

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Estudos genéticos em *Cunila fasciculata* Benth. (Lamiaceae), uma espécie endêmica e ameaçada no Rio Grande do Sul, Brasil



Daniela Berquó Grandi

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Estudos genéticos em *Cunila fasciculata* Benth. (Lamiaceae), uma espécie endêmica e ameaçada no Rio Grande do Sul, Brasil

Daniela Berquó Grandi

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliane Kaltchuk dos Santos

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiana Teixeira de Souza Chies

Porto Alegre

2015

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Eliane Kaltchuk dos Santos, que me recebeu como aluna de iniciação científica e sempre me apoiou e incentivou em todos os momentos. Obrigada pelas conversas, risadas, pelas palavras de incentivo e pelo carinho que sempre me deste!

À Prof.^a Dr.^a Tatiana Teixeira de Souza Chies, que abriu as portas do laboratório de Sistemática Molecular para que eu realizasse este trabalho de iniciação científica e que me apoiou sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Sérgio Augusto de Loreto Bordignon, pela ajuda nas coletas a campo e buscas incessantes pelas "Cunilas", pelo aprendizado passado durante as coletas e por ser um "GPS humano" que sempre sabe onde encontrar as plantas.

À Pós-Doutoranda Dra. Eudes Maria Stiehl-Alves, pela grande amizade e pelos ensinamentos passados todos os dias, pela orientação extraoficial. Muito obrigada de coração!

À Joana, pela amizade e ajuda constante quando os dias eram difíceis, pelos cafês, risadas e conversas. Por ser uma amiga sempre presente e que já está no meu coração!

À Paula, pelos *helps* eternos no laboratório de Citogenética, pelo ensinamento da organização, pelas conversas, por sempre estar disposta a ensinar, por ter se tornado uma grande amiga que levo como um presente valioso da iniciação científica.

Aos meus queridos colegas de laboratório, Maurício, Cris, Léo e Tamara que fizeram meus dias serem mais leves e divertidos sempre que estávamos juntos.

Ao Paulo, por aguentar minhas crises durante a confecção deste trabalho e ao longo de toda a iniciação científica, por sempre me apoiar e me incentivar a ser o melhor de mim.

À minha mãe Laura, por ser meu porto seguro, minha melhor amiga e minha inspiração. Muito obrigada eterno por sempre me apoiar seja qual fosse a minha decisão. Te amo!

À minha irmã Bettina, por ser, juntamente com a minha mãe, uma das pessoas mais importantes da minha vida e por sempre me ajudar e me apoiar em tudo, por revisar esse trabalho e por ser minha melhor amiga.

À minha amiga Ludmila, por me aguentar quase todos os dias, pelas conversas, risadas e apoio eterno.

À todos meus familiares mais próximos que indiretamente contribuíram para eu chegar até aqui, meu Pai Roberto, Olavo, Eny, Thomás e Thirzá. Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO GERAL	7
1. O gênero <i>Cunila</i> D. Royen ex L.	7
2. A espécie <i>Cunila fasciculata</i> Benth.	11
3. Diversidade Genética e Marcadores Moleculares ISSR.....	12
4. Análises citológicas	13
JUSTIFICATIVA	16
OBJETIVO	17
1. Objetivos específicos.....	17
CAPÍTULO I	18
1. MATERIAL & MÉTODOS	18
<i>Material Vegetal</i>	18
<i>Análises Moleculares</i>	19
Isolamento de DNA e amplificação de PCR ISSR.....	20
Análise de Diversidade Genética.....	20
<i>Análises citogenéticas</i>	21
Coleta e fixação	21
Determinação de número cromossômico	22
Viabilidade polínica.....	22
Medidas dos grãos de pólen	22
Estimativa do tamanho de genoma.....	23
2. RESULTADOS	24
<i>Análise molecular</i>	24
Diversidade Genética Populacional.....	24
<i>Análises citogenéticas</i>	27
Determinação do número cromossômico e tamanho de genoma	27
Análise de pólen	28
3. DISCUSSÃO	31

Diversidade Genética Populacional.....	31
Análises Polínicas.....	33
Tamanho de genoma.....	35
CONCLUSÃO GERAL	36
CAPITULO II.....	37
1. Análises moleculares complementares	37
2. Material e métodos	37
Material.....	37
Coletas a campo.....	37
Análises moleculares	37
REFERÊNCIAS	42

RESUMO

O gênero *Cunila* D. Royen ex L. pertence à família Lamiaceae, e muitas de suas espécies apresentam elevado potencial para uso nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias devido a seus óleos essenciais. Porém, o grande extrativismo, a falta de um programa de cultivo e melhoramento, aliados à destruição do seu habitat, tem levado algumas espécies deste gênero à lista de plantas ameaçadas de extinção, como é o caso de *Cunila fasciculata* Benth. Esta espécie é endêmica e restrita à Depressão Central e Litoral Norte do Rio Grande do Sul. O objetivo deste trabalho é avaliar a diversidade genética dentro e entre populações de *C. fasciculata*, bem como realizar análises citogenéticas para a mesma. Cinco populações do Estado do Rio Grande do Sul foram amostradas e um conjunto de quatro primers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) foi selecionado para a amplificação do DNA de todas as populações. Foi observado um considerável polimorfismo(40,24%) e diversidade genética à nível de espécie, e alta variação genética entre indivíduos dentro das populações em vez de entre as populações, o que lhe sugere maior aptidão, diferentemente do que se espera para espécies raras ou ameaçadas. A diferenciação genética entre as populações da espécie demonstrou que estas populações são apenas moderadamente estruturadas vivendo em um possível cenário de fluxo gênico moderado entre elas. O teste de Mantel mostrou não haver correlação entre distâncias genéticas e geográficas. Para as análises citogenéticas foram amostrados indivíduos de quatro das populações utilizadas nas análises moleculares. As análises citológicas compreenderam viabilidade e morfologia do pólen e conteúdo de DNA. Constatou-se que *C. fasciculata* apresenta uma alta viabilidade polínica, tendo sido observados três diferentes morfologias de grãos de pólen. A medida do conteúdo de DNA revelou que *C. fasciculata* apresenta valor 2C em torno de 3,30 pg. Os resultados gerados nesse trabalho quanto à análises moleculares, quantidade de DNA nuclear são inéditos para a espécie, assim como os dados obtidos nas análises de morfologia e viabilidade dos grãos de pólen. Tais informações ampliam o conhecimento acerca do gênero *Cunila*, e principalmente da espécie *C.fasciculata*.

Palavras- chave: Lamiaceae - marcadores ISSR - genética de populações - viabilidade de pólen- tamanho de genoma- morfologia de pólen

ABSTRACT

The genus *Cunila* D. Royen ex L. belongs to the Lamiaceae family, many of its species have high potential for the pharmaceutical, cosmetic and food industries because of their essential oils. However, the extended extractivism, the lack of cultivation and genetic improvement programs, allied to habitat destruction, have caused some species from this genus to be added to the list of endangered plants species, such as *Cunila fasciculata* Benth. This species is endemic and restricted to the Central Depression and North Shore of Rio Grande do Sul. The aim of this work is to assess the genetic diversity within and among populations of this species, as well as to perform cytogenetic analyses of the same species. Five populations from the state of Rio Grande do Sul were sampled and a set of four ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) primers was selected for DNA amplification of all populations. We observed considerable polymorphism (40,24%) and genetic diversity at the species level and high genetic variability between individuals within populations, rather than among populations. This suggests higher fitness, differently from what is expected for rare or endangered species. Genetic differentiation among this species' populations showed that these are only moderately structured and are existing in a possible scenario of moderate gene flow between them. Mantel test showed no correlation between genetic and geographic distances. Regarding cytogenetic analyses, individuals from four of the populations used in the molecular approach were sampled. Cytological analyses involved pollen viability and morphology as well as DNA content. *Cunila fasciculata* presented high pollen viability with three different pollen grain morphologies. DNA content assessment revealed that *C. fasciculata* has a 2C value around 3.30 pg. The results generated by the present work represent novelties in terms of the molecular analyses, nuclear DNA quantity and also in terms of the data obtained from pollen morphology and pollen viability analyses. These information broaden the knowledge regarding *Cunila*, especially *C. fasciculata*.

Keywords: Lamiaceae – ISSR markers – population genetics – pollen viability – genome size – pollen morphology.

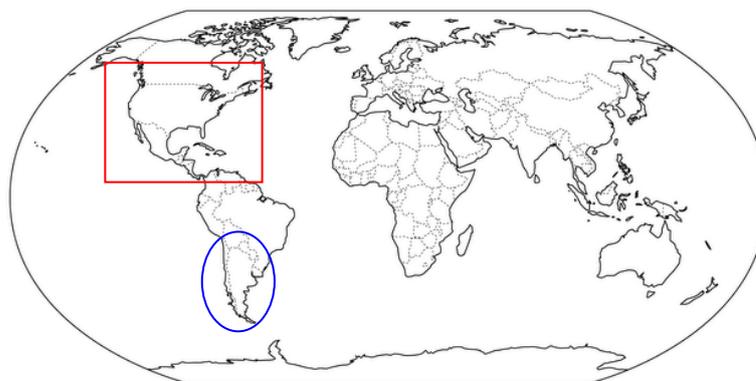
INTRODUÇÃO GERAL

O gênero Cunila D. Royen ex L.

O gênero *Cunila* D. Royen ex L. está incluso na família Lamiaceae, subfamília Nepetoideae, tribo Mentheae (Cantino, 1992). As espécies do gênero são popularmente conhecidas como poejo, sendo diversas delas utilizadas na medicina popular, não só no Brasil como também no Uruguai, Argentina e México, onde existem registros do gênero (Garcia-Peña, 1989; Bordignon, 1997). Variações dos nomes populares das diferentes espécies são frequentemente encontradas, sendo que estas se relacionam, na maioria das vezes, com o habitat no qual as plantas ocorrem (poejo-do-banhado, poejo-do-brejo, poejo-do-campo) e/ou com o tamanho das folhas ou porte da planta (poejo-de-folha-grande, poejo-de-folha-miúda, poejinho) (Bordignon *et al.*, 1997).

Cunila ocorre na América de forma disjunta e apresenta dois centros de distribuição, um na América do Norte representado por uma espécie do Leste dos Estados Unidos (*C. origanoides* L. Britton), e oito espécies do México, sendo sete do ocidente e centro do país (*C. longiflora* Gray, *C. secunda* S. Watson, *C. crenata* M.R. Garcia-Peña et P. Tenório Lezama, *C. lythrifolia* Benth., *C. polyantha* Benth., *C. pycnantha* B.L. Rob. & Greenm., *C. ramamoorthiana* M.R. Garcia-Peña e uma espécie, distribuída do sul do México ao Panamá (*C. leucantha* Kunth ex Schldl. & Cham.), mas que está ausente na Nicarágua. O outro centro está na América do Sul, sendo representado por onze espécies, localizadas no sul do Brasil, norte da Argentina e parte do Uruguai (Garcia-Peña, 1989; Bordignon, 1997) (Figura 1).

Figura 1- Distribuição do gênero *Cunila* nas Américas. Em vermelho a distribuição na América do Norte; em azul a distribuição na América do Sul.



Fonte: <http://aloim.org/alo/2014/01/mapa-mundo-politico-de-europa-blanco-y-negro.gif>

As espécies sul-americanas foram classificadas em três seções por Epling (1936), com base no hábito e tipo de inflorescência: *Incanae*, *Incisae* e *Spicatae*. A seção *Incanae* possui uma única espécie, *C. incana* Benth. (Figura 2) e se caracteriza por apresentar flores solitárias (ou no máximo duas) nas axilas das folhas, estas densamente pilosas com tricomas ramificados.

Figura 2- *Cunila incana* Benth.



Fonte: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/> (Autor:Sérgio Bordignon)

A seção *Incisae* (Figura 3) é representada por duas espécies, *C. incisa* Benth. e *C. angustifolia* Benth., as quais são plantas arbustivas com címulas dispostas nas axilas das folhas e com pedúnculos breves de 2-10 mm de comprimento.

Figura 3-Representantes da seção Incisae. (A) *C. angustifolia* Benth., (B) *C. incisa* Benth.



Fonte: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/> (Autor:Sérgio Bordignon)

Por sua vez, a seção *Spicatae* apresenta o maior número de espécies, sendo elas *C. menthoides* Benth., *C. platyphylla* Epling, *C. menthiformis* Epling, *C. spicata* Benth., *C. galioides* Benth., *C. fasciculata* Benth. e *C. microcephala* Benth. (Figura 4). Os representantes dessa seção são plantas subarborescentes ou ervas perenes, com cimas sésseis ou com pedúnculos curtos formando espigas ou capítulos globosos ou ovais. Outras duas espécies podem ser incluídas na seção *Spicatae*, *C. tenuifolia* Epling e *Cunila* sp, porém, algumas divergências relativas a esta classificação são relatadas, sugerindo a necessidade de estudos botânicos complementares para a identificação dessas espécies (Bordignon, 1997). Estudos recentes baseados em marcadores ISSR e em estudos filogenéticos confirmaram a existência de somente dois grupos monofiléticos correspondendo a duas seções (Agostini *et al.*, 2012)

Figura 4- Alguns representantes da seção *Spicatae*. (A) *C. menthoides* Benth., (B) *C. spicata* Benth., (C) *C. microcephala* Benth., (D) *C. galioides* Benth., (E) *C. fasciculata* Benth.



