

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

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE TRÊS ESPÉCIES NATIVAS  
DO RIO GRANDE DO SUL COM POTENCIAL ORNAMENTAL

Marília Tedesco  
Bióloga/UFSM  
Mestre em Agrobiologia/UFSM

Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia  
Área de Concentração Recursos genéticos, Biotecnologia e Melhoramento Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Agosto de 2019

### CIP - Catalogação na Publicação

Tedesco, Marília  
Caracterização citogenética de três espécies  
nativas do Rio Grande do Sul com potencial ornamental  
/ Marília Tedesco. -- 2019.

132 f.

Orientador: Gilmar Schafer.

Coorientadora: Carine Simioni.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2019.

1. Citogenética. 2. *Angelonia integerrima*. 3.  
*Campomanesia aurea*. 4. *Sesbania punicea*. 5.  
Cromossomos. I. Schafer, Gilmar, orient. II. Simioni,  
Carine, coorient. III. Título.

MARÍLIA TEDESCO  
Bel<sup>a</sup> Ciências Biológicas - UFSM  
Mestre em Agrobiologia - UFSM

## **TESE**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **DOUTOR EM FITOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 26.08.2019  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 12.11.2019  
Por

GILMAR SCHÄFER  
Orientador - PPG Fitotecnia  
UFRGS

CHRISTIAN BREDEMEIER  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

CARINE SIMIONI  
Coorientadora - Faculdade de  
Agronomia/UFRGS

MAGNÓLIA APARECIDA SILVA DA SILVA  
PPG Fitotecnia/UFRGS

ELIANE KALTCHUK DOS SANTOS  
PPG em Genética e Biologia Molecular  
UFRGS

ELAINE BIONDO  
UERGS - Encantado/RS

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade  
de Agronomia

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Dérry, à minha mãe, Greice (*in memoriam*) e ao meu irmão Lucas, que foram (e serão eternamente) a base de toda minha existência e os responsáveis por eu ter chegado até aqui. Sem eles, nada disso seria possível!

Ao Rodrigo, por todos os momentos de companheirismo, calma e aconchego nessa fase tão difícil.

À Vanessa, por todo cuidado, carinho e acolhida.

À Lilica, minha companheira de vida por 16 anos, que acompanhou de perto toda minha formação acadêmica.

Ao professor Gilmar Schafer, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade, calma e bom-humor, que tornaram a relação orientador-orientada muito harmoniosa.

À professora Carine Simioni, pela coorientação, valiosa ajuda, disponibilização do laboratório de Citogenética e amizade construída nestes quatro anos de trabalho e convivência.

Aos amigos de Santa Maria, responsáveis por tantos momentos de alegrias e que estão sempre comigo em pensamento.

A todo pessoal da “Flori” com quem tive a sorte de conviver e dividir as dores e, principalmente, as alegrias da pós-graduação. Aquélis, Bibiana, Daniele, Eduarda, Joana, Juliana, Kassia, Larissa, Luciana, Luciano, Mara, Monique, Pedro’s, Priscila e Professor Claudimar (e demais, que por algum momento passaram por lá), vocês foram muito especiais nessa caminhada! Incluo aqui o menino Satanael, que me proporcionou tantas alegrias (e preocupações) nos oito meses que residiu na Floricultura!

Às colegas de laboratório, Karine e Vitória, pela companhia, ajudas e risadas compartilhadas.

À professora Eliane Kalchuck e ao biólogo Pedro Erê Disconzi Brum, pelo valioso auxílio com as análises de citometria de fluxo.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À Universidade, até o momento, pública, gratuita e de qualidade, pela oportunidade.

Aos demais colegas e professores do PPG Fitotecnia e do Departamento de Horticultura e Silvicultura pelo agradável convívio e ensinamentos.

À banca examinadora que prontamente aceitou o convite.

E a todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho!

O meu sincero muito obrigada!

# CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE TRÊS ESPÉCIES NATIVAS DO RIO GRANDE DO SUL COM POTENCIAL ORNAMENTAL<sup>1</sup>

**Autor:** Marília Tedesco

**Orientador:** Gilmar Schafer

**Co-orientador:** Carine Simioni

## RESUMO

*Angelonia integerrima* Spreng. (Plantaginaceae), *Campomanesia aurea* O. Berg (Myrtaceae) e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth (Fabaceae) são espécies nativas do Rio Grande do Sul, que devido a características como o porte, arquitetura, coloração e aroma das flores, são classificadas como plantas ornamentais de uso potencial. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar citogeneticamente diferentes populações de *A. integerrima*, *C. aurea* e *S. punicea* quanto ao número cromossômico, índice meiótico, viabilidade e germinação dos grãos de pólen e conteúdo nuclear (2C) de DNA. Para tanto, foram realizadas coletas do material a campo em diferentes localidades de seis municípios do Rio Grande do Sul - Brasil. O número cromossômico foi determinado pelo método de Feulgen, enquanto o índice meiótico e a estimativa da viabilidade polínica foram obtidos pelo método de esmagamento de anteras com diferentes corantes. A germinação *in vitro* dos grãos de pólen foi avaliada em diferentes meios de cultura (M1, M2 e M3) e temperaturas (20 e 30 °C). Por fim, estimou-se o conteúdo de DNA nuclear utilizando-se citometria de fluxo a partir de tecidos foliares e de sementes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste LSD. Quando os mesmos não apresentaram normalidade, foram analisados por Kruskal-Wallis e teste de Dunn. *Angelonia integerrima* apresenta número cromossômico somático de  $2n = 20$ , índice meiótico e viabilidade polínica superiores a 90 %. *Campomanesia aurea* teve seu número cromossômico somático determinado pela primeira vez, sendo este de  $2n = 22$ , apresenta índice meiótico médio de 93,6 %, número médio de anteras por flor de 144,2 e viabilidade polínica com variação de 83,4 a 98,9 %. *Sesbania punicea* apresenta número cromossômico somático de  $2n = 12$  e gamético  $n = 6$  cromossomos, índice meiótico e viabilidade polínica com média de 98,8 %. *Angelonia integerrima*, *Campomanesia aurea* e *Sesbania punicea* diferem quanto ao requerimento de micronutrientes para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen, sendo a temperatura de 30 °C a mais adequada para as três espécies. Com relação ao conteúdo de DNA nuclear (2C), estimou-se o valor de 1,43 pg para *A. integerrima*, 0,97 pg para *C. aurea* e 1,55 pg para *S. punicea*. Os resultados encontrados para as populações analisadas das três espécies indicam que as mesmas apresentam estabilidade quanto ao número cromossômico, regularidade durante o processo de microsporogênese, alta viabilidade polínica e germinação satisfatória dos grãos de pólen.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (132f.) Agosto, 2019.

# CYTOGENETIC CHARACTERIZATION OF THREE NATIVE SPECIES OF RIO GRANDE DO SUL WITH ORNAMENTAL POTENTIAL<sup>1</sup>

**Author:** Marília Tedesco  
**Adviser:** Gilmar Schafer  
**Co-adviser:** Carine Simioni

## ABSTRACT

*Angelonia integerrima* Spreng. (Plantaginaceae), *Campomanesia aurea* O. Berg (Myrtaceae) and *Sesbania punicea* (Cav.) Benth (Fabaceae) are native species of Rio Grande do Sul, due to characteristics such as size, architecture, coloration and flower scent, are classified as ornamental plants of potential use. The present work aimed to characterize cytogenetically different populations of *A. integerrima*, *C. aurea* and *S. punicea* regarding chromosome number, meiotic index, viability and pollen grain germination and nuclear content (2C) of DNA. Thus, field material was collected at different locations in six municipalities of Rio Grande do Sul - Brazil. The chromosome number was determined by the Feulgen stain method, while the meiotic index and the estimate of pollen viability were obtained by squashing anthers with different stains. *In vitro* germination of pollen grains was evaluated in different culture media (M1, M2 and M3) and temperatures (20 and 30 °C). Finally, nuclear DNA content was estimated using flow cytometry from leaf and seed tissues. Data were subjected to analysis of variance and means compared by LSD test. When they did not show normality, they were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn's test. *Angelonia integerrima* has a somatic chromosome number of  $2n = 20$ , meiotic index and pollen viability greater than 90 %. *Campomanesia aurea* has its somatic chromosomal number determined for the first time, this being  $2n = 22$ , has a medium meiotic index of 93.6 %, average number of anthers per flower of 144.2 and pollen viability ranging from 83.4 to 98.9 %. *Sesbania punicea* has a somatic chromosome number of  $2n = 12$  and gametic  $n = 6$  chromosomes, meiotic index and pollen viability with an average of 98.8 %. *Angelonia integerrima*, *Campomanesia aurea* and *Sesbania punicea* differ in the requirement of micronutrients for *in vitro* germination of pollen grains, being the temperature of 30 °C the most appropriate for the three species. Regarding the content of nuclear DNA (2C), it was estimated 1.43 pg for *A. integerrima*, 0.97 pg for *C. aurea* and 1.55 pg for *S. punicea*. The results found for the populations analyzed of the three species indicate that they present stability regarding chromosome number, regularity during the microsporogenesis process, high pollen viability and satisfactory pollen grain germination.

---

<sup>1</sup>Doctoral thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (132p.) August, 2019.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Floricultura nacional.....	5
2.2 Espécies nativas com potencial ornamental.....	7
2.3 Caracterização citogenética.....	10
2.3.1 Número cromossômico.....	12
2.3.2 Análise da microsporogênese e viabilidade polínica.....	13
2.3.4 Germinação <i>in vitro</i> do grão de pólen.....	16
2.3.5 Estimativa do conteúdo de DNA nuclear utilizando citometria de fluxo.....	18
2.4 Descrição das espécies.....	20
2.4.1 <i>Angelonia integerrima</i> Spreng.....	20
2.4.2 <i>Campomanesia aurea</i> O. Berg.....	23
2.4.3 <i>Sesbania punicea</i> (Cav.) Benth.....	27
2.5 Referências bibliográficas.....	30
3 ARTIGO 1.....	39
Caracterização citogenética de <i>Angelonia integerrima</i> Sprengel (Plantaginaceae), uma espécie nativa com potencial ornamental.....	39
4 ARTIGO 2.....	52
Caracterização citogenética de <i>Campomanesia aurea</i> O. Berg (Myrtaceae)...	52
5 ARTIGO 3.....	71
Caracterização citogenética de <i>Sesbania punicea</i> (Cav.) Bent (Fabaceae).....	71



	Página
6 ARTIGO 4.....	86
Germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen de três espécies nativas do bioma Pampa com potencial ornamental.....	86
7 ARTIGO 5.....	100
Estimativa do conteúdo de DNA nuclear de espécies nativas com potencial ornamental.....	100
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
9 APÊNDICES.....	118

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
ARTIGO 1	
1. Populations of <i>Angelonia integerrima</i> Spreng., number of plants and cells analyzed and respective chromosome number.....	46
2. Final meiotic products, meiotic index (%) and mean of pollen viability of four populations of <i>Angelonia integerrima</i> Spreng.....	47
ARTIGO 2	
1. Localização geográfica e número de indivíduos analisados nas quatro populações de <i>Campomanesia aurea</i> O. Berg.....	67
2. Número cromossômico (2n), produtos finais da microsporogênese (%), índice meiótico, viabilidade polínica e número médio de anteras por flor de indivíduos de quatro populações de <i>Campomanesia aurea</i> O. Berg.....	68
ARTIGO 3	
1. Acessos de <i>Sesbania punicea</i> (Cav.) Benth. com o respectivo número de indivíduos e de células analisados e número cromossômico somático determinado (2n).....	84
2. Associações cromossômicas em diacinese, média dos produtos pós-meióticos, índice meiótico (IM) e viabilidade polínica (%) de acessos de <i>Sesbania punicea</i> (Cav.) Benth.....	84
ARTIGO 4	
1. Porcentagem média de germinação <i>in vitro</i> de pólen de <i>Angelonia integerrima</i> Spreng. e <i>Campomanesia aurea</i> O. Berg em diferentes meios de cultura e temperaturas.....	93
2. Porcentagem média de germinação <i>in vitro</i> de pólen de <i>Sesbania punicea</i> (Cav.) Benth em diferentes meios de cultura e temperaturas.....	94

## ARTIGO 5

1. Locais de origem do material propagativo e número de indivíduos obtidos para cada espécie, modo de propagação utilizado para obtenção das plantas e tipo de tecido vegetal analisado por citometria de fluxo para determinação do conteúdo de DNA de *Angelonia integerrima* Spreng., *Campomanesia aurea* O. Berg e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth..... 105

2. Estimativa do conteúdo de DNA nuclear (2C) de diferentes acessos de *Angelonia integerrima* L., *Campomanesia aurea* O. Berg e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth..... 107

## APÊNDICES

1. Informações sobre os locais de coletas, populações/acessos e número de tombo do Herbário ICN (UFRGS)..... 118

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1. <i>Angelonia integerrima</i> Spreng. em ambiente natural (Parque Natural Morro do Osso - Porto Alegre - RS); a) aspecto geral; b) detalhe da inflorescência; c) detalhe dos frutos após dispersão das sementes. Imagens: Marília Tedesco, 2018.....	21
2. Mapa adaptado da área de ocorrência de <i>Angelonia integerrima</i> Spreng. gerado pela plataforma online Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2019a).....	22
3. <i>Campomanesia aurea</i> O. Berg em ambiente natural (Parque Natural Morro do Osso - Porto Alegre - RS); a) aspecto geral; b) detalhe das flores; c) detalhe dos frutos. Imagens: Marília Tedesco, 2018.....	24
4. Mapa adaptado da área de ocorrência de <i>Campomanesia aurea</i> O. Berg gerado pela plataforma online Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2019b).....	25
5. <i>Sesbania punicea</i> (Cav.) Benth. em ambiente natural (Palmares do Sul - RS); a) aspecto geral; b) detalhe da inflorescência; c) detalhe dos frutos. Imagens: Marília Tedesco, 2018.....	27
6. Mapa adaptado da área de ocorrência de <i>Sesbania punicea</i> (Cav.) Benth. gerado pela plataforma online Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2019c).....	29
7. Mapa da área de distribuição de <i>Sesbania punicea</i> (Cav.) Benth. Fonte: Plants of the World Online (PoWO, 2019).....	29
ARTIGO 1	
1. (a) General aspect of <i>Angelonia integerrima</i> Spreng. in natural environment (Parque Saint-Hilaire); (b - d): Mitotic metaphases with $2n = 20$ chromosomes of the populations from Morro do Osso, Morro Santana and Parque Saint-Hilaire, respectively.....	45

2. Pollen grains and microsporogenesis end products of *Angelonia integerrima* Spreng. (a) dyad; (b) triad; (c) polyad with microcyst (arrow); (d) normal tetrad; (e) pollen grains stained with propionic carmine: viable (stained red) and unviable (unstained); (f) pollen grains stained with Alexander staining: viable (stained purple) and unviable (stained blue). Scale: 10  $\mu\text{m}$ ..... 47

## ARTIGO 2

1. Metáfases mitóticas com  $2n = 22$  cromossomos de indivíduos de três populações de *Campomanesia aurea* O. Berg..... 69

2. Produtos finais da microsporogênese e grãos de pólen de indivíduos de quatro populações de *Campomanesia aurea* O. Berg. a) díade; b) tríade; c) tétrade com micronúcleos (setas); d) tétrade; e) grãos de pólen corados com carmim propiônico: viável (em vermelho) e inviável (seta); grãos de pólen corados com reativo de Alexander: viáveis (roxo escuro) e inviável (seta). Escala: 10  $\mu\text{m}$ ..... 70

## ARTIGO 3

1. Caracterização citogenética de *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. (a)(b)(c) células em metáfase mitótica com  $2n = 12$  cromossomos; (d)(e) células meióticas em prófase I (diacinese) com seis bivalentes (6II,  $n = 6$  cromossomos); setas indicam o nucléolo; (f) tétrade regular com quatro microsporócitos; (g) tríade irregular com três microsporócitos; (h) grão de pólen viável (corado); (i) grão de pólen inviável (não corado)..... 85

## ARTIGO 4

1. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Campomanesia aurea* O. Berg, *Angelonia integerrima* Spreng. e *Sesbania punicea* (Cav.): a) detalhe da inflorescência de *A. integerrima*; b) grãos de pólen germinado (seta) e não germinados de *A. integerrima*; c) detalhe da flor de *C. aurea*; d) grão de pólen germinado (seta) e não germinado de *C. aurea*; e) detalhe da inflorescência de *S. punicea*; f) grãos de pólen germinado (seta) e não germinados de *S. punicea*..... 93

## APÊNDICES

1. Municípios do Rio Grande do Sul onde foram realizadas as coletas de indivíduos de *Angelonia integerrima* Spreng., *Campomanesia aurea* O. Berg e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth para os estudos de caracterização citogenética..... 119

2. Imagens representativas de locais de coletas de *Angelonia integerrima*, *Campomanesia aurea* e *Sesbania punicea*. a) Barra do Ribeiro; b) Barão do Triunfo; c) Parque Natural Morro do Osso; d) Parque Natural Municipal Saint'Hilaire..... 120

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade, as plantas ornamentais tiveram papel fundamental na relação do homem com a biodiversidade, principalmente no número de espécies cultivadas. Através das plantas cultivadas por seu valor ornamental, o homem interage com a diversidade genética, introduz em cultivo espécies selvagens e promove atividades de domesticação e melhoramento genético de maneira livre, não vinculada a protocolos e instituições acadêmicas (Nahoum & Fraga, 2015).

No âmbito das plantas ornamentais, a floricultura pode ser definida como o “conjunto das atividades produtivas e comerciais relacionadas ao mercado das espécies vegetais cultivadas com finalidades ornamentais” (SEBRAE, 2015). Em dados recentes do setor, somadas as exportações de todos os países produtores e re-exportadores, o volume financeiro movimentado superou US\$ 21 bilhões em 2013 (IBRAFLOR, 2015).

No Brasil, a produção de flores e plantas ornamentais tem como principal destino o mercado interno, o qual foi responsável pela movimentação de 97% do volume financeiro comercializado pelos produtores. Entre os estados brasileiros que se destacam pelo consumo médio *per capita* com flores e plantas ornamentais, tomando por base o faturamento do setor, estão São Paulo, seguido pelo Distrito Federal e Rio Grande do Sul (IBRAFLOR, 2015).

Apesar da grande biodiversidade da flora nativa, a qual poderia ser utilizada para alavancar o setor nacional da floricultura, a maior parte das plantas ornamentais

comercializada no Brasil não é originária das regiões onde é cultivada, o que acaba trazendo consequências negativas aos ambientes naturais. Com o tempo, as espécies exóticas podem acabar substituindo as nativas (Heiden & Iganci, 2009), além de poder ocorrer de um grande número de espécies nativas se extinguirem antes mesmo de se tornarem conhecidas e terem seu potencial utilizado, devido ao impacto do processo de antropização e degradação de áreas naturais. Por isso, a introdução de uma planta nativa ao cultivo pode ser um instrumento de conservação destas espécies (Leal & Biondi, 2006).

No Brasil, e mais especificamente no estado do Rio Grande do Sul, a identificação e o cultivo comercial de espécies nativas é ainda irrisório, o que denota uma falta de visão do seu potencial ornamental e da perspectiva econômica da floricultura (Barroso *et al.*, 2007). Produzidas e comercializadas conforme as leis ambientais, as espécies ornamentais nativas revelam-se como um produto diferenciado, capaz de ampliar o mercado da floricultura, já saturado pelos cultivos tradicionais (Stumpf *et al.*, 2008).

O Rio Grande do Sul está inserido em dois biomas: Mata Atlântica, ao norte do Estado, em altitudes maiores, e Bioma Pampa, na metade sul, os quais são ecossistemas naturais com alta diversidade de espécies vegetais, incluindo inúmeras com potencial ornamental. Dentre essas, as espécies *Angelonia integerrima* Spreng. (Plantaginaceae), *Campomanesia aurea* O. Berg (Myrtaceae) e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth (Fabaceae) foram identificadas e classificadas como plantas ornamentais de uso potencial e incluídas por Stumpf *et al.* (2009a) no livro “Cores e Formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas”.

Coradin (2011) ressalta que os recursos vegetais nativos são considerados de grande importância atual e potencial, sendo necessários investimentos para gerar e

disponibilizar tecnologia de uso sustentável de forma a viabilizar a utilização comercial desses recursos. Nesse contexto, os estudos de caracterização do germoplasma nativo tornam-se indispensáveis para potencializar a utilização desses recursos e também para possibilitar que essas espécies possam ser incluídas posteriormente em programas de domesticação e melhoramento genético.

A citogenética é uma ciência que combina o estudo dos cromossomos e outros componentes celulares (citologia) com o estudo da hereditariedade (genética) (Singh, 2003). Essa ciência permite obter informações sobre a caracterização e o comportamento dos cromossomos na mitose, meiose e fertilização (Brasileiro-Vidal & Guerra, 2002).

A caracterização citogenética revela-se como uma forma de enriquecimento do conhecimento acerca dos recursos genéticos nativos, os quais fornecem base importante, não somente para a caracterização em si, mas também para o seu uso adequado, sendo uma ferramenta que complementa e auxilia outros tipos de dados (taxonômicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares), próprios tanto para registro, como para documentação em bancos de germoplasma (Pinto-Maglio & Pierozzi, 2015).

Ao se considerar como vasta a diversidade genética de espécies com fins ornamentais nativas do Brasil, uma forma de impulsionar o setor nacional da floricultura e torná-lo autossuficiente é a criação e o desenvolvimento de programas de melhoramento genético destas espécies. Para que isso seja viável, é necessário que sejam feitos maiores investimentos em estudos de prospecção e caracterização das espécies, de modo a desenvolver cultivares com padrão de excelência similar ou até mesmo superior ao das cultivares estrangeiras (Cardoso, 2013).

Dentro de um programa de melhoramento, a caracterização citogenética fornece informações que permitem ao melhorista fazer uma pré-seleção mais eficiente dos



recursos genéticos que possam ser utilizados, além de possibilitar, após os cruzamentos serem realizados, a avaliação da estabilidade dos híbridos (Zanela, 2009; Pinto-Maglio & Pierozzi, 2015). Dessa forma, esses estudos podem auxiliar na resolução de questões tanto antes quanto depois do melhoramento genético propriamente dito, assegurando benefícios que podem ser aplicados a curto, médio e longo prazo (Singh, 2003).

A partir da prospecção de espécies ornamentais nativas para utilização em um projeto de revitalização no município de Porto Alegre - RS foram selecionadas algumas espécies que apresentavam potencial elevado para ornamentação de jardins e facilidade de coleta de material propagativo e reprodutivo, dentre as quais *A. integerrima*, *C. aurea* e *S. punicea*. Assim, iniciou-se um projeto amplo de estudos de propagação e caracterização destas espécies para futura utilização na floricultura, no qual o presente trabalho de tese objetivou contribuir através da caracterização citogenética destas três espécies.

Os objetivos específicos do trabalho foram determinar o número cromossômico, analisar o índice meiótico, estimar a viabilidade polínica, avaliar a germinação *in vitro* dos grãos de pólen e determinar o conteúdo de DNA nuclear de *Angelonia integerrima*, *Campomanesia aurea* e *Sesbania punicea*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Floricultura nacional

A floricultura, definida como o conjunto de atividades relacionadas com a produção e comercialização de flores e plantas ornamentais, é um setor que muitas vezes encontra-se à margem das discussões do agronegócio nacional, por compreender produtos considerados superficiais e restritos a um público de maior poder aquisitivo. Porém, a produção comercial de flores e plantas ornamentais está longe de ser uma atividade supérflua, visto que desempenha importantes funções econômicas, sociais, culturais e até mesmo ecológicas (Terra & Züge, 2013).

Uma das características que tornam esse setor diferenciado é o rápido retorno financeiro ocasionado pelo alto valor comercial de seus produtos, em comparação com frutas e hortaliças, por exemplo, e o ciclo relativamente curto de produção das flores e plantas ornamentais (Terra & Züge, 2013). Além disso, a floricultura brasileira ostenta números significativos de produtores, área cultivada e geração de empregos (Stumpf *et al.*, 2005).

Com relação ao consumo brasileiro de flores e plantas ornamentais, este varia de acordo com a renda, conjuntura econômica, classe social e fatores de gênero, o que denota a grande elasticidade no consumo desses produtos (Tsuboi & Tsurushima, 2009). Nas últimas décadas, a demanda por flores e plantas ornamentais no país opera por uma

forte concentração sazonal em datas especiais e comemorativas, como Dia das Mães, Finados, Namorados, entre outras (Junqueira & Peetz, 2008).

Os últimos dados reportados para o setor mostram que no Brasil há 33.450 estabelecimentos envolvidos com a produção e comercialização de flores e plantas ornamentais, ocupando uma área de cultivo de 129.164 ha. Desse total, 28,21% das áreas localizam-se em São Paulo (SP), seguido por Minas Gerais (MG), com 10,5%, e Mato Grosso (MT), com 7,3%. O Rio Grande do Sul aparece em 9º lugar, com 3.273 estabelecimentos, que ocupam uma área de 4.902 ha, o que corresponde a 3,8% do total da área de cultivo ocupada pelo setor no Brasil (IBGE, 2017).

A diversidade e a amplitude de climas e solos no Brasil permitem cultivos de espécies de origens nativas e exóticas, de clima subtropical a tropical. Com relação às principais espécies de flores e plantas ornamentais comercializadas, destacam-se três grandes grupos: 1) Flores e folhagens de corte: alstroemeria, lírio, crisântemo, rosa, gérbera, boca de leão, lisianto, gipsófila, cravo, áster, orquídeas, helicônia, *Protea* sp., e *Solidago* sp.; 2) Flores e plantas de vaso: antúrio, lírio, begônia, kalanchoe, violeta, azaleia, rosa, orquídeas *Phalaenopsis* sp. e crisântemo; 3) Plantas ornamentais e para paisagismo: forração, cactos e suculentas, *Raphis* sp., *Phoenix* sp., *Cyca* sp., podocarpo, *Buxus* sp. e arbustos diversos (Junqueira & Peetz, 2008; Neves & Pinto, 2015).

Buainain & Batalha (2007) listaram as principais medidas para o aumento da sustentabilidade do agronegócio de flores e plantas ornamentais no mercado interno brasileiro. Segundo esses autores, é necessário que os produtores tenham um maior acesso a insumos básicos, novas tecnologias de produção, novas espécies e cultivares e à capacitação profissional. Além disso, é de suma importância para esse setor estimular e viabilizar pesquisas científicas em geral, como aquelas relacionadas à esfera reprodutiva do material encontrado na própria natureza, o qual possui um enorme valor

comercial. Por fim, a criação e realização de programas para o desenvolvimento econômico do setor poderá trazer um melhor desempenho ao processo de expansão da floricultura nacional.

## **2.2 Espécies nativas com potencial ornamental**

A flora brasileira é uma das mais ricas do mundo, abrigando atualmente 33.301 espécies nativas de Angiospermas, sendo mais de 50 % destas endêmicas do nosso território (INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2019). Apesar de essa flora representar uma gama variada de opções, o número de espécies ornamentais nativas cultivadas comercialmente ainda é irrisório diante da grande biodiversidade existente (Heiden *et al.*, 2006).

A utilização de espécies nativas com potencial ornamental pode contribuir com diversas funções ecológicas do meio ambiente, como a preservação da diversidade biológica e a oferta de ambientes para a fauna, além de implicar em uma maior valorização da identidade regional (Heiden *et al.*, 2006).

Ainda que o potencial das plantas nativas não tenha obtido o merecido destaque no mercado da floricultura nacional, este é cada vez mais reconhecido no exterior. Fischer *et al.* (2007) relataram em um estudo que mais de 60 espécies ornamentais brasileiras, como orquídeas, bromélias e alstromérias, foram comercializadas no ano de 2007 em endereços eletrônicos de empresas estrangeiras de sementes na Internet, bem como em catálogos de empresas internacionais de comercialização de sementes com representação no Brasil. Isso demonstra o maior interesse e apreciação que o público estrangeiro atribui às plantas nativas do Brasil em comparação aos próprios brasileiros. Os referidos autores ainda salientam que os países estrangeiros, ao tomarem conhecimento do potencial ornamental de espécies brasileiras, investem em pesquisas

básicas de melhoramento e propagação, introduzindo, muitas vezes, essas espécies como lançamento no mercado internacional, enquanto a escassez de pesquisas no Brasil provoca a subutilização das mesmas no nosso país.

