

ESTUDO MEIÓTICO E VIABILIDADE DO PÓLEN DE TRÊS ESPÉCIES DE *Lippia* (VERBENACEAE) DA CADEIA DO ESPINHAÇO-MG

Milene Miranda Praça-Fontes¹, Lyderson Facio Viccini²

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Produção Vegetal, Alto Universitário S/N – CX Postal 16, CEP:29.500.000 – Alegre – ES, Brasil, milenemiranda@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Juiz de Fora/Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia. Campus Martelos, CEP: 36036-900 - Juiz de Fora- MG, Brasil, lyderson.viccini@ufjf.edu.br

Resumo- O gênero *Lippia* reúne várias espécies de plantas com propriedades medicinais comprovadas. Em virtude da sua importância, três espécies- *Lippia lupulina*, *L. pseudothea* e *L. rotundifolia*- foram caracterizadas quanto ao comportamento meiótico e a viabilidade dos grãos de pólen. Botões florais foram coletados no banco de germoplasma *in vivo* da Universidade Federal de Juiz de Fora, fixados e acondicionados em baixas temperaturas. Lâminas foram preparadas pela técnica de secagem ao ar. Para a análise da viabilidade do pólen foram utilizados os corantes Carmim Acético e Alexander. Células anormais foram observadas nas três espécies estudadas. Dentre as anormalidades destacaram-se paquíteno e diacinese com ausência de pareamento, telófase I não reduzida, mônades, díades e tríades. O índice de viabilidade polínica foi considerado médio para *L. rotundifolia* e alto para *L. lupulina* e *L. pseudothea*.

Palavras-chave: citogenética, *Lippia*, meiose, viabilidade do pólen

Área do Conhecimento: Genética

Introdução

A família Verbenaceae compreende cerca de 1.035 espécies e 36 gêneros com distribuição pantropical (Judd et al. 2007). Vários problemas taxonômicos sobre seções e gêneros têm sido relatados, resultando em erros na classificação e número estimado de espécies (Salimena 2002).

O gênero *Lippia* compreende cerca de 200 espécies (Sanders 2001), de ervas, arbustos e pequenas árvores distribuídas pela América Central, África tropical e por toda América do Sul. A maioria das espécies ocorre no Brasil, Paraguai e Argentina, e algumas delas são restritas a África. Há dois centros de diversidade no Brasil: Cadeia do Espinhaço, no Estado de Minas Gerais e Chapada Diamantina, no estado de Bahia.

A ocorrência restrita de muitas espécies de *Lippia*, a degradação de habitat e o uso contínuo na medicina popular tradicional têm contribuído para a situação de risco que se encontram muitas espécies (Pascual et al. 2001).

Caracteres citológicos e citogenéticos tais como número e morfologia de cromossomos, comportamento meiótico, bem como os valores C de DNA nuclear, têm sido utilizados para inferir as relações entre diferentes táxons (Kron et al. 2007; Guerra 2008). O número de cromossomos tem sido considerado importante para investigar as relações entre as espécies (Guerra 2008). No gênero *Lippia*, o número de cromossomos tem sido descrito em vários trabalhos (Bose e Choudhury, 1960; Smith 1966; Kumar e Dutt,

1989; Pastoriza e Andrada 2006; Brandão et al. 2005; Viccini et al. 2006), e varia de n = 10 a 30.

Estudos meióticos tem sido realizados em espécies de *Lippia* (Viccini et al. 2006), no entanto há poucos relato do comportamento meiótico e da viabilidade polínica.

O objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo do comportamento meiótico e da viabilidade dos grãos de pólen de três espécies de *Lippia*: *L. rotundifolia*, *L. lupulina* e *L. pseudothea*.