Fonte: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/> (Autor: Sérgio Bordignon)

As espécies sul-americanas de *Cunila* são usadas na medicina popular como estimulantes, laxantes, calmantes, antiespasmódicas, emenagogas, antifebris, no tratamento de tosse crônicas e infecções respiratórias (Simões *et al.*, 1994) e ainda como aromatizantes da bebida tradicional do Rio Grande do Sul, o chimarrão (Bordignon, 1997). Além disso, o óleo essencial de espécies de *Cunila* apresenta atividade bactericida, fungicida e inseticida (Duke, 1994; Luz *et al.*, 2006), sendo testado contra microorganismos contaminantes de alimentos (Sandri *et al.*, 2007), bem como no controle de insetos e proliferação de bactérias patogênicas em aviários (Apel *et al.*, 2009).

A composição química do óleo essencial das espécies deste gênero varia consideravelmente, principalmente quanto ao composto majoritário de cada espécie. Os óleos podem conter compostos tais como: isomentona; 1,8-cineol; óxido *trans*-piperitona; sabineno; mentofurano; betulenal; fitol; linalol; geraniol; pulegona; mentona; mentol; citral; ocimeno; limoneno; óxido de linalol; gamma-terpineno; entre inúmeros outros (Manjarrez & Mendoza, 1966; Moreira & Krambeck, 1976; Bordignon *et al.*, 1996, 1997, 1998, 1999; Ciccio & Poveda, 1999; Echeverrigaray *et al.*, 2003; Agostini *et al.*, 2006; Echeverrigaray *et al.*, 2008;

Agostini *et al.*, 2010a). Portanto, diante da grande variabilidade quanto à composição dos óleos essenciais dentro das espécies do gênero *Cunila* e o consequente potencial aromático e medicinal destas plantas, as mesmas podem ser empregadas nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia.

1. A espécie *Cunila fasciculata* Benth.

Cunila fasciculata apresenta-se como uma erva ereta ou ascendente, com cerca de 50cm de altura, caracterizando-se por crescer formando densos grupos em solo arenoso de campos inundados ou pantanosos (Bordignon *et al.*, 1997) (Figura 5). É considerada endêmica e restrita à Depressão Central e Litoral Norte do Estado do Rio Grande do Sul. Estudos sobre esse gênero são bastante escassos e, em vista disso, sabe-se ainda muito pouco sobre essa espécie cujo hábitat vem sendo fragmentado (principalmente pela ação humana), a ponto de a mesma ser citada na lista oficial de espécies ameaçadas do RS com o status de Vulnerável–VU (Decreto estadual nº 52.109, publicado em 19/12/2014). Há registros de ocorrência de *C. fasciculata* em apenas três municípios (localidades), sendo elas: município de Novos Cabrais (localidade de Cortado), município de Paraíso do Sul (localidades de Campestre e Contenda), e município de Torres (S. A. L. Bordignon, comunicação pessoal).

Figura 5- A espécie *Cunila fasciculata*.



Fonte: Sérgio Bordignon (arquivo pessoal)

Esta planta, assim como já mencionado para algumas outras do gênero, tem sido empregada nas suas áreas de ocorrência como aromatizante (flavorizante) e na medicina

popular, na forma de chá, como estimulante, antiespasmódica, emenagoga e no tratamento de doenças respiratórias (Bordignon *et al.* 1997). O óleo essencial de *C. fasciculata* (três plantas) foi analisado por GC, GC/MS e ¹³C NMR por Bordignon *et al.* (1997). O rendimento do óleo (v/p), bastante aromático, variou entre 0,65 e 0,74% para as três amostras analisadas e o composto majoritário encontrado foi o mentofurano (71,6 a 76,4%). Além deste, outros compostos importantes foram encontrados, entre eles: limoneno (8,6 a 11,2%) e β-cariofileno (3,5 a 4,2%).

Em um artigo recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa (Agostini *et al.*, 2014) as populações remanescentes de *C. fasciculata* do estado foram avaliadas quanto à variabilidade química de seus óleos essenciais. Foram identificados vinte compostos voláteis na espécie, sendo encontrada uma clara variação quantitativa e qualitativa entre as cinco populações estudadas. As quatro populações da Região Central do Estado (Paraíso do Sul e Novos Cabrais) apresentaram os mesmos quinze compostos, formando um grupo caracterizado por alta concentração do composto hepatotóxico mentofurano, similar a estudos anteriores de Bordignon *et al.* (1997). Em contraste, apenas dez compostos foram detectados e identificados na extração do óleo essencial da população de Torres, sendo que cinco deles não são encontrados nas outras populações do estado. Com base nestes dados verifica-se que esta população de Torres representa um novo quimiotipo para *C. fasciculata* onde o composto majoritário é a mentona.

Embora todos os fatos apontem para a necessidade de se investigar mais detalhadamente essa espécie endêmica do Rio Grande do Sul e inclusa na lista das espécies ameaçadas, possui grande potencial aromático e medicinal, ainda não existem estudos de caracterização genética para a mesma.

2. Diversidade Genética e Marcadores Moleculares ISSR

Um grande número de marcadores moleculares tem auxiliado em estudos de genética, evolução e taxonomia de plantas contribuindo para um maior conhecimento da biodiversidade de diversas espécies, gêneros ou famílias de plantas. Além disso, análises utilizando marcadores moleculares fornecem informações sobre alguns fatores que determinam a estrutura genética populacional, tais como estimativas de padrões de dispersão do pólen, distância de dispersão e fluxo gênico, que são particularmente importantes para a otimização de programas de conservação *in situ* (Dawson *et al.*, 1997; Grashof-Bokdam *et al.*, 1998; He *et al.*, 2004; Ouborg *et al.*, 1999). A análise da diversidade genética avaliada nos níveis inter

e/ou intrapopulacional é de extrema relevância para estudos que visam à caracterização biológica de uma espécie e também sua conservação, pois permite relacionar sua condição atual e sua história evolutiva possibilitando delinear propostas de manejo e de manutenção da espécie, esteja ela em risco de extinção ou não.

Uma das técnicas que vem sendo utilizada para estudos de variabilidade genética é o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), proposta pela primeira vez por Zietkiewicz *et al.*(1994). ISSR é um método fundamentado na amplificação por PCR de fragmentos de DNA presentes em uma distância amplificável entre dois microsatélites idênticos repetidos, orientados em direções opostas (Reddy *et al.*, 2002). A técnica não requer informação de sequência do genoma e gera padrões de múltiplos *loci* altamente polimórficos (Nagaoka & Ogihara, 1997; Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Por serem amplificados via PCR, são de fácil detecção e altamente informativos, permitindo a investigação da diversidade genética de populações e de outros processos, como a ocorrência de fluxo gênico e de deriva genética. Estudos de diversidade genética dentro e entre populações de *Cunila* mediante o uso de marcadores moleculares são ainda limitados (Agostini, 2003; Fracaro *et al.*, 2005; Agostini *et al.*, 2010b). Análises com marcadores tipo RAPD revelaram uma ampla variação dentro de *C. galioides* (Fracaro *et al.*, 2005) e uma nítida relação entre a variação genética, a origem geográfica e a composição química. Através de marcadores ISSR, Agostini *et al.* (2010a) também verificaram uma baixa variabilidade genética em populações de *C. menthoides* indicando que cada população é derivada de um limitado número de plantas num cenário de baixo fluxo gênico. Os autores sugerem estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*.

3. Análises citológicas

Informações quanto ao número cromossômico de uma espécie e seu padrão cariotípico são de extrema importância, pois além de contribuírem para o esclarecimento de questões taxonômicas, permitem inferências quanto à evolução deste grupo. Quando estes dados são relacionados com poliploidias, distribuição geográfica e com dados moleculares, podem se tornar analíticos ao invés de descritivos, permitindo a formulação de hipóteses sobre os processos citogenéticos que estiveram ou estão atuando no grupo considerado.

Estudos citológicos em espécies do gênero *Cunila* não são encontrados na literatura. Nem mesmo registros quanto ao número cromossômico são reportados para as espécies de

Cunila. Dentre outras espécies de Lamiaceae pertencentes a gêneros relacionados filogeneticamente com *Cunila* (Agostini, 2008), existem registros de números cromossômicos para *Hedeoma costata* ($2n=36$ e 72) e *H. apiculata* ($2n=144$) (Irving, 1976). Para o gênero *Glechon* não há determinação de número cromossômico e para *Hesperozygis* há o registro apenas para uma espécie, *H. marifolia* Epling com $2n=44$ (Irving, 1976).

O conhecimento da quantidade de DNA nuclear pode trazer informações importantes para diferentes áreas de investigação (Nani, 2011). Na citotaxonomia o teor de DNA permite realizar inferências a respeito de relações filogenéticas bem como entender sua evolução cariotípica (Kron *et al.*, 2007).

A citometria de fluxo é uma das técnicas que cumprem o propósito da determinação da quantidade de DNA e oferecendo resultados confiáveis de maneira rápida, simples e, de certa forma, com baixo custo (Dolezel *et al.*, 2005). O uso padronizado da técnica permite realizar estimativas bastante precisas e sensíveis a pequenas variações. Dessa forma, a citometria de fluxo gera resultados não apenas para análises de cruzamentos interespecíficos, mas também de variações intraespecíficas do tamanho do genoma (Greilhuber *et al.*, 2007).

A inexistência de dados citogenéticos em *Cunila* e a escassa informação nas espécies de gêneros relacionados os quais exibem variação quanto ao número básico, além da poliploidia, evidenciam a relevância de estudos cromossômicos para esse gênero.

As análises com pólen permitem inferências quanto à sua morfologia, podendo ser empregado como um caráter taxonômico importante. Questões como a ocorrência de hibridação interespecífica ou de poliploidia podem ser investigadas inicialmente pela análise dos grãos de pólen. Apesar da importância deste tipo de análise para a caracterização de uma população ou espécie, em *Cunila fasciculata* não existem ainda estudos com esta abordagem realizados até o presente momento. Convém salientar que há diferentes metodologias que permitem determinar a taxa de viabilidade, sendo estas, em sua maioria, de fácil realização e de baixo custo. Este é o caso da técnica de coloração de Alexander (Alexander, 1980), a qual emprega o corante verde malaquita, que confere uma coloração esverdeada à celulose existente na parede do grão de pólen, e a fucsina ácida, que cora o citoplasma. Assim, é possível distinguir facilmente, a partir de observações em microscópio óptico, os grãos de pólen viáveis, que apresentam cor roxa, dos grãos inviáveis, que adquirem a coloração verde (Pline *et al.*, 2002).

A análise da viabilidade do pólen também é um aspecto importante na caracterização citogenética de uma espécie, e tem sido empregada tanto em trabalhos com plantas cultivadas, como rabanete (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae; Shaner & Marshall, 2003) e algodão (*Gossypium hirsutum* L., Malvaceae) (Pline *et al.*, 2002) quanto em estudos de caracterização de espécies nativas, como em espécies de *Vriesea* e *Aechmea* (Bromeliaceae; Palma-Silva *et al.*, 2004) e de *Sisyrinchium* (Iridaceae, Tacuatiá *et al.*, 2012) abrangendo tanto monocotiledôneas quanto eudicotiledôneas. A determinação da viabilidade polínica traz informações relevantes quanto à estabilidade meiótica e a fertilidade das populações analisadas.

JUSTIFICATIVA

Devido à variabilidade existente quanto à composição dos óleos essenciais, as espécies do gênero *Cunila* apresentam elevado potencial para uso nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. Entretanto, para a utilização sustentável destas espécies, é importante o uso racional e a conservação das mesmas, principalmente no caso de espécies endêmicas sob risco de extinção, como é *Cunila fasciculata*.

Diversas espécies deste gênero vêm sofrendo com ações antrópicas, sendo encontradas em ambientes fragmentados e ameaçados pela agricultura e atividades de pastagens. Existem registros de ocorrência de *C. fasciculata* somente em três municípios do estado do Rio Grande do Sul (Bordignon *et al.*, 1997). De acordo com as observações realizadas pelo grupo, acredita-se que as populações de *C. fasciculata* do município de Torres estejam praticamente extintas, tendo em vista que o extensivo trabalho de busca a campo resultou na observação de uma única população.

Dados de diversidade genética intra e interpopulacional, dados citogenéticos, de conteúdo de DNA, biologia reprodutiva, fertilidade e outros parâmetros que possam auxiliar na caracterização de *Cunila fasciculata* são, inexistentes. Estes dados são de extrema relevância, pois além de permitir o esclarecimento de questões filogenéticas e inferências quanto à evolução deste táxon, poderão ainda contribuir para a compreensão de aspectos genéticos, nos quais futuros programas de melhoramento poderão se embasar, visando características de interesse fitoterápico. A obtenção de dados como esses permitirá também o estabelecimento de programas de manejo e conservação desta espécie cuja existência está seriamente ameaçada.

