

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltdl. (CLUSIACEAE) EM COMPARAÇÃO COM OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO.

Ana Paula Guisso Navarini  
Bióloga/UFPel

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Área de Concentração Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil  
Março de 2008

Aos meus pais ROBERTO Antonio Guisso (em memória) e ELSA Maria  
Marchesin Guisso, pela vida e pelos ensinamentos.

Ao meu esposo DANIEL Navarini, pelo amor e compreensão.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Teresa Schifino Wittmann, por sua orientação, amizade e incentivo.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ingrid Bergman Inchausti de Barros, pela co-orientação e amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Judith Viégas, pela amizade e incentivo.

À minha bolsista Danielle Almeida, pela colaboração e amizade.

À Nair, Ionara, Thanise, Divanilde e Camila, pela amizade e apoio.

Aos colegas de laboratório, Viviane, Kelly, Júlio e Carlos, pela amizade e agradável convivência.

À todos os professores e colegas durante o mestrado, pelos ensinamentos, colaboração e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Horticultura e Silvicultura e do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRGS.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização deste curso e à CAPES pela bolsa de estudos.

À minha família, pela confiança, amor e compreensão.

Ao Daniel, pelo companheirismo e apoio durante a realização deste trabalho.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o êxito desta pesquisa.

# CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltdl. (CLUSIACEAE) EM COMPARAÇÃO COM OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO<sup>1</sup>

Autora: Ana Paula Guisso Navarini

Orientadora: Maria Teresa Schifino Wittmann

Co-orientadora: Ingrid Bergman Inchausti de Barros

## RESUMO

O gênero *Hypericum*, originário da Europa e Ásia, apresenta uma ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais e compreende aproximadamente 460 espécies. Destas, 20 têm ocorrência natural no Brasil, e concentram-se principalmente na Região Sul do país. As espécies deste gênero são amplamente utilizadas na medicina popular, devido as suas propriedades antivirais, antimicrobianas e antidepressivas. Devido à possibilidade de se explorar tais propriedades, há necessidade de estudos que auxiliem na compreensão taxonômica das espécies nativas da flora brasileira, buscando melhor entender a citogenética e a biologia floral, a fim de se obter meios que possibilitem incluí-las em programas de melhoramento genético. O presente trabalho teve por objetivos determinar o número cromossômico, analisar a meiose e a fertilidade do pólen em diferentes populações de *H. caprifoliatum* em comparação com *H. cf carinatum*, *H. polyanthemum* e *H. perforatum*. Um total de 18 populações foram analisadas. Os resultados constituem-se nas primeiras informações citogenéticas para as espécies, com exceção de *H. perforatum*. Os cromossomos destas espécies são muito pequenos (ca. 1,0 - 2,0  $\mu\text{m}$ ), numerosos e de difícil análise. O número cromossômico obtido foi de  $2n$  cerca de (ca.) 48, para *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum*, e de  $2n=32$  para *H. perforatum* e cerca de  $2n=32$  para *H. polyanthemum*. Irregularidades na meiose foram observadas com maior frequência em *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum*. A fertilidade do pólen variou de 42% e 89% entre as populações, sendo que foi observada uma grande variabilidade no tamanho dos grãos entre e dentro de populações, para *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum*, sugerindo que estas espécies, assim como outras do gênero, se reproduzem por apomixia.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (86p.) Março, 2008.

**CYTOGENETIC CHARACTERIZATION OF *Hypericum caprifoliatum*  
Cham. & Schltl. (CLUSIACEAE) POPULATIONS IN COMPARISON WITH  
OTHER SPECIES OF THE GENUS<sup>2</sup>**

Author: Ana Paula Guisso Navarini  
Adviser: Maria Teresa Schifino Wittmann  
Co-adviser: Ingrid Bergman Inchausti de Barros

**ABSTRACT**

The genus *Hypericum*, originated from Europe and Asia, is widely distributed in tropical and subtropical regions and contains around 460 species. From these, 20 occur naturally in Brazil, concentrated in the Southern Region. *Hypericum* species are widely used in folk medicine, due to their antiviral, antimicrobial and antidepressive properties. In order to explore these properties, studies that help to a better understanding of the Brazilian native species taxonomy, cytogenetics and floral biology are needed, aiming to include these species in genetic breeding programs. The objective of the present work was to determine chromosome numbers and to analyse meiosis and pollen fertility in different *H. caprifoliatum* populations, in comparison to *H. cf. carinatum*, *H. polyanthemum* and *H. perforatum*. A total of 18 populations were studied. The results obtained are the first cytogenetic informations for these species, except *H. perforatum*. These species chromosomes are very small (ca. 1- 2  $\mu$ m) in relative large numbers and of difficult analyses. The number of chromosomes was ca.  $2n=48$  for a *H. caprifoliatum* e *H. cf. carinatum*, and  $2n=32$  for *H. perforatum* and ca.  $2n=32$  for *H. polyanthemum*. Meiotic irregularities were more frequent in *H. caprifoliatum* and *H. cf. carinatum*. Pollen fertility ranged from 42% to 89% among the populations and a great variability in pollen grain sizes was found within and among *H. caprifoliatum* and *H. cf. carinatum* populations, suggesting that these species, as other of the genus, reproduce by apomixis.

---

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (86p.) March, 2008.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Gênero <i>Hypericum</i> L.....	4
2.1.1. Taxonomia.....	4
2.1.2. Morfologia.....	7
2.1.3. Importância.....	8
2.2. Outros estudos com espécies de <i>Hypericum</i> .....	14
2.3. Citogenética: considerações gerais .....	15
2.3.1. Citogenética e biologia reprodutiva do gênero <i>Hypericum</i> ....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Material .....	25
3.1.1. Descrição das populações e locais de coleta.....	27
3.2. Métodos.....	33
3.2.1. Caracterização citogenética.....	33
3.2.1.1. Determinação do número cromossômico somático.....	33
3.2.1.2. Análise meiótica.....	34
3.2.1.3. Estimativa do índice meiótico.....	35
3.2.1.4. Estimativa da viabilidade dos grãos de pólen.....	35
3.2.1.5. Germinação <i>in vitro</i> dos grãos de pólen.....	36
3.2.1.6. Análise do material.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Caracterização citogenética.....	37
4.1.1. Determinação do número cromossômico somático.....	37
4.1.2. Análise meiótica.....	41
4.1.3. Estimativa do índice meiótico.....	52
4.1.4. Estimativa da viabilidade de pólen.....	57
4.1.5. Germinação <i>in vitro</i> dos grãos de pólen.....	65
5. CONCLUSÕES.....	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
7. APÊNDICE.....	79
8. VITA.....	86

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Número dado a cada população de <i>Hypericum</i> , coletor e número de registro no herbário (ICN), local de coleta, data e horário da coleta e material coletado. Porto Alegre, RS. 2006/2007.....	26
2. Número cromossômico e análise meiótica em espécies do gênero <i>Hypericum</i> . Porto Alegre, RS. 2007.....	43
3. Índice meiótico em espécies do gênero <i>Hypericum</i> . Porto Alegre, RS. 2007.....	53
4. Diâmetro mínimo, máximo, mediana, limite de classes e estimativa da fertilidade dos grãos de pólen em populações de <i>Hypericum</i> . Porto Alegre, RS. 2007.....	59
5. Viabilidade de pólen de <i>H. polyanthemum</i> baseada em germinação <i>in vitro</i> dos grãos de pólen. Porto Alegre, RS. 2007.....	66

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Árvore genealógica das seções do gênero <i>Hypericum</i> (adaptada de Robson, 1981).....	5
2. a) <i>H. caprifoliatum</i> (população 1); b) <i>H. cf carinatum</i> (população 15); c) <i>H. polyanthemum</i> (população 17); d) <i>H. perforatum</i> (população 18).....	28
3. Locais de coleta de <i>H. caprifoliatum</i> (1-14), <i>H. cf. carinatum</i> (15-16), <i>H. polyanthemum</i> (17) e <i>H. perforatum</i> (18) no estado do Rio Grande do Sul.....	32
4. Cromossomos somáticos de <i>Hypericum</i> . a) <i>H. caprifoliatum</i> , população 1 com cerca de $2n=48$ ; b) desenho esquemático da figura 4a; c) <i>H.cf carinatum</i> , população 15 com cerca de $2n=48$ ; d) desenho esquemático da figura 4c. e-f) <i>H. perforatum</i> , população 18, com $2n=32$ cromossomos. Escala: 10 $\mu$ m.....	39
5. Células mãe-de-pólen em meiose de <i>H caprifoliatum</i> . a) população 14, sobreposição entre os cromossomos. b) população 7, fissão nucleolar. Diacineses em: c) população 1, d) população 4, e) população 7, f) população 8. Seta - indica associações cromossômicas maiores que bivalentes. Escala 10 $\mu$ m.....	46
6. Células mãe-de-pólen em meiose de <i>Hypericum</i> . Diacineses em a) <i>H. caprifoliatum</i> , população 9. b) <i>H. cf carinatum</i> , população 15. c) <i>H. polyanthemum</i> , população 17. Escala 10 $\mu$ m.....	48
7. Células mãe-de-pólen em meiose de <i>Hypericum</i> . a, b, d, e) <i>H. caprifoliatum</i> . a) população 4, metáfase I com cromossomos fora da placa equatorial (seta). b) população 1 e c) <i>H. polyanthemum</i> , população 17, metáfase I com associações cromossômicas não identificadas (setas). d) população 4, anáfase I com retardatários (seta). e) população 4, anáfase I com ponte cromossômica f) <i>H. cf carinatum</i> população 16, telófase I com cromossomos retardatários (seta). Escala 10 $\mu$ m.....	49
8. Células mãe-de-pólen em meiose de <i>Hypericum</i> . a, c, d, e) <i>H. caprifoliatum</i> . a) população 1, final de anáfase II com	



<p>cromossomos retardatários (seta). b) <i>H. polyanthemum</i>, população 17, telófase II com micronúcleos (seta). c) população 2, telófase II com 3 núcleos. d) população 3, metáfase II. e) população 8, metáfase II com cromossomos retardatários (seta). Escala 10µm.....</p>	51
<p>9. Tétrades e políades em <i>Hypericum</i>. a, b, c, e, f) <i>H. caprifoliatum</i>. A) população 4, tétrade. b) população 1, micrósporos com tamanho desigual. c) população 14, pêntade. d) <i>H. cf carinatum</i>, população 15, tétrade com micrócito. e-f) população 4, tétrade com micrócitos. Escala 10µm.....</p>	54
<p>10. Tétrades e políades em <i>H. caprifoliatum</i>. a) população 7, políade. b) população 12, políade. c) população 12, díade. d) população 14, díade com micrócito. e) população 11, tétrade e tríade. f) população 1, tríade. Escala 10µm.....</p>	55
<p>11. Percentagem de díades e tríades observadas nas populações de <i>Hypericum</i>. 1-14: <i>H. caprifoliatum</i>; 15-16: <i>H. cf carinatum</i>; 17: <i>H. polyanthemum</i>. Porto Alegre, RS. 2007.....</p>	56
<p>12. Grãos de pólen de espécies de <i>Hypericum</i>. a,c,d,e,f) <i>H. caprifoliatum</i>. a) população 13, variação no tamanho. b) população 17, <i>H. polyanthemum</i>, grãos com tamanho similar. c) população 14, variação na morfologia e macropólen. d) população 5. e, f) população 6. diferentes tamanhos. Escala 10 µm.....</p>	61
<p>13. Diâmetro médio (µm) mínimo, máximo e mediana dos grãos de pólen em espécies de <i>Hypericum</i>. Porto Alegre, RS. 2007.....</p>	62
<p>14. Médias percentuais das populações de <i>Hypericum</i> quanto ao índice meiótico e estimativa da fertilidade dos grãos de pólen. Porto Alegre, RS. 2007.....</p>	64
<p>15. Germinação <i>in vitro</i> dos grãos de pólen de <i>Hypericum</i>. a,b,e,f) <i>H. polyanthemum</i>, população 17. a) 2 horas e b) 4 horas em temperatura ambiente. c) <i>H. caprifoliatum</i>, população 1 e d) <i>H. cf carinatum</i>, população 15, 24 horas em BOD. e) 24 horas em BOD. f) 4 horas em temperatura ambiente. Escala 10 µm.....</p>	67

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Hypericum* L. pertence à família Clusiaceae Lindl. e compreende aproximadamente 460 espécies, que caracterizam-se por apresentar diferentes tipos de estruturas secretoras, onde ocorre a síntese e/ou acúmulo de substâncias biologicamente ativas. Originário da Europa e Ásia, o gênero apresenta uma ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, sendo ausente somente em locais extremamente secos ou frios (Robson, 2006). Aproximadamente 20 espécies deste gênero têm ocorrência natural no Brasil, e concentram-se principalmente na Região Sul do país (Robson, 1981).

As espécies deste gênero são amplamente utilizadas na medicina popular, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, anti-virais, antimicrobianas e antidepressivas, além de servirem como analgésico e sedativo. A espécie *H. perforatum* L., é a mais bem estudada por apresentar hipericina, hiperforina e pseudohipericina, que são as substâncias responsáveis pelo efeito antidepressivo (Barnes *et al*, 2001; Couceiro *et al*, 2006).

Algumas das espécies nativas do Rio Grande do Sul foram avaliadas quanto à constituição química, verificando-se a produção de compostos secundários com ação antiproliferativa (Ferraz *et al*, 2004; Ferraz *et al*, 2005), antimicrobiana (Dall'Agnol, 2003) e antidepressiva, sendo *H. caprifoliatum* Cham. & Schl., a espécie com maior potencial para o tratamento de depressão (Daudt *et al*, 2000; Viana, 2002).

Embora *Hypericum* seja um gênero de grande importância, poucos trabalhos foram realizados sobre caracterização citogenética, restringindo-se, principalmente, ao número cromossômico (Nielsen, 1924; Robson & Adams, 1968; Kogi, 1984; Matzk *et al*, 2003; Moraes, 2007). Hoar & Haertl (1932) observaram irregularidades meióticas em espécies do gênero e concluíram que estas, provavelmente, seriam a causa da alta taxa de formação de grãos de pólen estéreis. Segundo Noack (1939), citado por Moraes (2007), a esterilidade observada pode estar relacionada com a presença de uma forma de reprodução comumente relatada para o gênero, a apomixia. Há relato de poucos estudos citogenéticos envolvendo espécies nativas do Brasil (Clarke, 1975; Moraes, 2007).

Devido à possibilidade de se explorar propriedades medicinais como as já identificadas para o gênero *Hypericum*, há necessidade de estudos que auxiliem na compreensão taxonômica das espécies nativas da flora brasileira, buscando compreender a citogenética e a biologia floral, a fim de se obter meios que possibilitem incluí-las em programas de melhoramento genético, objetivando produção de cultivares com qualidade homogênea de extratos e exibindo características agronômicas favoráveis. Ressalta-se assim, a importância do conhecimento citogenético, que é uma ferramenta poderosa no melhoramento e evolução de plantas, uma vez que permite obter informações sobre o material genético e ao mesmo tempo, fornece métodos para manipulá-lo (Sybenga, 1998).

O fato das espécies nativas do sul do Brasil serem promissoras na indústria de fitoterápicos constitui um desafio para obtenção de matéria-prima de alto padrão de qualidade e uniformidade, justificando assim a necessidade de estudos genéticos.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar citogeneticamente diferentes populações de *H. caprifoliatum*, *H. cf. carinatum* Griseb., *H. polyanthemum*

Klotzsch ex Reichardt e *H. perforatum*, com base, principalmente, no número cromossômico, análise da meiose e estimativa da viabilidade dos grãos de pólen.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Gênero *Hypericum*

#### 2.1.1. Taxonomia

A família Clusiaceae, anteriormente denominada Guttiferae, compreende cerca de 1200 espécies, distribuídas em 49 gêneros de larga distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Robson, 2006). O gênero *Hypericum* (subfamília Hypericoideae, tribo Hypericeae) (Gustafsson *et al*, 2002) contém aproximadamente 460 espécies, e é o único a penetrar em regiões temperadas. Originário da Europa e Ásia apresenta uma ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, sendo ausente somente em locais extremamente secos e/ou frios (Robson, 2006). As espécies deste gênero são amplamente utilizadas na medicina popular, devido às suas propriedades fitoterápicas (Couceiro *et al*, 2006).

Clusiaceae divide-se em três subfamílias (Kielmeyeroideae, Hypericoideae e Clusioideae), sendo Hypericoideae considerada por alguns taxonomistas como uma família distinta, devido à diversidade morfológica que apresenta (Gustafsson *et al*, 2002). O gênero *Hypericum* possui características tão distintas que, às vezes, é considerado como uma família independente, Hypericaceae (Takhtajan, 1997).

Robson (1981) sugeriu a divisão do gênero em 30 diferentes seções baseadas em características morfológicas, citológicas e ecológicas, presença de glândulas escuras ou pálidas, distribuição geográfica, modo de reprodução, entre outros (Figura

1). A partir da determinação do número cromossômico e citometria de fluxo, Matzk *et al* (2003) complementaram os estudos realizados por Robson (1981) e propuseram a separação das seções com base nos valores C de DNA (1C: quantidade de DNA de um núcleo haplóide) e números cromossômicos, entre espécies apomíticas e sexuais.

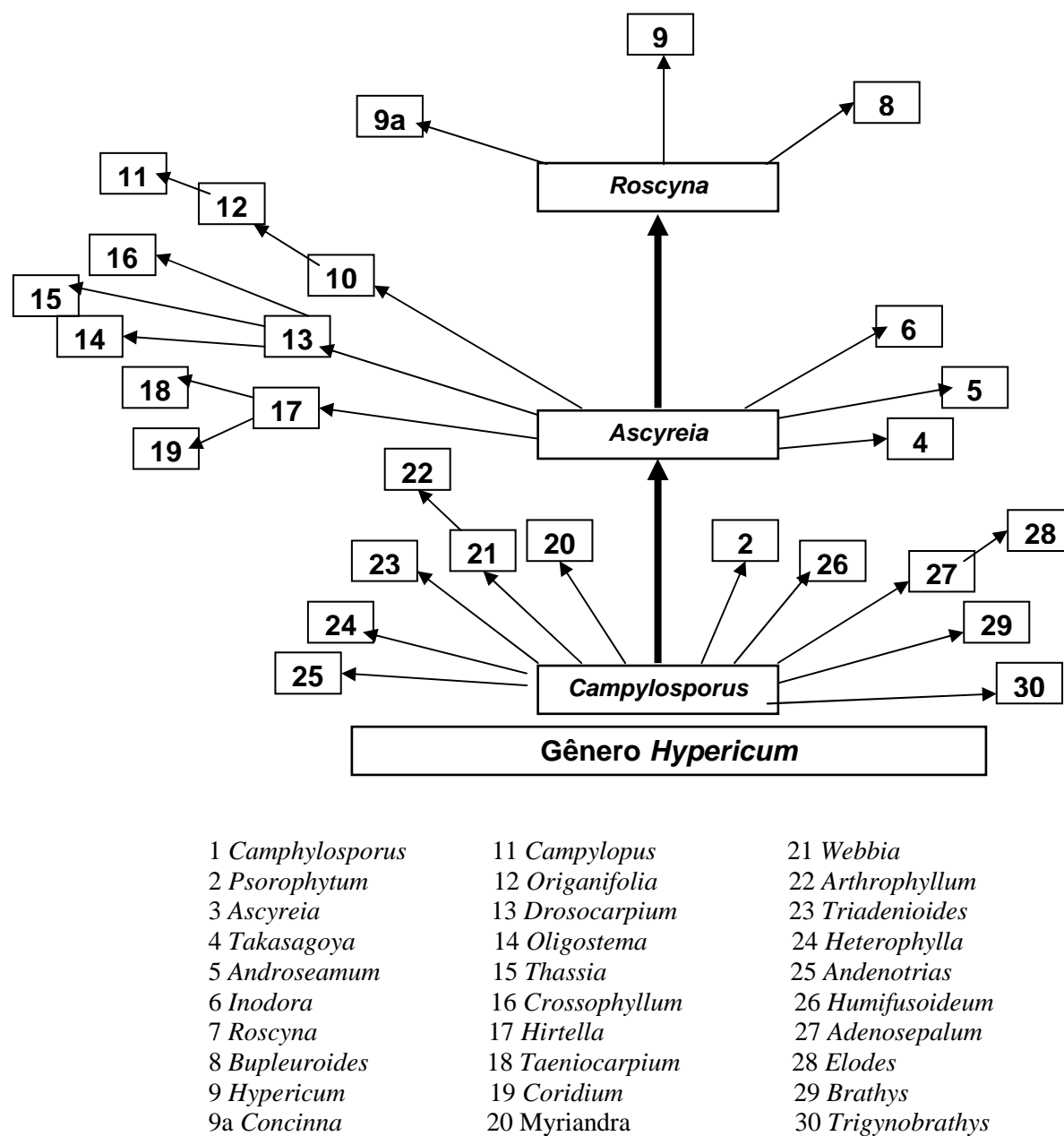


FIGURA 1. Árvore genealógica das seções do gênero *Hypericum* (adaptada de Robson, 1981).

No Brasil, principalmente nas Regiões Sul e Sudeste, ocorrem cerca de 20 espécies do gênero, as quais pertencem a apenas duas seções, *Brathys* (29) e *Trigynobrathys* (30). As seções 29 e 30 contêm dois e 18 representantes nativos, respectivamente (Figura 1) (Robson, 1981).

A distribuição de hipericina e pseudo-hipericina nas espécies de *Hypericum* tem importante valor taxonômico para a classificação infragenérica. Estes compostos não são encontrados nas seções mais primitivas como *Ascyreia* (3), *Androsaemum* (5), *Inodorum* (6), *Roscyna* (7), *Bupleuroides* (8) e *Spachium* (*Tryginobrathys*) (30), mas ocorrem freqüentemente nas seções *Hypericum* (9), *Adenosepalum* (27) e *Olympia* (10) (Kitanov, 2001).

Nogueira *et al* (2008) ao analisarem quimiotaonomicamente *H. perfoliatum* L. (seção *Drosocarpium*), *H. humifusum* L., *H. linarifolium* Vahl. (seção *Oligostema*), e *H. pulchrum* L. (seção *Taeniocarpium*), observaram algumas variações quantitativas intra-específicas na composição química dos óleos, possivelmente resultante de diferentes estágios fenológicos da planta e/ou diferentes origens geográficas, porém estas diferenças não foram relevantes o suficiente para separar os óleos essenciais de cada espécie. Por outro lado, as diferenças na composição do óleo essencial entre as espécies analisadas foram relevantes, dando, então, suporte à classificação taxonômica baseada em caracteres morfológicos.

De acordo com Matzk *et al* (2003) os indivíduos apomíticos da seção *Ascyreia* são evolutivamente mais antigos que os da seção *Hypericum*, pois possuem maior conteúdo de DNA por genoma e por cromossomo, e compreendem 85% da variação total do conteúdo de DNA do gênero.

### 2.1.2. Morfologia

A maioria das plantas da família Clusiaceae são lenhosas, arbóreas, arbustivas ou subarbustivas, com algumas herbáceas. As folhas são simples, opostas ou verticiladas, inteiras, com bases livres ou conadas, muitas vezes coriáceas e translúcido-pontuadas e, apresentam meatos oleíferos. As flores, quase sempre vistosas, são actinomorfas, hermafroditas ou unissexuais e possuem prefloração valvar. As inflorescências são terminais e racemosas, e raramente são encontradas flores solitárias. O fruto em geral é seco, podendo ser drupáceo ou baciforme (Schultz, 1984).

As espécies do gênero *Hypericum* variam de hábito herbáceo a arbóreo, além de mostrarem uma ampla variação morfológica na distribuição e natureza das glândulas punctiformes (Robson, 2006). Conforme citado por Slusarski *et al* (2007), são ervas anuais ou perenes, subarbutos ou arbustos, eretos ou decumbentes; o caule é cilíndrico na base e quadrangular na parte superior. As folhas são isomórficas ou heteromórficas, sésseis, opostas e cartáceas ou membranáceas. As flores são hermafroditas, apresentam pedicelo, corola actinomorfa, de coloração amarela ou alaranjada, e presença ou não de glândulas punctiformes marginais nas sépalas e pétalas. O fruto é do tipo cápsula septicida e as sementes, numerosas, são oblongas, amarelas ou negras e reticuladas. Conforme Driemeier-Kreimeier *et al* (2007), para *H. caprifoliatum*, há aproximadamente 48.800 sementes por grama.