Metodologia

Botões florais de *L. rotundifolia*, *L. lupulina* e *L. pseudothea*, em períodos anteriores à antese, foram previamente selecionados para a obtenção de PMCs (células mãe do grão de pólen) em diferentes estágios. Esses botões foram fixados em solução de Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético) e estocado à -20°C. As lâminas com material meiótico foram preparadas de acordo com Viccini et al. (2006). As anteras foram digeridas com solução enzimática e posteriormente fragmentadas em lâmina.

Aproximadamente 5.000 meiócitos de cada espécie, corados com Giensa 8%, foram analisados para descrever o comportamento meiótico.

Para a viabilidade polínica botões florais de *L. rotundifolia*, *L. lupulina* e *L. pseudothea*, em período de antese, foram coletados, fixados em metanol: ácido acético (3:1) e acondicionados à -20°C. Para preparo das lâminas, retirou-se as anteras das inflorescências. Essas anteras foram

colocadas em HCL 1N por cerca de 10 minutos, e logo em seguida, os grãos de pólen foram removidos para posterior coloração.

Os grãos de pólen foram corados com as soluções de Carmim acético 2% e Alexander. O Carmim acético indica a integridade cromossômica e a solução de Alexander revela a integridade de estruturas celulares, como núcleo e membranas plasmáticas. Os grãos de pólen foram corados por cinco minutos, e recobertos por lamínula para posterior análise.

A fim de se obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados, foi utilizado o método de varredura até se alcançar o número total de 5000 grãos de pólen para cada espécie. Três lâminas de cada espécie foram analisadas.

Os grãos de pólen corados com Carmim Acético foram analisados e classificados em normais/ viáveis, com citoplasma corado e anormais/ inviáveis, aqueles com pouco ou nenhum citoplasma evidenciado. Logo, os grãos de pólen corados com Alexander foram analisados e classificados em normais/ viáveis, corados de rosa com contornos verdes e anormais/ inviáveis, aqueles com coloração acinzentada.

As lâminas com material meiótico e grãos de pólen foram observadas em fotomicroscópio, equipado com acessórios de análise de imagem, iluminação de campo claro e de fluorescência; com objetiva de imersão de 100X. As imagens foram capturadas diretamente por uma vídeo-câmera acoplada ao microscópio e a um computador equipado com placa digitalizadora. As análises dos cromossomos e as medidas dos grãos de pólen foram realizadas usando o Programa Image SXM de domínio público, o qual pode ser obtido via internet (<http://reg.ssci.liv.ac.uk>).

Resultados

A metodologia empregada permitiu observar, nas lâminas de todas as espécies analisadas, abundância de material, bem como cromossomos com boa morfologia. Foram encontrados meiócitos em diversos estágios de divisão como: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno, diacinese, telófase I, anáfase I e tétrade. Foi possível verificar, principalmente no paquíteno, grande quantidade de heterocromatina (Figura 1).

A análise das lâminas das três espécies permitiu a observação de meiócitos normais e anormais. Para *L. lupulina* um total de 4293 células foram contabilizadas, sendo que destas apenas 2,13% foram consideradas anormais. Para *L. pseudothea*, um total de 4922 células foram analisadas sendo 3,6% anormais. Em *L. rotundifolia* um total de 5807 células foram

contabilizadas. Destas 3,19% estavam anormais. Dentre as anormalidades encontradas destacam-se paquíteno e diacinese com ausência de pareamento, metáfase I com aderências cromossômicas (stickyness). Também foram encontradas mônades, díades e tríades, telófases I com cromossomos tardios e formação de micronúcleo (Figura 2).

O estudo da viabilidade do pólen revelou que a espécie que apresentou maior índice de infertilidade foi *L. rotundifolia*, 62,79% para o corante carmim acético e 64,98% para Alexander. *L. lupulina* e *L. pseudothea* tiveram os índices de infertilidade menores, 10,95% e 20,64% para carmim acético e 20,45% e 15,02% para Alexander, respectivamente. Na figura 3 pode ser observado o teste de coloração com carmim acético realizado em *L. lupulina*.