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo contribuir para a caracterização genética de *Cunila fasciculata*, a partir de dados genéticos, visando informações que possibilitem o estabelecimento de programa de conservação dessa espécie ameaçada.

1. Objetivos específicos

- Avaliar a divergência genética inter- intrapopulacional de *Cunila fasciculata* através de marcadores moleculares ISSR;
- Determinar o número cromossômico e o tamanho do genoma da espécie;
- Analisar comparativamente populações de *C. fasciculata* quanto à viabilidade e à morfologia dos grãos-de-pólen.

CAPÍTULO I

1. MATERIAL & MÉTODOS

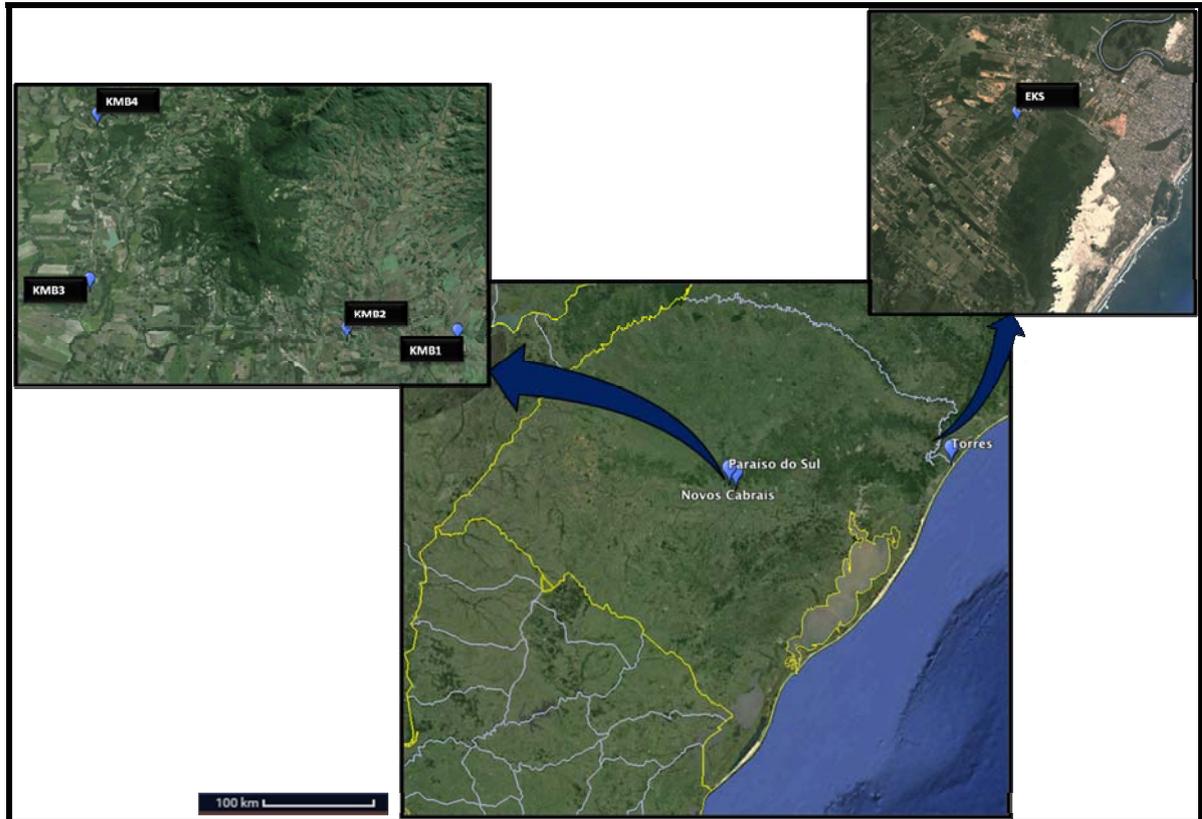
Material Vegetal

O estudo incluiu exemplares de *Cunila fasciculata* de cinco populações do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 6), coletados nos anos de 2011, 2012 e 2014. Um indivíduo de cada população foi coletado, herborizado e depositado na forma de exsiccatas no Herbário ICN, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Na Tabela 1 constam as populações, as coordenadas geográficas e as localidades de coleta.

Tabela 1 - Locais de coleta de *Cunila fasciculata* no Rio Grande do Sul, Brasil.

População	Altitude (m)	Latitude (°S)	Longitude (°W)	Localidade
KMB 1	84	29° 44' 50,5"	053° 02' 41,7"	Novo Cabrais
KMB2	91	29° 44' 48,7"	053° 04' 31,9"	Campestre, Paraíso do Sul
KMB3	66	29° 44' 05,9"	053° 08' 48,0"	Contenda, Paraíso do Sul
KMB4	65	29° 41' 40,1"	053° 08' 41,8"	Contenda, Paraíso do Sul
EKS12	10	29° 20' 24,3"	049° 45' 53,0"	Faxinal, Torres

Figura 6- Localização dos pontos de coleta de *C. fasciculata* no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.



Análises Moleculares

Exemplares coletados nos anos de 2011 e 2012 de *Cunila fasciculata* dos cinco acessos foram utilizados, totalizando 209 indivíduos analisados. O material coletado no ano de 2014 foi utilizado para análises moleculares complementares discutidas no capítulo II. O material vegetal utilizado foram folhas desidratadas em sílica-gel (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de indivíduos coletados em cada população.

População	Número de indivíduos
KMB 1	13
KMB 2	50
KMB 3	54
KMB 4	54
EKS	38

Isolamento de DNA e amplificação de PCR ISSR

A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo modificado de Doyle & Doyle (1987). Um total de 22 *primers* de ISSR foram testados; desses, quatro foram selecionados (Tabela 3) para amplificação de DNA de todas as populações. As reações de PCR foram realizadas de acordo com as seguintes condições: 1,0 µl de DNA (1-10ng), 2,5 µl de tampão 10X, 0,8 µl de dNTPs(10mM), 1,2 µl de MgCl₂ (50mM), 1,0 µl de *primer* (10pmol/ µl), 0,2 de *Taq* DNA polimerase (5U/ µl) e H₂O Milli-Qsuficiente para completar o volume de 25 µl. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti® ThermalCycler (AppliedBiosystems, Foster City, CA) seguindo os programas: desnaturação inicial a 94°C por 5 min.; seguido por 40 ciclos de 1 min. a 45°C ou 49°C- variando de acordo com o *primer* (Tabela 3) por 45s, 72°C por 2 min.; extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% e corados com GelRed (amiconCorp., Lexington , MA). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparativamente com Ladder 100bp (PB-L Produtos Bio-Lógicos).

Tabela 3 - *Primers* selecionados para PCR. Sequência do *primer* e temperatura de anelamento (Ta).

<i>Primers</i>	Sequência (5' - 3')	Ta (�C)
SP1	(AGA) ₃ (GAG) ₂ GT	45
F4	(GAG) ₃ (AGA) ₂ AC	49
F13	(CTC) ₃ (TCT) ₂ TA	45
P2	(GAG) ₃ (AGA) ₂ AT	45

Análise de Diversidade Genética

Tendo em vista que marcadores ISSR são dominantes, considera-se que cada banda represente o fenótipo de um único *locus* bialélico (Williams *et al.*, 1990). A presença (1) e ausência (0) das bandas foram inseridas em uma matriz binária. Bandas com a mesma distância de migra o foram consideradas homólogas. Os dados binários foram usados para

caracterizar a diversidade genética entre as populações de *C. fasciculata*. O percentual de locos polimórficos (*PLP*) e índice de Shannon (*I*) foram calculados utilizando GenAlEx ver.6.5 (Peakall & Smouse de 2006, 2012) assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Uma análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), com base numa matriz de distância euclidiana ao quadrado, foi realizada com o mesmo software para quantificar a distribuição de variação genética entre e dentro das populações de *C. fasciculata* e teste de significância estatística de distinção genética dessas populações. O efeito da separação espacial na estrutura genética foi testado pelo teste de Mantel (Mantel & Valand, 1970) em matrizes genéticas (Nei, 1978) e distâncias geográficas entre as populações. Teste de Mantel foi realizado com 10.000 permutações aleatórias também usando GenAlEx. A partir do mesmo software também foi realizada uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA), a fim de explorar e visualizar a variância das semelhanças/diferenças nos grupos analisados.

Análises citogenéticas

Coleta e fixação

Para análise de mitose foram utilizadas raízes obtidas a partir de plantas de quatro populações (KMB1, KMB3, KMB4 e EKS12), as quais estão em cultivo no jardim experimental localizado no Instituto de Biociências, Departamento de Botânica/UFRGS. As raízes foram pré-tratadas com agente antimitótico 8-Hidroxiquinoleína (8-HQ) durante 4 horas (18°C) e fixadas em 3:1 (etanol:ácido acético) por 12-24 h em temperatura ambiente. O material foi mantido em freezer a -18°C para posterior utilização.

O material empregado para as análises de pólen constituiu-se de inflorescências de 1-2 indivíduos de três populações (KMB1, KMB3 e KMB4) coletadas a campo e fixadas em solução 3:1 (etanol:ácido acético) por 12-24h em temperatura ambiente. Após o período de fixação, os botões florais foram mantidos em freezer à temperatura de -18°C até a sua utilização.

Determinação de número cromossômico

As raízes anteriormente acondicionadas em freezer foram utilizadas para o preparo das lâminas. Para a preparação das lâminas e visualização dos cromossomos utilizou-se o protocolo descrito por Guerra (1988). As raízes retiradas do fixador 3:1 são lavadas em água destilada duas vezes por 10 minutos e posteriormente submetidas a hidrólise com HCL 5N por 20 minutos e incubação em frasco de vidro com 5ml de Reativo de Schiff (Feulgen) por 2 horas no escuro. Após essa etapa, as raízes são lavadas em água destilada duas vezes por 10 minutos e realizada a digestão enzimática por 20 minutos com celulase 2% e pectinase 20% em estufa a 37°C em câmara úmida. Posteriormente a etapa de digestão enzimática adiciona-se à lâmina uma gota de ácido acético 45% para facilitar o esmagamento do material na lâmina com a utilização de uma lamínula. A lamínula é vedada com esmalte para posterior visualização.

Viabilidade polínica

A estimativa da viabilidade dos grãos de pólen foi feita a partir da técnica de Alexander (1980), na qual foram analisados 500 grãos por indivíduo. As análises das lâminas foram feitas em fotomicroscópio óptico Zeiss Axioplan e posteriormente fotografadas e registradas no microscópio Zeiss Imager.D2.

Medidas dos grãos de pólen

As medidas dos grãos de pólen foram realizadas com material das populações KMB1, KMB3 e KMB4. As medidas foram confeccionadas em 20 grãos de pólen maduros por indivíduo, corados pela técnica de Alexander, considerando o eixo polar (P) e o diâmetro equatorial (E). Com base nessas dimensões, calculou-se a razão P/E, utilizada para classificar a morfologia do pólen, de acordo com Erdtman (1971). As medidas foram realizadas em fotomicroscópio óptico Zeiss Axioplan e registradas e fotografadas em microscópio Zeiss Imager.D2.

Estimativa do tamanho de genoma

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram realizadas no laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Minas Gerais. Um indivíduo de cada uma das quatro populações (KMB1, KMB3, KMB4 e EKS12), foi utilizado para análise. Para a determinação da quantidade de DNA, utilizou-se para cada amostra cerca de 20 e 30 mg de tecido foliar jovem e a mesma quantia de material foliar do padrão de referência. Empregou-se o padrão *Raphanus sativus* cv. Saxa (padrão de referência de quantidade de DNA $2C=1,11$ pg).

Com auxílio de um bisturi, as folhas foram trituradas em placa de Petri na presença do tampão LB01 (1ml) para liberar os núcleos (Dolezel *et al.*, 1989). A solução proveniente desta maceração foi pipetada com uma pipeta Pasteur com a ajuda de duas camadas de gaze, este procedimento é essencial para diminuir a absorção de material vegetal. A solução foi colocada em um tubo contendo um filtro e uma malha de nylon de $50\mu\text{m}$. Os núcleos foram corados com $25\mu\text{l}$ de uma solução composta por iodeto de propídio 1mg/mL^{-1} e $5\mu\text{L}$ de RNase.

As amostras foram armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ no escuro e analisadas após uma ou duas horas. Pelo menos 10.000 núcleos foram analisados para cada amostra, usando um citômetro FACSCalibur (Becton-Dickinson). Os histogramas de citometria de fluxo foram gerados no software Cell Quest e analisados pelo software 2,8 WinMDI (Trotter, 2000).

