



THAÍS FURTADO NANI

**ASPECTOS MORFOPOLÍNICOS E
CROMOSSÔMICOS EM ESPÉCIES DE
PLECTRANTHUS L' HERITIER**

LAVRAS – MG

2011

THAÍS FURTADO NANI

**ASPECTOS MORFOPOLÍNICOS E CROMOSSÔMICOS EM ESPÉCIES
DE *PLECTRANTHUS L' HERITIER***

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

Orientadora

Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS – MG

2011

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

Nani, Thaís Furtado.

Aspectos morfológicos e cromossômicos em espécies de
Plectranthus L' Heritier / Thaís Furtado Nani. – Lavras: UFLA,
2011.

88 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. Citotaxonomia. 2. Boldo. 3. Cariótipo. 4. Conteúdo de DNA.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.870446

THAÍS FURTADO NANI

**ASPECTOS MORFOPOLÍNICOS E CROMOSSÔMICOS EM
ESPÉCIES DE *PLECTRANTHUS* L' HERITIER**

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

APROVADA em 27 de julho de 2011.

Dra. Giovana Augusta Torres

UFLA

Dr. Sandro Barbosa

UNIFAL

Dra. Lisete Chamma Davide

Orientadora

LAVRAS – MG

2011

A quem pensei em todos os dias nos quais achei que não teria mais forças para seguir: Ao meu pai, que intercede pela família, à minha mãe e irmã, que nunca deixaram de acreditar em mim!

DEDICO

A Amanda, Flávia, Jeanne, Ludmila, Luíge, Mariana, Marinês: aqueles que defenderam comigo!

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por orientar o destino da minha vida.

À professora Lisete, pela confiança depositada em mim, pela formação intelectual que me ofereceu, pelo exemplo profissional e de pessoa que, em conjunto, nos mostra a arte de pesquisar.

Ao professor Sandro, pelo incentivo para a pós-graduação, pelas contribuições ao desenvolvimento deste trabalho e pela participação em minha vida profissional.

À professora Vânia, pela prontidão em amparar a execução deste trabalho.

Ao professor Eduardo Alves, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFLA, pelo auxílio nas análises.

Ao professor Moacir Pasqual, do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, por permitir a utilização do citômetro de fluxo e a realização de parte deste trabalho.

À minha mãe, pelo exemplo de superação, pelo seu duplo apoio em sua figura e na figura de meu pai. Obrigada por me acompanhar e apoiar todos os momentos de decisão.

À minha irmã, pela paciência, por ser o suporte em casa fazendo a sua parte e o que caberia a mim fazer, mas que não pude por estar longe.

Aos meus avós, pelo carinho e pela torcida a distância.

À minha madrinha Silvana, por ajudar a cuidar do meu equilíbrio e por sempre estar presente nos momentos mais importantes de minha vida.

Ao Luige, por me incluir em seus planos, entender os motivos da minha ausência e tornar fácil superar a distância.

À Flávia, pela amizade sincera e transparente. Obrigada por me deixar contar sempre com você e por viver esse momento intensamente comigo!

À Marinês, pela dedicação a nossa amizade e pelo carinho confortante nos dias em que estive triste.

À Luciene, pelas orações.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética da UFLA, pelos momentos de aprendizado, alegria e amizade. Em especial, à Amanda Teixeira, pela fidelidade e disposição no trabalho e por me reanimar a cada desilusão. A Fernanda Bustamante, Kátia e Rose, pela disponibilidade para auxiliar na execução das técnicas laboratoriais. Ao João Vítor, pelas análises citogenéticas que iniciamos juntos e por sempre se preocupar comigo. Obrigada a todos vocês, pela amizade que foi construída.

À Jeanne e Ludmila, pessoas raras que fazem a diferença em minha vida, sou grata pela amizade incondicional que se iniciou desde minha chegada, mas que aparenta ter um começo muito anterior.

À Mariana, por compartilhar as alegrias e as dificuldades de cada etapa!

Ao Matheus, pelo suporte estatístico e amizade.

Aos Suricatos, pela simbiose a distância!

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, pela dedicação em suas respectivas funções que, de certa forma, refletem no bem-estar de cada aluno do nosso meio de convívio.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

“Milho de pipoca que não passa pelo fogo continua a ser milho para sempre. Assim acontece com a gente. As grandes transformações acontecem quando passamos pelo fogo. Quem não passa pelo fogo, fica do mesmo jeito a vida inteira.”

(Rubem Alves)

RESUMO

Plectranthus é um dos gêneros pertencentes à família Lamiaceae e, em geral, caracteriza-se pela riqueza de espécies de interesse medicinal e ornamental. Este gênero apresenta problemas taxonômicos pelo fato de agregar as espécies que, no passado, compunham o gênero *Coleus*, o que contribuiu para que uma mesma espécie apresentasse diferentes sinonímias. Além disso, alguns autores consideram *P. grandis* e *P. barbatus* como sinonímias. Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar espécies, tais como *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus grandis* e *Plectranthus neochilus*, do ponto de vista citogenético e palinológico, com a finalidade de dar suporte às soluções de problemas taxonômicos do gênero, bem como às hipóteses evolutivas. As espécies avaliadas possuem grãos de pólen bastante semelhantes. *P. barbatus* e *P. neochilus* apresentaram exina reticulada com poucas diferenças de ornamentação. *P. amboinicus* possui ornamentação menos complexa em relação às demais. Pelas análises citogenéticas, foram observados $2n=30$ cromossomos para as espécies de *Plectranthus* estudadas, exceto para *P. amboinicus* ($2n=34$). Foram constatadas variações na morfologia dos cromossomos e no conteúdo de DNA nuclear entre genótipos apenas para *P. barbatus*, cujas médias para essa variável não diferiram das de *P. grandis*. Os resultados provenientes das análises de citometria associados às diferenças cariotípicas permitem inferir que as populações de *P. barbatus* se encontram em processo ativo de variação cariotípica, expressando a ocorrência de citotipos e que *P. grandis*, provavelmente, é um deles.

Palavras-chave: Citotaxonomia. Boldo. Cariótipo. Conteúdo de DNA.

ABSTRACT

Plectranthus is a genus what is included in the Lamiaceae family and generally is characterized by the richness of ornamental and medicinal species. In this genus, there are taxonomic problems because of *Plectranthus* aggregate, in the past, species from *Coleus*. This fact contributed to a synonyms variety for the same species. Some authors consider *P. grandis* and *P. barbatus* like synonyms. Therefore, the objective of this study was to compare species such as *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus grandis* and *Plectranthus neochilus* at cytogenetic and palynology point of view, in order to support the taxonomy problem solving, as well as the evolutionary hypotheses. The results showed that these species have similar pollen grains. *P. neochilus* and *P. barbatus* have a few exine ornamentation differences and *P. amboinicus* has exine less complex. Through cytogenetic analysis was possible to identify $2n = 30$ for studied species, except for *P. amboinicus* ($2n = 34$). Chromosomes morphology variations and DNA content differences were fouded only among genotypes from *P. barbatus*. The nuclear DNA content mean did not differ from *P. grandis*. The cytometry results associated with karyotypic differences can be inferred that *P. barbatus* population are in the karyotype variation active process expressing the occurrence of cytotypes and *P. grandis* is probably one of them.

Keywords: Cytotaxonomy. Boldo. Karyotype. DNA Content.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Aspectos taxonômicos e botânicos em <i>Plectranthus</i>	14
2.2	Palinologia	17
2.3	Citogenética do gênero <i>Plectranthus</i>	22
2.4	Citometria de fluxo	25
	REFERÊNCIAS	28
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	35
	ARTIGO 1 Aspectos morfológicos em espécies de <i>Plectranthus</i> L'Héritier (Lamiaceae)	35
	ARTIGO 2 Cariótipo e quantidade de DNA nuclear em espécies de <i>Plectranthus</i> L' Héritier (Lamiaceae)	56

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

A família Lamiaceae Martinov abrange cerca de 250 gêneros e 7.000 espécies (THORNE, 1992) encontrados no mundo inteiro. Entretanto, a área de maior concentração está na região que vai do Mediterrâneo e Oriente Médio até a Ásia central (CHENGYIH; HSIWEN, 1982). No Brasil, 500 espécies de 34 gêneros distintos ocupam quase toda área territorial (HARLEY et al., 2010).

Plectranthus L'Héritier é um dos gêneros mais conhecidos dessa família, abrangendo cerca de 300 espécies (RICHARDSON, 1992) e, em geral, caracteriza-se pela riqueza de espécies de interesse medicinal e ornamental (THOPPIL, 1993). Espécies do gênero *Plectranthus* têm sido utilizadas na medicina fitoterápica por produzirem vários metabólitos secundários, dentre os quais se destacam alguns diterpenos, como o forskolin (SHAH et al., 1980). Forskolin é isolado de *Coleus forskohlii* (sinonímia de *Plectranthus barbatus*) que apresenta função carminativa e reduz a pressão arterial, e também tem aplicação no tratamento de doenças respiratórias e do sistema circulatório (KAVITHA; RAJAMANI; VADIVEL, 2010).

Nos últimos anos, o interesse por terapias alternativas tem sido crescente, especialmente aquelas oriundas de plantas medicinais (GOLDFRANK et al., 1982; VULTO; SMET, 1988; MENTZ; SCHENKEL, 1989). No entanto, o uso de plantas como fonte de drogas ainda é pouco explorado e, na maioria das vezes, apenas triagens farmacológicas são realizadas (PAYNE et al., 1991).

A falta de estudos que melhor caracterizem espécies de plantas medicinais facilita o risco de uso equivocado de espécies que são muito similares às espécies alvo. Algumas espécies de plantas apresentam diferenças citogenéticas entre genótipos que podem refletir no seu comportamento, como

variação na quantidade, qualidade e ou tipo de metabólito secundário produzido. Para *Lippia alba* já foram descritos indivíduos de números cromossômicos diferentes, porém, morfológicamente semelhantes e considerados quimiotipos por apresentarem produtos metabólicos de quantidade ou caráter distintos (PIERRE et al., 2011).

Em *Thymus* podem ser encontrados genótipos de espécies com diferentes teores de DNA nuclear e números cromossômicos e essas variações também podem refletir na quantidade de óleo essencial produzida pelas plantas (MAHDAVI; KARIMZADEH, 2010).

Plectranthus é um dos gêneros de Lamiaceae em que há necessidade de estudos para melhor identificar suas espécies, pois existem relatos de variação quanto ao número cromossômico que sugerem a ocorrência de citotipos (THOPPIL, 1993). *P. barbatus* é uma das espécies do gênero para a qual são descritos diferentes números cromossômicos de $2n=28$ a 34 (REDDY, 1951; RILEY; HOFF, 1961; SAGGOO; BIR, 1983).

Esse gênero também enfrenta problemas taxonômicos pelo fato de suas espécies, juntamente com as de *Coleus*, já terem sido pertencentes ao gênero *Ocimum* Linn. Contudo, as características que subdividiam esse gênero foram consideradas insuficientes para separar *Coleus* de *Plectranthus* e, por esse motivo, esses dois gêneros passaram a compor um só grupo com o nome de *Plectranthus* (MORTON, 1962), fato que contribuiu para a existência de diversas sinónimas (LUKHOBBA; SIMMONSD; PATON, 2006).

Estudos botânicos têm se mostrado eficientes na reformulação de hipóteses taxonômicas. Em Lamiaceae, a palinologia teve sua importância na subdivisão dessa família em duas subfamílias, Lamioideae e Nepetoideae, com base no número de aberturas do grão de pólen e número de núcleos (WUNDERLICH, 1967).

As análises cariotípicas, de conteúdo de DNA nuclear, bem como a palinologia, podem trazer informações valiosas para comparar espécies ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie e têm subsidiado reformulações taxonômicas em grupos que apresentam problemas de classificação (WUNDERLICH, 1967; GUERRA et al., 1997).

Diante dos fatos apresentados, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar e comparar as espécies de *Plectranthus* supracitadas quanto à morfologia cromossômica, ao conteúdo de DNA nuclear e à palinologia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos taxonômicos e botânicos em *Plectranthus*

Na família Lamiaceae Martinov podem ser encontradas espécies que têm ocupação no mundo inteiro abrangendo cerca de 250 gêneros e 7.000 espécies (THORNE, 1992). Entretanto, a área de maior concentração está na região que vai do Mediterrâneo e Oriente Médio até a Ásia central (CHENGYIH; HSIWEN, 1982). No Brasil, 500 espécies de 34 gêneros estão distribuídas em quase toda área territorial (HARLEY et al., 2010).

Plectranthus L'Héritier é um dos gêneros mais comuns dessa família, abrange cerca de 300 espécies (RICHARDSON, 1992) e, em geral, caracteriza-se pela riqueza de espécies de interesse medicinal e ornamental (THOPPIL, 1993).

Esse gênero pertence à divisão Magnoliophyta, classe Equisetopsida C. Agardh, subclasse Magnoliidae Novák ex Takht., superordem Asteranae Takht., ordem Lamiales Bromhead, família Lamiaceae Martinov, subfamília Nepetoideae e tribo Ocimeae (CANTINO, 1992).

Exemplares de *Plectranthus* e *Coleus* Loureiro, bem como outras espécies, faziam parte de um só agrupamento, o gênero *Ocimum* Linn. A justificativa para sua subdivisão baseou-se apenas em diferenças morfológicas: *Coleus* apresenta estames fundidos, enquanto em *Plectranthus* os estames são completamente livres. A diversidade observada nas espécies que compunham *Ocimum* permitiu sua subdivisão não apenas nesses dois grupos, mas ainda em vários outros, como *Burnatastrum*, *Englerastrum*, *Neomullera* e *Isodictyophorus*, além de outros aliados (MORTON, 1962).

A diversidade de novas classificações dificultou o estabelecimento de limites genéricos para as espécies intimamente relacionadas. Hutchinson (1988)

não consideravam as diferenças do estame suficientes para separar *Coleus* e *Plectranthus* e, por esse motivo, esses gêneros anteriormente distintos passaram a agregar suas respectivas espécies em um só grupo, ou seja, o gênero *Coleus* passou a ser incorporado ao *Plectranthus*, o qual também agrupou todas aquelas espécies remanescentes que não se enquadravam em nenhum dos gêneros aliados, formando, assim, um gênero independente de *Ocimum* (MORTON, 1962).

Alguns taxonomistas consideram essas reclassificações ainda insatisfatórias para algumas espécies pertencentes a *Plectranthus*. Muitas delas foram estudadas do ponto de vista quimiosistemático, o que permitiu observar que estas espécies poderiam ser nitidamente separadas em dois clados contrastantes, coincidindo com a separação das espécies pertencentes ao gênero *Plectranthus* e as anteriormente pertencentes ao gênero *Coleus*. Oitenta e dois por cento das espécies do clado *Plectranthus* examinadas produzem maior número e quantidade de compostos químicos quando comparadas com as espécies do clado *Coleus*, dando suporte a uma possível redivisão do grupo (GRAYER et al., 2010).

Como consequência das divergências taxonômicas, algumas nomenclaturas passaram a ser consideradas sinônimas. Cerca de 30% das citações na literatura usam sinônimas para descrever espécies de *Plectranthus*, sendo que as espécies de uso em maior escala possuem maior número de sinônimas. A variedade de referências taxonômicas no gênero se deve ao âmbito regional e não global das pesquisas realizadas, o que contribui para a confusão de múltiplas classificações para descrever a mesma espécie (LUKHOBBA; SIMMONSD; PATON, 2006).

Alguns exemplos clássicos merecem atenção a respeito, como *Plectranthusamboinicus* (Lour.) Spreng. tem como sinônimas *Plectranthusaromaticus* (Lour.) Spreng., *Coleusamboinicus* Lour., *Coleusaromaticus*

Benth., *Coleus crassifolius* Benth, *Plectrathus aromaticus* (Benth) Roxb., *Coleus suganda* Blanco, *Coleus carnosus* Hassk e *Majana amboinica* (Lous.) (LUKHOBÁ; SIMMONSD; PATON, 2006).

Plectranthus barbatus Andr. tem sido referido como *Plectranthus forskohlii* Briq, *Plectranthus forskalaei* Willd., *Plectranthus kilimandschari* (Gurke) HL Maass., *Plectranthus grandis* (Cramer) RH Willemse, *Coleus forskohlii* Briq., *Coleus kilimandschari* Gurke ex Engl., *Coleus coerulescens* Gurke e *Coleus barbatus* (Andr.) Benth (LUKHOBÁ; SIMMONSD; PATON, 2006). Contudo, *P. barbatus* e *P. grandis* já foram consideradas espécies distintas, porém, muito similares, e pelo fato de serem utilizadas pelo mesmo propósito usualmente são confundidas (LORENZI; MATTOS, 2002).

Para *Plectranthus neochilus*, outras denominações também podem ser encontradas: *Coleus carnosus* A. Chev., *Coleus neochilus* (Schltr.) Codd, *Coleus pentheri* Gurke e *Coleus schinzii* Gurke (RUSSELL et al., 1987).

Quanto à origem geográfica dessas espécies, *P. amboinicus* é uma espécie nativa do Leste da Ásia, posteriormente introduzida em Cuba e distribuída na América. É comumente conhecida como malvarisco, orégano ou hortelã da folha grossa, sendo identificada como erva perene e suculenta, apresentando folhas com bordas irregulares, pecíolos grossos e flores roxas (CASTILLO; GONZALEZ, 1999). O emprego dessa espécie na medicina fitoterápica tem sido relacionado com o tratamento do câncer, mas ela também é utilizada como carminativo, antifúngico, anti-inflamatório, na prevenção de ataques asmáticos e pode ser aplicada em queimaduras, picadas de inseto e edema (WEI et al., 2006).

Carriconde et al. (1996) relatam que *P. barbatus* é uma espécie originária da África e constitui uma das espécies mais citadas em levantamentos etnobotânicos no Brasil. O autor descreve também que essa espécie é conhecida popularmente como falso-boldo, boldo-brasileiro, boldo-da-terra, boldo-do-reino, malva-santa, boldo-nacional ou boldo-do-jardim.

As plantas que representam essa espécie apresentam porte arbustivo, são perenes, de aroma característico, com ramos de secção quadrangular; as folhas são opostas, ovadoblôngas, pilosas e as flores pentâmeras, azuis a violáceas, reunidas em ráculos (MARTINS et al., 1995).

Medicinalmente, é uma espécie utilizada como tônico, digestivo, hipossecrator gástrico (para azia e dispepsia), carminativo para afecções do fígado e ressaca alcoólica (MARTINS, et al. 1995).

P. neochilus também tem como centro de origem a África, espécie popularmente conhecida no Brasil como boldo-gambá, boldinho ou boldo-rasteiro (LORENZI; MATOS, 2002). É identificada anatomicamente como uma planta de tricomas glandulares em folhas e flores; possui folhas suculentas, aromáticas de odor intenso e nauseoso (MAURO et al., 2008). Trata-se de uma erva aromática empregada popularmente no tratamento de insuficiência hepática e dispepsia. Entretanto, sua principal aplicação terapêutica está relacionada com doenças gastrintestinais, sendo geralmente utilizada como um substituto para *P. barbatus* (BOCARDI, 2008).