Ao se delimitar o contexto ao Rio Grande do Sul (RS), percebe-se que apesar da grande biodiversidade da sua flora, as espécies vegetais nativas desse estado também são pouco associadas, lembradas ou reconhecidas como plantas que podem ser cultivadas e admiradas pelos brasileiros (Barroso *et al.*, 2007).

O Rio Grande do Sul está inserido em dois biomas: Mata Atlântica, ao norte do Estado, em altitudes maiores, e Bioma Pampa, na metade sul, os quais são ecossistemas naturais com alta diversidade de espécies vegetais e animais. Esses biomas asseguram serviços ambientais importantes, como a conservação de recursos hídricos, a disponibilidade de polinizadores e o fornecimento de recursos genéticos, além de oferecerem beleza cênica com potencial turístico importante. Porém, a conservação desses biomas tem sido ameaçada por diversos fatores, dentre eles a degradação vinculada à invasão de espécies exóticas e seu uso inadequado (Pillar *et al.*, 2009). De acordo com Boldrini (2009), a preservação da paisagem do RS somente terá sucesso quando for reconhecida e difundida a beleza de sua flora.

Assim, a utilização de espécies nativas como plantas ornamentais surge como um novo nicho no mercado da floricultura, com grande potencial de produção e comercialização, visto que muitas espécies podem ser mais bem adaptadas às condições edafoclimáticas locais, não sendo tão dependentes de aplicações abundantes de agrotóxicos, como normalmente requerem as espécies exóticas (Oliveira Junior *et al.*, 2013). Destaca-se ainda que a floricultura pode contribuir diretamente para a preservação *in situ* do germoplasma nativo (Nahoum & Fraga, 2015), pois ao oferecer o

produto pronto para o produtor e/ou consumidor, coletado e propagado de maneira correta, diminui-se a coleta indiscriminada do material na natureza.

A redução, ou mesmo a substituição das espécies ornamentais exóticas por nativas, é uma tendência que vem se consolidando no paisagismo (Heiden *et al.*, 2007). Nesse contexto, diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de identificar espécies nativas do Rio Grande do Sul que apresentem elementos estéticos apropriados para uso no paisagismo, bem como disponibilizar as informações sobre suas características ornamentais.

Em um trabalho realizado por Stumpf *et al.* (2009b), foram identificadas nove espécies nativas do RS que apresentaram potencial para utilização no paisagismo. São elas: *Campomanesia aurea* Berg. (guabirobinha-do-campo), *Colletia paradoxa* (Spreng.) Escal. (espinho-de-cruz), *Daphnopsis racemosa* Griseb. (embira), *Eriocaulun magnificum* Ruhland (sempre-viva-do-banhado), *Maytenus muelleri* Schwacke (espinheira-santa), *Schinus lentiscifolius* Marchand (aroeira-cinzenta), *Scoparia ericacea* Cham. & Schltld. (escopária-azul), *Senecio bonariensis* Hook. & Arn. (margarida-do-banhado) e *Solanum granulosoleprosum* Dunal (fumo-bravo).

Em outro estudo, Stumpf *et al.* (2015) identificaram espécies nativas do Bioma Pampa com características e potencial de uso semelhantes aos de espécies exóticas com uso consagrado no paisagismo brasileiro. Entre as plantas identificadas, encontra-se a espécie *Tibouchina asperior* (Cham.) Cogn. (quaresmeira-do-banhado), que possui arquitetura e cor das flores análogas à espécie exótica *Solanum rantonnetii* Carrière (solano-azul).

Carrion & Brack (2012) coordenaram um estudo com o objetivo de realizar um levantamento preliminar de Eudicotiledôneas ornamentais nativas dos campos do bioma Pampa no sul do Brasil, avaliando o potencial de algumas dessas espécies para uso em

jardins. Os autores identificaram 177 espécies com potencial ornamental, distribuídas em 36 famílias. As dez espécies que possuíram os maiores valores de potencial ornamental foram: *Calliandra brevipes* Benth. (cabelo-de-anjo), *Calliandra tweedii* Benth. (topete-de-cardeal), *Escallonia bifida* Link & Otto (escalônia), *Evolvulus glomeratus* Nees & C. Mart. (azulzinha), *Glandularia cabreræ* (Moldenke) Botta, *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. (petúnia-lilás), *Salvia guaranitica* A.St.Hil. ex Benth. (sálvia-rocha), *Schinus molle* L. (aroeira-salso), *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. (fedegoso-da-praia) e *Verbena bonariensis* L.

Ainda, um extenso trabalho de prospecção desenvolvido por Stumpf *et al.* (2009a) resultou na publicação do livro “Cores e formas do Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas”, onde foram listadas 100 espécies nativas com base em suas características peculiares, as quais foram avaliadas segundo metodologias propostas por Stumpf *et al.* (2007, 2009b) para definição do potencial de uso em paisagismo ou na arte floral. Dentre essas espécies, estão as três que são objeto de estudo do presente trabalho: *Angelonia integerrima* Spreng., *Campomanesia aurea* O. Berg e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth.

### **2.3 Caracterização citogenética**

A citogenética é uma ciência que combina o estudo dos cromossomos e outros componentes celulares (citologia) com o estudo da hereditariedade (genética) (Singh, 2003), podendo resumidamente ser compreendida por toda e qualquer análise referente ao cromossomo, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação, quanto a sua variação e evolução (Guerra, 1988).

A citogenética progrediu uma vez que se estabeleceu que os cromossomos são os transmissores dos genes. Apesar do progresso de disciplinas como a biologia

molecular, e do nível cada vez maior de complexidade e desempenho de novas técnicas e ferramentas, continua a existir a necessidade de citogeneticistas bem treinados para abordar questões que são mais prontamente resolvidas por abordagens citogenéticas (Singh, 2003).

Apesar de o Brasil possuir uma flora altamente rica em relação a muitas espécies com características ornamentais, para a maioria dessas não se conhecem sequer os aspectos básicos, principalmente aqueles relacionados à reprodução. Assim, informações sobre número e comportamento de cromossomos, bem como dos grãos de pólen, além de contribuírem para o conhecimento da nossa flora, deverão propiciar a base para o melhoramento genético, visando à obtenção de material comercialmente mais interessante (Cruz *et al.*, 1993).

Além de fornecerem fundamentação para trabalhos aplicados que contribuem na utilização de material nativo com potencial econômico, os estudos citogenéticos também são importantes para a preservação do germoplasma nativo, visto que é cada vez mais crescente a preocupação de se entender o impacto antrópico e de mudanças ambientais sobre as populações e comunidades naturais (Valls, 1988).

Os estudos de caracterização citogenética de espécies vegetais podem ser realizados através da determinação do número básico de cromossomos, da identificação de indivíduos poliploides/aneuploides, da composição de cariótipos, do estudo do comportamento meiótico e da viabilidade do pólen, além da determinação do modo de reprodução (Pinto-Maglio & Pierozzi, 2015). Além disso, pode-se incluir nessas análises o conhecimento do tamanho do genoma, técnica que se desenvolveu no início dos anos 80 (Dolezel, 1991).



### 2.3.1 Número cromossômico

Cada espécie possui número e morfologia de cromossomos definidos e constantes através de inúmeras gerações celulares. Porém, ao longo de todo o processo evolutivo dos seres vivos, alterações gênicas ou de número e morfologia cromossômica ocorrem naturalmente. Dessa forma, os estudos citogenéticos são importantes porque fornecem embasamento para estudos filogenéticos e geram informações de ordem mais prática das observações dos cromossomos nas plantas. O número de cromossomos pode indicar a variabilidade disponível em plantas autógamas e alógamas; um mesmo número de cromossomos em espécies e gêneros afins pode significar compatibilidade em cruzamentos para obtenção de híbridos; um baixo número cromossômico é indicação de diploidia; e um alto número cromossômico sugere que o indivíduo é provavelmente de origem poliploide (Cruz *et al.*, 1993).

O número cromossômico é um dos parâmetros mais utilizados para a caracterização citogenética de uma espécie, e juntamente com outros caracteres citológicos, fornece informações para a compreensão das alterações genéticas envolvidas. Estes dados podem também ser utilizados para a determinação da posição filogenética e taxonômica das espécies (Heslop-Harrison, 2000; Auler *et al.*, 2006).

À respeito das espécies tropicais nativas, há uma quantidade razoável registrada de estudos de determinação de números cromossômicos, porém essa quantidade ainda é pequena se comparada ao enorme número existente destas espécies, além de os dados registrados serem muitas vezes incompletos ou incorretos. Isso se dá em razão das dificuldades na determinação de protocolos para contagem cromossômica e identificação correta das espécies ou, também, por esses dados serem obtidos a partir de um único indivíduo ou população, sugerindo-se que seriam necessários mais estudos

citogenéticos e recontagem de números cromossômicos para inúmeras espécies (Guerra, 1986; Bennett, 1998).

Com relação ao número básico de cromossomos para os gêneros estudados, em *Angelonia*, Molero *et al.* (2006) propõem o número básico de  $x = 10$ . Já para Raghavan & Srinivasan (1940), o número básico de cromossomos proposto para o gênero pode ser considerado como cinco ( $x = 5$ ). Para esses últimos autores, a paleopoliploidia é sugerida para explicar o número básico de  $x = 5$ , e as espécies do gênero *Angelonia* com  $2n = 20$  cromossomos devem ser consideradas como tetraploides secundários que surgiram pela alopoliploidia. Para o gênero *Campomanesia*, o número cromossômico básico sugerido é de  $x = 11$ . Esse número tem sido observado em quase todos os gêneros da família Myrtaceae, embora os autores afirmem que são necessários estudos complementares para entender a existência desse número cromossômico na família (Atchinson, 1947; Forni-Martins & Martins, 2000). Por último, para o gênero *Sesbania*, Forni-Martins *et al.* (1994) indicaram o número básico  $x = 6$  para o gênero.

### **2.3.2 Análise da microsporogênese e viabilidade polínica**

Um dos principais eventos que ocorre durante a divisão meiótica é a recombinação gênica, a qual é considerada uma fonte de variabilidade genética que os indivíduos possuem para se adaptar ao meio ambiente em que vivem e, assim, garantir a sua perpetuação por meio da descendência. Essa é umas das razões pela qual a análise da microsporogênese em espécies vegetais apresenta grande importância (Pagliarini, 2000).

Em programas de melhoramento, tais avaliações são relevantes para verificar as condições reprodutivas e direcionar a escolha de genótipos promissores. Através da avaliação do comportamento meiótico, é possível verificar se a espécie possui

instabilidade meiótica que, quando associada a outras anormalidades genéticas, pode resultar na formação de plantas atípicas, macho-estéreis ou incapazes de formar grãos de pólen, podendo prejudicar assim a produção de sementes, bem como afetar a polinização (Pozzobon *et al.*, 2011). Muitos dos genes que estão relacionados com a esterilidade masculina têm ação pré-meiótica, podendo induzir a formação de anteras sem pólen, enquanto outros têm ação pós-meiótica, ou seja, o pólen é formado, mas não se desenvolve (Alcochete, 2005).

Ao final da microsporogênese tem-se uma estrutura formada por quatro células haploides, conhecida como tétrade de micrósporos. A tétrade é envolta por uma parede de calose, que se dissolve ao final da meiose liberando os micrósporos. Cada micrósporo torna-se arredondado e entrará em microgametogênese, dando início ao processo de formação do grão de pólen (Pagliarini & Pozzobon, 2005).

Love (1949) definiu o termo “índice meiótico” como a porcentagem de tétrades normais ao final da divisão meiótica. A avaliação desse índice consiste em uma análise bastante rápida e precisa do desempenho reprodutivo de um ou mais indivíduos de uma espécie em relação ao processo de formação de tétrades e, por consequência, dos grãos de pólen. Esse índice aumenta com o aumento da normalidade do comportamento cromossômico durante a divisão meiótica, sendo considerado um indicativo de regularidade do processo meiótico.

Em um trabalho realizado por Franzon & Raseira (2004), o índice meiótico (IM) de cinco espécies (*Eugenia involucrata* DC., *E. uniflora* L., *E. pyriformis* Camb., *Acca sellowiana* (Berg.) Burr. e *Campomanesia xanthocarpa* Berg.) da família Myrtaceae foi determinado. Nesse estudo, as médias para esse índice variaram de 84,8 a 96,3 %, sendo *A. sellowiana* a única espécie considerada estável citologicamente, pois apresentou o IM superior a 90%.

A viabilidade do pólen é outra característica muito importante no estudo das espécies vegetais, pois evidencia a capacidade reprodutiva do gameta masculino destas, além de contribuir em estudos taxonômicos, ecológicos e palinológicos. Essas informações, apesar de básicas, podem ser utilizadas para aplicação prática na conservação genética e para o planejamento de algum tipo de melhoramento ou cultivo (Arroyo, 1981; Guinet, 1989).

A viabilidade polínica pode ser avaliada por métodos diretos e indiretos. Entre os métodos diretos, pode-se destacar a germinação *in vitro* do tubo polínico, enquanto entre os métodos indiretos destacam-se as técnicas de coloração, utilizando corantes como o carmim propiônico e o reativo de Alexander (Kearns & Inouye, 1993). Dentre esses métodos, a coloração dos grãos de pólen é o procedimento mais simples e que fornece os resultados prontamente. Considerando que existe uma correlação entre viabilidade e coloração, a estimativa é dada pela contagem dos grãos de pólen com citoplasma corado (considerados férteis) e não corado (estéreis), ou corados distintamente (quando utilizado o reativo de Alexander). Porém, para muitos autores, os testes de coloração utilizando métodos colorimétricos podem superestimar a viabilidade, pois, algumas vezes, grãos de pólen inviáveis podem ser corados devido à presença suficiente de enzimas, amido ou outras substâncias (Rodríguez-Riano & Dafni, 2000).

Considerando trabalhos que avaliaram a viabilidade polínica por métodos colorimétricos, pode-se citar o de Frescura *et al.* (2012), que utilizaram três corantes (orceína acética, carmim acético e reativo de Alexander) para estimar a viabilidade polínica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae), uma espécie nativa do Rio Grande do Sul. Os autores observaram que houve diferença significativa entre os três corantes,

sendo o reativo de Alexander considerado o melhor para estimar a viabilidade nessa espécie, pois permitiu diferenciar com mais precisão os grãos viáveis dos inviáveis.

#### **2.3.4 Germinação *in vitro* do grão de pólen**

Dentre os métodos utilizados para avaliação *in vitro* da viabilidade do pólen, destaca-se o da germinação em meio artificial. Esse teste é realizado para avaliar fatores qualitativos e quantitativos, como os componentes necessários para a composição do meio de cultura para a germinação do grão de pólen, além da temperatura de incubação e o tempo de armazenamento do pólen.

O objetivo desse tipo de análise é reproduzir as condições naturais do estilete e estigma, locais do órgão floral em que o pólen germina e se desenvolve. Na natureza, o estilete é o responsável pela nutrição e crescimento do tubo polínico, através do suprimento de água, açúcares e aminoácidos (Kearns & Inoué, 1993). Outros elementos químicos também são importantes nesse processo, destacando-se o boro (B) e o cálcio (Ca), além de magnésio (Mg) e potássio (K) em menor grau (Stanley & Linskens, 1974). No caso da germinação *in vitro*, a adição desses elementos ao meio de cultura fornece ao pólen uma condição semelhante à encontrada no estigma (Sousa *et al.*, 2010).

Em adição ao meio de cultura, cada nutriente adquire uma função na germinação do grão de pólen. Dentre os principais, a sacarose é responsável pelo fornecimento de energia para o processo de desenvolvimento do tubo polínico, além de proporcionar o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de cultura (Stanley & Linskens, 1974; Miranda & Clement, 1990). A adição de boro ao meio promove a formação de um complexo ionizável açúcar-borato, o qual interage com as membranas celulares, incrementando a porcentagem de germinação e o comprimento do tubo polínico

(Thompson & Batjer, 1950). Por último, o cálcio adicionado ao meio proporciona uma menor permeabilidade da membrana, conferindo um aspecto mais rígido ao tubo polínico (Stanley & Linskens, 1974).

Sabe-se que durante o desenvolvimento do grão de pólen, qualquer flutuação na temperatura, mesmo que sutil, já pode provocar danos. Apesar do intervalo de tolerância ser variável entre as espécies, essas flutuações afetam de maneira negativa características como viabilidade do pólen, capacidade germinativa, taxa de crescimento do tubo polínico e, conseqüentemente, a produção de sementes e frutos (Erickson & Markhart, 2002; Sato *et al.*, 2002). Por isso, a avaliação da melhor temperatura de incubação durante a germinação do grão de pólen é importante para o planejamento, por exemplo, de futuros testes de cruzamentos dirigidos.

Em trabalhos que abordam a germinação *in vitro* do pólen, a maioria encontrada na literatura é relacionada às espécies comerciais de uso consagrado. Com relação às nativas, são encontrados trabalhos com espécies frutíferas da família Myrtaceae. Franzon & Raseira (2006) realizaram um estudo com o objetivo de determinar as condições adequadas para testes de germinação *in vitro* do pólen de *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira-do-rio-grande), além de analisar a possibilidade de armazenamento do pólen em congelador. Os autores verificaram que o pólen de *E. involucrata* apresenta boa viabilidade, com germinação média de 58,3% nas condições do trabalho; o meio de cultura mais adequado para avaliação através da germinação *in vitro* é constituído por 10% de açúcar e 1% de ágar, com incubação à temperatura constante de 25°C; o período ideal para coleta de pólen é logo após a antese e o armazenamento de pólen pode ser realizado satisfatoriamente por até 220 dias em congelador.

Para *Eugenia uniflora* L. (pitangueira), realizou-se um estudo com objetivo similar ao do trabalho anterior. Observou-se que cinco horas a 25°C, em meio de cultura básico (10% de açúcar + 1% de ágar), proporcionou as melhores médias de germinação *in vitro*. O boro não exerceu influência sobre a germinação média do pólen de pitangueira, e houve uma grande perda de viabilidade do pólen após 105 dias de armazenamento em freezer (Franzon *et al.*, 2007).

Por último, Danner *et al.* (2011) determinaram as condições para testes de germinação *in vitro* e armazenamento de pólen de genótipos de jabuticabeiras (*Plinia trunciflora* Berg e *P. cauliflora* (DC) Berg). Constatou-se que a adição de ácido bórico no meio de cultura aumentou a germinação *in vitro* do pólen de jabuticabeiras, sendo a viabilidade do pólen máxima após seis horas da antese. Além disso, é possível conservar o pólen por até 90 dias em congelador.

### **2.3.5 Estimativa do conteúdo de DNA nuclear utilizando citometria de fluxo**

O núcleo da célula vegetal armazena a maior parte do material hereditário, sendo, dessa forma, objeto de estudos intensivos. Dentre esses, a quantidade de DNA nuclear, referida como valor C (do termo constante), expressa o tamanho do genoma, ou seja, a quantidade de material genético existente em um dado organismo (Bennet & Leitch, 1995). A quantidade de DNA nuclear é expressa em picogramas (pg),  $10^{-12}$  g ou em mega pares de bases de nucleotídeos (Mb= 10<sup>6</sup> pares de bases), sendo que 1 pg corresponde a 965 Mb (Bennet & Leitch, 1995).

A disponibilidade de dados sobre o tamanho do genoma é fundamental para inúmeros campos de pesquisa, como os que abordam estudos evolutivos e taxonômicos (Kron *et al.*, 2007). Além disso, esses dados são igualmente importantes em trabalhos de melhoramento e controle de qualidade na produção de sementes (Suda *et al.*, 2007).

A estimativa simultânea do conteúdo de DNA no embrião e endosperma das sementes também permite determinar a origem genética de uma semente, isto é, estabelecer sua origem sexual ou apomítica e sua ploidia gamética (Matzk, 2007).

A citometria de fluxo usando fluorocromos seletivos de DNA é o método predominante para a medição do conteúdo de DNA nuclear nas plantas, pois se trata de um procedimento rápido e confiável (Doležel *et al.*, 2007).

A metodologia básica de determinação do conteúdo nuclear de DNA por citometria de fluxo baseia-se na intensidade de fluorescência relativa de núcleos corados com um fluorocromo específico para o DNA (Doležel, 1997). Nela, primeiramente, o tecido vegetal (aproximadamente 50 mg ou 1 cm<sup>2</sup>, no caso de folhas), juntamente com um padrão de referência com um tamanho de genoma conhecido, é cortado com uma lâmina em uma placa de Petri contendo um tampão de lise. Após o isolamento dos núcleos, estes são filtrados por uma rede de nylon ou filtro com cerca de 50 µm, de forma a eliminar a maior parte dos resíduos obtidos. Então a solução com os núcleos é corada com um fluorocromo que se liga especificamente ao DNA. Geralmente, o fluorocromo utilizado é o iodeto de propídio (IP). A suspensão líquida contendo os núcleos corados é, então, introduzida no centro da câmara de fluxo do citômetro, onde é realizada a leitura da fluorescência emitida por estes núcleos. O tamanho do genoma da amostra é calculado pela proporção das posições dos picos G1 da amostra/padrão multiplicado pelo conteúdo de DNA conhecido da planta de referência (Schifino-Wittmann, 2001; Loureiro & Santos, 2004).

Não são encontrados na literatura estudos que abordam a determinação do conteúdo de DNA das espécies deste presente estudo, apenas foram encontradas estimativas de valor 2C para as espécies do gênero *Campomanesia* e *Sesbania*. São estes: *Campomanesia pubescens* (0.497 pg), *C. guazumifolia* (0.503 pg), *C.*



*schlechtendaliana* (0.519 pg), *C. phaea* (0.528 pg), *C. adamantium* (0.586 pg), *C. guaviroba* (0.596 pg), *C. laurifolia* (0.612 pg) (Costa *et al.*, 2008) e *Sesbania rostrata* (2.45 pg) (Arumuganathan & Earle, 1991).

## **2.4 Descrição das espécies**

### **2.4.1 *Angelonia integerrima* Spreng.**

A espécie *Angelonia integerrima* (Figura 1), conhecida popularmente como angelônia, caracol-do-campo ou violeta-do-campo, pertence à família Plantaginaceae (anteriormente Scrophulariaceae). O gênero *Angelonia* passou a integrar a família Plantaginaceae após o processo de “desintegração” das Scrophulariaceae que ocorreu depois de um extenso trabalho de filogenia (Souza & Lorenzi, 2012).

Taxonomistas aceitam a circunscrição de Plantaginaceae em um sentido amplo, com aproximadamente 108 gêneros (APG III, 2009). Dessa forma, as Plantaginaceae são bastante variáveis morfologicamente, reflexo de uma recente diversificação evolutiva no tipo de polinização (Souza & Lorenzi, 2008).

No Brasil, são referidos 16 gêneros nativos para a família. Dentre eles, o gênero *Angelonia* é o mais comum, ocorrendo predominantemente em campos rupestres e na Caatinga (Souza & Lorenzi, 2008).

Atualmente, são descritas para o gênero *Angelonia* aproximadamente 50 espécies (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2017). Dentre essas, 15 são endêmicas do Brasil, porém nenhuma é endêmica da região Sul (Souza *et al.*, 2017). Esse gênero tem distribuição restrita à região neotropical, sendo de ocorrência exclusiva nas Américas, estendendo-se do centro do México até o extremo sul da América do Sul (Boff *et al.*, 2014).

Algumas espécies, como *A. angustifolia* e *A. salicariifolia* são cultivadas como ornamentais, apesar desse potencial não ser suficientemente explorado (Souza & Lorenzi, 2012).

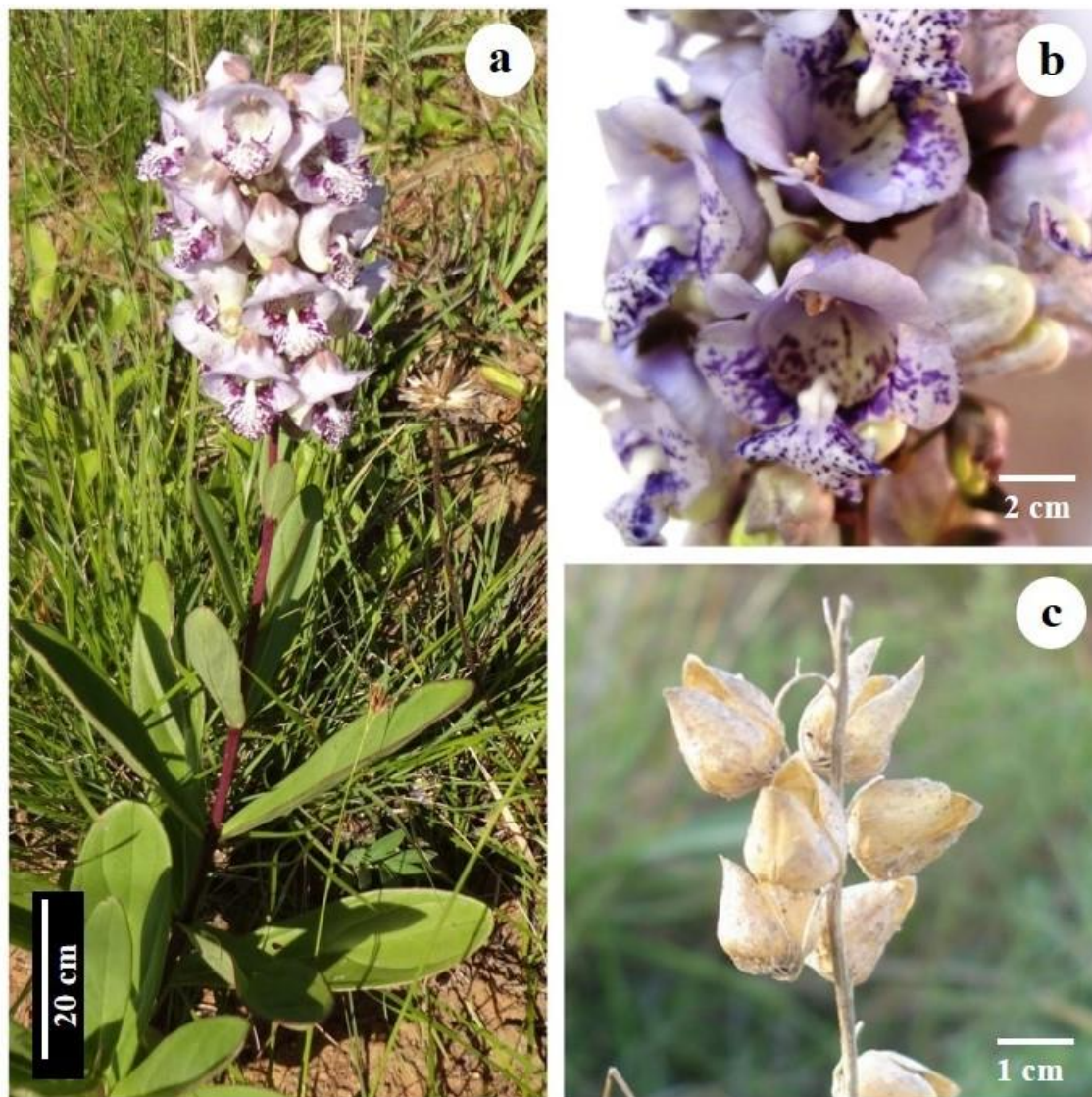


FIGURA 1. *Angelonia integerrima* Spreng. em ambiente natural (Parque Natural Morro do Osso - Porto Alegre - RS); a) aspecto geral; b) detalhe da inflorescência; c) detalhe dos frutos após dispersão das sementes. Imagens: Marília Tedesco, 2018.

*A. integerrima* ocorre em campos do Mato Grosso do Sul e da Região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) do Brasil e no Paraguai e Argentina, próximo à divisa com o Brasil (Figura 2). Diferencia-se das demais espécies do gênero por possuir folhas opostas a subopostas e flores dispostas em racemos bem definidos,

além de ser a única espécie de *Angelonia* que ocorre naturalmente na região Sul do Brasil, onde é relativamente frequente nos campos naturais (Souza & Giulietti, 2009).