Os valores $2C$ de cada amostra foram calculados pela intensidade de fluorescência relativa da amostra e do padrão conforme a seguinte equação:

$$\text{DNA amostra} = \left(\frac{\text{G1 da amostra}}{\text{G1 do padrão}} \right) \times \text{DNA padrão}$$

2. RESULTADOS

Análise molecular

Diversidade Genética Populacional

A amplificação dos quatro *primers* resultou em 82 *loci*, 40,24% dos quais foram polimórficos. Os fragmentos de ISSR geraram uma média de 20,5 bandas por *primer*. O tamanho dos produtos amplificados variou de 300 a >2080 pb. O *primer* F13 foi o que apresentou o menor número de fragmentos (13); diferentemente do *primer* SP1, o qual amplificou 26 fragmentos apresentando também a maior amplitude de tamanho de fragmentos (300-> 2080 pb) (Tabela 4).

Tabela 4 - *Primers* ISSR nas análises de diversidade genética populacional de *Cunila fasciculata*. Número de fragmentos registrados e tamanho dos fragmentos amplificados.

Primers	Nº de fragmentos	Nº de fragmentos polimórficos	Tamanho dos fragmentos (pb)
SP1	26	11	450->2080
F4	20	9	300 ->1964
P2	23	10	425 ->2080
F13	13	3	800 ->2080
Total	82	33	

A percentagem de bandas polimórficas em nível de população variou entre 35,37% e 46,34% (Tabela 5). A população que apresentou menor número de *loci* polimórficos foi KMB3 (35,37%). O valor médio do índice de Shannon 0,18, variando entre 0,14 até 0,19. Em ambos os índices de diversidade genética, a população KMB4 obteve os maiores valores. Em KMB2 foram encontrados os menores valores (Tabela 5).

Tabela 5 - Índices de diversidade genética em cada população de *Cunila fasciculata*. Porcentagem de loci polimórficos (PLP) e índice de Shannon (I).

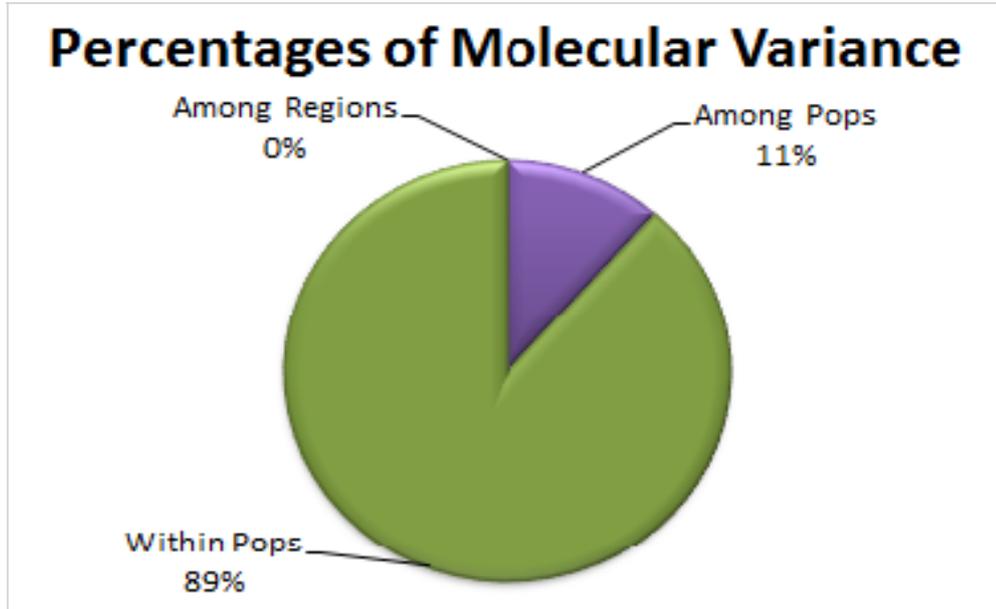
População(voucher)	PLP	I
KMB1	40,24	0,21
KMB2	40,24	0,14
KMB3	35,37	0,14
KMB4	46,34	0,22
EKS	45,12	0,19
Média	41,46	0,18

A AMOVA gerou estatísticas Φ , um análogo a estatísticas F de Wright. Estes resultados mostraram que houve diferenças genéticas significativas entre e dentro das populações de *C. fasciculata* coletadas no Rio Grande do Sul ($P < 0,001$) A AMOVA não detectou variação entre as duas regiões (Depressão Central e Litoral Norte) (Tabela 6). Do total da variância genética, 89% era devido a diferenças dentro das populações, enquanto que os restantes 11% eram devidos a variação entre as populações (Figura 7).

Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) para *C. fasciculata*.

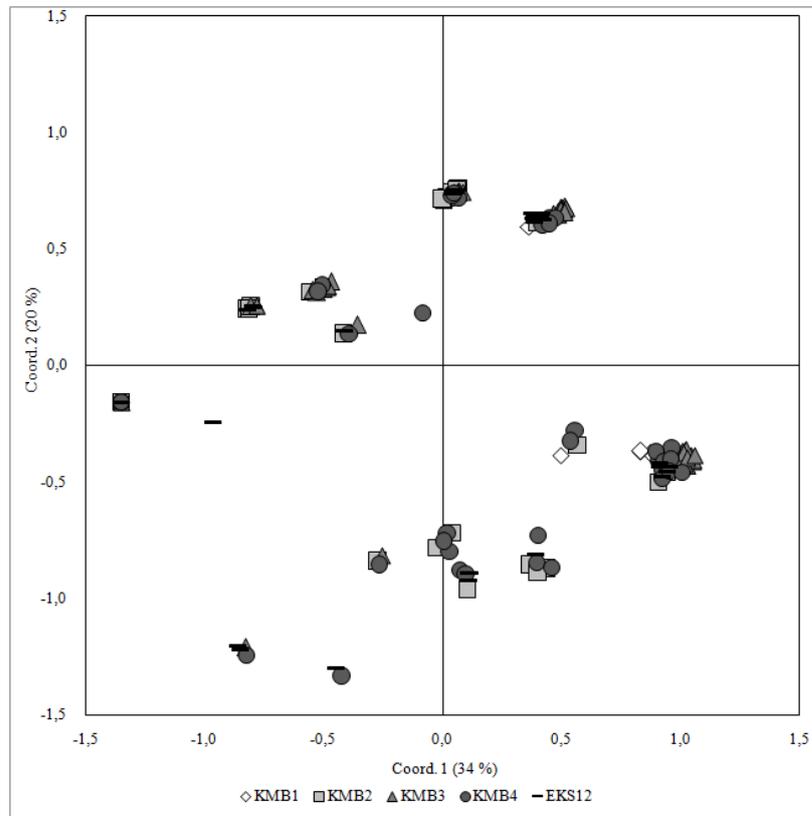
Fatores de variação	df	Sum Squares	MSD	Componente de variância	Porcentagem	P
Entre Regiões	2	171,21	85,60	-	0	< 0.001
Interpopulacional	2	252,57	126,28	2,61	11%	< 0.001
Intrapopulacional	167	3.363,71	20,14	20,14	89%	< 0.001

Figura 7 - Gráfico de variância molecular mostrando variação inter e intra-populacional de *C. fasciculata*.



De acordo com o teste de Mantel, não houve relação significativa entre a matriz de distâncias genéticas populacionais e a matriz de distância geográfica entre os locais de coleta ($r = 0,087$, $P = 0,495$). O valor obtido para Φ_{ST} foi de 0,11, demonstrando uma moderada estruturação das populações. PCoA revelou que o primeiro componente principal foi responsável por 34% da variação genética total observada, enquanto que o segundo componente explicou 20% da variação. Os dois componentes resultaram em um percentual cumulativo de 54% demonstrando graficamente as semelhanças/diferenças dos indivíduos das cinco populações analisadas.

Figura 8- Cenário bi-dimensional dos componentes principais a partir dos resultados de marcadores ISSR obtidos para as cinco populações de *C. fasciculata*.

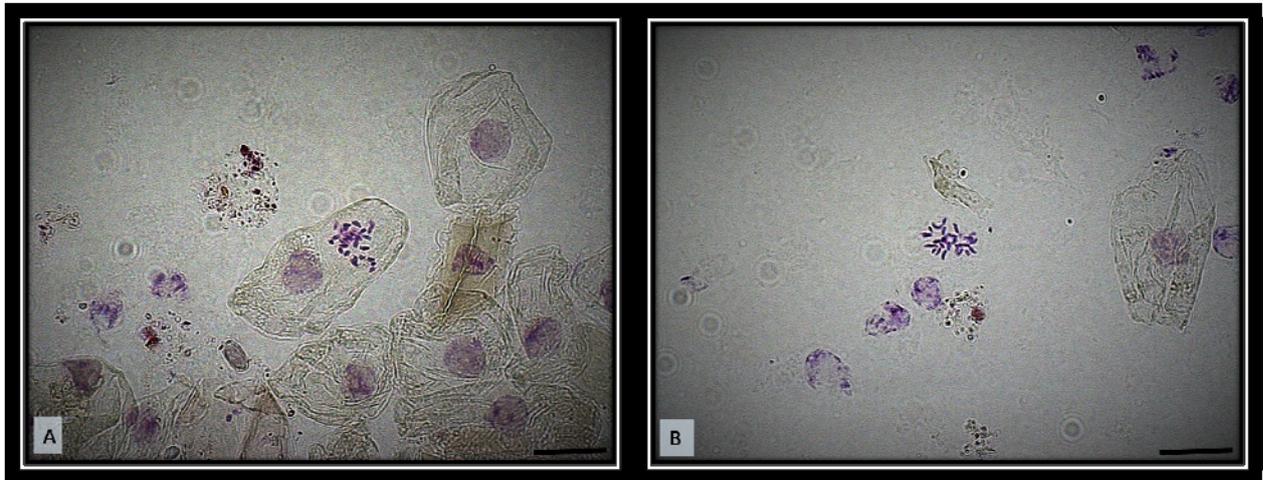


Análises citogenéticas

Determinação do número cromossômico e tamanho de genoma

A dificuldade na obtenção de cromossomos adequadamente espalhados e com igual condensação da cromatina dificultaram a determinação do número cromossômico para a espécie até o momento. As metáfases mitóticas obtidas e apresentadas aqui (Figura 9) evidenciam que *C. fasciculata* apresenta cromossomos relativamente pequenos e sugerem um número em torno de $2n=20$. Estão sendo confeccionadas novas lâminas com o fim de determinar o número cromossômico exato para a espécie.

Figura 9 - Metáfases mitóticas em *C. fasciculata*. Barra = 10 μ m.



A estimativa de tamanho de genoma total foi obtida para quatro acessos de *C. fasciculata*, dados estes apresentados na Tabela 7. Todas as populações apresentaram valores 2C: ao redor de 3,30pg .

Tabela 7 - Conteúdo 2C de DNA (valor 2C), coeficiente de variação (CV), tamanho genômico em Megapares de bases (Mbp) das amostras analisadas.

População (Voucher)	Nº de indivíduos	Valor 2C (pg)	CV	Tamanho do Genoma (Mbp)
KMB1	1	3,30	3,11	3,234
KMB3	1	3,38	3,45	3,312
KMB4	1	3,36	3,45	3,293
EKS12	1	3,32	3,56	3,254

Análise de pólen

Os grãos de pólen dos acessos analisados são classificados como médios, pois apresentam eixos polares (P) entre 25-50 μ m (Tabela 8). Os quatro acessos apresentam grãos de pólen hexacolpados, também denominados 6-zonocolpados (Figura 10 A-B).

