

# Estudo citológico em *Aegiphila sellowiana*, *Vitex montevidensis* e *Citharexylum myrianthum* da bacia do Rio Tibagi, Paraná, Brasil

Priscila Mary Yuyama, Alba Lúcia Cavaleiro & André Luís Laforga Vanzela

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências  
Biológicas – CCB, Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas,  
Caixa Postal 6001, 86051-990, Londrina, PR, Brasil. andrevanzela@uel.br

Recebido em 10.VII.2008. Aceito em 26.V.2010.

**RESUMO** - *Lamiaceae* e *Verbenaceae* correspondem às principais famílias da ordem *Lamiales* distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do mundo. Neste trabalho foram feitas análises citológicas de *Aegiphila sellowiana* Chamisso, *Vitex montevidensis* Chamisso e *Citharexylum myrianthum* Chamisso, coletadas em diferentes regiões da bacia do Rio Tibagi, Paraná, Brasil. Os resultados mostraram que *A. sellowiana* apresenta  $2n = 42$  cromossomos, maiores do que os de *V. montevidensis* ( $2n = 34$ ) e os de *C. myrianthum* ( $2n = ca.104$ ), esta com os menores. Porém, as três espécies apresentam núcleos interfásicos do tipo arreticulado a semi-reticulado e padrão de condensação profásico proximal, sem evidências de variação intraespecífica ou diferenças interespecíficas. No entanto, nossos resultados indicam que, do ponto de vista citológico (número e tamanho dos cromossomos), indivíduos das três espécies podem ser identificados corretamente e assim, suas sementes serem utilizadas, com segurança, em programas de restauração ambiental na bacia do rio Tibagi.

Palavras-chave: cromossomos, número, tamanho, núcleos interfásicos.

**ABSTRACT** - *Cytological study of Aegiphila sellowiana, Vitex montevidensis and Citharexylum myrianthum from Tibagi River Basin, Paraná, Brazil.* *Lamiaceae* and *Verbenaceae* are the main families in order *Lamiales* distributed in all tropical and temperate regions of the world. In this study, cytological comparisons were made between *Aegiphila sellowiana* Chamisso, *Vitex montevidensis* Chamisso and *Citharexylum myrianthum* Chamisso, collected in different areas of Tibagi River Basin, of Paraná State, Brazil. Results showed that *A. sellowiana* presents  $2n = 42$  chromosomes, larger than those of *V. montevidensis* ( $2n = 34$ ) and of *C. myrianthum* ( $2n = ca.104$ ), which presents the smallest. The three analyzed species presented interphase nuclei of an arreticulate to semi-reticulate type and a proximal pattern of prophase condensation, without intraspecific variation or interspecific differences. Our results indicate that, from a cytological point of view (based on their chromosome numbers and size), individuals of these three species can be correctly identified and their seeds safely used for environmental restoration programs in the Tibagi River Basin.

Key words: chromosomes, number, size, interphase nuclei.

## INTRODUÇÃO

A determinação do número cromossômico é um importante auxílio para a identificação e para distinção de espécies próximas ou sub-grupos taxonômicos. Essas informações também podem ser essenciais para o esclarecimento de alguns aspectos evolutivos de diferentes grupos de plantas (Pedrosa *et al.*, 1999). De acordo com Guerra (2008), a análise da forma e tamanho dos cromossomos de um

cariótipo pode revelar que rearranjos e aberrações cromossômicas ocorreram na espécie, e/ou explicar a ocorrência de esterilidade, barreiras reprodutivas e/ou outros mecanismos associados ao processo evolutivo de um grupo vegetal.

A ordem *Lamiales* constitui um grupo de 23 famílias com distribuição em todas as regiões tropicais e temperadas do mundo (Cantino, 1992). As famílias *Lamiaceae* ou *Labiatae* e *Verbenaceae* estão incluídas na ordem acima referida (APG

II, 2003). Essas duas famílias são distinguíveis principalmente pela inserção do estilete no ovário, o qual é terminal em *Verbenaceae* e ginobásico em *Lamiaceae*. Contudo, os limites taxonômicos entre as duas famílias ainda não foram claramente definidos (Cantino, 1992).

