

## NÚMERO CROMOSSÔMICO DE *Lippia gracilis* Schauer (VERBENACEAE) OCORRENTES NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL<sup>1</sup>

LUIS EDUARDO DE SOUSA SOARES<sup>2\*</sup>, KATHIA MARIA BARBOSA SILVA<sup>2</sup>, ZENAIDE BARBOSA<sup>3</sup>, CYNTHIA CAVALCANTI ALBUQUERQUE<sup>2</sup>

**RESUMO** - O gênero *Lippia* (Verbenaceae), compreende aproximadamente 200 espécies de distribuição pantropical. *Lippia gracilis* Schauer, conhecida popularmente como cidreira da serra, é uma planta aromática, nativa do Nordeste brasileiro, utilizada na medicina popular como anti-séptico e no tratamento de dermatites. Apesar da citogenética servir de importante ferramenta na delimitação taxonômica de táxons, estudos citogenéticos no gênero *Lippia* são restritos. Face ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo determinar, pela primeira vez, o número cromossômico de exemplares de *L. gracilis*, e dessa forma contribuir para um melhor entendimento taxonômico do gênero. Neste sentido pontas de raízes recém-coletadas de exemplares cultivados foram pré-tratadas com solução de 8-hidroxiquinoleína 2mM por 4 horas, fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24 horas e estocadas no próprio fixador para posterior análise. As raízes foram hidrolisadas em HCl 5N por 20 minutos e as lâminas, preparadas por esmagamento em ácido acético (45%) e coradas com Giemsa 2%. As melhores metáfases foram fotografadas e apontaram para o número cromossômico  $2n=24$ . Além disso, foram observados cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Como há vários números cromossômicos no gênero *Lippia*, que variam desde  $n=10$  até  $n=30$ , e como o mesmo é citogeneticamente pouco conhecido, faz-se necessária a realização de estudos citogenéticos mais abrangentes no gênero, envolvendo um maior número de espécies, de forma que esses dados possam auxiliar a esclarecer contradições taxonômicas na família Verbenaceae.

**Palavras-chave:** Cromossomos. Cariótipo. Planta medicinal.

## CHOMOSOME NUMBER OF *Lippia gracilis* Schauer (VERBENACEAE) FROM RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL

**ABSTRACT** - The genus *Lippia* (Verbenaceae) comprises about 200 species of pantropical distribution. *Lippia gracilis* Schauer, popularly known as the mountain balm, is an aromatic plant, native of northeastern Brazil, used in folk medicine as an antiseptic and to treat dermatitis. Although cytogenetic serve as a tool in taxonomy rate, cytogenetical studies of genus *Lippia* are restricted. Given the above, the present study aimed to determine, at the first time, the chromosome number of copies of *L. gracilis*, and thereby contribute to a better taxonomic understanding of this genus. In this sense root tips collected from newly planted specimens were pre-treated with a solution of 2mM 8-hydroxyquinoline for 4 hours, fixed in Carnoy 3:1 (ethanol: acetic acid) for 24 hours and stored in the same fixative for later analysis. The roots were hydrolyzed in 5N HCl for 20 minutes and the slides, prepared by squashing in acetic acid (45%) and stained with 2% Giemsa. The best metaphases were photographed and pointed to the chromosome number  $2n = 24$ . Moreover, were observed metacentric and submetacentric chromosomes. Because there are several chromosome numbers in the genus, from  $n=10$  to  $n=30$ , and as the same is little known cytogenetically, f more comprehensive cytogenetic studies are necessary, involving a larger number of species, so these data may help to clarify taxonomic inconsistencies in the family Verbenaceae.

**Keywords:** Chromosomes. Cytogenetics. Medicinal Plant.

\*Autor para correspondência.

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 13/09/2010; aceito em 26/03/2011.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, UERN, av. Professor Antônio Campos s/n-km 46 BR 110, Costa e Silva, 59633-010, Mossoró – RN; edusoares@gmail.com; kmbsbarbosa@yahoo.com; cycavalcanti@gmail.com

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Biológicas, UECE, av. Dom Aureliano Matos, 2058, 62930-000, Limoeiro do Norte – CE; zenbarbosa@yahoo.com

## INTRODUÇÃO

O gênero *Lippia* compreende aproximadamente 200 espécies de árvore, arbustos e pequenas árvores (PASCUAL et al, 2001). O Brasil é um dos maiores centro de diversidade do referido táxon, possuindo aproximadamente de 70-75% de todas as espécies conhecidas (VICCINI et al., 2006).

Comumente, as espécies do gênero *Lippia* apresentam uma longa lista de propriedades farmacológicas, principalmente por acumular óleos essenciais em seus tricomas glandulares (NETO et al., 2010). Por tal motivo, as espécies desse gênero são amplamente empregadas como plantas medicinais, dessa forma, importantes sob o ponto de vista econômico (MELO et al., 2010) Para a subfamília Verbenoidae, a qual pertence as espécies do gênero *Lippia* a produção de metabólitos secundários como limoneno e carvona está intimamente relacionada a um conjunto de variações morfológicas, anatômicas e fitoquímicas resultantes de adaptações a condições ambientais (SANTOS, 2004).