Com base na classificação proposta por Erdtman (1971) as razões P/E (Tabela 8) obtidas para KMB1 e KMB4 foram de 1,12 e 1,11 μ m, respectivamente, o que permitiu identificar grãos de pólen do tipo prolado esferoidal. Esta classificação é aplicada quando a

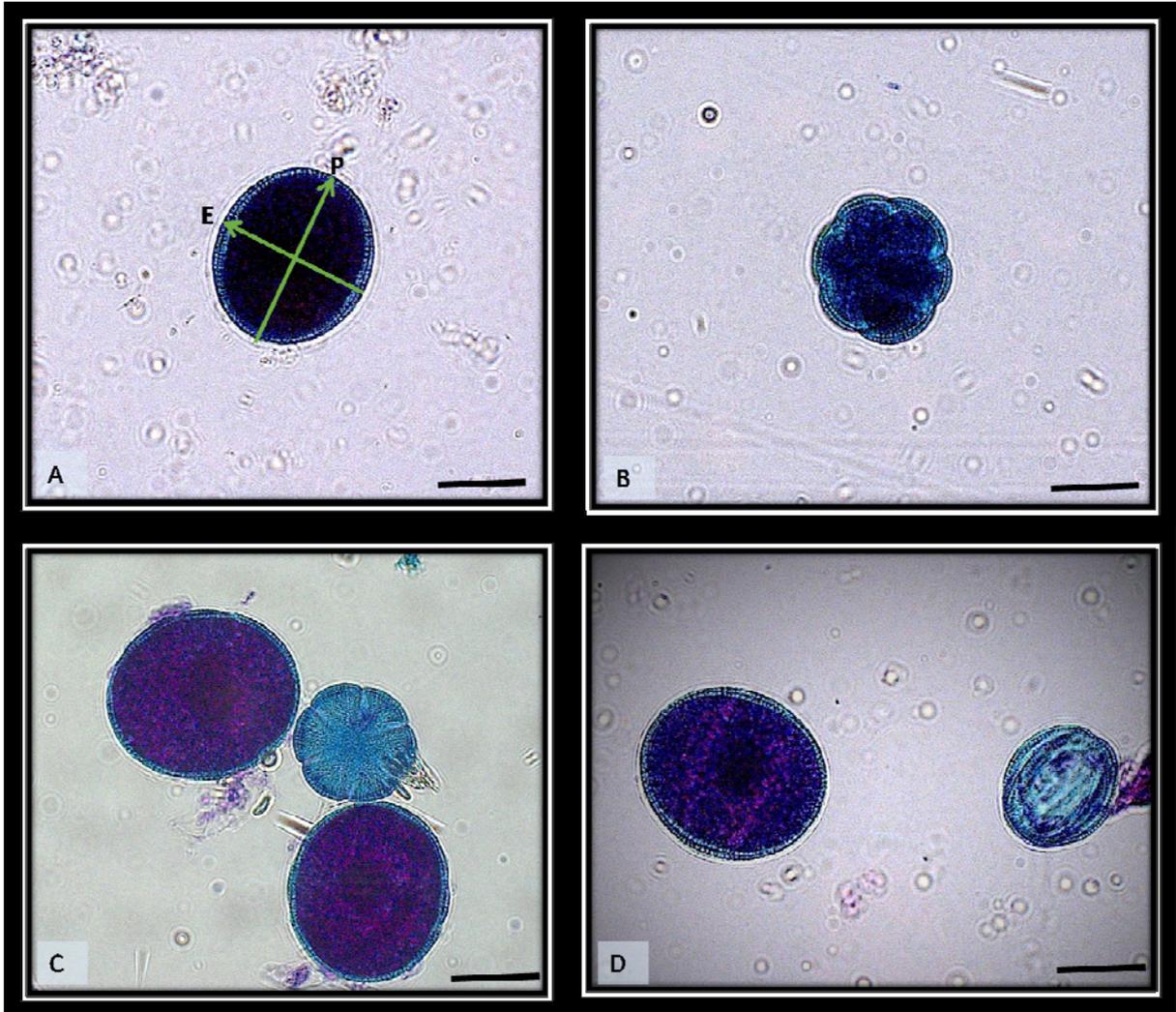
razão encontra-se entre 1,00 a 1,14 μm . KMB2 apresenta tipo polínico subprolado, pois a razão P/E é de 1,16 μm , fundamentada no intervalo 1,14 a 1,33 μm . Já EKS12 obteve razão P/E igual a 1,61 μm e foi classificada como tipo polínico prolado, que se encontra na faixa de 1,33 a 2,00 μm . Com relação às análises de viabilidade polínica (Figura 10 C-D), todos os acessos analisados apresentaram valores considerados altos, superiores a 77% (Tabela 8).

Tabela 8 - Fertilidade do pólen em acessos de *C. fasciculata* e resultados do eixo polar (P), do eixo equatorial (E) e da razão P/E dos acessos analisado.

Acesso	Viabilidade polínica		P	E	P/E	Morfologia
	N ¹	%	Média(μm)	Média(μm)	Média	
KMB1	1000(2)	87,2	34,07	30,4	1,12	Prolado- esferoidal
KMB3	500(1)	98,6	33,3	28,74	1,16	Subprolado
KMB4	1000(2)	77,6	36,76	33,08	1,11	Prolado- esferoidal
EKS12	1000(2)	94,6	36,48	29,99	1,61	Prolado

N¹ corresponde ao número de células analisadas e o número de indivíduos está entre parênteses.

Figura 10 - Análises polínicas em *C. fasciculata*. (A) grão de pólen viável em vista equatorial (setas: P, eixo polar; E, diâmetro equatorial), (B) grão de pólen viável em vista polar com visualização dos 6 colpos, (C-D) grãos de pólen viáveis (escuro) e inviáveis (claros). Barra = 10 μ m.



3. DISCUSSÃO

Diversidade Genética Populacional

A distribuição geográfica é geralmente considerada como uma medida aproximada do número total de indivíduos de uma espécie, por isso, podemos esperar que em espécies com uma distribuição mais ampla há tendência em ter maior diversidade genética do que as espécies raras e ameaçadas de extinção (Karron, 1987;. Xiao *et al*, 2004). No entanto, muitos estudos têm mostrado que as espécies ameaçadas ou endêmicas também pode manter a alta diversidade genética (González-Astorga & Castillo-Campos, 2004; Luan *et al.*, 2006;. Zhang *et al.*, 2010).

Um nível significativo de variação genética foi revelado em populações de *C. fasciculata*. As análises indicaram que a maior parte da variação foi dentro em vez de entre as populações. Os dados mostraram populações moderadamente estruturadas e diferenciação genética pouco significativa entre essas populações ($P < 0,001$), sugerindo que há um moderado fluxo gênico. Estes dados diferem dos relatados por Agostini *et al.* (2010a) para *Cunila menthoides*, uma espécie intimamente relacionada com *C. fasciculata*. Neste estudo o autor demonstrou que *C. menthoides* se apresenta em populações bem estruturadas, de baixa variabilidade genética em um cenário de baixo fluxo gênico.

Há muitos fatores que determinam a estrutura genética de populações de plantas, incluindo a biologia reprodutiva, o fluxo gênico, disseminação de sementes e a seleção natural. A biologia reprodutiva é um dos fatores mais importantes. De acordo com Hamrick e Godt (1990), espécies de plantas com polinização cruzada tendem a apresentar entre 10 e 20% de variação genética entre as populações enquanto espécies que apresentam auto-fecundação exibem variação, em média, de 50% entre as populações. Embora não existam relatos sobre o sistema de reprodução de *C. fasciculata*, é provável que ela se apresente como uma espécie de polinização cruzada (Figura 5), e assim, a maior parte da variabilidade genética da mesma é esperada para ser apresentada dentro de populações (Hamrick & Godt, 1996), como foi observado neste trabalho. A relação positiva entre variabilidade genética e a distribuição geográfica, assim como a identidade genética das populações, tem sido observada em diversas espécies de plantas aromáticas como, por exemplo, *Artemisia annua* (Sangwan *et al.*, 1999), *Tanacetum vulgare* (Keskitalo *et al.*, 2001), *Primilla ovalfolia* (Nan *et al.*, 2003), inclusive

em plantas de Lamiaceae nativas do sul do Brasil, *Cunila galioides* (Fracaro & Echeverrigaray., 2005) e *Cunila incisa* (Agostini., 2003).

Óleos essenciais desempenham funções biológicas diferentes e importantes relacionadas com a adaptação ambiental, proteção contra estresses bióticos e abióticos, e atração do polinizador (Feresin *et al*, 2001; Jassim & Naji, 2003). Portanto, dependendo do meio ambiente e/ou condições genéticas, plantas da mesma espécie que vivem em ambientes diferentes podem diferir na composição dos seus óleos essenciais como uma resposta evolutiva para diferentes pressões ambientais. Estas diferenças podem levar a ligeiras alterações em suas vias metabólicas, resultando em diferentes componentes primários nessas populações (Agostini *et al.*, 2014). Nossos resultados diferem do estudo fitoquímico realizado por Agostini *et al* (2014), em que as mesmas populações de *C. fasciculata* foram analisadas quanto a sua composição de óleos essenciais, demonstrando que a população de Torres (EKS) apresenta um novo quimiotipo para a espécie, onde a composição majoritária é mentona, diferindo das outras populações. Esta variação química encontrada para as populações de *C. fasciculata* acaba, não podendo ser imputada apenas para uma variação molecular entre as populações. Sugerindo que a mudança de rota metabólica na população de Torres possa vir a ser regida pelo habitat onde esta é encontrada e por pressões ambientais distintas das outras populações.

O maior desafio da conservação é preservar a variabilidade genética para garantir os processos evolutivos (Soulé & Simberloff, 1982), já que em ambientes fragmentados há uma tendência de perda da variabilidade genética intrapopulacional devido à baixa frequência de troca gênica (Oostermeijer & den Nijs, 2003). No caso específico de *Cunila fasciculata*, a variabilidade intrapopulacional ainda se mantém alta garantindo os processos evolutivos da espécie, embora as populações fossem geralmente observadas em habitats severamente fragmentados e com pequenas dimensões populacionais. Contudo a constante interferência antrópica vigente nos habitats onde esta planta é encontrada somando ao seu endemismo e estar presente na Lista de espécies ameaçadas do Estado, alerta para que mais estudos sejam realizados com o fim de monitoramento e conservação da mesma. Aqui propomos a conservação *in situ*, que é geralmente a estratégia preferida para a maioria das espécies de plantas selvagens, porque permite as populações continuarem a serem expostas a processos evolutivos em seu habitat natural. Esta estratégia permite a perpetuação e integração de complexos de genes co-adaptados, especialmente na produção de novas resistências a estresses (pragas, doenças, mudanças climáticas) (AGA *et al.*, 2005; Vinceti *et al.*, 2004).

Análises Polínicas

O estudo de grãos de pólen tem subsidiado reformulações em grupos que apresentam problemas taxonômicos. A família Lamiaceae é um exemplo típico, pois a palinologia forneceu elementos que permitiram a separação de suas espécies em duas subfamílias: Lamioideae, na qual os grãos de pólen são providos de dois núcleos e três colpos, e *Nepetoideae* que abrange espécies com grãos trinucleados e hexacolpados (Wunderlinch, 1967). Os grãos de pólen hexacolpados aqui descritos para a espécie *Cunila fasciculata* já foram relatados para outros gêneros de *Nepetoideae* (Wunderlinch, 1967) sendo esta condição rara fora de Lamiaceae, exceto para alguns gêneros de Rubiaceae, como, por exemplo *Galium* (Harley *et al.*, 1992).

Saggio & Bir (1983) reportaram que das 109 espécies avaliadas de 35 gêneros distintos pertencentes à Lamiaceae, 66 espécies possuem grãos de pólen hexacolpados, indicando alta frequência dessa característica dentro da família. Outros gêneros de Lamiaceae possuem esse mesmo número de colpos, como ocorre em *Hymenocrater* e *Lycopus* respectivamente descritos por Jafari & Jafarzadeh (2008) e Moon & Hong (2003) e até para o gênero *Cunila*, onde as espécies *C. incisa* Benth., *C. platyphylla* Epling. e *C. spicata* Benth. também apresentaram o mesmo padrão de grãos de pólen hexacolpados (Palinoteca do Laboratório de Palinologia da Universidade Luterana do Brasil - ULBRA).

Vários autores descreveram que o maior número de colpos é uma característica derivada, pois as espécies das tribos mais primitivas de Lamiaceae (*Prostanthroideae* e *Ajugoideae*) são caracterizadas por possuírem grãos de pólen tricopados, mas que essa transição ainda não foi concluída, já que podem ser encontrados em *Prostanthera* grãos de pólen com mesocolpos estreitos alternados com os mais largos, característica considerada evolutivamente em transição (Schnarf, 1937; Borzova, 1960). Entretanto, Pozhidaev (1992) sugeriu que em Lamiaceae a existência do grão de pólen hexacolpado parece não estar ligada ao tipo tricolpado e sua origem evolutiva pode ser independente no decorrer da diferenciação dos grupos de *Lamiaceae*. A presença de mesocolpos de tamanho distintos é comum até mesmo em tribos de espécies mais especializadas. Além disso, na família também podem ser encontrados grãos de pólen de aspecto semelhante, com quatro ou cinco colpos. Essa variação não acompanha o número de seus núcleos. Já para Ressayre *et al.* (2002), um dos fatores responsáveis pelas variações do número e da posição dos colpos é o tipo de citocinese envolvida na formação dos grãos de pólen. Trata-se de um processo que envolve a divisão dos microsporócitos de duas formas: uma simultânea, na qual ocorre divisão citoplasmática após

cada divisão nuclear e outra sucessiva, em que o citoplasma só é dividido após a segunda divisão. Cada tipo de citocinese implica a formação de um determinado número de aberturas. Grãos de pólen monossulcados podem ser gerados tanto por citocinese simultânea quanto por sucessiva, enquanto na maioria das eucotiledôneas, a formação de grãos de pólen com três ou mais aberturas é realizada apenas pela simultânea (Furness *et al.*, 2004). Nesse sentido, a presença de seis colpos na espécie *C. fasciculata* bem como nas outras três espécies (*C. incisa*, *C. platyphylla*, *C. spicata*) do mesmo gênero, sugere a ocorrência de citocinese simultânea.