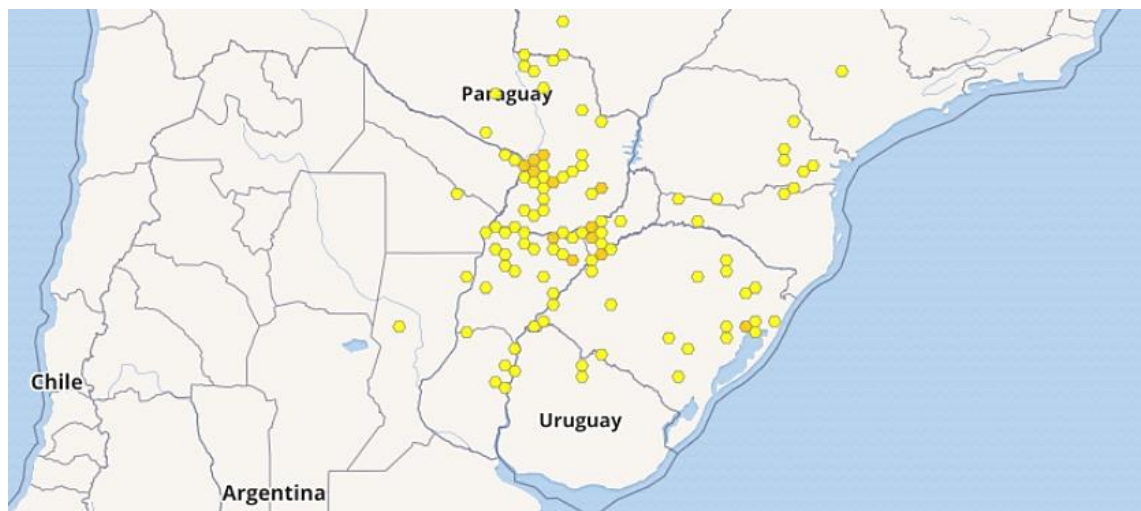


FIGURA 2. Mapa adaptado da área de ocorrência de *Angelonia integerrima* Spreng. gerado pela plataforma online Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2019a).

É descrita como uma planta de hábito herbáceo, perene, que atinge em média 40 cm, ocorrente em campos pedregosos e afloramentos rochosos, ereta a subereta, simples ou menos frequentemente ramificada na base ou na região da inflorescência. O caule apresenta cor castanha a avermelhada, enquanto as folhas são verdes, opostas ou menos frequentemente subopostas, iguais em um mesmo nó, oblanceoladas e de ápice agudo a arredondado. As flores são dispostas em racemos terminais bem definidos, simples, com 11 a 30 cm de comprimento, sendo a corola de cor lilás à esbranquiçada com manchas roxo-escuras no labelo e interior, com o padrão e coloração das manchas variando de acordo com cada indivíduo. As flores ainda possuem duas bolsas de óleo bem desenvolvidas localizadas no interior da corola (labelo), que estão relacionadas à atração de visitantes florais e posterior polinização. O fruto é uma cápsula ovoide, com ápice agudo, 1,2 a 2,0 cm de comprimento e 0,7 a 1,1 cm de diâmetro. A floração e

frutificação ocorrem de outubro a março (Stumpf *et al.*, 2009a; Souza & Giulietti, 2009; Martins & Alves-dos-Santos, 2013).

As principais características que apontam para o uso ornamental dessa espécie são o hábito de crescimento (herbáceo e perene), o contraste causado pela coloração diferencial entre o caule e as folhas, os racemos com as flores em diferentes estágios de maturação (aumentando o tempo de duração da floração), além do aspecto pouco comum das flores. Pode ser utilizada para o cultivo em canteiros, formando maciços, bem como em jardins rochosos, floreiras e até mesmo vasos, devido ao seu porte (Stumpf *et al.*, 2009a).

A caracterização citogenética dessa espécie é precária, sendo limitada a um único trabalho encontrado na literatura, onde foram determinados os números cromossômicos de 33 espécies nativas do Paraguai, incluindo *A. integerrima*, que teve seu número diploide definido como  $2n = 20$  cromossomos (Molero *et al.*, 2006). Destaca-se que no referido trabalho, o número cromossômico foi determinado a partir de uma única população, e não há nenhuma informação sobre o número de indivíduos e/ou de células analisados, além de não existir fotomicrografias que ilustrem os cromossomos da espécie. Com relação ao conteúdo de DNA, tanto para a espécie, quanto para o gênero *Angelonia*, não foram encontradas informações na literatura.

#### **2.4.2 *Campomanesia aurea* O. Berg**

A espécie *Campomanesia aurea* (Figura 2), conhecida popularmente como guabirobinha-do-campo ou arazá-rasteiro, pertence à família Myrtaceae.

A família Myrtaceae possui uma distribuição predominantemente pantropical e subtropical. Inclui cerca de 130 gêneros e mais de 4000 espécies, o que faz desta uma das maiores famílias da flora brasileira, com 22 gêneros e aproximadamente 1000

espécies ocorrendo no Brasil. Dentre os gêneros nativos mais representativos, destacam-se *Eugenia*, *Myrcia*, *Psidium* e *Campomanesia* (Souza & Lorenzi, 2012).

Para o gênero *Campomanesia*, são descritas 36 espécies (Landrum, 1986). Dentre essas, 32 são referidas como endêmicas do Brasil, porém nenhuma é endêmica da região Sul (INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2017). O gênero tem ocorrência restrita, exclusiva às Américas, distribuindo-se do norte da Argentina a Trinidad, e da costa do Brasil até o Peru, Equador e Colômbia (Landrum, 1986).

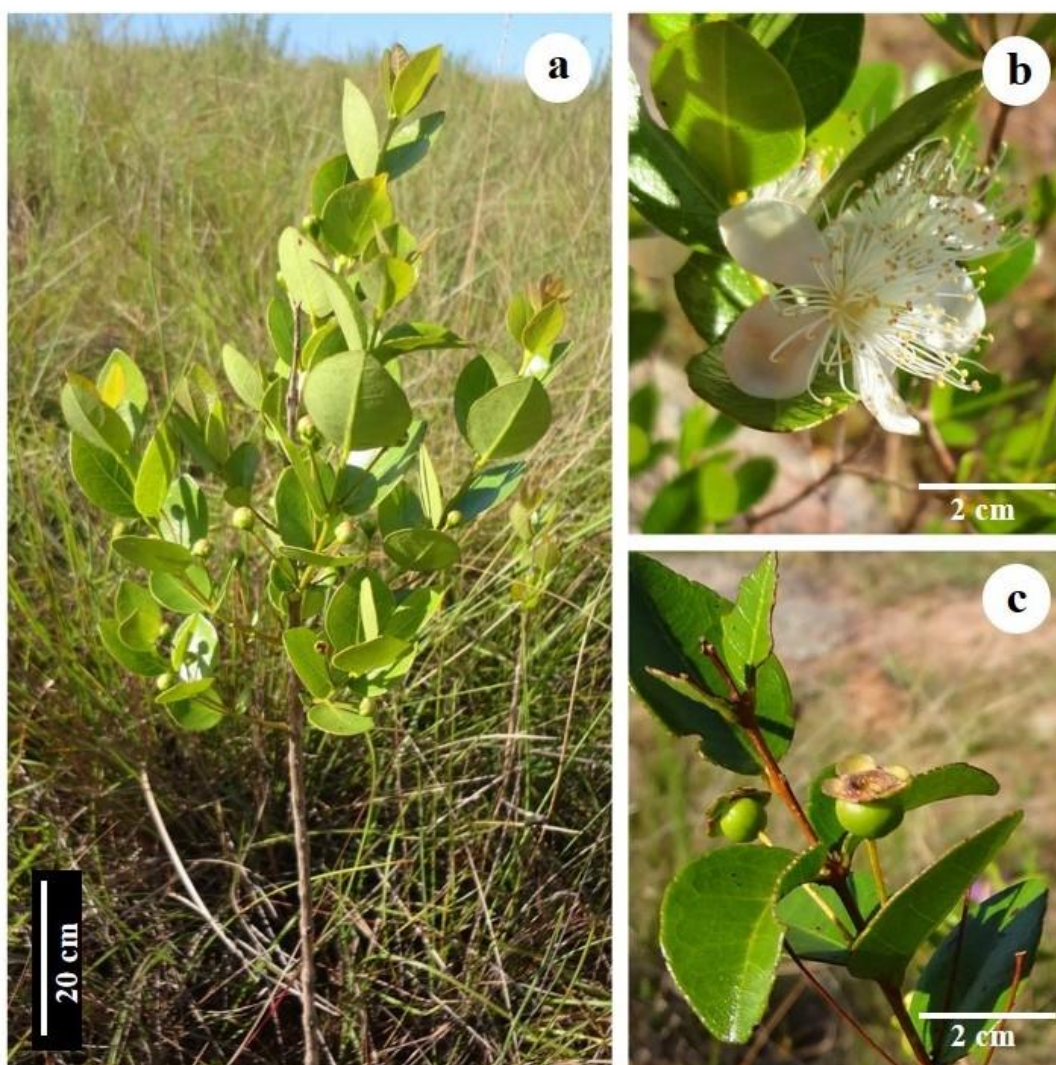


FIGURA 3. *Campomanesia aurea* O. Berg em ambiente natural (Parque Natural Morro do Osso - Porto Alegre - RS); a) aspecto geral; b) detalhe das flores; c) detalhe dos frutos. Imagens: Marília Tedesco, 2018.

*C. aurea* desenvolve-se em campos com afloramentos rochosos, distribuindo-se geograficamente no Brasil na Região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), Argentina, Paraguai e Uruguai (Figura 4) (Sobral *et al.*, 2015).

É descrita como um subarbusto perene, de pequeno porte, horizontalizado e assimétrico, e que, em determinados ambientes, pode alcançar até 1 m de altura. O caule é lenhoso ramificado; as folhas são verdes com margens e nervuras amareladas, inteiras, com filotaxia oposta; as flores são axilares e pedunculadas e possuem pétalas brancas, estames numerosos e longos, com filete branco e antera de cor creme. Os frutos são de coloração amarelada, globosos, pedunculados e pendentes. A floração e frutificação ocorrem entre setembro e fevereiro (Lorenzi *et al.*, 2006; Stumpf, 2009a).

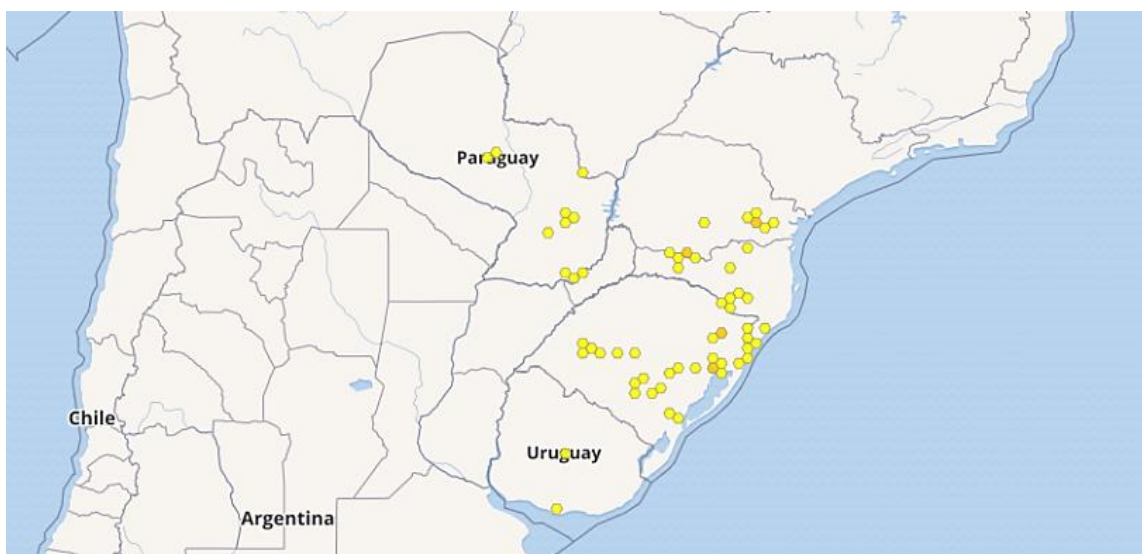


FIGURA 4. Mapa adaptado da área de ocorrência de *Campomanesia aurea* O. Berg gerado pela plataforma online Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2019b).

Devido a diversos atributos, como a arquitetura interessante, a delicadeza, o pequeno porte, a floração intensa e aromática e os frutos comestíveis que atraem a avifauna, a espécie pode ser utilizada em jardins, como planta de destaque, para compor

maciços ou bordaduras ou, ainda, para o cultivo em vasos, conferindo dessa forma um diferencial aos ambientes (Stumpf *et al.*, 2009a).

Com relação à caracterização citogenética de *C. aurea*, não há nenhum trabalho encontrado na literatura acerca desse aspecto, o que torna qualquer informação inédita. Já para o gênero, há alguns estudos que envolvem principalmente a determinação do número cromossômico, a germinação *in vitro* do tubo polínico e a estimativa do conteúdo de DNA. Costa & Forni-Martins (2006) determinaram o número cromossômico de quatro espécies de *Campomanesia* (*C. adamantium*, *C. guaviroba*, *C. phaea* e *C. pubescens*). Para essas quatro espécies, o número diploide de  $2n = 22$  cromossomos foi encontrado. O número cromossômico gamético de *C. pubescens* foi determinado como sendo de  $n = 11$  cromossomos (Forni-Martins & Martins, 2000), enquanto o número cromossômico diploide de *C. cambessedeana* foi determinado como sendo de  $2n = 22$  cromossomos (Forni-Martins *et al.*, 1989).

A respeito da germinação *in vitro* do tubo polínico, um estudo realizado por Franzon *et al.* (2006) procurou identificar qual o meio de cultura e as condições térmicas que deveriam ser utilizadas em testes de germinação *in vitro* do pólen de *C. xanthocarpa*, bem como verificar a possibilidade de armazenamento do pólen em freezer. Os autores constataram que a viabilidade do pólen pode ser avaliada por germinação *in vitro* em meio de cultura padrão (10% de açúcar + 1% de ágar), três horas após a inoculação, e incubação a 25 °C, sendo que o pólen de *C. xanthocarpa* não manteve sua viabilidade após 90 dias de armazenamento em freezer.

Com relação ao conteúdo de DNA, foram encontradas estimativas de valor 2C para as espécies: *Campomanesia pubescens* (0.497 pg), *C. guazumifolia* (0.503 pg), *C. schlechtendaliana* (0.519 pg), *C. phaea* (0.528 pg), *C. adamantium* (0.586 pg), *C. guaviroba* (0.596 pg) e *C. laurifolia* (0.612 pg) (Costa *et al.*, 2008).

### 2.4.3 *Sesbania punicea* (Cav.) Benth.

*Sesbania punicea* (Figura 3), conhecida popularmente como acácia-de-flores-vermelhas, fedegoso-da-praia ou cambaí-vermelho, pertence à família Fabaceae (Leguminosae).

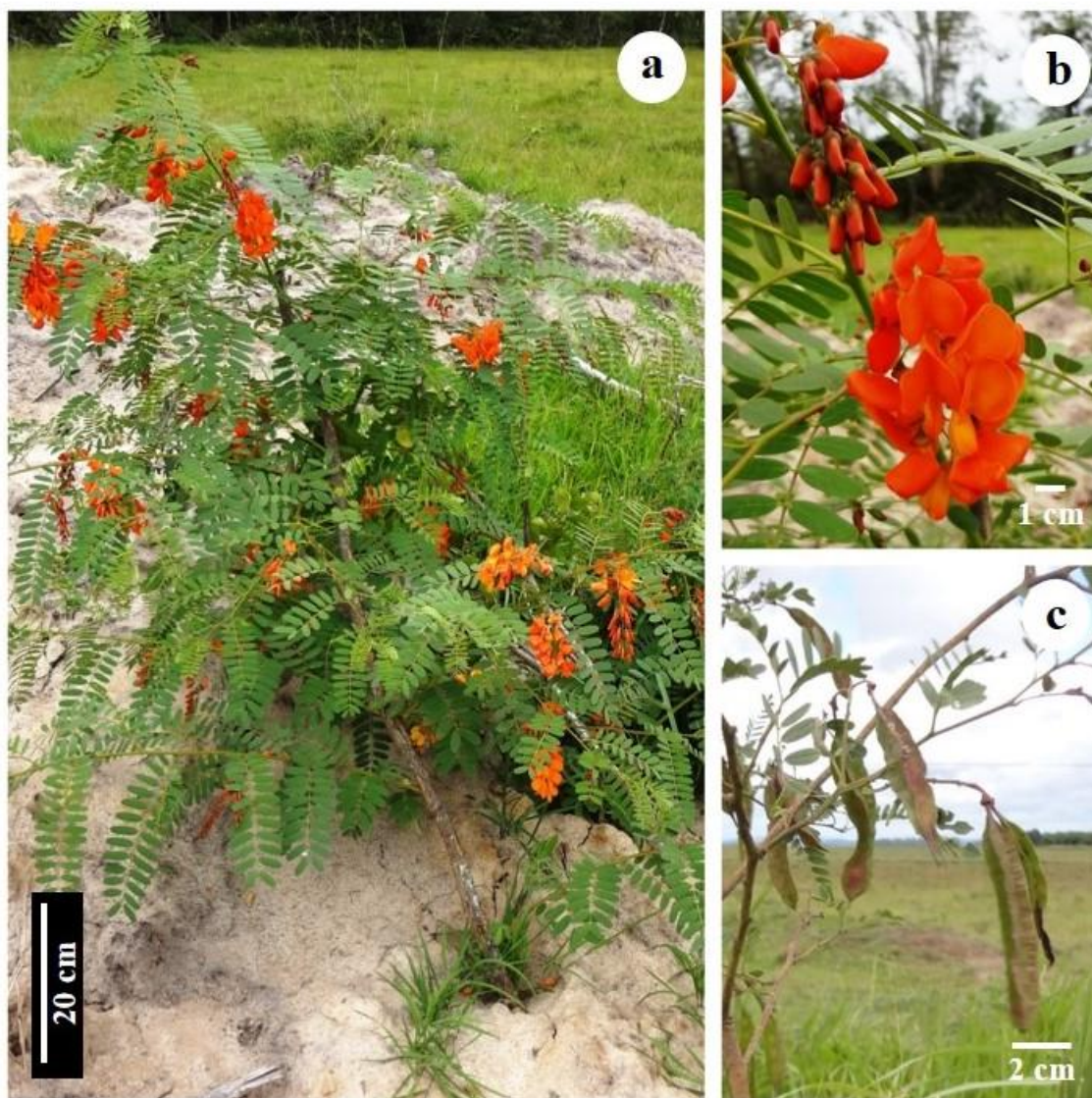


FIGURA 5. *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. em ambiente natural (Palmares do Sul - RS); a) aspecto geral; b) detalhe da inflorescência; c) detalhe dos frutos. Imagens: Marília Tedesco, 2018.

A família Fabaceae tem distribuição cosmopolita, incluindo aproximadamente 650 gêneros e 19000 espécies, o que a torna uma das principais famílias de Angiospermas, tanto do ponto de vista da diversidade, quanto do ponto de vista da



importância econômica das espécies. No Brasil, ela corresponde a maior família em número de espécies, totalizando 2700 e cerca de 200 gêneros. Dentre os gêneros nativos do Brasil, destaca-se *Sesbania* (Souza & Lorenzi, 2012).

Para o gênero *Sesbania*, são descritas cerca de 60 espécies (Monteiro, 1984), de distribuição cosmopolita, sendo encontradas 32 espécies na África, 10 na Austrália, cerca de 10-11 na Ásia tropical e oito na América (Monteiro, 1984).

*S. punicea* pode ser descrita como um arbusto ou pequena árvore caducifólia que pode atingir de 2 a 4 m de altura. As folhas são verdes, alternas e compostas por numerosos folíolos. As flores são vermelho-alaranjadas, com cerca de 3 cm de comprimento, reunidas densamente em racemos terminais pendentes, com comprimento de até 25 cm. Os frutos são do tipo vagem, tetralados, com deiscência longitudinal, de coloração marrom quando maduros, medindo cerca de 8 cm de comprimento. Floresce entre novembro e fevereiro (Erb, 1980; Stumpf *et al.*, 2009a). É uma espécie bastante tolerante a solos pobres, sendo sua propagação frequentemente facilitada por perturbações na natureza, como incêndios e alterações no uso da terra (Ulibarri *et al.*, 2002).

*S. punicea* é comum em campos arenosos e vegetação de restinga, distribuindo-se naturalmente na América do Sul no leste da Argentina (margens do Rio da Prata), no Uruguai e nas regiões sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo), centro-oeste (Mato Grosso do Sul) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) do Brasil (Figura 6) (Erb, 1980; Iganci & Miotto, 2016).

Em países como África do Sul, Estados Unidos e Portugal (Figura 7), foi introduzida e cultivada como planta ornamental, tendo *status* atual de espécie invasora (Csurhes e Edwards 1998; Woodward e Quinn 2011).

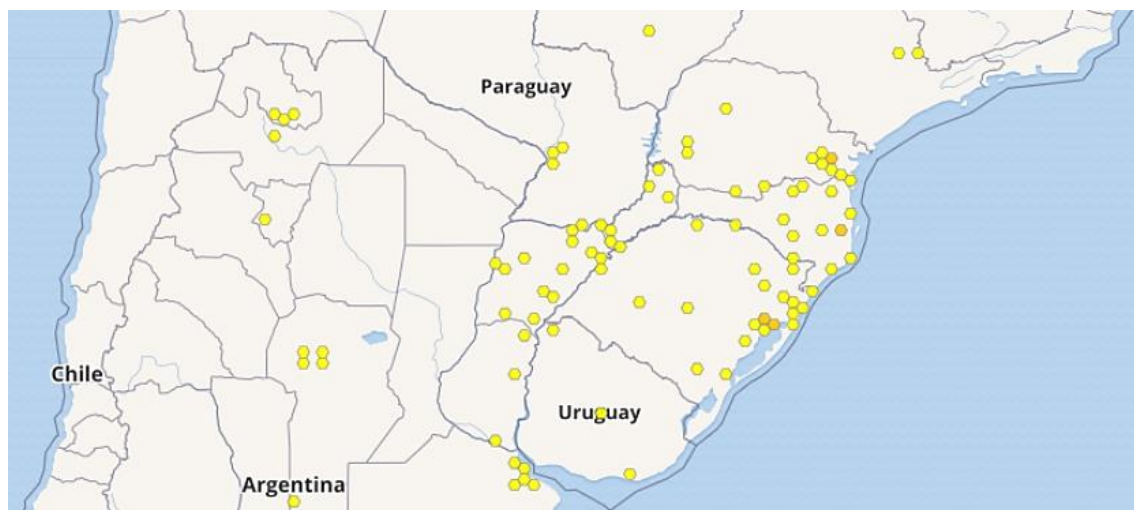


FIGURA 6. Mapa adaptado da área de ocorrência de *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. gerado pela plataforma online Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2019c).

Algumas particularidades, como a arquitetura equilibrada, o aspecto das folhas e flores e a persistência dos frutos fazem com que *S. punicea* seja uma espécie ornamental desejável, podendo ser utilizada na formação de agrupamentos ou cercas vivas e também como planta de destaque em composições paisagísticas (Stumpf *et al.*, 2009a).

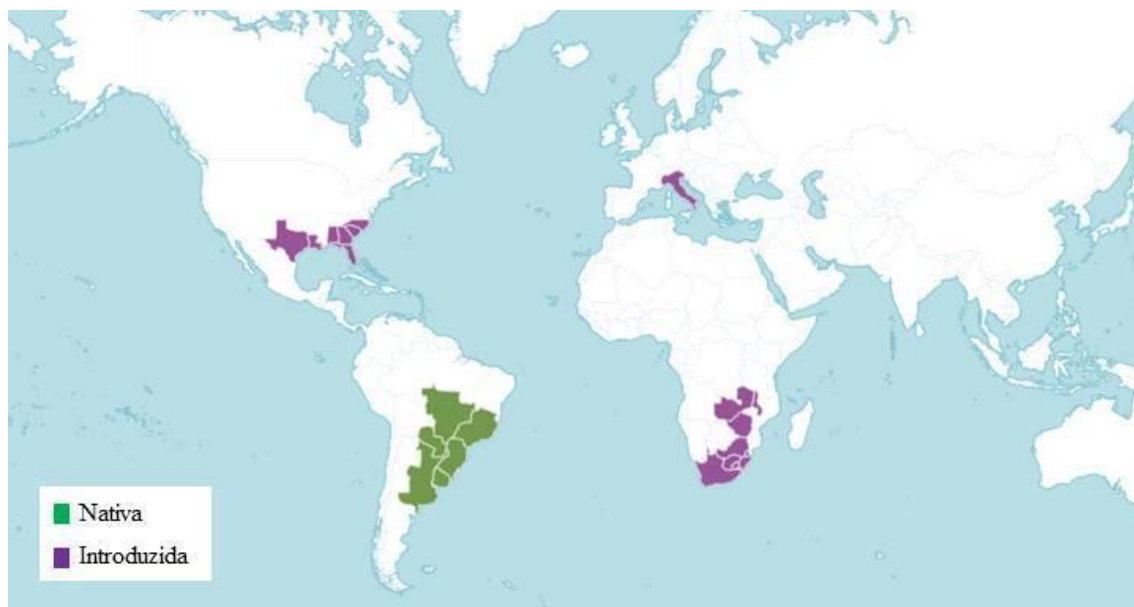


FIGURA 7. Mapa da área de distribuição de *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. Fonte: Plants of the World Online (PoWO, 2019).

Acerca da caracterização citogenética da espécie e do gênero, os trabalhos incluem a montagem de cariótipo, análise da diferenciação longitudinal dos cromossomos e estimativa do conteúdo de DNA. Forni-Martins *et al.* (1994), caracterizaram o cariótipo de cinco espécies do gênero: *Sesbania punicea*, *S. virgata*, *S. exasperata*, *S. sesban* e *S. tetraptera*. Os autores verificaram que as espécies apresentam  $2n = 12$  cromossomos, indicando o número básico  $x = 6$  para o gênero. Porém, nesse trabalho o cariótipo foi analisado e montado a partir de uma única população, e não há nenhuma informação sobre o número de indivíduos e/ou de células analisadas, além de não existir fotomicrografias que ilustrem os cromossomos da espécie. Em um trabalho realizado por Forni-Martins & Guerra (1999), três técnicas diferentes foram aplicadas para analisar os padrões de diferenciação longitudinal dos cromossomos em cinco espécies de *Sesbania*, dentre elas *S. punicea*. Para o conteúdo de DNA, em *S. rostrata*, a estimativa do valor 2C encontrado foi de 2.45 pg (Arumuganathan & Earle, 1991).

## 2.5 Referências bibliográficas

- ALCOCHETE, A. A. N. **Diversidade genética e mapeamento de QTLs do sistema gênico de macho-esterilidade termossensível (TGMs) do genoma de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2005. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2005.
- APG - ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 161, p. 105-121, 2009.
- ARROYO, M. T. K. Breeding systems and pollination biology in leguminosae. *In*: POLHILL, M.; RAVEN, P. H. (ed.) **Advances in legumes systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 723-769.
- ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 9, n. 3, p. 208-218, 1991.
- ATCHINSON, E. Chromosome numbers in the Myrtaceae. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 34, n. 3, p. 159-164, 1947.

AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botocatu, v. 8, n. 2, p. 55-63, 2006.

BARROSO, C. M. *et al.* Considerações sobre a propagação e o uso ornamental de plantas raras ou ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 91-94, 2007.

BENNET, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, Oxford, v. 76, n. 2, p. 113-176, 1995.

BENNETT, M. D. Plant genome values: how much do we know? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, New York, v. 95, n. 5, p. 2011-2016, 1998.

BFG - THE BRAZIL FLORA GROUP. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

BOFF, S. *et al.* Perfume production in flowers of *Angelonia salicariifolia* attracts males of *Euglossa annectans* which do not promote pollination. **Apidologie**, Paris, v. 46, n. 1, p. 84-91, 2014.

BOLDRINI, I. I. A flora dos campos do Rio Grande do Sul. *In*: PILLAR, V.D. *et al.* (Eds.). **Campos sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2009. p. 63-77.

BRASILEIRO-VIDAL, A. N.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. *In*: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (org.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 277-298.

BUAINAIN, A.; BATALHA, M. (coord.). **Cadeias produtivas de flores e mel**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; SPA; IICA, 2007. (Agronegócios, 9).

CARDOSO, J. C. Melhoramento de espécies ornamentais como estratégia para o desenvolvimento e autossuficiência do setor. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 31, n. 1, p. 171, 2013.

CARRION, N. A.; BRACK, P. Eudicotiledôneas ornamentais dos campos do bioma Pampa no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 23-37, 2012.

CORADIN, L. A Iniciativa Plantas para o Futuro. *In*: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. (org.) **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - região sul**. Brasília, DF: MMA, 2011. 934 p.