2.2 Palinologia

A caracterização morfopolínica tem se mostrado uma ferramenta eficiente em diversas áreas de pesquisa, proporcionando melhor entendimento de relações ecológicas e processos evolutivos, além de ser útil em estudos voltados para a taxonomia (ADEKANMBI; OGUNDIPE, 2009; MACEDO; SOUZA; BAUERMANN, 2009; CANTINO; HARLEY; WAGSTAFF, 1992).

Na ecologia, a palinologia geralmente se aplica ao estudo do comportamento dos insetos. É possível identificar quais as fontes preferenciais de néctar utilizadas, por exemplo, pelas abelhas, por meio de análises realizadas em amostras de mel, que podem conter diversos tipos de grãos de pólen. Essas

análises podem indicar uma provável rota polinizadora dos insetos, bem como os gêneros mais frequentes ou espécies presentes em uma determinada região geográfica que são mais importantes para o desempenho das funções dos insetos (ADEKANMBI; OGUNDIPE, 2009).

Os grãos de pólen e esporos constituem uma importante entidade morfológica que reflete a história da evolução das plantas. Estudos realizados com grãos de pólen em processo de fossilização em rochas sedimentares (palinomorfos) permitem elaborar tendências evolutivas de determinados gêneros, além de identificar a existência de características conservadas quando comparadas com dados palinológicos de espécies atuais (MACEDO; SOUZA; BAUERMANN, 2009). O padrão de formação das aberturas da parede da exina é umas das características mais conservadas evolutivamente e é influenciado pela orientação dos eixos meióticos e pela forma de como ocorre a citocinese na tétrade. Dessa forma, o número de colpos pode indicar quão basal ou derivada a espécie é (FURNESS; RUDALL, 2004).

O grau de complexidade das plantas tem sido explicado também pelo número de aberturas que o grão de pólen possui. A caracterização genética de várias espécies de angiospermas comprova que quanto mais a espécie é basal, menor o número de colpos que ela possui. O aumento do número dessas aberturas em angiospermas oferece maiores possibilidades de sítios de germinação do tubo polínico, facilitando o contato de, pelo menos, uma das aberturas com a superfície do estigma. Portanto, espécies com maior número de colpos possuem melhores estratégias adaptativas no meio em que sobrevivem. Este fato contribui para o entendimento da irradiação adaptativa que um determinado grupo de plantas sofreu ao longo do tempo evolutivo e da coevolução da morfologia do pólen com seus respectivos agentes polinizadores (FURNESS; RUDALL, 2004).

A palinologia possui aplicação valiosa na taxonomia de Lamiaceae, pois permitiu a separação da família em duas subfamílias: Lamioideae, com grãos de pólen binucleados e tricolpados e Nepetoideae, com grãos trinucleados e hexacolpados (WUNDERLICH, 1967).

Algumas espécies de Lamiaceae já descritas palinologicamente compartilham as características mais encontradas na família. No gênero *Plectranthus*, os grãos de pólen, geralmente, são de tamanho mediano, 6-zonocolpados, com ornamentações da exina reticulada e psilada finamente reticulada (SAGGOO; BIR, 1983). Esse mesmo número de colpos, com algumas exceções, é bastante frequente em espécies de *Salvia*, entretanto, o tipo de ornamentação mais comum é a birreticulada (GUTA; SHARMA, 1990).

A palinologia tem sido aplicada com propósitos taxonômicos também em outros gêneros da família Lamiaceae. Em *Stachys*, é possível diagnosticar algumas espécies separando-as de outras relacionadas, como ocorre na seção *Eriantomum*. Mas, nem sempre a morfologia do pólen é um caráter que permite determinar os limites de cada táxon. Em outras seções podem ser encontradas dificuldades na utilização de dados palinológicos para a distinção de espécies, como em *Fragicaulis*. Nesta seção, a morfologia polínica sugere uma relação específica muito estreita, sendo, nesses casos, um caráter que seria útil apenas em níveis taxonômicos superiores (SALMAKI et al., 2008).

Lycopus é considerado um gênero estenopolínico, pois não existem diferenças polínicas significantes para a taxonomia. As espécies pertencentes ao gênero, geralmente, possuem grãos de pólen médios e circulares, 6-zonocolpados e com ornamentação birreticulada (MOON; HONG, 2003).

O estudo morfopolínico tem gerado informações úteis na elaboração de hipóteses genéticas. Stebbins (1950) postulou que o grão de pólen sofre variações morfométricas de acordo com a ploidia da espécie, ou seja, se a poliploidia causa efeito gigas nas plantas, conseqüentemente, há aumento

também no tamanho do grão de pólen. Da mesma forma, Erdtman (1964) admite que o volume polínico também pode ser correlacionado com a aneuploidia e que, em várias taxa, em espécies com altos números cromossômicos os grãos de pólen são proporcionalmente maiores. Além disso, essa proporcionalidade está presente em algumas espécies poliploides, quando comparadas com seus respectivos genótipos diploides.

O tamanho do grão de pólen pode ser utilizado como um marcador da condição diploide e poliploide das plantas e proceder à combinação de dados palinológicos de espécies modernas com os de seus ancestrais fósseis facilita o entendimento da evolução da complexidade dos níveis de ploidia (STEBBINS, 1959).

Em *Mentha suaveolens*, grãos de pólen menores estão associados à condição de 24 cromossomos. Esta espécie faz parte de uma linha de ploidia com número básico de cromossomos de $x = 12$ e os grãos maiores são encontrados em *Mentha dumetorum*, espécie tetraploide com $2n = 60$ (CELENK et al., 2008).

Em genótipos norte-americanos do gênero *Eriogonus*, quando os grãos de pólen são pequenos, geralmente, a espécie tem baixo número cromossômico, ao passo que grãos de pólen grandes, provavelmente, indicam números cromossômicos altos (ERDTMAN, 1964).

Esse tipo de correlação também já foi descrito para algumas espécies da família Lamiaceae. Saggoo e Bir (1983) desenvolveram estudos citopalinológicos com 109 espécies e 6 variedades, envolvendo 35 gêneros da família. Contudo, não constataram nenhum padrão de correlação do aumento do grão de pólen com maior número cromossômico em vários grupos, como, por exemplo, em *C. forsskohlii*, em que os citotipos com $n=17$ possuem grãos de pólen menores quando comparados com o citotipo de $n=15$. Em várias espécies do gênero *Justicia*, o aumento do número de cromossomos leva a uma gradual

tendência de aumentar o tamanho polínico. Entretanto, em espécies com $n=15$ a 18 cromossomos, o tamanho do grão de pólen contrariamente decresce de tamanho, não alterando a classificação do tipo polínico.

Estudos palinológicos não abrangem apenas aspectos evolutivos e morfológicos, mas também o conhecimento da fertilidade polínica, o que tem grande importância por gerar informações sobre a capacidade de regeneração de determinada população por meio da reprodução sexual, com a finalidade de garantir sua sobrevivência frente às adversidades do ambiente (JENNERSTEN; NILSSEN, 1993). Além disso, permite ter conhecimento do comportamento reprodutivo da espécie, fator este que interfere no manejo de programas de melhoramento (RODRIGUEZ-RIANO; DAFNI, 2000).

A viabilidade do pólen também já se mostrou ser um dado complementar ao da quantidade de DNA em investigações taxonômicas no gênero *Hosta* Tratt (Hostaceae), permitindo sua divisão em três subgêneros. Nesse trabalho, em espécies com mesmo número cromossômico, diferentes rotas migratórias podem ser relacionadas com diferenças no tamanho do genoma total e a viabilidade do pólen obteve importância no estudo dos cruzamentos interespecíficos nos limites das áreas populacionais, possibilitando separar as espécies dos híbridos, sendo os híbridos os indivíduos de baixa porcentagem de fertilidade (ZONNEVELD; VAN IREN, 2001).

A porcentagem de grãos de pólen viáveis também pode indicar qual é estratégia reprodutiva da espécie. Plantas com baixa viabilidade geralmente são plantas que possuem meiose irregular e, por isso, se reproduzem vegetativamente como uma alternativa de sobrevivência frente às pressões seletivas (BENGTSSON; CEPLITIS, 2000). Em espécies de *Plectranthus*, a fertilidade do pólen pode variar de 37,8% até 100% (SAGGOO; BIR, 1983). Em *P. barbatus*, ocorre o aumento esporádico da porcentagem de grãos de pólen viáveis, o que pode ser um método utilizado pela espécie para manter a

variabilidade genética em situações de estresse ambiental e, por esse motivo, a espécie possui produção de sementes problemática, dada a baixa porcentagem de sementes viáveis (BATTISTIN et al., 2006).

2.3 Citogenética do gênero *Plectranthus*

As espécies pertencentes ao gênero *Plectranthus* têm números cromossômicos bastante diversos, variando de $2n=14$ a 84, sendo o número mais frequente o de 28 e o número básico mais comum o 7. Entretanto, $x = 6$ e $x = 8$ não são incomuns e ocorrem em várias outras espécies (MORTON, 1962).

As diferenças quanto ao número cromossômico em *Plectranthus* são mais abordadas na literatura para *P. barbatus*, por esta ser uma espécie que apresenta intensa variação cromossômica (Tabela 1).

Coleus forskohlii, uma das sinónimas de *P. barbatus*, foi descrita como uma espécie diploide, com número gamético 14, com cromossomos de tamanhos relativamente semelhantes (REDDY, 1952). No entanto, Riley e Hoff (1961), em seus estudos sobre número de cromossomos em dicotiledôneas da região sul-africana, também concluíram que a espécie é diploide, porém, com $n=16$. Bir e Saggoo (1982) descreveram as coleções dessa espécie, que são provenientes da Índia Central e do Sul da Índia, com número básico 17 e 15, respectivamente. Os autores concluíram que essa variabilidade pode ser devido à aneuploidia em nível de gênero, o que acaba por conduzir a variações na morfologia da planta.

Silva (2005) relatou que, para uma população de *P. barbatus*, verifica-se número cromossômico de $2n=2x=28$, sendo os cromossomos classificados como metacêntricos de acordo com a metodologia proposta por Levan, Fredga e Souberg (1964).

Tabela 1 Autores e números cromossômicos das espécies em estudo. Consta entre parênteses a sinonímia utilizada como referência

Espécie	Nº cromossômico	Autor
<i>Plectranthus barbatus</i>	2n=28	Spelberg e Ward (1988) Battistin et al. (2006) Silva et al. (2007)
<i>Plectranthus barbatus</i> (<i>Coleus barbatus</i>)	2n=32 2n=34 2n=30 2n=30 2n=32	Riley e Hoff (1961) Sagoo E Bir (1979) Cherian E Kuriachan (1981) Goldblat (1981) Pagliarini et al. (1989)
<i>Plectranthus barbatus</i> (<i>Coleus forskohlii</i>)	2n=28 2n=34 2n=34, 30 2n=30, 34 2n=28, 30 2n=30	Reddy (1952) Basavaraj e Krishnappa (1982) Bir e Saggoo (1982) Sagoo e Bir (1983) Thoppil (1993) Bahl e Tyagi (1988)
<i>Plectranthus amboinicus</i> (<i>Coleus amboinicus</i>)	2n=56	Basavaraja e Krishnappa (1982)
<i>Plectranthus amboinicus</i> (<i>Coleus aromaticus</i> Benth.)	2n=32 2n=34 2n=16, 24, 30, 32, 34, 48	Scheel (1931) Sagoo e Bir (1983) Thoppil (1993)
<i>Plectranthus amboinicus</i> (<i>Coleus carnosus</i> Hassk)	2n=48	Morton (1962)
<i>Plectranthus neochilus</i> (<i>Coleus pentheri</i> Gurke)	2n=32	De Wet (1958) Riley e Hoff (1961)

Estudos citogenéticos para essa espécie foram realizados por Thoppil (1993), com plantas da família Lamiaceae no sul da Índia. O autor utiliza a sinonímia *C. forskolli* e descreve a espécie com $2n=4x=28$ cromossomos pertencentes a um genoma autotetraploide com número básico $x=7$. Entretanto, foram encontradas algumas variações somáticas, tais como $2n=26$ e $2n=30$. Em avaliações mais detalhadas do cariótipo, o autor constatou que o segundo par de cromossomos possui constrição secundária e que a amplitude de variação do comprimento dos cromossomos variou de $3,4 \mu\text{m}$ a $1,6 \mu\text{m}$, com média de $2,36 \mu\text{m}$ e o comprimento total da cromatina, $66 \mu\text{m}$.

Hiley e Hoff (1961), usando a sinonímia *Coleus barbatus*, foram os primeiros a encontrar um exemplar com 32 cromossomos, considerados de tamanho pequeno.

Para as espécies *P. amboinicus* e *P. neochilus* existem poucos trabalhos que as descrevem cariotipicamente. Contudo, Thoppil (1993), utilizando a sinonímia *Coleus aromaticus* Benth. para *P. amboinicus*, encontrou $2n=32$ como número cromossômico mais comum, além de outras plantas com variação somática. *P. neochilus* é uma espécie que pouco tem sido estudada citogeneticamente, haja vista pelo número de referências encontradas com relação ao seu número cromossômico (Tabela 1).

Estudos meióticos também podem contribuir para a caracterização da espécie quanto ao número cromossômico, bem como para avaliar o seu comportamento em termos reprodutivos. Bahl e Tyagi (1988) realizaram estudos de cromossomos paquitênicos em *C. forskholii*. Foram identificados 15 bivalentes, indicando $2n=30$ como número somático. Os pares cromossômicos foram mensurados e o comprimento total do lote haploide foi de $515,88 \mu\text{m}$; a variação do tamanho dos cromossomos foi entre $50,45 \mu\text{m}$ e $15,0 \mu\text{m}$ e a relação de braços entre 0,09 e 0,9, demonstrando que os cromossomos são acrocêntricos e metacêntricos. Os centrômeros foram localizados nas regiões heterocromáticas

e os cromossomos raramente eram terminados por telômeros proeminentes. Os cromossomos 9 e 13 possuem o braço curto totalmente heterocromatinizado, associando-os à região organizadora de nucléolo.

Battistin et al. (2006) relatam que *P. barbatus* apresenta meiose regular com formação de 14 bivalentes, indicando que o número cromossômico do genótipo estudado é de $2n=28$.

2.4 Citometria de fluxo

O conhecimento da quantidade de DNA nuclear em grupos de organismos tem utilidade em vários campos da ciência. Em programas de melhoramento é de fundamental importância o conhecimento da ploidia da espécie na seleção de determinados genótipos que tenham potencial de gerar híbridos superiores e também na identificação dos híbridos de interesse (EECKHAUT et al., 2003). Na citotaxonomia, o teor de DNA permite realizar inferências a respeito de relações filogenéticas e estudar o comportamento da espécie por meio de avaliações da meiose, da detecção de mixoploidia e aneuploidia, além de auxiliar na contagem de cromossomos (KRON; SUDA; HUSBAND, 2007).

A citometria de fluxo é uma das técnicas que cumprem o propósito da determinação da quantidade de DNA e oferecem resultados confiáveis de maneira rápida, simples e, de certa forma, com baixo custo (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

O uso padronizado da técnica permite realizar estimativas bastante precisas e sensíveis a pequenas variações. Dessa forma, a citometria de fluxo pode gerar resultados não apenas para análises de cruzamentos interespecíficos, mas também de variações intraespecíficas do tamanho do genoma (GREILHUBER; TEMSCH; LOUREIRO, 2007).

Estimativas para a mesma espécie por vezes podem ser divergentes (BENNETT; SMITH, 1976) e essa variação intraespecífica no tamanho do genoma é de interesse de longa data, pois, frequentemente, entra em desacordo com a inicial percepção de que existiria uma constância na quantidade de DNA dos indivíduos de mesma espécie (SWIFT, 1950). Por esse motivo, muitas vezes, a detecção de variação nos resultados de densitometria ou citometria de fluxo tem sido explicada por artefatos da técnica como falta de padronização e/ou coloração insuficiente (GREILHUBER, 2005).

Inúmeros casos de variação intraespecífica em plantas e animais poderiam ser atribuídos às diferenças cromossômicas (aneuploidias, poliploidia, cromossomos B, cromossomos sexuais), além da variação no tamanho dos cromossomos (GREGORY, 2005). Contudo, alterações no teor de DNA têm sido mais relacionadas com a proliferação diferencial de elementos transponíveis, que pode ser a causa da maioria das diferenças no tamanho do genoma entre as espécies (PIEGU, 2006).

O estudo da quantidade de DNA em plantas foi realizado apenas em uma fração de todas as espécies existentes. Em angiospermas, o tamanho do genoma varia cerca de 2.500 vezes, com faixa de variação de 0,06 a 152,2 pg 2C de DNA (GREILHUBER et al., 2006; PELLICER; FAY; LEITCH, 2010). Na família Lamiaceae, a menor quantidade de DNA 2C já descrita é de 0,28 pg para *Nepeta teydea* e a maior, 6,24 pg para *Stachys graniflora* (BAROW; MEISTER, 2003; SUDA; KYNCL; FREIOVA, 2003).

A citometria de fluxo, juntamente com outras técnicas moleculares, permite a identificação de espécies que são geneticamente mais relacionadas, bem como indivíduos superiores quanto a produção de metabólitos secundários. Genótipos de espécies de *Mentha* com maior potencial de produção de metabólitos secundários já foram selecionados com base no conteúdo de DNA nuclear para a realização de hibridizações intra e interespecíficas na obtenção de

plantas que produzam maiores quantidades de óleo essencial (GOBERT et al., 2002).

A determinação da quantidade de DNA também auxilia a distinção de plantas quanto ao nível de ploidia; em espécies de potencial ornamental do gênero *Plectranthus*, foram realizadas hibridizações intraespecíficas com o objetivo de criar novos poliploides de floração distinta e a citometria facilitou a identificação dos indivíduos triploides aos quais se destina maior interesse por possuírem características de floração mais favoráveis (BRITS; LING, 2008).

REFERÊNCIAS

- ADEKANMBI, O. H.; OGUNDIPE, O.. Nectar Sources for the Honey Bee (*Apis mellifera adansonii*) Revealed by Pollen Content. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, Cluj-Napoca, v 37, n. 2, p. 211-217, 2009.
- BAHL, J. R.; TYAGI, B. R. Pachytene Chromosomes of *Coleus forskohlii*. **Current Science**, Bangalore, v. 57, n. 6, p. 326-328, Mar. 1988.
- BAROW, M.; MEISTER, A. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. **Plant, cell and environment**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 571-584, Apr. 2003.
- BASAVARAJ, D. G.; KRISHNAPPA, I. IOPB chromosome number reports LXXV. **Taxon**, Utrech, v. 31, p. 361, 1982.
- BATTISTIN, A. et al. Biologia floral, microsporogênese e número cromossômico em cinco espécies de plantas utilizadas na medicina popular no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 56-62, nov. 2006.
- BENGTSSON, B. O.; CEPLITIS, A. The balance between sexual and asexual reproduction in plants living in variable environments. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 13, n. 3, p. 415-422, May 2000.
- BENNETT, M.D.; SMITH, J. B. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. London, v. 274, n. 933, p. 227-274, May 1976.
- BOCARDI, J. M. B. **Etnofarmacologia das plantas mediciniais do céu azul e composição química do óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schltr.** 2008. 101 p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
- BIR, S. S.; SAGGOO, M. I. S. Cytology of some members of Labiatae from Central India. In: PROCEEDINGS of the Indian National Science Academy - Part B: Biological Sciences. New Delhi: Indian National Science Academy, 1982. v. 107-112, p. 52.