No que se refere ao tamanho dos grãos de pólen de *C. fasciculata*, embora tenham sido classificados como médios, existe uma faixa de variação entre cada planta analisada (Tabela 8). Um dos fatores responsáveis pela variação do tamanho do grão de pólen pode ser o acúmulo de substâncias em seu interior durante o seu processo de maturação, no qual alterações citoplasmáticas podem ser observadas, como a presença de numerosas vesículas e pequenas partículas, bem como o aumento de gotículas lipídicas e de grãos de amido em número e tamanho (Kuang *et al.*, 1996). Estas variações no tamanho de grão de pólen interferem diretamente na determinação do tipo polínico, uma vez que essa classificação é dada pela razão entre o eixo polar (P) e diâmetro equatorial do grão de pólen (Punt *et al.*, 2007). Talvez por essa razão sejam encontrados diversos tipos polínicos até mesmo a nível de espécie, como é o caso de *C. fasciculata*, onde se obteve tipos polínicos diversificados entre os diferentes acessos analisados, incluindo os tipos prolado-esferoidal, subprolado e prolado. Assim como em *Cunila*, outros gêneros também podem incluir espécies com tipos polínicos diversificados. Em *Salvia*, o polimorfismo dos grãos de pólen abrange os tipos oblado, suboblado, oblado-esferoidal, prolado-esferoidal e subprolado, com números de colpos distintos para a espécie *S. leucantha* (Gupta *et al.*, 1990).

O conhecimento da fertilidade polínica tem grande importância por gerar informações sobre a capacidade de regeneração de determinada população por meio da reprodução sexual, com a finalidade de garantir sua sobrevivência frente às adversidades do ambiente (Jennersten *et al.*, 1993). A porcentagem de grãos de pólen viáveis pode indicar qual é a estratégia de reprodução da espécie. Plantas com baixa viabilidade geralmente são plantas que possuem meiose irregular e, por isso, se reproduzem vegetativamente como alternativa de sobrevivência frente às pressões seletivas (Bengtsson *et al.*, 2000). As taxas de viabilidade de pólen altas obtidas neste estudo para *C. fasciculata* (superiores a 77%) indicam uma estabilidade meiótica elevada e sugerem a ocorrência de reprodução sexuada, muito embora essa espécie apresente propagação clonal mediante a formação de estolões subterrâneos.

Tamanho de genoma

A literatura reporta dados de tamanho de genoma para cerca de 80 espécies da família Lamiaceae (IPCN - Index to Plant Chromosome Numbers – Missouri Botanical Garden; <http://www.tropicos.org/Project/IPCN>). Contudo, não existem informações para nenhuma espécie de *Cunila* ou gêneros relacionados como *Glechon* Spr., *Rhabdicaulon* Epl. ou *Hesperozygis* Epl. O conteúdo de DNA médio para Lamiaceae é de $2C=2,43\text{pg}$, com valores mínimo e máximo de $2C=0,55\text{pg}$ e $12,47\text{pg}$, respectivamente. Todos os indivíduos analisados de *C. fasciculata* apresentaram valores $2C$ praticamente idênticos ($3,30\text{ pg}$), evidenciando assim uma constância no tamanho do genoma da espécie. Assim, *C. fasciculata* possui conteúdo de DNA semelhante à outras Lamiaceae como *Vitex negundo* ($2C=3,25\text{ pg}$ - Ohri, 2002), *Lamium galeobdolon* ($2C= 3,27\text{ pg}$ - Rosenbaumová *et al.*, 2004) e *Lamium flavidum* ($2C= 3,41\text{ pg}$ - Rosenbaumová *et al.*, 2004).

Estimativas de conteúdo de DNA podem se mostrar divergentes dentro de uma mesma (Bennett & Smith, 1976) sendo que essa variação intraespecífica usualmente reflete a evolução do complemento cromossômico. Por outro lado, muitas vezes, a detecção de variação nos resultados se deve aos métodos empregados na quantificação do DNA (densitometria ou citometria de fluxo) refletindo artefatos da técnica devido à falta de padronização e /ou coloração insuficiente (Greilhuber., 2005). São descritos casos de variação intraespecífica em plantas e animais são atribuídos a diferenças cromossômicas (aneuploidias, poliploidia, cromossomos B, cromossomos sexuais), além da variação no tamanho dos cromossomos (Gregory, 2005). Todavia, alterações no conteúdo de DNA podem também estar relacionadas com a proliferação diferencial de elementos transponíveis, resultando em grande parte das diferenças no tamanho de genoma entre espécies. (Piegu, 2006). Considerando a constância no tamanho do genoma dos indivíduos das diferentes populações, é provável que o número cromossômico seja o mesmo entre as populações, não havendo indícios de citótipos pliploides ou disploides.

CONCLUSÃO GERAL

Os dados levantados no presente trabalho indicaram que a técnica de ISSR foi capaz de avaliar a variabilidade genética, estrutura populacional e sugerir, a polinização cruzada como um sistema reprodutivo em populações de *C. fasciculata*. Esta espécie vegetal apresenta um grau alto de variância genética dentro de suas populações, o que sugere maior aptidão, diferentemente do que se espera para espécies raras ou ameaçadas. A diferenciação genética entre as populações da espécie demonstrou que estas populações são apenas moderadamente estruturadas vivendo em um possível cenário de fluxo gênico moderado entre elas.

Os resultados gerados nesse trabalho quanto à quantidade de DNA nuclear são inéditos, assim como os dados obtidos nas análises de morfologia e viabilidade grãos de pólen. Tais informações ampliam o conhecimento acerca do gênero *Cunila*, e principalmente da espécie *C. fasciculata*. A associação destes dados com outras abordagens genéticas como, análise a partir de marcadores co-dominantes (SSR), e a realização de técnicas de citogenética molecular (FISH), associados à investigações quanto à biologia reprodutiva e polinização permitirão uma melhor compreensão dos processos evolutivos e da sua biologia como um todo.

CAPITULO II

1. Análises moleculares complementares

Considerando que o tamanho amostral da população KMB1 foi pequeno e que a amplificação não foi eficiente para um número significativo de indivíduos das populações, optou-se por realizar análises moleculares complementares no ano de 2014. Acreditamos que tais acréscimos tornarão os resultados obtidos no capítulo I mais robustos e confiáveis.

2. Material e métodos

Material

O material de *Cunila fasciculata* utilizado para as análises complementares foi coletado nos mesmos pontos de ocorrência já mencionados no capítulo 1, sendo quatro deles próximos ao município de Paraíso do Sul/RS e um deles em Torres/RS.

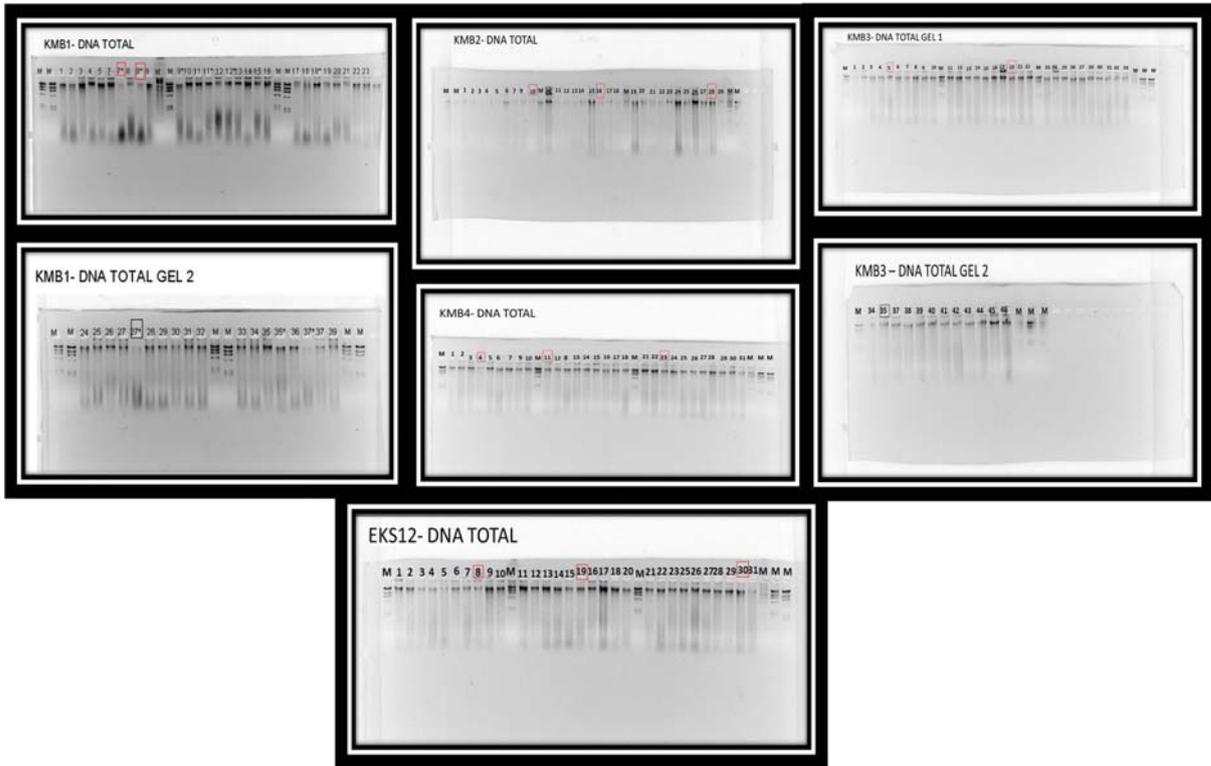
Coletas a campo

O grupo de pesquisa realizou coletas a campo no ano 2014 nos meses de outubro/novembro, tanto em Torres/RS como em Paraíso do Sul/RS.

Análises moleculares

Todo material vegetal coletado nas saídas de campo foi identificado e acondicionado em sílica-gel. Esse material foi pesado e triturado no macerador para posterior extração de DNA. Assim, o DNA foi extraído de todos os indivíduos de cada uma das cinco populações (KMB1, KMB2, KMB3, KMB4 e EKS12) seguindo o protocolo modificado de Doyle & Doyle (1987), o mesmo das análises anteriores. Após a etapa de extração, o DNA foi quantificado por meio de um espectrofotômetro Nano Drop e analisado qualitativamente por meio de gel de agarose 1 % (Figura 11). Diluiu-se o DNA total de cada indivíduo em TE' para posterior uso na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Figura 11- Análise qualitativa de DNA extraído das cinco populações de *C. fasciculata*.



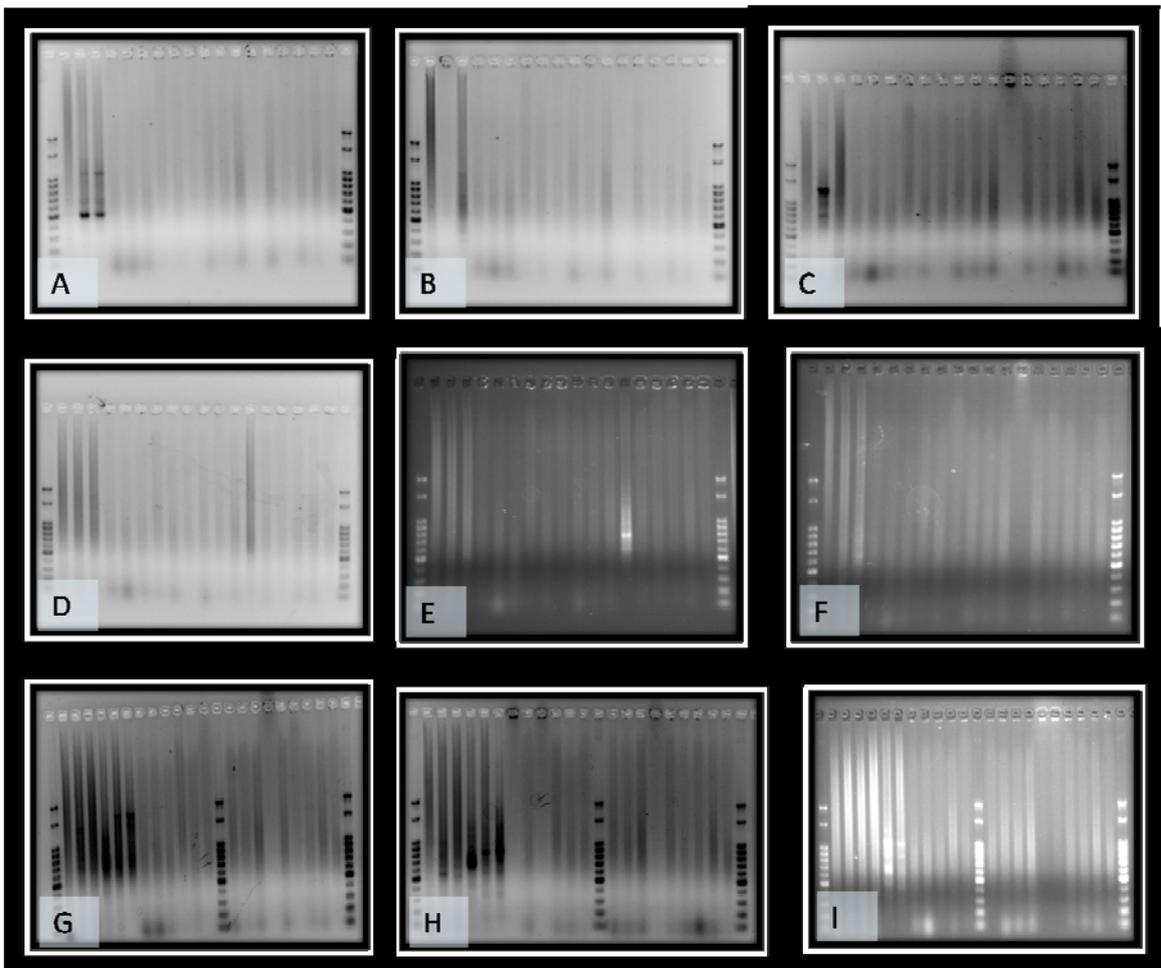
Testes foram realizados a fim de se padronizar a reação de PCR. Assim, foi realizado um experimento-piloto no qual foram avaliados três indivíduos de cada uma das cinco populações, além de um negativo, e de duas a quatro amostras de positivos para 20 *primers* de ISSR (Tabela 9).