Estudos de anatomia vegetal demonstraram que este gênero é caracterizado pela presença de diferentes tipos de estruturas secretoras (glândulas translúcidas, negras e canais secretores), as quais caracterizam-se por ser o local de síntese e/ou acúmulo de substâncias biologicamente ativas,



importantes na discriminação entre os táxons (Cicarelli *et al*, 2001). As glândulas pálidas ou translúcidas são encontradas em todas as espécies, no entanto, o mesmo não é regra para as glândulas negras, que apresentam dispersão restrita, uma vez que a sua ocorrência é um forte indício da presença de hipericina e derivados nesta estrutura glandular (Robson, 1981). Ferraz *et al* (2004) ao analisarem algumas espécies nativas do Rio Grande do Sul (*H. brasiliense* Choisy, *H. carinatum*, *H. caprifoliatum*, *H. connatum* Lam., *H. cordatum* Vell., *H. myrianthum* Cham. & Schlecht., *H. piriai* Arechav. e *H. polyanthum*) verificaram que estas não apresentavam hipericina e seus derivados. Conforme proposto por Robson (1981), as espécies nativas do Brasil são caracterizadas pela ausência de glândulas negras, apresentando somente glândulas pálidas, as quais são responsáveis pela produção de outros metabólicos secundários com atividade fitoterápica.

### **2.1.3. Importância**

Plantas pertencentes à família Clusiaceae são bem conhecidas pela medicina popular, pois apresentam uma ampla variedade de usos, tais como antiinflamatório, anti-hemorrágico e antimicrobiano. Em várias partes do mundo, representantes do gênero *Hypericum* têm sido usados com propósito medicinal e, assim, compostos antifúngicos, antibióticos, antivirais e anticâncer têm sido isolados destas espécies (Nör, 2006). Investigações químicas do gênero têm levado ao isolamento de mais de 100 compostos das folhas e flores de aproximadamente 20 espécies, com diferentes atividades biológicas (Barnes *et al*, 2001).

A erva de São João ou hipérico (*H. perforatum*), nativa da Europa e Ásia tem sido foco de muitos estudos, devido ao seu uso como medicamento natural. Apresenta propriedades antiinflamatória, sedativa, cicatrizante, analgésica e diurética, sendo útil também para problemas neurológicos, como depressão, uma vez que o extrato parece ter uma significativa atividade antidepressiva (Couceiro *et al*, 2006; Urbanová *et al*, 2006; Diniz *et al*, 2007). Na Europa, Estados Unidos e América do Sul os extratos da erva de São João são usados para o tratamento de depressão média a moderada (Viana *et al*, 2005).

Santos-Filho & Bernardo-Filho (2005), ao analisarem o efeito do extrato de hipérico na marcação *in vitro* de elementos sanguíneos em ratos, concluíram que o extrato pode alterar a marcação dos elementos sanguíneos com o radiofármaco, diminuindo a captação no osso, músculo e tireóide e aumentando a fixação do radiofármaco no pâncreas. Embora os resultados obtidos tenham sido com animais, sugere-se precaução com os exames de medicina nuclear em pacientes que utilizam *H. perforatum* como medicamento.

Segundo Couceiro *et al* (2006) os extratos de *H. perforatum* contêm mais que 25 compostos bioativos, dentre estes se destaca a hiperforina, pseudohipericina e hipericina. Por anos se acreditou que a hipericina fosse responsável pela atividade antidepressiva, porém, estudos experimentais e clínicos recentes indicaram que a hiperforina é o principal componente envolvido em tal atividade. Ambos compostos bioativos, pseudohipericina e hipericina foram relatados por inibir diversas viroses encapsuladas, incluindo herpes e HIV.

Devido às atividades atribuídas a *H. perforatum*, a pesquisa em espécies nativas do gênero tem levado a descoberta de várias moléculas bioativas. Segundo Viana *et al* (2003) e Couceiro *et al* (2006), as espécies são utilizadas como medicinais pela população, devido às inúmeras propriedades fitoterápicas. Até 1995, apenas a espécie *H. brasiliense* havia sido estudada apresentando atividade antifúngica e antibacteriana. A partir de 1998, o Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul iniciou a avaliação química e farmacológica de espécies nativas do Rio Grande do Sul, com a perspectiva de encontrar propriedades semelhantes às de plantas exóticas do mesmo gênero.

Schmitt *et al* (2001) investigaram três espécies (*H. caprifoliatum*, *H. polyanthemum* e *H. connatum*) nativas do sul do Brasil quanto à atividade antiviral e observaram que *H. connatum* foi a que apresentou maior atividade contra o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV).

Viana (2002) analisou extratos de *H. caprifoliatum*, *H. piriaei*, *H. cordatum*, *H. carinatum*, *H. connatum* e *H. polyanthemum* quanto a potencial atividade antidepressiva em ratos no Teste de Natação Forçada, observando que, apenas *H. caprifoliatum* apresentou redução no tempo de imobilidade, preditivo de atividade antidepressiva, corroborando dados obtidos por Daudt *et al* (2000).

A partir do estudo da constituição química das partes aéreas de *H. caprifoliatum* (escadinha), observou-se a presença de derivados de floroglucinol (hiperbrasilol B) e dois flavonóides (quercetina e hiperosídeo), os quais podem ser considerados como marcadores quimiotaxonômicos das seções *Brathys* e *Trigynobrathys*, nas quais estão sendo classificadas todas

as espécies sul americanas (Nör, 2006). Comumente encontrados em *Hypericum*, os derivados de quercitina podem estar envolvidos em atividades biológicas, como a ação antidepressiva de *H. perforatum* (Viana *et al*, 2005; Nör, 2006).

O potencial terapêutico das espécies nativas, inclusive para o tratamento de doenças de origem bacteriana, torna-se evidente, em vista da grande variedade de substâncias farmacologicamente ativas encontradas. Ao testar a atividade antimicrobiana dos extratos sobre bactérias, Dall'Agnol (2003) observou que *H. carinatum* e *H. connatum* não apresentaram atividade sobre as bactérias testadas. Por outro lado, *H. caprifoliatum* e *H. myrianthum* foram ativos nas concentrações de 100 e 200 µg/mL, frente a *Staphylococcus aureus*, enquanto que o extrato de *H. polyanthemum*, nas mesmas concentrações foi ativo frente ao *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (Dall'Agnol *et al*, 2003/2005).

Avancini & Wiest (2002), também analisaram a atividade antibacteriana de *H. caprifoliatum* e a confirmaram, sugerindo a possibilidade da utilização do extrato como desinfetante e anti-séptico em determinadas situações.

Visando verificar o efeito antiproliferativo de espécies de *Hypericum* do Sul do Brasil, Ferraz *et al* (2004) avaliaram extratos metanólicos brutos de seis espécies (*H. caprifoliatum*, *H. myrianthum*, *H. connatum*, *H. carinatum*, *H. ternum* e *H. polyanthemum*), frente a duas linhagens de células (carcinoma de cólon humano e células não pequenas de carcinoma de pulmão). Considerou-se ativo os extratos de *H. caprifoliatum* e *H. myrianthum*, os quais inibiram mais de 75% do crescimento celular das linhagens derivadas de tumores humanos. Posteriormente, após o fracionamento dos extratos com solventes,

as espécies foram reavaliadas quanto à atividade citotóxica, frente às mesmas células testadas anteriormente, e observou-se que *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* (Ferraz *et al*, 2005) mostraram-se mais ativas, comprovando a atividade antiproliferativa dos benzopiranos.

Fenner *et al* (2005) analisaram a atividade antifúngica de algumas espécies brasileiras de *Hypericum* (*H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. ternum*, *H. myrianthum* e *H. piraí*) e observaram que somente os extratos de *H. ternum* A. St.-Hil. mostraram atividade significativa, pois inibiram todas as espécies do gênero *Candida* testadas.

Estudos relatam atividade antioxidante para espécies de *Hypericum*, o que é esperado, já que a presença de compostos fenólicos é comum nestas plantas. As propriedades antioxidantes demonstradas por extratos de *H. perforatum* podem ser em parte responsáveis por alguns efeitos terapêuticos atribuídos a esta planta, tais como as propriedades antiinflamatórias e a ação no sistema nervoso central. Por isso, Bernardi (2007) analisou extratos metanólicos de *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*, confirmando o potencial antioxidante, porém por ter-se uma avaliação preliminar, são necessários testes com métodos complementares que expressem o perfil antioxidante de forma mais completa.

Diniz *et al* (2007) analisaram a alteração dos metabólitos secundários em plantas de *H. perforatum* submetidas à secagem e ao congelamento e, observaram redução na concentração de hipericina devido à secagem ou ao congelamento e armazenamento a -20 °C, representando uma limitação para o preparo de medicamentos fitoterápicos que utilizem em sua fórmula a hipericina. Conforme Urbanová *et al* (2006), em plantas de *H. perforatum*

regeneradas e submetidas à criopreservação, o conteúdo de hipericina permaneceu estável.

Plantas de *H. perforatum* que crescem em diferentes regiões da Itália, Austrália e Pacífico norte nos Estados Unidos mostram variações nas concentrações dos compostos bioativos, sugerindo que regiões geográficas próximas sintetizam diferentes quantidades dos componentes, devido às mudanças ambientais. Em ambiente controlado é possível se obter aumento na produção de compostos específicos, facilitando o desenvolvimento de produtos com alta qualidade e consistência, mas, mesmo assim, ainda ocorrem variações nas concentrações dos compostos bioativos e produção de biomassa, enfatizando então a importância da seleção de um germoplasma superior (Couceiro *et al*, 2006).

Conforme Abreu & Mazzafera (2005), estudos mostraram que fatores ambientais exercem influência sobre a produção de metabólitos secundários em *H. brasiliense*. Foi observado que o estresse hídrico gerou aumento nos níveis de todos os compostos analisados, principalmente os compostos fenólicos e, quanto ao fator temperatura, a resposta foi variável de acordo com o composto. Portanto, é possível aumentar o conteúdo de compostos farmacologicamente desejáveis pela manipulação de técnicas agrícolas.

Em *H. brasiliense* também foi testada a distribuição de substâncias bioativas durante o crescimento da planta. Abreu *et al* (2004) observaram que a maior concentração de compostos fenólicos ocorreu durante o florescimento e de terpenos durante a frutificação.

Enfim, mais estudos terapêuticos devem ser realizados com as espécies nativas do Brasil, pois devido as suas potencialidades, se caracterizam como promissoras na indústria de fitoterápicos.

## **2.2. Outros estudos com espécies de *Hypericum***

O interesse na conservação de germoplasma de plantas medicinais está crescendo, e quando possível, o banco de sementes é o sistema mais eficiente para a conservação *ex situ* destes recursos genéticos (Pérez-Garcia *et al*, 2006). Segundo Çirak *et al* (2007) geralmente a capacidade de germinação de espécies de *Hypericum* é muito baixa devido à dormência das sementes. Por isso, a presença de luz, reguladores de crescimento (ácido giberélico e ácido indol-acético), tratamento químico com nitrato de potássio e água quente tem sido recomendado para quebrar a dormência e acentuar a germinação.

Estudando o comportamento da germinação de sementes de *H. perforatum* em 68 populações de campo, Pérez-Garcia *et al* (2006) observaram que a percentagem de germinação final foi altamente variável, dependendo do acesso, variando de 6 a 98% / 6 a 23 dias. Sementes de quatro acessos com baixa germinação foram submetidas a diferentes tratamentos (térmico e ácido giberélico) que poderiam aumentar a germinação. Os autores observaram que a germinação foi promovida pelo ácido giberélico em dois dos quatro acessos, sendo que o tratamento térmico não influenciou as percentagens de germinação. Devido à alta variação interpopulacional, concluíram que não é possível, baseado em uma população, caracterizar o comportamento germinativo de toda espécie.

Durante o processo de domesticação as plantas acumularam, gradualmente, características que facilitaram a produção agrícola, como a perda dos mecanismos de dispersão natural e germinação rápida da semente. Estudos comparativos entre *H. perforatum* e *H. brasiliense* permitiram concluir que a presença de luz é necessária para germinação de sementes em ambas as espécies, mas exerce um efeito maior sobre a segunda, a qual possui menor grau de domesticação. Foi observado também que o umedecimento do substrato com solução de nitrato de potássio a 0,02% favoreceu somente a germinação de *H. brasiliense* (Faron *et al*, 2004).

De acordo com Driemeier-Kreimeier (2005), as sementes de *H. perforatum* tiveram uma germinação mais uniforme que as sementes de *H. caprifoliatum*. Dos tratamentos utilizados para superação de dormência de *H. caprifoliatum* foi observada uma baixa eficácia da solução de nitrato de potássio a 0,02%. Já o tratamento com ácido giberélico se mostrou eficiente, uma vez que as giberilinas são importantes na germinação de sementes, pois estão envolvidas na mobilização de reservas do endosperma.

### **2.3. Citogenética: considerações gerais**

Estudos citogenéticos compreendem todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, no que diz respeito à morfologia, organização, função e replicação, bem como na sua variação e evolução (Guerra, 1988).

Singh (1993) considera a citogenética como uma ciência que combina análise dos cromossomos (técnicas de coloração cromossômica), função e movimento (divisão celular, mitose e meiose), número e estrutura (análise do



cariótipo), bem como modificações da estrutura e comportamento e, como estão relacionados à recombinação, transmissão e expressão dos genes.

Segundo Lacadena (1996) a citogenética tem como objetivo principal, analisar e explicar como a estrutura e o comportamento dos cromossomos garantem a tripla função de conservar a informação genética entre as células de um organismo pluricelular, transmití-la de pais para filhos e liberá-la de forma ordenada para controlar as funções celulares e o desenvolvimento do organismo, estudando os controles e variações, suas conseqüências genéticas e implicações evolutivas, assim como as aplicações no melhoramento genético de plantas e animais.

Os estudos citogenéticos possibilitam a obtenção de informações básicas para a caracterização citológica e, permitem que diferenças possam ser encontradas entre as espécies, além de serem de fundamental importância para o estudo evolutivo, relação filogenética e polimorfismos intra e interespecíficos (Love, 1949; Pozzobon, 2005).

O conhecimento gerado pela citogenética é de grande importância para um programa de melhoramento, uma vez que ajuda a selecionar materiais adequados e a manter uma monitoração constante, revelando possíveis alterações na fertilidade dos indivíduos. Conforme Sybenga (1998), a citogenética possui duas funções principais no melhoramento de plantas: primeiramente, gerar informações e, posteriormente, fornecer métodos para manipulação genética. As informações citogenéticas importantes ao melhorista são aquelas já existentes sobre o material que está sendo trabalhado, sobre a metodologia que será utilizada durante o trabalho e, as novas informações que irão surgindo ao longo do projeto.

A citogenética convencional também possui um papel importante nos estudos evolutivos e taxonômicos, uma vez que auxilia nos problemas de classificação e identificação taxonômicas, além de melhorar a compreensão evolutiva dos grupos (Stace, 2000). Vários trabalhos dentro da citogenética vêm sendo realizados para esclarecer questões envolvendo taxonomia e evolução (Conterato & Schifino-Wittmann, 2006) e origem e evolução das espécies (Pozzobon *et al*, 2006).

A partir da década de 80, com o desenvolvimento da citogenética molecular, técnicas de FISH (Hibridação Fluorescente *in situ*) e GISH (Hibridação Genômica *in situ*) passaram a ser amplamente empregadas, por permitirem a identificação de alterações cromossômicas, processos envolvidos na especiação (Bennet, 1995; Stace, 2000) e, identificação e caracterização de genomas em híbridos inter-específicos e inter-genéricos (Raina & Rani, 2001).

Conforme Pagliarini & Pozzobon (2004) estudos citogenéticos envolvendo a contagem do número de cromossomos (Maciel & Schifino-Wittmann, 2002), determinação do nível de ploidia, avaliação do comportamento meiótico e fertilidade do pólen (Corrêa *et al*, 2005; Pozzobon & Schifino-Wittmann, 2006) são de fundamental importância na caracterização de coleções de germoplasma.

### **2.3.1. Citogenética e biologia reprodutiva do gênero *Hypericum***

Apesar da grande importância do gênero *Hypericum*, os estudos relacionados à citogenética e biologia reprodutiva são escassos, havendo um maior número de trabalhos relacionados às propriedades farmacológicas das

espécies. A busca de estratégias de melhoramento para o gênero requer um melhor entendimento destas plantas sob o ponto de vista citogenético e reprodutivo.

Nielsen (1924) determinou o número cromossômico de 16 espécies do gênero *Hypericum* e observou que o número básico ( $x$ ) foi variável (7, 8, 9) entre as seções *Roscyna*, *Androsaemum*, *Euhypericum* e *Myriandra*. Porém, somente foi encontrada variação quanto ao número básico dentro da seção *Hypericum* (*Euhypericum*).

Robson & Adams (1968) apresentaram os números cromossômicos de espécies do gênero *Hypericum* determinados por outros autores. O número básico foi bastante variável (7, 8, 9, 10, 12) entre e dentro de seções.

Kogi (1984) analisou espécies de *Hypericum* ocorrentes no Japão e observou, para a maioria dos indivíduos, número básico igual a oito.

Entre as 71 espécies diplóides e tetraplóides de *Hypericum*, avaliadas por Matzk *et al*, (2003) foi encontrada uma ampla variação em relação ao número cromossômico, uma vez que o número básico foi 7, 8, 9 ou 10. Nas espécies com reprodução sexual, o número cromossômico variou entre 14 e 40, e de 28 a 38 nas espécies apomíticas. Porém, quando comparada com a diferença entre o valor C médio de espécies apomíticas e sexuais, a diferença relativa do número cromossômico médio foi menor, mas também significativa.

Ao analisarem a estabilidade do número cromossômico e o índice mitótico de meristemas criopreservados de *H. perforatum* diplóide ( $2n=2x=16$ ), com número cromossômico básico  $x=8$ , observaram que os meristemas não apresentaram nenhuma alteração em número cromossômico (Urbanova *et al*, 2002; Urbanova *et al*, 2006) e, o índice mitótico de meristemas

criopreservados variou de 96% a 99%, não diferindo significativamente das amostras controle (Urbanova *et al*, 2002).

Segundo estudos de Brutovská *et al* (2000b) os cromossomos de *Hypericum* tem centrômeros medianos ou submedianos. A partir da análise cariomorfológica de *H. perforatum*, observou-se que cinco de oito cromossomos do conjunto básico possuem o centrômero mediano. Kogi (1984) analisou algumas espécies de *Hypericum* distribuídas no Japão e mostrou que o conjunto cromossômico diplóide inclui apenas um par de cromossomos com centrômero submediano e sete pares de cromossomos com centrômero mediano. Destes, um apresenta cromossomos longos, podendo facilmente ser distinguido do restante e outro par, apresenta satélites.

Normalmente, o *H. perforatum* é tetraplóide ( $2n=4x=32$ ), podendo ocorrer indivíduos diplóides ( $2n=2x=16$ ) e hexaplóides ( $2n=6x=48$ ) (Brutovská *et al*, 2000b; Mayo & Langridge, 2003). Esta espécie apresenta cromossomos muito pequenos (0.78-1.52  $\mu\text{m}$ ) e similares (Brutovská *et al*, 1998; Brutovská *et al*, 2000b). De acordo com Campebell & Delfosse, citado por Brutovská *et al* (1998), *H. perforatum* é produto de uma hibridação antiga entre dois diplóides, *H. maculatum* subs. *maculatum* Crantz e *H. attenuatum* L., com subsequente duplicação cromossômica.

Brutovská *et al* (2000a) realizaram análise comparativa de cariótipo para as três espécies acima citadas por meio da hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) com sondas 5S/25S de DNA ribossômico. A similaridade da região organizadora do nucléolo (NOR) e cromossomos portando região 5S rRNA indicaram que *H. perforatum* teve origem de um ancestral comum

com *H. maculatum* Crantz via autoploidização, devido a apomixia facultativa ao invés de um evento de hibridação interespecífica.

Em relação às espécies nativas do Brasil, os trabalhos relacionados à determinação do número cromossômico são bastante escassos. Conforme Matzk *et al* (2003), para a seção 29 (*Brathys*) ainda não foram realizados estudos quanto ao número cromossômico e quantidade de DNA, enquanto que para a seção 30 (*Trigynobrathys*), que compreende 18 das 20 espécies nativas, realizou-se estudos apenas para duas espécies. *H. japonicum* Thunb. e *H. gentianoides* L., ambas com reprodução sexual obrigatória, apresentaram número cromossômico somático de  $2n=16$  e  $2n=18$  e um valor C de DNA de 1.3 e 2.0, respectivamente.

Moraes (2007) ao analisar citogeneticamente três espécies de *Hypericum* nativas (*H. brasiliense*, *H. cordatum* e *H. ternum*), registrou números cromossômicos inéditos para as mesmas, sendo  $2n=16$ ,  $2n=56$  e  $2n=36$ , respectivamente. Assim, *H. cordatum* possivelmente é uma espécie heptaplóide ( $x=8$ ), enquanto que *H. ternum* provavelmente é tetraplóide ( $x=9$ ).

Hoar & Haertl (1932) observaram algumas irregularidades meióticas em *H. perforatum*, e concluíram que estas, provavelmente, seriam a causa da alta taxa de formação de grãos de pólen morfológicamente estéreis. No entanto, as demais espécies analisadas apresentaram comportamento meiótico aparentemente normal. Clarke (1975) também observou produção de grãos de pólen morfológicamente irregulares em diversas espécies, dentre as quais estão inclusas *H. caprifoliatum* e *H. connatum*, ambas nativas do Brasil.

Urbanova *et al* (2002) relata que a espécie *H. perforatum* é apomítica facultativa, podendo se reproduzir via três formas: apomítica, partenogenética

ou sexual. Segundo Asker & Jerling (1992), citado por Dall'Agnol & Schifino-Wittmann (2005) a apomixia consiste na formação de sementes sem que tenha ocorrido a fusão dos gametas masculino e feminino, e é descrita em aproximadamente 15% das famílias das angiospermas, sendo mais freqüente em gramíneas (Poaceae), Asteraceae, Rosaceae e Rutaceae.

Conforme citado por Moraes (2007), Noack (1939) observou que apenas 3% dos sacos embrionários em *H. perforatum* têm origem sexual, e 97% são apomíticos pseudogâmicos. Relatou também que, embora a meiose na célula mãe do pólen seja predominantemente normal, foi detectada a presença de cromossomos retardatários e uma percentagem de grãos de pólen estéreis. A esterilidade observada pode estar relacionada com a presença de uma forma de reprodução comumente relatada para o gênero, a apomixia.

Utilizando progênies e somaclones de *H. perforatum*, Halusková & Cellarová (1997) analisaram a variabilidade genética e a herança do modo de reprodução através de marcadores moleculares RFLP. Contrastando com os dados obtidos por Noack (1939) observaram que mais de 3% das progênies se reproduzem sexualmente, no entanto mais indivíduos devem ser analisados para se ter resultados mais precisos. Arnholdt-Schmitt (2000) utilizando marcadores RAPD, observou uma variação de 80-100% de progênies idênticas, mostrando, então, que esta técnica pode auxiliar em estudos para elucidar o modo de reprodução desta espécie.

Posteriormente, Matzk *et al* (2001) afirmaram que estas ferramentas (RAPD e RFLP) podem ser ineficientes e levar a conclusões errôneas sobre o modo de reprodução devido à alta variabilidade que o mesmo apresenta

dentro de *H. perforatum*. A análise citológica do saco embrionário pode ser uma ferramenta valiosa para complementar os marcadores moleculares, já que progênies homogêneas podem ser geradas por reprodução sexual autógena (Arnholdt-Schmitt, 2000).

Mayo & Langridge (2003) analisaram populações australianas de *H. perforatum* através de marcadores moleculares (AFLP e RFLP) e observaram que sete progênies de um total de 121 tinham padrão de bandas diferente do materno. O restante, 94,2% compreendia progênie tetraplóide com padrão de bandas idêntico ao materno e, provavelmente, estas tenham sido geradas apomiticamente de sacos embrionários pseudogâmicos não reduzidos.

A relação genética entre 15 populações italianas de *H. perforatum* foi analisada a partir de marcadores moleculares (RAPD, ISSR e AFLP). De acordo com Barcaccia *et al* (2006) a diversidade genética observada entre as populações foi variável e é gerada pelo modo de reprodução característico da espécie, que é a apomixia facultativa.

Segundo Pank *et al* (2003), na espécie *H. perforatum* há uma correlação entre nível de ploidia e modo de reprodução, onde diploidia está correlacionada com reprodução sexuada e a poliploidia com apomixia. Esta correlação sugere, então, estratégias para programas de melhoramento, cruzando plantas-mãe diplóides sexuais com apomíticos facultativos tetraplóides, a fim de se obter variabilidade genética.

Usberti Filho (1981) relata que a maioria das forrageiras tropicais de importância econômica (gêneros *Paspalum*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Poa*, *Cenchrus*) reproduzem-se por apomixia facultativa, havendo associação entre

apomixia e poliploidia. De acordo com Martinez *et al* (2007), em *Paspalum*, plantas diplóides se reproduzem sexualmente e as tetraplóides por apomixia.

A estabilidade genética, em nível molecular, foi avaliada em 50 plantas de *H. perforatum* originadas de cinco genótipos diplóides e, revelou variabilidade genética inter e intra-genotípica. O alto grau de variabilidade é devido ao modo de reprodução sexual, o qual é prevalente em plantas diplóides da espécie em contraste aos tetraplóides que se reproduzem por apomixia facultativa (Urbanová *et al*, 2006).