- COSTA, I. R.; FORNI-MARTINS, E. R. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pávon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). **Caryologia**, Firenze, v. 59, n. 1, p. 7-13, 2006.
- COSTA, I. R.; DORNELAS, M. C.; FORNI-MARTINS, E. R. Nuclear genome size variation in fleshy-fruited Neotropical Myrtaceae. **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v. 276, n. 3/4, p. 209-217, 2008.
- CRUZ, N. D. *et al.* **Citogenética vegetal: cinquenta e três anos de pesquisa da seção de citologia do Instituto Agrônomo. Campinas: IAC, 1993. v. 27.**
- CSURCHES, S.; EDWARDS, R. **Potential environmental weeds in Australia: candidate species for preventative control.** Brisbane: Biodiversity Group, 1998. 208 p.
- DANNER, M. A. *et al.* Modo de reprodução e viabilidade de pólen de três espécies de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 345-352, 2011.
- DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, New York, v. 2, n. 4, p. 143-154, 1991.
- DOLEŽEL, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. *In: LELLEY, T. Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement.* Vienna: WUV-Universitätsverlag, 1997. p. 80-90.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. *In: DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (ed.) Flow cytometry with plant cells.* Weinheim: Wiley, 2007. p. 41-65.
- ERB, H. E. The natural enemies and distribution of *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. in Argentina. **Proceedings of the National Weeds Conference of South Africa**, Cape Town, v. 3, p. 205-210, 1980.
- ERICKSON, A. N.; MARKHART, A. H. Flower production, fruit set, and physiology of bell pepper during elevated temperature and vapor pressure deficit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, USA, v. 126, n. 6, p. 697-702, 2001.
- FISCHER, S. Z. *et al.* Plantas da flora brasileira no mercado internacional de floricultura. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 510-512, 2007. supl. 1.
- FORNI-MARTINS, E. R.; PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. IOPB chromosome data I. **International Organization of Plant Biosystematists Newsletter**, Cambridge, v. 13, n. 1, p. 17, 1989.
- FORNI-MARTINS, E. R.; FRANCHI-TANIBATA, M.; LUCENA, M. A. C. Karyotypes of species of *Sesbania* Scop. (Fabaceae). **Cytologia**, Tokyo, v. 59, n. 1, p. 479-482, 1994.

- FORNI-MARTINS, E. R.; GUERRA, M. Longitudinal differentiation in chromosome of some *Sesbania* Scop. species (Fabaceae). **Caryologia**, Tokyo, v. 52, n. 1/2, p. 97-103, 1999.
- FORNI-MARTINS E. R.; MARTINS F. R. Chromosome studies on brazilian cerrado plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 947-955, 2000.
- FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B. Meiotic index in Myrtaceae native fruits trees from southern Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 4, n. 3, p. 344-349, 2004.
- FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B.; WAGNER JUNIOR, A. Germinacao *in vitro* de pólen de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 53, n. 305, p. 129-134, 2006.
- FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B.; WAGNER JUNIOR, A. Testes de germinação *in vitro* e armazenamento de pólen de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Acta Scientiarum-Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 2, p. 251-255, 2007.
- FRESCURA, V. D. S. *et al.* Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different methods of staining. **Biocell**, Mendoza, v. 36, n. 3, p. 143-145, 2012.
- GBIF - GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. *Angelonia integerrima* Spreng. In: **GBIF backbone taxonomy**. [Base de dados]. Copenhagen, 2019a. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/3742036>. Acesso em: 3 out. 2019.
- GBIF - GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. *Campomanesia aurea* O. Berg. In: **GBIF backbone taxonomy**. [Base de dados]. Copenhagen, 2019b. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/3180909>. Acesso em: 3 out. 2019.
- GBIF - GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. *Sesbania punicea* Benth. In: **GBIF backbone taxonomy**. [Base de dados]. Copenhagen, 2019c. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/2970728>. Acesso em: 3 out. 2019.
- GUERRA, M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco I. **Revista Brasileira de Genética**, Recife, v. 9, n. 1, p. 21-40, 1986.
- GUERRA, M. **Introdução à citogenética vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131 p.
- GUINET, P. H. **Advances in legume biology: structure evolution, and biology of pollen in Leguminosae**. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1989. 842 p.
- HEIDEN, G.; BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 2-7, 2006.

- HEIDEN, G. *et al.* Uso de plantas arbóreas e arbustivas nativas do Rio Grande do Sul como alternativa a ornamentais exóticas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 2, n. 1, p. 851-853, 2007.
- HEIDEN, G.; IGANCI, J. R. V. Valorizando a flora nativa. *In*: STUMPF, E. R. T.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. (ed.). **Cores e formas no Bioma Pampa**: plantas ornamentais nativas. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. p. 36-43.
- HESLOP-HARRISON, J. S. RNA, genes, genomes and chromosomes: repetitive DNA sequences in plants. *In*: OLMO, E; REDI, C. A. (ed.). **Chromosomes today**. Basel: Springer, 2000. v.13, p. 45-57.
- IBGE. Censo agropecuário 2017: resultados preliminares. **Censo Agropecuário**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 1-108, 2017. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3093/agro\\_2017\\_resultados\\_preliminares.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3093/agro_2017_resultados_preliminares.pdf). Acesso em: 10 jun. 2019.
- IBRAFLOR. **Mapeamento e quantificação da cadeia de flores e plantas ornamentais do Brasil**. Holambra, SP: IBRAFLOR, 2015. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=248>. Acesso em: 12 jun. 2016.
- IGANCI, J. R. V.; MIOTTO, S. T. S. *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. *In*: LISTA de espécies da flora do Brasil. [Base de dados]. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB101171>. Acesso em: 8 jun. 2016.
- INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Flora do Brasil 2020 em construção**. [Base de dados]. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acesso em: 30 ago. 2019.
- INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. *Campomanesia*. *In*: FLORA do Brasil 2020 em construção. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10311>. Acesso em: 26 set. 2017.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Colorado: University Press of Colorado, 1993. 579 p.
- KRON, P.; SUDA, J.; HUSBAND, B. C. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 38, n. 1, p. 847-876, 2007.
- LANDRUM, L. R. *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium* and *Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica**, New York, v. 45, n. 4, p. 65-66, 1986.

- LEAL, L.; BIONDI, D. Potencial ornamental de espécies nativas. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, Garça, v. 4, n. 8, p.1-16, 2006.
- LORENZI, H. *et al.* **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640 p.
- LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, Porto, v. 77, n. 1, p. 18-29, 2004.
- LOVE, E. M. La citologia como ayuda practica al mejoramiento de los cereales. **Revista Argentina de Agronomia**, Buenos Aires, v. 16, n. 1, p. 1-13, 1949.
- MARTINS, A. C.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Floral-oil-producing plantaginaceae species: geographical distribution, pollinator rewards and interactions with oil-collecting bees. **Biota Neotrópica**, Campinas, v. 13, n. 4, p. 77-89, 2013.
- MATZK, F. Reproduction mode screening. *In*: DOLEZEL, J., GREILHUBER, J.; SUDA, J. (ed.) **Flow cytometry with plant cells**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. cap. 6, p. 131-152.
- MIRANDA, P. A.; CLEMENT, C. R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) palmae pollen. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 38, n. 1, p. 29-33, 1990.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Tropicos**. [Base de dados]. St. Louis: Missouri Botanical Garden, [2017]. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/40014574?tab=subordinatetaxa>. Acesso em: 26 set. 2017.
- MOLERO, J. *et al.* Chromosome studies on plants from Paraguay II. **Candollea**, Ville de Genève, v. 61, n. 2, p. 373-392, 2006.
- MONTEIRO, R. **Taxonomic studies on brazilian vegetables with forage potential: *Sesbania*, *Lupinus***. 1984. Thesis (Doctoral) - University of Saint Andrews, Saint Andrews, 1984.
- NAHOUM, P.; FRAGA, C. N. Uso de recursos fitogenéticos no paisagismo. *In*: VEIGA, R. F. A; QUEIRÓZ, M. A. **Recursos fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil**. Viçosa, MG: UFV, 2015. cap. 40, p. 306-313.
- NEVES, M. F.; PINTO, M. J. A. (org.) **Mapeamento e quantificação da cadeia de flores e plantas ornamentais do Brasil**. São Paulo: OCESP, 2015. Disponível em: [http://ocespp.org.br/download/Livro\\_Mapeamento\\_e\\_Quantificacao\\_Cadeia\\_de\\_Flores\\_FINAL.pdf](http://ocespp.org.br/download/Livro_Mapeamento_e_Quantificacao_Cadeia_de_Flores_FINAL.pdf). Acesso em: 6 out. 2016.
- OLIVEIRA JÚNIOR, C. J. F. *et al.* Potencial das espécies nativas na produção de plantas ornamentais e paisagismo agroecológico. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 8, n. 3, p. 190-200, 2013.



- PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 997-1002, 2000.
- PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. Meiose em vegetais: um enfoque para a caracterização de germoplasma. *In*: PEÑALOZA, A. D. P. S. (coord.) **II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa, 2005. 89 p.
- PILLAR, V. P. *et al.* (ed.) **Campos sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília, DF: MMA, 2009. 403 p.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; PIEROZZI, N. I. Caracterização citogenética. *In*: VEIGA, R. F. A; QUEIRÓZ, M. A. **Recursos fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil**, Viçosa, MG: UFV, 2015. cap. 25, p. 204-213.
- PoWO - PLANTS OF THE WORLD ONLINE. Facilitated by the Royal Botanic Gardens. Kew, 2019. Disponível em: <http://www.plantsoftheworldonline.org>. Acesso em: 3 out. 2019.
- POZZOBON, M. T. *et al.* Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 2, p. 212-216, 2011.
- RAGHAVAN, T. S.; SRINIVASAN, V. K. Studies in the Scrophulariaceae: the cytology of *Angelonia grandiflora* C. Merr. and some related genera. **Cytologia**, Tokyo, v. 11, n. 1, p. 37-54, 1940.
- RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to asses pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, Wageningen, v. 12, n. 4, p. 241-244, 2000.
- SATO, S.; PEET, M. M.; THOMAS, J. F. Determining critical pre and post anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill. exposed to moderately elevated temperatures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 371, p. 1187-1195, 2002.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 897-902, 2001.
- SEBRAE. **Flores e plantas ornamentais do Brasil**. Brasília, DF: SEBRAE, 2015. (Estudo Mercadológicos, 1).
- SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2003. 488 p.
- SOBRAL, M. *et al.* Myrtaceae. *In*: LISTA de espécies da flora do Brasil. [Base de dados]. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10311>. Acesso em: 12 jul. 2017.

- SOUSA, V. A.; SCHEMBERG, E. A.; AGUIAR, A. V. Germinação *in vitro* do pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 86, p. 147-151, 2010.
- SOUZA, V. C. *et al.* *Plantaginaceae*. In: FLORA do Brasil 2020 em construção. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB25958>. Acesso em: 26 set. 2017.
- SOUZA, V. C.; GIULIETTI, A. M. Levantamento das espécies de Scrophulariaceae *sensu lato* nativas do Brasil. **Pesquisas. Série Botânica**, São Leopoldo, v. 60, n. 1, p. 7-288, 2009.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 647 p.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas e nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768 p.
- STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen**: biology, biochemistry, management. Heidelberg: Springer, 1974. 310 p.
- STUMPF, E. R. T. *et al.* **O setor produtivo de flores e plantas ornamentais nos Coredes Sul e Centro-Sul do Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. 26 p.
- STUMPF, E. R. T. *et al.* Método para avaliação da potencialidade ornamental de flores e folhagens de corte nativas e não convencionais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 143-148, 2007.
- STUMPF, E. R. T. *et al.* Prospecção de plantas nativas do bioma pampa para uso na arte floral. **BioScriba**, Bahía Blanca, v.1, n. 2, p. 65-72, 2008.
- STUMPF, E. R. T.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. (org.). **Cores e formas no Bioma Pampa**: plantas ornamentais nativas. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009a. 276 p.
- STUMPF, E. R. T. *et al.* Características ornamentais de plantas do Bioma Pampa. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 46-62, 2009b.
- STUMPF, E. R. T. *et al.* Espécies nativas que podem substituir as exóticas no paisagismo. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 21, n.2, p. 165-172, 2015.
- SUDA, J. *et al.* Flow cytometry and ploidy: applications in plant systematics, ecology and evolutionary biology. In: DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (ed.) **Flow cytometry with plant Cells**. Weinheim: Wiley, 2007. p. 103-130.

TERRA, S. B.; ZÜGE, D. P. P. O. Floricultura: a produção de flores como uma nova alternativa de emprego e renda para a comunidade de Bagé - RS. **Revista Conexão UEPG**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 342-353, 2013.

THOMPSON, A. H.; BATJER, L. P. The effect of boron in the germinating medium on pollen germination and pollen tube growth for several deciduous tree fruits. **Proceedings of American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 56, n. 1, p. 227-230, 1950.

TSUBOI, N.; TSURUSHIMA, H. **Introdução à história da indústria de flores e plantas ornamentais no Brasil**. Arujá: Lip Gráfica, 2009. 276 p.

ULIBARRI, E. A. *et al.* **Leguminosas nativas y exóticas**. Buenos Aires: L.O.L.A., 2002. (Biota Rioplatense, 7). 180 p.

VALLS, J. F. M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. *In*: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., 1988, Jaboticabal. **Anais** [...]. Jaboticabal: FCAV, 1988. p.106-128.

WOODWARD, S. L.; QUINN, J. A. **Encyclopedia of invasive species: from africanized honey bees to zebra mussels**. Santa Barbara: Greenwood Press, 2011.764 p.

ZANELA, L. **Caracterização cariotípica de quatro espécies brasileiras de *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) com as técnicas de FISH, CMA, DAPI e AgNOR**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2009.

### 3 ARTIGO 1

**Caracterização citogenética de *Angelonia integerrima* Sprengel (Plantaginaceae),  
uma espécie nativa com potencial ornamental\***

\*Artigo publicado na revista Crop Breeding and Applied Biotechnology:

TEDESCO, M. et al. Cytogenetic characterization of *Angelonia integerrima* Sprengel, a native species with ornamental potential. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, p. 118-125, 2019.

## Cytogenetic characterization of *Angelonia integerrima* Sprengel (Plantaginaceae), a native species with ornamental potential

Marília Tedesco<sup>1</sup>, Aquélis Armiliato Emer<sup>1</sup>, Mara Cíntia Winhelmann<sup>1</sup>, Eduarda Demari Avrella<sup>1</sup>, Karine Cristina Krycki<sup>2</sup>, Carine Simioni<sup>2\*</sup> and Gilmar Schafer<sup>1</sup>

\*Corresponding author:

E-mail: carine.simioni@ufrgs.br

ORCID: 0000-0002-0642-6980

Received: 15 March 2018

Accepted: 15 April 2018

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Horticultura e Silvicultura, 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

**Abstract:** *Angelonia integerrima* Sprengel is a native species of the state of Mato Grosso do Sul and the Southern region (Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul) of Brazil, with features such as an unusual appearance and color of the flowers, indicating an ornamental use. To optimize the use of this species and to fill in gaps regarding its cytogenetic characterization, this study determined the chromosome number, meiotic index and pollen viability of plant individuals of four *A. integerrima* populations. All plant individuals of the four populations had  $2n = 20$  chromosomes. Still, the meiotic index of most analyzed plant individuals exceeded 90%, while pollen viability of all plant individuals was higher than 80%. These data suggest considerable cytological stability of the analyzed *A. integerrima* plant individuals, which may favor the selection of future genotypes for commercial purposes or their use in conservation and breeding programs of the species.

**Keywords:** Caracol-do-campo, chromosome number, meiotic index, pollen viability, plant genetic resources.

### INTRODUCTION

*Angelonia integerrima* Sprengel (Plantaginaceae), popularly known as Angelonia, caracol-do-campo or violeta-do-campo in Brazil, is a native species that occurs in stony fields and rocky outcrops in Mato Grosso do Sul and the Southern Region (Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul) of Brazil, and close to the Brazilian borders of Paraguay and Argentina (Souza and Giulietti 2009).

This species has a considerable ornamental potential in view of features such as herbaceous growth, the contrast caused by the color difference between stem and leaves, inflorescences with flowers at different maturation stages (increasing the duration of flowering), aside from the peculiar aspect of the flowers. It can be

cultivated in flowerbeds, forming clumps, as well as in rock gardens, flower planters and even pots (Stumpf et al. 2009).

Although the Brazilian flora presents a great biodiversity, including species with ornamental characteristics such as *A. integerrima*, the number of native species cultivated commercially is still derisory (Heiden et al. 2006). However, a reduction or even replacement of exotic ornamental species by native ones is a trend that has been consolidating in the modern landscaping (Heiden et al. 2007), emerging as a new niche in the floriculture market, with great potential of production and commercialization (Oliveira Junior et al. 2013).

However, to introduce *A. integerrima* into cultivation, some aspects must be known. Among these, the cytogenetic characterization is essential, for providing a foundation for related studies that contribute both to the use of native material with economic potential and to the preservation of the species germplasm (Valls 2007). Moreover, the information generated may provide a basis underlying breeding, with a view to developing the commercially most promising material (Cruz et al. 1993).

The knowledge about the chromosome number of a species provides data that contribute to phylogeny and taxonomy, as well as helping to determine the most appropriate procedures to obtain hybrids in breeding programs (Heslop-Harrison 2000, Auler et al. 2006). While the analysis of the meiotic index and pollen viability allow obtaining information on genetic variability, sterility problems and possibilities of crosses (Souza et al. 2004).

The cytogenetic characterization of the genus *Angelonia* is doubtful, since only chromosome numbers are reported for some species such as *A. grandiflora* C. Morr. (Raghavan and Srinivasan 1940), *A. salicariaefolia* Humb. & Bonpl. (Chandran and Bhavanandan 1983), *A. cubensis* (var *alba*) (Subramanian and Pondmudi 1987), *A. gardneri* Hook. (Molero et al. 2006) and *Angelonia* spp. (hybrid) (Plaschil and Olbricht 2008). In these studies, the chromosome number of the species was  $n = 10$  or  $2n = 20$ , suggesting that  $x = 5$  or  $x = 10$  is the basic chromosome number of the genus. Only one study in the literature determined the chromosome number of *A. integerrima*, based on a single Paraguayan population, as  $2n = 20$  chromosomes (Molero et al. 2006).

Thus, to deepen the knowledge about the basic aspects of the species *A. integerrima*, which could contribute to enhance conservation strategies and underlie

future breeding studies, this study addressed the description of the species in terms of chromosome number, meiotic index and pollen viability of different populations of the state of Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

## **MATERIAL AND METHODS**

The analyses were carried out at the Laboratory of Cytogenetics of the Department of Forage Plants and Agrometeorology (DPFA) and the Laboratory of Biotechnology of the Department of Horticulture and Forestry (DHS), at the Faculty of Agronomy of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) in Porto Alegre, RS, Brazil.

### **Plant material**

The plant material used included flower buds and seeds of four natural populations, resulting in a total of 44 plant individuals collected in 2016 and 2017, in localities of the state of Rio Grande do Sul (RS).

The populations with the respective geographic coordinates are listed below: Morro do Osso (MO), Porto Alegre, RS (lat 30° 07' 77" S, long 51° 14' 87" W, alt 143 m asl); Morro Santana (MS), Porto Alegre, RS (lat 30° 02' 14" S, long 51° 06' 33" W, alt 311 m asl); Barão do Triunfo (BT), Barão do Triunfo, RS (lat 30° 21' 36" S, long 51° 43' 55" W, alt 401 m asl) and Parque Saint'Hilaire (PSH), Viamão, RS (lat 30° 5' 42.72" S, long 51° 5' 9.36" W, alt 114 m asl). The collected material was cataloged in the Herbário ICN of the Instituto de Biociências/UFRGS (Morro do Osso - ICN 200787, Morro Santana - ICN 200789, Barão do Triunfo - ICN 200786 and Parque Saint'Hilaire - ICN 200788). The project is registered with SisGen under number A685CD8.

The regional climate is Cfa, i.e., humid subtropical (Pessoa 2017). The sites where the species was found were composed of native grassland areas characteristic of the Pampa biome.

### **Chromosome number**

To determine the chromosome number, seeds of 29 *Angelonia integerrima* plant individuals, previously refrigerated (4 to 6 °C), were sterilized in 70% alcohol and 1%

sodium hypochlorite followed by triple washing with distilled and autoclaved water. Thereafter, they were placed to germinate in Petri dishes double-lined with pH-neutral filter (Germitest®) paper moistened with distilled and autoclaved water. Then, the dishes were placed in a growth chamber, at a mean temperature of  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  and photoperiod of 16 h light. When the radicles reached an approximate length of 0.5 cm (seven days after sowing), they were pre-treated with 0.002M 8-hydroxyquinoline for 23 h 30 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a refrigerator. To determine the adequate pretreatment, preliminary tests were performed. After this step, the roots were fixed in Carnoy 3:1 (absolute ethanol/glacial acetic acid v/v) for a period of 24 h at room temperature and stored in 70% ethanol under refrigeration until further analysis. To analyze the mitotic metaphases, the radicles were washed in distilled water, hydrolyzed in 1N hydrochloric acid at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a water bath for 10 min and rinsed again in distilled water. Thereafter, the rootlets were stained with Feulgen for about 12 h. For the slides, root tips (meristematic region) were ground in 2% propionic carmine, covered with coverslips and sealed with nail polish.

For each plant individual, 10 - 20 cells were analyzed in mitotic metaphases, with good chromosome distribution and degree of contraction. The analyses were performed with a ZEISS microscope, coupled with an AxioCam ERc5s camera. The best metaphases were photographed and the images edited in the Adobe Photoshop program.

### **Meiotic index and pollen viability**

Due to the development stage of the bud at collection, only the pollen grain viability could be analyzed in some plant individuals (44 plants), while in others (19) the final microsporogenesis products were also analyzed.

After collection, the flower buds at different development stages were immediately fixed in Carnoy 3:1 (absolute ethanol/glacial acetic acid v/v) for 24 h at room temperature. Subsequently, they were transferred to 70% ethanol and refrigerated until use. For the slides, the floral buds were dissected and the anthers removed, stained with 2% propionic carmine and crushed with a glass stick, by the methodology of Guerra and Souza (2002).



To determine the meiotic index, a mean of 310 tetrads per plant individual were analyzed. Tetrads with four cells (quartet) were considered normal, while the abnormal had other numbers (two, three or more) or presence of micronuclei or microcytes. The meiotic index (MI) was calculated by the formula:  $MI = [\text{number of normal tetrads} / \text{total number of tetrads (dyads, triads, tetrads, polyads or presence of micronuclei or microcytes observed)}] \times 100$  (Love 1949).

To estimate the pollen viability, more mature flower buds were used, and the slides were also prepared by the methodology of anther squashing. Two dyes were used for pollen grain staining: 2% propionic carmine and Alexander staining. When using 2% propionic carmine dye, the fully stained pollen grains were considered viable and the unstained or weakly stained unviable. When using Alexander staining, purple pollen grains were considered viable and blue-green grains unviable, and the slides were analyzed 24 h after preparation for a better reaction of the dye. Two slides per plant individual and dye were prepared, resulting in a total of 2000 pollen grains per plant individual (500 per slide). Pollen viability was estimated by the percentage of viable grains, dividing the number of grains considered viable by the total number of grains multiplied by 100.

For each population, the longitudinal and transverse axes of 10 plant individuals (10 grains per plant individual) were measured, except for the populations of Barão do Triunfo and Parque Saint-Hilaire, in which the pollen grains of three plant individuals (all plant individuals of both populations) were measured. The measurements were performed with an ocular micrometer coupled to an optical microscope.

Meiosis and pollen viability were also analyzed under a ZEISS microscope, coupled with an AxioCam ERc5s camera, and the photomicrographs edited, using Adobe Photoshop.

### **Statistical analysis**

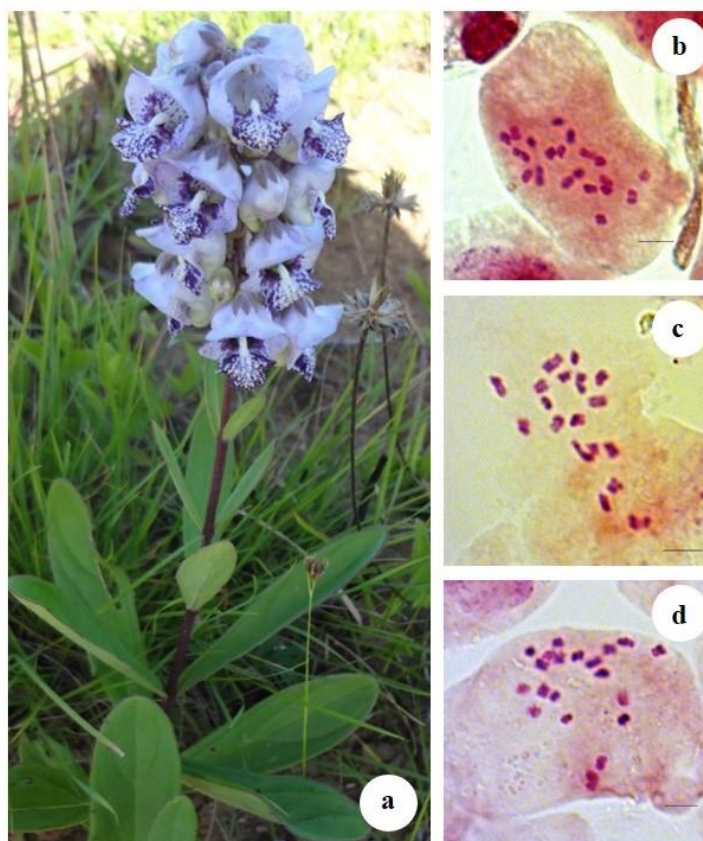
Data were analyzed by descriptive statistics (mean and standard deviation). For pollen viability means between populations, plant individuals and dyes, the data did not meet the assumptions of analysis of variance, even after transformations, and

were therefore subjected to non-parametric analysis by the Kruskal-Wallis test, followed by means comparison by Dunn's test, using software SigmaPlot 11.0.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Chromosome number

This is the first study to determine the somatic chromosome number of a large number of plant individuals of four *Angelonia integerrima* populations (Figure 1a). A chromosomal number of  $2n = 20$  was found for all plant individuals of the four populations (Table 1). This result agrees with reports of Molero et al. (2006) for a population of *A. integerrima* in Paraguay. However, it is emphasized that the photomicrographs of the chromosomes of the species presented in this study are new and unpublished (Figures 1b, 1c and 1d). As the number of chromosomes found in the four analyzed *A. integerrima* populations is the same ( $2n = 20$ ), analogous to that of the Paraguayan population (Molero et al. 2006), it is assumed that there is probably no intraspecific variability.



**Figure 1.** (a) General aspect of *Angelonia integerrima* Spreng. in natural environment (Parque Saint-Hilaire); (b - d): Mitotic metaphases with  $2n = 20$  chromosomes of the populations from Morro do Osso, Morro Santana and Parque Saint-Hilaire, respectively. Scale: 10  $\mu\text{m}$ .

*Table 1.* Populations of *Angelonia integerrima* Spreng., number of plants and cells analyzed and respective chromosome number.

Population (acronym)	Number of plant individuals (number of cells analyzed)	Chromosome number (2n)
Morro do Osso (MO)	12 (160)	2n = 20
Morro Santana (MS)	13 (130)	2n = 20
Barão do Triunfo (BT)	01 (20)	2n = 20
Parque Saint'Hilaire (PSH)	03 (40)	2n = 20

Studies with other *Angelonia* species indicate that there is no intrageneric variation affecting the chromosome number either, at least with regard to the cultivated species: *A. grandiflora* C. Morr. (Raghavan and Srinivasan 1940), *A. salicariaefolia* Humb. & Bonpl. (Chandran and Bhavanandan 1983), *A. cubensis* (var *alba*) (Subramanian and Pondmudi 1987), *A. gardneri* Hook. (Molero et al. 2006), and *Angelonia* spp. (Hybrid) (Plaschil and Olbricht 2008). In these studies, the species had  $n = 10$  or  $2n = 20$  chromosomes, suggesting that  $x = 5$  or  $x = 10$  is the basic chromosome number of the genus.

With regard to the small sample size of the population of Barão do Triunfo (one plant individual with seeds), it is emphasized that this population is known to have comprised several *A. integerrima* plant individuals a few years ago, however, with the intensive conversion of native field areas into pastures and monocultures, the population was drastically reduced. Thus, this study reinforces the importance of describing this species, as a contribution to the conservation of the still existing germplasm.