Tabela 9 - Primers ISSR testados nas análises de amplificação do DNA.

<i>Primers</i>		
F 3	ORY807	ISCS12
F4	ORY810	ISCS17
F5	ORY811	ISCS19
F7	ORY814	ISCS20
F11	ORY834	ISCS23
F12	ORY872	-
F13	ORY879	-

Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, com corante Gel Red. Entretanto, nenhum dos *primers* utilizados gerou amplificação nas populações amostradas, salvo em alguns casos, para os positivos testados (Figura 12).

Figura 12 - Testes dos *primers* ISSR. (A) F3; (B) F4; (C) F11, (D) ORY80; (E) ORY808; (F) ORY834; (G) ISCS19; (H) ISCS 20; (I) ISCS 32.



Posteriormente foram testadas adaptações no protocolo de reação de PCR, utilizando-se DMSO 2% (Figura 13), diferentes quantidades de DNA na reação (1 μ L e 2 μ L) e também se diluindo o DNA quantificado em até 1ng/ μ l (Figura 14), com o objetivo de proporcionar melhores condições para a amplificação de DNA dos indivíduos com os *primers* selecionados.

Figura 13 - Testes de amplificação de DNA utilizando-se DMSO 2% na reação de PCR. (A) *primers* F3 e F4; (B) *primers* F5 e F13.

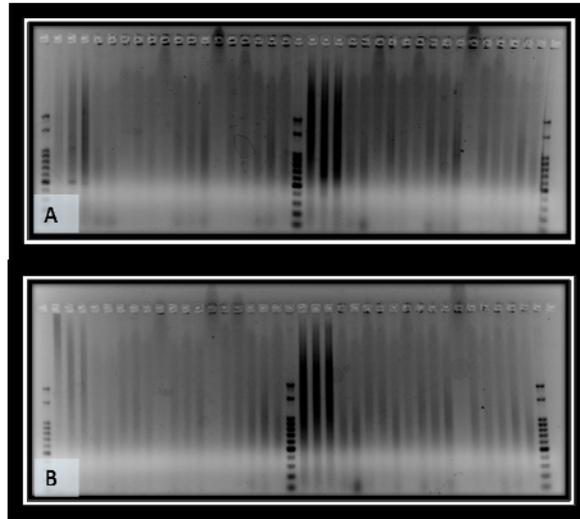
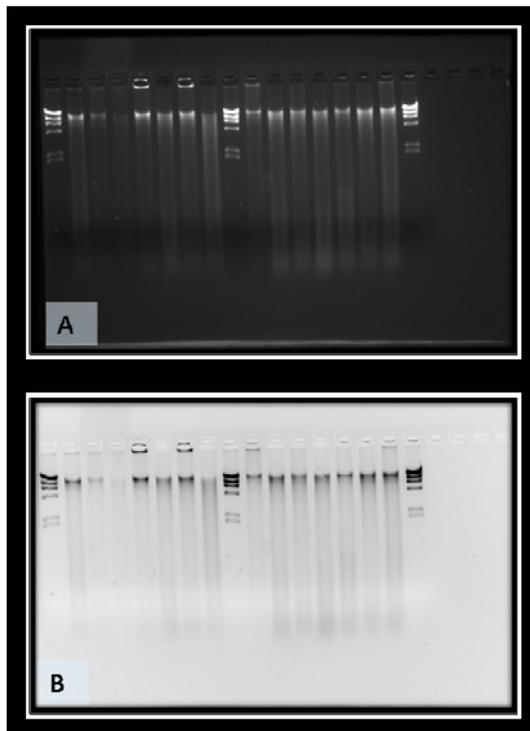


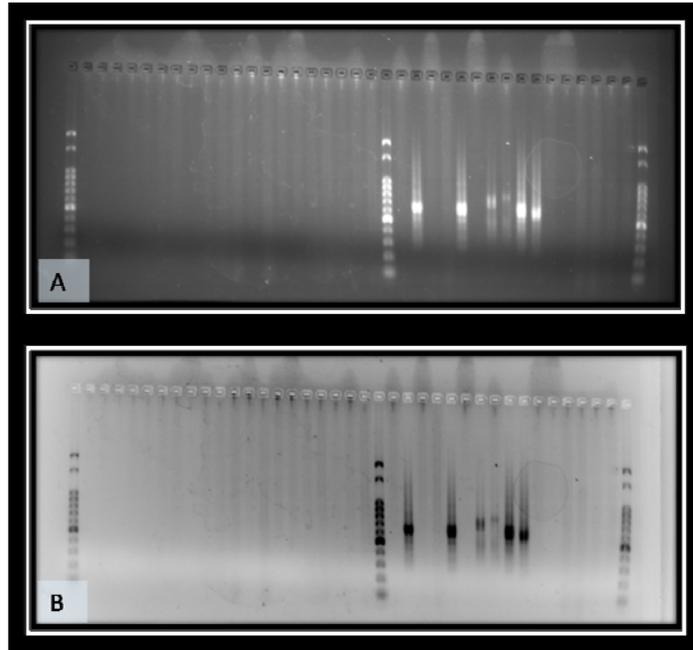
Figura 14 - Análise qualitativa do DNA extraído e diluído a 1ng/ μ L.



A diluição de DNA à concentração de 1ng/ μ L foi a única adaptação de protocolo de PCR testada que resultou na amplificação. Foi observada a amplificação de DNA em dois indivíduos de *C. fasciculata*, em populações distintas (Figura 15). Entretanto, esse *primer* não

pode ser selecionado, pois é necessário que haja, pelo menos, a amplificação de dois indivíduos de cada população

Figura 15 - Teste de amplificação do *primer* F4 com DNA diluído em 1ng/ μ l.



Até o presente momento, estão sendo testadas outras modificações no protocolo de PCR utilizado por nosso grupo de pesquisa, além de nova extração de DNA das amostras coletadas estarem sendo realizadas. Com isso, espera-se repetir as análises, a fim de dar continuidade ao trabalho e aumentar a robustez dos dados já obtidos.

REFERÊNCIAS

- AGA E., BEKELE, E., BRYNGELSSON, T., (2005) **Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia.** *Genetica* 124:213–221.
- AGOSTINI G., (2003) **Micropropagação, variabilidade química e genética em *Cunila incisa* Benth.** Dissertação de mestrado. PPG Biotecnologia, UCS. Caxias do Sul, RS. 72p.
- AGOSTINI G., AGOSTINI F., ATTI-SERAFINI L., ECHEVERRIGARAY S., (2006) **Essential oil variability within and among populations of *Cunila incisa* Benth.** *Biochem. Syst. Ecol.* 34:802-808.
- AGOSTINI G., ECHEVERRIGARAY S., SOUZA-CHIES T. T., (2008) **Genetic relationships among South American species of *Cunila* D. Royen ex L. based on ISSR.** *Pl. Syst. Evol.*
- AGOSTINI G., ECHEVERRIGARAY S., SOUZA-CHIES T.T, (2010a) **Genetic diversity of the endangered Brazilian endemic herb *Cunila menthoides* Benth. (Lamiaceae) and its implications for conservation.** *Biochem. Syst. Ecol.* 38:1111-1115.
- AGOSTINI G.; AGOSTINI F.; BERTOLAZZI M.; ECHEVERRIGARAY S. SOUZA-CHIES T.T (2010b) **Variation of the chemical composition of essential oils in Brazilian populations of *Cunila menthoides* Benth. (Lamiaceae).** *Biochem. Syst. Ecol.* 38: 906-910.
- AGOSTINI G., ECHEVERRIGARAY S., SOUZA-CHIES T. T., (2012) **A preliminary phylogeny of the genus *Cunila* D. Royen ex L. (Lamiaceae) based on ITS rDNA and trnL-F regions.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65:739–747.
- AGOSTINI G., BORDIGNON S. A. DE L., SOUZA-CHIES T.T., AGOSTINI F., COLUSSI G., ECHEVERRIGARAY S., MARASINI A. B., SANTOS E.K., (2014) **Variation in the essential oils of the endangered species *Cunila fasciculata* Benth. (Lamiaceae).** *Biochem. Syst. Ecol.* 54:292-298.
- ALEXANDER M.P., (1980) **A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria.** *Stain Technol.* 55:13-18.
- APEL M.A., RIBEIRO V. L. S., BORDIGNON S.A.L., HENRIQUES A. T., VON POSER G., (2009) **Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** *Parasitol Res.* 105:863-868.

- BAROW M., MEISTER A., (2003) **Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size.** *Plant, cell and environment.* Oxford, 26:571-584.
- BENGTSSON B.O., CEPLITIS A., (2000) **The balance between sexual and asexual reproduction in plants living in variable environments.** *Journal of Evolutionary Biology*, Basel, 3:415-422.
- BENNETT M. D., SMITH J. B., (1976) **Nuclear DNA amounts in angiosperms.** *Philosophical transaction of the Royal Society of London*, London, 274:277-274.
- BENNETT MD, LEITCH IJ. 2005. **Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects.** *Annals of Botany*, 95:45-90.
- BORDIGNON, S. A. L. (1997) **Estudo botânico e químico de espécies de *Cunila* D. Royen ex L. (Lamiaceae) nativas do sul do Brasil.** Tese de doutorado. PPG Farmacia, UFRGS. Porto Alegre, RS. 197p.
- BORDIGNON S. A. DE L., SCHENKEL E. P., SPITZER V., (1997) **The essential oil composition of *Cunila microcephala* and *Cunila fasciculata*.** *Phytochemistry*. 44:1283-1286.
- BORDIGNON S. A. DE L., SCHENKEL E. P., SPITZER V., (1998) **The essential oil of *Cunila menthoides* Benth (Lamiaceae).** *J. Essent. Oil Res*, 10:317-320.
- BORDIGNON S. A. DE L., SCHENKEL E. P., SPITZER V., (1999) **The essential oil composition of *Cunila angustifolia* Benth (Lamiaceae).** *J. Essent. Oil Res*, 11:145-148.
- BORDIGNON, S. A. DE L., SCHENKEL E. P., SPITZER V. (1996) **The essential oil of *Cunila incisa* (Lamiaceae). A rich source of 1,8-cineole.** *Quím. Nova*, 19:105-107.
- BORZOVA L. A., (1960) **The question of the origin of the six-grooves type of pollen of the mits.** *Doklady Akademiinawk SSSR, Leningrad*, Leningrad, 33:1465-1467.
- BRASIL. **Decreto Federal n.º 58.054**, de 23 de março de 1966.
- _____. Decreto Estadual n.º 52.109, de dezembro de 2014. **Lista da espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul.** *Diário Oficial*.
- CICCIÓ J. F.; POVEDA L. J. (1999) **Volatile constituents of *Cunila polyantha* (Lamiaceae) from Costa Rica. A rich source of menthone.** *Rev. Biol. Trop.* 47: 377.
- DAWSON IK, WAUGH R, SIMONS J & POWELL W (1997) **Simple sequence repeats provide a direct estimate of pollen-mediated gene dispersal in the tropical tree *Gliricidia sepium*.** *Mol. Ecol*, 6:179-183.