Matzk *et al* (2003) avaliaram 71 espécies/subespécies do gênero *Hypericum*, das quais 16 são apomíticas e 55 são sexuais, relacionando modo de reprodução com tamanho do genoma, que consiste na quantidade de DNA nuclear de um indivíduo. Observaram que o valor C (quantidade de DNA de um núcleo haplóide) médio variou entre 1,3 a 6,0, sendo nas espécies sexuais de 1,3 a 3,7 e nas espécies apomíticas de 3,1 a 6,0, sugerindo então diferenças altamente significativas entre o modo de reprodução sexual e o modo apomítico. Portanto, o tamanho do genoma foi significativamente maior para espécies apomíticas que para espécies sexuais, devido não somente à poliploidização, mas também ao maior conteúdo de DNA por cromossomo.

A citometria de fluxo por *screen* de sementes (FCSS) permite discriminar processos de reprodução sexual ou assexual baseada em conteúdo de DNA do núcleo do embrião e do endosperma. Usando esta técnica foram descritas 11 diferentes rotas reprodutivas para *H. perforatum* onde 113 acessos foram caracterizados quanto ao modo de reprodução. Foram descritas sementes individuais que originaram dois sacos embrionários, sendo o endosperma de um apospórico e o embrião de um



sexual. O endosperma geralmente se desenvolve de forma pseudogâmica, mas em alguns casos se observou o desenvolvimento de forma autônoma (Matzk *et al*, 2001).

Abreu *et al* (2003) realizaram análise isoenzimática de uma população de *H. brasiliense* e observaram uma baixa variabilidade genética intrapopulacional, sugerindo, então, a existência de um modo de reprodução assexual.

Apesar da grande importância do gênero *Hypericum*, não existem, na literatura disponível, outros trabalhos de citogenética e/ou molecular, além dos citados anteriormente. Sabe-se que a citogenética, aliada aos marcadores moleculares, pode gerar informações importantíssimas para os programas de melhoramento genético. No entanto, ainda há muito a ser feito em *Hypericum*, já que a grande diversidade disponível, principalmente a nativa do sul do Brasil, não foi totalmente explorada.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Eletroforese do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia (DPFA), Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

#### 3.1. Material

As inflorescências de 15 populações, utilizadas neste trabalho, foram coletadas em saídas de campo na metade Norte do Estado do Rio Grande do Sul. Além destas, foi coletado material em três populações antropogênicas, ambas obtidas na Faculdade de Agronomia. As coletas (inflorescências, mudas e sementes), tanto nas populações naturais quanto nas antropogênicas, foram populacionais. Foi coletado material de quatro espécies, sendo *H. caprifoliatum*, *H. cf. carinatum* e *H. polyanthemum* nativas do Rio Grande do Sul e *H. perforatum* exótica (Figura 2).

A Tabela 1 indica os locais de coleta e o tipo de material coletado para cada população de *Hypericum*.

TABELA 1. Número dado a cada população de *Hypericum*, coletor e número de registro no herbário (ICN), local de coleta, data e horário da coleta e material coletado. Porto Alegre, RS. 2006/2007.

Número população	Coletor <sup>a</sup> / ICN	Localização	Data e horário da coleta	Material coletado
<i>H. caprifoliatum</i> 1	APGN/ 151667	Estufa do Laboratório de Biotecnologia em Horticultura/UFRGS	17-01-06 10:00h	Botões-Sementes, ponta de raiz
2	APGN/ 151668	BR 290, Km 131-132, Eldorado do Sul -RS	24-10-06 15:00h	Botões-Sementes-Mudas
3	APGN/ 151673	Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre-RS	30-10-06 9:00h	Botões-Sementes-Mudas
4	APGN/ 151674	Linha Progresso Sananduva-RS	03-11-06 17:00h	Botões-Sementes-Mudas
5	APGN/ 151675	FEPAGRO Viamão-RS	06-12-06 10:30h	Botões-Mudas
6	IC s/n	BR 285 Lagoa Vermelha-RS	19-12-06 15:00h	Botões-Sementes
7	APGN/ 151676	BR 116, Km 164 Galópolis-RS	26-12-06 12:00h	Botões-Sementes
8	APGN/ 151677	BR 116, Km 77 Campestre da Serra-RS	26-12-06 15:00h	Botões-Sementes
9	APGN/ 151678	Marcelino Ramos-RS, próximo ao balneário	01-01-07 18:00h	Botões-Sementes
10	APGN/ 151679	BR 386, Km 409-410, Triunfo-RS	04-01-07 11:00h	Botões-Sementes
11	APGN/ 151669	BR 386, Km 350-351, Estrela-RS	04-01-07 12:00h	Botões-Sementes
12	APGN/ 151670	BR 386, Km 336-337, Lajeado-RS	04-01-07 12:30h	Botões-Sementes
13	APGN/ 151671	RST 453, Km 73-74, Boa Vista do Sul-RS	04-01-07 14:00h	Botões-Sementes
14	APGN/ 151672	RST 453, Km 87-88, Carlos Barbosa-RS	04-01-07 14:30h	Botões-Sementes

...continuação.

TABELA 1. Número dado a cada população de *Hypericum*, coletor e número de registro no herbário (ICN), local de coleta, data e horário da coleta e material coletado. Porto Alegre, RS. 2006/2007.

Número população	Coletor <sup>a</sup> /ICN	Localização	Data e horário da coleta	Material coletado
<i>H. cf carinatum</i>				
15	APGN/151665	BR 290, Km 120, Eldorado do Sul -RS	24-10-06 14:00h	Botões-Sementes -Mudas
16	APGN/151666	BR 386, Km 382, Tabai-RS	04-01-07 11:30h	Botões-Sementes
<i>H. polyanthemum</i>				
17	APGN s/n	Casa de vegetação/ Departamento de Plantas Forrageiras UFRGS - Porto Alegre-RS	08/10/07 10:00h	Botões
<i>H. perforatum</i>				
18	APGN s/n	Casa de vegetação/Laboratório de Citogenética UFRGS – Porto Alegre-RS	Maio a agosto/ 2007, 10:00-14:00h	Ponta de raiz

<sup>a</sup> APGN – Ana Paula Guisso Navarini – UFRGS – Porto Alegre – RS  
IC – Ionara Conterato – UFRGS – Porto Alegre - RS

### 3.1.1. Descrição das populações e locais de coleta

*H. caprifoliatum*:

**População 1** – população antropogênica, localizada no município de Porto Alegre, Faculdade de Agronomia da UFRGS, casa de vegetação do Laboratório de Biotecnologia em Horticultura. As mudas foram produzidas via micropropagação, a partir de meristemas apicais de plantas matrizes disponíveis na estufa do Laboratório. As plantas matrizes, oriundas de sementes coletadas em Teutônia (RS), fazem parte do trabalho de mestrado

de Rosemari Driemeier-Kreimeier, realizado em 2004 (Driemeier-Kreimeier, 2005).

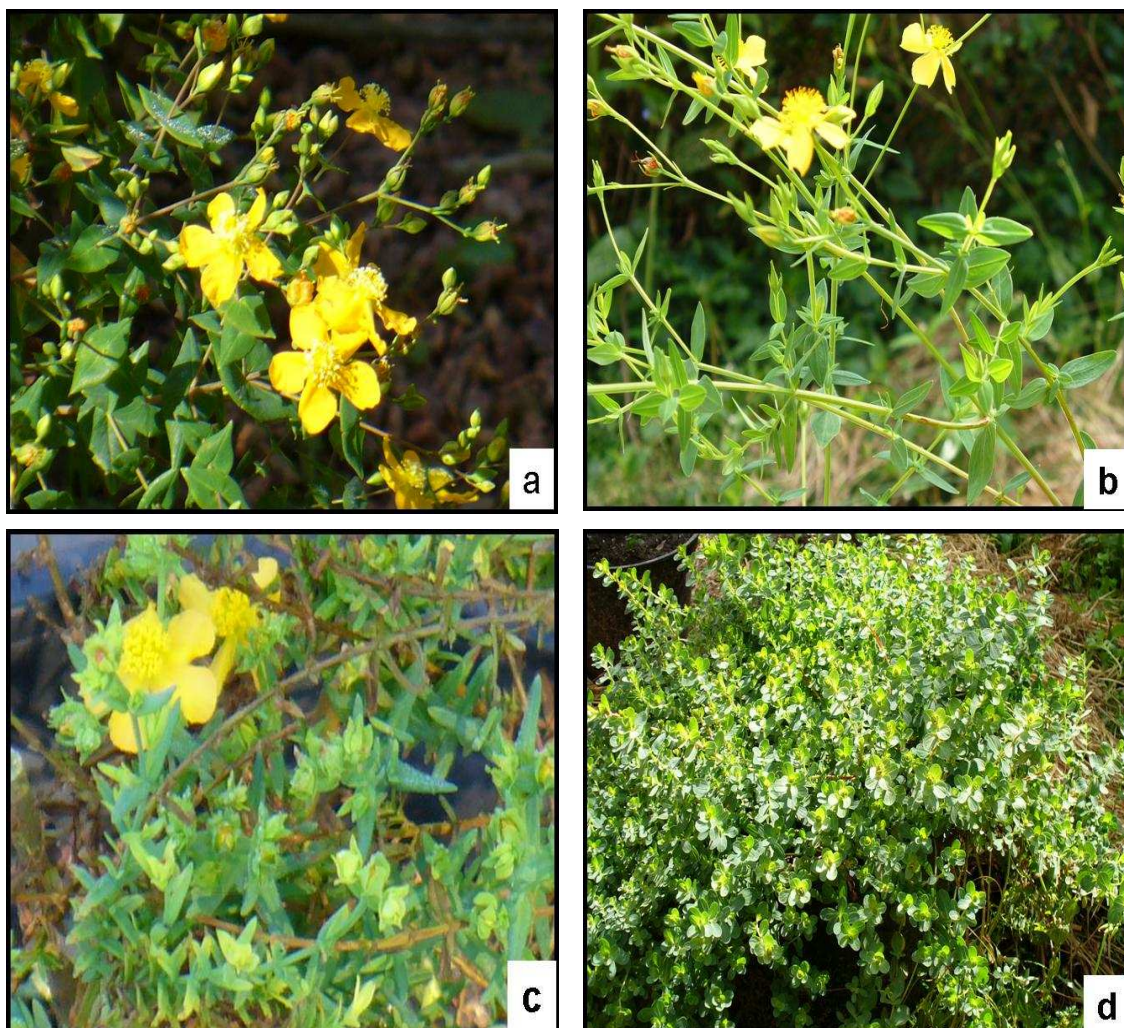


FIGURA 2. a) *H. caprifoliatum* (população 1); b) *H. cf. carinatum* (população 15); c) *H. polyanthemum* (população 17); d) *H. perforatum* (população 18).

**População 2** – população natural, localizada em Eldorado do Sul-RS, BR 290, entre o Km 131 e 132. População grande com indivíduos agrupados e, quase todos, em estágio de florescimento. Situada em beira de estrada e ambiente seco.

**População 3** – população natural, localizada em Porto Alegre, Campus do Vale – UFRGS, nos fundos do prédio da Botânica. Indivíduos dispersos, maioria em estágio vegetativo e situados em ambiente rochoso e úmido.

**População 4** – população natural, localizada em Sananduva – RS, na localidade de Linha Progresso, propriedade particular da Sr<sup>a</sup> Geneci Savi. Indivíduos agrupados e poucos em estágio reprodutivo; situados em beira de estrada e ambiente úmido.

**População 5** – população natural, localizada em Viamão – RS, na FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária). Indivíduos dispersos em área experimental, variando de ambientes úmidos a secos. Foram encontrados poucos indivíduos em estágio reprodutivo.

**População 6** - população natural, localizada em Lagoa Vermelha – RS, na BR 285, cuja localização é  $044^{\circ} 61' 29''$ ;  $68^{\circ} 78' 836''$ . Indivíduos situados em beira de estrada. Foram coletados poucos botões, pois a maioria estava em estágio de frutificação. Material coletado por Ionara F. Conterato.

**População 7** – população natural, localizada em Galópolis, próximo a Caxias do Sul, na BR 116, entre Km 163 – 164. Poucos indivíduos e todos em estágio de florescimento. Situados à beira da estrada e em ambiente rochoso.

**População 8** – população natural, localizada em Campestre da Serra-RS, BR 116, Km 77. Muitos indivíduos agrupados, todos em estágio reprodutivo. Situados em beira de estrada e ambiente seco.

**População 9** - população natural, localizada em Marcelino Ramos, próximo ao Balneário. População dispersa e indivíduos em estágio reprodutivo. Situada em beira de estrada e ambiente extremamente seco.

**População 10** – população natural, localizada em Triunfo, localidade de Vendinha, BR 386, entre Km 410-409. População dispersa e quase todos os indivíduos em estágio reprodutivo; situada em beira de estrada e ambiente rochoso.

**População 11** - população natural, localizada em Estrela – RS, BR 386, entre Km 351-350. População agrupada e todos os indivíduos em estágio de florescimento. Situada em beira de estrada, ambiente rochoso e seco.

**População 12** – população natural, localizada em Lajeado – RS, BR 386, entre Km 337-336. População agrupada, quase todos os indivíduos em estágio de frutificação e poucos com flores (botões florais). Situada em beira de estrada e ambiente rochoso.

**População 13** – população natural, localizada em Boa Vista do Sul, RST 453, Km 73-74. População dispersa e a maioria dos indivíduos em estágio reprodutivo; situada em beira de estrada e ambiente rochoso.

**População 14** - população natural, localizada em Carlos Barbosa, RST 453, Km 87-88. População dispersa e a maioria dos indivíduos em estágio reprodutivo; situada em beira de estrada e ambiente rochoso.

As populações se caracterizaram por apresentar plantas com hábito subarborescente (altura variando entre 0,4 - 0,6 metro). As folhas apresentaram mesma coloração e mesmo tamanho, exceto para população quatro, que apresentou folhas maiores em relação às demais populações.

*H. cf. carinatum* (cf: espécie a confirmar):

**População 15** - população natural, localizada em Eldorado do Sul-RS, BR 290, entre o Km 119 e 120. População grande, indivíduos dispersos e,

quase todos em estágio de florescimento. Situada em beira de estrada e ambiente úmido.

**População 16** - população natural, localizada em Tabaí-RS, na BR 386, entre o Km 382-381. População grande, com indivíduos agrupados e muitos em estágio reprodutivo. Situada em beira de estrada e ambiente bastante úmido.

Conforme observações durante a coleta, as duas populações apresentaram plantas com altura variando entre 0,5 e 0,8 metro e, folhas e flores com mesma coloração e tamanho.

*H. polyanthemum*

**População 17** - população antropogênica, localizada no município de Porto Alegre, Faculdade de Agronomia da UFRGS, casa de vegetação do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia. As mudas foram produzidas a partir da regeneração de plântulas via micropropagação, na Faculdade de Farmácia (UFRGS). As matrizes foram coletadas em Guaritas, Caçapava do Sul, em setembro de 2003 (ICN: Bordignon, 1429). Material cedido pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Rech.

*H. perforatum*

**População 18** - as sementes foram obtidas junto a Empresa Sementes Feltrin, em agosto de 2006. Número do lote: 622395. Foram semeadas em substrato comercial em novembro de 2006 e mantidas em casa de vegetação. Porém, devido às condições ambientais do local, que não satisfazem as exigências desta espécie, a qual exige dias curtos para florescimento, não foi possível obtenção de botões florais para análise de meiose. Assim, foi



realizada somente a coleta de pontas de raiz para posterior análise do número cromossômico.

A Figura 3 apresenta um mapa indicando as diferentes localizações das populações estudadas. As coletas registradas pelo ICN (Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) concentram-se, principalmente, na região norte do Rio Grande do Sul.

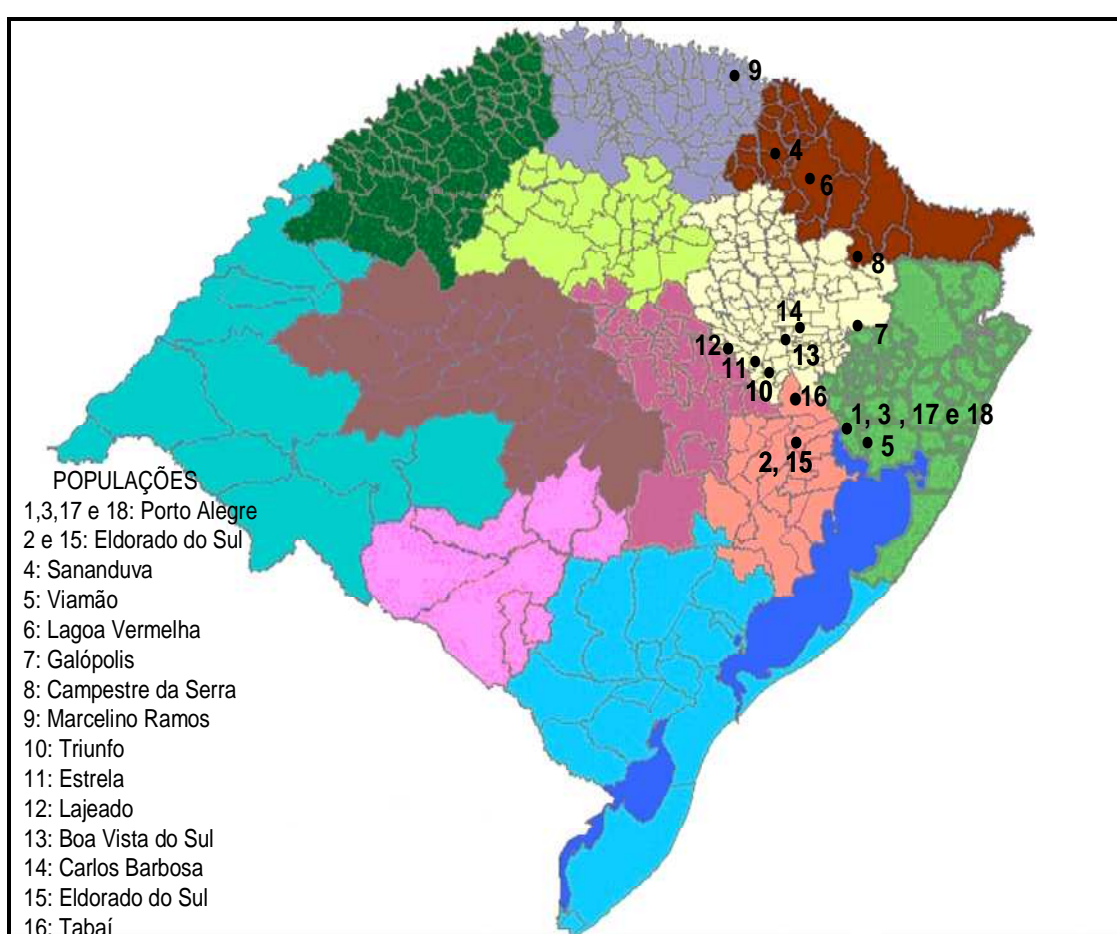


FIGURA 3. Locais de coleta de *H. caprifoliatum* (1-14), *H. cf. carinatum* (15-16), *H. polyanthemum* (17) e *H. perforatum* (18) no estado do Rio Grande do Sul.

De todas as plantas-mãe que foram coletados botões florais (exceto população 6 e 18), foram também coletados materiais para herborização. As

exsicatas foram depositadas no herbário ICN, recebendo um número de ordem e/ou identificação (Tabela 1).

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Caracterização citogenética**

#### **3.2.1.1. Determinação do número cromossômico somático**

Tendo em vista a dificuldade de estabelecimento das plantas oriundas do campo em casa de vegetação e de germinação das sementes coletadas, não foi possível determinar o número cromossômico de todas as populações. Foi determinado apenas para as populações 1, 15 e 18.

Para determinação do número cromossômico somático foram utilizados tecidos de ponta de raiz, obtidas de plantas mantidas em vasos, na casa de vegetação do Laboratório de Citogenética e Eletroforese.

As raízes coletadas, entre 0,5 e 1 cm, foram pré-tratadas em solução saturada de paradiclorobenzeno (PDB) durante 24 horas a 4<sup>o</sup>C. Após isso, foram lavadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético) por mais 24 horas, em temperatura ambiente e, então, transferidas para uma solução estoque (álcool 70%) e armazenadas em refrigerador até a confecção das lâminas.

As radículas foram retiradas do álcool 70%, lavadas em água destilada, hidrolizadas em HCl 1N (ácido clorídrico), durante 6 minutos em banho-maria a 60<sup>o</sup>C. Em seguida, foram coradas com Feulgen, por pelo menos 20 horas e, então, maceradas em uma gota de carmim propiônico 2% e seladas com luto (breu e cera na proporção 3:1).

As lâminas foram analisadas imediatamente ou armazenadas na geladeira em caixas especiais para análise no dia seguinte. No mínimo 10 células por população, com bom espalhamento dos cromossomos foram analisadas.

### **3.2.1.2. Análise meiótica**

As coletas populacionais foram efetuadas durante o período de florescimento, dando-se preferência a botões florais em diversos estádios de desenvolvimento (Tabela 1). Os botões florais ou inflorescências colhidas foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24 horas em temperatura ambiente, e, após, estocadas em álcool 70% e armazenadas em freezer até a análise. As lâminas foram preparadas com a maceração das anteras e coloração em carmim propiônico 2%. Foram utilizadas lâminas temporárias seladas com luto (breu e cera na proporção 3:1).

Em cada lâmina, todas as células mãe-de-pólen (CMP) em divisão meiótica foram observadas procurando-se determinar o número de cromossomos, as associações cromossômicas (diacinese e metáfase I) e disjunção (anáfase e telófase I). As fases metáfase I e II, anáfase I e II e telófase I e II também foram avaliadas quando possível. Foram consideradas CMP com meiose anormal aquelas com associações cromossômicas outras que não bivalentes e cromossomos fora da placa equatorial, retardatários e/ou pontes cromossômicas.

### 3.2.1.3. Estimativa do índice meiótico

Conforme proposto por Love (1949), o índice meiótico é uma complementação a análise da meiose e representa a porcentagem de quartetos de micrósporos normais, sendo indicativo de regularidade meiótica. O índice meiótico foi calculado dividindo-se o número de quartetos (tétrades) de grãos de pólen normais pelo total de quartetos observados, multiplicado por 100. Consideraram-se normais aqueles com quatro células ou micrósporos de igual tamanho e, anormais, quando apresentavam número diferente de quatro ou então micrósporos de tamanhos diferentes. Quando possível, foram analisadas no mínimo 200 tétrades aleatoriamente a partir da análise de pelo menos três botões florais para cada população.

### 3.2.1.4. Estimativa da viabilidade dos grãos de pólen

Como os grãos de pólen de *H. caprifoliatum*, *H. cf. carinatum* e *H. polyanthemum* apresentaram capacidade de coloração frente ao corante utilizado, a viabilidade dos grãos foi estimada pelo seu tamanho a partir de medidas, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), dos eixos longitudinal (EL) e transversal (ET) de 150 grãos de pólen maduros por população. Esta medida foi feita com o auxílio de uma régua micrométrica que ficava acoplada a ocular do microscópio. Procurou-se analisar o pólen de botões florais mais maduros, com tamanho padronizado entre as populações de cada espécie. Todas as anteras do botão floral foram esmagadas e coradas com orceína acética 2%. Foi calculado o diâmetro médio  $(EL + ET / 2)$  dos 150 grãos de pólen e, para cada população, se fez a distribuição de frequências a partir do Sistema de Análises Estatísticas para Microcomputadores/SANEST (Zonta *et al*, 1984). A

fertilidade foi estimada considerando-se a percentagem de grãos das classes de diâmetro médio mais freqüente.

#### **3.2.1.5. Germinação *in vitro* dos grãos de pólen**

A fim de complementar a estimativa da fertilidade do pólen foi realizado o teste de germinação *in vitro*, em meio de cultura.

As flores de *H. caprifoliatum*, *H. cf. carinatum* e *H. polyanthemum* foram coletadas pela manhã e submetidas à luz incandescente por 20 minutos para diminuir a umidade. A germinação foi realizada em outubro de 2007 e foram germinados grãos de pólen de apenas três populações (1, 15 e 17).

Após o preparo do meio, seguindo metodologia descrita por Moraes (2007), os grãos de pólen foram distribuídos em lâminas contendo uma solução com 20 ml de água destilada, 0,32g de sacarose e 0,22g de Ágar, e mantidos a temperatura ambiente (20-25 °C) e em BOD (25 °C). Em microscópio óptico, foi monitorada a emissão do tubo polínico por 4 horas, de hora em hora, e após 24 horas.