Due to the small chromosome size of *A. integerrima* ( $< 2 \mu\text{m}$ ), as also reported for other species of the genus (Raghavan and Srinivasan 1940), the centromere could not be accurately identified, nor the arm length measured for karyotype assembly.

According to Guerra (1990), the analysis of several populations of a same species can provide information about the cytological stability of the species, as observed in *A. integerrima*, and on the existence of intraspecific variability or even subspecies. It is worth remembering that the chromosome number of a species must be determined in several plant individuals and populations, and voucher specimen of the analyzed material should be deposited in a herbarium, underlying the identification of the species under study (Castro et al. 2006).

## Meiotic index and pollen viability

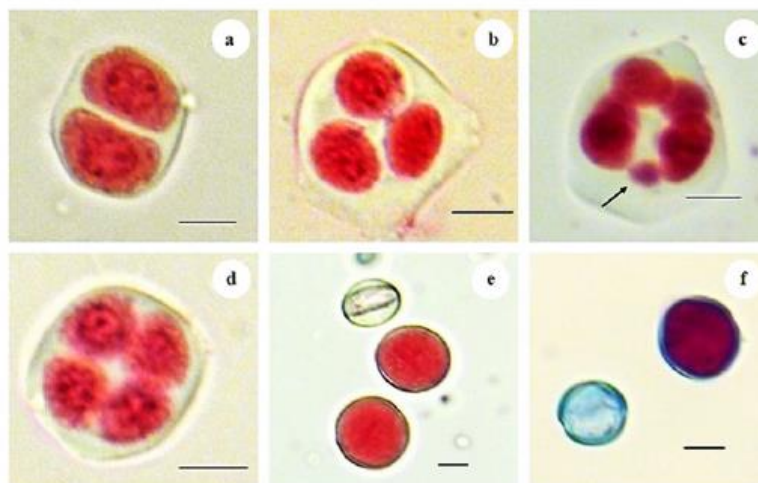
Data resulting from the analysis of microsporogenesis end products indicated a high percentage of normal tetrads, with meiotic index average of 92.9% (Table 2). In this study, some irregularities such as dyads, triads and polyads (Figure 2a, 2b, and 2c) were observed, although the number of normal tetrads (2d) was the highest.

**Table 2.** Final meiotic products, meiotic index (%) and mean of pollen viability of four populations of *Angelonia integerrima* Spreng.

Population (acronym)	Number of individuals	Microsporogenesis products (total)		Meiotic index (MI %)	Pollen viability (%)	
		Regular (tetrad)	Irregular (dyads, triads, polyads)		Propionic carmine	Alexander staining
Morro do Osso (MO)	20	3174	197	94.1 <sup>ns</sup>	95.4 <sup>ns</sup>	95.9 <sup>ns</sup>
Morro Santana (MS)	18	2184	166	92.9	96.2	96.7
Barão do Triunfo (BT)	03	471	34	93.2	95.7	96.1
Parque Saint-Hilaire (PSH)	03	66	6	91.7	97.2	97.3
Mean	-	1473.5	100.7	92.9	96.1	96.5

<sup>ns</sup> no significant differences in average (5% probability) by Dunn's test.

There are no literature reports on the chromosome behavior at the end of meiosis and/or on the pollen viability of *A. integerrima*. For the genus *Angelonia*, Molero et al. (2006) studied the meiotic behavior of *A. gardneri*, identifying normal chromosome segregation, with few irregularities. Ten bivalents ( $n = 10$ ) in diacinesis/metaphase I were found.



**Figure 2.** Pollen grains and microsporogenesis end products of *Angelonia integerrima* Spreng. (a) dyad; (b) triad; (c) polyad with microcyst (arrow); (d) normal tetrad; (e) pollen grains stained with propionic carmine: viable (stained red) and unviable (unstained); (f) pollen grains stained with Alexander staining: viable (stained purple) and unviable (stained blue). Scale: 10  $\mu$ m.

A single plant individual presented had a low meiotic index (64.15% - data not shown), indicating that a series of irregularities may have occurred during meiosis, resulting in gamete imbalance. The same plant individual also had the lowest

percentage of pollen viability (82.3% - data not shown). As pollen viability is directly related to gamete formation during meiosis (Diegues et al. 2015), it is expected that a plant with a low meiotic index will also have a lower pollen grain viability.

In addition, in relation to the meiotic index, the values of the other individuals analyzed were on average greater than 90%. (Table 2). According to Love (1949), plants with a meiotic index of more than 90% are considered to be cytologically stable and can therefore be included in breeding programs and used for species preservation.

Despite the simplicity of the parameter, the meiotic index is a commonly used indicator of regularity in studies on the meiotic behavior of plants (Love 1949). Consequently, this index is also widely used to identify the best genotypes for inclusion in breeding and conservation programs, particularly with regard to native species, which have been increasingly addressed by specific studies in the last two decades.

The high meiotic indices found here, indicating the regularity in the meiotic behavior of *A. integerrima*, corroborate the statement of Füller et al. (2015) that high-frequency meiotic irregularities in natural populations are not a common phenomenon. This was also observed in studies with natural populations of *Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntze (Poaceae) (Füller et al. 2015), *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) (Fachinetto et al. 2008), *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) (Auler et al. 2006), and *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae) (Guerra et al. 2016), which are also native species of the South-Brazilian flora.

Pollen viability was analyzed in 44 plant individuals of four *A. integerrima* populations. The mean value of pollen viability was used as the carmine propionic dye was of 96.1 and with the Alexander staining was of 96.5 (Table 2). The statistical analysis showed no significant difference when comparing pollen viability between populations and between dyes (p-value for populations: 0.644; p-value for dyes: 0.378). However, a significant difference (p-value: <0.001) was observed among individuals within the populations, which indicates that the species may present a reasonable genetic variability for the characteristic pollen viability under the conditions of this study. This difference can also be explained by environmental factors such as temperature, humidity and pollen stage (Kelly et al. 2002), since the samplings were carried out on days with different climatic conditions.

Information on pollen viability and morphology are scarce for both the genus *Angelonia* and the family Plantaginaceae. Thus, our results constitute important information for the characterization of this taxon. The pollen grains of *A. integerrima* are predominantly rounded, with a mean polar axis (P) length between 18.33 and 20.86  $\mu\text{m}$  and equatorial axis (E) between 18.67 and 20.86  $\mu\text{m}$ . Compared to the pollen grains of other herbaceous species, such as *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) (diploid series) (Tacuatiá et al. 2012), with an equatorial axis length of grains between 29.71 and 36.35  $\mu\text{m}$  and polar axis between 25.19 and 30.34  $\mu\text{m}$ , the *A. integerrima* pollen grains are considered small.

The pollen viability was tested with two dyes, propionic carmine and Alexander staining, since some authors claimed that their efficiency is different, for staining the pollen grains differently (Auler et al. 2006, Coelho et al. 2012, Hister and Tedesco 2016). While propionic carmine reddens viable grains and leaves unviable grains unstained (Figure 2e), the Alexander staining, which contains the dyes fuchsin and malachite green, produces a differential staining between viable and unviable pollen grains. The cellulose in the pollen cell wall reacts with malachite green to produce a blue-green color, while the protoplasm reacts with acid fuchsin to produce a purple color (Alexander 1980). Thus, as unviable grains have no protoplasm, they have a blue-green color, while viable grains have a blue-green cellulose wall and purple protoplasm (Figure 2f).

Nevertheless, the means of pollen viability, determined with propionic carmine and Alexander staining, were not significantly different in this study (Table 2), indicating that both are efficient to estimate the viability of *A. integerrima* pollen grains.

In a study with *Citrus* (Rutaceae) species, Moreira and Gurgel (1940) defined that pollen viability above 70% can be considered high. Based on this definition, high pollen viability was detected in all plants analyzed of both populations. Parallel to the meiotic indices found, a high percentage of viable pollen grains is expected in view of the high percentage of normal tetrads, which are a direct reflection of a regular meiotic process (Corrêa et al. 2005), as pointed out in this study. If the process of megasporogenesis also occurs regularly, the seed production of these plants will be problem-free and the viability good, recommending their use in breeding programs.

In addition, it is emphasized that several authors, such as Krycki et al. (2016), Costa et al. (2018), Fachinetto et al. (2018), Tolomeotti et al. (2018) and Silva et al. (2018), have carried out studies involving native species of economic importance, such as the present study.

## CONCLUSION

The somatic chromosome number of all plant individuals of the four analyzed populations of *A. integerrima* is  $2n = 20$ . The meiotic index is superior to 90% in most of the analyzed plant individuals, whereas pollen viability exceeded 80% for all plant individuals. These data suggest a regular microsporogenesis process of the analyzed plant individuals.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for financial support.

## REFERENCES

- Alexander MP (1980) A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology** **55**: 13-18.
- Auler NMF, Battistin A and Reis MS (2006) Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** **8**: 55-63.
- Castro B, Biondo E, Schifino-Wittmann MT and Miotto STS (2006) Estudos cromossômicos em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) do Sul do Brasil: confirmação de contagens e detecção de variabilidade intra-específica em *Senna occidentalis* (L.). **Revista Científica Rural** **11**: 130-134.
- Chandran R and Bhavanandan KV (1983) IOPB chromosome numbers reports LXXIX. **Taxon** **32**: 1-320.
- Coelho APD, Morais KP, Laughinghouse IV HD, Giacomini SJ and Tedesco SB (2012) Pollen grain viability in accessions of *Crotalaria juncea* L. (FABACEAE). **Agrociencia** **46**: 481-487.
- Corrêa MGS, Viegas J, Silva JB, Avila PFV, Busato GR and Lemes JS (2005) Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. **Acta Botanica Brasílica** **19**: 295-303.
- Costa AM, Motoike SY, Corrêa TR, Silva TC, Coser SM, Resende, MDV and Teófilo RF (2018) Genetic parameters and selection of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) accessions: an alternative crop for biofuels. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **18**: 259-266.
- Cruz ND, Boaventura YMS, Conagin CHTM, Dutilh JHA, Forni-Martins ER, Medina DM, Mendes AJT, Pierozzi NI and Pinto-Maglio CAF (1993) **Citogenética vegetal**: cinquenta e três anos de pesquisa da seção de citologia do Instituto Agrônomo. IAC, Campinas, 60p.
- Diegues IP, Junior PCD, Ribeiro NVS, Reis MVM and Abboud ACS (2015) Comportamento meiótico e viabilidade polínica na espécie *Jatropha curcas* L. **Revista Ciências Agrárias** **36**: 141-150.
- Fachinetto JM, Laughinghouse IV MHD, Silva ACF and Tedesco SB (2008) Variability of the chromosomal number and meiotic behavior in populations of *Bidens pilosa* from southern Brazil. **Caryologia** **61**: 164-169.
- Fachinetto JM, Dall'Agnol M, Schifino-Wittmann MT, Simioni C and Ávila MR (2018) New wild diploids in *Paspalum notatum* Flüggé (Poaceae): potential accessions for use in breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **18**: 432-436.
- Füller TN, Guerra D, Schifino-Wittmann MT, Tessele CB, Bergman II and Neto JFB (2015) Genetic and cytogenetic structure of wild lemon grass (*Elionurus muticus*) populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **15**: 272-277.

- Guerra MS (1990) A situação da citotaxonomia de angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. **Acta Botanica Brasilica** **4**: 75-86.
- Guerra M and Souza MJ (2002) **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. FUNPEC, Ribeirão Preto, 131p.
- Guerra D, Souza PVD, Schwarz SF, Schifino-Wittmann MT, Werlang CA and Veit PA (2016) Genetic and cytological diversity in cherry tree accessions (*Eugenia involucrata* DC) in Rio Grande do Sul. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **16**: 219-225.
- Heiden G, Barbieri RL and Stumpf ERT (2006) Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** **12**: 2-7.
- Heiden G, Barbieri RL, Stumpf ERT and Grolli PR (2007) Uso de plantas arbóreas e arbustivas nativas do Rio Grande do Sul como alternativa a ornamentais exóticas. **Revista Brasileira de Agroecologia** **2**: 851-853.
- Heslop-Harrison JS (2000) RNA, genes, genomes and chromosomes: repetitive DNA sequences in plants. **Chromosome Today** **13**: 45-57.
- Hister CAL and Tedesco SB (2016) Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** **18**: 135-141.
- Kelly JK, Rasch A and Kalisz S (2002) A method to estimate pollen viability from pollen size variation. **American Journal of Botany** **89**: 1021- 1023.
- Krycki KC, Simioni C and Dall'Agnol M (2016) Cytoembryological evaluation, meiotic behavior and pollen viability of *Paspalum notatum* tetraploidized plants. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **16**: 282-288.
- Love EM (1949) La citologia como ayuda practica al mejoramiento de los cereales. **Revista Argentina Agronomia** **16**: 1-13.
- Molero J, Daviña JR, Honfi AI, Franco D and Rovira A (2006) Chromosome studies on plants from Paraguay II. **Candollea** **61**: 373-392.
- Moreira S and Gurgel JTA (1940) Exame e contagem de pólen. In **Relatório da seção de citricultura**. IAC, Campinas, p. 53-62.
- Oliveira Junior CJF, Gonçalves FS, Couto F and Matajs L (2013) Potencial das espécies nativas na produção de plantas ornamentais e paisagismo agroecológico. **Revista Brasileira de Agroecologia** **8**: 190-200.
- Pessoa ML (Org.) (2017) **Atlas FEE: Clima do Rio Grande do Sul**. Available at: < <http://atlas.fee.tche.br/rio-grande-do-sul/socioambiental/clima/> >. Accessed on January 8, 2018.
- Plaschil S and Olbricht K (2008) Histogenetic variation in flowers of *Angelonia* Humb. et Bonpl. **Journal of Applied Botany and Food Quality** **82**: 41-46.
- Raghavan TS and Srinivasan VK (1940) Studies in the Scrophulariaceae: The cytology of *Angelonia grandiflora* C. Merr. and some related genera. **Cytologia** **11**: 37-54.
- Silva DC, Blank AF, Nizio DAC, Sampaio TS, Nogueira PCL and Arrigoni-Blank MF (2018) Chemical diversity of essential oils from native populations of *Eplingiella fruticosa*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **18**: 205-214.
- Souza MM, Pereira TNS, Viana AP, Pereira MG and Amaral Junior AT (2004) Flower receptivity and fruit characteristics associated to time of pollination in yellow passion fruit. **Scientia Horticulturae** **1**: 373-385.
- Souza VC and Giuliotti AM (2009) Levantamento das espécies de SCROPHULARIACEAE sensu lato nativas do Brasil. **Pesquisas – série Botânica** **60**: 7-288.
- Stumpf ERT, Barbieri RL and Heiden G (2009) **Cores e formas no bioma pampa: plantas ornamentais nativas**. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 276 p.
- Subramanian D and R Pondmudi (1987) Cytotaxonomical studies of south Indian Scrophulariaceae. **Cytologia** **52**: 529-541.
- Tacuatiá LO, Souza-Chies TT, Flores AM, Eggers L, Siljak-Yakovlev S and Kaltchuk-Santos E (2012) Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** **69**: 350-364.
- Tolomeotti KRB, Felippi M and Donazzolo J (2018) Cytogenetic characterization of *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **18**: 65-71.
- Valls JFM (2007) Caracterização de recursos genéticos vegetais. In Nass LL (ed) **Recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, p. 281-305.



## **4 ARTIGO 2**

**Caracterização citogenética de *Campomanesia aurea* O. Berg (Myrtaceae)\***

\*Artigo formatado conforme as normas da revista Bragantia.

## Caracterização citogenética de *Campomanesia aurea* O. Berg (Myrtaceae)

**RESUMO:** *Campomanesia aurea* O. Berg, conhecida popularmente como guabirobinha-do-campo, pertence à família Myrtaceae. Apresenta características morfológicas que apontam para o seu uso como planta ornamental, além de produzir frutos comestíveis com elevado conteúdo de vitamina C. Apesar disso, ainda é considerada uma espécie não domesticada, de forma que estudos citogenéticos aliados a outros tipos de caracterização podem potencializar a sua utilização a partir de um processo de domesticação e melhoramento. O objetivo deste trabalho foi realizar avaliações citogenéticas a partir de botões florais e frutos de indivíduos coletados em quatro populações naturais de *C. aurea* ocorrentes no estado do Rio Grande do Sul - Brasil. Foram determinados o número cromossômico, índice meiótico, viabilidade polínica e número de anteras por flor nos indivíduos amostrados. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de comparação de médias de Dunn a 5%. O número cromossômico foi determinado pela primeira vez para a espécie, sendo  $2n = 22$  cromossomos para todos os indivíduos avaliados em três das quatro populações. O índice meiótico, com valor médio de 93,6%, e o número de anteras por flor, com valor médio de 142,2, não diferem entre os indivíduos avaliados nas quatro populações. Quanto à estimativa da viabilidade polínica, há diferença significativa entre as populações amostradas, com variação de 83,4% a 98,9% de grãos de pólen considerados viáveis. Conclui-se que as populações de *C. aurea* avaliadas são diploides com  $2n = 22$  cromossomos, apresentam regularidade meiótica e alta viabilidade polínica.

**Palavras-chave:** guabirobinha-do-campo, germoplasma nativo, potencial ornamental, cromossomos, pólen.

**ABSTRACT:** *Campomanesia aurea* O. Berg, popularly known as *guabirobinha-do-campo*, belongs to the Myrtaceae family. It has morphological characteristics that point to its use as an ornamental plant, besides producing edible fruits with high vitamin C content. Nevertheless, it is still considered an undomesticated species, so that cytogenetic studies, combined with other types of characterization, may enhance their use from a process of domestication and improvement. The objective of this work was to perform cytogenetic evaluations from flower buds and fruits of individuals collected in four natural populations of *C. aurea* occurring in the state of Rio Grande do Sul - Brazil. Chromosome number, meiotic index, pollen viability and number of anthers per flower were determined. Data were analyzed by the nonparametric Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn mean comparison method at 5%. The chromosome number was first determined for the species, with  $2n = 22$  chromosomes for all individuals evaluated in three of the four populations. The meiotic index, with an average value of 93.6%, and the number of anthers per flower, with an average value of 142.2, do not differ among the individuals evaluated in the four populations. Regarding the estimate of pollen viability, there is a significant difference between the sampled populations, ranging from 83.4% to 98.9% of pollen grains considered viable. It is concluded that the populations of *C. aurea* evaluated are diploids with  $2n = 22$  chromosomes, present meiotic regularity and high pollen viability.

**Key-words:** *guabirobinha-do-campo*, native germplasm, ornamental potential, chromosomes, pollen.

## INTRODUÇÃO

A espécie *Campomanesia aurea* O. Berg., conhecida popularmente como guabirobinha-do-campo e araçá-rasteiro, pertence à família Myrtaceae, podendo ser encontrada em campos com afloramentos rochosos na Região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), Argentina, Paraguai e Uruguai (Sobral et al. 2015). É caracterizada como um subarbusto de pequeno porte, com flores de pétalas brancas e numerosos estames, além de frutos globosos, comestíveis e de coloração verde a amarelada (Lorenzi et al. 2006; Stumpf et al. 2009).

*Campomanesia aurea* apresenta atributos morfológicos, como o pequeno porte e a arquitetura delicada, bem como a floração intensa e aromática, que apontam para o seu potencial na ornamentação de jardins ou cultivo em vasos (Stumpf et al. 2009). Além disso, os frutos possuem elevado conteúdo de vitamina C (Emer et al. 2018a), o que acaba agregando um valor nutracêutico à espécie.

O Brasil possui uma flora altamente rica em relação a muitas espécies com características ornamentais, porém, para a maioria delas, não se conhecem sequer os aspectos básicos, principalmente aqueles relacionados à forma de reprodução destas na natureza. Dessa forma, informações sobre número e comportamento de cromossomos, bem como de aspectos relacionados ao comportamento meiótico e viabilidade polínica, contribuem tanto para aumentar o conhecimento sobre a flora brasileira, quanto para propiciar a base para o melhoramento genético, visando à obtenção de material comercialmente mais interessante (Cruz et al. 1993).

Por se tratar de uma espécie nativa não domesticada ainda pouco investigada, são necessários estudos básicos, como os que informem a respeito de aspectos sobre a sua morfologia, propagação e caracterização citogenética e genética. Estudos

relacionados às características físico-químicas de frutos e germinação de sementes, bem como métodos de propagação vegetativa de *C. aurea* foram realizados recentemente (Emer et al. 2018a, 2018b, 2019), demonstrando o interesse atual na espécie para inserção no mercado da floricultura.

No geral, a família Myrtaceae apresenta pequena variação no número cromossômico, sendo o número básico relatado na literatura de  $x = 11$  (aqui englobando o gênero *Campomanesia* Ruiz e Pav.) ou  $x = 12$  (Atchinson 1947). Porém, não há descrição acerca do número cromossômico e aspectos da biologia reprodutiva masculina de *C. aurea*, de forma que qualquer informação gerada irá contribuir na ampliação do conhecimento sobre a espécie, podendo ser utilizada para subsidiar futuros trabalhos.

O presente estudo teve por objetivo caracterizar citogeneticamente a espécie *C. aurea* quanto ao número cromossômico, índice meiótico, viabilidade polínica e número de anteras por flor em indivíduos coletados em diferentes populações do estado do Rio Grande do Sul - Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta de material**

O material vegetal, compreendido por botões florais e frutos de *C. aurea*, foi coletado de indivíduos amostrados de populações naturais nos anos de 2016 e 2017 em localidades do estado do Rio Grande do Sul (RS) – Brasil. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, pertence ao grupo climático Cfa, descrito como do tipo subtropical úmido (Pessoa 2017).

As populações avaliadas com as respectivas coordenadas geográficas e o número de indivíduos por análise são descritas na Tabela 1. O material coletado foi catalogado no Herbário ICN do Instituto de Biociências/UFRGS (Morro do Osso - ICN 200791, Estação experimental - ICN 200793, Barão do Triunfo - ICN 200790 e Parque Saint'Hilaire - ICN 200792). O projeto encontra-se registrado no SisGen sob número A685CD8.

Não foi possível determinar o número cromossômico dos indivíduos da população Estação Experimental Agronômica (EEA), do município de Eldorado de Sul, pois a área que os mesmos ocorriam foi roçada antes da formação dos frutos. Por isso, a determinação cromossômica foi obtida a partir dos indivíduos coletados nas outras três populações.

### **Número cromossômico**

Para determinação do número cromossômico, os frutos coletados foram despolidos, sendo as sementes retiradas, lavadas em água corrente com auxílio de peneira para a retirada da mucilagem e, por fim, colocadas sobre superfície de papel filtro para secagem em temperatura ambiente, na sombra, por cerca de 48 horas.

As sementes foram desinfestadas com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos, sendo posteriormente lavadas com água deionizada autoclavada. Após as mesmas foram acomodadas em caixas do tipo gerbox, com papel mata-borrão umedecido com água autoclavada e levadas para sala de crescimento com temperatura de  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Quando as radículas estavam com aproximadamente 1 cm de comprimento, estas foram coletadas e procedeu-se o pré-tratamento utilizando imersão em substância antimetabólica 8-hidroxiquinolina 0,002M por um período de 24 horas em geladeira

( $4\pm 2^\circ\text{C}$ ). Após, foi realizada a fixação do material em etanol absoluto:ácido acético glacial (3:1) por 24 horas em temperatura ambiente, seguida do armazenamento em álcool 70% sob refrigeração até a utilização.

Para o preparo das lâminas, primeiramente as radículas foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N à  $60^\circ\text{C}$  em banho-maria por 15-20 minutos e coradas com Feulgen por cerca de 5 horas. Posteriormente, as pontas das radículas (região meristemática) foram maceradas em carmim propiônico 2%, cobertas por lamínulas e seladas. Para análise, percorreu-se toda a lâmina a procura de células em metáfases mitóticas com bom espalhamento dos cromossomos e grau de contração, sendo analisadas cerca de 10 células por indivíduo, totalizando 260 metáfases analisadas.

#### **Determinação do índice meiótico, estimativa da viabilidade polínica e número de anteras por botão floral**

Os botões florais utilizados para as análises da microsporogênese (em estágio inicial de desenvolvimento) e viabilidade polínica (pré-antese) foram coletados e imediatamente fixados em etanol absoluto:ácido acético glacial (3:1), onde permaneceram por 24 horas à temperatura ambiente. Então, os botões foram transferidos para frascos de vidro contendo etanol 70%, ficando armazenados sob refrigeração até sua utilização. Para o preparo das lâminas do índice meiótico, foi utilizada a técnica de esmagamento das anteras (Guerra e Souza 2002), seguida de coloração com carmim propiônico 2%. Foram avaliadas as células em fase final do processo de microsporogênese, sendo consideradas normais as células com quatro micrósporos (tétrades) e anormais as que diferiram desse número (díades, tríades e políades) ou tétrades com micronúcleos ou micrócitos. O índice meiótico (IM) foi calculado a partir da fórmula determinada por Love (1949), onde se divide o número de

tétrades normais (quatro células) pelo número total de tétrades observado multiplicado por 100.

Para estimar a viabilidade polínica, quando se utilizou o carmim propiônico, foram considerados viáveis os grãos de pólen corados em vermelho, enquanto os transparentes ou não corados foram tidos como inviáveis. Já para o reativo de Alexander, os grãos de pólen de coloração púrpura foram considerados viáveis e os de coloração azul-esverdeado, inviáveis. A viabilidade polínica foi estimada através da porcentagem de grãos viáveis, dividindo-se o número de grãos corados (os de coloração púrpura, no caso do reativo de Alexander) pelo total de grãos contados multiplicados por 100. Para cada corante foram utilizadas três repetições (três lâminas), sendo contados 500 grãos de pólen por lâmina, totalizando 1500 grãos de pólen por corante e 3000 por indivíduo. Também foram medidos 10 grãos de pólen corados com carmim propiônico por população, escolhidos ao acaso, utilizando o ImageJ. Nestes, mediu-se o diâmetro polar (P) e o diâmetro equatorial (E), além de se determinar a razão P/E (razão do diâmetro polar pelo diâmetro equatorial).

Para contagem do número de anteras, três botões florais em pré-antese de cada indivíduo foram selecionados aleatoriamente, sendo as pétalas e sépalas removidas com o auxílio de agulha e bisturi, sob uma lupa, e as anteras separadas e depois contadas.

### **Análise estatística**

Os dados não atenderam aos pressupostos de normalidade, mesmo após transformações, sendo então analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de comparação de médias de Dunn ( $p \leq 0,05$ ). As análises foram conduzidas no software Sigma Plot 11.0.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número cromossômico foi determinado pela primeira vez para a espécie *Campomanesia aurea*, sendo  $2n = 22$  cromossomos para todos os indivíduos avaliados nas três populações (Figura 1). Esse número também foi referido para outras espécies do gênero *Campomanesia*, como *C. guaviroba*, *C. phaea*, *C. pubescens*, *C. guazumifolia*, *C. laurifolia* e *C. schlechtendaliana* (Forni-Martins & Martins, 2000, Costa & Forni-Martins, 2006, Costa et al., 2008), indicando que o mesmo é constante para esse grupo taxonômico. O gênero *Campomanesia* pertence à subfamília Myrtoideae, à qual se diferencia da subfamília Psiloxylloideae ( $x = 12$ ) pelo número básico de cromossomos de  $x = 11$  (Wilson et al. 2005).

Apesar de ser um parâmetro simples, o conhecimento do número de cromossomos é uma ferramenta de fundamental importância no melhoramento de plantas, visto que é imprescindível na elaboração de estratégias de hibridização para a produção de cultivares ou híbridos (Trevisani et al. 2018). No caso de *C. aurea*, o cruzamento com outras espécies do mesmo gênero, sabidamente compatíveis quanto ao número cromossômico, poderia propiciar a incorporação de características úteis que aumentem a sua possibilidade de uso na horticultura, como por exemplo, cores mais atrativas, florescimento uniforme, frutos maiores e porte de planta .

O índice meiótico (IM) foi avaliado em 23 indivíduos das quatro populações, não sendo verificada diferença significativa entre estas, com o valor médio encontrado de 93,6% (Tabela 2). Apesar desse alto valor, algumas irregularidades foram observadas durante o processo de microsporogênese, como díades, tríades e tétrades com micronúcleos (Figura 2a, 2b e 2c, respectivamente). Mesmo assim, o número de produtos normais da meiose (tétrades – Figura 2d) se manteve próximo (população

Morro do Osso – 86,7%) ou superior a 90% (demais populações), o que, segundo Love (1951), é um indicativo de que o processo meiótico deve ocorrer regularmente nessas populações.