Pertencente grupo supracitado destaca-se a espécie *Lippia gracilis* Schauer. ou alecrim-dachapada, nativo da região Nordeste do Brasil, que é um arbusto muito ramificado, com altura variando de 1,2 a 3,0 m portando folhas aromáticas, (SANTOS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2008) que exibem forte atividade antimicrobiana, tendo como principais constituintes o timol e carvacrol como metabólitos secundários (ALBUQUERQUE et al., 2006). Através da comercialização de seu óleo essencial, a espécie em questão pode constituir importante fonte de renda para as comunidades rurais do Semi-Árido, visto que possui boa capacidade de adaptação a ambientes secos.

O gênero *Lippia* é considerado como sendo taxonomicamente pouco compreendido e incompletamente definido do ponto de vista citogenético. Alguns problemas envolvendo o número e a delimitação de espécies do referido taxon foram reportados por diversos autores, dentre esses merecem destaque os desacordos taxonômicos com relação aos gêneros *Aloysia*, *Acantolippia* e *Phyla* considerados por Benthán e Hooker (1876) e Briquet (1897) como sinônimos, seções ou subgêneros de *Lippia*. Como uma ferramenta adicional para análise taxonômica, os estudos dos cromossomos mitóticos e meióticos, seja através de técnicas convencionais, de técnicas de bandeamento ou de técnicas de citogenética molecular são de grande auxílio na delimitação taxonômica de gêneros que, muitas vezes, são pobremente definidos e compreendidos (VIÉGAS et al., 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo determinar, pela primeira vez, o número de cromossomos de *L. gracilis*, visando inferir possíveis mecanismos genéticos envolvidos na evolução da espécie, assim como contribuir com informações sobre sua morfologia cromossômica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos citogenéticos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal (LCTV) pertencente à Faculdade de Ciências Exatas e Naturais (FANAT) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN).

Estacas de indivíduos distintos pertencentes a uma população de *Lippia gracilis* Schauer foram coletadas em 2008 no município de Felipe Guerra (RN) e cultivadas na casa de vegetação da FANAT. Exsiccatas do material analisado foram depositadas no Herbário Dárdano de Andrade (MOSS) da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) sob número de tombo: 12514.

Para as análises citológicas, pontas de raízes, obtidas de diferentes estacas cultivadas, foram pré-tratadas com solução de 8-hidroxiquinoleína 2 mM, a 4 °C por 4 horas, fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético, respectivamente) por 24 horas e estocadas a -20 °C no fixador, em freezer, para posterior análise, conforme Guerra e Souza (2002).

Para o preparo das lâminas, os ápices radiculares foram hidrolisados em HCl 5N por 20 minutos a temperatura ambiente, esmagados em ácido acético 45%, as lâminas foram coradas com Giemsa 2%, por 10 minutos e montadas em Bálsamo do Canadá.

Foram analisadas células (no mínimo 5 por exemplar) em metáfase cujos cromossomos apresentavam-se bem espalhados e condensados. As melhores metáfases foram fotografadas para identificação do número cromossômico. As medições e a classificação dos cromossomos foram realizadas com o auxílio do programa ImageJ e do plugin Levan, que classificou os cromossomos à medida em que foram traçadas linhas sobre os braços cromossômicos, quando distinguíveis, e estes por sua vez classificados de acordo com os critérios de Levan et al (1964).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de coloração convencional mostrou que a espécie *Lippia gracilis* possui número cromossômico  $2n=24$  (Figura 1). O número cromossômico para *L. gracilis* é congruente com as espécies *L. salviaefolia*, *L. filifolia*, *L. glandulosa*, *L. pohliana*, *L. sidoides*, (COLEMAN, 1982; VICCINI et al., 2006). Os resultados obtidos nesse trabalho evidenciam que o número cromossômico relatado é recorrente no gênero.

Devido ao grau de condensação cromossômica não foi possível inferir uma fórmula cariotípica para *L. gracilis*, entretanto, pela análise de algumas metáfases, é possível apontar a ocorrência de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos.

As medições cromossômicas realizadas em 15 metáfases apontaram que a espécie possui cromossomos que variam de 2,48  $\mu$ m a 7,0  $\mu$ m.