#### **3.2.1.6. Análise do material**

Todas as observações foram feitas com ajuda de microscópio óptico Nikon e de um microscópio óptico com Sistema de Captação de Imagens. As melhores células foram fotografadas ou capturadas digitalmente no sistema de captação de imagens.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização citogenética

Este trabalho apresenta, pela primeira vez, informações sobre o número cromossômico e análise da meiose para *H. caprifoliatum*, *H. cf carinatum* e *H. polyanthemum*, assim como análise da fertilidade do pólen para *H. cf carinatum* e *H. polyanthemum*. *H. caprifoliatum* já foi estudada por Clarke (1975), quanto à fertilidade do pólen.

#### 4.1.1. Determinação do número cromossômico somático

A análise do número de cromossomos somáticos em células de ponta de raiz de *H. caprifoliatum*, *H. cf carinatum* e *H. perforatum* foi bastante difícil, devido ao pequeno tamanho, relativamente alto número de cromossomos e dificuldade de bom espalhamento. Além disso, a maioria das células meristemáticas observadas apresentavam cromossomos muitas vezes em prófase, pouco contraídos, dificultando a individualização dos mesmos para contagem e, por fim, quando em metáfase apresentavam-se muito agrupados. No entanto, este pode ser um problema causado pela técnica de pré-tratamento utilizada neste trabalho.

Aliado a estes problemas, a falta de conhecimento sobre o poder germinativo das espécies silvestres, estabelecimento e manutenção das

plantas em casa de vegetação, limitou a coleta de pontas de raízes em representantes de todas as populações estudadas.

O número cromossômico somático foi determinado para a população 1 de *H. caprifoliatum*, população 15 de *H. cf carinatum* e população 18 de *H. perforatum*. Para os táxons *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum* não há determinação cromossômica disponível na literatura. Os números cromossômicos podem ser observados na Tabela 2, que se encontra na seção análise meiótica.

O número cromossômico somático encontrado para a população 1 (*H. caprifoliatum*) (Figura 4 a-b) e 15 (*H. cf carinatum*) (Figura 4 c-d) foi cerca de  $2n=48$ . Assim, *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum*, aceitando-se que o número básico seja  $x=8$ , são espécies hexaplóides.

Estes resultados concordam com os obtidos por Moraes (2007) que avaliou três espécies da mesma seção (*Trigynobrathys*) e relatou número básico igual a oito para *H. brasiliense* ( $2n=2x=16$ ) e *H. cordatum* ( $2n=7x=56$ ). *H. ternum* apresentou número básico igual a nove ( $2n=4x=36$ ).

Matzk *et al* (2003) analisaram duas espécies da seção *Trigynobrathys*, *H. japonicum* e *H. gentianoides* e também relataram um número cromossômico diplóide de  $2n=16$  ( $x=8$ ) e  $2n=18$  ( $x=9$ ), respectivamente.

As plantas da população 1 (*H. caprifoliatum*) foram obtidas a partir de cultura de tecidos com a utilização de reguladores de crescimento para induzir o enraizamento dos explantes. Urbanová *et al* (2002) analisaram a estabilidade do número cromossômico em plantas regeneradas de *H. perforatum* e, observaram que a regeneração direta não afeta a estabilidade

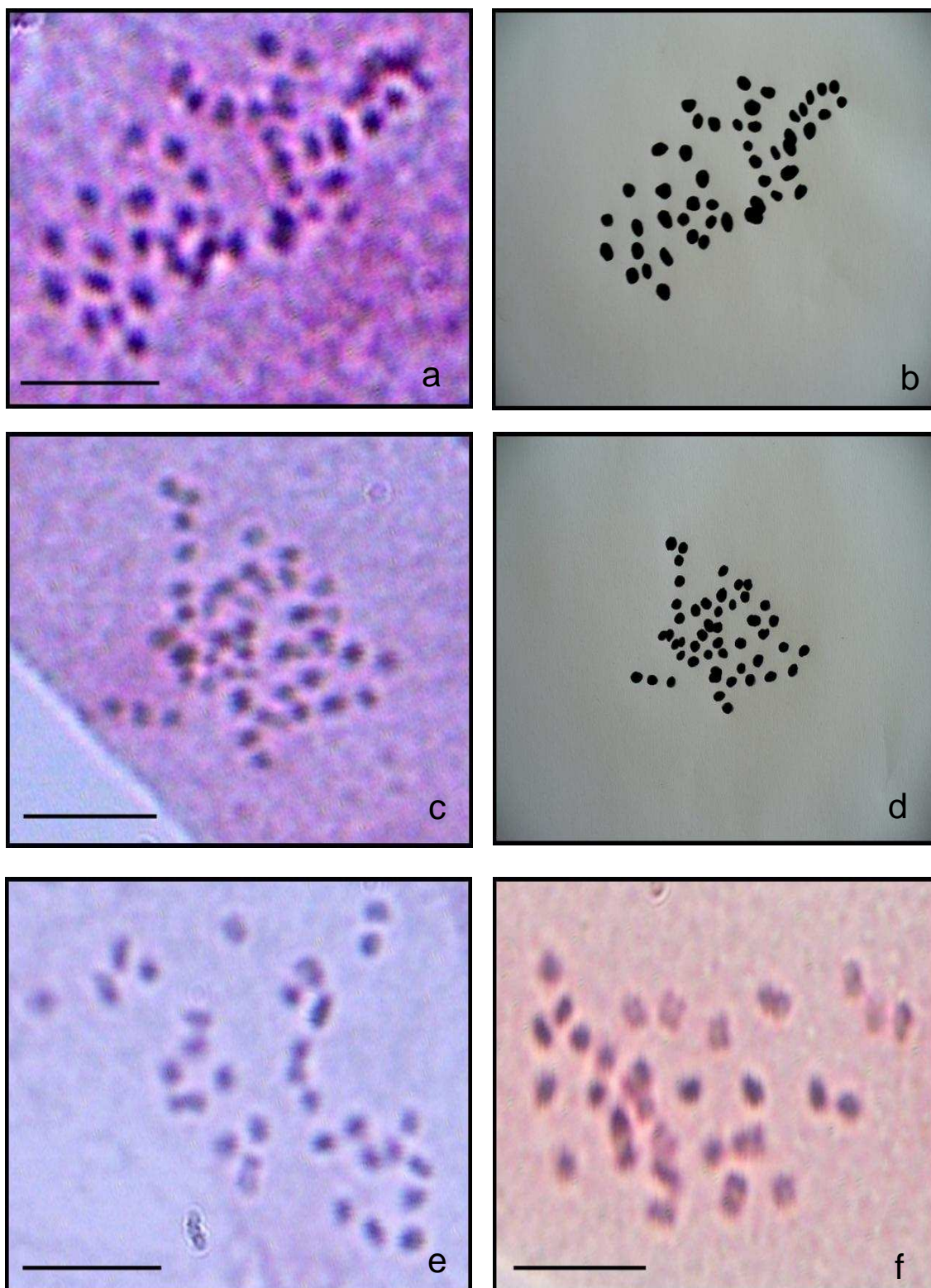


FIGURA 4. Cromossomos somáticos de *Hypericum*. a) *H. caprifoliatum*, população 1 com cerca de  $2n=48$ ; b) desenho esquemático da figura 4a; c) *H.cf carinatum*, população 15 com cerca de  $2n=48$ ; d) desenho esquemático da figura 4c. e-f) *H. perforatum*, população 18, com  $2n=32$  cromossomos. Escala: 10  $\mu\text{m}$ .



genética em nível citogenético. Então, certamente, o número cromossômico observado para a população 1 (ca.  $2n=48$ ) é o mesmo das plantas matrizes utilizadas no processo de micropropagação.

Concordando com Matzk *et al* (2003) *H. perforatum* é uma espécie tetraplóide ( $2n=4x=32$ ), baseado em  $x=8$  (Figura 4 e-f). Nielsen (1924) e Robson & Adams (1968) relataram para a espécie um número haplóide de 16 cromossomos ( $x=8$ ).

A partir da análise citológica, Mayo & Lamgridge (2003) relataram, para sete progênies recombinantes de populações australianas de *H. perforatum*, três progênies tetraplóides ( $2n=4x=32$ ), três hexaplóides ( $2n=6x=48$ ) e uma aneuplóide ( $2n-1=31$ ), sendo que todas as não recombinantes se mostraram tetraplóides. Conforme Matzk *et al* (2003), das espécies estudadas, há relatos de número cromossômico  $2n=48$ , para apenas duas: *H. perforatum* e *H. yezoense*, ambas pertencentes à seção *Hypericum*.

Os resultados mostram que os cromossomos somáticos das três espécies aqui estudadas são pequenos (cerca de 1,0 – 2,0  $\mu\text{m}$ ) e numerosos, dificultando, portanto, a determinação exata do número cromossômico. Estes resultados estão de acordo com Moraes (2007), que observou que o tamanho dos cromossomos variou de 1,0 – 2,5  $\mu\text{m}$  para *H. brasiliense* e de 1,0 – 2,0  $\mu\text{m}$  para *H. cordatum* e *H. ternum*, o que acabou dificultando a realização da análise cariomorfológica para as espécies.

Kogi (1984) relatou dificuldade ao analisar cariomorfológicamente espécies de *Hypericum* ocorrentes no Japão, devido ao pequeno tamanho dos cromossomos.

De acordo com Brutovská *et al* (2000b) os cromossomos de *H. perforatum* são pequenos (0,78 a 1,52  $\mu\text{m}$ ) e morfologicamente muito similares, dificultando a análise cariomorfológica em plantas com maior nível de ploidia. Por isso, segundo Brutovská *et al* (1998), tem se usado, para estimar o nível de ploidia, a citometria de fluxo, que permite uma análise mais rápida do conteúdo de DNA nuclear do que a determinação por contagem microscópica, que é muito difícil e trabalhosa, apesar de ser muito mais precisa.

Variações no conteúdo de DNA foram observadas por Matzk *et al* (2003), que relataram uma diferença significativa no tamanho do genoma entre indivíduos que se reproduzem sexualmente ou por apomixia.

#### **4.1.2. Análise meiótica**

A análise do comportamento meiótico nas populações de *H. caprifoliatum* e *H. cf. carinatum* também foi dificultada pelo pequeno tamanho dos cromossomos e freqüentes sobreposições, prejudicando, assim, a visualização dos mesmos. A presença de associações cromossômicas foi evidente, em muitas células em diacinese e/ou metáfase I, no entanto, foi difícil identificar quantos cromossomos estavam associados e qual era a configuração apresentada. Por outro lado, a espécie *H. polyanthemum* apresentou maior regularidade meiótica, permitindo, então, uma melhor compreensão das associações cromossômicas.

Outro problema consistiu na determinação do tamanho ideal dos botões florais em que se encontravam as fases meióticas, pois se observou uma variação entre e dentro das populações estudadas, prejudicando o fluxo

contínuo de trabalho. O tamanho dos botões variou de 0,3 a 0,5 cm nas populações de *H. caprifoliatum*, de 0,4 a 0,5 cm nas duas populações de *H. cf carinatum* e de 0,3 a 0,35 cm em *H. polyanthemum*. Além disso, alguns botões com desenvolvimento normal, apresentavam anteras menores e aparentemente vazias, contendo poucos meiócitos. A quantidade de anteras por botão floral variou de 73 (população 5) á 112 (população 2 e 4). Quanto ao horário de coleta dos botões florais não foram observadas diferenças no processo meiótico entre as populações.

Todas as fases da meiose, possíveis de serem identificadas, foram analisadas para documentar toda a divisão meiótica. Estão incluídas as fases anáfase I e II, telófase I e II, porém, em anáfase I não foi possível observar a regularidade na segregação cromossômica, devido à intensa sobreposição dos cromossomos. Por isso, foram consideradas normais as células em divisão que não apresentaram pontes ou cromossomos retardatários e o inverso para as anormais. A análise das fases da meiose pode ser observada na Tabela 2.

Nas populações analisadas de *H. caprifoliatum* (ca.  $2n=48$ ), em algumas células em diacinese e/ou metáfases I, foram observadas configurações cromossômicas, porém, para a grande maioria, devido à sobreposição dos cromossomos (Figura 5a), não foi possível realizar a identificação.

Em algumas células em diacinese das populações 1, 7, 10 e 11 (*H. caprifoliatum*) foi verificada a fissão do nucléolo (Figura 5b), comum em muitas plantas, como por exemplo, *Leucaena* (Boff, 2002).

TABELA 2. Número cromossômico e análise meiótica em espécies do gênero *Hypericum*. Porto Alegre, RS. 2007.

População	2n	Meiose					Número total de células
		Diacinese/ Metáfase I <sup>1</sup>	Anáfase I <sup>2</sup>	Telófase I <sup>2</sup>	Metáfase II <sup>2</sup>	Anáfase II/Telófase II <sup>2</sup>	
<i>H. caprifoliatum</i>							
1	48	60* (A) <sup>d</sup> 83*/55(No) <sup>m</sup>	41* (6) R / (5) P	4* (2) R	1*	3* <sup>All</sup> 124* / (57) R <sup>TII</sup>	316
2	ca. 48	10* (A) <sup>d</sup> 19* / 10 (No) <sup>m</sup>	6* (4) R / (1) P	8* (3) R	-	- 42* / (21) R <sup>TII</sup>	85
3	ca. 48	29* (A) <sup>d</sup> 74* / 66 (No) <sup>m</sup>	17* (2) P / (6) R	-	13* (5)R/(2) Oi	17* / (5) R <sup>All</sup> 61* / (19) R <sup>TII</sup>	211
4	ca. 48	27* (A) <sup>d</sup> 271* / 256 (No) <sup>m</sup>	98* (14) P / (34) R	3*	28* (12) R (4)Oi	9* / (6) R <sup>All</sup> 45* / (11) R <sup>TII</sup>	481
5	ca. 48	21* (A) <sup>d</sup> 325* / 202 (No) <sup>m</sup>	8* (6)R	14* (3) R	12* (6) R/ (1)Oi	- 32* / (11) R <sup>TII</sup>	412
6	ca. 48	- 51* / 32 (No) <sup>m</sup>	-	1* (1) R	-	- 18* / (7) R <sup>TII</sup>	70
7	ca.48	119* (A) <sup>d</sup> 266* / 245 (No) <sup>m</sup>	19* (10) R / (8) P	-	5* (2) R	- 30* / (16) R <sup>TII</sup>	439
8	ca.48	21* (A) <sup>d</sup> 69* / 64(No) <sup>m</sup>	8* (6) R / (2) P	2* (2) R	8* (4)R/(2)Oi	2* <sup>All</sup> 31* / (17) R <sup>TII</sup>	141

...continuação.

Tabela 2- Número cromossômico e análise meiótica em espécies do gênero *Hypericum*. Porto Alegre, RS. 2007.

População	2n	Meiose					Número total de células
		Diacinese/ Metáfase I <sup>1</sup>	Anáfase I <sup>2</sup>	Telófase I <sup>2</sup>	Metáfase II <sup>2</sup>	Anáfase II/ Telófase II <sup>2</sup>	
<i>H. caprifoliatum</i>							
9	ca.48	4* (A) <sup>d</sup> 108* / 66(No) <sup>m</sup>	37* (11)R/(13)P	1* -	3* (3) R	2* <sup>All</sup> 34* / (11) R <sup>TII</sup>	189
10	ca. 48	9* (A) <sup>d</sup> 491* / 221(No) <sup>m</sup>	20* (5)P/(11)R	- -	2* (1)R	- 90* / (29) R <sup>TII</sup>	612
11	ca. 48	2* (A) <sup>d</sup> 109* / 95 (No) <sup>m</sup>	8* (6)R / (2) P	3* (3) R	- -	- 33* / (21) R <sup>TII</sup>	155
12	ca. 48	10* (A) <sup>d</sup> 71* / 61 (No) <sup>m</sup>	34* (19)R / (9) P	4* (1) R	2* (1) R	- 34* / (18)R <sup>TII</sup>	155
13	ca. 48	15* (A) <sup>d</sup> 56* / 19 (No) <sup>m</sup>	1* -	1* (1) R	- -	- 47* / (23) R <sup>TII</sup>	120
14	ca.48	7* (A) <sup>d</sup> 46* / 36 (No) <sup>m</sup>	2* (1)R / (1) P	4* (1) R	- -	- 54* / (28)R <sup>TII</sup>	113
<i>H. cf carinatum</i>							
15	48	11* (A) <sup>d</sup> 203* / 194 (No) <sup>m</sup>	84* (18)R/(61) P	- -	31* (15)R/(6)Oi	9* / (7) R <sup>All</sup> 60* / (19) R <sup>TII</sup>	398

...continuação.

Tabela 2- Número cromossômico e análise meiótica em espécies do gênero *Hypericum*. Porto Alegre, RS. 2007.

População	2n	Meiose					Número total de células
		Diacinese/ Metáfase I <sup>1</sup>	Anáfase I <sup>2</sup>	Telófase I <sup>2</sup>	Metáfase II <sup>2</sup>	Anáfase II/ Telófase II <sup>2</sup>	
16	ca.48	- 19*/ 17 (No) <sup>m</sup>	-	8* (5)R	-	- 38* / (24) R <sub>III</sub>	65
<i>H. polyanthemum</i>							
17	ca. 32	5* (14II -4I) <sup>d</sup>	1*	6* (3) R	3* (2) R	- 1* / (1) R	16
<i>H. perforatum</i>							
18	32	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> Diacinese (d), I univalentes, II bivalentes, (A) associações não identificadas e Metáfase I (m), \* número de células observadas, (No) número de células com cromossomos não orientados

<sup>2</sup> Anáfase I e II, telófase I e II, metáfase II: \* número de células observadas, ( ) número de células com pontes cromossômicas P e/ou retardatários R ou outras irregularidades.

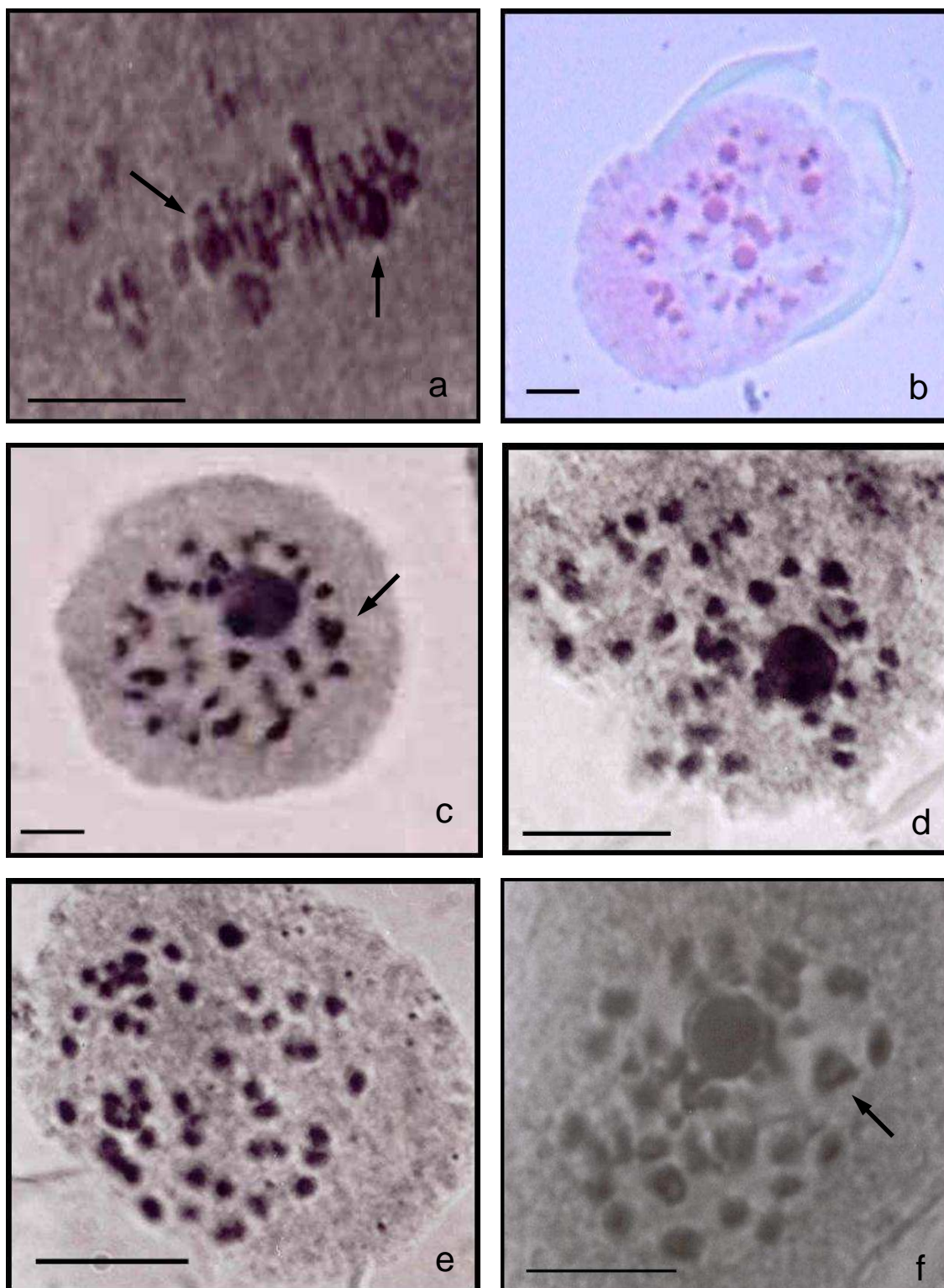


FIGURA 5. Células mãe-de-pólen em meiose de *H. caprifoliatum*. a) população 14, sobreposição entre os cromossomos. b) população 7, fissão nucleolar. Diacineses em: c) população 1, d) população 4, e) população 7, f) população 8. Seta - indica associações cromossômicas maiores que bivalentes. Escala 10 $\mu$ m.

Em relação às duas populações de *H. cf carinatum* (ca.  $2n=48$ ), as células analisadas mostraram que, semelhante ao observado em *H. caprifoliatum*, o processo meiótico apresenta irregularidades. Para a população 17 de *H. polyanthemum* a meiose mostrou maior regularidade, se comparada às espécies acima citadas, com ca.  $2n=32$ .

Somente para as populações 1 (Porto Alegre), 4 (Sananduva), 7 (Galópolis), 8 (Campestre da Serra), 9 (Marcelino Ramos), 15 (Eldorado do Sul) e 17 (Porto Alegre) foram observadas algumas células em diacinese passíveis de serem analisadas (Figura 5 c-f e Figura 6 a-c). Nas demais populações, os problemas acima citados prejudicaram a identificação das configurações.

Em *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum* foram observadas associações do tipo multivalentes. *H. polyanthemum*, em diacinese, apresentou predominantemente associações do tipo bivalentes.

Em metáfase I foi muito comum a presença de cromossomos, possivelmente bivalentes e/ou univalentes, não orientados na placa equatorial. As células nesta fase da meiose I, que apresentavam estes cromossomos não orientados, foram consideradas anormais (Figura 7a). A maior percentagem de metáfases I anormais foi observada nas seguintes populações: 3 (89%), 4 (94%), 7 (92%), 8 (93%), 11 (87%), 12 (86%), 15 (96%) e 16 (89,5%). Já, nas demais populações analisadas, a percentagem variou de 34 % (população 13) a 78% (população 14) (Tabela 2). Na população 1, 11, 14 e 17 foram verificadas algumas metáfases com cromossomos melhor espalhados, permitindo a observação de associações cromossômicas maiores que bivalentes, mas não sua resolução (Figura 7b-c).