O índice meiótico tem sido utilizado por diversos autores na avaliação do comportamento meiótico quando se trabalha com um grande número de plantas. Franzon e Raseira (2004) determinaram o índice meiótico de cinco espécies da família Myrtaceae, incluindo uma do gênero *Campomanesia* (*Eugenia involucrata* DC., *E. uniflora* L., *E. pyriformis* Camb., *Acca sellowiana* (Berg.) Burr. e *Campomanesia xanthocarpa* Berg.). Nesse estudo, as médias para o IM variaram de 84,8 a 96,3%, sendo *A. sellowiana* considerada a mais estável citologicamente, pois apresentou o IM superior a 90%.

Com relação à estimativa da viabilidade polínica, as médias, dentro de cada população, não diferiram entre os corantes (p-valor: 0,926) (dados não apresentados), demonstrando que ambos são eficientes para estimar a viabilidade em *C. aurea*. Porém, quando se comparou as médias entre as populações, foi verificada uma diferença significativa entre os indivíduos da população Parque Saint-Hilaire (PSH), que apresentou a maior média (99,95%) (Tabela 2) e os da população do Morro do Osso (MO), que apresentou a menor média (83,4%) (Tabela 2). Essa diferença identificada entre as populações pode ser explicada pela variabilidade genética intrínseca a cada indivíduo analisado ou por fatores ambientais, como temperatura e umidade (Kelly et al. 2002).

Os grãos de pólen de *C. aurea* apresentam comprimento médio do eixo polar (P) de  $23 \pm 1,11$   $\mu\text{m}$  e do eixo equatorial (E) de  $22,7 \pm 1,28$   $\mu\text{m}$ , com razão P/E de 1,01, e contorno triangular quando observado em vista polar (Figura 2e e 2f). Dessa forma,

estes grãos são classificados como de tamanho pequeno e de formato prolato-esferoidal (Punt et al. 2007).

Fazendo um paralelo com os resultados de IM, percebe-se que o valor mais alto desse índice, apesar de não significativo, também foi encontrado para a população PSH. Esses dados corroboram com o exposto por Correa et al. (2005), de que uma alta porcentagem de grãos de pólen viáveis é resultado de um alto percentual de tétrades normais, as quais são reflexo direto de um processo meiótico regular.

Para a família Myrtaceae, poucos estudos utilizando métodos colorimétricos para estimar a viabilidade polínica são encontrados na literatura científica. Em um trabalho realizado por Guerra et al. (2016), a viabilidade polínica de 35 acessos de *Eugenia involucrata* DC. coletados no Rio Grande do Sul foi estimada utilizando-se o corante carmim propiônico. Não foi verificada diferença significativa entre os acessos, sendo 92,44% a média de viabilidade polínica constatada. Já para *Psidium cattleianum* Sabine, Hister e Tedesco (2016) observaram que os grãos de pólen corados com orceína acética apresentaram viabilidade alta, acima de 98,1%, e os 20 acessos avaliados não diferiram entre si, enquanto ao utilizar o reativo de Alexander as médias variaram de 43% a 97%, demonstrando variabilidade entre os acessos.

De uma forma geral, percebe-se que as populações analisadas a partir dos indivíduos amostrados apresentaram valores elevados tanto para o índice meiótico, quanto para a viabilidade polínica. Segundo Pozzobon et al. (2011), a estabilidade meiótica e a produção de gametas viáveis são aspectos que estão diretamente ligados à reprodução e manutenção das espécies vegetais por meio de sementes. Desse modo, a identificação de populações mais estáveis mediante análise citogenética auxilia na eventual utilização destas para a produção de sementes e futura comercialização.

Emer et al. (2018a), estudando o comportamento de sementes de *C. aurea* provenientes de acessos de duas das mesmas populações aqui estudadas (Barão do Triunfo e Morro do Osso), verificaram que estas apresentaram alta porcentagem de germinação (93%), com tempo médio de germinação de 20 dias, o que indica que a espécie não apresenta problemas quanto à propagação sexual.

Por último, o número de anteras por flor é uma informação que contribui no conhecimento da biologia reprodutiva masculina de uma espécie, além de ser um aspecto morfológico que pode inferir variabilidade entre populações e condições ambientais (Petri et al. 1996). No presente trabalho, não foi verificada diferença significativa entre o número médio de anteras por flor entre as populações, sendo o valor médio encontrado de 142,2 (Tabela 2). Um grande número de anteras por flor parece ser um dado frequente para as mirtáceas, visto que no gênero *Campomanesia* esse valor pode variar de 70 a 600 (Lima et al. 2011), enquanto para *Eugenia involucrata* o valor médio encontrado para essa variável foi de 161,85 (Guerra et al. 2016).

## CONCLUSÕES

Conclui-se que as populações de *C. aurea* avaliadas são diploides com  $2n = 22$  cromossomos, apresentam regularidade meiótica e alta viabilidade polínica.

## REFERÊNCIAS

Atchinson, E. (1947) Chromosome numbers in the Myrtaceae. American Journal of Botany, 34, 159-164. <https://doi.org/10.2307/2437370>

Corrêa, M. G. S., Viegas, J., Silva, J. B., Avila, P. F. V., Busato, G. R. and Lemes, J. S. (2005) Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. *Acta Botanica Brasilica*, 19, 295-303. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062005000200012>

Costa, I. R., Forni-Martins, E. R. (2006). Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pavon and *Psidium* L. (Juss.). *Caryologia*, 59, 7-13. <https://doi.org/10.1080/00087114.2006.10797891>

Costa, I. R., Dornelas, M. C. and Forni-Martins, E. R. (2008). Nuclear genome size variation in fleshy-fruited Neotropical Myrtaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 276, 209-217. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0088-x>

Cruz, N. D., Boaventura, Y. M. S., Conagin, C. H. T. M., Dutilh, J. H. A., Forni-Martins, E. R., Medina, D. M., Mendes, A. J. T., Pierozzi, N. I. and Pinto-Maglio, C. A. F. (1993). Citogenética vegetal: cinquenta e três anos de pesquisa da seção de citologia do Instituto Agrônomo. Campinas: IAC, Documentos, 27.

Emer, A. A., Winhelmann, M. C., Tedesco, M., Fior, C. S. and Schafer, G. (2018a). The physicochemical properties of fruits and seed germination of *Campomanesia aurea* O. Berg. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* (Online), 40, e35007. <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsci.v40i1.35007>

Emer, A. A., Fior, C. S. and Schafer, G. (2018b). Cutting from *Campomanesia aurea* O. Berg (Myrtaceae): The collection time of propagules and the effects of auxin. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 13, 1-7. <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v13i1a5494>

Emer, A. A., Lucchese, J. R., Fior, C. S. and Schafer, G. (2019). Viabilidade de sementes de *Campomanesia aurea* em diferentes temperaturas de armazenamento. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 39, 1-5. <http://dx.doi.org/10.4336/2019.pfb.39e201701475>

Franzon, R. C. and Raseira, M. C. B. (2004). Meiotic index in Myrtaceae native fruits trees from southern Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4, 344-349. <http://dx.doi.org/10.12702/1984-7033.v04n03a13>

Forni-Martins, E. R. and Martins F. R. (2000). Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 947-955. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572000000400040>

Guerra, M. (1988). Introdução à citogenética vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara, 142p.

Guerra, M. and Souza, M. J. (2002). Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 131p.

Guerra, D., Souza, P. V. D., Schwarz, S. F., Schifino-Wittmann, M. T., Werlang, C. A. and Veit, P. A. (2016). Genetic and cytological diversity in cherry tree accessions (*Eugenia involucrata* DC) in Rio Grande do Sul. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16, 219-225. <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332016v16n3a33>

Hister, C. A. L. and Tedesco, S. B. (2016). Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (Sabine) através de distintos métodos de coloração. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18, 135-141. [https://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_081](https://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_081)

Kelly, J. K., Rasch, A. and Kalisz, S. (2002). A method to estimate pollen viability from pollen size variation. *American Journal of Botany*, 89, 1021–1023. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.6.1021>

Lima, D.F., Goldenberg, R., Sobral, M. O gênero *Campomanesia* (Myrtaceae) no estado do Paraná, Brasil. 62(3): 683–693. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201162313>

Lorenzi, H., Bacher, L., Lacerda, M. and Sartori, S. (2006). *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 640p.

Love, R. M. (1949). La citologia como ayuda practica al mejoramiento de los cereales. *Revista Argentina Agronomia*, 16, 1-13.

Love, R. M. (1951). Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal*, Madison, 43, 72-76.

Pessoa, M.L. (Org.) (2017). Atlas FEE: Clima do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://atlas.fee.tche.br/rio-grande-do-sul/socioambiental/clima/>>

Petri, J. L., Palladini, L. A., Shuck, E., Ducroquet, J. P. H. J., Matos, C. S. and Pola, A. C. (1996). Dormência e indução da brotação de fruteiras de clima temperado. Florianópolis: EPAGRI, 110 p., Boletim Técnico, 75.

Pinto-Maglio, C. A. F. and Pierozzi, N. I. (2015). Caracterização Citogenética. *In: Veiga, R. F. A and Queiróz, M. A. Recursos Fitogenéticos - A base da Agricultura Sustentável no Brasil*, Viçosa: UFV, 1, 204-213.

Pozzobon, M. T., Souza, K. R. R., Carvalho, S. I. C. and Reifschneider, F. J. B. (2011). Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 29, 212-216. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362011000200013>

Punt, W., Hoen, P. P., Blackmore, S., Nilsson, S. and Le Thomas, A. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 143, 1-81. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2006.06.008>

Sobral, M., Proença, C., Souza, M., Mazine, F. and Lucas, E. (2015). Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10311>>.

Stumpf, E. R. T., Barbieri, R. L. and Heiden, G. (Org.). (2009). *Cores e Formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 276 p.

Trevisani, N., Melo, R. C., Pierre, P. M. O., Colli, M. P., Coimbra, J. L. M. and Guidolin, A. F. (2018). Ploidy and DNA content of cape gooseberry populations grown in southern Brazil. *Caryologia*, 71, 1-6. <https://doi.org/10.1080/00087114.2018.1494440>

Wilson, P. G., O'Brien, M. M., Gadek, P. A. and Quinn, C. J. (2001). Myrtaceae revisited: A reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany*, 88, 2013-2025. <http://dx.doi.org/10.2307/3558428>

**Tabela 1.** Localização geográfica e número de indivíduos analisados nas quatro populações de *Campomanesia aurea* O. Berg. Porto Alegre, RS, 2019.

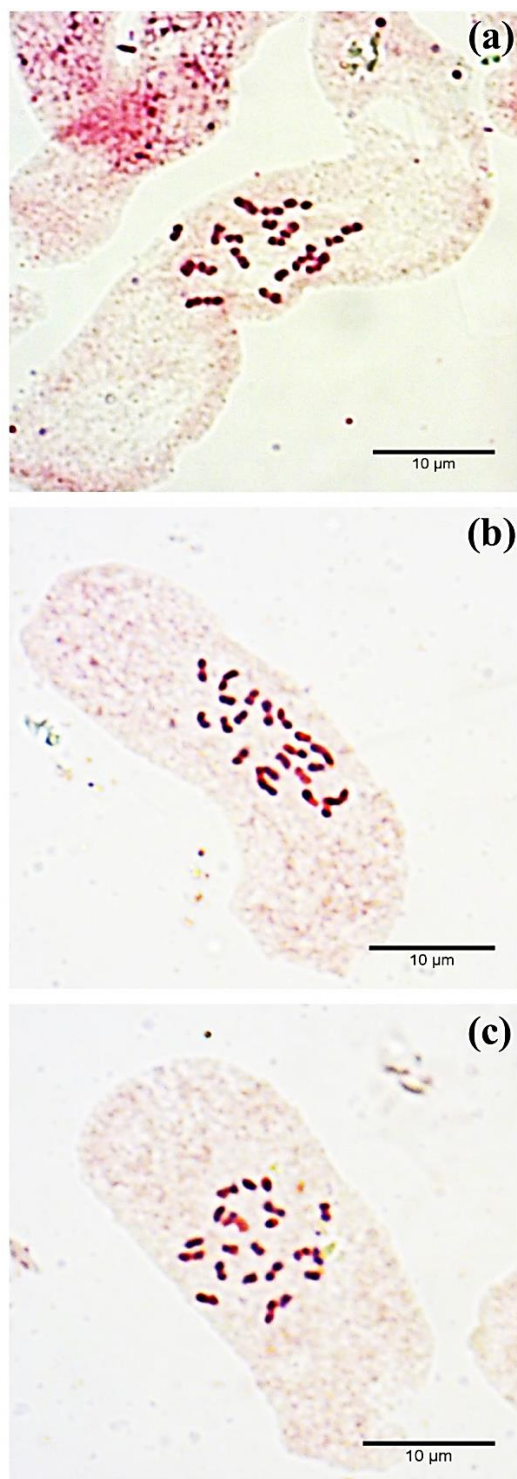
População	Localidade e coordenadas geográficas	Número de indivíduos em cada análise		
		Número Cromossômico	Índice Meiótico	Número de anteras/ Viabilidade polínica
<b>Morro do Osso</b>	Porto Alegre (30°07'S e 51°14'W)	16	10	16
<b>Estação Experimental</b>	Eldorado do Sul (39°29'S e 51°06'W)	-	02	02
<b>Barão do Triunfo</b>	Barão do Triunfo (30°18'S e 51°50'W)	05	09	11
<b>Parque Saint'Hilaire</b>	Viamão (30°5'S e 51°5'W)	05	02	05



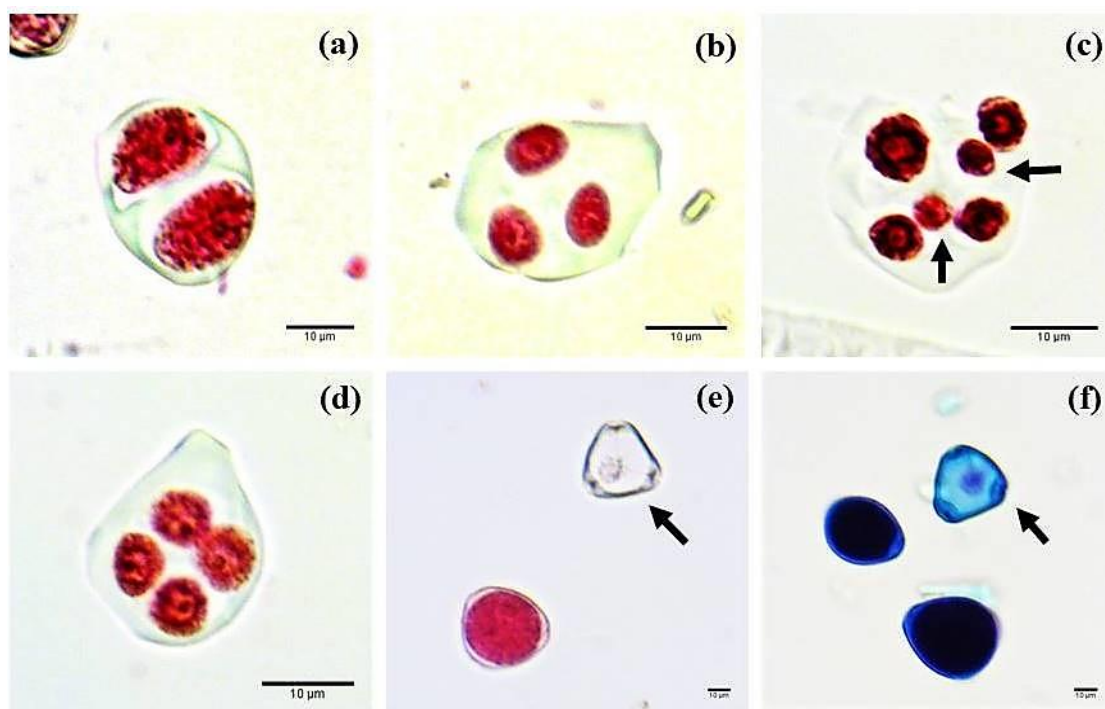
**Tabela 2.** Número cromossômico (2n), produtos finais da microsporogênese (%), índice meiótico, viabilidade polínica e número médio de anteras por flor de indivíduos de quatro populações de *Campomanesia aurea* O. Berg. Porto Alegre, RS, 2019.

Pop.	Número cromos. (2n)	Produtos finais da microsporogênese (%)		Índice meiótico (IM%)	Viabilidade polínica (%)		Número médio de anteras
		Reg.	Irreg.		Carmim propiônico	Reativo de Alexander	
PSH	22	96.2	3.8	96.1 <sup>ns</sup>	99.0 a	98.9 a	164.5 <sup>ns</sup>
EEA	-	95.8	4.2	95.4	97.4 ab	96.1 ab	134.0
BT	22	97.9	2.1	96.2	87.5 ab	87.5 ab	137.2
MO	22	91.4	8.6	86.7	83.1 b	83.8 b	133.2
<b>p-valor</b>	-	-	-	0.439	0.003	0.018	0.093
<b>Média</b>	-	95.3	4.7	93.6	-	-	142.2

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunn a 5% de probabilidade de erro.



**Figura 1.** Metáfases mitóticas com  $2n = 22$  cromossomos de indivíduos de três populações de *Campomanesia aurea* O. Berg.



**Figura 2.** Produtos finais da microsporogênese e grãos de pólen de indivíduos de quatro populações de *Campomanesia aurea* O. Berg. a) díade; b) tríade; c) tétrade com micronúcleos (setas); d) tétrade; e) grãos de pólen corados com carmim propiônico: viável (em vermelho) e inviável (seta); f) grãos de pólen corados com reativo de Alexander: viáveis (roxo escuro) e inviável (seta). Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

## **5 ARTIGO 3**

### **Caracterização citogenética de *Sesbania punicea* (Cav.) Bent (Fabaceae)\***

\*Artigo formatado conforme as normas da revista Caryologia.

## Caracterização citogenética de *Sesbania punicea* (Cav.) Bent (Fabaceae)

**Resumo:** *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. é uma espécie nativa da América do Sul encontrada comumente em campos arenosos e vegetação de restinga, que apresenta potencial ornamental devido ao seu porte equilibrado e inflorescências alaranjadas vistosas. O objetivo do presente trabalho foi determinar o número cromossômico gamético e somático, definir o comprimento total do complemento cromossômico, avaliar o índice meiótico e estimar a viabilidade e morfometria polínica de diferentes acessos de *Sesbania punicea* coletados no Rio Grande do Sul – Brasil. Para determinação do número cromossômico foram utilizadas pontas de raízes provenientes de sementes, enquanto para as demais análises utilizou-se botões florais. Os dados foram analisados por estatística descritiva, pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn ( $p \leq 0,05$ ). O número cromossômico somático determinado para todos os indivíduos analisados foi de  $2n = 12$ , confirmado pelo número gamético de  $n = 6$ , sendo o comprimento total do complemento cromossômico (CTC) igual a  $37,70 \mu\text{m}$  e o índice de assimetria cromossômica igual a  $0,37$ . O índice meiótico e a viabilidade polínica apresentaram valores elevados, ambos com média de  $98,8 \%$ , não diferindo estatisticamente entre os acessos. Os grãos de pólen apresentaram comprimento médio do eixo polar (P) de  $41,17 \mu\text{m}$  e do eixo equatorial (E) de  $42 \mu\text{m}$ , com razão P/E de  $0,98$ . Conclui-se que os acessos de *S. punicea* avaliados são diploides com  $2n = 12$ , apresentam estabilidade meiótica e alta formação de grãos de pólen viáveis, sendo estes grãos de tamanho médio e de formato oblato-esferoidal.

**Palavras-chave:** fedegoso-da-praia; espécie ornamental; número cromossômico; microsporogênese; grãos de pólen.

**Abstract:** *Sesbania punicea* (Cav.) Benth is a native species from South America commonly found in sandy fields and restinga vegetation, which presents ornamental potential due to its balanced size and showy orange inflorescences. The objective of the present work was to determine the gametic and somatic chromosome number, to define the total length of the chromosome complement, to evaluate the meiotic index and to estimate the viability and pollen

morphometry of different accessions of *Sesbania punicea* collected in Rio Grande do Sul - Brazil. To determine the chromosome number, root tips from seeds were used, while for the other analyzes, flower buds were used. Data were analyzed using descriptive statistics, the nonparametric Kruskal-Wallis test and Dunn's test ( $p \leq 0.05$ ). The somatic chromosome number determined for all analyzed individuals was  $2n = 12$ , confirmed by the gametic number of  $n = 6$ , and the total length of the chromosome complement (CTC) was  $37.70 \mu\text{m}$ . The meiotic index and pollen viability presented high values, both with an average of 98.8%, not differing statistically between accessions. The pollen grains had a mean length of the polar axis (P) of  $41.17 \mu\text{m}$  and the equatorial axis (E) of  $42 \mu\text{m}$ , with a P / E ratio of 0.98. It was concluded that the evaluated *S. punicea* accessions are diploid with  $2n = 12$ , have meiotic stability and high formation of viable pollen grains, these grains being medium in size and oblate-spheroidal in shape.

**Key-words:** *fedegoso-da-praia*; ornamental species; chromosome number; microsporogenesis; pollen grains.

## Introdução

A família Fabaceae tem distribuição cosmopolita, incluindo aproximadamente 650 gêneros e 19000 espécies. É considerada uma das principais famílias de Angiospermas, tanto do ponto de vista da diversidade, quanto do ponto de vista da importância econômica das espécies. Corresponde, no Brasil, a maior família em número de espécies (2700), distribuídas em cerca de 200 gêneros (Souza e Lorenzi 2012).

Dentre os gêneros nativos do Brasil destaca-se *Sesbania* Scop., para o qual são descritas cerca de 60 espécies, sendo encontradas 32 espécies na África, 10 na Austrália, cerca de 10-11 na Ásia tropical e oito na América (Monteiro 1984).

Representante deste gênero, *Sesbania punicea* (Cav.) Benth., conhecida popularmente fedegoso-da-praia, acácia-de-flores-vermelhas ou cambaí-vermelho, é um arbusto ou pequena árvore caducifólia que pode atingir de 2 a 4 m de altura. Suas folhas são compostas por numerosos folíolos e as flores, de cor vermelho-alaranjada, são reunidas densamente em racemos terminais pendentes, com comprimento de até 25 cm. Os frutos são do tipo vagem, tetralados, de coloração marrom quando maduros. Floresce entre novembro e fevereiro (Erb 1980; Stumpf et al. 2009).

É uma espécie comum em campos arenosos e vegetação de restinga, distribuindo-se naturalmente na América do Sul no leste da Argentina (margens do Rio da Prata), no Uruguai e nas regiões sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo), centro-oeste (Mato Grosso do Sul) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) do Brasil (Erb 1980; Iganci e Miotto 2016). Bastante tolerante a solos pobres, tem sua propagação frequentemente facilitada por perturbações na natureza, como incêndios e alterações no uso da terra (Ulibarri et al. 2002).

Diversos aspectos tornam *S. punicea* uma espécie ornamental desejável, como a arquitetura equilibrada, o aspecto das folhas e flores, a persistência dos frutos, além da enorme beleza das inflorescências, podendo ser utilizada na formação de agrupamentos ou cercas vivas e também como planta de destaque em composições paisagísticas (Stumpf et al., 2009). Em países como África do Sul, Estados Unidos e Portugal, já foi cultivada como planta ornamental, tendo *status* atual de espécie invasora (Csurhes e Edwards 1998; Woodward e Quinn 2011).

Por ser um recurso nativo com grande potencial de utilização no mercado da floricultura, surge a necessidade de ampliar as informações sobre essa espécie. Assim, a caracterização citogenética desponta como uma forma de enriquecimento do conhecimento acerca desse recurso, sendo uma ferramenta que complementa e auxilia

outros tipos de dados (taxonômicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares) (Pinto-Maglio e Pierozzi 2015).

No que diz respeito à caracterização citogenética do gênero *Sesbania*, incluindo *S. punicea*, são encontrados estudos relacionados à análise de cariótipo e padrões de diferenciação longitudinal dos cromossomos, que indicam o número básico  $x = 6$  para o gênero (Forni-Martins et al. 1994; Forni-Martins e Guerra 1999). Porém, um estudo mais abrangente, que englobe aspectos citogenéticos de diferentes indivíduos e locais de coleta, se faz necessário para fundamentar futuros trabalhos de domesticação e melhoramento de *S. punicea*.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi determinar o número cromossômico gamético e somático, definir o comprimento total do complemento cromossômico e o índice de assimetria intercromossômico, avaliar o índice meiótico e estimar a viabilidade e morfometria polínica de diferentes acessos de *Sesbania punicea* coletados no Rio Grande do Sul – Brasil.

## **Material e métodos**

O material vegetal analisado foi composto por botões florais e sementes de diferentes acessos de *Sesbania punicea*, coletados nos municípios de Barra do Ribeiro (dois acessos), Palmares do Sul e Barão do Triunfo, no estado do Rio Grande do Sul – Brasil. Em todos os locais de coleta a espécie era encontrada em áreas adjacentes à estrada (taludes), em solos que passam constantemente por algum tipo de perturbação, como revolvimento ou roçada. O material coletado foi catalogado no Herbário ICN do Instituto de Biociências/UFRGS (Barra do Ribeiro - ICN 200794, Tecnoplanta - ICN



200795, Barão do Triunfo - ICN 200796 e Palmares do Sul - ICN 200797). O projeto encontra-se registrado no SisGen sob número A685CD8.

Para determinação do número cromossômico foram utilizadas sementes de 24 indivíduos coletadas de frutos em fase de amadurecimento (coloração amarelada), de três acessos. Primeiramente, os frutos foram colocados em bancada para secar à sombra a temperatura ambiente. Após a secagem, as sementes foram retiradas das vagens e armazenadas em frascos de vidro em sala com temperatura controlada ( $25 \pm 3$  °C).

Para superar a possível dormência tegumentar, as sementes foram escarificadas com lixa número 120 por 60 segundos. Após, procedeu-se a desinfestação utilizando-se hipoclorito de sódio 2 % por 60 segundos, seguida de tríplice lavagem com água autoclavada. Então as sementes foram acomodadas em caixas do tipo gerbox, com papel mata-borrão umedecido com água autoclavada e levadas para sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 3$  °C e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Após a emissão das radículas (cerca de três dias), estas foram imersas em solução de 8-hidroxiquinolina 0,002 M por 22 h (em geladeira), seguidas de fixação em etanol absoluto:ácido acético glacial (3:1) por 24 h e armazenamento em álcool 70 % em refrigeração até a utilização.

Para o preparo das lâminas, as radículas foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N à 60 °C em banho-maria por 10 minutos e coradas com Feulgen por cerca de 3 h. Para a montagem das lâminas, as pontas das radículas (região meristemática) foram maceradas em carmim propiônico 2 % e cobertas por lamínulas.

Para determinação do número cromossômico, foram analisadas de 15 a 25 células em metáfases mitóticas por indivíduo com bom espalhamento dos cromossomos e grau de contração, utilizando-se microscópio da marca ZEISS, com câmera AxioCam ERc5s acoplada. Os cromossomos de 10 metáfases com bom espalhamento e mesmo

grau de contração foram medidos utilizando o software livre ImageJ (Image processing and analysis in Java) e o comprimento total do complemento cromossômico (CTC) foi calculado. A partir destas medidas, calculou-se o índice de assimetria intercromossômica ( $A_2$ ), utilizando-se a fórmula proposta por Zarco (1986) onde:  $A_2$  é igual ao desvio padrão do tamanho cromossômico ( $s$ ) dividido pela média do comprimento cromossômico ( $\bar{X}$ ).

Para análise da microsporogênese, os botões florais foram fixados em etanol absoluto:ácido acético glacial (3:1) assim que coletados, onde permaneceram por 24 horas. Em seguida, foram armazenados em álcool 70% até o preparo das lâminas. Para observação das associações cromossômicas em diacinese, foram analisadas 10 células de três indivíduos por acesso. Além disso, foram analisadas as células em fase final do processo de formação dos gametas masculinos (tétrades) de 29 indivíduos de três acessos, que permitiram a obtenção do índice meiótico (IM). Esse índice foi determinado dividindo-se o número de tétrades normais (com quatro células) pelo número total de tétrades observado (díades, tríades, tétrades, políades, tétrades com micronúcleos ou micrócitos) multiplicado por 100 (Love 1949).