BRITS, G. J.; LING, L. I. Polyploid breeding of wild south african *Plectranthus* (spurflowers) as new flowering pot plants. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 774, p. 437-442, Oct. 2008.

CANTINO, P. D.; HARLEY, R. M.; WAGSTAFF, S. J. Genera of Labiatae: status and classification. In:; Harley, R. M.; Reynolds, R. M. **Advances in Labiate Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 511-522.

CANTINO, P. D. Evidence for a polyphyletic origin of the Labiatae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 79, n. 2, p. 361–379, 1992.

CARRICONDE, C. et al. **Plantas medicinais & plantas alimentícias**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1996.

CASTILLO, R. A. M.; GONZALEZ, V. P. *Plecthranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Revista Cubana Plantas Medicinai**s, La Habana, v. 4, n. 3, p. 110-115, Sept./Dec. 1999.

CELENK, S. et al. A palynological study of the genus *Mentha* L. (Lamiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 157, n. 1, p. 141–154, May 2008.

CHENGYIH, W.; HSIWEN, L. On the evolution and distribution in Labiatae. **Acta Botanica Yunnanica**. Kunming, v. 4, n. 2, p. 1-3, 1982.

CHERIAN, M.; KURIACHAN, P. I. **Chromosome number reports LXXII**. *Taxon*, Utrech, v. 30, p. 707-709, 1981.

DE WET, J. M. J. Chromosome number in *Plectranthus* and related genera. **South African Journal of Science**, Johannesburg v. 34, p. 153-156, 1958.

DOLEZEL J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005..

EECKHAUT, T. et al. Interspecific hybridization between *Hibiscus syriacus* L and *Hibiscus paramutabilis* Bailey. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 630, p. 85-90, Jan. 2004.

ERDTMAN, V. Palynology. In: TURRIL, W. B. (Ed.). **Vistas in Boyany**: recent researches in plant taxonomy. Pergamon Press: London, 1963. v. 4. p. 23-54.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Pollen aperture evolution: a crucial factor for eudicot success? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 154-158, Mar. 2004.

GOBERT, V. et al. Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 89, n. 12, p. 2017–2023, Dec. 2002.

GOLDBLATI, P. **Index to plant chromosome number of 1975-1978**. Missouri: Botanical Garden, 1981.

GOLDFRANK, L. et al. The Pernicious Panacea: herbal medicine. **Hospital Physician**, Oradell, v. 18, n. 10, p. 64–69, Oct. 1982.

GRAYER, R.J. et al. Distribution of exudates flavonoids in the genus *Plectranthus*. **Biochemical Systematics and Ecology**. Oxford, v. 38, n. 3, p. 335-341, June 2010.

GREGORY, T. R. The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 133–46, Jan. 2005.

GREILHUBER, J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 91–98, Jan. 2005.

GREILHUBER, J. et al. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae with chromosomes of bacterial size. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 8, n. 6, p. 770-777, Nov. 2006.

GREILHUBER, J.; TEMSCH, E. M.; LOUREIRO, J. C. M. Nuclear DNA content measurement. In: DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (Ed.). **Flow Cytometry with Plant Cells**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. p. 67–101.

GUERRA, M. et al. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germoplasm bank. **Brasilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 3, p. 489-496, Sept. 1997.

GUPTA, A; SHARMA, C. Polymorphism in pollen of *Salvia leucantha* (Lamiaceae). **Grana**, Stockholm, v. 29, n. 4, p. 277–284, 1990.

HARLEY, R. et al. **Lamiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000142>>. Acesso em: 31 maio 2011.

HUTCHINSON, J. (Ed.) **Flora of West Tropical Africa**. 2th ed. London: University of Virginia, 1988. v. 2.

JENNERSTEN, O.; NELSEN, S. G. Insect flower visitation frequency and seed production in relation to patch size in *Viscaria vulgaris* (Caryophyllaceae). **Oikos**, Buenos Aires, v. 68, p. 283-292, 1993.

KAVITHA, C.; RAJAMANI, K.; VADIVEL, E. *Coleus forskohlii*: A comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. **Journal of Medicinal Plants Research**, New York, v. 4, n. 4, p. 278-285, Feb. 2010.

KRON, P.; SUDA, J.; HUSBAND, B. C. Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. **Annual review of ecology, evolution, and systematics**, Palo Alto, v. 38, n. 1, p. 847-876, Dec. 2007.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SOUBERG, A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

LORENZI, H.; MATOS, F. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. São Paulo : Instituto Plantarum, 2002.

LUKHOB, C. W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 103, n. 1, p. 1-24, Jan. 2006.

MACEDO, R. B.; SOUZA, P. A. DE; BAUERMANN, S. G. Catálogo de pólenes, esporos e demais palinórfos em sedimentos holocênicos de Santo Antônio da Patrulha, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**: série Botânica, Porto Alegre, v. 64, n. 2, p. 43-78, jul./dez. 2009.

MAHDAVI, S.; KARIMZADEH, G. Karyological and Nuclear DNA Content Variation in Some Iranian Endemic *Thymus* Species (Lamiaceae). **Journal of Agricultural, Science, and Technology**, Nairobi, v. 12, n. 4, p. 447-458, Oct. 2010.

MARTINS, E. R. et al.. **Plantas Medicinais**. Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 1995.

MAURO, C. et al. Estudo anatômico comparado de órgãos vegetativos de boldo miúdo, *Plectranthus ornatus* Codd. e malvarisco, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. – Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 608-613, out./dez. 2008.

MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Plantas medicinais: a coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 5, n. 1/2, p. 93–119, jan./dez. 1989.

MOON, H. K.; HONG, S. P. Pollen morphology of the genus *Lycopus* (Lamiaceae). **Annales Botanici Fennici**, Helsinki, v. 40, n. 3, p. 191-198, June 2003.

MORTON, J. K. Cytotaxonomic studies on the West African Labiatae. **Journal of the Linnean Society of London: botany**, London, v. 58, n. 372, p. 231–283, July, 1962.

PAGLIARINI, M. S. et al. Número de cromossomos em plantas medicinais. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 515-524, ago. 1989.

PAYNE, G. et al. The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture, In: _____. **Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems**. Munich: Hanser, 1991. p. 1-10.

PELLICER, J.; FAY, M. F.; LEITCH, I. J. The largest eukaryotic genome of them all? **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 164, n. 1, p.10-15, Sept. 2010.

PIEGU, B. et al. Doubling genome size without polyploidization: dynamics of retrotransposon-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 16, n. 10, p. 1262 – 1269, 2006.

PIERRE, P. M. O. et al. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, p 1-13, July 2011.

REDDY, N. S. Chromosome numbers in Coleus. **Journal of Heredity**, Washington, v. 43, n. 5, p. 233-237, Sept. 1952.

RICHARDSON, P. The chemistry of the Labiatae: an introduction and overview. In: Harley, R. M.; Reynolds, T. (Ed.). **Advances in Labiate Science**. Kew: Royal Botanic Garden, 1992. p. 291 - 297.

RILEY, H.P.; HOFF, V.J. Chromosome studies in some South African dicotyledons. **Canadian journal of genetics and cytology**, Ottawa, v. 3, n. 3, p.260-271, Sept. 1961.

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to asses pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v.12, n. 4. p. 241–244, Jan. 2000.

RUSSELL, G. E. G. et al. **List of species of Southern African plants**: recent literature and synonyms. 2th ed. Pretoria: Botanical Research, 1987. v. 2.

SAGGOO, M. I. S.; BIR, S. S. Chromosome number reports LXV. **Taxon**, Utrech, v. 28, p. 631, 1979.

SAGGOO, M. I. S.; BIR, S. S. Cytopalynological Studies on Indian Members of Acanthaceae and Labiateae. **Journal of Palynology**, New Delhi, v. 19, n. 1/2, p. 243-277, 1983.

SALMAKI, Y. et al. Pollen morphology of *Stachys* (Lamiaceae) in Iran and its systematic implication. **Flora**: morphology, distribution, functional ecology of plants, London, v. 203, n. 8, p. 627–639, Nov. 2008.

SCHEEL, M. Karyologische Untersuchung der Gattung *Salvia*. **Botanisches Archive**, Leipzig, v. 32, p. 148-208, 1931.

SHAH, V. et al. The occurrence of forskolin in the Labiatae. **Planta Medica**. Stuttgart, v. 39, n. 2, p. 183–185, 1980.

SILVA, S. C. **Análise cariotípica do boldo brasileiro (*Plectranthus barbatus* Andrews)**. 2005. 40 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, 2005.

SILVA, S. C. Análise Cariotípica do Boldo Brasileiro (*Plectranthus barbatus* Andrews). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 53., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, 2007. p.106.

SPEELLENBERG, R.; WARD, D. Chromosome number reports, XCIX. **Táxon**, Utrech, v. 35, p. 396-399, 1988.

STEBBINS, G. L. **Variation and evolution in plants**. New York: Columbia, 1950.

STEBBINS, G. L. Genes, chromosomes, and evolution. In: TURRILL, W. B. (Ed.) **Vistas in Botany**. London: Pergamon, 1959. p. 258-290.

SUDA, J.; KYNCL, T.; FREIOVA, R. Nuclear DNA amounts in Macaronesian angiosperms. **Annals of Botany**, London, v. 92, n. 1, p. 153-164, July 2003.

SWIFT, H. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 36, n. 11, p. 643-54, Nov. 1950.

THOPPIL, J. E. **Chromosome Studies and exploration of chemical constituents in some members of South Indian Lamiaceae**. 1993. 497 p. Tese (Doctor of philosophy in Botany) Faculty of Science, Mahatma Gandhi University, Kerala, 1993.

THORNE, R. F. Classification and geography of the flowering plants. **Botanical Review**, Bronx, v. 58, n. 3, p. 225-327, July 1992.

UNITED STATES. Patent Application Publication. Cheng-Yu Wei, Kun-Shan Lu; Ching-Wu Hsia, Huei Long. **Leaf juice of *Plectranthus amboinicus* for treating cancer and/or tumor**. North American patent. May 11, 2006.

VULTO, A. G.; SMET, P. A. G. M. Drugs used in non-orthodox medicine. In: DUKES, M. M. G. (Ed.). **Meyler's side effects of drugs**. 11th ed. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 999-1005.

WUNDERLICH, R. Ein Vorschlag zu einer natürlichen Gliederung der Labiaten auf Grund der Pollenkörner, der Samenentwicklung und des reifen Samens. **Österreichische botanische Zeitschrift**, Wien, v. 114, p. 383-483, 1967.

ZONNEVELD, B. J. M.; VAN IREN, F. Genome Size and Pollen Viability as Taxonomic Criteria: Application to the Genus *Hosta*. **Plant Biology**, Stuttgart, v.3, n. 2, p. 176-185, Mar. 2001.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

**Aspectos morfopolínicos em espécies de *Plectranthus* L'Héritier
(Lamiaceae)**

RESUMO

Na família Lamiaceae, a palinologia tem expressiva importância, pois permitiu sua divisão em duas subfamílias, Lamioideae e Nepetoideae. *Plectranthus* é um dos gêneros pertencentes a essa família, caracterizado pela diversidade de plantas de interesse medicinal e ornamental. Trata-se de um gênero que enfrenta problemas taxonômicos pelo fato de agregar as espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Coleus*, o que contribuiu para que existisse variedade de sinônimas para uma mesma espécie. Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar os grãos de pólen das espécies *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus barbatus* e *Plectranthus neochilus*, com a finalidade de dar suporte às soluções de problemas taxonômicos do gênero, bem como às hipóteses evolutivas. Para proceder às análises, os grãos de pólen foram acetolisados e avaliados por meio do microscópio de luz. Também foram realizadas análises da ornamentação da exina por meio da microscopia eletrônica de varredura. As três espécies apresentam grãos de pólen hexazonocolpados de âmbito circular e polos de área grande. Os colpos são longos, rasos, estreitos e com extremidades agudas. Foram identificadas diferenças na espessura das camadas da exina dentre as espécies estudadas. *P. amboinicus* possui grão de pólen pequeno, prolato esferoidal com ornamentação rugulada. *P. barbatus* apresenta grão de pólen com mesmo tipo polínico, porém de tamanho médio e ornamentação reticulada da exina. Os grãos de pólen de *P. neochilus* são médios, do tipo subprolato com ornamentação reticulada. Os resultados indicam que as espécies são estreitamente relacionadas. A ornamentação do tipo rugulada da exina de *P. amboinicus* sugere um novo posicionamento taxonômico evolutivamente mais basal dentre as espécies estudadas.

Palavras-chave: Palinologia. Taxonomia. Ornamentação da exina. Evolução.

ABSTRACT

In the Lamiaceae, the palynology divided this family into two subfamilies: Lamioideae and Nepetoideae. *Plectranthus* is included genus in this family, characterized by diversity of the medicinal and ornamental plants and face taxonomic problems because *Plectranthus* aggregate, in the past, species from *Coleus*. This fact contributed to a synonyms variety for the same species. Therefore, the objective of this study was to compare the pollen grains of the species *Plectrathus amboinicus*, *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus neochilus* in order to solving the taxonomy problem, as well as hypotheses evolutionary. The pollen grains were acetolyzed and evaluated by light microscope. The exine ornamentation was analyzed through scanning electron microscopy. The three species have pollen grains hexazonocolpados, circular and have large polar area. The colpo are long, shallow, narrow and pointed end. Differences on the exine thickness were identified. *P. amboinicus* has pollen grain small, spheroid prolate with rugulate ornamentation. *P. barbatus* pollen grain has the same pollen kind, but medium size and reticulate ornamentation. *P. neochilus* pollen grains are medium with reticulate ornamentation too, but subprolate. The results indicate that the species are close. The rugulate exine ornamentation type from *P. amboinicus* suggests a new taxonomic position evolutionary most basal among the studied species.

Keywords: Palynology. Taxonomy. Exine ornamentation. Evolution.

1 INTRODUÇÃO

Lamiaceae Martinov é uma família que compreende cerca de 220 gêneros e 6.000 espécies, concentrados na região do Mediterrâneo e Oriente Médio até a Ásia central (CHENGYIH; HSIWEN, 1982). No Brasil, 500 espécies de 34 gêneros estão distribuídas em quase toda área territorial (HARLEY et al., 2010).

Plectranthus L'Héritier é um dos gêneros dessa família, caracterizado pela riqueza de espécies de interesse medicinal e ornamental, sendo utilizado amplamente na medicina fitoterápica por produzir metabólitos secundários variados, dentre os quais se destacam alguns diterpenos, como, por exemplo, o forskolin (SHAH et al., 1980), que é isolado principalmente de *Coleus forskohlii* (sinonímia de *Plectranthus barbatus*), apresenta função carminativa e reduz a pressão arterial, além de possuir aplicação no tratamento de doenças respiratórias e do sistema circulatório (KAVITHA; RAJAMANI; VADIVEL, 2010).

As espécies do gênero *Plectranthus*, juntamente com as de *Coleus*, já pertenceram ao gênero *Ocimum* Linn. Entretanto, como os taxonomistas utilizaram apenas diferenças morfológicas do estame para a subdivisão deste último gênero, esse critério posteriormente foi considerado insuficiente para a separação desses taxa. Por esse motivo, as espécies de *Coleus* passaram a compor o grupo das espécies de *Plectranthus* (MORTON, 1962).

Em consequência das divergências taxonômicas, algumas espécies desse gênero podem ser conhecidas por múltiplas sinonímias, sendo as de uso em grande escala, as detentoras do maior número delas. *P. barbatus*, por exemplo, possui como principais sinonímias *Plectranthus forskohlii* Briq, *Plectranthus grandis* (Cramer) RH Willemse, *Coleus forskohlii* Briq. e *Coleus barbatus* (Andr.) Benth (LUKHOBBA; SIMMONDS; PATON, 2006).

O estudo do grão de pólen tem subsidiado reformulações em grupos que apresentam problemas taxonômicos. A família Lamiaceae é um exemplo típico, pois a palinologia permitiu a separação de suas espécies em duas subfamílias: Lamioideae, na qual os grãos de pólen são providos de dois núcleos e três colpos, e Nepetoideae, que abrange espécies com grãos trinucleados e hexacolpados (WUNDERLICH, 1967). Nessa subfamília, estudos realizados em grãos de pólen de espécies pertencentes à tribo Ocimum reforçaram hipóteses filogenéticas propostas com base em outros parâmetros, além de influenciarem novos enquadramentos taxonômicos principalmente em nível de gênero (HARLEY et al., 1992).

Considerando o estudo palinológico uma ferramenta que pode auxiliar na definição de limites taxonômicos, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar e comparar os grãos de pólen das espécies *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus barbatus* e *Plectranthus neochilus*, com a finalidade de dar suporte à solução de problemas taxonômicos do gênero.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Inflorescências de *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus barbatus* e *Plectranthus neochilus* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da UFPA, imediatamente fixadas em álcool etílico: ácido propiônico (3:1) por, no mínimo, 24 horas e armazenadas em freezer até o momento de uso.

Para as avaliações em microscopia de luz, foram preparadas 5 lâminas para cada espécie, segundo o método acetolítico de Erdtman (1952). Em cada lâmina foram avaliados 10 grãos de pólen em cada lâmina, sendo 5 na visão polar e 5 na visão equatorial em microscópio de campo claro (Leica DMLS) equipado com microcâmera (Nikon Digital Sight DS-Fi1). As imagens foram obtidas no prazo máximo de sete dias após a acetólise a partir do software Image

Tool 3.0 da UTHSCA (The University of Texas Health Science Center in San Antonio).

As variáveis avaliadas foram: eixo polar (P) – dado utilizado na classificação do tamanho do pólen, diâmetro equatorial (E), diâmetro do colpo (D), lado do apocolpo (d), largura do colpo (LC) e comprimento do colpo (CC). As medidas da espessura da endo e ectoexina foram obtidas, de forma padronizada, da região equatorial. Também foram estabelecidas as relações P/E, por meio das quais foi classificado o tipo polínico de acordo com Punt et al. (2007) e (d/D) para a classificação do tamanho da área polar, de acordo com Faegri e Iversen (1966).