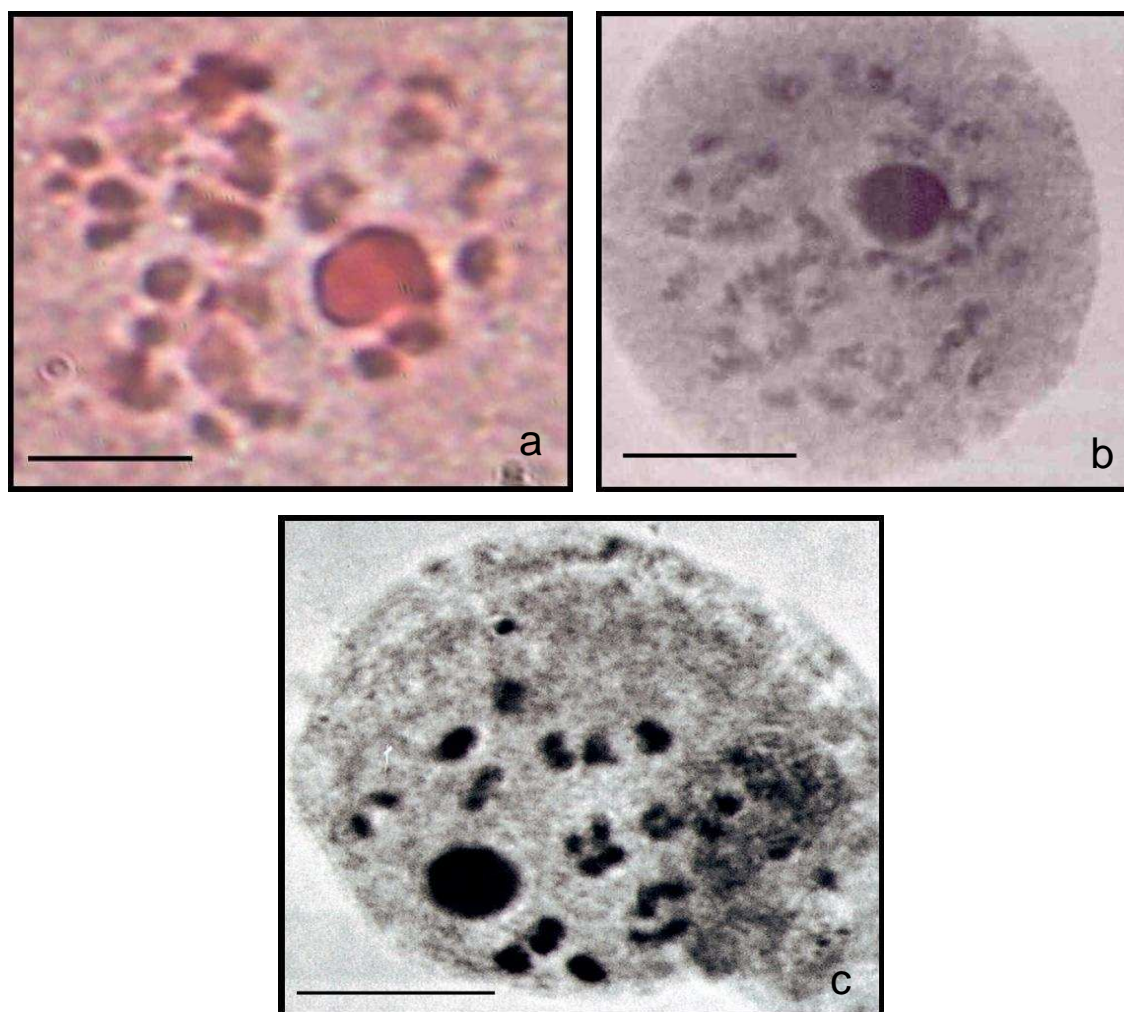


FIGURA 6. Células mãe-de-pólen em meiose de *Hypericum*. Diacineses em a) *H. caprifoliatum*, população 9. b) *H. cf. carinatum*, população 15. c) *H. polyanthemum*, população 17. Escala 10 $\mu$ m.

Conforme Moraes (2007) poucas irregularidades meióticas foram observadas em *H. brasiliense*. No entanto, *H. cordatum* e *H. ternum*, apresentaram meiose predominantemente anormal, sendo comum a presença de cromossomos não alinhados na placa equatorial durante a metáfase I. Cabe ressaltar que estas três espécies pertencem à mesma seção (*Trigynobrathys*) de *H. caprifoliatum*, *H. cf. carinatum* e *H. polyanthemum*.

Não é rara a ocorrência de anormalidades meióticas em populações naturais, por exemplo, segundo Pozzobon (2005) a presença de bivalentes

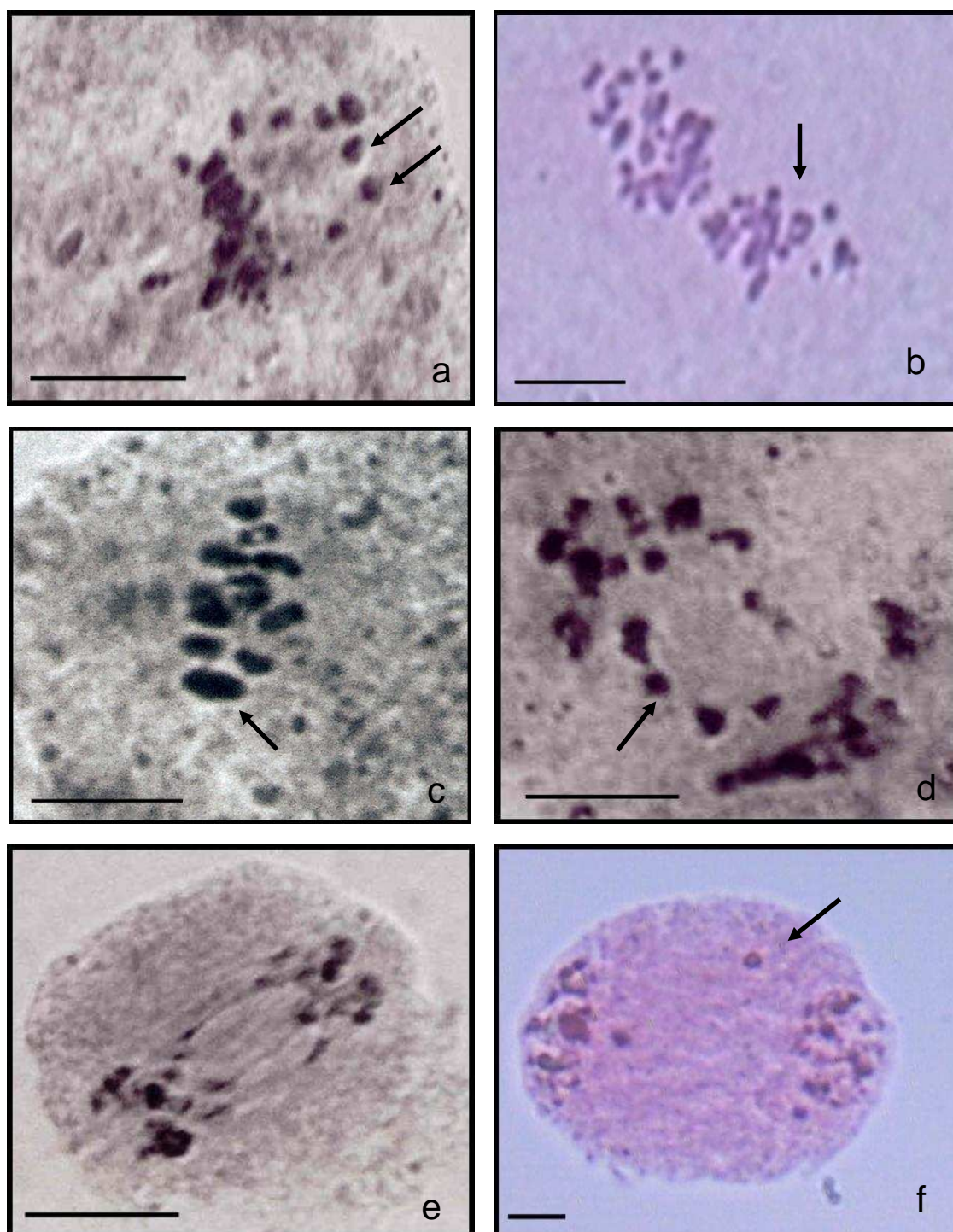


FIGURA 7. Células mãe-de-pólen em meiose de *Hypericum*. a, b, d, e) *H. caprifoliatum*. a) população 4, metáfase I com cromossomos fora da placa equatorial (seta). b) população 1 e c) *H. polyanthemum*, população 17, metáfase I com associações cromossômicas não identificadas (setas). d) população 4, anáfase I com retardatários (seta). e) população 4, anáfase I com ponte cromossômica f) *H. cf. carinatum* população 16, telófase I com cromossomos retardatários (seta). Escala 10 $\mu$ m.

não orientados na placa equatorial foi comum em acessos de espécies silvestres e semidomesticadas do gênero *Capsicum*. Células metafásicas com cromossomos fora da placa equatorial também foram observadas em três populações de *Foeniculun vulgare* Mill. (Apiaceae), popularmente conhecido como funcho (Battistin *et al*, 2006).

Hoar & Haertl (1932) analisaram a meiose de algumas espécies do gênero *Hypericum*, entre as quais *H. gentianooides* ( $2n=24$ ), pertencente à seção *Trigynobrathys* e, não observaram irregularidades no comportamento cromossômico.

No presente trabalho, nas demais fases da meiose, foram observadas, além de células aparentemente normais, várias irregularidades (Tabela 2). As irregularidades mais freqüentes foram cromossomos retardatários e/ou pontes cromossômicas em anáfase I (Figura 7d-e) e II e telófase I (Figura 7f), e micronúcleos em telófase II (Figura 8a-b). Em telófase II foi observada a formação de três núcleos ou mais, em vez de quatro (Figura 8c). Na metáfase II, foi observada disparidade em relação ao início da migração dos cromossomos para os pólos da célula e cromossomos fora da placa (Figura 8d-e). Estas irregularidades tiveram conseqüências diretas na formação irregular das tétrades de micrósporos.

Os estudos sobre o processo meiótico em espécies de *Hypericum* do Rio Grande do Sul, principalmente para *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum*, demonstraram meiose bastante irregular, e devido a estas irregularidades e os demais problemas citados anteriormente, não foi possível analisar o comportamento meiótico para cada população. Apesar do número de células

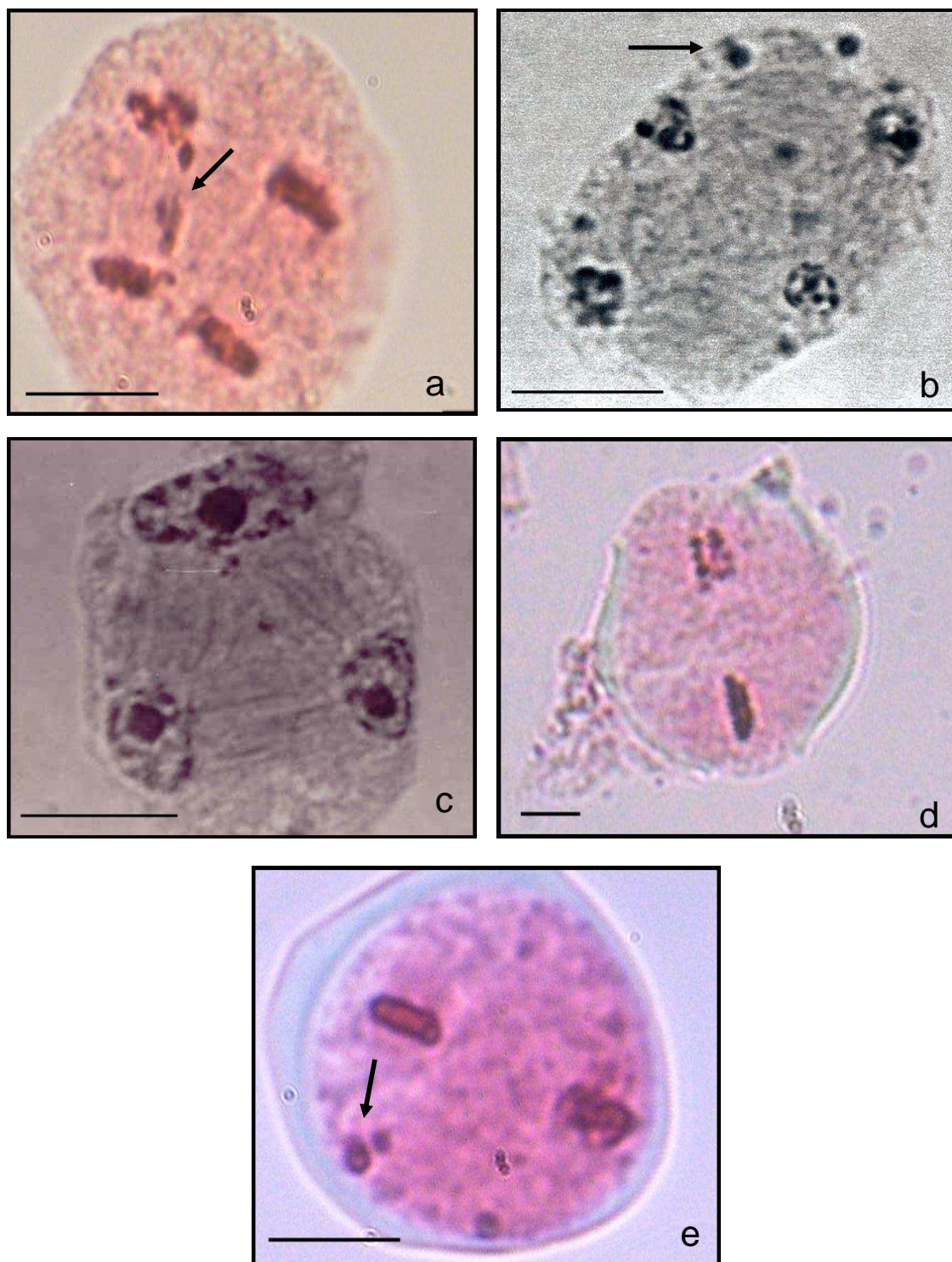


FIGURA 8. Células mãe-de-pólen em meiose de *Hypericum*. a, c, d, e) *H. caprifoliatum*. a) população 1, final de anáfase II com cromossomos retardatários (seta). b) *H. polyanthemum*, população 17, telófase II com micronúcleos (seta). c) população 2, telófase II com 3 núcleos. d) população 3, metáfase II. e) população 8, metáfase II com cromossomos retardatários (seta). Escala 10 $\mu$ m.

analisadas para a população de *H. polyanthemum* ter sido muito baixa, foi possível observar que esta espécie apresenta maior regularidade meiótica.

Reunindo os dados da literatura (Hoar & Haertl, 1932; Moraes, 2007) com os obtidos neste estudo pode-se inferir que há variação, em relação ao processo meiótico, entre diferentes espécies do gênero. No entanto, mais análises citológicas são necessárias em outras espécies.

#### **4.1.3. Estimativa do índice meiótico**

Na Tabela 3 são apresentados os resultados observados em 17 populações para o estudo de tétrades. De cada população foram analisadas pelo menos três lâminas, sendo contadas aleatoriamente, no mínimo 200 tétrades. Para as populações 6 e 12, não foi possível a análise de 200 células, tendo em vista a baixa quantidade de botões florais obtidos durante a coleta, pois ambas se encontravam basicamente em estágio de frutificação. Durante as análises foram observadas variações na percentagem de tétrades normais entre botões da mesma população. Possivelmente estejam relacionadas à quantidade de anteras funcionais presentes em cada botão floral.

Todas as populações analisadas apresentaram índice meiótico abaixo de 90%. Segundo Love (1949), somente plantas com índice meiótico acima de 90% podem ser consideradas citologicamente estáveis e, portanto, passíveis de fazerem parte de um possível programa de melhoramento.

O índice meiótico variou de 44 (população 11) a 80% (população 17) entre as populações estudadas, apresentando tétrades com quatro micrósporos normais, conforme Figura 9 a. A população 17, que apresentou o

maior índice meiótico, foi também, a que apresentou a maior regularidade meiótica.

TABELA 3. Índice meiótico em espécies do gênero *Hypericum*. Porto Alegre, RS. 2007.

População	Tétrades	Díade	Tríade	Outras irregularidades	Total de células	Índice Meiótico (IM %)
<i>H. caprifoliatum</i>						
1	407	42	51	258	758	54,00
2	148	12	13	93	266	56,00
3	312	18	12	118	460	68,00
4	171	9	17	37	234	73,00
5	359	13	17	118	507	71,00
6	102	3	2	44	151	68,00
7	268	14	8	231	521	51,00
8	231	3	9	219	462	50,00
9	143	8	-	52	203	70,00
10	261	24	10	71	366	71,00
11	237	47	20	234	538	44,00
12	93	12	3	57	165	56,00
13	145	14	1	109	269	54,00
14	205	35	5	110	355	58,00
<i>H. cf carinatum</i>						
15	328	3	4	92	427	77,00
16	180	19	1	72	272	66,00
<i>H.</i>						
<i>polyanthemum</i>						
17	241	-	2	59	302	80,00

Além das tétrades normais, várias irregularidades foram observadas, como micrósporos de diferentes tamanhos, políades com diferente número de micrósporos e/ou micrócitos, díades, tríades (Figura 9 b-f e 10 a-f).

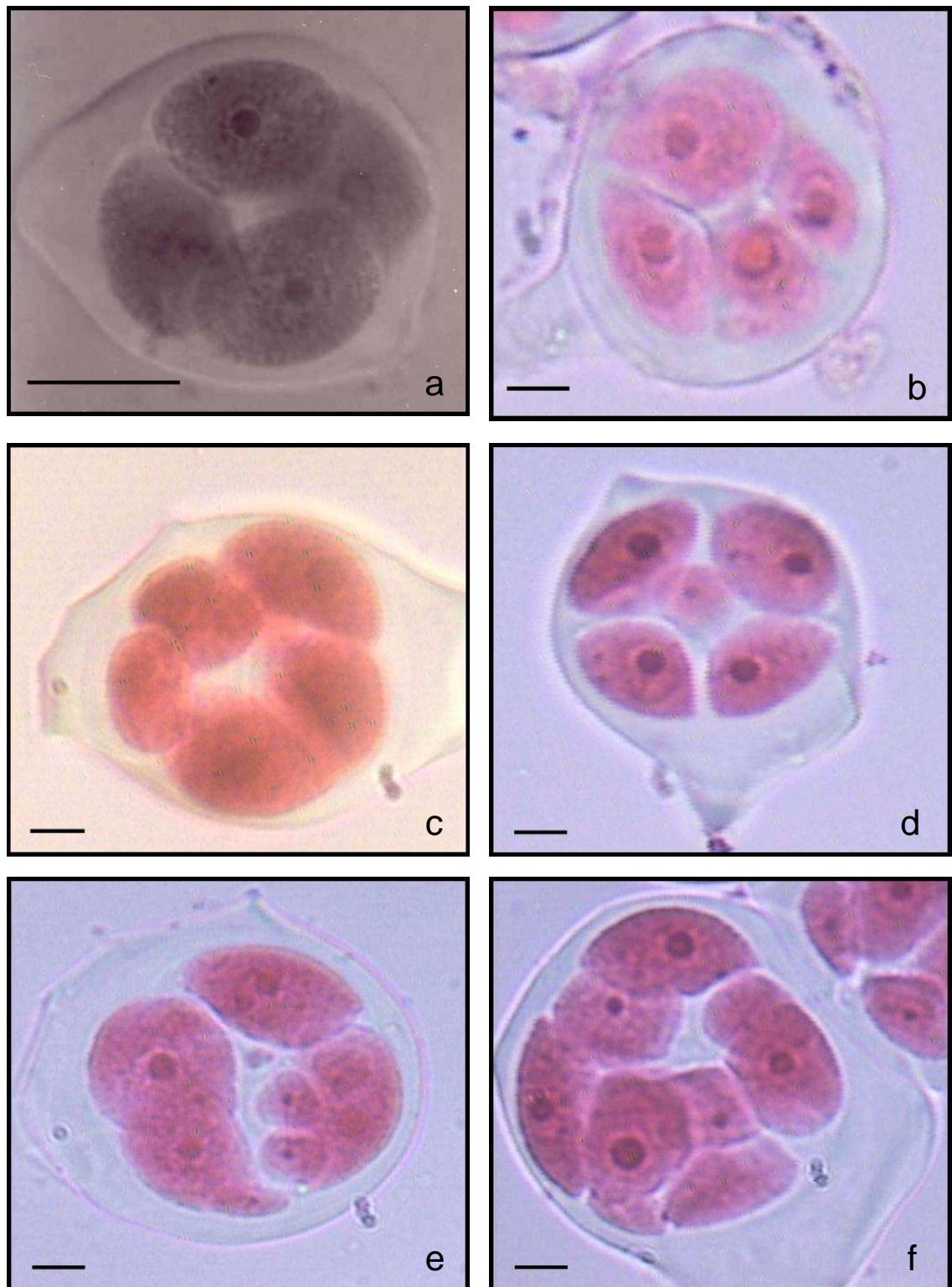


FIGURA 9. Tétrades e poliádes em *Hypericum*. a, b, c, e, f) *H. caprifoliatum*. a) população 4, tétrede. b) população 1, micrósporos com tamanho desigual. c) população 14, pêntade. d) *H. cf carinatum*, população 15, tétrede com micrócito. e-f) população 4, tétrede com micrócitos. Escala 10 $\mu$ m.

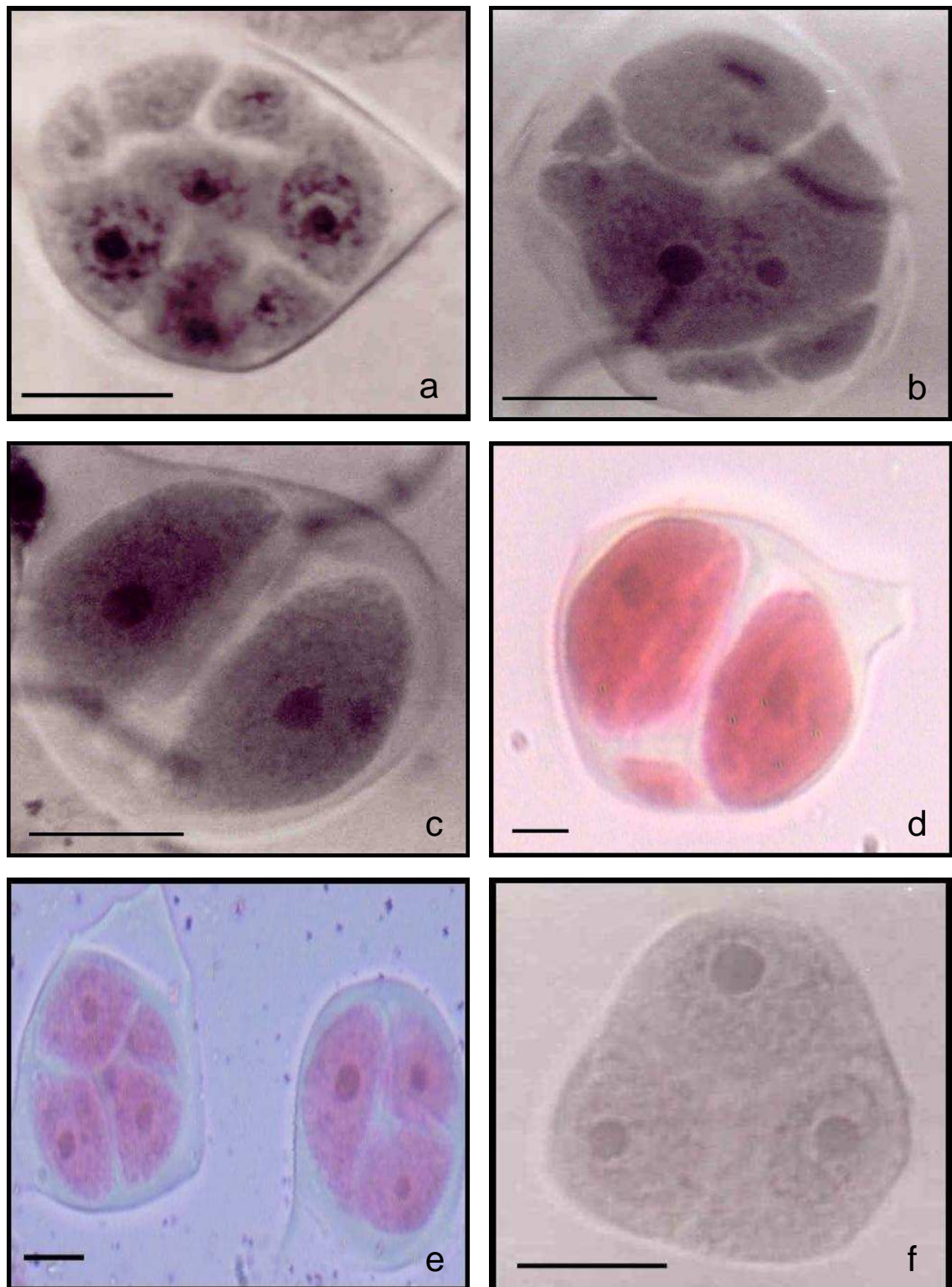


FIGURA 10. Tétrades e políades em *H. caprifoliatum*. a) população 7, políade. b) população 12, políade. c) população 12, díade. d) população 14, díade com micrócito. e) população 11, tétrade e tríade. f) população 1, tríade. Escala 10 $\mu$ m.



Na fase de tétrade, a presença de díades e tríades foi observada com frequência entre 0,0% (população 17) - 9,9% (população 14) e 0,0% (população 9) - 7,3% (população 4), respectivamente (Tabela 3).

As populações 11, 12, 14 e 16 foram as que apresentaram a maior percentagem de díades (Figura 11). Segundo Yan *et al* (1997) a presença de díades entre os quartetos é um indicativo da formação de gametas não reduzidos e, tríades e outros números são indicativos da formação de gametas com número cromossômico diferenciado. Para Corrêa (2000), a presença de tétrades anormais é indicativo de processo meiótico irregular e, conseqüentemente, de diminuição de viabilidade de pólen.