A estimativa da viabilidade polínica foi determinada utilizando-se botões florais maduros de 30 indivíduos de três acessos, sendo as lâminas preparadas pela metodologia de esmagamento das anteras. Para a coloração dos grãos de pólen, foi utilizado o corante carmim propiônico 2 %, sendo os grãos de pólen inteiramente corados considerados viáveis e os não corados, ou corados fracamente, inviáveis. Foram confeccionadas três lâminas por indivíduo, sendo contados 500 grãos por lâmina, totalizando 1500 por indivíduo e 45000 grãos ao final da análise. A viabilidade polínica foi estimada através da porcentagem de grãos viáveis, dividindo-se o número de grãos considerados viáveis pelo total de grãos contabilizados, multiplicados por 100.

Para as análises de morfometria polínica foram medidos 10 grãos de pólen corados por acesso, escolhidos ao acaso, utilizando o ImageJ. Mediu-se nos grãos de pólen o diâmetro polar (P) e o diâmetro equatorial (E), além de se determinar a razão P/E (razão do diâmetro polar pelo diâmetro equatorial).

Os dados de tamanho cromossômico e de morfometria polínica foram analisados por estatística descritiva no Excel 2013 (média e desvio padrão). Os dados de índice meiótico (IM) e viabilidade polínica, mesmo após as transformações, não atenderam à normalidade de variâncias e foram analisados pela estatística não paramétrica através do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de comparação de médias de Dunn ( $p \leq 0,05$ ), usando o software Sigma Plot 11.0.

## **Resultados e discussão**

Esse é o primeiro trabalho que envolve a caracterização citogenética de um grande número de indivíduos e acessos de *Sesbania punicea*. No presente estudo, o número cromossômico somático encontrado para os 24 indivíduos analisados é de  $2n = 12$  cromossomos (Figura 1(a), 1(b) e 1(c)). Esse mesmo número foi reportado para uma população de *S. punicea* do sudeste do Brasil (SP) e também para outras espécies do gênero, como *S. virgata*, *S. exasperata*, *S. sesban* e *S. tetraptera*, indicando o número básico  $x = 6$  para o gênero (Forni-Martins et al. 1994). Em outro estudo, o número cromossômico de  $2n = 12$  foi encontrado em *S. bispinosa* (Jacq.) W.F. Wight, *S. procumbens* Wight e Arn., *S. sesban* var. *bicolor* (Wight e Arn.) F.W. Andr. e *S. sesban* var. *sesban* Gillett e  $2n = 4x = 24$  para a espécie *S. grandiflora* (L.) Poir (Vijayakumar e Kuriachan 1995), assinalando que a poliploidia pode ocorrer neste gênero.

Com relação ao tamanho dos cromossomos de *S. punicea*, estes variam de  $1,68 \pm 0,21 \mu\text{m}$  a  $5,13 \pm 0,39 \mu\text{m}$ , com comprimento médio de  $3,40 \mu\text{m}$ , sendo o comprimento total do complemento cromossômico (CTC) igual a  $37,70 \mu\text{m}$ . Esses valores concordam com o que foi relatado por Forni-Martins et al. (1994) para *S. punicea*, onde foi encontrado o CTC de  $36,38 \mu\text{m}$ . Neste mesmo trabalho, foi realizada a montagem do cariótipo para esta espécie, sendo este composto por cinco pares de cromossomos metacêntricos (M) e um par de cromossomos submetacêntricos (SM).

Para o índice de assimetria intercromossômica, o valor obtido foi de  $A_2 = 0,37$ . Esse índice reflete a variação entre os comprimentos cromossômicos do complemento, podendo permitir, em alguns grupos taxonômicos vegetais, uma compreensão do sentido da evolução cariotípica (Barella e Karsburg 2007). Segundo Stebbins (1971), espécies mais primitivas apresentam um maior índice de assimetria cariotípica, enquanto espécies mais derivadas evolutivamente caracterizam-se por possuir um índice com resultado menor.

Dessa forma, informações sobre número, forma e tamanho dos cromossomos, bem como estudos moleculares mais detalhados acabam se tornando ferramentas importantes e auxiliares na identificação taxonômica (Stace 2000), principalmente na diferenciação de grupos taxonômicos muito próximos, além de elucidar, muitas vezes, os fundamentos citológicos da variabilidade dentro de uma família (Martinez 1976).

Dos 29 indivíduos analisados quanto à microsporogênese, em apenas nove deles foi possível visualizar células em diacinese com bom espalhamento dos cromossomos. Estes compartilharam a mesma contagem de cromossomos gaméticos de  $n = 6$ , confirmada pela presença visível de seis bivalentes (6II) em diacinese (Figura 1(d) e 1(e)), o que está diretamente ligado a regularidade posteriormente encontrada na

formação dos produtos pós-meióticos do presente trabalho, demonstrada através do índice meiótico (IM).

O índice meiótico é considerado um complemento para a análise da microsporogênese e um indicador de regularidade dos genótipos analisados, sendo que valores acima de 90 % caracterizam genótipos considerados meioticamente estáveis (Love 1949). No presente trabalho o IM dos 29 indivíduos apresentou valores altos, não diferindo estatisticamente entre os acessos, com média de 98,8 %. Dessa forma, pode-se inferir que os acessos analisados são estáveis meioticamente, produzindo, em sua maioria, tétrades regulares (Tabela 2 e Figura 1(f)), apesar de algumas irregularidades, em sua totalidade tríades (Tabela 2 e Figura 1(g)), terem sido observadas.

No tocante à viabilidade polínica, os valores encontrados nos 30 indivíduos analisados também foram altos e não diferiram significativamente entre os três acessos, com média de 98,8 %. O corante utilizado, carmim propiônico, permitiu diferenciar com precisão os grãos viáveis (corados - Figura 1(h)) dos inviáveis (não corados - Figura 1(i)). Porém, ressalta-se que a avaliação colorimétrica fornece apenas uma estimativa da viabilidade dos grãos de pólen, visto que pode superestimar essa análise, pois algumas vezes os grãos de pólen abortados fornecem coloração semelhante àquela de grãos viáveis (Munhoz et al. 2008).

Em estudos citogenéticos com espécies brasileiras da família Fabaceae, observa-se um comportamento semelhante ao encontrado em *S. punicea*. Em espécies de *Senna* Mill. estudadas por Resende et al. (2013), o IM apresentou valores superiores a 90 % nos genótipos das 11 espécies analisadas. Em 38 acessos coletados na região sul do Brasil de 17 espécies de *Adesmia* DC., Tedesco et al. (2002) observaram valores de IM e viabilidade polínica superiores a 90 %, indicando serem também os genótipos avaliados estáveis citologicamente. Já em espécies de *Leucaena* Benth. estudadas por

Boff e Schifino-Wittmann (2003), o IM também se manteve próximo ou superior a 90%, porém a viabilidade polínica variou de 54,2 a 87,3 %.

Os grãos de pólen de *S. punicea* apresentam comprimento médio do eixo polar (P) de  $41,17 \pm 1,26 \mu\text{m}$  e do eixo equatorial (E) de  $42,0 \pm 1,05 \mu\text{m}$ , com razão P/E de 0,98. Sendo assim, estes grãos são classificados como de tamanho médio e de formato oblato-esferoidal (Punt et al. 2007).

Segundo Bione et al. (2000), estudos com diferentes espécies vegetais tem demonstrado que o declínio na produção de sementes está correlacionado com irregularidades meióticas. Portanto, a identificação de genótipos e populações mais estáveis mediante análise citológica se tornam indispensáveis no caso da inclusão dessas espécies em programas de melhoramento genético e produção de sementes, ou mesmo na formação de coleções ativas de trabalhos de pré-melhoramento. No caso de *S. punicea*, o conhecimento destes aspectos é diretamente importante, visto que a espécie possui um apelo comercial devido ao seu potencial ornamental.

Conclui-se que os acessos de *S. punicea* avaliados são diploides com  $2n = 12$ , apresentam estabilidade meiótica e alta formação de grãos de pólen viáveis, sendo estes grãos de tamanho médio e de formato oblato-esferoidal.

## Referências

Barella APW, Karsburg IV. 2007. Caracterização morfológica dos cromossomos mitóticos de *Parkia pendula* (Willd.) Benth ex Walp. e *Dinizia excelsa* Ducke (Fabaceae, Mimosoideae). Rev. Cien. Agro-Amb. 5: 85-93.

Bione NCP, Pagliarini MS, Toledo JFF. 2000. Meiotic behavior of several Brazilian soybean varieties. Genet. Mol. Biol. 23:623-631.

Boff T, Schifino-Wittmann MT. 2003. Paleopolyploidy and segmental allopolyploidy in species of *Leucaena* Benth: evidence from meiotic behaviour analysis. Hereditas. 138:27-35.

Csurches S, Edwards R. 1998. Potential Environmental Weeds in Australia. Candidate Species for Preventative Control. National Weeds Program: Queensland Department of Natural Resources, Brisbane, Qld.

Erb HE. 1980. The natural enemies and distribution of *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. in Argentina. Proc. 3rd Nat. Weeds Conj. S.A. 205-210.

Forni-Martins ER, Franchi-Tanibata M, Lucena MAC. 1994. Karyotypes of species of *Sesbania* Scop. (Fabaceae). Cytologia. 59:479-482.

Forni-Martins ER, Guerra M. 1999. Longitudinal differentiation in chromosome of some *Sesbania* Scop. species (Fabaceae). Caryologia. 52:97-103.

Iganci JRV, Miotto STS. *Sesbania* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [Acesso em: junho de 2018]. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB101171>

Love EM. 1949. La citologia como ayuda practica al mejoramiento de los cereales. Rev. Argent. Agron. 16:1-13.

Martinez AP. 1976. Procedimentos para facilitar el estudio de cromossomas en materials vegetales difíciles. Cuadernos G. Biological 5:53-60.

Monteiro R. 1984. Taxonomic studies on Brazilian vegetables with forage potential: *Sesbania*, *Lupinus*. Tese (doutorado), Saint Andrews University, Saint Andrews (Scotland).

Munhoz M, Luz CFP, Meissner Filho PE, Barth OM, Reinert F. 2008. Viabilidade polínica de *Caryca papaya* L.: Uma comparação metodológica. Rev. Brasil. Bot. 31(2):209-214.

Pinto-Maglio CAF, Pierozzi NI. 2015. Caracterização Citogenética. In: Veiga RFA, Queiróz MA. Recursos Fitogenéticos - A base da Agricultura Sustentável no Brasil, Viçosa: UFV, 204-213.

Punt W, Hoen PP, Blackmore S, Nilsson S, Le Thomas A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. Review of Palaeobotany and Palynology. 143: 1-81.

Resende KFM, Davide LC, Torres GA. 2013. Chromosome number and meiosis in populations of *Senna* species (Caesalpinioideae - Fabaceae) from Southeast Brazil. Caryologia 66:1-5.

Souza VC, Lorenzi H. 2012. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas e nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3ª edição, Nova Odessa, São Paulo, Instituto Plantarum. 768p.

Stace CA. 2000. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. Taxon. 49:451-477.

Stebbins GL. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. London: Arnold. Uhl CH. 1978. Chromosomes of Mexican Sedum. II. Section Pachysedum. Rhodora 80: 491-512.

Stumpf ERT, Barbieri RL, Heiden G. 2009. Cores e Formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 276p.

Tedesco SB, Schiffino-Wittmann MT, Dall'agnol M. 2002. Meiotic behavior and pollen fertility in the seventeen Brazilian species of *Adesmia* DC. (Leguminosae). Caryologia. 55(4):341-347.

Ulibarri EA, Sosa EVG, Cialdella AM, Fortunato R, Bazzano D. 2002. Leguminosas Nativas y exóticas. Colección Biota Rioplatense. Volume VII, 180p.

Vijayakumar MG, Kuriachan PI. 1995. Karyomorphology of five races of *Sesbania* from South India. Caryologia. 48:329-334.

Woodward SL, Quinn JA. 2011. Encyclopedia of invasive species: from africanized honey bees to zebra mussels. Greenwood Press. 764p.



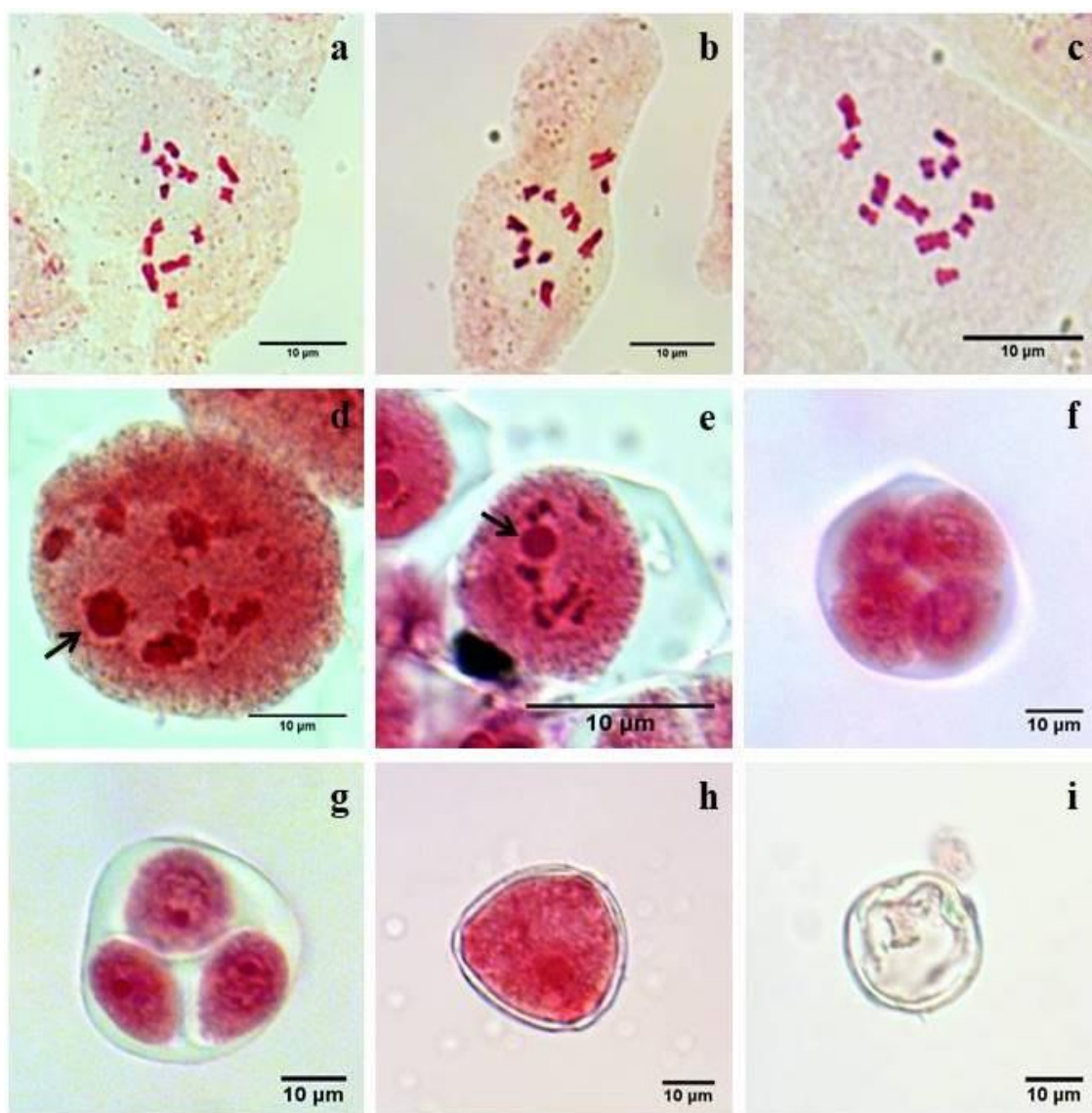
**Tabela 1.** Acessos de *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. com o respectivo número de indivíduos e de células analisados e número cromossômico somático determinado (2n). Porto Alegre, RS, 2019.

Acesso (código)	Número de indivíduos (número de células)	Número cromossômico (2n)
<b>Barão do Triunfo (BT)</b>	03 (60)	12
<b>Palmares do Sul (PS)</b>	14 (300)	12
<b>Barra do Ribeiro (BR)</b>	07 (160)	12

**Tabela 2.** Associações cromossômicas em diacinese, média dos produtos pós-meióticos, índice meiótico (IM) e viabilidade polínica (%) de acessos de *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. Porto Alegre, RS, 2019.

Acesso (código)	Diacinese	Produtos pós-meióticos		Índice meiótico	Viabilidade polínica (%)
		Irregulares (tríades)	Regulares (tétrades)		
<b>Barra do Ribeiro (BR)</b>	6 II	5,34	401,38	98,6 <sup>ns</sup>	98,9 <sup>ns</sup>
<b>Tecnoplanta (TP)</b>	6 II	16,5	372	95,7	98,4
<b>Palmares do Sul (PS)</b>	6 II	2,7	405,7	99,3	99,2

<sup>ns</sup>: Médias não diferem entre si pelo teste de Dunn ao nível de 5% de probabilidade de erro.



**Figura 1.** Caracterização citogenética de *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. (a)(b)(c) células em metáfase mitótica com  $2n = 12$  cromossomos; (d)(e) células meióticas em prófase I (diacinese) com seis bivalentes ( $6II$ ,  $n = 6$  cromossomos); setas indicam o nucléolo; (f) tétrede regular com quatro microsporócitos; (g) tríade irregular com três microsporócitos; (h) grão de pólen viável (corado); (i) grão de pólen inviável (não corado).

## **6 ARTIGO 4**

### **Germinação *in vitro* de grãos de pólen de três espécies nativas do bioma Pampa com potencial ornamental\***

\*Nota científica formatada conforme as normas da revista *Communicata Scientiae*.

## **Germinação *in vitro* de grãos de pólen de três espécies nativas do bioma Pampa com potencial ornamental**

**Resumo:** O objetivo do presente trabalho foi verificar a germinação *in vitro* dos grãos de pólen de populações de *Angelonia integerrima* L., *Campomanesia aurea* O. Berg e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth em diferentes meios de cultura e temperaturas. Para isso, foram utilizados botões florais de onde o pólen foi coletado e aspergido sobre placas contendo os três meios de cultura testados: M1 - ágar e sacarose; M2 - ágar, sacarose e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; M3 - ágar, sacarose, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>), MgSO<sub>4</sub> e KNO<sub>3</sub>; e duas temperaturas de incubação (20 °C e 30 °C). Os dados foram submetidos à análise de variância após transformação para raiz quadrada e as médias foram comparadas pelo teste de Fisher (LSD). Para as três espécies, a temperatura de 30 °C proporcionou as maiores porcentagens de germinação dos grãos de pólen. Para *A. integerrima*, o M1 e o M3 promoveram as maiores porcentagens de germinação (40.7 % e 56.5 %, respectivamente). Para *C. aurea*, o M2 propiciou a maior média de germinação (43.7 %). E para *S. punicea*, o M3 foi o que proporcionou a maior média (31.62 %). Conclui-se que as espécies avaliadas diferem quanto ao requerimento de micronutrientes para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen, sendo M1 e M3 os melhores meios para *A. integerrima*, M2 para *C. aurea* e M3 para *S. punicea*, e a temperatura de 30 °C adequada para as três espécies.

**Palavras-chave:** *Angelonia integerrima* L., *Campomanesia aurea* O. Berg, *Sesbania punicea* (Cav.) Benth, tubo polínico, espécies nativas.

**Abstract:** The objective of the present work was to verify the *in vitro* germination of pollen grains of *Angelonia integerrima* L., *Campomanesia aurea* O. Berg and *Sesbania punicea* (Cav.) Benth populations in different culture media and temperatures. For this, we used flower buds

from which pollen was collected and sprayed on plates containing the three culture media tested: M1 - agar and sucrose; M2 - agar, sucrose and  $H_3BO_3$ ; M3 - agar, sucrose,  $H_3BO_3$ ,  $Ca(NO_3)$ ,  $MgSO_4$  and  $KNO_3$ ; and two incubation temperatures (20 °C and 30 °C). Data were subjected to analysis of variance after transformation to square root and means were compared by Fisher's test (LSD). For the three species, the temperature of 30 °C provided the highest percentage of pollen grain germination. For *A. integerrima*, M1 and M3 promoted the highest germination percentages (40.7% and 56.5%, respectively). For *C. aurea*, M2 provided the highest germination average (43.7%). And for *S. punicea*, M3 was the one that provided the highest average (31.62%). It was concluded that the evaluated species differ in micronutrient requirements for in vitro germination of pollen grains, being M1 and M3 the best media for *A. integerrima*, M2 for *C. aurea* and M3 for *S. punicea*, and temperature of 30 °C suitable for all three species.

**Key-words:** *Angelonia integerrima* L., *Campomanesia aurea* O. Berg, *Sesbania punicea* (Cav.) Benth, pollen tube, native species.

O bioma Pampa é caracterizado por possuir elevada riqueza de espécies. Em estimativa recente, Boldrini et al. (2015) descreveram a existência de aproximadamente 2.150 espécies de plantas superiores nesse bioma, sendo que pelo menos 250 destas já foram reconhecidas pelo seu potencial ornamental para uso em arte floral e paisagismo (Stumpf et al., 2012).

A utilização de espécies nativas como plantas ornamentais tem despontado como um novo nicho no mercado da floricultura, apresentando um elevado potencial de produção e comercialização.

Essas espécies apresentam algumas vantagens em relação às exóticas, como a maior adaptação às condições edafoclimáticas locais (Oliveira Junior et al., 2013), além de apresentarem uma beleza singular, em um mercado já saturado pelos cultivos tradicionais. Além disso, a floricultura pode contribuir diretamente para a preservação *in situ* do germoplasma nativo (Nahoum & Fraga, 2015), principalmente em espécies que são alvo de extrativismo, visto que, se propagado e comercializado corretamente, diminui-se a coleta indiscriminada desse material na natureza.

Dentre as espécies nativas do bioma Pampa com potencial ornamental, algumas vêm se destacando por características como o porte, arquitetura, coloração e aroma das flores, como: *Campomanesia aurea* O. Berg (Myrtaceae), *Angelonia integerrima* Spreng. (Plantaginaceae) e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth (Fabaceae). Essas três espécies e seus atributos foram apresentados por Stumpf et al. (2009a) no livro "Cores e Formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas", além de terem sido citadas por outros pesquisadores em trabalhos de identificação de espécies nativas para fins ornamentais (Stumpf et al., 2009b; Carrion & Brack 2012; Stumpf et al., 2015).

Para fins comerciais, estudos quanto a capacidade germinativa *in vitro* dos grãos de pólen de genótipos de uma espécie podem pressupor o sucesso da utilização destes em futuros cruzamentos (Chagas et al., 2010), com a intenção de se obter um material com características mais interessantes.

As condições exigidas para a germinação do pólen diferem entre as espécies, principalmente no que diz respeito aos componentes do meio de cultura, à temperatura e ao tempo de incubação (Stanley & Linskens, 1974). Com relação ao meio de cultura, este deve ser constituído por elementos orgânicos e inorgânicos, de forma a fornecer ao pólen uma condição semelhante à encontrada no estigma da flor (Sousa et al., 2010; Silva et al., 2017).

Até o momento, não eram conhecidas as condições adequadas para testes de germinação *in vitro* do pólen de *C. aurea*, *A. integerrima* e *S. punicea*. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi verificar a germinação *in vitro* dos grãos de pólen de populações destas três espécies em diferentes meios de cultura e temperaturas.

O material vegetal utilizado foi composto por botões florais coletados no mês de novembro de 2018 de 15 indivíduos de uma população de *C. aurea* e 25 indivíduos de uma população de *A. integerrima*, ambas localizadas no Parque Natural Morro do Osso – Porto Alegre – RS (30° 07' S e 51° 14' W); além de botões florais de 15 indivíduos de uma população de *S. punicea* localizada em área adjacente à estrada no município de Palmares do Sul – RS (30° 15' S e 50° 30' W), coletados no mês de dezembro de 2018.

Assim que coletado, o material foi imediatamente acondicionado em caixas de isopor e transportado até o laboratório, onde foi realizada a triagem manual dos botões florais, mantendo-se apenas os que estavam em estágio de balão (pré-antese). Os botões foram, então,

colocados em bandejas forradas com papel absorvente em câmara do tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) com temperatura de 30 °C, no escuro, por 24 horas, para secagem do pólen. Posteriormente, as pétalas foram retiradas e as anteras expostas à luz incandescente por 20 minutos, para completa deiscência e liberação do pólen.

Foram testados três meios de cultura, expressos em uma concentração para 100 mL de água deionizada autoclavada: Meio 1 (M1) – 10 g de sacarose + 1 g de agar (meio de cultura padrão); Meio 2 (M2) – 10 g de sacarose + 1 g de agar + 0,08 g de  $H_3BO_3$  (Franzon et al., 2006); e Meio 3 (M3) – 15 g de sacarose + 1 g de agar + 0,01 g de  $H_3BO_3$  + 0,1 g de  $Ca(NO_3).4H_2O$  + 0,03 g de  $MgSO_4.7H_2O$  + 0,01 g de  $KNO_3$  (Sahar & Spiegel-Roy, 1984); e duas temperaturas de incubação: 20 °C e 30 °C.

Para o preparo dos meios de cultura, os elementos constituintes foram dissolvidos em água deionizada e aquecidos em agitador magnético a uma temperatura de aproximadamente 90°C, sendo então vertidos em placas de cultura de células (35 mm × 12 mm) acopladas em lâminas de microscopia. Após a solidificação do meio, o pólen foi retirado das anteras com o auxílio de um pincel número 4 e aspergido sobre toda a superfície da placa. As placas/lâminas foram, então, mantidas em caixas do tipo gerbox com papel Germitest umedecido, simulando uma câmara úmida, e incubadas em câmaras do tipo B.O.D. por 12 horas, no escuro, nas duas temperaturas.



A contagem dos grãos de pólen germinados (que emitiram tubo polínico superior, ao menos, a duas vezes o diâmetro do pólen) foi efetuada com auxílio de microscópio óptico no aumento de 20x, observando-se 500 grãos de pólen por placa/lâmina.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 2, sendo três meios de cultura (M1, M2 e M3) e duas temperaturas de incubação (20°C e 30°C), com quatro repetições (cada placa/lâmina correspondendo a uma repetição). Os dados foram submetidos à análise de variância após transformação para raiz quadrada, e então as médias foram comparadas pelo teste de Fisher (LSD) a 5% de probabilidade de erro. A análise foi realizada utilizando-se o software Sigmaplot 11.0.

Para *A. integerrima* (Figura 1a), houve interação entre os fatores meio de cultura e temperatura de incubação ( $p$ -valor $<0,001$ ). A porcentagem de germinação não diferiu entre os meios de cultura para a temperatura de 20 °C, com média de apenas 0.9 % de pólenes germinados (Tabela 1). Já quando a temperatura utilizada foi a de 30 °C houve diferença entre os meios, sendo o meio M2 o que apresentou a menor média, enquanto os meios M1 e M3 aumentaram em 6,2 e 8,6 vezes a germinação em relação ao M2, respectivamente (Tabela 1).