No presente trabalho, foram estudadas três espécies arbóreas de fecundação cruzada: *Aegiphila sellowiana* e *Vitex montevidensis* - ambas pertencentes à família *Lamiaceae*, e *Citharexylum myrianthum* - pertencente à família *Verbenaceae*. Foram avaliados os números de cromossomos, a organização dos núcleos interfásicos e os padrões de condensação profásica dessas três espécies e respectivas populações estudadas. Essas informações são importantes para que se possa avaliar possíveis diferenças cromossômicas (número cromossômico, forma do núcleo e padrão de condensação cromossômica) entre as espécies e respectivas populações estudadas, a serem utilizadas como matrizes para produção de sementes, bem como para orientar novas coletas e a manutenção de lotes de sementes para pesquisa, e ainda para a realização de permutas com outros viveiros de mudas. Os resultados dessas pesquisas também podem ser muito úteis para a elaboração de estratégias de conservação e recomposição de habitats degradados.

## MATERIAL E MÉTODOS

De cada uma das três espécies estudadas, foram avaliados cinco indivíduos, por população amostrada. A localização, no campo, das matrizes doadoras de sementes, foi determinada por GPS, sendo os lotes das sementes colhidas, cultivadas em tubetes e as plantas mantidas no viveiro de mudas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE), CCB, Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram coletadas em diferentes locais no Estado do Paraná, Brasil, e estão discriminadas a seguir.

**Material examinado:** *Aegiphila sellowiana*: **Arapongas**, fazenda Solana (23°25'11.61"S, 51°25'31.00"O, 16.II.2000, A. L. Cavalheiro s/n° (LABRE, lote 699 6A); **Manoel Ribas** (24°32'24.47"O, 51°38'20.83"O), 1.VIII.2004, A.L.Cavalheiro s/n° (LABRE, lote 728 8A); **Rancho Alegre**, fazenda Congonhas (23°04'06.85"S, 50°54'19.95"O), 8.VII.2004, A. L. Cavalheiro s/n° (LABRE, lote 535); **Sertaneja** (23°01'43.41"S, 50°50'32.91"O), 31.V.2004, A. L. Cavalheiro s/n° (LABRE, lote 691 6A); **Tamarana**, fazenda da Prata (23°48'33.68"S, 51°09'42.23"O), 15.XII.1999, A. L. Cavalheiro s/n° (LABRE, lote 695 8A). *Vitex montevidensis*: **São Jerônimo da Serra**, fazenda Endo (23°42'53.00"S, 50°43'46.46"O), 14.V.2003, A. L. Cavalheiro s/n° (LABRE, lote 547 5A). *Citharexylum myrianthum*: **Alvorada do Sul**, sítio São Domingos (22°46'47.80"S, 51°13'55.27"O), 15.XI.2002, A. L. Cavalheiro s/n°