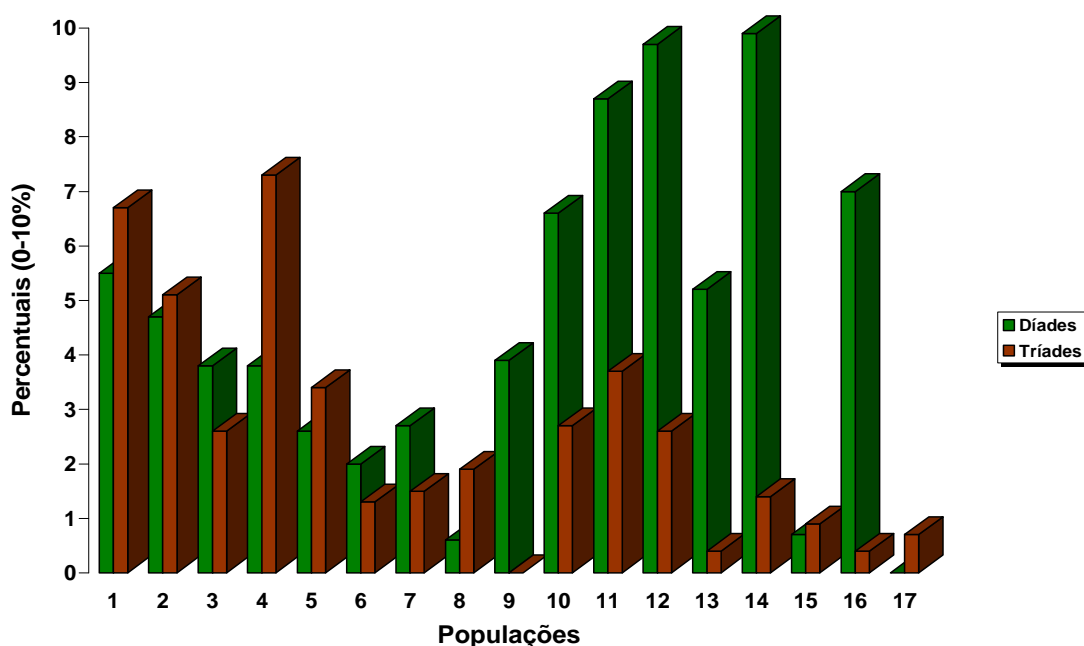


FIGURA 11. Percentagem de díades e tríades observadas nas populações de *Hypericum*. 1-14: *H. caprifoliatum*; 15-16: *H. cf. carinatum*; 17: *H. polyanthemum*. Porto Alegre, RS. 2007.

Micrócitos também foram observados nas populações estudadas. Conforme Pozzobon (2005), os micrócitos geralmente são formados pelos cromossomos que não se conjugaram durante a primeira divisão meiótica, ou

seja, que permaneceram como retardatários em anáfase I, originando, posteriormente, os micronúcleos na telófase I e na meiose II.

Baptista-Giacomelli *et al* (2000) também observaram a presença de micronúcleos em variedades de *Avena sativa* L. Em uma variedade de aveia, após a formação do micrósporo, o micronúcleo foi eliminado como um micrócito, dando origem a um grão de pólen pequeno e estéril.

Cabe ressaltar que pouco se conhece sobre o sistema reprodutivo das espécies do gênero *Hypericum*. Entretanto, devido às irregularidades meióticas observadas, principalmente em *H. caprifoliatum* e *H. cf. carinatum*, possivelmente o modo de reprodução predominante seja a apomixia, que é comum no gênero, conforme o trabalho de Matzk *et al* (2003).

#### **4.1.4. Estimativa da viabilidade de pólen**

Estudos sobre a viabilidade do pólen são realizados na maioria dos trabalhos e fornecem subsídios para avaliar o potencial de fertilidade masculina de indivíduos e populações, contribuindo para estudos taxonômicos e de melhoramento de plantas.

Uma das técnicas mais utilizadas para observar a viabilidade de pólen é a técnica com coloração de carmim (Boff & Schifino-Wittmann, 2002; Corrêa *et al*, 2005, Conterato & Schifino-Wittmann, 2006; Pozzobon & Schifino-Wittmann, 2006), onde grãos completamente corados são considerados viáveis e grãos parcialmente corados ou vazios são considerados inviáveis. Na presente análise, como todos os grãos de pólen apresentaram capacidade de coloração frente ao corante utilizado, a viabilidade foi estimada pelo seu tamanho, a partir de medidas do eixo longitudinal e transversal dos grãos,

sendo considerados viáveis aqueles grãos que se classificavam nas classes de tamanhos mais freqüentes em cada população.

Em *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum*, durante a realização das lâminas, foram observadas variações florais intra e interpopulacionais. Em geral, todos os botões apresentavam todas ou a maioria das anteras claras, restando poucas de coloração amarela. Moraes (2007) observou o mesmo em *H. brasiliense* e caracterizou as flores com anteras claras como macho-esteréis, pois a partir de secções anatômicas das mesmas foi possível visualizar a má formação dos grãos de pólen.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados obtidos, onde consta diâmetro médio (mínimo e máximo), mediana dos grãos de pólen e a estimativa da fertilidade para cada população analisada. Os dados detalhados para cada população encontram-se no Apêndice 1.

A partir da análise do diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) dos grãos de pólen foi observada uma ampla variação no tamanho, dentro e entre populações (Figura 12 a-b). A maior variação foi encontrada na população 11, sendo o limite inferior 11,5  $\mu\text{m}$  e o limite superior 66,0  $\mu\text{m}$ ; a menor variação foi observada na população 17, variando de 18,5 a 25,0  $\mu\text{m}$ . Entre populações, o tamanho dos grãos de pólen variou de 5,0  $\mu\text{m}$  (limite inferior) a 66,0  $\mu\text{m}$  (limite superior) e a mediana variou de 19,0 a 33,5  $\mu\text{m}$  (Figura 13).

O tamanho mais comum de grãos de pólen entre as populações de *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum* foi de 20,0  $\mu\text{m}$  à 30,0  $\mu\text{m}$ , com pequenas variações acima ou abaixo deste intervalo, para algumas populações. Para a população 17 de *H. polyanthemum* o tamanho mais freqüente foi de 20,0  $\mu\text{m}$  à 23,5  $\mu\text{m}$ .

TABELA 4. Diâmetro mínimo, máximo, mediana, limite de classes e estimativa da fertilidade dos grãos de pólen em populações de *Hypericum*. Porto Alegre, RS. 2007.

População	Diâmetro mínimo (µm)	Diâmetro máximo (µm)	Mediana (µm)	Limite de classes (µm)	Fertilidade (%)
<i>H. caprifoliatum</i>					
1	7,50	38,00	25,00	20,00 I- 30,00	59,00
2	5,00	38,50	20,00	20,00 I- 30,00	44,00
3	5,00	56,00	22,50	17,00 I- 29,00	69,00
4	5,00	32,50	25,00	18,50 I- 29,75	88,00
5	5,00	31,50	23,50	20,40 I- 31,40	68,00
6	10,00	31,00	22,50	20,20 I- 30,40	71,00
7	5,00	31,00	22,50	19,00 I- 29,00	64,00
8	8,00	37,50	19,75	19,50 I- 28,70	51,00
9	5,00	33,50	19,00	18,50 I- 29,75	57,00
10	9,00	32,00	23,50	19,80 I- 30,60	83,00
11	11,50	66,00	33,50	20,00 I- 32,75	42,00
12	10,00	35,00	20,00	20,00 I- 30,00	48,00
13	8,00	29,00	20,00	19,90 I- 30,10	57,00
14	10,0	54,00	30,00	17,00 I- 31,00	45,00
<i>H. cf carinatum</i>					
15	7,50	40,00	25,00	18,10 I- 31,35	88,00
16	12,00	48,50	30,00	18,00 I- 33,00	65,00
<i>H. polyanthemum</i>					
17	18,50	25,00	22,00	20,00 I- 23,50	89,00

A viabilidade do pólen variou de 42 a 89% entre as populações analisadas e foi estimada a partir da percentagem de grãos das classes de tamanhos mais freqüentes (Tabela 4).

A variação na viabilidade do pólen pode ser associada às variações florais intra e interpopulacionais observadas nas espécies de *Hypericum*. Foram utilizados botões florais com tamanho padrão de 0,6 cm para as populações de *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum* e 0,5 cm para *H.*

*polyanthemum*. Para as populações 4, 6, 10, 15 e 17, com alta viabilidade de pólen, os botões florais possuíam todas as anteras amarelas. Já para as populações 2, 11, 12 e 14, com baixa viabilidade de pólen, os botões florais possuíam todas as anteras brancas. Nas demais populações analisadas, no mesmo botão havia anteras brancas e amarelas.

Moraes (2007) realizou testes de viabilidade do pólen em três espécies da seção *Trigynobrathys*, nativas do Brasil, e relatou para *H. brasiliense* viabilidade de  $83\% \pm 3,0$ , utilizando corante Alexander. Para *H. cordatum* e *H. ternum*, espécies que apresentaram meiose bastante irregular, a viabilidade foi de  $66\% \pm 5,5$  e  $61\% \pm 9,0$ , respectivamente, utilizando como corante carmim acético 1,2%, pois o corante Alexander não mostrou-se eficiente, já que corava os grãos de pólen de modo escasso, não permitindo conclusões sobre viabilidade e não-viabilidade.

Para estimar a fertilidade masculina, Matzk *et al* (2003) coraram os grãos de pólen com carmim acético 4% e observaram que espécies apomíticas facultativas de *Hypericum* apresentaram uma menor percentagem de pólen viável/corado (58-80%) em comparação aos sexuais (89-97%). Conforme Arda *et al* (2006) a viabilidade estabelecida para *H. perforatum* e *H. rumeliacum* foi de 83 e 72%, respectivamente.

Macropólens encontrados nas populações de *Hypericum* (Figura 12 c), assim como díades e tríades, são indicativos de gametas não reduzidos (GNR). Porém, há necessidade de uma análise mais detalhada da divisão meiótica, para inferir com certeza a não redução meiótica. Grãos de pólen maiores foram encontrados por Boff (2002) em *Leucaena* e Simioni (2004) em trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.).

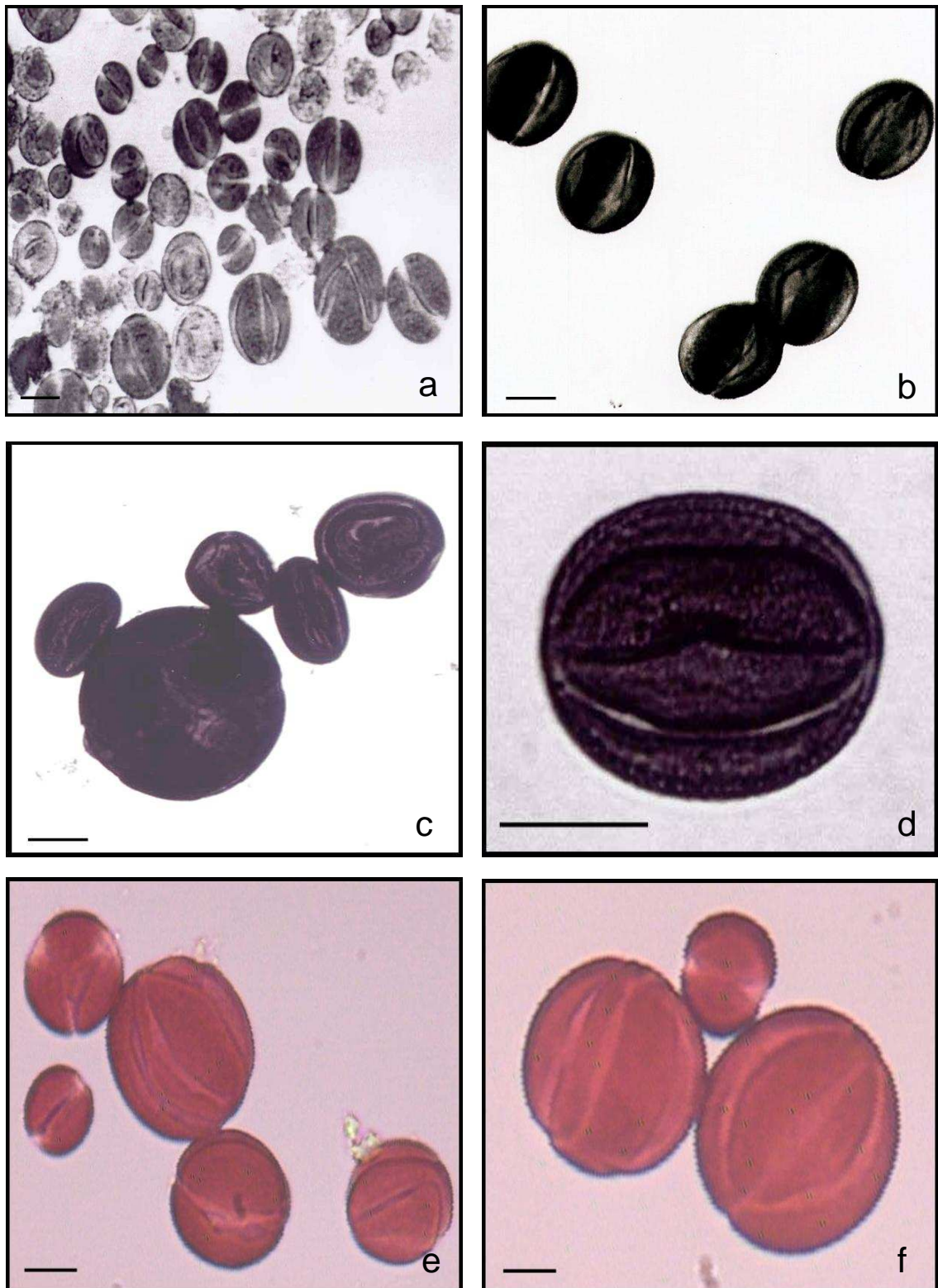


FIGURA 12. Grãos de pólen de espécies de *Hypericum*. a,c,d,e,f) *H. caprifoliatum*. a) população 13, variação no tamanho. b) população 17, *H. polyanthemum*, grãos com tamanho similar. c) população 14, variação na morfologia e macropólen. d) população 5. e, f) população 6. diferentes tamanhos. Escala 10  $\mu\text{m}$ .

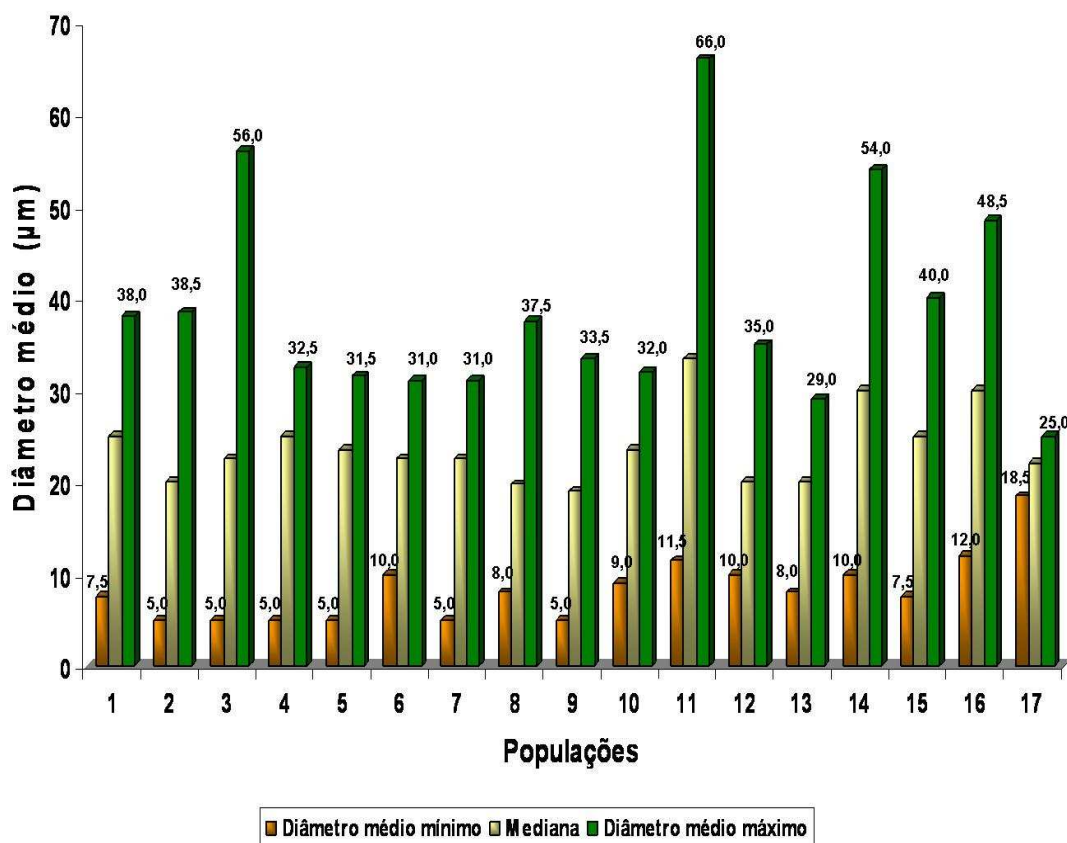


FIGURA 13. Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) mínimo, máximo e mediana dos grãos de pólen em espécies de *Hypericum*. Porto Alegre, RS. 2007.

Os grãos de pólen pequenos observados nas populações de *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum* (Figura 12 e-f) provavelmente originaram-se dos cromossomos não alinhados na placa equatorial e/ou retardatários observados durante a meiose. Moraes (2007) também observou grãos de pólen minúsculos em *H. cordatum* e *H. ternum*.

Segundo Clarke (1975) a maioria das espécies de *Hypericum* produz uma proporção de grãos de pólen irregulares (30%), os quais raramente são maiores que o normal. Apenas três seções (*Ascyreia*, *Spachium* e *Hirtella*) possuem espécies com mais de 50% dos grãos de pólen irregulares. Dentro da seção *Spachium* (*Trigynobrathys*), para os indivíduos analisados, foram observadas irregularidades variando de 50 a 100% em *H. caprifoliatum* e *H.*

*connatum*. No entanto, grãos irregulares podem ser férteis ou inférteis, como por exemplo, *H. lydium* que tinha aproximadamente 96% dos grãos irregulares, mas apresentou fertilidade de 30%. Para distinguir entre grãos com e sem citoplasma foi utilizado o corante Alexander.

Durante as análises, foram observados grãos de pólen polimórficos, variando de formato arredondado a elíptico, no mesmo botão floral (Figura 12 c, d). Moraes (2007) também observou diferenças no formato e tamanho dos grãos de pólen em *H. brasiliense*, *H. cordatum* e *H. ternum*.

Conforme Clarke (1975), Van Campo (1966) incluiu a família Guttiferae na lista das famílias que apresentavam pólen dimórfico ou polimórfico. Clarke analisou cerca de 238 espécies de *Hypericum* e relatou que o mesmo botão floral ou a mesma antera, normalmente, contém uma mistura de grãos de pólen com diâmetros variáveis.

Calic *et al* (2003/4) analisaram a variabilidade no tamanho dos grãos de pólen em *Aesculus hippocastanum* L. e observaram uma distribuição bimodal, onde botões com o mesmo tamanho apresentavam grãos de pólen com diâmetros distintos.

Estudos polínicos realizados em algumas espécies brasileiras da família Clusiaceae Lindl. (Gonçalves-Esteves & Mendonça, 2001) e do gênero *Cheiloclinium* Miers (Hippocrateaceae Juss.) (Gonçalves-Esteves & Melhem, 2004) mostraram a possibilidade de separação de espécies ou de grupos de espécies a partir de variações no tamanho e formato dos grãos de pólen. Das espécies analisadas neste trabalho, foram observadas variações em relação ao tamanho e ao formato dos grãos de pólen em *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum*.



A grande variação observada na viabilidade dos grãos de pólen é compatível com estudos prévios que mostraram índice meiótico também variável entre as populações (Figura 14). A maioria das populações (1, 2, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14 e 16) apresentou índice meiótico abaixo de 70%, sendo que as demais variaram de 70-80%. Comparando-se os dados da Tabela 3 com a Tabela 4 verifica-se uma maior relação entre índice meiótico e estimativa da fertilidade dos grãos de pólen nas populações 1, 3, 5, 6, 8, 11, 13, 16 (Figura 14). A menor relação observada nas demais populações pode ser devido as variações florais intra e inter-populacionais observadas nestas espécies.

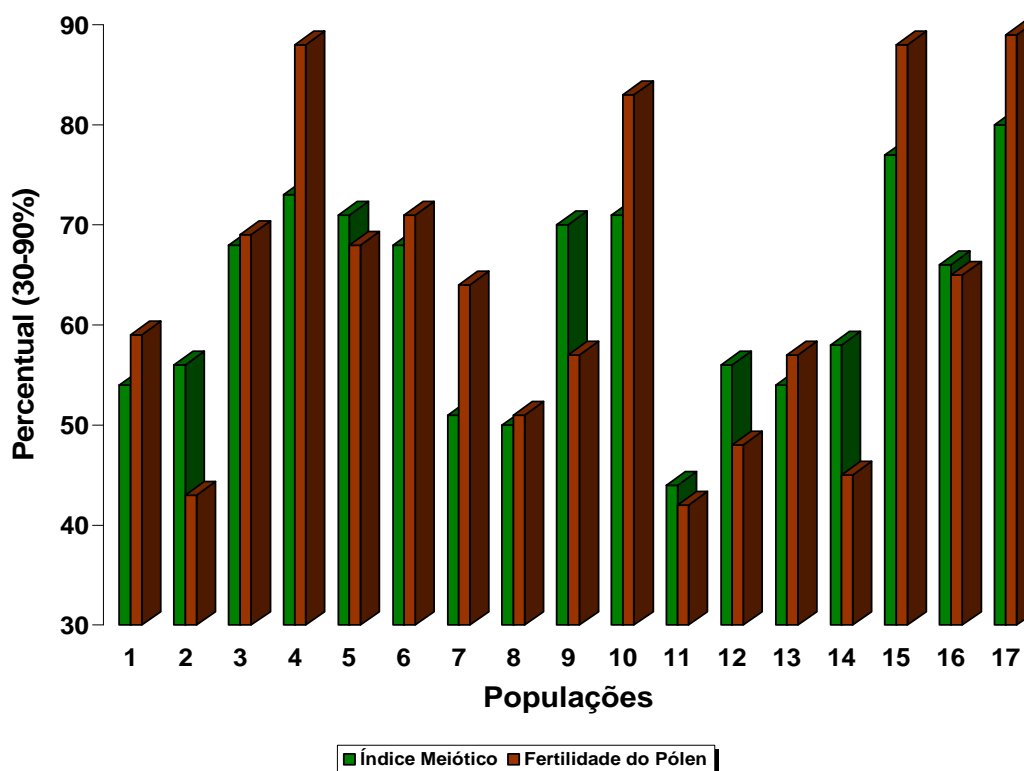


FIGURA 14. Médias percentuais das populações de *Hypericum* quanto ao índice meiótico e estimativa da fertilidade dos grãos de pólen. Porto Alegre, RS. 2007.

Portanto, a alta variação no tamanho e fertilidade dos grãos de pólen nas populações de *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum* sugere a apomixia como modo de reprodução predominante, a fim de garantir a manutenção das sucessivas gerações. A baixa variação do tamanho dos grãos de pólen na população 17 (*H. polyanthemum*) é reflexo da maior regularidade meiótica, e permite sugerir que o modo de reprodução para esta população é sexual.

#### **4.1.5. Germinação *in vitro* dos grãos de pólen**

Os testes de germinação *in vitro* foram realizados tanto em temperatura ambiente (20-25 °C) quanto em BOD (25 °C) para apenas três populações (população 1 de *H. caprifoliatum*, população 15 de *H. cf carinatum* e população 17 de *H. polyanthemum*). Durante a coleta foi constatado que as flores da população 1 apresentavam a maioria das anteras brancas e pequenas, com aproximadamente 10% de anteras amarelas, justificando a menor disponibilidade de grãos de pólen. Para as outras duas populações analisadas, todas as flores possuíam anteras amarelas e maiores e, por isso, maior disponibilidade de pólen.

A germinação *in vitro*, para o experimento mantido em temperatura ambiente, foi monitorada, em microscópio ótico, de hora em hora, até quatro horas. Após 24 horas, não foi possível a observação, pois o meio estava desidratado, possivelmente devido à baixa umidade do ar. Conforme observado na Tabela 5, para *H. polyanthemum*, foi observada uma pequena variação entre os tempos de germinação (Figura 15 a-b). Durante a análise, não foi observado nenhum grão germinado para *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum*.

Para o experimento mantido em incubadora do tipo BOD, a população 1 de *H. caprifoliatum* não apresentou, durante a análise, grãos de pólen germinados (Figura 15 c). Já, para a população 15 de *H. cf carinatum*, somente 24 horas após o início do experimento foi possível observar alguns grãos iniciando o processo de emissão do tubo polínico (Figura 15 d), entretanto, não foi realizada contagem. Foi observado um atraso no início da emissão e um menor crescimento do tubo polínico para *H. polyanthemum* se comparado ao tratamento realizado em temperatura ambiente (Figura 15 e-f) e, por isso, a contagem foi realizada somente quatro e 24 horas após a montagem do experimento (Tabela 5).