- DOLEZEL J., BINAROVÁ P., LUCRETTI S., (1989) **Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry.** *Biologia Plantarum* 31: 113–120.
- DOYLE J.J. & DOYLE J.L., (1987) **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.
- DUKE, J.A.,(1994) **Biologically- active compounds in important species.** *In: George Charalembours (Ed). Spicies, herbs, and edible fungi.* Amsterdam: Elsevier Publishers. p 595.
- ECHEVERRIGARAY S., ALBUQUERQUE M., ZACARIA J., ATTI DOS SANTOS A. C., ATTI-SERAFINI L., (2008) **Chemical variations on the essential oils of *Cunila spicata* Benth. (Lamiaceae), an aromatic and medicinal plant from South Brazil.** *J. Essent. Oil Res.* In press.
- ECHEVERRIGARAY S., FRACARO F., ATTI DOS SANTOS A. C., PAROUL N., WASUM R., ATTI-SERAFINI L., (2003) **Essential oil composition of south Brazilian populations of *Cunila galioides* and its relation with the geographic distribution.** *Biochemical Syst. Ecol*, 31:467-475.
- EPLING C. (1936) **Synopsis of the South American Labiatae.** *Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih*, II. 85:97-192.
- ERDTMAN G. (1971) **Pollen morphology and plant taxonomy angiosperms: an introduction to palynology.** New York: Hafner Publishing Company.
- EXCOFFIER L, SMOUSE PE, QUATTRO JM (1992) **Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data.** *Genetics*, 131:479-491.
- FERESIN G.E., TAPIA A., LOPEZ S.N., ZACCHINO S.A., (2001) **Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine.** *J. Ethnopharmacol*, 78:103–107.
- FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL : <
<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/>> Acessado em: 25 de maio de 2015.
- FRACARO F., ZACARIA J., ECHEVERRIGARAY S., (2005) **RAPD based genetic relationship between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth.** *Biochem. Syst. Ecol*, 33:409-417.
- FURNESS C.A., RUDALL P.I., (2004) **Pollen aperture evolution : a crucial factor for eudicot success? Trends in plant science.** *Oxford*, 9:154-158.
- GARCIA-PEÑA M.R., (1989) **A new species of *Cunila*(Lamiaceae) from southwestern Mexico.** *Kew Bulletin*. 44:727-730.

- GONZÁLEZ-ASTORGA J., CASTILLO-CAMPOS G., (2004) **Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea* aromatic Castillo-Campos and Lorence, (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico.** Ann. Bot. 93:521–528.
- GRASHOF-BOKDAM C.J., JANSEN J. & SMULDERS M.J.M., (1998) **Dispersal patterns of *Lonicera periclymenum* determined by genetic analysis.** Mol Ecol 7:165-174.
- GREGORY T. R. (2005) **The C- value enigma in plants and animals : a review of parallels and an appeal partnership.** Annals of botany, London, 95:133-146.
- GREILHUBER J., (2005) **Intraspecific variation in genome size in angiosperms : identifying its existence.** Annals of Botany, London, 95: 91-98.
- GREILHUBER J., TEMSCH E.M., LOUREIRO J.C.M., (2007) **Nuclear DNA content measurement.** In: Dolenzel J., Greilhuber J., Suda J., (Ed) Flow cytometry with plant cells. Weinheim.
- GUERRA M. (1988) **Introdução à citogenética geral.** Rio de Janeiro: Guanabara.
- GUPTA A., SHARMA C., (1990) **Polymorphism in pollen of *Salvia leucantha* (Lamiaceae),** Grana, Stockholm, 4:277-284.
- HAMRICK J.L., & GODT M.J.W., (1990) **Allozyme diversity in plant species.** In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS ed. Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts.
- HAMRICK J.L., GODT M.J.W., (1996) **Effect of life history traits on genetic diversity in plant species.** Philos Trans. R. Soc. London. B. Biol. Sci, 351:1291–1298.
- HARLEY M.M, *et al.*, (1992) **Pollen morphological studies in tribe Ocimeae (Neptoideae : Labiatae) :** I. *Ocium* L. Grana, Stockholm, 31:161-176.
- HARTL, D. L. AND CLARK A. G., (1989) **Principles of Population Genetics.** 2 ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. p 682.
- HE T., KRAUSS S.L., LAMONT B.B., MILLER B.P.; ENRIGHT N.J. (2004). **Long-distance dispersal in a metapopulation of *Bankasia hookeriana* inferred from a population allocation analysis of amplified fragment length polymorphism data.** Molecular Ecology, 13:1099-1109.
- HERNANDEZ J., GARDUÑO R.R., GARCIA P., RIOS M., DELGADO G., (1989) **Estudo químico de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana.** II Seminario Mesoamericano de etnofarmacología. II Congresso Nacional de Medicina Popular. Resumen. Universidade de Costa Rica; Universidad Nacional e Museo Nacional de San José, Costa Rica. 11-15.

- HOUSE P.R., LAGOS-WITTE S., OCHOA L., TORRES C., MEJÍA T., RIVAS M., (1995) **Plantas medicinales comunes de Honduras**. Tegucigalpa. 156-157.
- IRVING R. S. (1976). **Chromosome numbers of Hedeoma (Labiatae) and related genera**. Syst. Bot. 1: 46–56.
- JAFARI A., JAFARZADEH F., (2008) **Anatomical and pollen ornamentation study on Hymenocrater species in Noth East of Iran**. Pakistan Journal of Biological Sciences, Dacca, 11:2149-2153.
- JASSIM S.A.A., NAJI M.A.A., (2003) **Novel antiviral agents: a medicinal plant preservative**. J. Appl. Microbiol, 95:412–427.
- JENNERSTEN O., NELSSSEN S. G., (1993) **Insect flower visitation frequency and seed production in relation to patch size in *Viscaria vulgaris* (Caryophyllaceae)**. Oikos, Buenos Aires, 68: 283-292.
- KARRON J.D., (1987) **A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners**. Evol.Ecol, 1:47–58.
- KESKITAL M., PEHU E., SIMON J.E., (2001) **Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes**. Biochem. Syst. Ecol, 29:267-285.
- KRON P., SUDA J., HUSBAND B.C., (2007) **Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. Annual review of ecology, evolution and systematics**, Palo Alto, 38: 847-876.
- KUANG A., MUSGRAVE M.E., (1996) **Dynamics of vegetative cytoplasm during generative cell formation and pollen maturation in *Arabidopsis thaliana***. Protoplasma, New York, 194:81-90.
- LUAN S., CHIANG, T.Y., GONG, X., (2006) **High genetic diversity vs. low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, revealed by ISSR fingerprinting**. Ann. Bot. (Lond), 98:583–589.
- LUZ R., COSTA S. O. P., ECHEVERRIGARAY S., DELAMARE A. P. L., (2006) **Effect of the essential oils of Brazilian *Cunila* species on the growth and biofilm formation by *Aeromonas*** In: **Modern multidisciplinary applied microbiology: Exploiting microbes and their interactions**. Ed. Weinheim : Willey-VCH, 692-695.
- MANJARREZ A.; MENDOZA V. (1966) **The volatile oils of *Agastache mexicana* (Benth.) Epling and *Cunila lythrifolia* Benth**. Perf. Essent. Oil Rec, 57: 561-562.
- MANTEL N, VALAND RS (1970) **A technique of nonparametric multivariate analysis**. Biometrics, 547-558.

- MARIE D, BROWN SC. 1993. **A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species.** Cell, 78: 41–51.
- MCDONALD DB & POTTS WK (1997) **DNA Microsatellites as Genetic Markers at Several Scales. Avian molecular evolution and systematics.** San Diego, D.P. Mindell ed. Academic Press, 29-50.
- MOREIRA E. A.; KRAMBECK R. (1976) **Análise cromatográfica do óleo essencial das folhas de *Cunila angustifolia* Benth.** Tribuna Farmacêutica, 44:50-59.
- NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. **Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers.**
- NAN P., PENG S. SHI S., REN H., YANG, J., ZHONG Y., (2003) **Interpopulation congruence in chinese *Primula ovalifolia* revealed by chemical and molecular markers using essential oils and ISSRs.** Z. Naturforsch. 58:57-61.
- NANI T.F. (2011) **Aspectos Morfológicos e cromossômicos em espécies de *Plectranthus* L.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras(UFLA), Lavras, MG. 38-89.
- NEI M (1978) **Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals.** Genetics, 89:583-590.
- OOSTERMEIJER J.G.B., LUIJTEN S.H., DEN NIJS J.C.M., (2003) **Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation.** Biol. Conserv, 3:389-398.
- OUBORG N.J., Y. PIQUOT AND J.M. VAN GROENENDAEL, 1999. **Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants.** J. Ecol., 87: 551-568.
- PALINOTECA DO LABORATÓRIO DE PALINOLOGIA DA UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL - ULBRA. Disponível em: <<http://sites.ulbra.br/palinologia/colecao.htm#l>>. Acessado em: 25 de maio de 2015.
- PALMA-SILVA C., SANTOS D.G., KALTCHUK-SANTOS E. & BODANESE-ZANETTINI M.H., (2004) **Chromosome numbers, meiotic behavior, and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil.** Am J Bot 91(6): 804–807.
- PARKER P.G., SNOW A.A., SCHUG M.D., BOOTON G.C. & FUERST P.A., (1998) **What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker.** Ecology, 79(2):361–382.
- PEAKALL .R, SMOUSE P.E., (2006) GenAlEx 6: **genetic analysis in Excel.** Population genetic

- PEAKALL R., SMOUSE P.E., (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. **Population genetic software for teaching and research-an update**. *Bioinformatics*, 28:2537-2539.
- PIEGU B., *ET AL.*, (2006) **Doubling genome size without polyploidization: dynamics of retro transposition driven, genome expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative rice**. *Genome Research*, Cold Spring Harbor, 16: 1262-1269.
- PLINE W.A., EDMISTEN K.L., OLIVER T., WILCUT J.W., WELLS R. & ALLEN N.S., (2002) **Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability**. *Crop Sci* 42: 2193–2200.
- POZHIDAEV A., (1992) **The origin of three and sixcolpate pollen grain in the Lamiaceae**. *Grana*, Stockholm, 31:49-52.
- PUNT W. ET AL., (2007) **Glossary of pollen and spore terminology**. Review of paleobotany and palynology, Amsterdam, 143:1-81.
- REDDY M. P., SARLA N., SIDDIQ E., (2002) **Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding**. *Euphytica*, 128: 9–17.
- RESSAYRE A., ET AL., (2002). **Aperture pattern ontogeny in angiosperms**. *Journal of experimental zoology*, New York, 294:122-135.
- ROMERO-ZARCO C., (1986) **A new method for estimating karyotype asymmetry**. *Taxon* 35:526– 530.
- SAGGOO M. I.S., BIR S.S., (1983) **Cytopalynological studies on Indian members of Acanthaceae and Labiatae**. *Journal of palynology*, New Delhi, 19:243-277.
- SANDRI I. G., ZACARIA J., FRACARO F., DELAMARE A.P.L., ECHEVERRIGARAY S., (2007) **Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against food borne pathogens and spoiling bacteria**. *Food Chem.* 103:823-828.
- SANGWAN R. S., SANGWAN N. S., JAIN D.C., KUMAR S., RANADE A.S., (1999) **RAPD profile genetic characterization of chemotypic variants of *Arthemisia annua* L.** *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 47:935-94.
- SCHNARF K., (1980) **Studien uber der Bau der pollenßrner der angiospermen**. *Planta*, Berlim, 30:183-185.
- SIMÕES C. M. O., MENTZ L. A., SCHENKEL E. P., IRGANG B. E., STEHMANN J. R., (1994) **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**, 4th ed., Editora da Universidade/ UFRGS, Porto Alegre, Brazil.
Software for teaching and research. *Mol Ecol Notes*, 6:288–295.

- SOUTÉ M.E., SIMBERLOFF D., (1986) **What do genetics and ecology tell us about the design of nature reserves?** Biol. Conserv, 35:19-40.
- STEBBINS G. L.,(1971) **Chromosomal evolution in higher plants.** Edward Arnold, London, UK.
- SUDA J., KYNCL T., FREIOVA R., (2003) **Nuclear DNA amounts in Macaronesian angiosperms.** Annals of botany, London, 92:152-164.
- SWIFT H., (1950) **The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei.** Proceedings of the Academy of Sciences of The United States of America, Washington, 36:643-654.
- TACUATIÁ L.O., SOUZA-CHIES T.T., EGGERS L., SILJAK-YAKOVLEV .S AND SANTOS E.K.,(2012) **Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil.** Bot J Linn Soc, 169:350-364.
- TROTTER, J. WINMDI© . Version 2.8. La Jolla: The Scripps Research Institute, 2000. Disponível em: <<http://facs.scripps.edu/software.html>>. Acesso em: 31 Janeiro 2015.
- VINCETI, B., VAN BREUGE, P., AMARAL, W., (2004) **The practical implications of research outputs from forest genetic studies.** In: Vinceti, B., Amaral, W., Meilleur, B. (Eds.), Challenges in Managing Forest Genetic Resources for Livelihoods. International Plant Genetic Resources Institute, 245–267.
- WILLIAMS JGK, KUBELIK AR, LIVAK KJ, RAFALESKI JA, TINGEY SV (1990) **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic Acids Res, 18:6531–6535.
- WUNDERLICH R., (1967) **Ein vorschlag zu einer natürlichen gliederung der Labiaten aufgrund der pollenkörner , der samenentwicklung und des reifen Samens.** Österreich. Bot. Zeitg, 114:383-483.
- XIAO L.Q., GE X.J., GONG X., HAO G., ZHENG S.X., (2004) **ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae).** Ann. Bot. (Lond) 94:133–138.
- ZHANG D.Q., GAO L.M., YANG Y.P., (2010) **Genetic diversity and structure of a traditional Chinese medicinal plant species, *Fritillaria cirrhosa* (Liliaceae) in southwest China and implications for its conservation.** Biochem. Syst. Ecol. 38:236–242
- ZIETKIEWICZ E.; RAFALSKI A.; LABUDA D. (1994) **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification.** *Genome*, 20: 176–18