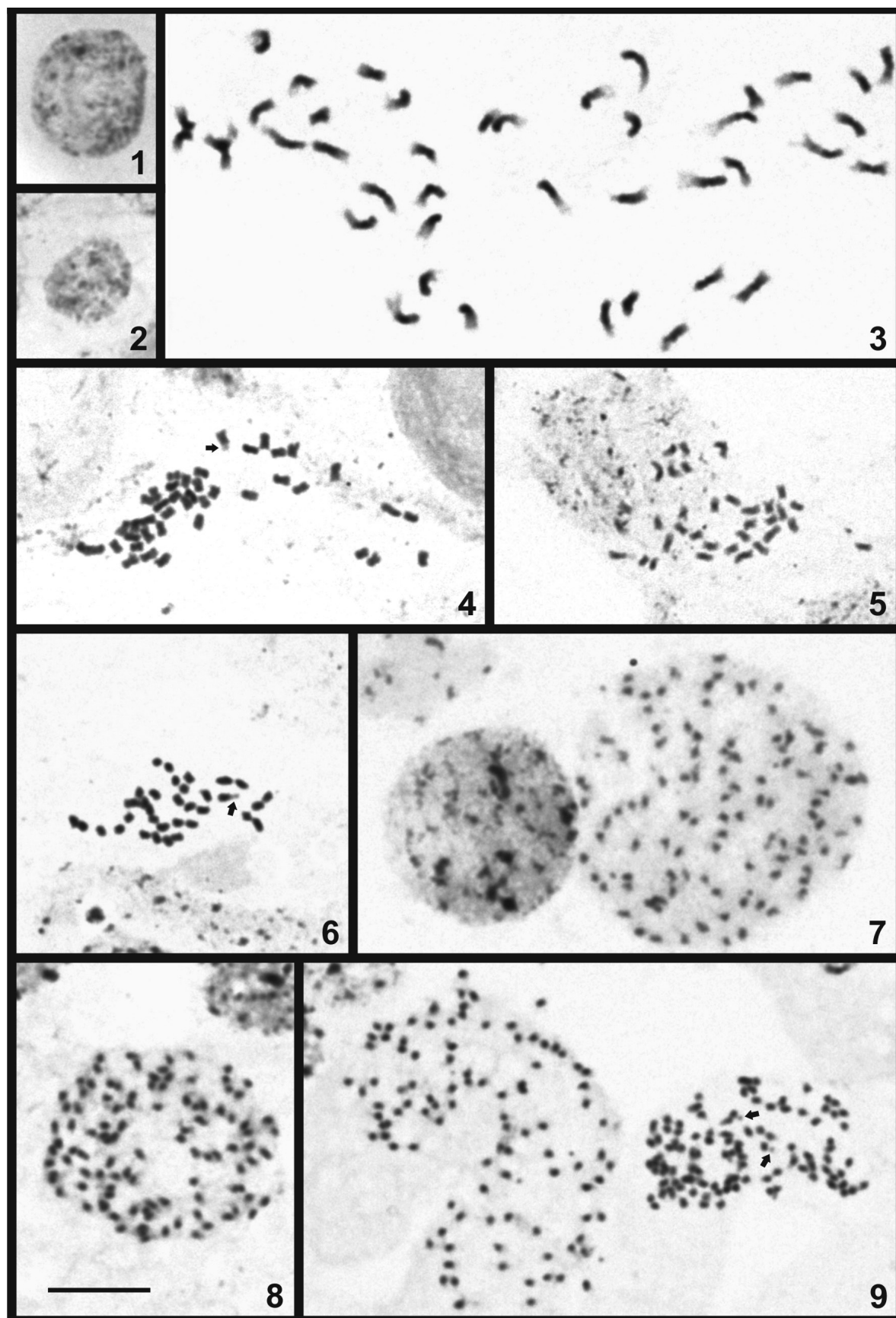
(LABRE, lote 532a 3A); **Londrina**, fazenda Esperança (23°18'32.37"S, 51°09'58.73"O), 7.XI.2003, E. M. Francisco s/n° (LABRE, lote 665b 1B); **Paiquerê, Londrina**, fazenda Figueira (23°31'59.94"S, 51°04'00.22"O), 4.V.2003, A. L. Cavalheiro s/n° (LABRE, lote 672 3A); **Rancho Alegre**, fazenda Congonhas (23°04'07.38"S, 50°54'20.72"O), 8.VIII.2002, A. L. Cavalheiro s/n° (LABRE, lote 452 3A); **Rancho Alegre**, fazenda Congonhas (23°04'06.93"S, 50°54'21.17"O), 27.VIII.2002, A. L. Cavalheiro s/n° (LABRE, lote 540 3A); **Rancho Alegre**, fazenda Figueira (23°04'07.19"S, 50°54'20.14"O), 12.IV.2003, A. L. Cavalheiro s/n° (LABRE, lote 671 4B).