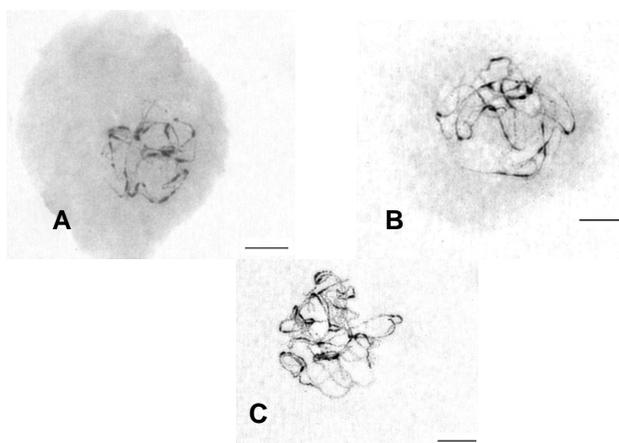


Figura 1- Paquítenos com regiões de heterocromatina evidente em *L. lupulina* (A), *L. pseudothea* (B) e *L. rotundifolia* (C). Barra= 10µm

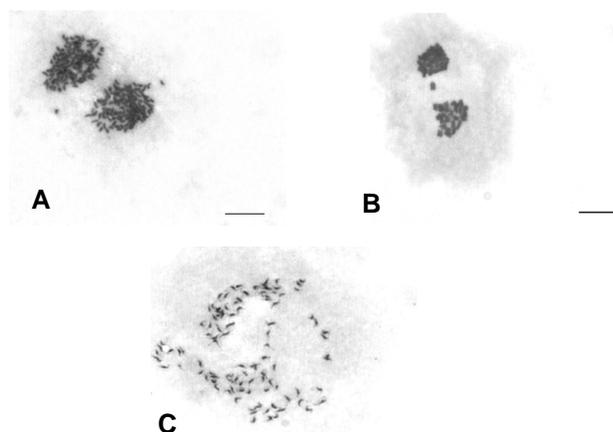


Figura 2 – Três tipos de anormalidades encontradas nos meiócitos das espécies de *Lippia* estudadas. (A e B) Telófase I com cromossomos tardios e (C) Diacinese com ausência de pareamento. Barra= 10µm

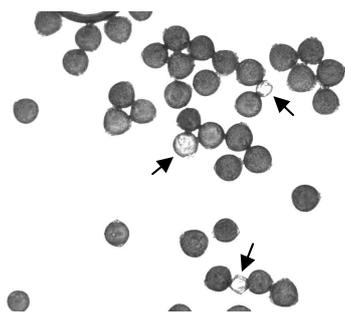


Figura 3 – Grãos de pólen de *L. lupulina* corados com o corante Carmim Acético. As setas indicam os grãos de pólen inviáveis.

Discussão

A meiose compreende eventos fisiológicos, bioquímicos, citogenéticos e fenotípicos altamente coordenados, que levam à recombinação gênica, redução cromossômica e formação de gametas (Kaul e Murthy, 1985). As anormalidades meióticas encontradas no presente estudo podem ser decorrentes de mutações em genes envolvidos com a sinapse dos homólogos, ou funcionamento defeutivo de proteínas envolvidas com a organização do cromossomo, tais como as histonas (Bione et al, 2000). Essas anormalidades podem levar à formação de grãos de pólen inviáveis (aneuplóides) e até mesmo euplóides. A frequência de células anormais foi baixa nas três espécies estudadas. Vários agentes podem levar à formação de irregularidades, tais como fatores ambientais incluindo herbicidas, substâncias químicas presentes no solo, variações na temperatura ou até mesmo condições patológicas (Bione et al, 2000).

Uma interessante característica a respeito da propagação das espécies de *Lippia* é que não se observa em campo a formação de sementes, o podendo-se acreditar que estas venham se propagar vegetativamente. Além disso, essas plantas apresentam uma estrutura vegetativa subterrânea denominada xilopódio, que pode, por sua vez, reforçar a hipótese de ocorrência de propagação vegetativa.