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura as anteras das espécies de *Plectranthus* foram lavadas três vezes, por 10 minutos, em tampão cacodilato e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por, no mínimo, 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi lavado por três vezes em água destilada, desidratado em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%) e levado para o aparelho de ponto crítico (CDP 030). Os grãos de pólen foram extraídos das anteras sobre stubs, os quais foram submetidos ao evaporador de ouro (SCD 050) e, finalmente, analisados em aparelho MEV-LEO-EVO40.

3 RESULTADOS

Os grãos de pólen das espécies de *Plectranthus* demonstram aspecto similar por meio da técnica de acetólise (Figura 1). Os grãos de pólen das espécies de *Plectranthus* são classificados como médios, pois apresentam eixos polares (P) em torno de 40 μm (Tabela 1). Essas espécies possuem grãos de pólen de âmbito circular e pólos de área grande, sendo 0,52 μm para *P. barbatus* e *P. neochilus*, e 0,44 μm para *P. amboinicus*.

As três espécies apresentam grãos de pólen hexazonocolpados, também denominados 6-zonocolpados, com colpos longos, rasos, estreitos e extremidades agudas (Figura 1).

Com base nas classificações propostas por Punt et al. (1999), as razões P/E (Tabela 1) obtidas para *P. amboinicus* e *P. barbatus* foram de 1,09 e 1,12 μm , respectivamente, o que permitiu identificar grãos de pólen do tipo prolato esferoidal para ambas as espécies, já que esta classificação é aplicada quando essa razão está entre 1,00 a 1,14 μm . *P. neochilus* apresenta tipo polínico subprolato, pois a razão P/E é de 1,19 μm , fundamentada no intervalo 1,14 a 1,33 μm (Figura 1).

As espécies apresentam variações sutis quanto à espessura da exina. *P. amboinicus* e *P. neochilus* possuem, em média, a ectoexina ligeiramente mais espessa que a endoexina e, em *P. barbatus*, a espessura das camadas possui relação inversa (Tabela 2).

As ornamentações da exina permitiram diferenciar as espécies de *Plectranthus*. *P. amboinicus* apresenta exina diferente das demais, sendo essa rugulada (Figura 2A, 2B e 2C). No colpo, foram observadas regiões arredondadas e curtas, assemelhando-se a grânulos, entre os quais podem ocorrer espaços conferindo aspecto perfurado (Figura 2D). *P. barbatus* apresenta grãos de pólen com colpos de duas formas: recuada (Figura 2E) e proeminente (Figura 2F). Ambas as variações polínicas possuem exina reticulada, com muros arredondados e rasos, formando lumens alongados e angulares de tamanho grande (Figura 2G). A ornamentação da exina do colpo apresenta regiões mais porosas quando o colpo está em posição recuada (Figura 2E e 2H). O colpo proeminente geralmente é acompanhado de exina de caráter liso (Figura 2F).

P. neochilus possui exina semelhante à de *P. barbatus*, contudo, os muros delimitam lumens mais largos e angulares, com aspecto menos alongado que em *P. barbatus* (Figura 2I, 2J e 2K). A ornamentação da exina do colpo também se

apresenta diferenciada com aspecto granulado, contudo, com região central provida de poros mais contínuos formando uma fenda central (Figura 2I e 2L).

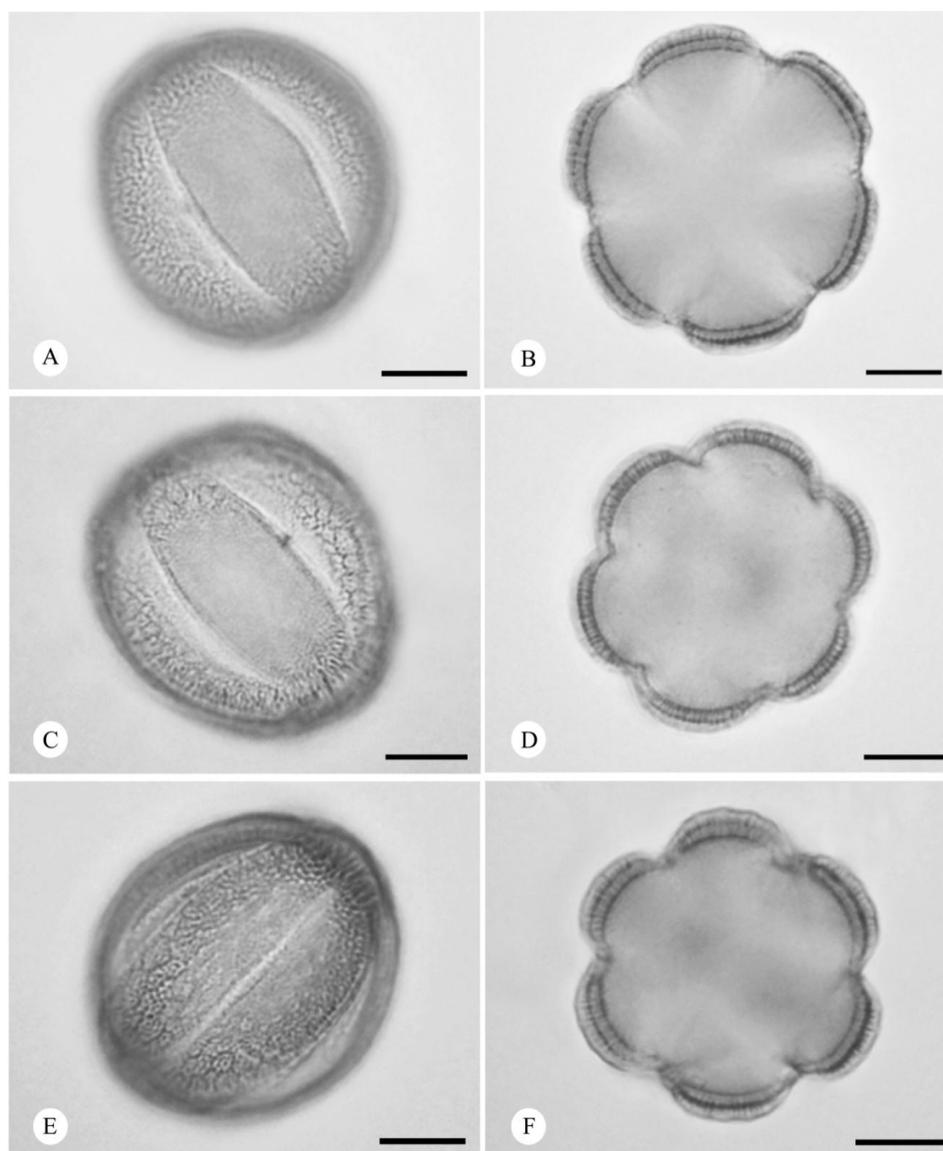


Figura 1 Grãos de pólen das espécies estudadas do gênero *Plectranthus*. (A e B) *P. amboinicus*; (C e D) *P. barbatus*; (E e F) *P. neochilus*, nas visões equatorial e polar, respectivamente. Barra = 10µm

Tabela 1 Média das medidas, em μm , dos grãos de pólen de *Plectranthus* nas vistas equatorial e polar

Espécie	parâmetros	Visão equatorial				Visão polar	
		E	P	CC	LC	d	D
<i>P. amboinicus</i>	X±s	35,64±2,86	39,06±3,96	29,53±3,46	2,13±0,4	7,44±1,42	16,92±1,61
	Mín - Max	28,99 - 41,59	30,24 - 46,76	23,08 - 36,8	1,34 - 3,44	4,6 - 10,9	14,03 - 20,35
	IC 95%	35,61 - 35,66	39,02 - 39,09	29,50 - 29,56	2,13 - 2,14	7,43 - 7,45	16,91 - 16,93
<i>P. barbatus</i>	X±s	36,46±2,64	40,99±2,5	26,38±2,17	1,75±0,29	8,88±1,51	17±1,23
	Mín - Max	31,35 - 42,75	36,83 - 47,1	21,24 - 32,88	0,86 - 2,56	5,38 - 11,99	14,18 - 19,71
	IC 95%	36,44 - 36,48	40,97 - 41,01	26,36 - 26,40	1,75 - 1,76	8,87 - 8,89	16,99 - 17,01
<i>P. neochilus</i>	X±s	33,74±2,41	40,3±2,09	27,41±2,41	1,99±0,35	8,53±1,55	16,34±1,55
	Mín - Max	27,61 - 39,26	35,14 - 45,29	23,24 - 32,49	1,36 - 2,92	5,21 - 13,05	12,29 - 20,51
	IC 95%	33,72 - 33,76	40,29 - 40,33	27,39 - 27,43	1,98 - 1,99	8,55 - 8,54	16,33 - 16,35

X – média aritmética, s – desvio padrão da média, IC – intervalo de confiança, E – diâmetro equatorial, P - eixo polar, CC – comprimento do colpo, LC – largura do colpo, D – diâmetro equatorial em vista polar, d – lado do apocolpo

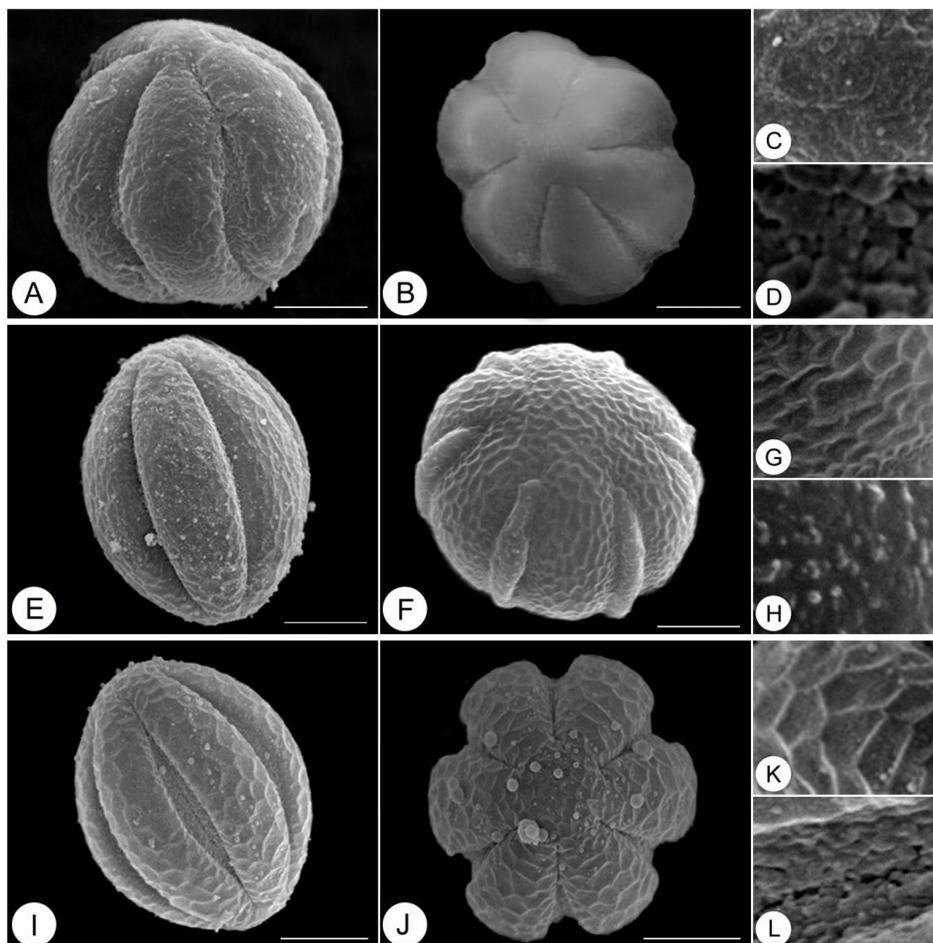


Figura 2 Grão de pólen de *P. amboinicus* (A-D): visão equatorial (A), visão polar (B), exina rugulada (C), aspecto granular da exina do colpo. Grão de pólen de *P. barbathus* (E-H): visão equatorial com colpo não proeminente (E), visão polar com colpo proeminente (F), exina reticulada (G), ornamentação granular da exina do colpo (H). Grão de pólen de *P. neochilus* (I-L): visão equatorial (I), visão polar (J), exina reticulada (K) ornamentação do colpo no qual se encontra uma fenda central (L). Barra = 10 μ m

Tabela 2 Média das medidas da exina, em μm , dos grãos de pólen das espécies de *Plectranthus*

Espécie	parâmetros	EXINA		
		EC	EN	ET
<i>P. amboinicus</i>	X s	1,26±0,21	1,15±0,25	2,42±0,38
	Mín - Max	0,94 - 1,8	0,06 - 1,73	1,2 - 3,13
	IC 95%	1,258 - 1,262	1,148 - 1,152	2,417 - 2,423
<i>P. barbatus</i>	X±s	1,02±0,14	1,17±0,12	2,2±0,19
	Mín - Max	0,77 - 1,38	0,45 - 1,92	1,89 - 2,57
	IC 95%	1,019 - 1,021	1,169 - 1,171	2,198 - 2,201
<i>P. neochilus</i>	X±s	1,33±0,22	1,25±0,15	2,58±0,3
	Mín - Max	0,69 - 1,7	0,86 - 1,55	1,74 - 3,02
	IC 95%	1,018 - 1,332	1,253 - 1,256	2,585 - 2,590

X – média aritmética, s – desvio padrão da média, IC – intervalo de confiança, EC – ectoexina, EN – endoexina, ET – exina total

4 DISCUSSÃO

Grãos de pólen hexazonocolpados aqui descritos para as espécies de *Plectranthus* já foram amplamente relatados para outros gêneros da subfamília Nepetoideae (WUNDERLICH, 1967) e esta condição é rara fora da família, exceto para alguns gêneros de Rubiaceae, como, por exemplo, *Galium* (HARLEY et al., 1992).

Saggio e Bir (1983) reportam que, das 109 espécies avaliadas de 35 gêneros distintos pertencentes à família Lamiaceae, 66 espécies, dentre as quais 7 são de *Plectranthus* e 3 de *Coleus*, possuem grãos de pólen hexazonocolpados, indicando alta frequência dessa característica dentro da família.

Outros gêneros de Lamiaceae também demonstram esse mesmo número de colpos, como ocorre em *Hymenocrater* e *Lycopus*, respectivamente descritos por Jafari e Jafarzadeh (2008) e Moon e Hong (2003). Em *Salvia* e *Mentha* predominam grãos hexacolpados radialmente simétricos, embora mais raramente existam exemplares desses gêneros com grãos de pólen com número distinto de colpos (GUPTA; SHARMA, 1990; CELENK et al., 2008; MOON et al., 2008; ÖZLER et al., 2011).

O número de colpos foi importante para a divisão da família em duas subfamílias: Lamioideae, com grãos de pólen binucleados e tricolpados e Nepetoideae, com grãos trinucleados e hexacolpados (WUNDERLICH, 1967). Vários autores descrevem que o maior número de colpos é uma característica derivada, pois as espécies das tribos mais primitivas de Lamiaceae (Prostanthroideae e Ajugoideae) são caracterizadas por possuírem grãos de pólen tricolpados, mas que essa transição ainda não foi concluída, já que podem ser encontrados em *Prostanthera* grãos de pólen com mesocolpos estreitos alternados com os mais largos, característica considerada evolutivamente em transição (SCHNARF, 1937; BORZOVA, 1960).

Entretanto, Pozhidaev (1992) sugere que, para essa família, a existência do grão de pólen hexacolpado parece não estar ligada ao tricolpado e que esses dois tipos podem possuir origem evolutiva independente na diversificação dos grupos de Lamiaceae, já que a presença de mesocolpos de tamanhos distintos é comum até mesmo em tribos de espécies mais especializadas. Além disso, na família também podem ser encontrados grãos de pólen de aspecto semelhante com 4 ou 5 colpos e que essa variação não acompanha mudanças no número de seus núcleos.

Para Ressayre et al. (2002), um dos fatores responsáveis pelas variações do número e da posição de colpos é o tipo de citocinese envolvida na formação dos grãos de pólen. Trata-se de um processo que envolve a divisão dos microsporócitos de duas formas: simultânea, na qual ocorre a divisão citoplasmática após cada divisão nuclear meiótica e sucessiva, em que o citoplasma só é dividido apenas após a segunda divisão.

Cada tipo de citocinese implica a formação de certo número de aberturas. Grãos de pólen monossulcados podem ser gerados tanto por citocinese simultânea quanto pela sucessiva, enquanto, na maioria das eudicotiledôneas, a formação de grãos de pólen com três ou mais aberturas é realizada apenas pela simultânea (FURNESS; RUDALL, 2004).

Nesse sentido, a presença de seis colpos nas espécies de *Plectranthus* estudadas evidencia a ocorrência de citocinese sucessiva, processo que também foi descrito para *Coleus blumei*, espécie cujo gênero é intimamente relacionado ao *Plectranthus*. Nessa espécie, a produção de micrósporos é simultânea, formando, posteriormente, grãos de pólen trinucleados (WEI et al., 2010).

No que se refere ao tamanho dos grãos de pólen das espécies de *Plectranthus* estudadas, embora tenham sido classificados como médios, existe uma faixa de variação (Tabela 1) em que se verifica a presença de grãos de pólen médios e pequenos para as três espécies.

Um dos fatores responsáveis pela variação do tamanho do grão de pólen pode ser o acúmulo de substâncias em seu interior no seu processo de maturação, no qual alterações citoplasmáticas podem ser observadas, como a presença de numerosas vesículas e pequenas partículas, bem como o aumento de gotículas lipídicas e de grãos de amido em número e tamanho (KUANG; MUSGRAVE, 1996).

Também foram encontradas variações no aspecto físico do grão de pólen em *P. barbatus*, os quais ora apresentavam-se intumescidos com colpos salientes, ora menos cheios com colpos não proeminentes. Essas variações no aspecto e no tamanho polínico podem ser advindas de características próprias da espécie ou do seu estágio de maturação. Entretanto, para verificar de fato quais as razões responsáveis por essas diferenças faz-se necessário o uso da microscopia eletrônica de transmissão para investigar, no decorrer do processo de maturação, a ocorrência de acúmulo de substâncias no interior do grão de pólen da espécie.

Essas variações no tamanho do grão de pólen interferem diretamente na determinação do tipo polínico, uma vez que essa classificação é dada pela razão entre eixo polar e diâmetro equatorial do grão de pólen (PUNT et al., 2007). Talvez esse seja um dos motivos pelos quais podem ser encontrados diversos tipos polínicos até mesmo em nível de espécie.

Em Lamiaceae, o tipo de grão de pólen parece não ser constante. Em estudos da morfologia do pólen na tribo Ocimeae (Nepetoideae) relatam-se as mais variadas formas de grãos de pólen, desde oblato até prolato, até mesmo dentro de um mesmo gênero, (HARLEY et al., 1992).

Plectranthus, do mesmo modo, não apresenta um tipo polínico estável no gênero. Saggoo e Bir (1983) encontraram grãos de pólen subprolatos em *Coleus aromaticus* Benth (sinonímia de *P. amboinicus*) e prolatos em *Coleus forskohlli* (sinonímia de *P. barbatus*). No presente estudo, dois tipos de grãos de

pólen foram encontrados: prolato esferoidal em *P. barbatus* e *P. amboinicus* e subprolato em *P. neochilus*.

