ecology**, **41**: 11-21.

TOWNSEND, C. C. 1974. Notes on Amaranthaceae: 2. **Kew Bulletin**, **29 (3)**: 461-475.

VAINOLA A. 2000. Polyploidization an dearly screening of Rhododendron hybrids. **Euphytica**, **112**: 239-44.

VAN DUREN, M.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J.; AFZA, R. 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. **Euphytica**, **88**: 25-34.

VASCONCELLOS, J.M.O. 1982. **Estudo taxonômico sobre Amaranthaceae no Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 277 p.

VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S.M.K.; MENTZ, L.A. 2005. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **15**: 361-372.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. 2003. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **13 (2)**: 46-49.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MARQUES, L.C. 2004. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *Hebanthe paniculata* Martius – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **6 (2)**: 7-19.

VISHNU-MITRE e SHARMA, B.D. 1962. Studies of Indian pollen grains. 1 - Leguminosae. **Pollen et spores**, **4(1)**: 6-45.

ZANELA, L. 2009. **Caracterização cariotípica de quatro espécies brasileiras de *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) com as técnicas de FISH, CMA, DAPI e AgNOR**. Dissertação de mestrado. Instituto Agrônomo de Pós-graduação. Campinas, SP. 15/96 p.

ZANOTTO, M.; BRAMMER, S.P.; JUNIOR, A.N.; SCAGLIUSI, S.M. 2009. Viabilidade polínica como seleção assistida no programa de melhoramento genético de Triticale. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, **33**: 2078-2082.

ZHANG, J.; ZHANG, M.; DENG, X. 2007. Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **89**: 211–216.

ZHANG, Z.; DAI, H.; XIAO, M.; LIU, X. 2008. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. **Euphytica**, **159**: 59–65.

ZIMMER, A.R.; BRUXEL, F.; BASSANI, V.L.; GOSMANN, G. 2006. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **40**: 450-453.

WATANABE K, YAHARA T, DENDA T AND 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 Plankton Research**, **112**: 145-161.

WOLFE, A. D. 2005. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods in Enzymology**, **395**: 134-144.