Apesar da taxa de anormalidades meióticas encontrada terem sido baixas, a inviabilidade polínica foi relativamente maior que os valores observados para essas anormalidades. Isto mostra que a infertilidade destas plantas, pode não ser consequência direta do processo meiótico. A causa da não produção de sementes por elas pode estar relacionado a uma deficiência nos mecanismos pós zigótico (esta ausência de sementes pôde ser observada no Banco de Germoplasma *in vivo* da UFJF, onde fazia-se o monitoramento das plantas).

De acordo com Vargas et al. (2009), valores de 70% representam alta viabilidade polínica, de 31 a 69% é considerado média e até 30% baixos índices de viabilidade. Sendo assim, o índice de viabilidade polínica foi considerado médio para *L. rotundifolia* e alto para *L. lupulina* e *L. pseudothea*.

Os resultados da viabilidade polínica foram semelhantes para os dois corantes utilizados, sendo assim, ambos eficientes para este tipo de análise em espécie do gênero *Lippia*.

Conclusão

O estudo meiótico realizado nas três espécies do gênero *Lippia* pode ser útil para resolver os problemas taxonômicos do grupo. Além disso, com o presente estudo foi possível avaliar os índice de anormalidades encontradas durante a meiose, bem como a relação dessas anormalidades na formação dos grãos de pólen.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a FAPES – Fundação de Apoio a Pesquisa no Espírito Santo, pelo suporte financeiro.

Referências

- BIONE, N.C.P., PAGLIARINI, M.S. & TOLEDO, J.F.F. Meiotic behavior of several Brazilian soybean varieties. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 623-631, 2000.
- BOSE, R.B.; CHOUDHURY, J.K. Cytological studies in *L. alba* (Mill) NE Br. Bull Bot Soc Bengal 14:71–72, 1960.
- BRANDÃO, A.D.; VICCINI, L.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Meiotic analysis of two putative polyploidy species of Verbenaceae from Brazil. *Caryologia* 4:315–319, 2005.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. (2007) *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer, Sunderland
- GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Genome Res* 120:339–350, 2008.
- KAUL, M. L. H.; MURTHY, T. G. K. Mutant genes affecting higher plant meiosis. *Theor. Appl. Genet.* 70: 449-466, 1985.

KRON, P.; SUDA, J.; HUSBAND, B.C. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Ann Rev Ecol Evol Syst* 38:847–876, 2007.

KUMAR, P.; DUTT, B. Cytogenetic basis of breeding system in some verbenaceous species. *Cytologia* 54:347–353, 1989.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SANCHES, M.D.; VILLAR, A. *Lippia*: tradicional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol* 76:201–214, 2001.

PASTORIZA, A.V.; ANDRADA, A.B. Cytogenetics in *Lippia* species (Verbenaceae) from northwest Argentina. *J Bas Appl Genet* 17:25–32, 2006.

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

SANDERS, R.W. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. *Harv Pap Bot* 5:303–358, 2001.

SMITH, E.B. Cytogenetic and phylogeny of *Haplopappus* section *Isopappus* (Compositae). *Can J Genet Cytol* 8:14–36, 1966.

VARGAS, D.P.; SOUZA, S.A.M.; SILVA, S.D.A.; BOBROWSKI, V.L. Análise dos grãos de pólen de diferentes cultivares de mamona (*Ricinus communis* L., Euphorbiaceae): conservação e viabilidade. *Arq. Inst. biol., São Paulo*, 76:115-120, 2009.

VICINI, L.F.; PIERRE, P.M.O.; PRAÇA, M.M.; COSTA, D.C.S.; SOUSA, S.M.; PEIXOTO, P.H.P.; SALIMENA, F.R.G. Chromosome numbers in the genus *Lippia*. *Plant Syst Evol* 256:171–178, 2006.