Assim como em *Plectranthus*, outros gêneros também se caracterizam por incluir espécies com tipos polínicos diversificados. Em *Salvia leucantha*, o polimorfismo dos grãos de pólen abrange os tipos oblato, suboblato, oblato-esferoidal, prolato esferoidal e subprolato, com números de colpos distintos (GUPTA; SHARMA, 1990).

O comprimento dos eixos polares (P) pode gerar informações também para inferências de nível de ploidia. Erdtman (1964) sugere que, em várias taxa, espécies com altos números cromossômicos possuem grãos de pólen proporcionalmente maiores e essa correlação está presente em algumas espécies poliploides quando comparadas com seus respectivos genótipos diploides.

As médias dos tamanhos de grão de pólen para as espécies de *P. amboinicus*, *P. barbatus* e *P. neochilus* do presente trabalho (Tabela1) são similares às encontradas por Reddy (1952) para genótipos diploides ($41,18 \pm 2,01 \mu\text{m}$) de *Coleus blumei*, *Coleus hybridus*, *Coleus laciniatus* e *Coleus forskohlii*. O autor relata que os genótipos triploides e tetraploides dessas espécies apresentaram tamanhos polínicos médios de $43,07 \pm 1,63 \mu\text{m}$, $52,7 \pm 1,53 \mu\text{m}$, respectivamente.

Quanto à ornamentação da exina, o tipo de retículo encontrado para as espécies de *Plectranthus* estudadas está em conformidade com o trabalho de Saggoo e Bir (1983), no qual o aspecto reticulado da exina também foi descrito para algumas das espécies do gênero.

Os dados encontrados no presente trabalho assemelham-se às características palinológicas comuns presentes em outros gêneros da família Lamiaceae, ou seja, retículos rasos e arredondados cercando lumens de tamanho similares. Entretanto, as espécies avaliadas apresentam apenas um retículo diferindo da exina birreticulada, que é a mais facilmente encontrada nas duas

subfamílias: em Lamioideae, o lúmen primário e secundário são frequentemente pequenos e seus muros são, por muitas vezes, dentados por poros, e em Nepertoideae, o lúmen primário é maior que em Lamioideae com muros de face lisa (HARLEY et al., 1992).

Harley et al. (1992) também encontraram exina birreticulada em quase todas as 20 espécies de *Ocimum* (tribo Ocimaeae), gênero no qual *Plectranthus*, no passado, já foi incluído (MORTON, 1962) e em 6 espécies de taxa próximos. O retículo principal dessas espécies é arredondado e, em média, não excede 0,5 μm de espessura e 1 μm de profundidade, delimitando lumens principais de tamanho médio e grande. Os autores descrevem que espécies do gênero *Dauphinea* (tribo Ocimaeae) podem ser as que mais possuem afinidades morfológicas com as espécies do gênero *Plectranthus*, pois apresentam grãos de pólen com contorno polar circular, muros do primeiro retículo arredondados, rasos, formando lumens pequenos e o segundo retículo é perfurado.

O tipo de ornamentação birreticulada também é o mais facilmente encontrado em espécies de *Salvia*, *Hymenocrater*, *Lycopus* e *Oryganum* (Lamiaceae) (AKYALÇIN, 2003; MOON e HONG, 2003; JAFARI e JAFARZADEH, 2008; KAHRAMAN; CELEP; DOGAN, 2010). Özler et al. (2011) descrevem que, em *Salvia*, esses dois retículos da exina podem ser diferenciados, sendo os muros do segundo retículo mais estreitos e seu número de perfurações bastante variável.

Em *Mentha* (Lamiaceae), as paredes da exina são também esculpturadas de forma birreticulada, mas algumas espécies podem apresentar outras ornamentações, tais como reticulada, microrreticulada e perfurada (CELENK et al., 2008; MOON et al., 2008).

Segundo Miranda e Andrade (1990), espécies mais derivadas são aquelas que possuem maior complexidade estrutural da exina, a qual admite o desempenho de estratégias de polinização mais eficientes. Sendo assim,

considerando-se a existência de espécies com grãos de pólen de ornamentação de exina birreticulada em Lamiaceae (HARLEY et al., 1992) e que a ornamentação com apenas um retículo já foi encontrada em palinomorfos de espécies dessa família (MACEDO; SOUZA; BAUERMANN, 2009), infere-se que as espécies de *Plectranthus* estudadas podem estar situadas em um nível evolutivo mais basal por possuírem apenas um retículo.

Além disso, *P. neochilus*, por possuir grãos de pólen com uma fenda central no colpo, pode ser considerada uma espécie de nível evolutivo mais derivado que o de *P. barbatus*, uma vez que, de acordo com Edlund, Swanson e Preuss (2004), ornamentações mais permeáveis permitem que as substâncias do estigma entrem em contato com o grão de pólen mais facilmente, ativando a emissão do tubo polínico.

Já *P. amboinicus* apresenta grãos de pólen com exina rugulada, ou seja, com textura menos complexa, indicando que essa espécie é mais primitiva quando comparada com *P. barbatus* e *P. neochilus*, pois Rudall (1980) considera que a ornamentação menos perfurada é considerada o tipo mais basal, enquanto as mais perfuradas estão presentes nas espécies mais derivadas.

O padrão birreticulado é uma tendência filogenética de Ocimaeae (tribo na qual *Plectranthus* é incluído) (RUDALL, 1980) e o tipo de ornamentação rugulada parece não ser comum em *Plectranthus* e, até mesmo, em Lamiaceae. Sendo assim, faz-se necessária a realização de estudos mais detalhados para o gênero, a fim de se averiguar a veracidade do enquadramento taxonômico de *P. amboinicus*.

5 CONCLUSÕES

O aspecto polínico geral das espécies estudadas indica tratarem-se de exemplares estreitamente relacionados. Contudo, a ornamentação do tipo

rugulada da exina encontrada para *P. amboinicus* é distinta do padrão mais encontrado no gênero (reticulado), o que sugere um novo posicionamento taxonômico, além de indicar que, das três, essa é a evolutivamente mais basal. Também foi verificada variação morfológica intraespecífica para os grãos de pólen de *P. barbatus*.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, pelo auxílio financeiro; à CAPES, pela concessão da bolsa; ao Horto de Plantas Medicinais da UFLA, pelo fornecimento de material botânico e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFLA, pelo apoio nas análises.

REFERÊNCIAS

- AKYALÇIN, H. Pollen morphology of *Origanum* L. (Labiatae) taxons in Turkiye. **Asian Journal os Plant Sciences**, Pakistan, v. 2, n. 1, p. 28-41, Jan. 2003.
- BOCARDI, J. M. B. **Etnofarmacologia das plantas medicinais do céu azul e composição química do óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schltr.** 2008. 101 p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
- BORZOVA, L. A. The question of the origin of the six-grooved type of pollen of the mits. **Doklady Akademii nauk SSSR**, Leningrad, v. 133, p. 1465-1467, 1960.
- CELENK, S. et al. A palynological study of the genus *Mentha* L. (Lamiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 157, n. 1, p. 141–154, May 2008.
- CHENGYIH, W.; HSIWEN, L. On the evolution and distribution in Labiatae. **Acta Botanica Yunnanica**. Kunming, v. 4, n. 2, p. 1-3, 1982.

EDLUND, A. F.; SWANSON, R.; PREUSS, D. Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 1, p. 84–97, Apr. 2004.

ERDTMAN, V. **Pollen morphology and plant taxonomy**: angiosperms. Stockholm: Almqvist & Wilsell, 1952. 539 p.

FAEGRI, K.; INVERSEN, J. **Textbook of modern pollen analysis**. 2th ed. Copenhagen: Scandinavian University Books, 1966.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Pollen aperture evolution: a crucial factor for eudicot success? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 154-158, Mar. 2004.

GUPTA, A.; SHARMA, C. Polymorphism in pollen of *Salvia leucantha* (Lamiaceae). **Grana**, Stockholm, v. 29, n. 4, p. 277–284, 1990.

HARLEY, M. M. et al. Pollen morphological studies in tribe Ocimeae (Nepetoideae: Labiatae): I. Ocimum L. **Grana**, Stockholm, v. 31, n. 3, p. 161-176, 1992.

HARLEY, R. et al. **Lamiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000142>>. Acesso em: 31 maio 2011.

JAFARI, A.; JAFARZADEH, F. Anatomical and pollen ornamentation study on Hymenocrater species in North East of Iran. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Dacca, v. 11, n. 17, p. 2149-2153, Sept. 2008.

KAHRAMAN, A.; CELEP, F.; DOGAN, M. Anatomy, trichome morphology and palynology of *Salvia chrysophylla* Stapf (Lamiaceae). **South African Journal of Botany**, Pretoria, v.76, n. 2, p. 187–195, Apr. 2010.

KAVITHA, C.; RAJAMANI, K.; VADIVEL, E. *Coleus forskohlii*: A comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. **Journal of Medicinal Plants Research**, New York, v. 4, n. 4, p. 278-285, Feb. 2010.

KUANG, A.; MUSGRAVE, M. E. Dynamics of vegetative cytoplasm during generative cell formation and pollen maturation in *Arabidopsis thaliana*. **Protoplasma**, New York, v. 194, n. 1/2, p. 81-90, Mar. 1996.

LORENZI, H.; MATOS, F. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. São Paulo : Instituto Plantarum, 2002.

LUKHOBBA, C. W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 103, n. 1, p. 1–24, Jan. 2006.

MACEDO, R. B.; SOUZA, P. A. DE; BAUERMANN, S. G. Catálogo de pólenes, esporos e demais palinomorfos em sedimentos holocênicos de Santo Antônio da Patrulha, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**: série Botânica, Porto Alegre, v. 64, n. 2, p. 43-78, jul./dez. 2009.

MIRANDA, M. M. B.; ANDRADE, T. A. **Fundamentos de palinologia**. Fortaleza: UFC, 1990. 99 p.

MOON, H. K.; HONG, S. P. Pollen morphology of the genus *Lycopus* (Lamiaceae). **Annales Botanici Fennici**, Helsinki, v. 40, n. 3, p. 191-198, June 2003.

MOON, H. K. et al. Palynological evolutionary trends within the tribe Mentheae with special emphasis on subtribe Menthinae (Nepetoideae: Lamiaceae). **Plant Systematic and Evolution**, v. 275, n. 1/2, p. 93–108, Oct. 2008.

MORTON, J. K. Cytotaxonomic studies on the West African Labiatae. **Journal of the Linnean Society of London: botany**, London, v. 58, n. 372, p. 231–283, July, 1962.

ÖZLER, H. et al. Pollen morphology of the genus *Salvia* L. (Lamiaceae) in Turkey. **Flora**: morphology, distribution, functional ecology of plants, London, v. 206, n. 4, p. 316-327, Apr. 2011.

POZHIDAEV, A. The origin of three and sixcolpate pollen grains in the Lamiaceae. **Grana**, Stockholm, v. 31, n. 1, p. 49-52, 1992.

PUNT, W. et al. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology**, Amsterdam, v. 143, n. 1/2, p. 1-81, 2007.

REDDY, N. S. Chromosome numbers in *Coleus*. **Journal of Heredity**, Washington, v. 43, n. 5, p. 233-237, Sept. 1952.

RESSAYRE, A. et al. Aperture pattern ontogeny in angiosperms. **Journal of experimental zoology**, New York, v. 294, n. 2, p.122–135, Aug. 2002.

RUDALL, P. Pollen morphology in the subtribe Hyptidinae (Labiatae). **Kew Bulletin**, London, v. 35, n. 3, p. 453 - 458, 1980.

SAGGOO, M. I. S.; BIR, S. S. Cytopalynological Studies on Indian Members of Acanthaceae and Labiateae. **Journal of Palynology**, New Delhi, v. 19, n. 1/2, p. 243-277, 1983.

SCHNARF, K. Studien über den Bau der Pollenkörner der Angiospermen. **Planta**, Berlin, v. 27, p. 48-99, 1937.

SHAH, V. et al. The occurrence of forskolin in the Labiatae. **Planta Medica**. Stuttgart, v. 39, n. 2, p. 183–185, 1980.

WEI, Q. I. et al. Microsporogenesis and male gametophyte development in *Coleus blumei* Benth. **Journal of Northeast Agricultural University**, Xiangfang, v. 41, n. 12, 2010.

WUNDERLICH, R. E. Vorschlag zu einer natürlichen Gliederung der Labiaten auf Grund der Pollenkörner, der Samenentwicklung und des reifen Samens. **Osterreichische Botanische Zeitschrift**, Wien, v. 114, p. 383-483, 1967.

ARTIGO 2

**Cariótipo e quantidade de DNA nuclear em espécies de *Plectranthus* L'
Héritier (Lamiaceae)**

RESUMO

Plectranthus é um gênero que compreende espécies de potencial ornamental e medicinal que enfrenta problemas taxonômicos por agregar as espécies antes pertencentes ao gênero *Coleus*, fato que contribuiu para a existência de diversas sinonímias. Nesse contexto, incluem-se *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus grandis* e *Plectranthus neochilus*. Alguns autores consideram *P. barbatus* e *P. grandis* como sinonímias. Existem relatos para espécies desse gênero quanto à variação de número cromossômico. Nesse sentido, este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar genótipos das espécies supracitadas, provenientes de diferentes localidades (Lavras, MG, Campinas, SP e Santa Maria, RS), quanto ao número cromossômico e morfologia cariotípica, correlacionando ao conteúdo de DNA nuclear. As metáfases foram obtidas pela técnica de esmagamento e a coloração dos cromossomos foi feita com orceína 1%. A determinação da quantidade de DNA foi realizada por meio da citometria de fluxo. Não houve variação de número cromossômico entre os genótipos da mesma espécie. *P. amboinicus* foi a única a apresentar $2n=34$, enquanto as demais, $2n=30$. Não foram encontradas diferenças cariotípicas entre os genótipos de cada uma das espécies, exceto para *P. barbatus*. Os genótipos das espécies de *Plectranthus* revelam poucas coincidências entre os pares cromossômicos. O conteúdo de DNA nuclear permitiu agrupar *P. amboinicus* e *P. neochilus* com as maiores médias e *P. grandis* e *P. barbatus* com as menores. Diferenças na quantidade de DNA entre os genótipos foram identificadas apenas para *P. barbatus*. Esses resultados permitem inferir que populações de *P. barbatus* estão em processo ativo de variação cariotípica, expressando a ocorrência de citotipos, sendo *P. grandis* provavelmente um deles.

Palavras-chave: Citotipos. Variação cariotípica. Taxonomia. Teor de DNA.

ABSTRACT

Plectranthus is a genus that group ornamental and medicinal species. It faces taxonomic problems because this genus incorporated the *Coleus* species, which contributed to the existence of several synonyms. In this context, *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus grandis* and *Plectranthus neochilus* were included. Some authors consider *P. grandis* and *P. barbatus* like synonyms. There are chromosome number variation in this genus. Accordingly, the study objective was to compare *Plectranthus* species genotypes from different localities (Lavras-MG, Campinas-SP and Santa Maria-RS), as to chromosome number and karyotype morphology, correlating with nuclear DNA content. The metaphases were obtained by squashing technique and the chromosomes were staining with 1 % orcein. The determination of the amount of DNA was performed by flow cytometry. There was no variation in chromosome number between genotypes of the same specie. *P. amboinicus* was the only species with $2n = 34$, while the others, $2n = 30$. There were no differences on the karyotype among the genotype of each specie, except for *P. barbatus*. The genotypes of the *Plectranthus* species revealed a few similarities between the chromosomal pairs. The DNA content grouped *P. amboinicus* and *P. neochilus* with the highest average, and *P. grandis* and *P. barbatus* with the lowest one. Differences about the DNA content between the genotypes were identified only in *P. barbatus*. These results allow the conclusion that *P. barbatus* is in the karyotype variation ative process expressing the cytotypes occurrence and *P. grandis* is probably one of them.

Keywords: Cytotypes. Karyotype variation. Taxonomy. DNA content.

1 INTRODUÇÃO

Lamiaceae Martinov é uma família que compreende cerca de 250 gêneros e 7.000 espécies (THORNE, 1992) e tem como principal área de ocupação a região do Mediterrâneo e Oriente Médio até a Ásia Central (CHENGYIH; HSIWEN, 1982). No Brasil, 500 espécies de 34 gêneros estão distribuídas em quase toda área territorial (HARLEY et al., 2010).

Plectranthus L'Héritier é um dos gêneros mais comuns dessa família, abrange cerca de 300 espécies (RICHARDSON, 1992) e, em geral, caracteriza-se pela riqueza de espécies de interesse medicinal e ornamental (THOPPIL, 1993).

Em Lamiaceae, *Plectranthus* é um gênero que enfrenta problemas taxonômicos, visto que as espécies que o compõem pertenciam ao gênero *Ocimum* Linn. Entretanto, taxonomistas encontraram características que permitiram a subdivisão deste último gênero em vários outros, dentre eles *Plectranthus* e *Coleus* Lour. Novas classificações foram propostas para as suas respectivas espécies, baseando-se em diferenças morfológicas do estame, posteriormente consideradas características insuficientes para a separação desses taxa. Dessa forma, as espécies de *Coleus* foram agregadas às espécies de *Plectranthus*, fazendo desse agrupamento um único gênero e independente de *Ocimum* (MORTON, 1962).

Em decorrência de tantas divergências taxonômicas, algumas espécies de *Plectranthus* ainda são confundidas como espécies pertencentes ao gênero *Coleus*, fato que contribui para múltiplas classificações destinadas a uma mesma espécie. *P. amboinicus*, por exemplo, pode ser conhecido também por *Coleus amboinicus*, *Coleus aromaticus* Benth. e *Coleus carnosus* Hassk. *P. barbatus* possui como principais sinonímias *Plectranthus grandis* (Cramer) RH Willemse, *Coleus forskohlii* Briq., e *Coleus barbatus* (Andr.) Benth., dentre outras

(LUKHOBÁ; SIMMONDSD; PATON, 2006). Contudo, Lorenzi e Mattos (2002) consideram que *P. barbatus* e *P. grandis* são espécies utilizadas para o mesmo propósito e, por serem muito similares, usualmente são confundidas. A mesma ambiguidade de denominações ocorre para *P. neochilus* que, por vezes, é chamado de *Coleus pentheri* Gurke (LUKHOBÁ; SIMMONDSD; PATON, 2006).

Esse gênero inclui espécies que possuem números cromossômicos diversificados, de $2n=14$ a 84, sendo o mais frequente o de $2n=28$ (MORTON, 1962).

A variação do número cromossômico não apenas é encontrada em nível genérico, mas também em nível intraespecífico. Para *P. amboinicus* já foram encontrados diferentes números cromossômicos, como $2n=32$, 24, 56 (BASAVARAJA; KRISHNAPPA, 1982; SAGGOO; BIR, 1983; THOPPIL, 1993).