As sementes foram germinadas em tubetes e vasos; pontas de raízes coletadas e pré-tratadas com 8HQ (8-hidroxiquinoleína, 2mM), por quatro a cinco horas a 15°C. As amostras foram fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v: v) por uma a duas horas. Para o preparo das lâminas, as raízes foram retiradas do fixador, digeridas por uma hora em uma mistura de celulase 4% e pectinase 40% (v/v), e posteriormente hidrolisadas em HCl 1M a 60°C. As pontas das raízes foram dissecadas em ácido acético 45%, cobertas com lamínulas e esmagadas. As lamínulas foram retiradas após congelamento em nitrogênio líquido. O material foi corado com Giemsa 2% e as lâminas permanentes montadas com Entellan. A análise foi feita em imagens capturadas em um fotomicroscópio Leica DM 4500 B com o programa IM50 da Leica. Foram analisados, no mínimo, três metáfases, três prometáfases e três núcleos por indivíduo.

## RESULTADOS

Os resultados das avaliações da organização dos núcleos interfásicos, dos padrões de condensação profásica e dos números cromossômicos – de cada espécie estudada, não mostraram variações intrapopulacionais ou diferenças interpopulacionais. As três espécies apresentaram núcleos interfásicos do tipo arreticulado a semi-reticulado, com diferenças no tamanho e na porção de cromatina condensada. *Aegiphila sellowiana* apresentou núcleos de tamanho intermediário em relação às outras duas espécies, com poucas regiões de cromatina condensada e com cromocentros pouco definidos (Fig. 1). Os núcleos de *V. montevidensis* foram os menores, com poucas regiões de cromatina condensada, mais cromatina difusa e alguns cromocentros (Fig.2). *Citharexylum myrianthum* apresentou núcleos um pouco maiores e cromocentros mais evidentes (Fig.7). O padrão de condensação profásico foi do tipo proximal nas três espécies (Figs. 3, 5, 7, 8 e 9).

*Aegiphila sellowiana* apresentou  $2n = 42$ , com predominância de cromossomos metacêntricos e



**Figs. 1-9.** **Figs. 1, 3, 4** *Aegiphila sellowiana* **1.** núcleo interfásico; **3.** prometáfase; **4.** metáfase. **Figs. 2, 5, 6** *Vitex montevidensis* **2.** núcleo interfásico; **5.** prometáfase; **6.** metáfase. **Figs. 7-9** *Citharexylum myrianthum* **7.** núcleo interfásico e prometáfase; **8.** prometáfase; **9.** prometáfase e metáfase. Satélites: ver setas nas **Figs. 4, 6, 9.** Barra = 10 µm.

submetacêntricos (Fig. 4), segundo avaliação de Guerra (1986). Apesar de não termos realizado medições cromossômicas, foi possível observar que *A. sellowiana* possui cromossomos maiores em relação às duas espécies analisadas. Em *V. montevidensis* foram observados  $2n = 34$  (Fig. 6) e em *C. myrianthum*  $2n = ca.104$  cromossomos (Fig. 9). Nessas duas últimas espécies referidas, a forma dos cromossomos foi de difícil identificação, devido ao tamanho reduzido dos mesmos. Condições secundárias (satélites) foram observadas em algumas metáfases, mas seu número não pode ser determinado com precisão (Figs. 4, 6 e 9).