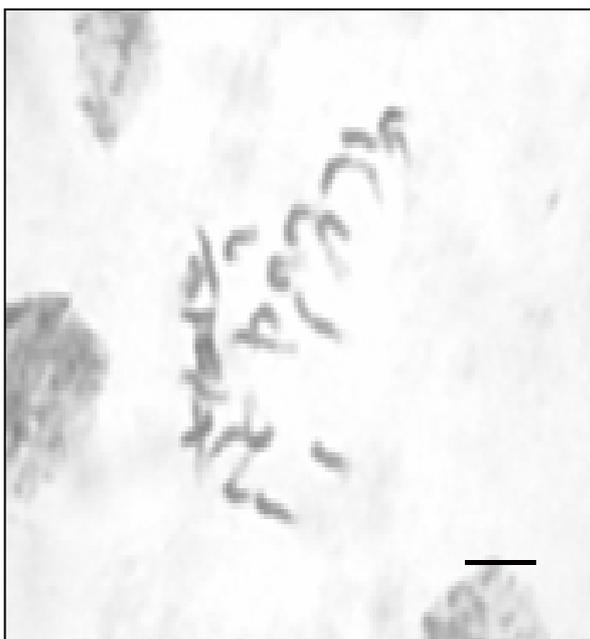
A ocorrência de números cromossômicos

n=13, n=14, n=15, n=16, n=26, n=28 e n=30 (BOSE; CHOUDHURY, 1960 *apud* VICCINI et al., 2006; KUMMAR; DUTT, 1989; VICCINI et al., 2006; CAMPOS et al., 2010), sugerem um histórico evolutivo bastante complexo do gênero *Lippia*, onde tantos os fenômenos genéticos de aneuploidia quanto poliploidia ocorreram durante o curso evolutivo de suas espécies.

Admitindo-se, portanto, a hipótese de Sanders (2001) que propõe  $x=5$  como o número cromossômico básico para o gênero, a espécie em questão (*L. gracilis*), possivelmente originou-se por poliploidia ( $n=5 \times 2=10$ ) seguida de disploidia por ganho ( $n=10+2=12$ , portanto,  $2n=24$ ) ou pelo caminho inverso. Neste caso, se poderia inferir que *L. gracilis* seria um aloploplóide diploidizado.

Considerando a difícil delimitação taxonômica das espécies pertencentes ao gênero *Lippia*, as informações aqui relatadas podem servir como ferramenta auxiliar na identificação taxonômica da espécie estudada. Adicionalmente, os primeiros dados citogenéticos para *L. gracilis* podem ser de grande valia para futuros programas de melhoramento genético envolvendo a espécie.

Entretanto, como o gênero *Lippia* é citogeneticamente pouco conhecido e como há vários números cromossômicos no gênero, variando de  $n=10$  até  $n=30$  (CAMPOS et al., 2010), enfatiza-se a necessidade de estudos citogenéticos mais abrangentes, envolvendo um maior número de espécies, que possam vir a esclarecer de forma mais contundente as inúmeras contradições taxonômicas existentes na família Verbenaceae.



**Figura 2.** Metáfase mitótica de *Lippia gracilis*,  $2n=24$  cromossomos. Barra = 10  $\mu$ m

## CONCLUSÕES

A primeira contagem cromossômica para *L. gracilis* evidencia que tal espécie possui complemento diplóide com  $2n=24$  cromossomos;

São observados cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, dados que, aliados com as informações supracitadas servem como ferramenta biosistemática na identificação de *Lippia gracilis*.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, C. C. et al. Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 527-535, 2006.
- BENTHAN, G; HOOKER, W. J. Verbenaceae. In: BENTHAN, G. (Ed.). **Genera Plantarum**, 1876. v. 2, n. 2, p. 131-160.
- BRANDÃO A. D. et al. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **Journal of Plant Research**, v. 120, n. 2, p. 317-321, 2007.
- BRIQUET, I. Verbenaceae In: ENGLER, A.; PRANTL, K. (Ed.). **Die Natürlich Pflanzenfamilien**, 1897. v. 4, n. 3A, p. 132-182.
- CAMPOS, J. M. S. et al. Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1-4, p. 171-178, 2010.
- COLEMAN J. R. Chromosome numbers of angiosperms collected in the state of São Paulo. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 3, p. 533-549, 1982.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131 p.
- KUMAR, P.; DUTT, B. Cytogenetic basis of breeding system in some verbenaceous species. **Cytologia**, v. 54, n. 2, p. 347-353, 1989.
- LEVAN, A.; FREDGA K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.
- MELO, J. I. M. et al. Verbenaceae *sensu lato* em um trecho da ESEC Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, p. 41-47, 2010.
- NETO, R. M. et al. O óleo essencial de *Lippia gracilis*

*lis* Schauer, Verbenaceae, em ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 261-266, 2010.

OLIVEIRA, O. R. et al. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 94-100, 2008.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214. 2001.

SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**, v. 5, n. 2, p. 303-358, 2001.

SANTOS, J. S. et al. Verbenaceae *sensu stricto* na região de xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 4, p. 985-998, 2009.

SANTOS, M. R. A.; INNECCO, R.; SOARES, A. A. Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 35, n. 2, p. 377-383, 2004.

VICCINI, L. F. et al. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1-4, p. 171-178, 2006.

VIÉGAS, J. et al. Taxonomic and cytogenetics analysis of species of the *Anthurium* (Araceae) genus native to the Brazilian Atlantic Forest. In: SILVA, J. T. (Ed.). **Floriculture, ornamental and plant biotechnology**. London, UK: Global Science Books, 2006. v. 4, p. 669-677.