P. barbatus também apresenta variação cariotípica, podendo ser encontrados citotipos com 28 a 34 cromossomos (REDDY, 1952; RILEY; HOFF, 1961; SAGGOO; BIR, 1983). Em populações dessa espécie de origens distintas podem ser verificadas variações na morfologia dos cromossomos entre genótipos (SHAH, 1980).

São poucos os trabalhos que envolvem a citogenética de *P. neochilus*. De Wet (1958) e Riley e Hoff (1961) descrevem a espécie com 32 cromossomos.

Essas diferenças citogenéticas entre genótipos da mesma espécie podem refletir no seu comportamento, como a variação da quantidade, a qualidade e o tipo de metabólito secundário produzido pela planta (PIERRE et al., 2011).

A variedade de informações citogenéticas na literatura para espécies do gênero *Plectranthus* sugere a necessidade de melhor investigar o complemento cromossômico dessas espécies para fornecer dados que possam subsidiar novos enquadramentos taxonômicos, além de inferências evolutivas.

A análise cariotípica, envolvendo a avaliação de dados, como número e tamanho dos cromossomos, relação entre braços cromossômicos e presença de constrição secundária ou satélites, pode trazer informações valiosas para comparar espécies ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie (GUERRA et al., 1997).

Nesse sentido, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar e comparar cariotipicamente e quanto ao teor de DNA genótipos provenientes de localidades distintas das espécies *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus grandis* e *Plectranthus neochilus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Estacas de genótipos de *P. amboinicus*, *P. barbatus*, *P. grandis* e *P. neochilus* foram cedidas pelos Hortos de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (Tabela 1), as quais foram transplantadas em vasos contendo substrato. Após o enraizamento, as pontas de raiz foram coletadas e pré-tratadas com solução de 8- hidroxiquiloneína 3mM, por 4 horas, a 4°C e fixadas em Carnoy (3 etanol:1 ácido acético) e armazenadas, a -20°C, por, no mínimo, 24 horas.

Tabela 1 Identificação dos locais de coleta dos genótipos do gênero *Plectranthus*

Espécie	Identificação	Local de coleta
<i>Plectranthus amboinicus</i>	-	UFLA
<i>Plectranthus amboinicus</i>	CPMA 2193	IAC
<i>Plectranthus amboinicus</i>	CPMA 465	IAC
<i>Plectranthus barbatus</i>	-	UFLA
<i>Plectranthus barbatus</i>	-	UFSM
<i>Plectranthus barbatus</i>	CPMA 396	IAC
<i>Plectranthus grandis</i>	CPMA 819	IAC
<i>Plectranthus neochilus</i>	-	UFLA
<i>Plectranthus neochilus</i>	-	UFSM
<i>Plectranthus neochilus</i>	CPMA 1635	IAC

Para o preparo das lâminas, as raízes foram submetidas à digestão da parede celular em solução enzimática (100 U pectinase: 200 U celulase), por 15 minutos, a 37°C. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e os cromossomos corados com orceína acética 1%.

As metáfases selecionadas foram digitalizadas por meio de microscópio de campo claro (Leica DMLS) equipado com microcâmera (Nikon Digital Sight DS-Fi1). As mensurações dos cromossomos foram feitas por meio do software Image Tool 3.0 da UTHSCA (The University of Texas Health Science Center in San Antonio).

Para a construção dos kariogramas e idiogramas, foram utilizadas mensurações dos comprimentos dos braços curto e longo (BC/BL) de cada par cromossômico, obtidas a partir das médias de um mínimo de 4 metáfases mitóticas de cada genótipo. Também foram calculados o comprimento total de cada cromossomo ($C_{ti} = BL + BC$), o comprimento total do lote haploide ($CTLH = \sum C_{ti}$), o comprimento relativo ($CR = C_{ti}/CTLH \times 100$) e o índice centromérico ($IC = [BC/(BC+BL)] \times 100$).

Os dados de comprimento relativo dos pares cromossômicos de *P. grandis* e dos genótipos de *P. barbatus* foram submetidos ao teste de média LSD, a 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico SAS.

A classificação morfológica dos cromossomos foi baseada na posição do centrômero, dado obtido por meio da relação de braços ($RB = BL / BC$), como proposto por Levan, Fredga e Souberg (1964).

A assimetria cariotípica foi avaliada de acordo com os métodos propostos por Stebbins (1958) para determinar as categorias e também pelos critérios de Zarco (1986) e de Paszko (2006), por meio das seguintes fórmulas:

$$A_1 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n \frac{b_i}{B_i}}{n} \qquad A_2 = \frac{s}{\bar{x}}$$

em que A_1 = assimetria intracromossômica que varia entre 0 e 1 e não depende do número e do tamanho do cromossomo; A_2 = assimetria intercromossômica, que não depende do número cromossômico e não tem unidade de medida (ZARCO, 1986).

$$IA = \frac{CV_{CL} \times CV_{CI}}{100} \quad CV_{CL} = A_2 \times 100 = \frac{s_{CL}}{\bar{x}_{CL}} \times 100 \quad CV_{CI} = \frac{s_{CI}}{\bar{x}_{CI}} \times 100$$

em que IA = índice de assimetria; CV_{CL} = coeficiente de variação dos comprimentos totais dos cromossomos; CV_{CI} = coeficiente de variação dos índices centroméricos; s_{CL} = desvio padrão dos comprimentos totais dos cromossomos; \bar{x}_{CL} = média dos comprimentos totais dos cromossomos; s_{CI} = desvio padrão dos índices centroméricos; \bar{x}_{CI} = média dos índices centroméricos (PASZKO, 2006).

Para a determinação do conteúdo de DNA foram avaliadas três amostras por indivíduo proveniente das diferentes localidades. Em cada amostra, foram utilizados segmentos de folhas jovens e frescas com aproximadamente 20 mg das espécies de *Plectranthus*, juntamente com a mesma quantidade de folhas de

Pisum sativum (padrão interno de referência). Os núcleos foram liberados por meio de dissociação do material vegetal em placa de Petri contendo 1 ml de tampão Marie e Brown (1993) gelado. A suspensão de núcleos foi filtrada através de um tubo provido de malha de náilon de 50 µm, coradas com 25 µL de iodeto de propídeo (1 mg/ mL) acrescentando-se, em seguida, 5 µL de RNase do tipo I e, finalmente, armazenadas em tubos de poliestireno no escuro e refrigeradas até o momento da análise. Para cada amostra, o mínimo de 10.000 núcleos foi analisado por meio de um citômetro de fluxo (FacsCalibur- Becton Dickinson) e os histogramas foram obtidos pelo software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.8 (2009).

A estimativa do conteúdo de DNA foi realizada por meio de comparação com a posição do pico G1 do padrão, a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Amostra (2C)} = \frac{\text{Valor observado no canal do pico da espécie}}{\text{Valor observado no canal do pico padrão}} \times 9,09 \text{ pg}$$

Os dados de teor de DNA foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas com auxílio do programa estatístico SAS, utilizando-se o teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para comparar os genótipos e as espécies.

3 RESULTADOS

Não houve variação quanto ao número de cromossomos entre os genótipos das espécies de *Plectranthus*. O número somático de cromossomos foi comum (2n=30), exceto para *P. amboinicus*, a qual possui 2n=34 cromossomos (Figura 1).

Foi possível observar diferenças na morfologia cromossômica entre os cariótipos das espécies. *P. amboinicus* tem como fórmula cariotípica 13m+4sm,

P. grandis 7m+8sm e *P. neochilus* 9m+6sm (Figura 2, Tabela 2). Apenas os genótipos de *P. barbatus* apresentaram variação intraespecífica: 8m+7sm, 9m+6m e 10m+5sm referentes, respectivamente, aos indivíduos provenientes das regiões de Lavras, MG, Campinas, SP e Santa Maria, RS (Figura 3, Tabela 2).

A posição do centrômero entre as quatro espécies foi coincidente apenas nos pares 6 e 15, sendo esses classificados como metacêntricos (Tabela 2).

Para os genótipos de *P. barbatus* também foi constatada pouca similaridade cariotípica. Apenas os pares 4, 5, 6 e 15 possuem cromossomos com classificação coincidente e esses mesmos pares também são coincidentes em *P. grandis*. Essa espécie que apresentou maior semelhança cariotípica com o genótipo de *P. barbatus* (Santa Maria), apenas nos pares 3, 8 e 10 foram detectadas variações morfológicas (Tabelas 2).

Os contrastes realizados por meio do teste estatístico LSD entre os genótipos mostraram que *P. barbatus* (Campinas) difere estatisticamente de *P. grandis* quanto aos pares 2 e 12. O par 2 apresenta comprimento relativo com médias de 8,78 e 8,10, e o par 12, 5,45 e 5,92, para *P. barbatus* e *P. grandis*, respectivamente. O par 8 diferiu entre os genótipos de *P. barbatus* provenientes de Lavras e Santa Maria com respectivas médias de 6,68 e 6,93 (Tabelas 3 e 4). Os demais pares não apresentaram diferenças significativas para essa variável entre os genótipos das espécies.

De acordo com Stebbins (1958), *P. amboinicus* e *P. barbatus* (Campinas e Santa Maria) possuem cariótipos incluídos na categoria 3b. Já os cariótipos de *P. neochilus*, *P. grandis* e *P. barbatus* (Lavras) foram incluídos na categoria 3a.

As espécies de *Plectranthus* estudadas possuem índices de assimetria cariotípica próximos tanto pelo método proposto por Zarco (1986) quanto por Paszko (2006) (Figuras 4 e 5, Tabela 5).

P. amboinicus possui a maior diferença quanto ao tamanho total dos cromossomos, além do maior índice de assimetria proposto por Paszko (2006). *P. neochilus* possui um dos menores valores tanto para assimetria intracromossômica quanto intercromossômica propostos por Zarco (1986) e também o menor valor de índice de assimetria de Paszko (2006) (Tabela 5).

Com relação à quantidade de DNA dos genótipos de *Plectranthus* avaliados, dois agrupamentos foram identificados (Tabela 6). *P. amboinicus* e *P. neochilus* com as maiores médias (Figura 6A e 6C) e *P. grandis* e *P. barbatus* com as menores (Figura 6B e 6D, E e F).

Os genótipos de *P. barbatus* foram os únicos que apresentaram variação na quantidade de DNA, sendo as plantas provenientes de Lavras e Campinas com as menores médias separadas do grupo das plantas provenientes de Santa Maria, as quais apresentaram as maiores quantidades de DNA (Figura 6D, E e F) (Tabela 6).

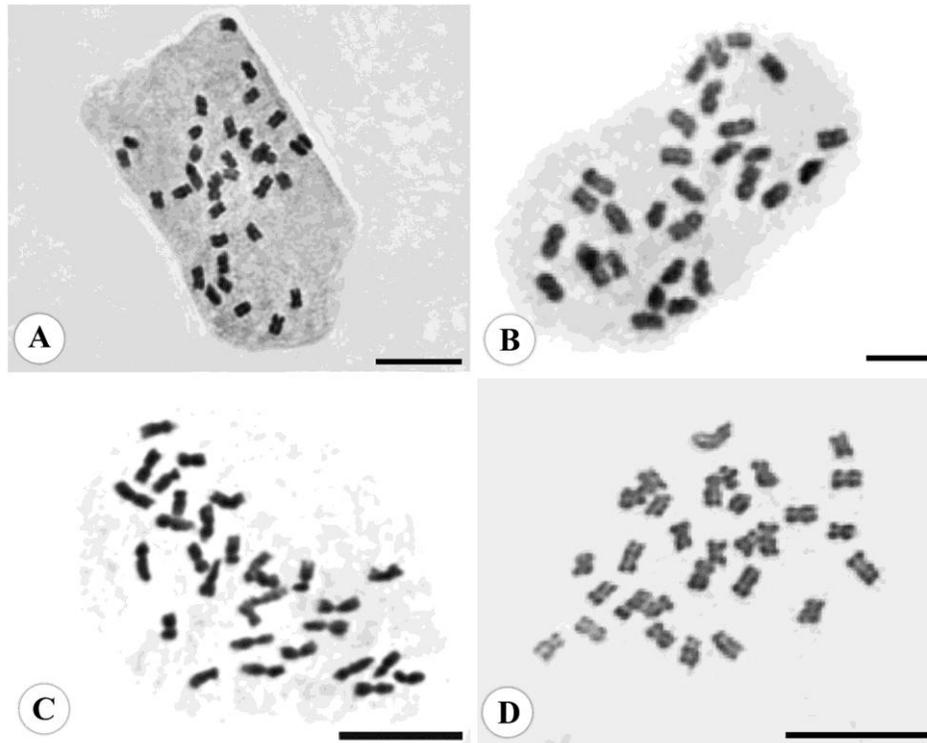


Figura 1 Metáfases mitóticas de *Plectranthus*: *P. amboinicus* $2n=34$ (A); *P. barbatus* $2n=30$ (B); *P. grandis* $2n=30$ (C); *P. neochilus* $2n=30$ (D). Barra = 10 μm

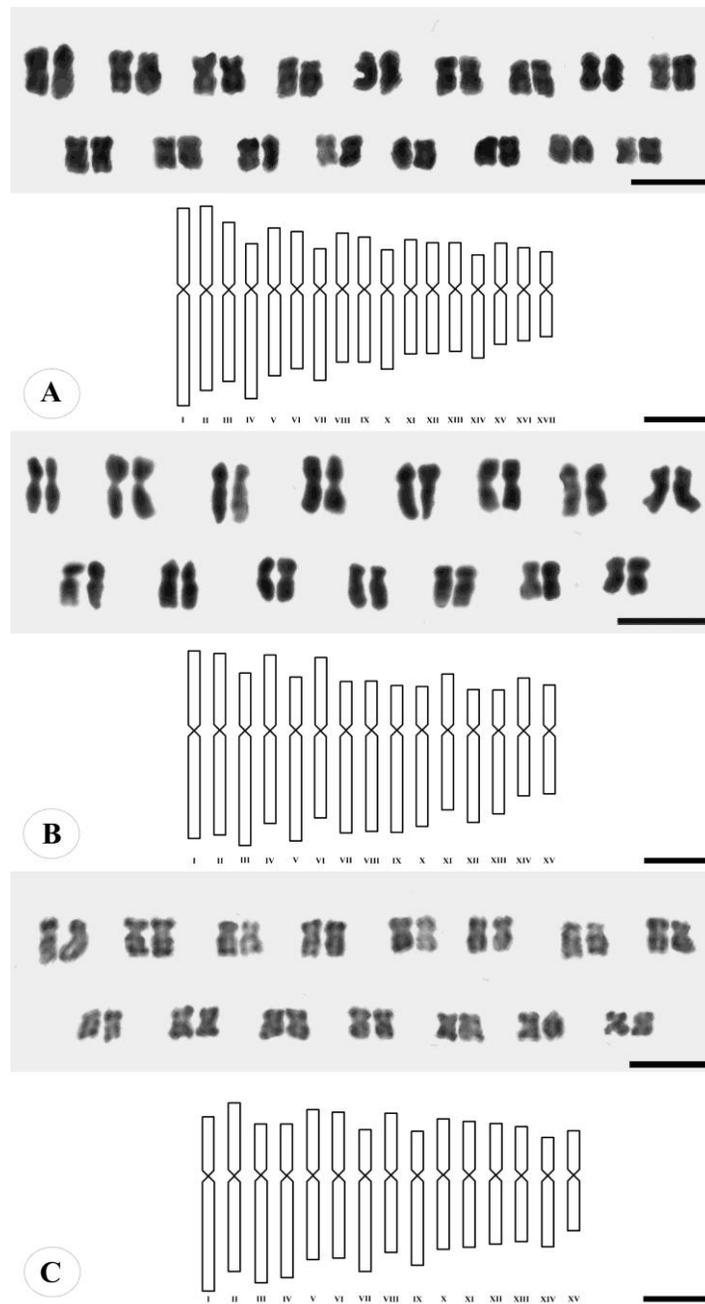


Figura 2 Cariogramas e idiogramas para as espécies *P. amboinicus* (A), *P. grandis* (B) e *P. neochilus* (C). Barra = 5 μm para os kariogramas e 1 μm para os idiogramas

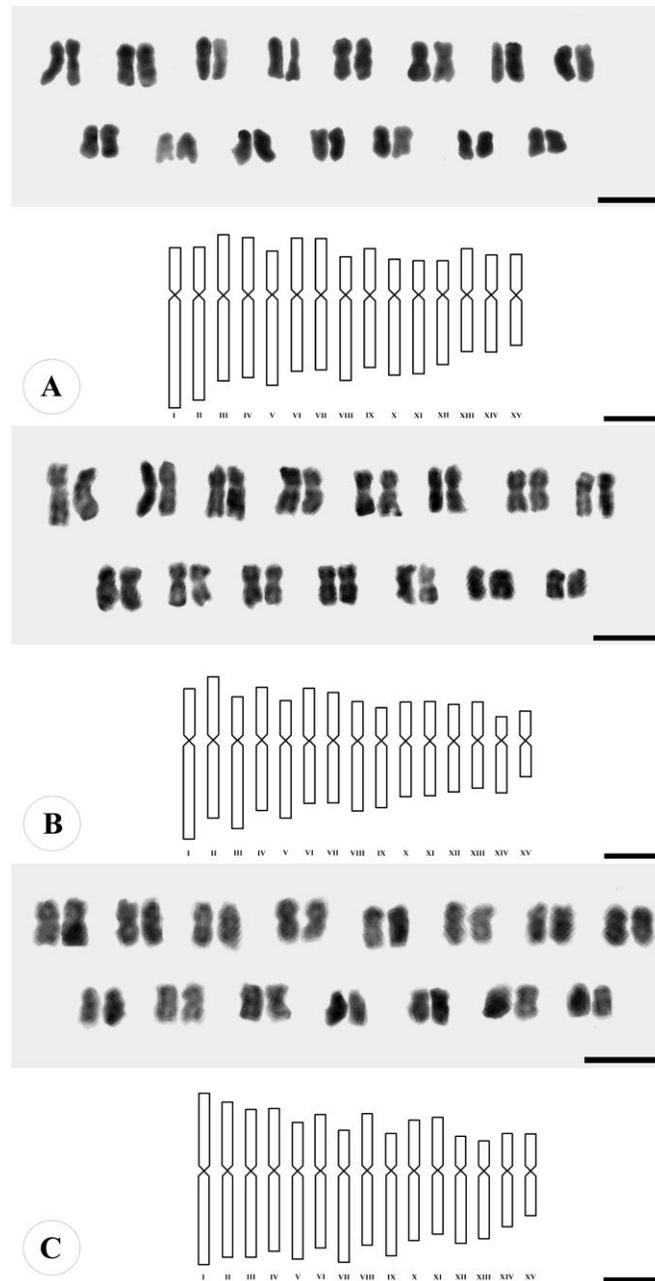


Figura 3 Cariogramas e idiogramas para as espécies *P. barbatus* provenientes das regiões de Lavras (A), Campinas (B) e Santa Maria (C). Barra = 5 μm para os cariogramas e 1 μm para os idiogramas