## DISCUSSÃO

Em regra, os números cromossômicos diferem entre as espécies da família Lamiaceae, como por exemplo:  $n = 11$  para *Lavandula multifida* Linnaeus,  $2n = 20$  para *Cedronella canariensis* (Linnaeus) Willdenow ex Webb & Berthelot e  $2n = 32$  para *Teucrium viscidum* Blume (números cromossômicos obtidos do IPCN). Assim como *A. sellowiana* e *V. montevidensis*, a maioria das espécies da família apresenta cromossomos pequenos, como observado para *Salvia sclarea* Linnaeus (Özdemir & Senel, 1999). No gênero *Vitex*, foram relatadas espécies com  $n = 16$  para *V. cymosa* Bertero ex Sprengel (Molero *et al.*, 2006),  $2n = 32$  para *V. rotundifolia* Linnaeus (Carr, 1978) e  $2n = 64$  para *V. lucens* Kirk (Dijkgraaf, *et al.*, 1995). Porém,  $2n = 32$  foi o número mais comum entre as espécies do gênero, com possível número básico  $x = 6$  ou  $8$  (Moldenke & Moldenke, 1983).

Análises citogenéticas, na família Verbenaceae, vêm sendo realizadas preferencialmente nas espécies de interesse farmacológico, como as dos gêneros *Lantana* Linnaeus e *Lippia* Linnaeus, como no estudo realizado por Brandão *et al.* (2007). Sanders (1987) observou que *Lantana* tem como números básicos  $x = 11$  e  $12$ , com poliploidia bastante frequente ( $2n = 22, 24$ , e  $4n = 44$  e  $48$ ). No gênero *Lippia*,  $x = 5$  é considerado o número básico e os outros números poderiam ser  $x = 6, 7, 8$  ou  $9$ , resultantes de aneuploidia (aumento) ou poliploidia seguida de aneuploidia (redução), como observado por Viccini *et al.* (2005). Para *Citharexylum* o número básico proposto é  $x = 9$ , e números mais elevados sugerem a ocorrência de poliploidia (Sun *et al.*, 1990). Contudo, não foi possível determinar se a espécie aqui analisada é auto ou alopoliplóide. Sanders (2001) sugere  $x = 5$  como o número ancestral básico para a família, sendo que

os números  $x = 6$  e  $7$  poderiam ter sido derivados por aneuploidia,  $x = 10$  por poliploidia e  $x = 8$  ou  $9$  reduzidos por aneuploidia. Contudo, a falta de contagens cromossômicas em um número maior de espécies e populações nativas não permite reforçar estas hipóteses sobre os números ancestrais.

Neste trabalho, os números cromossômicos observados para *A. sellowiana* ( $2n = 42$ ), *V. montevidensis* ( $2n = 34$ ) e *C. myrianthum* ( $2n = ca.104$ ) são inéditos. Esses números, associados à diversidade de números encontrados na literatura para *Lamiales*, permitem sugerir que a poliploidia tenha desempenhado um papel importante na diferenciação e evolução cromossômica desse grupo, embora os diferentes números básicos relatados para o grupo, permitem sugerir que a poliploidia tenha sido acompanhada por outros mecanismos de variação numérica. De um modo geral, as *Lamiales* apresentam uma tendência geral de apresentarem números cromossômicos elevados, uma vez que a poliploidia ocorre em 80% das angiospermas e é um dos principais mecanismos evolutivos das plantas (Masterson, 1994; Levin, 2002).

A falta de análises citológicas mais sofisticadas e, em especial, citogenéticas, tanto em *Verbenaceae* como em *Lamiaceae*, não permite sugerir possíveis mecanismos que poderiam ter atuado nos processos de reorganização e diferenciação desses cariótipos. Entretanto, as diferenças aqui observadas, entre as três espécies (números e tamanhos dos cromossomos), permitem supor que diferentes mecanismos, como poliploidia, reorganização de segmentos de cromossomos, incluindo ou não amplificação e/ou deleção de segmentos repetitivos, possam ter organizado os atuais cariótipos. Dessa forma, para a obtenção de informações sobre as possíveis reorganizações dos cariótipos, seriam necessários estudos envolvendo análises cromossômicas mais sofisticadas, envolvendo marcadores gerados por bandamento e hibridização *in situ*.