TABELA 5. Viabilidade de pólen de *H. polyanthemum* baseada em germinação *in vitro* dos grãos de pólen. Porto Alegre, RS. 2007.

Tempo	L 1		L 2		L 3		L 4		% germinação
	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	
1h TA	14	31	5	18	10	17	9	13	32
2h TA	6	11	17	29	11	18	5	11	36
3h TA	18	19	7	18	25	27	5	26	38
4h TA	15	19	13	16	19	31	3	11	39
4h BOD	9	44	12	58	15	51	5	23	19
24h BOD	23	32	15	20	25	27	17	21	44

L: lâmina; G: grão de pólen germinado; NG: não germinado; TA: temperatura ambiente; BOD: incubadora.

De acordo com Cavalcante (1999) a viabilidade dos grãos de pólen é influenciada pelas variações de temperatura e umidade que induzem mudanças significativas na resposta do grão de pólen. Alta temperatura e umidade ocasionam diminuição na viabilidade.

O percentual máximo de germinação dos grãos de pólen de *H. polyanthemum* foi 44%, contrastando com 89% de viabilidade. Moraes (2007)

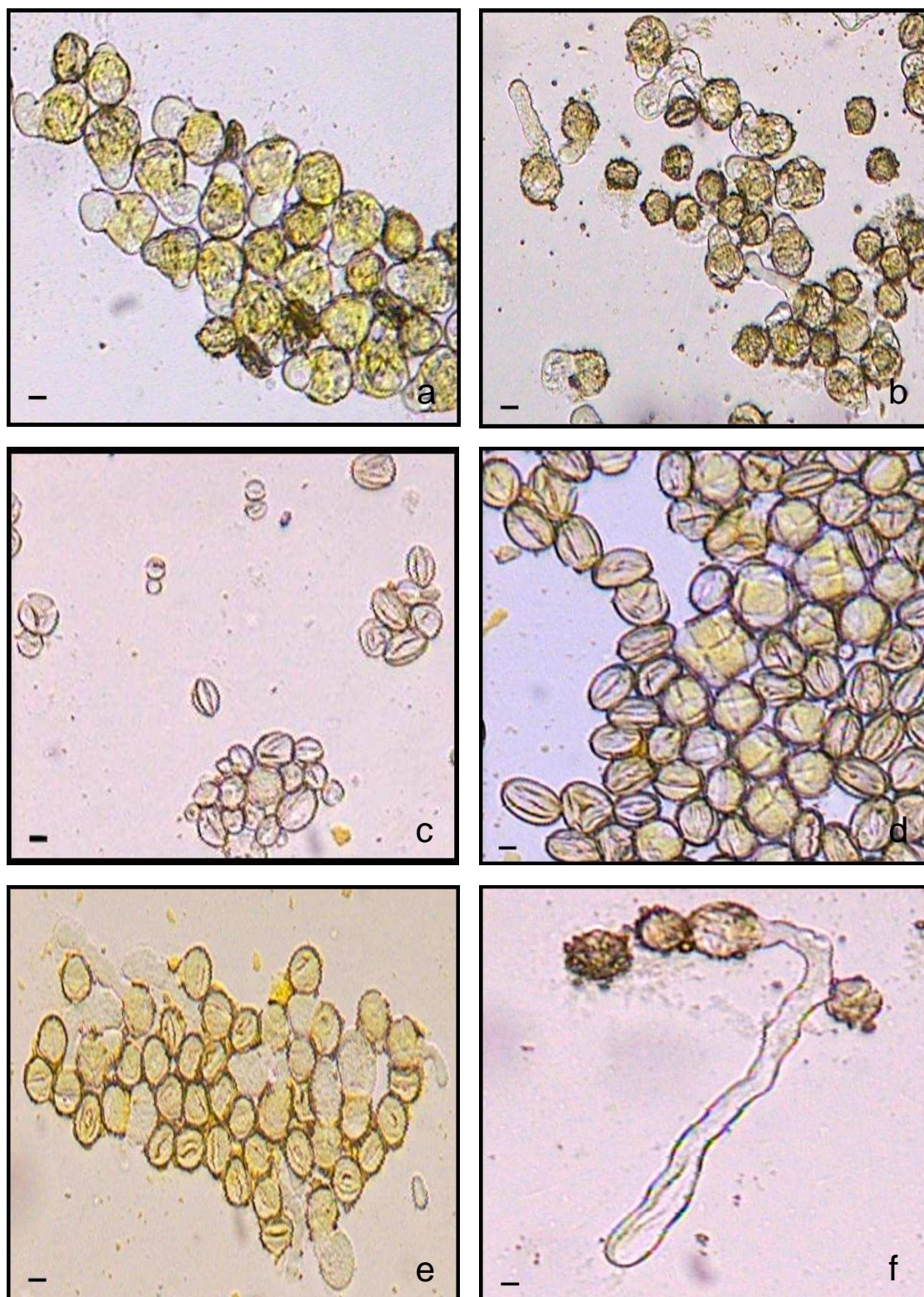


FIGURA 15. Germinação *in vitro* dos grãos de pólen de *Hypericum*. a,b,e,f) *H. polyanthemum*, população 17. a) 2 horas e b) 4 horas em temperatura ambiente. c) *H. caprifoliatum*, população 1 e d) *H. cf. carinatum*, população 15, 24 horas em BOD. e) 24 horas em BOD. f) 4 horas em temperatura ambiente. Escala 10  $\mu$ m.

obteve resultados semelhantes para *H. brasiliense*, onde a germinação foi de 43% e a viabilidade do pólen, acima de 80%.

A percentagem de viabilidade de pólen em testes de germinação é normalmente menor do que a estimada por coloração. Por exemplo, em *Citrus*, para três plantas de uma população de tangerina (72, 112 e 122), Cavalcante (1999) relatou 38,00, 59,25 e 78,50% de pólen corado, enquanto que a germinação *in vitro* foi de 1,50, 5,00 e 1,25%, respectivamente.

Brutovská *et al* (1998) utilizando grãos de pólen reduzidos de *H. perforatum* relataram freqüência de germinação igual a 86% para plantas diplóides e 38% para plantas tetraplóides, enquanto que a percentagem de viabilidade, obtida a partir de coloração da calose com anilina lactofenol azul (LAB) e reação fluorocromática, foi de aproximadamente 83%, para plantas diplóides e tetraplóides.

De acordo com Arda *et al* (2006), sob mesmas condições ambientais, foram observadas diferenças significativas na germinação *in vitro* dos grãos de pólen de duas espécies. A percentagem de germinação foi 12,85% para *H. perforatum* e 64,42% para *H. rumeliacum*, enquanto que a viabilidade de pólen foi de 83% e 72%, respectivamente.

Os grãos de pólen, das espécies analisadas neste trabalho, com formato elíptico não mostraram indícios de germinação, sugerindo, então, que somente os grãos com formato arredondado são viáveis.

Cabe salientar que, 24 horas após a montagem do experimento mantido em BOD, alguns grãos ainda estavam em processo de hidratação e certamente iriam germinar, no entanto, o meio já estava desidratando. Em vista disso, é necessário otimizar protocolos para germinação *in vitro* dos

grãos de pólen de espécies de *Hypericum*, levando-se em consideração o meio e os fatores ambientais (temperatura, luz, umidade) que possam alterar, inibindo ou acelerando, a emissão do tubo polínico.

## 5. CONCLUSÕES

- Este trabalho permitiu maior conhecimento sobre algumas espécies brasileiras do gênero *Hypericum* (*H. caprifoliatum*, *H. cf carinatum* e *H. polyanthemum*), para as quais, estudos citogenéticos são inéditos.
- *Hypericum caprifoliatum*, *H. cf carinatum* e *H. polyanthemum* são espécies difíceis para estudos citogenéticos, pois apresentam cromossomos muito pequenos e numerosos.
- A meiose irregular e alta variação no tamanho dos grãos de pólen em *H. caprifoliatum* e *H. cf carinatum* pode ser reflexo do modo de reprodução das espécies.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I.N.; AZEVEDO, M.T.A.; SOLFERINI, V.M.; MAZZAFERA, P. *In vitro* propagation and isozyme polymorphism of medicinal plant *Hypericum brasiliense*. **Biologia Plantarum**, Praha, v.47, n.4, p.629-632, 2003.

ABREU, I.N.; PORTO, A.L.M, MARSAIOLI, A.J.; MAZZAFERA, P. Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. **Plant Science**, Limerick, v.167, p. 949-954, 2004.

ABREU, I.N.; MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.43, p.241-248, 2005.

ARDA, H.; MERIC, C.; UNAL, S. *In vitro* pollen germination in *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum rumeliacum* Boiss. **Acta Biológica Hungarica**, Budapeste, v.57, n.1, p.97-103, 2006.

ARNHOLDT-SCHMITT, B. RAPD analysis: a method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hypericum perforatum* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, p.906-911, 2000.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlecht. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.30, n.3, p. 203-204, 2002.

BAPTISTA-GIACOMELLI, F.R.; PAGLIARINI, M.S.; ALMEIDA, J.L. Elimination of micronuclei from microspores in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.3, 2000.

BARCACCIA, G.; ARZENTON, F.; SHARBEL, T.F.; VAROTTO, S.; PARRINI, P. LUCCHIN, M. Genetic diversity and reproductive biology in ecotypes of the facultative apomitic *Hypericum perforatum* L. **Heredity**, London, v.96, p.322-334, 2006.

BARNES, J.; ANDERSON, L.A; PHILLIPSON, D.J. St Jhon's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties.



**Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 53, n.5, p. 583-600, 2001.

BATTISTIN, A.; CONTERATO, I.F.; PEREIRA, G.M.; PEREIRA, B.L.; DA SILVA, M.F. Biologia floral, microsporogênese e número cromossômico em cinco espécies de plantas utilizadas na medicina popular no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, Botucatu, v.8, n.3, p.56-62, 2006.

BENNETT, M.D. The development and use of genomic *in situ* hybridization (GISH) as a new tool in plant biosystematics. In: KEW CHROMOSOME CONFERENCE, 4., Kew, 1995. **Proceedings...** Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. p.167-183.

BERNARDI, A.P. **Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas *in vitro* de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul.** 2007. 270f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BOFF, T. **Comportamento meiótico e fertilidade do pólen em espécies de *Leucaena* Bentham (Leguminosae/Mimosoideae).** 2002. 159f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

BOFF, T.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; Pollen fertility and meiotic behaviour in accessions and species of leucaena. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v.36, p.54-58, 2002.

BRUTOVSKÁ, R.; CELLÁROVÁ, E.; DOLEZEL, J. Cytogenetic variability of in vitro regenerated *Hypericum perforatum* L. plants and their seed progenies. **Plant Science**, Limerick, v.133, p.221-229, 1998.

BRUTOVSKÁ, R.; CELLÁROVÁ, E.; SCHUBERT, I. Cytogenetic characterization of three *Hypericum* espécies by in situ hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 46-50, 2000a.

BRUTOVSKÁ, R.; KUSNIRIKOVÁ, P.; BOGYIOVÁ, E.; CELLÁROVÁ, E. Karyotype analysis of *Hypericum perforatum* L. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 43, n.1, p. 133-136, 2000 b.

CALIC, D.; ZDRAVKOVIC-KORAC, S.; PEMAC, D.; RADOJEVIC, Lj. Variability and bimodal distribution of size in microspores of *Aesculus hippocastanum*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, n.3, p.457-458, 2003/4.

CAVALCANTE, H.C. **Análise da meiose e estimativa da fertilidade de pólen de uma população de tangerine “Lee” [*Citrus clementina* X (*Citrus paradise* X *Citrus tangerina*)] de polinização aberta.** 104f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

CICCARELLI, D.; ANDREUCCI, A.C.; PAGNI, A.M. Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. **Annals of Botany**, London, v. 88, p. 637-644, 2001.

ÇIRAK, C.; KEVSEROGLU, K.; AYAN, A.K. Breaking of seed dormancy in a Turkish endemic *Hypericum* species: *Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* by light and some pre-soaking treatments. **Journal of Arid Environments**, London, v.68, n.1, p.159-164, 2007.

CLARKE, G.C.S. Irregular pollen grains in some *Hypericum* species. **Grana**, London, v.15, p.117-125, 1975.

CONTERATO, I.F.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. New chromosome numbers, meiotic behaviour and pollen fertility in American taxa of *Lupinus* (Leguminosae): contributions to taxonomic and evolutionary studies. **Botanical Journal of Linnean Society**, London, v.150, p.229-240, 2006.

CORRÊA, M.G. **Ciclo celular e microsporogênese de espécies da família Araceae, coletadas no Sul do Brasil**. Pelotas : UFPel, 2000. 105f. Dissertação (Mestrado - Fitomelhoramento)- Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2000.

CORRÊA, M.G.; VIÉGAS, J.; SILVA, J.B.; ÁVILA, P.F.V.; BUSATO, G.R.; LEMES, J.S. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v.19, n.2, p.295-303, 2005.

COUCEIRO, M.A.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: effects of harvesting time, temperature and germoplasma. **Plant Science**, Limerick, v.170, p. 128-134, 2006.

DALL'AGNOL, R. **Determinação da atividade antimicrobiana de extratos e substâncias isoladas de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul**. 107f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, Jena, v.10, p.511-516, 2003.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.E.S. Bioassay guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. **Phytotherapy Research**, Hoboken, NJ, v.19, n.4, p.291-293, 2005.

DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n.2, p.127-133, 2005.

DAUDT, R.; VON POSER, G.L.; NEVES, G.; RATES, S.M.K. Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. **Phytotherapy Research**, Hoboken, NJ, v.14, n.5, p. 344-346, 2000.

DINIZ, A.C.B.; ASTARITA, L.V.; SANTARÉM, E.R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v.21, n. 2, p.443-450, 2007.

DRIEMEIER-KREIMEIER, R. **Caracterização das sementes e propagação sexuada de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlecht. (Clusiaceae)**. 64f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

DRIEMEIER-KREIMEIER, R.; LISBÔA, G.N.; BARROS, I.B.I. Germinabilidade de sementes de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlecht. (Clusiaceae). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Brasília, v.2, n.1, p.1170-1173, 2007.

FARON, M.L.B.; PERECIN, M.B.; LAGO, A.A.; BOVI, O.A.; MAIA, N.B. Temperatura, nitrato de potássio e fotoperíodo na germinação de sementes de *Hypericum perforatum* L. e *Hypericum brasiliense* Choisy. **Bragantia**, Campinas, v.63, n.2, p. 193-199, 2004.

FENNER, R.; SORTINO, M.; RATES, S.M.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; von POSER, G.; SCHAPOVAL, E.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine**, Jena, v.12, p.236-240, 2005.

FERRAZ, A.; FARIA, D.H.; BENNETI, M.N.; DA ROCHA, A.B.; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, A.T.; von POSER, G. L. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. **Phytomedicine**, Jena, v.12, n. 1-2, p.112-115, 2004.

FERRAZ, A.; GRIVICICH, I.; von POSER, G. L.; HENRIQUES, A.T.; SCHWARTSMANN, G.; DA ROCHA, A.B. Antiproliferative activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*. **Fitoterapia**, Milano, v.76, n.2, p.210-215, 2005.

GONÇALVES-ESTEVEVES, V.; MENDONÇA, C.B.F. Estudo polínico em plantas de restinga do Estado do Rio de Janeiro- Clusiaceae Lindl. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.4, p.527-536, 2001.

GONÇALVES-ESTEVEVES, V.; MELHEM, T.S. Palinotaxonomia de espécies brasileiras de *Cheilochlinium* Miers (Hippocrateaceae Juss.). **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v.18, n.3, p.503-512, 2004.

GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 142p.

GUSTAFSSON, M.H.G.; BITTRICH, V.; STEVENS, P.F. Phylogeny of Clusiaceae based on *rbcl* sequences. **International Journal of Plant Science**, Limerick, v. 163, n.6, p.1045-1054, 2002.

HALUSKOVA, J.; CELLAROVÁ, E. RFLP analysis of *Hypericum perforatum* L. somaclones and their progenies. **Euphytica**, Wageningen, v.95, p.229-235, 1997.

HOAR, C.S. ; HAERTL, E.J. Meiosis in the genus *Hypericum*. **Botanical Gazette**, Chicago, v.93, p.197-204, 1932.

KITANOV, G.M. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.29, n.2, p.171-178, 2001.

KOGI, M. A karyomorphological study of the genus *Hypericum* (Hypericaceae) in Japan. **Botanical Magazine**, London, v.97, p. 333-343, 1984.

LACADENA, J.R. **Citogenética**. Madrid : Editorial Complutense, 1996. 464p.

LOVE, R.M. **Estudos citológicos preliminares de trigos Rio-Grandenses**. Porto Alegre: Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio, 1949. 23p. (Circular, 74).

MACIEL, H.S.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. First chromosome number determinations in south-eastern South American species of *Lupinus* L. (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.139, p.395-400, 2002.

MARTÍNEZ, E.J.; ACUNA, C.A.; HOJSGAARD, D.H.; TCACH, M.A.; QUARIN, C.L. Segregation for sexual seed production in *Paspalum* as directed by male gametes of apomitic triploid plants. **Annals of Botany**, London, v.100, p. 1239-1247, 2007.

MATZK, F.; MEISTER, A.; BRUTOVSKÁ, R.; SCHUBERT, I. Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixes. **The Plant Journal**, Oxford, v.26, n.3, p.275-282, 2001.

MATZK, F.; HAMMER, K.; SCHUBERT, I. Coevolution of apomixis and genome size within the genus *Hypericum*. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v.16, p.51-58, 2003.

MAYO, G.M.; LANGRIDGE, P. Modes of reproduction in Australian populations of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) revealed by DNA fingerprinting and cytological methods. **Genome**, Ottawa, v. 46, p.573-579, 2003.

MORAES, I.C.R. **Caracterização citogenética e da biologia reprodutiva de três espécies do gênero *Hypericum* L. (Clusiaceae)**. 64f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

NIELSEN, N. Chromosome numbers in the genus *Hypericum*. **Hereditas**, Lund, v.5, p.378-382, 1924.

NOGUEIRA, T.; MARCELO-CURTO, M.J.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; RUBIOLLO, P.; BICCHI, C. Chemotaxonomy of *Hypericum* genus from Portugal: geographical distribution and essential oils composition of *Hypericum perforatum*, *Hypericum humifusum*, *hypericum linarifolium* and *Hypericum pulchrum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.36, n.1, p.40-50, 2008.

NÖR, C. **Análise química e taxonômica de espécies de *Hypericum* e avaliação da atividade antiangiogênica**. 165f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PAGLIARINI, M.S.; POZZOBON, M.T. **Meiose vegetal: um enfoque para a caracterização de germoplasma**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. (Documentos, 154). II Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genéticos Vegetais.

PANK, F.; MATZK, F.; KASTNER, U.; BLUTHNER, W.D.; GARCIA, E.F.; MEISTER, A.; RYSCHKA, U.; SCHUMANN, G. Reproductive diversity and strategies for breeding in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) **Euphytica**, Wageningen, v. 134, p. 77-84, 2003.

PÉREZ-GARCIA, F.; HUERTAS, M.; MORA, E.; PEÑA, B.; VARELA, F.; GONZÁLEZ-BENITO, M.E. *Hypericum perforatum* L. seed germination: interpopulation variation and effect of light, temperature, presowing treatments and seed desiccation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 53, n. 6, p.1187-1198, 2006.

POZZOBON, M.T. **Caracterização citogenética de acessos de germoplasmas de espécies silvestres e semidomesticadas do gênero *Capsicum* (Solanaceae)**. 152f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

POZZOBON, M.T.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. A meiotic study of the wild and semi-domesticated Brazilian species of genus *Capsicum* L. (Solanaceae). **Cytologia**, Tokyo, v.71, n.3, p.275-287, 2006.

POZZOBON, M.T.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. BIANCHETTI, L.B. Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do  $x=12$  and  $x=13$  represent two evolutionary lines? **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.151, p.259-269, 2006.

RAINA, S.N.; RANI, V. GISH technology in plant genome research. **Methods in Cells Science**, v.23, p.83-104, 2001.

ROBSON, N.K.B.; ADAMS, P. Chromosome numbers in *Hypericum* and related genera. **Brittonia**, Bronx, v. 20, p.95-106, 1968.

ROBSON, N.K.B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 2. Characters of the genus. **Bulletin of the British Museum** (Natural History) Botany series, London, v.8, n.2, p.55-226, 1981.

ROBSON, N.K.B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Clusiaceae). Section 9. *Hypericum sensu lato* (part 3): subsection 1. *Hypericum* series 2. *Senanensia*, subsection 2. *Erecta* and section 9b. *Graveolentia*. **Systematics and Biodiversity**, London, v. 4, n.1, p. 19-98, 2006.

SANTOS-FILHO, S.D. ; BERNARDO-FILHO, M. Efeito de um extrato de hipérico (*Hypericum perforatum*) na marcação *in vitro* de elementos sanguíneos com tecnécio-99m e na biodisponibilidade do radiofármaco pertecnetato de sódio em ratos *Wistar*. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.20, suppl.1, 2005.

SCHMITT, A.C.; RAVAZZOLO, A.P.; von POSER, G.L. Investigation of some *Hypericum* species native to southern of Brazil for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.77, p.239-245, 2001.

SCHULTZ, A.R.H. **Introdução à botânica sistemática**. 4 ed. rev. Porto Alegre, Ed. UFRGS, 1984.

SIMIONI, C. **Seleção para aumento da produção de gametas não reduzidos e poliploidização sexual em trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.)**. 223f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 391p.

SLUSARSKI, S.R.; CERVI, A.C.; GUIMARÃES, O.A. Estudo taxonômico das espécies nativas de *Hypericum* L. (Hypericaceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 21, n.1, 2007.

STACE, C.A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> centuries. **Taxon**, Utrecht, v.49, p.451-477, 2000.

SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. In: LELLEY, T. (Ed). **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Tullen, Áustria : Universitätsverlag, 1998. p.22-32.

TAKHTAJAN, A. **Diversity and classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1997. 643p.

URBANOVÁ, M.; CELLÁROVÁ, E.; KIMÁKOVÁ, K. Chromosome number stability and mitotic activity of cryopreserved *Hypericum perforatum* L. meristems. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.20, n.11, p.1082-1086, 2002.

URBANOVÁ, M.; KOSUTH, J.; CELLÁROVÁ, E. Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.25, p.140-147, 2006.

USBERTI FILHO, J.A. Melhoramento genético e perspectiva de lançamento de cultivares de gramíneas forrageiras no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.3, n.1, p.135-143, 1981.

VIANA, A.F. **Estudo da atividade psicofarmacológica de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul e toxicidade aguda de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schledt.** 124f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

VIANA, A. F.; HECKLER, A.P.; FENNER, R.; RATES, S.M.K. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.36, n.5, p.631-634, 2003.