Tabela 2 Dados de relação de braço e tipo cromossômico em espécies de *Plectranthus* spp.; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico

Par	Relação de braços (tipo cromossômico)								
	<i>P. amboinicus</i>	<i>P. barbatus</i>						<i>P. grandis</i>	<i>P. neochilus</i>
		UFLA		IAC		UFSM			
1	1,43 (m)	2,35 (sm)	1,88 (sm)	1,21 (m)	1,34 (m)	1,79 (sm)			
2	1,21 (m)	2,15 (sm)	1,18 (m)	1,25 (m)	1,34 (m)	1,17 (m)			
3	1,37 (m)	1,42 (m)	1,98 (sm)	1,38 (m)	1,96 (sm)	2,00 (sm)			
4	2,35 (sm)	1,44 (m)	1,29 (m)	1,28 (m)	1,20 (m)	2,13 (sm)			
5	1,39 (m)	2,07 (sm)	1,88 (sm)	1,79 (sm)	2,02 (sm)	1,13 (m)			
6	1,36 (m)	1,32 (m)	1,17 (m)	1,37 (m)	1,18 (m)	1,19 (m)			
7	2,19 (sm)	1,32 (m)	1,30 (m)	2,23 (sm)	2,07 (sm)	1,92 (sm)			
8	1,27 (m)	2,22 (sm)	1,79 (sm)	1,30 (m)	1,98 (sm)	1,11 (m)			
9	1,38 (m)	1,53 (m)	1,97 (sm)	2,22 (sm)	2,27 (sm)	1,81 (sm)			
10	1,99 (sm)	2,19 (sm)	1,40 (m)	1,35 (m)	2,15 (sm)	1,25 (m)			
11	1,29 (m)	2,25 (sm)	1,38 (m)	1,17 (m)	1,37 (m)	1,26 (m)			
12	1,36 (m)	2,01 (sm)	1,41 (m)	2,06 (sm)	2,20 (sm)	1,39 (m)			
13	1,29 (m)	1,20 (m)	1,21 (m)	2,27 (sm)	2,04 (sm)	1,43 (m)			
14	1,97 (sm)	1,43 (m)	2,11 (sm)	1,47 (m)	1,21 (m)	1,84 (sm)			
15	1,17 (m)	1,24 (m)	1,20 (m)	1,21 (m)	1,35 (m)	1,25 (m)			
16	1,18 (m)								
17	1,24 (m)								

Tabela 3 Dados de comprimento total, em μm e comprimento relativo, em porcentagem de espécies de *Plectranthus* spp

Par	Comprimento total (comprimento relativo %)											
	<i>P. amboinicus</i>		<i>P. barbatus</i>						<i>P. grandis</i>		<i>P. neochilus</i>	
			UFLA		IAC		UFMS					
1	3,04	(8,89)	2,99	(8,56)	3,57	(9,42)	2,93	(9,09)	2,95	(8,37)	2,82	(8,55)
2	2,87	(8,38)	2,87	(8,22)	3,33	(8,78)	2,63	(8,15)	2,85	(8,10)	2,75	(8,33)
3	2,49	(7,26)	2,75	(7,87)	3,09	(8,15)	2,52	(7,82)	2,72	(7,72)	2,55	(7,75)
4	2,42	(7,06)	2,60	(7,44)	2,94	(7,75)	2,43	(7,55)	2,65	(7,52)	2,42	(7,34)
5	2,31	(6,73)	2,52	(7,20)	2,80	(7,38)	2,34	(7,26)	2,58	(7,32)	2,41	(7,31)
6	2,13	(6,23)	2,51	(7,17)	2,72	(7,17)	2,27	(7,03)	2,50	(7,09)	2,36	(7,15)
7	2,05	(5,98)	2,44	(6,97)	2,61	(6,89)	2,26	(7,00)	2,37	(6,72)	2,30	(6,97)
8	2,02	(5,90)	2,34	(6,68)	2,59	(6,83)	2,23	(6,93)	2,36	(6,69)	2,25	(6,82)
9	1,94	(5,68)	2,23	(6,37)	2,35	(6,20)	2,10	(6,50)	2,31	(6,57)	2,14	(6,48)
10	1,86	(5,42)	2,18	(6,23)	2,25	(5,95)	2,06	(6,39)	2,18	(6,19)	2,04	(6,19)
11	1,78	(5,20)	2,11	(6,02)	2,23	(5,87)	2,00	(6,21)	2,14	(6,09)	1,97	(5,97)
12	1,72	(5,02)	1,95	(5,58)	2,07	(5,45)	1,84	(5,71)	2,09	(5,92)	1,89	(5,72)
13	1,68	(4,90)	1,94	(5,56)	2,03	(5,35)	1,66	(5,15)	1,95	(5,52)	1,78	(5,39)
14	1,61	(4,70)	1,83	(5,23)	1,78	(4,71)	1,57	(4,88)	1,86	(5,29)	1,74	(5,26)
15	1,57	(4,59)	1,71	(4,89)	1,56	(4,10)	1,40	(4,34)	1,72	(4,89)	1,57	(4,76)
16	1,45	(4,22)										
17	1,32	(3,85)										

Tabela 4 Comparação entre *P. grandis* e genótipos de *P. barbatus* para os comprimentos relativos dos pares cromossômicos 2, 8 e 12, utilizando o teste de LSD

	<i>P. barbatus</i> (UFLA)	<i>P. barbatus</i> (IAC)	<i>P. barbatus</i> (UFSM)	<i>P. grandis</i> (IAC)
<i>P. barbatus</i> (UFLA)	-	ABC	AbC	ABC
<i>P. barbatus</i> (IAC)	ABC	-	ABC	aBc
<i>P. barbatus</i> (UFSM)	AbC	ABC	-	ABC
<i>P. grandis</i> (IAB)	ABC	aBc	ABC	-

* Letras minúsculas indicam médias estatisticamente diferentes. Par cromossômico 2 (A). Par cromossômico 8 (B). Par cromossômico 12 (C)

Tabela 5 Valores de índices de assimetria cariotípica calculados com base nas médias dos dados obtidos para os genótipos das diferentes localidades; A₁ índice de assimetria intracromossômica e A₂ índice de assimetria intercromossômica (ZARCO, 1986); IA = índice de assimetria (PASZKO, 2006)

	Índices de assimetria					
	<i>P.</i> <i>amboinicus</i>	<i>P. barbatus</i>			<i>P.</i> <i>grandis</i>	<i>P.</i> <i>neochilus</i>
	UFLA	IAC	UFSM			
A1	0,29	0,39	0,32	0,32	0,38	0,33
A2	0,23	0,17	0,22	0,19	0,15	0,16
IA	3,09	2,60	2,93	2,82	2,48	2,06

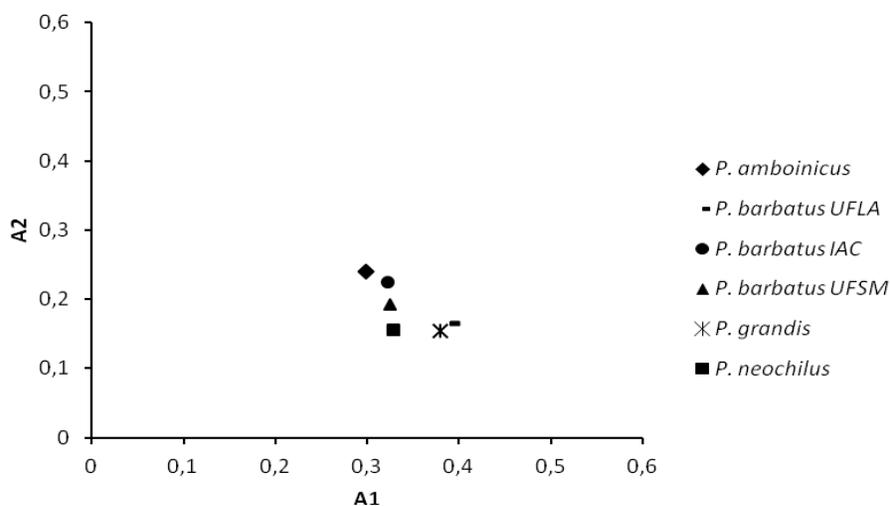


Figura 4 Diagrama de dispersão mostrando a assimetria cariotípica das espécies de *P. amboinicus*, *P. barbatus* das diferentes localidades, *P. grandis* e *P. neochilus*, segundo Zarco (1986). A1 = assimetria intracromossômica, A2 = assimetria intercromossômica

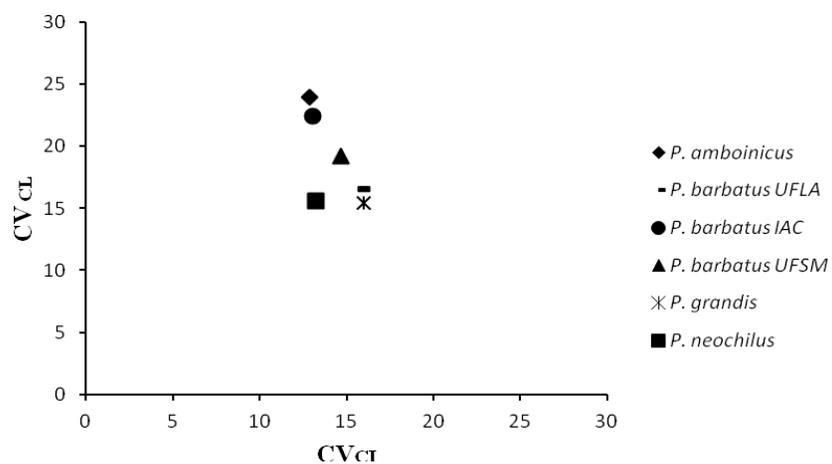


Figura 5 Diagrama de dispersão mostrando a assimetria cariotípica das espécies de *P. amboinicus*, *P. barbatus* das diferentes localidades, *P. grandis* e *P. neochilus*, segundo Paszko (2006). CV_{ci} = coeficiente de variação dos índices centroméricos, CV_{cl} = coeficiente de variação do tamanho total dos cromossomos

Tabela 6 Médias da quantidade 2C de DNA e coeficiente de variação obtidos por meio da técnica de citometria de fluxo para as espécies de *P.amboinicus*, *P. barbatus*, *P. grandis* e *P. neochilus* provenientes das diferentes localidades

Espécie/ genótipo	DNA (pg)¹	CV (%)
<i>P. amboinicus</i> (UFLA)	5,98 a	0,79
<i>P. amboinicus</i> (IAC 465)	5,79 a	0,72
<i>P. amboinicus</i> (IAC 2193)	5,81 a	0,57
Média	5,86 a	
<i>P. barbatus</i> (UFLA)	5,20 a	0,57
<i>P. barbatus</i> (IAC)	5,17 a	0,70
<i>P. barbatus</i> (UFSM)	5,69 b	0,57
Média	5,35 b	
<i>P. grandis</i>	5,23 b	0,64
<i>P. neochilus</i> (UFLA)	5,99 a	0,56
<i>P. neochilus</i> (IAC)	5,94 a	0,54
<i>P. neochilus</i> (UFSM)	6,00 a	0,55
Média	5,98 a	

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

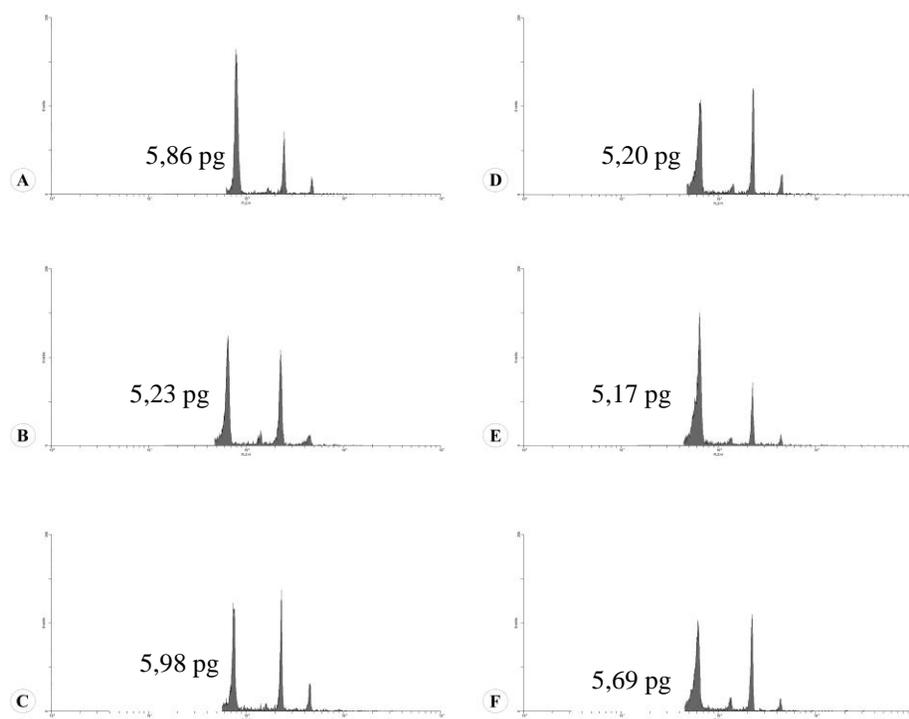


Figura 6 Histogramas de citometria de fluxo em núcleos de *P. amboinicus* (A); *P. grandis* (B); *P. neochilus* (C); *P. barbatus* (D a F) provenientes da UFLA (D), IAC (E) e UFSM (F). O primeiro pico em cada histograma é referente ao pico G1 de cada uma das espécies de *Plectranthus* e o segundo pico G1 é da amostra de referência (*Pisum sativum*). Eixo das abscissas representa a quantidade de DNA e o das ordenadas, o número de núcleos

4 DISCUSSÃO

As espécies de *Plectranthus* avaliadas no presente trabalho apresentaram pouca variação quanto ao número cromossômico. Das quatro espécies avaliadas, apenas *P. amboinicus* apresentou $2n=34$, enquanto as demais, $2n=30$ (Figura 1A). Números cromossômicos distintos para *P. amboinicus* já foram descritos ($2n=32, 34, 48, e 52$) com trabalhos que tratavam a espécie com diferentes

sinonímias, *Coleus amboinicus*, *Coleus aromaticus* Benth. e *Coleus carnosus* Hassk. (SCHEEL, 1931; MORTON, 1962; BASAVARAJA; KRISHNAPPA, 1982; SAGGOO; BIR, 1983).

Thoppil (1993), estudando a sinonímia *Coleus aromaticus* Benth, encontrou $2n=32$ como número cromossômico mais comum e $2n= 16, 24, 30, 34$ e 48 como variantes somáticos em plantas do sul da Índia. O autor ainda relata que, para indivíduos com $2n=32$, os comprimentos relativos do maior e menor cromossomo são de 8,19 e 4,37, respectivamente. Apesar de o número cromossômico mais comum se diferenciar do encontrado neste trabalho, os valores dos comprimentos relativos aqui descritos são semelhantes aos encontrados por Thoppil (1993) (Tabela 2), sugerindo a ocorrência de rearranjos nos cromossomos intermediários do tipo quebra ou fusão.

Em *P. neochilus* foram encontrados 30 cromossomos (Figura 1C), cuja fórmula cariotípica é $9m+6sm$ (Figura 2C) e a morfologia dos pares cromossômicos não apresentou alteração entre os genótipos das diferentes localidades (Tabela 5). Relatos cariotípicos para essa espécie são bastante escassos na literatura, contudo, De Wet (1958) e Riley e Hoff (1961), utilizando a sinonímia *Coleus pentheri* Gurke., descreveram 32 cromossomos para plantas de procedências do Oeste e Sul da África, mas não foram apresentados dados morfológicos dos cromossomos para a espécie.

Todos os genótipos avaliados de *P. barbatus* também possuem 30 cromossomos (Figura 1D, E e F) corroborando dados já descritos por outros autores (CHERIAN; KURIACHAN, 1981; GOLDBLAT, 1981; SAGGOO; BIR, 1983; BAHL; TYAGI, 1988; THOPPIL, 1993). Variações no número cromossômico também foram relatadas para a espécie ($2n=28$ a 34) (REDDY, 1951; RILEY; HOFF, 1961; SAGGOO; BIR, 1983); na maioria dos trabalhos de caracterização citogenética de *P. barbatus*, os autores utilizam as mais variadas sinonímias para se referir à espécie.

Entre os genótipos de *P. barbatus*, a classificação da posição do centrômero dos cromossomos se manteve apenas nos pares 4, 5, 6 e 15, sendo esses mesmos pares coincidentes em *P. grandis*. Os respectivos comprimentos relativos desses pares nas duas espécies apresentaram valores estatisticamente semelhantes. Desses pares cromossômicos, o sexto mostrou ser o mais conservado, por possuir os comprimentos relativos próximos entre os genótipos da espécie e também com *P. grandis* (Tabela 3 e 4).

As diferenças estatísticas observadas para os pares 2, 8 e 12, para *P. barbatus* e *grandis*, sugerem a ocorrência de rearranjos cromossômicos, visto que alguns desses pares, além de apresentar variação no comprimento relativo, também apresentam alteração na posição do centrômero. Dessa forma, os cromossomos dos pares 8 e 12 classificados como submetacêntricos podem ter sofrido alterações do tipo deficiência em um dos braços cromossômicos dando origem ao metacêntrico ou duplicações em um dos braços desses cromossomos podem ter gerado o submetacêntrico. As diferenças constatadas no par 2 para *P. barbatus* (Campinas) e *P. grandis* não expressaram variações na posição do centrômero, o que sugere eventos de duplicação/deficiência em ambos os braços cromossômicos.

A possibilidade de ocorrência de rearranjos é reforçada pelas análises realizadas por Thoppil (1993) em *P. barbatus* em exemplares com $2n=28$, cujo comprimento relativo para o maior par cromossômico é de 10,3 e o menor 4,84. Comparando-se esses dados com os obtidos neste trabalho é possível que tenha ocorrido algum rearranjo do tipo quebra cromossômica que envolve o primeiro par, pois, além de se tratar de um aumento de um par cromossômico ($2n=28$ para $2n=30$), os valores de comprimento relativo para o primeiro par dos três genótipos aqui descritos são inferiores ao encontrado pelo autor (Tabela 3).

Outros valores de comprimento relativo para os pares cromossômicos maior e menor, 9,77 e 2,91, respectivamente, foram encontrados por Bahl et al.

(1988) em cromossomos paquitênicos de *C. forskholii* com $2n=30$ (sinonímia de *P. barbatus*). O resultado para o menor par também demonstra possibilidades de rearranjos cromossômicos, já que expressa pouco mais da metade da contribuição do menor par dos genótipos de *P. barbatus* avaliados no presente trabalho.