## CONCLUSÕES

Exceto para *V. montevidensis*, que teve apenas uma população estudada, tanto *A. sellowiana* como *C. myrianthum* não mostraram diferenças entre suas populações quanto ao número cromossômico e tamanho e caracterização dos núcleos. Seria necessário obter informações sobre o conteúdo gênico dos cromossomos para poder sugerir áreas de coletas de sementes visando restaurações ambientais, em matrizes de fragmentos florestais na Bacia do Rio

Tibagi. Porém, a partir das informações obtidas neste estudo sobre números cromossômicos, as sementes poderiam ser permutadas ou repassadas para outros viveiros de mudas da região, uma vez que não foram registrados números diferentes nas áreas de coletas de *A. sellowiana* e *C. myrianthum*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Paraná (SEMA) e Instituto Ambiental do Paraná (IAP); do Programa de Pós Graduação da Universidade Estadual de Londrina e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradecem também a bióloga Carolina Randazzo de Oliveira pelo apoio técnico com a bolsa do CNPq (Processo 501961/2008-9).

## REFERÊNCIAS

- APG II ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. 2003. An ordinal classification for the families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, p.399-436.
- BRANDÃO, A. D.; VICCINI, L. F.; SALIMENA, F. R. G.; VANZELA, A. L. L.; RECCO-PIMENTEL, S. M. 2007. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **Journal of Plant Research**, v.120, p.317-321.
- CANTINO, P. D. 1992. Evidence for a polyphyletic origin of the Labiatae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.79, n.2, p.361-379.
- CARR, G. D. 1978. Chromosome Numbers of Hawaiian Flowering Plants and the Significance of Cytology in Selected Taxa. **American Journal of Botany**, v.65, n.2, p.236-242.
- DIJKGRAAF, A. C.; LEWIS, G. D.; MITCHELL, N. D. 1995. Chromosome number of the New Zealand puriri, *Vitex lucens* Kirk. **New Zealand Journal of Botany**, v.33, p.425-426.
- GUERRA, M. 1986. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* **Revista Brasileira de Genética**, v.9, n.4, p.741-743.
- \_\_\_\_\_. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, v.120, n.3-4, p.339-350.
- INDEX TO PLANT CHROMOSOME NUMBERS (IPCN). **Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>>. Acesso em: 24 de abril 2009.
- LEVIN, D. 2002. **The role of chromosomal change in plant evolution**. Oxford: Oxford University Press. 244p.
- MASTERSON, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science**, v.264, n.5157, p. 421-424.
- MOLDENKE, H. N.; MOLDENKE, A. L. 1983. Verbenaceae. In: DASSANAYAKE, M. D.; FOSBERG, F.R. (Ed.) **A revised handbook to the flora of Ceylon**. New Delhi: Amerind Publishing. v. 4, p.196-487.
- MOLERO, J.; DAVINA, J. R.; HONFI, A. L.; FRANCO, D.; ROVIRA, A. 2006. Chromosome studies on plants from Paraguay II. **Candollea**, v.61, n.2, p.373-392.
- ÖZDEMİR, C.; SENEL, G. 1999. The morphological, anatomical and karyological properties of *Salvia sclarea* L. **Turkish Journal of Botany**, v.23, p.7-18.
- PEDROSA, A., GITAÍ, J.; SILVA, A. E. B.; FELIX, L. P.; GUERRA, M. 1999. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco V. **Acta Botanica Brasilica**, v.13, n.1, p.49-60.
- SANDERS, R. W. 1987. Taxonomic significance of chromosome observations in Caribbean species of *Lantana* (Verbenaceae). **American Journal of Botany**, v.74, n.6, p.914-920.
- SANDERS, R. W. 2001. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**, v.5, n.2, p.303-358.
- SUN, B. Y.; STUESSY, T. F.; CRAWFORD, D. J. 1990. Chromosome Counts from the Flora of the Juan Fernandez Islands, Chile. III. **Pacific Science**, v.44, n.3, p.258-264.
- VICCINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; COSTA, D. C. S.; SOUSA, S. M.; PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G. 2005. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v.256, p.1-4.