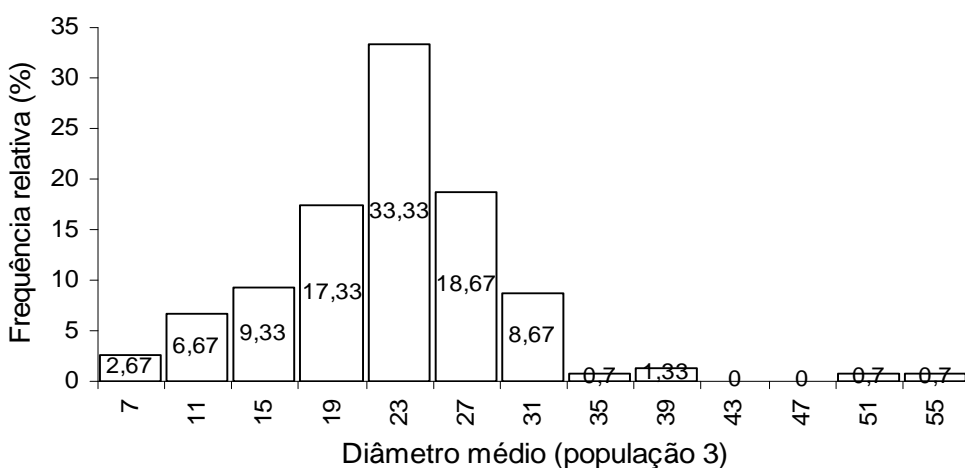
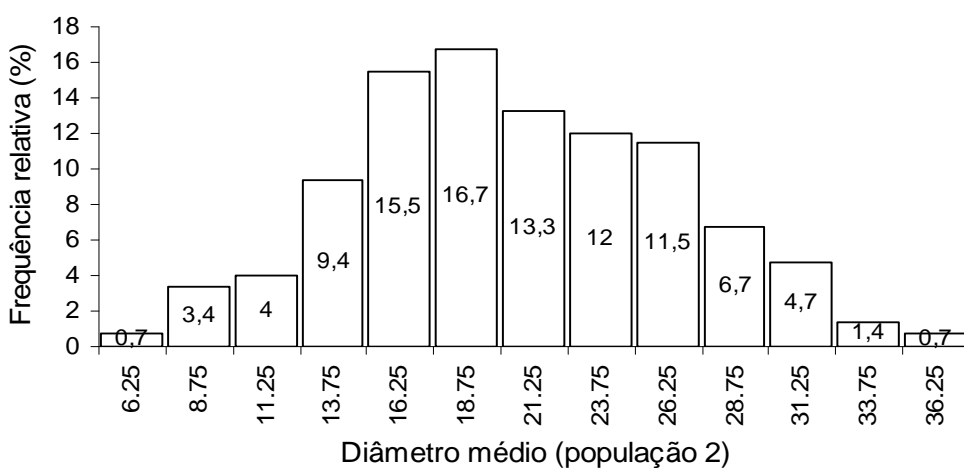
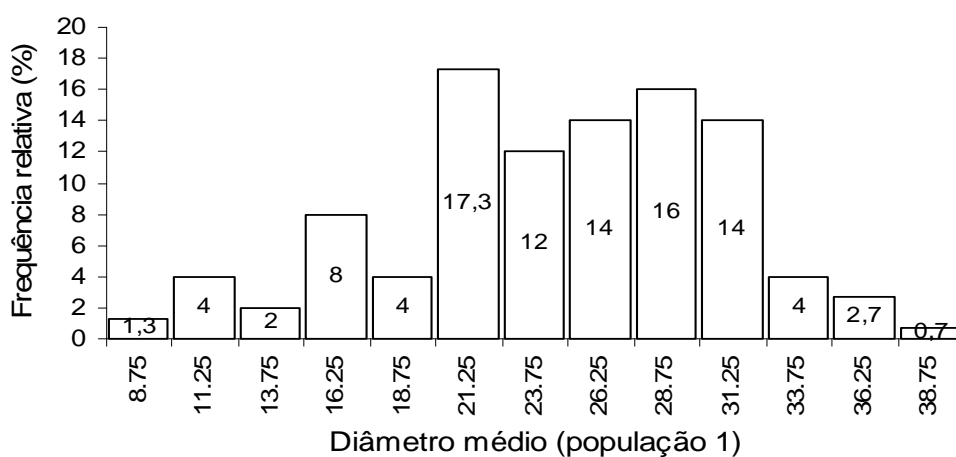
VIANA, A.; REGO, J.C.; VON POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, A.P.; COSTENTIN, J.; RATES, S.M.K. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology**, New York, v.49, p.1042-1052, 2005.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.D.; SILVEIRA JUNIOR, P. **Sanest: Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores.** Pelotas : UFPel, 1984. Registro na Secretária Especial de Informática, Categoria A.

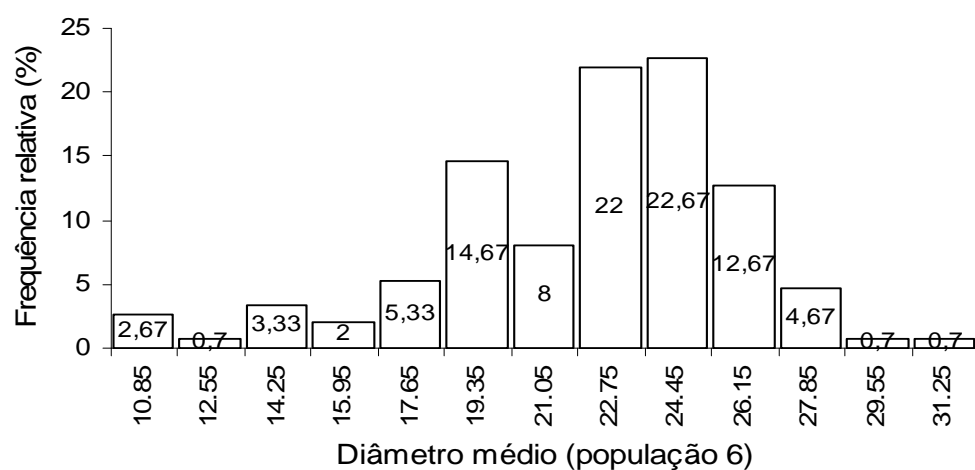
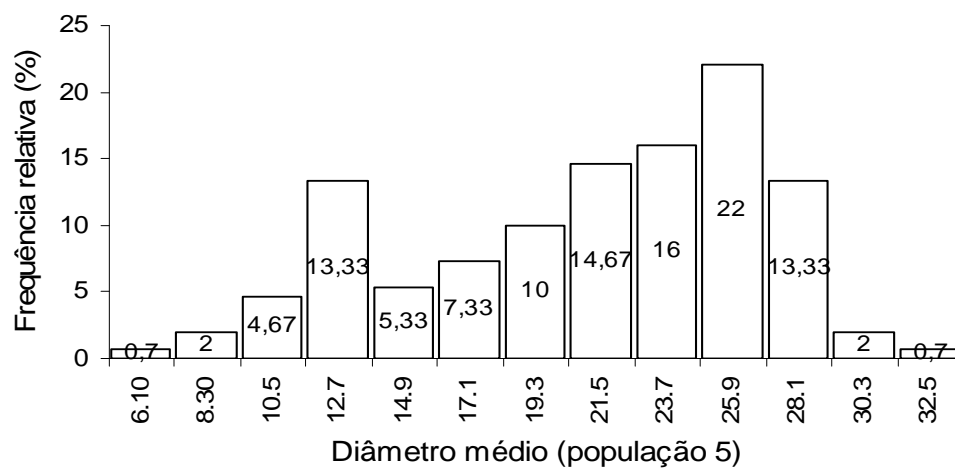
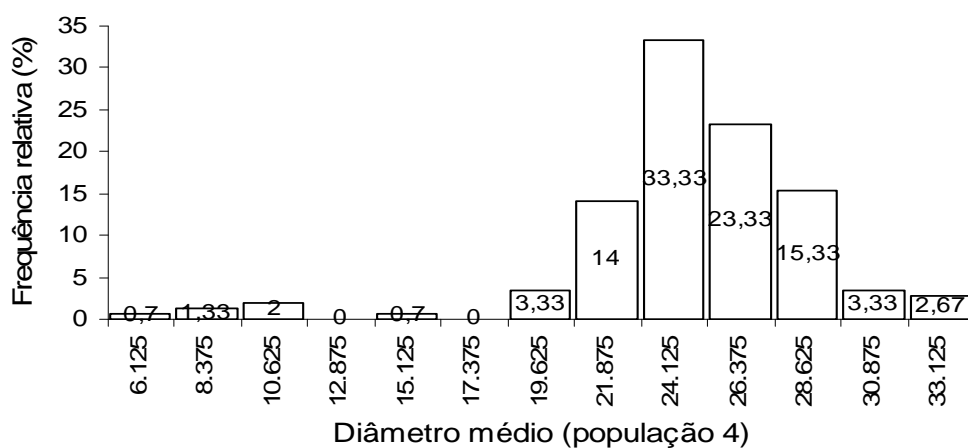
YAN, G.; FERGUSON, A.R.; MCNEILAGE, M.A.; MURRAY, B.G. Numerically unreduced (2n) gametes and sexual polyploidization in *Actinidia*. **Euphytica**, Wageningen, v.96, p.267-272, 1997.

## **7. APÉNDICE**



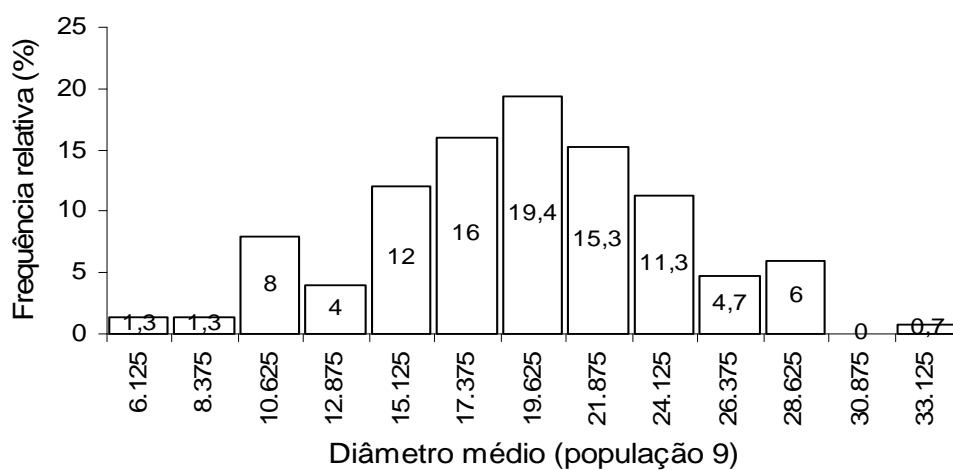
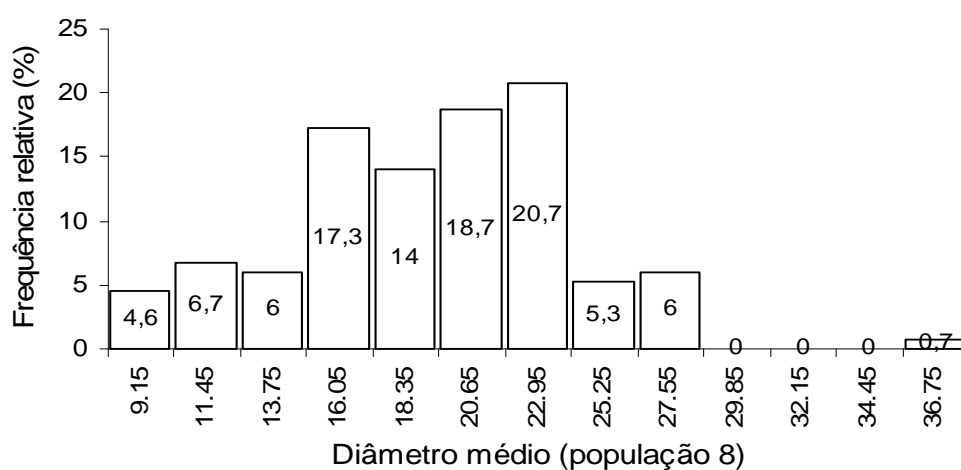
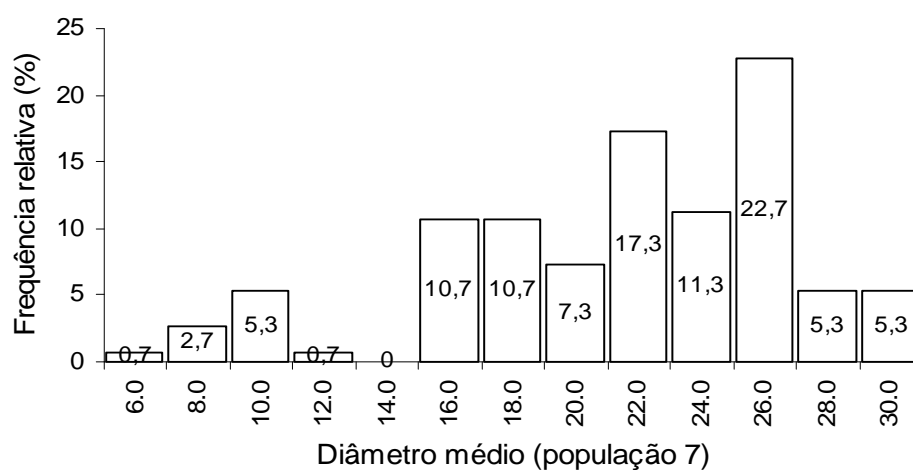


APÊNDICE 1. Distribuição de freqüências do diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) de 150 grãos de pólen em populações de *Hypericum*. Porto Alegre, RS. 2007.



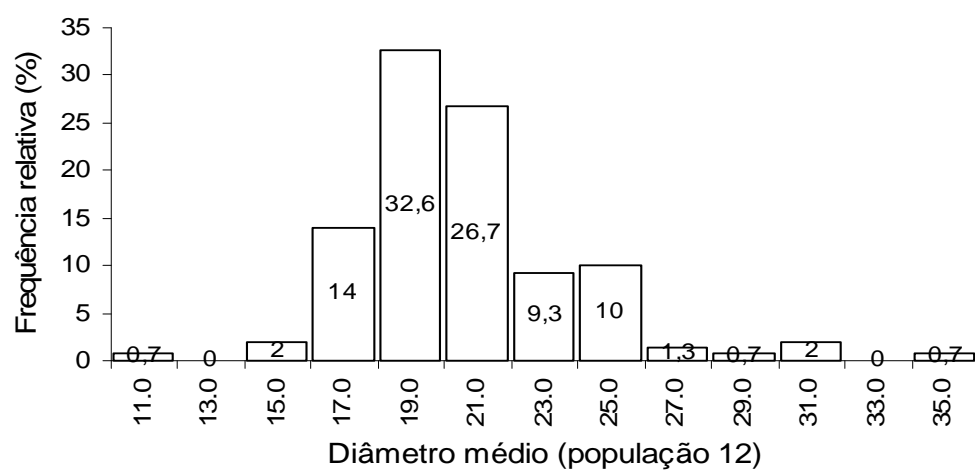
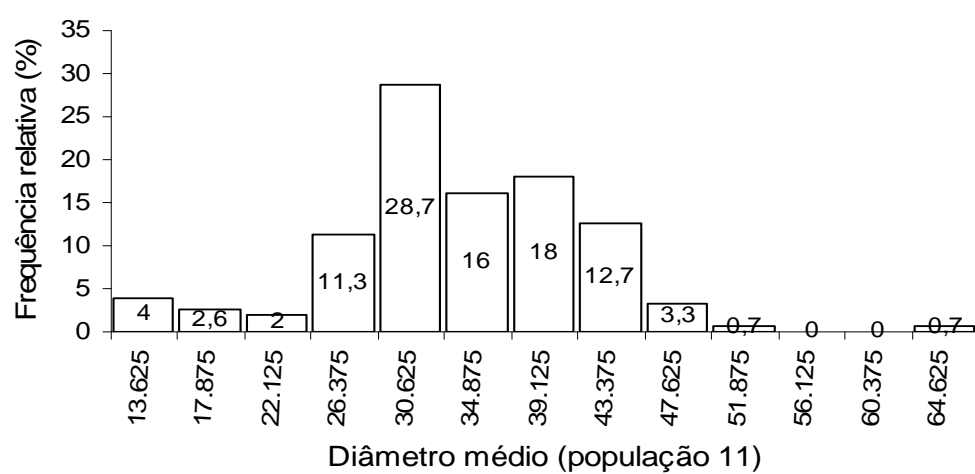
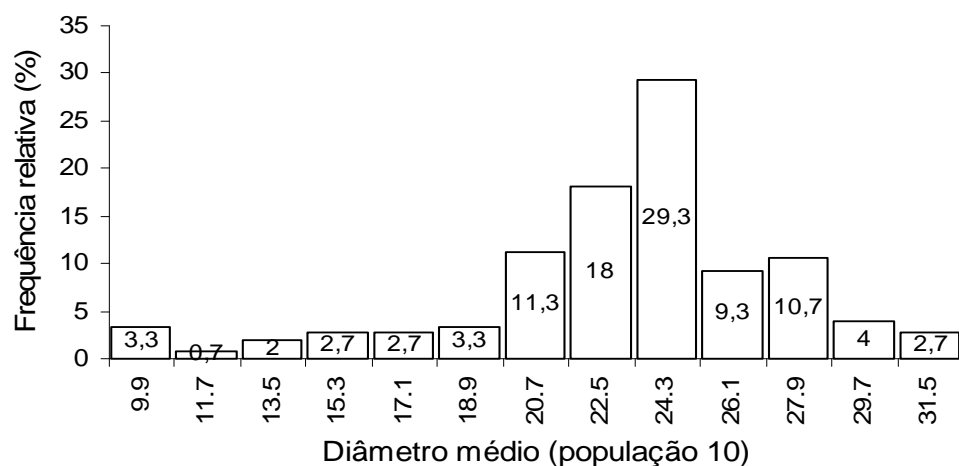
...continuação.

APÊNDICE 1. Distribuição de freqüências do diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) de 150 grãos de pólen em populações de *Hypericum*. Porto Alegre, RS. 2007.



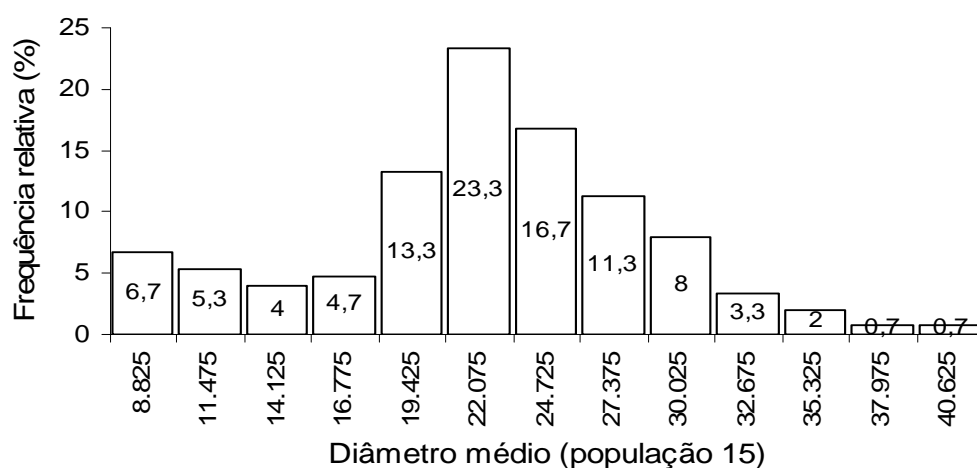
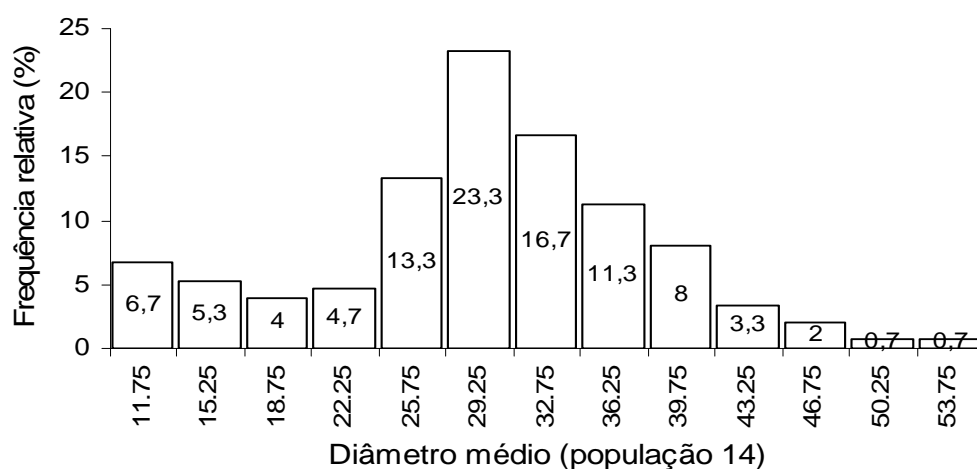
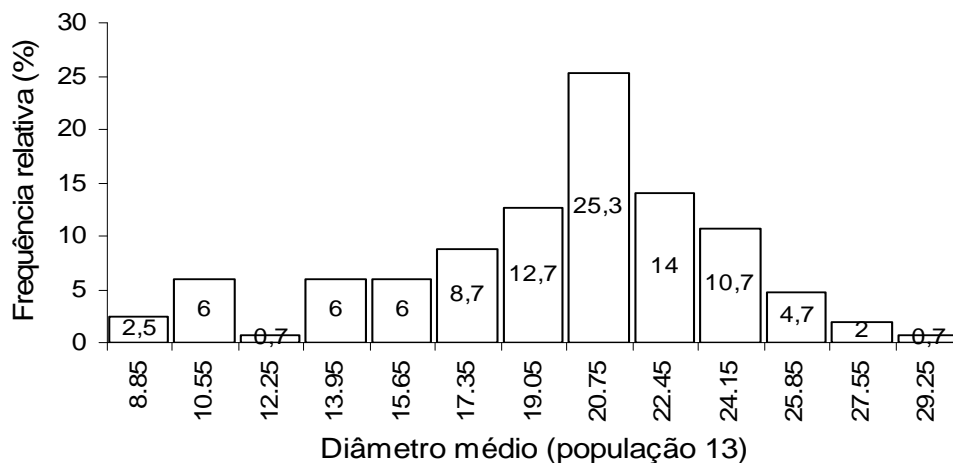
...continuação.

APÊNDICE 1. Distribuição de freqüências do diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) de 150 grãos de pólen em populações de *Hypericum*. Porto Alegre, RS. 2007.



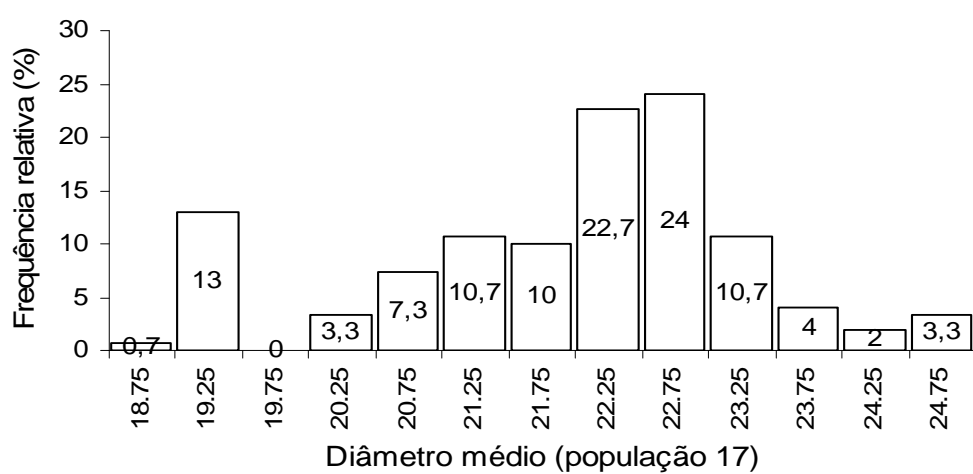
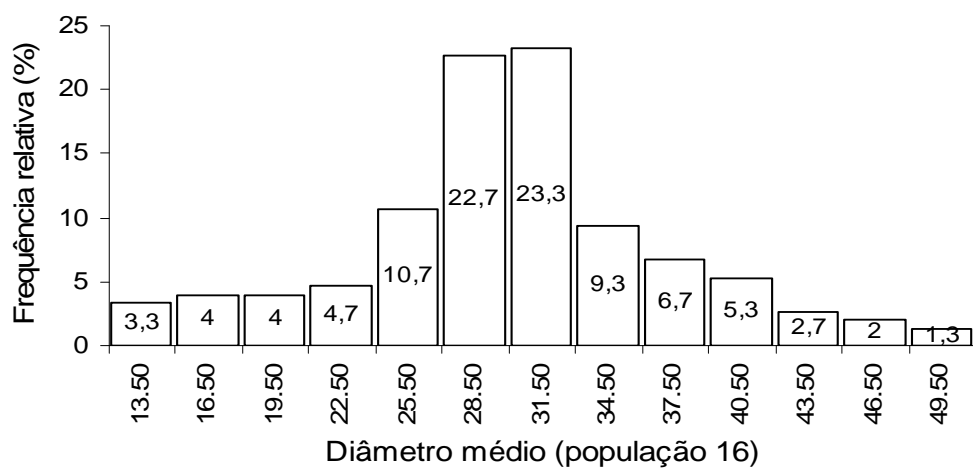
...continuação.

APÊNDICE 1. Distribuição de freqüências do diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) de 150 grãos de pólen em populações de *Hypericum*. Porto Alegre, RS. 2007.



...continuação.

APÊNDICE 1. Distribuição de freqüências do diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) de 150 grãos de pólen em populações de *Hypericum*. Porto Alegre, RS. 2007.



...continuação.

APÊNDICE 1. Distribuição de freqüências do diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) de 150 grãos de pólen em populações de *Hypericum*. Porto Alegre, RS. 2007.

## **8. VITA**

Ana Paula Guisso Navarini, filha de Roberto Antonio Guisso e Elsa Maria Marchesin Guisso, nasceu em 07 de fevereiro de 1979, em Sananduva, Rio Grande do Sul.

Cursou ensino fundamental na Escola Estadual de 1 e 2 Grau Sananduva. Em 2000 ingressou no curso de Ciências Biológicas – Bacharelado e Licenciatura- da Universidade Federal de Pelotas (UFPel - Pelotas, RS), onde formou-se em outubro de 2004. Foi monitora em 2001 e 2002 e a partir de 2003 foi bolsista de iniciação científica do Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Zoologia e Genética da UFPel. Em março de 2006 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.