Bahl e Tyagi (1988) encontraram características para *P. barbatus* até então não relatadas por outros autores. Para essa espécie, a relação de braços varia de 0,09 a 0,9, o que indica presença de cromossomos acrocêntricos até metacêntricos. Além disso, identificaram satélites nos cromossomos 9 e 13, que foram localizadas pela presença de braço curto totalmente heterocromatinizado e, durante a meiose, esses cromossomos estão associados à região organizadora de nucléolo.

A variedade de resultados que caracteriza *P. barbatus* demonstra instabilidade cariotípica entre genótipos. Essas variações podem ser consequência das diferentes pressões exercidas pelos diferentes ambientes. Esses resultados corroboram com Shah (1980), que avaliou populações de origens geográficas distintas e foi identificada variação na morfologia cromossômica entre genótipos dessa espécie. Variações no complemento cromossômico podem levar ao aparecimento de citotipos, ou quimiotipos, como observado por Pierre et al., (2011) em *Lippia Alba* (Verbenaceae). Exemplos dessa espécie revelaram variações genética e citogenética entre os quimiotipos coletados em diferentes estados brasileiros (Rio de Janeiro, Ceará e São Paulo). Os autores revelaram a existência de números cromossômicos distintos ($2n=30$ ou $2n=60$) e sugerem que essas alterações estão relacionadas com eventos de poliploidia. Os quimiotipos também mostram diferenças na quantidade de DNA nuclear, bem como variação no número de marcadores genéticos como consequência da mixoploidia.

P. grandis também possui 30 cromossomos (Figura 1B), com proporção semelhante entre cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (7m+8sm)

(Figura 2B). A morfologia dos cromossomos de *P. grandis* possui mais similaridades cariotípicas com o genótipo de *P. barbatus* (Santa Maria), diferindo na classificação da morfologia cromossômica apenas nos pares três, oito e dez (Tabelas 3 e 4).

O fato de os genótipos de *P. barbatus* apresentarem fórmulas cariotípicas variadas dificulta o reconhecimento de *P. grandis* como uma espécie distinta, pois não foi possível realizar agrupamentos que pudessem representar uma espécie constante. Dessa forma, a espécie aqui chamada de *P. grandis* poderia ser considerada um citotipo de *P. barbatus*.

O conteúdo de DNA nuclear apresentou as maiores médias entre *P. amboinicus* e *P. neochilus* (Figura 6A e 6C, Tabela 6), diferindo estatisticamente de *P. grandis* e *P. barbatus* com os menores valores (Figura 6B e de 6D a 6F, Tabela 6). O fato de *P. barbatus* e *P. grandis* terem ficado no mesmo agrupamento também reforça a hipótese, anteriormente discutida, a respeito da existência de citotipos.

Esses mesmos agrupamentos foram encontrados por Bandeira et al. (2010) por meio de análises de marcadores moleculares (RAPD). Os autores relataram que as maiores similaridades estão entre acessos de *P. neochilus* e de *P. amboinicus* (80%), seguidos por *P. grandis* e *P. barbatus* (77%) e que existe polimorfismo entre populações de *P. barbatus* provenientes de diferentes localidades.

Resultados semelhantes foram encontrados por Passinho et al. (1999), que avaliaram diferentes populações de espécies classificadas como *P. barbatus* e *P. grandis* por meio de AFLP, demonstrando variação genética intra e interpopulacional, ou seja, as análises cariotípicas não são as únicas que indicam que *P. barbatus* e *P. grandis* não possuem diferenças o suficiente para serem consideradas espécies distintas.

Dentre os genótipos de uma mesma espécie, os de *P. barbatus* foram os únicos a apresentar variação intraespecífica na quantidade de DNA, sendo as plantas provenientes de Lavras e Campinas estatisticamente semelhantes e diferentes das provenientes de Santa Maria, as quais, juntamente com *P. grandis*, possuem as maiores médias (Figura 6D a 6F) (Tabela 6).

Os mecanismos que alteram a quantidade de DNA nuclear podem estar relacionados com ocorrência de permuta desigual (SMITH, 1976), erros na replicação do DNA (KUNKEL, 1990) e poliploidização (SOLTIS; SOLTIS, 1999). No entanto, as diferenças de teor de DNA em espécies de plantas têm sido mais relacionadas com a proliferação de elementos transponíveis que podem alcançar números de cópias surpreendentemente altos (PIEGU et al., 2006). Nos casos de espécies de grandes genomas, já foi relatado um aumento de 50% ou mais da quantidade de DNA (BENNETZEN, 2000).

Para as espécies de *Plectranthus* avaliadas neste trabalho, não é possível localizar pontualmente quais eventos genéticos e/ou citogenéticos podem ter ocorrido, sendo necessários, para isso, estudos que envolvam bandeamentos cromossômicos e citogenética molecular.

As diferenças no número de cromossomos e na morfologia cromossômica entre espécies e genótipos podem ser mais bem representadas quando são comparados os comprimentos dos cromossomos, bem como a posição do centrômero, pois são fontes de variação que interferem diretamente na assimetria cariotípica.

No caso de *P. amboinicus* e de dois genótipos de *P. barbatus* (Campinas e Santa Maria), seus cariótipos foram incluídos na categoria 3b de Stebbins (1958). Essa categoria caracteriza-se por apresentar de 51% a 99% dos cromossomos com razão de braços (BL/BC) menor que 2:1 e a razão entre o maior e menor cromossomo (CT_{i1}/CT_{i5}) entre 2:1 e 4:1. Já os cariótipos de *P. neochilus*, *P. grandis* e *P. barbatus* (Lavras) foram incluídos na categoria 3a, a

qual se diferencia da anterior apenas por representar cariótipo mais simétrico que os da categoria anterior, devido à razão entre o maior e o menor cromossomo (CT_{i_1}/CT_{i_5}) ser menor que 2.

De acordo com Stebbins (1958), a simetria cariotípica é caracterizada pela predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos aproximadamente do mesmo tamanho e, apesar de *P. amboinicus* estar incluído em uma categoria mais assimétrica, em relação às encontradas para as espécies estudadas, agrupa o maior número de cromossomos metacêntricos (Tabela 2), o que, segundo o autor, teria o cariótipo menos assimétrico. Mas, essa espécie apresenta a maior proporção entre o menor e maior cromossomo, sendo, assim, mais assimétrica intercromossomicamente e, de acordo com Paszko (2006), esse critério revela melhor os níveis de heterogeneidade cariotípica.

As classificações propostas por Stebbins (1958), ainda assim, são de grande importância por expressar a morfologia dos cromossomos qualitativamente. Essa metodologia tem sido criticada por Zarco (1986) e Paszko (2006), por se tratar de categorias em que nem sempre é possível detectar pequenas diferenças cariotípicas entre espécies intimamente relacionadas.

Dessa forma, foram calculados os índices de assimetria que foram propostos por Zarco (1986), bem como os propostos por Paszko (2006). Os resultados obtidos por ambas as metodologias foram semelhantes, visto que as espécies apresentaram tendências de assimetrias bastante similares (Figura 4 e 5). Os índices propostos por Zarco (1986) foram criticados por Paszko (2006) pelo fato de a assimetria intracromossômica não ser adequada para expressar a variação cariotípica do complemento cromossômico. O autor propõe, então, um novo método para avaliar a assimetria cariotípica por meio de dois parâmetros: o índice de assimetria (IA), que foi desenvolvido a fim de oferecer um valor único que avalia a assimetria cariotípica e tem como vantagem o alto grau de precisão e sensibilidade para avaliar a assimetria.

Das espécies de *Plectranthus* aqui descritas, *P. amboinicus* apresentou o cariótipo mais assimétrico, pois foi a que representou o valor mais elevado para o IA (Tabela 2) e, de acordo com Paszko (2006), valores altos para esse índice são indicativos de maiores níveis de heterogeneidade cariotípica.

Já *P. neochilus* pode ser considerada a espécie com menor assimetria em relação às demais espécies, tanto do ponto de vista intracromossômico como intercromossômico, por apresentar os menores coeficientes de variação de índice centromérico e de comprimento total do cromossomo (Figuras 4 e 5), dados que consequentemente geram um valor inferior de IA (Tabela 5).

Nota-se que *P. amboinicus* e *P. neochilus* são as espécies mais distantes em termos de assimetria cariotípica. Provavelmente, são espécies que sofreram rearranjos estruturais no cariótipo sem grandes perdas ou ganhos de sequências de DNA, pois ambas possuem quantidades de DNA nuclear estatisticamente semelhantes.

Ainda que o diagrama de dispersão indique pequenas variações para cada uma das espécies, as espécies de *Plectranthus* estudadas são estreitamente relacionadas, visto pelas variações gradativas nos valores de IA (Tabela 5).

A ausência de cromossomos telocêntricos e acrocêntricos nos cariótipos das espécies de *Plectranthus* aqui descritas confere cariotipicamente uma posição menos derivada dentre as angiospermas, pois, de acordo com Stebbins (1958), cariótipos com maior número de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos são considerados os menos assimétricos e o aumento da assimetria ocorre por meio de rearranjos do tipo inversões pericêntricas, translocações desiguais nos braços cromossômicos convertendo cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos em telocêntricos ou acrocêntricos, característicos das espécies mais derivadas.

De acordo com Thoppil (1993), em Lamiaceae, *Plectranthus* e *Coleus* estão dentre os grupos em que variação cariotípica está relacionada também com

eventos de poliploidia, o que, segundo Stebbins (1950), também indica uma posição evolutiva mais ancestral.

A presença de cromossomos submetacêntricos é relatada como comum em Lamiaceae que, por consequência, em diversos taxa da família, é possível observar grande variedade de espécies com cariótipos nos quais se detectam baixos índices de assimetria cromossômica e as variações encontradas permitem diferenciar os cariótipos simétricos para ligeiramente assimétricos (THOPPIL, 1993).

A diversidade de números cromossômicos como ocorre em *P. amboinicus* ($2n=16$ a 52) e *P. barbatus* ($2n=28$ a 34), bem como variações na morfologia cromossômica em uma mesma espécie (REDDY, 1952; DE WET, 1958; RILEY; HOFF, 1961; BASAVARAJA; KRISHNAPPA, 1982; SAGGOO; BIR, 1983; THOPPIL, 1993), tem sido relacionada com eventos aneuploides e poliploides, fatores que representam importância evolutiva significativa (STEBBINS, 1958) e, de acordo com Thoppil (1993), em Lamiaceae, esses parecem ser os fatores que influenciam o aumento da variabilidade cromossômica na família.

De acordo com Guerra (2008), quando um ou mais cromossomos são perdidos ou adquiridos, processo referido frequentemente como aneuploidia, ocorrem deleções e duplicações de muitos genes, resultando em uma constituição não balanceada normalmente letal. Neste caso, a variação no número cromossômico aparentemente sem sentido evolutivo é, na maioria das vezes, documentada em material experimental de plantas cultivadas.

Em *Plectranthus*, as variações cromossômicas não revelam caráter letal e as diferenças citogenéticas entre genótipos ou espécies do gênero podem estar relacionadas com eventos disploides, nos quais, de acordo com Friebe et al., (2005), ocorrem mudanças graduais do número de cromossomos de indivíduo para indivíduo como consequência de rearranjos cromossômicos estruturais que

não afetam o número de genes da planta com perdas ou ganhos. Esses rearranjos incluem fusão de braços longos entre cromossomos não homólogos telocêntricos e/ou acrocêntricos (fusão robertsoniana), fissão cêntrica, seguida de translocações e outras alterações estruturais, caracterizando a disploidia.

Para os gêneros *Cymbispatha*, *Gibasis*, *Lycoris*, *Nothoscordum* e *Podocarpus*, entre outros, já foram relatados eventos de disploidia relacionados com trocas robertsonianas (JONES, 1998). Em *Nothoscordum* podem ser encontradas espécies com números cromossômicos formando uma série descontínua com $2n = 8, 10, 16, 18, 19, 20, 24$ e 26 , com cromossomos classificados, em sua maioria, como metacêntricos com presença de marcas de DNA telomérico na região centromérica. Essa variação foi relacionada com a disploidia também pelo fato de o número fundamental de braços ter sido constante (CROSA, 1996).

Os eventos de disploidia podem ser os responsáveis pelas diferenças cariotípicas entre genótipos de *P. barbatus*, visto que as variações de número cromossômico seguem uma série descontínua sem grandes variações quanto ao número, como observado por outros autores. Entretanto, para se verificar de fato quais os eventos responsáveis pela diversificação desses números cromossômicos faz-se necessária a aplicação de técnicas de citogenética molecular.

A variação entre os cariótipos de espécies aparentadas e entre genótipos expressa papel proeminente nos fatores que operam a evolução, além de subsidiar novos enquadramentos taxonômicos. A variabilidade de números cromossômicos associada às diferenças de conteúdo de DNA nuclear encontradas neste trabalho e às mudanças estruturais cariomorfométricas reforça a hipótese de que o processo de especiação ainda está em curso no gênero *Plectranthus*, o que fica ainda mais evidente diante das diferenças encontradas entre genótipos de *P. barbatus* quanto à morfologia cromossômica.

5 CONCLUSÕES

As populações de *P. amboinicus* e *P. neochilus* apresentam cariótipos coincidentes entre seus respectivos genótipos.

P. barbatus é uma espécie que está em processo ativo de variação cariotípica.

Existem indícios cariotípicos relevantes que suportam a existência de citotipos em *P. barbatus*, podendo-se inferir que *P. grandis*, provavelmente, é um deles.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, pelo auxílio financeiro; à CAPES, pela concessão da bolsa; ao Instituto Agrônomo de Campinas e aos Hortos de Plantas Medicinais da UFLA e UFSM, pelo fornecimento de material botânico e ao Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, pelo apoio nas análises de citometria.

REFERÊNCIAS

BAHL, J. R.; TYAGI, B. R. Pachytene Chromosomes of *Coleus forskohlii*. **Current Science**, Bangalore, v. 57, n. 6, p. 326-328, Mar. 1988.

BANDEIRA, J. M. et al. Genetic similarities among four species of the *Plectranthus* (L'Hér.) genus. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 43-48, 2010.

BASAVARAJ, D. G.; KRISHNAPPA, I. IOPB chromosome number reports LXXV. **Taxon**, Utrech, v. 31, p. 361, 1982.

BENNETZEN, J. L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, n. 1, p. 251–269, Jan. 2000.

CHENGYIH, W.; HSIWEN, L. On the evolution and distribution in Labiatae. **Acta Botanica Yunnanica**. Kunming, v. 4, n. 2, p. 1-3, 1982.

CHERIAN, M.; KURIACHAN, P. I. **Chromosome number reports LXXII**. Taxon, Utrech, v. 30, p. 707-709, 1981.

CROSA, O. **Sistemática e evolução das espécies da seção Inodorum Guag. do gênero Nothoscordum Kunth (Allieae, Alliaceae)**. 1996. 250 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

DE WET, J. M. J. Chromosome number in *Plectranthus* and related genera. **South African Journal of Science**, Johannesburg v. 34, p. 153-156, 1958.

FRIEBE, B. et al. Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, n. 1/3, p. 293-297, 2005.

GOLDBLATI, P. **Index to plant chromosome number of 1975-1978**. Missouri: Botanical Garden, 1981.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenet Genome Research**. Basel, v.120, n. 3/4, p. 339-350, May 2008.

GUERRA, M. et al. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germoplasm bank. **Brasilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 3, p. 489-496, Sept. 1997.

GURGEL, A. P. A. D. et al. In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lousanne, v. 125, n. 2, p. 361-363, Sept. 2009.

HARLEY, R. et al. **Lamiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000142>>. Acesso em: 31 maio 2011.

JONES, K. Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. **Botanical Review**, Bronx, v. 64, n. 3, p. 173-289, july/spet. 1998.

- KUNKEL, T.A. Misalignment-mediated DNA synthesis errors. **Biochemistry**, New York, v. 29, n. 35, p. 8003–8011, Sept. 1990.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SOUBERG, A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, Lund, v. 52, n. 2, p. 201-220, Nov. 1964.
- LORENZI, H.; MATOS, F. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. São Paulo : Instituto Plantarum, 2002.
- LUKHOB, C. W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 103, n. 1, p. 1–24, Jan. 2006.
- MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v.78, n.1/2, p. 41-51, 1993.
- MARTINS, E. R. et al.. **Plantas Mediciniais**. Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 1995.
- MORTON, J. K. Cytotaxonomic studies on the West African Labiatae. **Journal of the Linnean Society of London: botany**, London, v. 58, n. 372, p. 231–283, July, 1962.
- PASSINHO, H. C. R. et al. Genetic differentiation between *Plectranthus grandis* Cramer and *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 2, June 2000.
- PASZKO, B. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 258, n. 1/2, p. 39–48, Apr. 2006.
- PIEGU, B. et al. Doubling genome size without polyploidization: dynamics of retrotransposon-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 16, n. 10, p. 1262 – 1269, 2006.
- PIERRE, P. M. O. et al. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, p 1-13, July 2011.
- REDDY, N. S. Chromosome numbers in *Coleus*. **Journal of Heredity**, Washington, v. 43, n. 5, p. 233-237, Sept. 1952.

RICHARDSON, P. The chemistry of the Labiatae: an introduction and overview. In: Harley, R. M.; Reynolds, T. (Ed.). **Advances in Labiate Science**. Kew: Royal Botanic Garden, 1992. p. 291 - 297.

RILEY, H.P.; HOFF, V.J. Chromosome studies in some South African dicotyledons. **Canadian journal of genetics and cytology**, Ottawa, v. 3, n. 3, p.260-271, Sept. 1961.

SAGGOO, M. I. S.; BIR, S. S. Cytopalynological Studies on Indian Members of Acanthaceae and Labiateae. **Journal of Palynology**, New Delhi, v. 19, n. 1/2, p. 243-277, 1983.

SCHEEL, M. Karyologische Untersuchung der Gattung *Salvia*. **Botanisches Archive**, Leipzig, v. 32, p. 148-208, 1931.

SHAH, V. et al. The occurrence of forskolin in the Labiatae. **Planta Medica**. Stuttgart, v. 39, n. 2, p. 183–185, 1980.

SMITH, G. P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science**, Washington, v. 191, n. 4227, p. 528–535, Feb. 1976.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 14, n. 9, p. 348–352, Sept. 1999.

STEBBINS, G. L. Longevity, habitat, and release of genetic variability in the higher plants. Cold Spring Harbor Symp. **Cold spring harbor symposia on quantitative biology**, New York, n. 23, p. 365-378, 1958.

STEBBINS, G. L. **Variation and evolution in plants**. New York: Columbia, 1950.

THOPPIL, J. E. **Chromosome Studies and exploration of chemical constituents in some members of South Indian Lamiaceae**. 1993. 497 p. Tese (Doctor of philosophy in Botany) Faculty of Science, Mahatma Gandhi University, Kerala, 1993.

THORNE, R. F. Classification and geography of the flowering plants. **Botanical Review**, Bronx, v. 58, n. 3, p. 225-327, July 1992.

ZARCO, C. R. A new method for estimating karyotype asymmetry. **Taxon**, Utrech, v. 35, n. 3, p. 526-530, Aug. 1986.