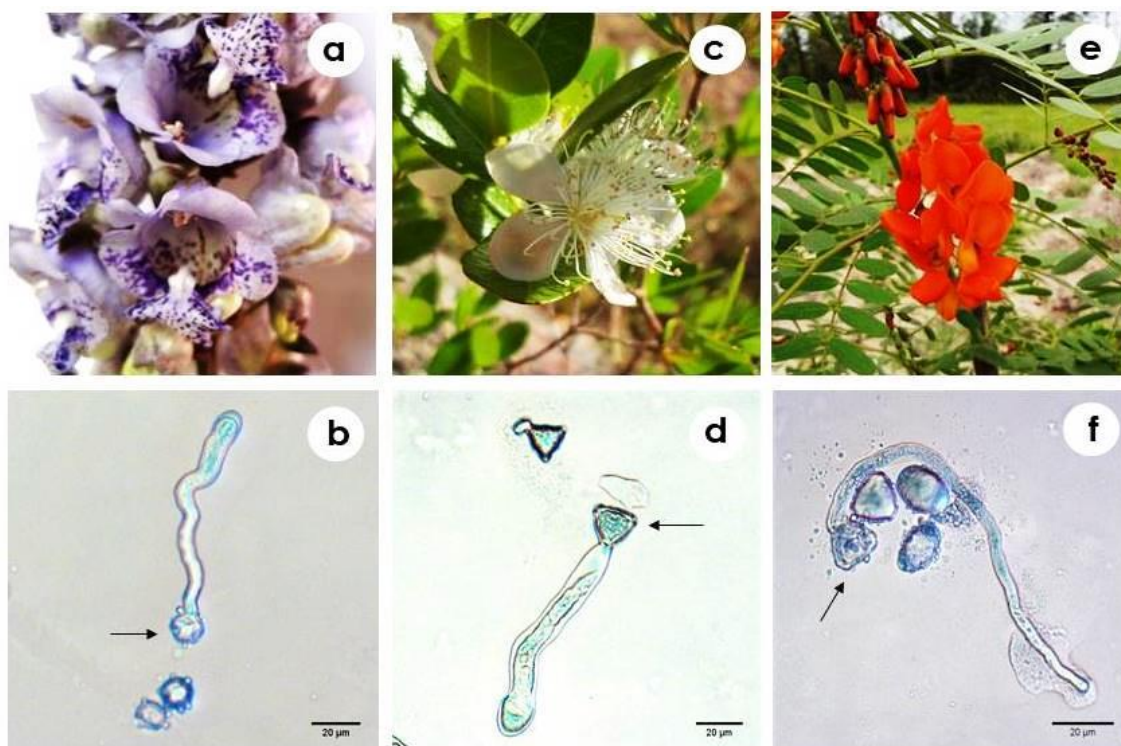
Para *C. aurea* (Figura 1c), nenhum grão de pólen germinou na temperatura de 20 °C (Tabela 1). Já para a temperatura de 30 °C, o M2 proporcionou a maior média de pólenes germinados, aumentando em 6,6 vezes a germinação em relação ao M3 (que acarretou a menor

média), porém ambos não diferiram do M1, que proporcionou uma germinação de 20 % (Tabela 1).

**Tabela 1.** Porcentagem média de germinação *in vitro* de pólen de *Angelonia integerrima* Spreng. e *Campomanesia aurea* O. Berg em diferentes meios de cultura e temperaturas.

Espécie	Meio de cultura	Temperatura de incubação	
		20°C	30°C
<i>Angelonia integerrima</i>	M1	1.2 aB	40.7 aA
	M2	0.5 aB	6.55 bA
	M3	1.0 aB	56.5 aA
<i>Campomanesia aurea</i>	M1	0 aB	20 abA
	M2	0 aB	43.7 aA
	M3	0 aB	8.05 bA

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD) a 5% de probabilidade de erro.



**Figura 1.** Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Campomanesia aurea* O. Berg, *Angelonia integerrima* Spreng. e *Sesbania punicea* (Cav.): a) detalhe da inflorescência de *A. integerrima*; b) grãos de pólen germinado (seta) e não germinados de *A. integerrima*; c) detalhe da flor de *C. aurea*; d) grão de pólen germinado (seta) e não germinado de *C. aurea*; e) detalhe da inflorescência de *S. punicea*; f) grãos de pólen germinado (seta) e não germinados de *S. punicea*.

Já para *S. punicea* (Figura 1e) não houve interação entre os fatores (p-valor: 0,384), havendo apenas efeito dos fatores isolados. As maiores médias de germinação foram obtidas com o M3, que proporcionou um incremento de germinação de cerca de 50 vezes em comparação ao M1 e pela temperatura de 30 °C, que ocasionou o dobro da germinação em relação à temperatura de 20 °C (Tabela 2).

**Tabela 2.** Porcentagem média de germinação *in vitro* de pólen de *Sesbania punicea* (Cav.) Benth em diferentes meios de cultura e temperaturas.

	<b>Meio de cultura</b>	<b>Germinação (%)</b>
	<b><i>Sesbania punicea</i></b>	M1
M2		3.85 b
M3		31.62 a
	<b>Temperatura de incubação</b>	
	20°C	8.2 b
	30°C	15,9 a

No presente trabalho, o M1, composto por apenas ágar e sacarose, e o M3, o mais completo, proporcionaram as maiores porcentagens de germinação de grãos de pólen para a espécie *A. integerima*, indicando não ser imprescindível a adição de micronutrientes para a germinação do pólen nesta espécie.

Para a espécie *Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham (jerivá - Arecaceae), Sousa et al. (2010) verificaram que o meio composto por apenas ágar e sacarose proporcionou a maior porcentagem de germinação *in vitro* dos grãos de pólen.

O boro, quando adicionado ao meio na forma de ácido bórico, promove a formação de um complexo ionizável açúcar-borato, o qual interage com as membranas celulares, incrementando a porcentagem de germinação e o comprimento do tubo polínico (Thompson & Batjer,

1950). Esse elemento pode ter sido o responsável pelo acréscimo da germinação em *C. aurea*, visto que o M2, composto por ágar, sacarose e ácido bórico, proporcionou a maior média de germinação nesta espécie. Apesar de o meio 3 também possuir ácido bórico em sua constituição, a interação com os demais elementos constituintes pode ter sido prejudicial à germinação dos grãos de pólen de *C. aurea*.

Em espécies nativas da família Myrtaceae, são encontradas diferenças quanto ao comportamento do pólen frente aos meios de cultura. Para *Campomanesia xanthocarpa* (guabirobeira), três diferentes meios de cultura foram testados e não diferiram entre si, indicando que o boro não influenciou na germinação média do pólen para essa espécie (Franzon et al., 2006), enquanto para *Eugenia uniflora* L. (pitangueira), o meio composto por sacarose e ágar proporcionou as melhores médias de germinação *in vitro* (Franzon et al., 2006). Já para *Plinia trunciflora* Berg, *P. cauliflora* (DC) Berg e *P. jaboticaba* (Vell.) Berg (jaboticabeiras), constatou-se que a adição de ácido bórico no meio de cultura aumentou a germinação *in vitro* do pólen (Danner et al., 2011).

O M3, composto além do ágar, sacarose e ácido bórico, por nitrato de cálcio, sulfato de magnésio e nitrato de potássio, proporcionou a maior porcentagem de germinação em *S. punicea*, o que sugere que essa espécie necessita de micronutrientes que estimulem a germinação dos grãos de pólen. O cálcio, um dos elementos constituintes deste meio, pode ter sido responsável por esse

resultado, visto que é importante especialmente para o crescimento do tubo polínico (Sousa et al., 2010).

É possível visualizar pelas figuras 1b, 1d e 1f que, com 12 horas de incubação, os tubos polínicos atingiram cerca de 8 a 10 vezes o tamanho do grão de pólen, indicando que esse tempo foi suficiente para a avaliação da germinação.

Para as três espécies estudadas, a temperatura de 20 °C proporcionou uma mínima porcentagem de pólenes germinados, incluindo a ausência de grãos germinados para *C. aurea*, o que demonstra que baixas temperaturas não são adequadas para a germinação dos grãos de pólen nestas espécies. Visto que as três espécies florescem nos meses de primavera (entre setembro e novembro), onde as temperaturas médias ultrapassam os 20 °C, isso pode explicar o requerimento de temperaturas mais elevadas para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen.

Para inúmeras espécies, temperaturas entre 25 °C e 30 °C são consideradas ideais para a germinação do pólen, como para *Eugenia involucrata* (Franzon et al., 2007), *Campomanesia xanthocarpa* (Franzon et al., 2006), *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Silva et al., 1999), *Olea europaea* (Silva et al., 2016), entre outras.

Nas três espécies, a germinação dos grãos de pólen variou de 31,6 a 56,5 % para os meios que proporcionaram as maiores médias, valores considerados satisfatórios para testes de germinação *in vitro* (Franzon et al., 2006; Danner et al., 2011). Considerando que vários

fatores influenciam a germinação dos grãos de pólen, em futuros trabalhos alguns ajustes podem ser realizados, como a avaliação de mais temperaturas, concentrações de micronutrientes e estágio das flores, o que pode aumentar ainda mais a porcentagem de germinação.

Conclui-se que as espécies avaliadas diferem quanto ao requerimento de micronutrientes para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen, sendo M1 e M3 os melhores meios para *A. integerrima*, M2 para *C. aurea* e M3 para *S. punicea*, e a temperatura de 30 °C adequada para as três espécies.

## REFERÊNCIAS

Boldrini, I., Overbeck, G., Trevisan, R. 2015. Biodiversidade de plantas. In: Pillar, V.P., Lange, O. *Os campos do sul*. Rede Campos Sulinos/UFRGS. Porto Alegre, Brazil. p. 51-60.

Carrion, N.A., Brack, P. 2012. Eudicotiledôneas ornamentais dos campos do bioma Pampa no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 18: 23-37.

Chagas, E.A., Pio, R., Chagas, P.C., Pasqual, M., Bettiol Neto, J.E. 2010. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. *Ciência Rural* 40: 261-266.

Danner, M.A., Citadin, I., Sasso, S.A.Z., Sachet, M.R., Malagi, G. 2011. Modo de reprodução e viabilidade de pólen de três espécies de jaboticabeira. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33: 345-352.

Franzon, R.C., Raseira, M.C.B., Wagner Junior, A. 2006. Germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). *Revista Ceres* 53: 129-134.

Franzon, R.C., Raseira, M.C.B., Wagner, J.A. 2007. Testes de germinação *in vitro* e armazenamento de pólen de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). *Acta Scientiarum-Agronomy* 29: 251-255.

Nahoum, P., Fraga, C.N. 2015. Uso de Recursos Fitogenéticos no Paisagismo. In: Veiga, R.F.A, Queiróz, M.A. *Recursos Fitogenéticos - A base da Agricultura Sustentável no Brasil*. UFV, Viçosa, Brazil, p. 306-313.

Oliveira Júnior, C.J.F., Gonçalves, F.S., Couto, F., Matajs, L. 2013. Potencial das espécies nativas na produção de plantas ornamentais e paisagismo agroecológico. *Revista Brasileira de Agroecologia* 8: 190-200.

Sahar, N., Spiegel-Roy, P. 1984. *In vitro* germination of avocado pollen. *Scientia Horticulturae* 19: 886-888.

Silva, M.M., Bruckner, C.H., Picanço, M., Cruz, C.D. 1999. Fatores que afetam a germinação de grão de pólen do maracujá: meios de cultura e tipos de agrotóxicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 347-352.

Silva, L.F.O., Zambon, C.R., Pio, R., Oliveira, A.F., Gonçalves, E.D. 2016. Establishment of growth medium and quantification of pollen grains of olive cultivars in Brazil's subtropical areas. *Bragantia* 75: 26-32.

Silva, D.F., Pio, R., Nogueira, P.V., Silva, P.A.O., Figueiredo, A.L. 2017. Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális. *Revista Ciência Agronômica* 48: 365-373.

Sousa, V.A., Schemberg, E.A., Aguiar, A.V. 2010. Germinação *in vitro* do pólen de jervá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). *Scientia Forestalis* 38: 147-151.

Stanley, R.G., Linskens, H.F. 1974. *Pollen: biology, biochemistry, management*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany. 310 p.

Stumpf, E.R.T., Barbieri, R.L., Heiden, G. 2009a. *Cores e Formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas*. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brazil. 276 p.

Stumpf, E.R.T., Romano, C.M., Barbieri, R.L., Heiden, G., Fischer, S.Z., Corrêa, L.B. 2009b. Características ornamentais de plantas do Bioma Pampa. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 15: 46-62.

Stumpf, E.R.T., Heiden, G., Iganci, J.R.V., Barbieri, R.L., Corrêa, L.B., Perleberg, T.D., Romano, C.M., Fischer, S.Z., Neitzke, R.S. 2012. Prospecting native ornamental plants in the brazilian pampa for use in landscaping and floral art. *Acta Horticulturae* 937: 1161-1166.

Stumpf, E.R.T., Silva, P.S., Romagnoli, I.D., Fischer, S.Z., Mariot, M.P. 2015. Espécies nativas que podem substituir as exóticas no paisagismo. *Ornamental Horticulture* 21: 165-172.

Thompson, A.H., Batjer, L.P. 1950. The effect of boron in the germinating medium on pollen germination and pollen tube growth for several deciduous tree fruits. *Proceedings of American Society for Horticultural Science* 56: 227-230.



## **7 ARTIGO 5**

### **Estimativa do conteúdo de DNA nuclear de espécies nativas com potencial ornamental\***

\*Artigo formatado conforme as normas da revista Crop Breeding and Applied Biotechnology.

## **Estimativa do conteúdo de DNA nuclear de espécies nativas com potencial ornamental**

**Resumo:** *Angelonia integerrima* Spreng. (Plantaginaceae), *Campomanesia aurea* O. Berg (Myrtaceae) e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth (Fabaceae) são espécies nativas da região sul do Brasil que apresentam características que as qualificam como potenciais para uso ornamental. O objetivo do presente trabalho foi estimar o conteúdo de DNA nuclear 2C de diferentes acessos destas espécies através de citometria de fluxo. Para isso, utilizaram-se tecidos foliares e de sementes de três acessos para cada espécie para a obtenção de suspensões nucleares, as quais foram coradas com iodeto de propídio e analisadas em citômetro de fluxo FacsAria. Utilizou-se como padrão interno tecido foliar de *Zea mays* L. ‘CE-777’ (2C = 5,43 pg). Foram gerados histogramas com boa resolução e coeficientes de variação satisfatórios. Para *A. integerrima*, foi estimado um valor de conteúdo nuclear 2C de 1,43 pg, para *C. aurea* de 0,97 pg e para *S. punicea* de 1,55 pg, não havendo diferença significativa para o conteúdo entre os acessos analisados dentro de cada espécie.

**Palavras-chave:** *Angelonia integerrima*; *Campomanesia aurea*; *Sesbania punicea*; floricultura; tamanho do genoma.

**Abstract:** *Angelonia integerrima* Spreng. (Plantaginaceae), *Campomanesia aurea* O. Berg (Myrtaceae) and *Sesbania punicea* (Cav.) Benth (Fabaceae) are native species from southern Brazil with characteristics that qualify them as potential for ornamental use. The objective of the present work was to estimate the 2C nuclear DNA content of different accessions of these species by flow cytometry. For this, we used leaf and seed tissues from three accessions for each species to obtain nuclear suspensions, which were

stained with propidium iodide and analyzed by a FACS Calibur flow cytometer. *Zea mays* L. 'CE-777' leaf tissue (2C = 5.43 pg) was used as internal standard. Histograms with good resolution and satisfactory coefficients of variation were generated. For *A. integerrima*, a 2C nuclear content value of 1.43 pg was estimated, for *C. aurea* 0.97 pg and for *S. punicea* 1.55 pg, there was no significant difference for the content between the accessions analyzed within each species.

**Key-words:** *Angelonia integerrima*; *Campomanesia aurea*; *Sesbania punicea*; floriculture; genome size.

## Introdução

A utilização de espécies nativas como plantas de vaso, corte ou mesmo para composição de projetos paisagísticos é uma tendência que vem se consolidando no mercado da floricultura (Heiden et al. 2007). Com isso, é crescente o número de trabalhos que vêm sendo realizados para identificar espécies nativas que apresentem elementos estéticos apropriados para estes fins. Como exemplo dessas espécies, pode-se destacar *Angelonia integerrima* Spreng. (Plantaginaceae), *Campomanesia aurea* O. Berg (Myrtaceae) e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth (Fabaceae), as quais tiveram seu potencial ornamental identificado em trabalho de Stumpf et al. (2009a), além de outros pesquisadores (Stumpf et al. 2009b, Carrion e Brack 2012, Stumpf et al. 2015).

No entanto, ainda são incipientes os estudos relativos a estas espécies, de modo que, para viabilizar a utilização comercial destas é necessário gerar e disponibilizar informações básicas, como as de caracterização (fenotípica, química, citogenética, molecular, entre outras) do material de interesse, as quais fornecem subsídios para futuros programas de melhoramento genético. Com relação às espécies não

domesticadas, os trabalhos de caracterização adquirem suma importância, visto que se pode considerar o melhoramento genético como o principal processo responsável pela transformação de um componente da biodiversidade, primeiramente em um recurso genético e, por fim, em um produto com valor econômico (Clement 2001).

O núcleo da célula vegetal armazena a maior parte do material hereditário, sendo, dessa forma, objeto de estudos intensivos. Dentre esses, a estimativa da quantidade de DNA nuclear, referida como valor C (do termo constante), expressa o tamanho do genoma, ou seja, a quantidade de material genético existente em um dado organismo (Bennet e Leitch 1995). A quantidade de DNA nuclear é expressa em picogramas (pg),  $10^{-12}$  g ou em mega pares de bases de nucleotídeos (Mb= 106 pares de bases), sendo que 1 pg corresponde a 965 Mb (Bennet e Leitch 1995).

A citometria de fluxo, que utiliza fluorocromos seletivos de DNA, é o método predominante para a medição do conteúdo de DNA nuclear nas plantas, pois se trata de um procedimento rápido e confiável (Doležel et al. 2007).

Em Angiospermas, o tamanho do DNA nuclear pode variar de 0,1 a 125 pg (Leitch et al. 1998), sendo a gama de valor C em plantas maior do que nos demais organismos (Souza-Chies 2003). Com isso, os genomas podem ser classificados segundo seu tamanho em: muito pequeno ( $1C \leq 1,4$  pg), pequeno ( $1C \leq 3,5$  pg), intermediário ( $1C$  de 3,51-13,99 pg), grande ( $1C \geq 14$  pg) e muito grande ( $1C \geq 35$  pg) (Leitch et al. 1998, Soltis et al. 2003). Analisados por um contexto evolutivo, grupos mais ancestrais em Angiospermas têm tamanhos menores de genoma quando comparados a grupos mais derivados (Leitch et al. 1998).

A disponibilidade de informações sobre o tamanho do genoma é fundamental para inúmeros campos de pesquisa, como os que abordam estudos evolutivos e taxonômicos (Kron et al. 2007), além de serem igualmente importantes em trabalhos de

melhoramento e controle de qualidade na produção de sementes (Suda et al. 2007, Leus et al. 2009).

Embora o conteúdo de DNA dentro de uma espécie tenda a permanecer constante, podem ocorrer pequenas variações. Há várias razões para isso, podendo-se citar a variação cromossômica (aneuploidia, cromossomos supranumerários, poliploidia, disploidia), bem como a perda ou duplicação de segmentos cromossômicos e a presença de DNA altamente repetitivo (Bennett e Smith 1976, Cavallini e Natali 1991).

Não há na literatura estudos que abordem a determinação do conteúdo de DNA de *A. integerrima*, *C. aurea* e *S. punicea*, apenas sendo encontradas estimativas de valor 2C para sete espécies do gênero *Campomanesia* (Costa et al. 2008) e uma do gênero *Sesbania* (Arumuganathan e Earle 1991). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi estimar a conteúdo de DNA nuclear (2C) de diferentes acessos de *Angelonia integerrima* L., *Campomanesia aurea* O. Berg e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth através de citometria de fluxo.

## **Material e métodos**

O material vegetal utilizado foi composto por folhas jovens das espécies *A. integerrima* e *S. punicea*, e por sementes de *C. aurea*. Para as análises foi utilizado material proveniente de três acessos para cada espécie, cada acesso sendo composto por três a cinco indivíduos. Para *A. integerrima*, os indivíduos foram obtidos por micropropagação de sementes coletadas a campo e armazenadas em geladeira. Para *S. punicea*, os indivíduos foram obtidos por germinação das sementes diretamente em substrato para plantas. Já para *C. aurea*, utilizou-se as sementes coletadas de populações naturais e armazenadas em geladeira (Tabela 1).

**Tabela 1.** Locais de origem do material propagativo e número de indivíduos obtidos para cada espécie, modo de propagação utilizado para obtenção das plantas e tipo de tecido vegetal analisado por citometria de fluxo para determinação do conteúdo de DNA de *Angelonia integerrima* Spreng., *Campomanesia aurea* O. Berg e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth.

<b>Espécie</b>	<i>Angelonia integerrima</i>	<i>Campomanesia aurea</i>	<i>Sesbania punicea</i>
<b>Acessos (número de indivíduos analisados)</b>	Morro do Osso (3)	Barão do Triunfo (5)	Barão do Triunfo (4)
	Morro Santana (3)	Parque Saint-Hilaire (4)	Barra do Ribeiro (3)
	Barão do Triunfo (5)	Morro do Osso (5)	Palmares do Sul (4)
<b>Propagação</b>	Micropropagação	-	Semeadura/substrato
<b>Tecido vegetal utilizado</b>	Folhas jovens	Sementes	Folhas jovens

Para cada espécie foram realizadas análises preliminares para a definição do tampão, padrão interno e tecido vegetal mais adequado para a quantificação do conteúdo de DNA nuclear, de forma que ao final se seguiu o mesmo protocolo (adaptado de Doležel et al. 2007) para as três espécies (com exceção do tecido vegetal utilizado para *C. aurea*). Primeiramente, os tecidos foliares jovens foram coletados de plantas mantidas em casa de vegetação, armazenados em sacos do tipo zip com papel-filtro umedecido e imediatamente levados para o laboratório para o processamento das amostras. Como padrão interno de referência utilizou-se tecido foliar da espécie *Zea mays* L. ‘CE-777’ (2C = 5,43 pg, Doležel et al. 2007); esta também mantida em casa de vegetação, sendo o material coletado da mesma forma.

Para cada amostra, aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> de tecido foliar da espécie de interesse (uma semente inteira de  $\approx$  0,5 cm para *C. aurea*) foi triturado com auxílio de lâmina de barbear juntamente com 0,5 cm<sup>2</sup> de tecido foliar do padrão interno, utilizando-se 2 mL de tampão de extração LB01 gelado. A suspensão foi então filtrada com filtro de malha de 50  $\mu$ m (QIAGEN), sendo adicionados posteriormente 50  $\mu$ L de RNase (1 mg mL<sup>-1</sup>) e a coloração efetuada com 50  $\mu$ L de iodeto de propídeo (1 mg mL<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>). As amostras permaneceram armazenadas em caixa de isopor com gelo e no escuro por aproximadamente 60 minutos, sendo então conduzidas à análise em citômetro de fluxo FacsAria (Becton Dickinson) com o programa BD FACSDiva™ Software v. 6.1.3. Foram medidos cerca de 10.000 núcleos para cada amostra. O tamanho do genoma foi estimado pela equação:  $2C \text{ amostra} = (\text{Média do pico G1 da amostra} / \text{Média do pico G1 do padrão interno de referência}) \times 2C \text{ padrão interno de referência}$ , onde a média do pico G1 é o valor médio de fluorescência emitida pelos núcleos na fase G1 do ciclo celular (Doležel e Bartos 2005).

Os dados, para cada espécie, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e então comparados através do teste de Fischer (LSD) ao nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa CoStat versão 6.4.

## Resultados e discussão

Os dados obtidos para as três espécies no presente trabalho são inéditos, visto que não foram encontradas estimativas de valor 2C para estas, segundo consulta ao banco de dados Plant DNA C-values Database (Leitch et al. 2019).

Para *Angelonia integerrima* foi estimado um conteúdo de DNA nuclear 2C médio de 1,43 pg, não havendo diferença entre os acessos analisados (Tabela 2). Essa é a primeira estimativa de tamanho de genoma reportada também para o gênero *Angelonia*.

Para espécies da família Plantaginaceae, há estimativas de valor C para inúmeros gêneros. Em *Mecardonia* Ruiz & Pavon, um estudo analisando o conteúdo de DNA nuclear de cinco espécies ocorrentes na Argentina verificou que este variou de 1,91 a 5,29 pg, sendo três espécies diploides (*M. flagellaris*, *M. grandiflora* e *M. procumbens*), uma tetraploide (*Mecardonia* sp.) e uma hexaploide (*M. kamogawae*) (Sosa et al. 2016).

Nas demais estimativas reportadas, os valores variam de 0,62 pg em *Veronica urticifolia*, uma espécie diploide (Pustahija et al. 2013), a 17,95 pg em *Plantago udicola*, poliploide (Wong e Murray 2012).

**Tabela 2.** Estimativa do conteúdo de DNA nuclear (2C) de diferentes acessos de *Angelonia integerrima* L., *Campomanesia aurea* O. Berg e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth.

<b>Espécie</b>	<b>Acesso</b>	<b>2C (pg)</b>	<b>CV (%)</b>	
<i>Angelonia integerrima</i>	<b>Barão do Triunfo</b>	1,41 <sup>ns</sup>	4,1	
	<b>Morro do Osso</b>	1,45	4,0	
	<b>Morro Santana</b>	1,43	4,1	
	<b>Média</b>	-	<b>1,43</b>	4,1
	<b>p-valor</b>	-	0,28	-
<i>Campomanesia aurea</i>	<b>Morro do Osso</b>	0,98 <sup>ns</sup>	4,8	
	<b>Barão do Triunfo</b>	0,97	4,7	
	<b>Parque Saint-Hilaire</b>	0,95	4,6	
	<b>Média</b>	-	<b>0,97</b>	4,7
	<b>p-valor</b>	-	0,21	-
<i>Sesbania punicea</i>	<b>Barra do Ribeiro</b>	1,54 <sup>ns</sup>	4,9	
	<b>Barão do Triunfo</b>	1,57	4,9	
	<b>Palmares do Sul</b>	1,53	4,6	
	<b>Média</b>	-	<b>1,55</b>	4,8
	<b>p-valor</b>	-	0,52	-

<sup>ns</sup> - médias não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade de erro.

Para *Campomanesia aurea*, o conteúdo de DNA nuclear 2C médio estimado foi de 0,97 pg, também não diferindo entre os acessos analisados (Tabela 2). Comparando-se esse resultado com o relatado para sete espécies do gênero *Campomanesia*, percebe-se que há uma diferença no tamanho do genoma a nível infragenérico. Neste estudo de Costa et al. (2008) foram encontrados valores de 0,494 pg para *C. pubescens*, 0,503 pg para *C. guazumifolia*, 0,519 pg para *C. schlechtendaliana*, 0,528 pg para *C. phaea*, 0,586 pg para *C. adamantium*, 0,596 pg para *C. guaviroba* e 0,612 pg para *C. laurifolia*. Apesar da diferença observada para o conteúdo de DNA nuclear, o número cromossômico de algumas dessas espécies avaliadas (*C. adamantium*, *C. guaviroba*, *C. phaea* e *C. pubescens*) não varia, e é de  $2n = 22$  cromossomos (Costa e Forni-Martins



2006), o mesmo número cromossômico encontrado em *C. aurea* (dados não publicados).

Para outras espécies da subtribo Myrtinae, na qual está inclusa o gênero *Campomanesia*, também avaliadas por Costa et al. (2008), o conteúdo de DNA nuclear 2C variou de 0,503 pg em *Acca sellowiana* a 0,556 pg em *Pimenta dioica*, além de duas espécies tetraploides (4x), *Psidium acutangulum* e *P. cattleianum*, apresentarem 1,167 pg e 1,053 pg respectivamente.

Um grande problema relativo a análises por citometria de fluxo é a presença nos tecidos analisados de compostos endógenos resultantes do metabolismo secundário, a grande maioria de natureza fenólica (Greilhuber 1998). Entre estes, pode-se citar as antocianinas e o ácido tânico, que podem inibir ou prejudicar a ação dos fluorocromos sobre o DNA (Loureiro et al. 2006, Bennett et al. 2008). No caso de *C. aurea*, a provável presença de compostos fenólicos, em maior quantidade no tecido foliar, impediu a utilização deste para análise. Dessa forma, após inúmeros testes, as sementes apresentaram picos de fluorescência e coeficientes de variação (CV) adequados para a estimativa do DNA nuclear para esta espécie, sendo utilizadas para análise final. A utilização de sementes para determinação do conteúdo de DNA nuclear foi reportada em trabalhos de Sliwinska et al. (2005) e Marques et al. (2019).

Para *Sesbania punicea*, os acessos analisados também não diferiram quanto ao conteúdo de DNA 2C estimado (Tabela 2), sendo a média de valor 2C de 1,55 pg. Para o gênero *Sesbania*, há apenas um trabalho encontrado na literatura, onde o conteúdo de DNA de *S. rostrata* foi determinado como sendo de 2,45 pg (Arumuganathan e Earle 1991).

Para a família Fabaceae, considerada uma das principais famílias de Angiospermas, tanto do ponto de vista da diversidade, quanto do ponto de vista da

importância econômica das espécies (Souza e Lorenzi 2012), os valores de conteúdo de DNA nuclear 2C variam de 0,56 pg para *Lotus unifoliolatus* (2x) (Tanaka et al. 2016) a 54,80 pg para *Vicia faba* (16x) (Bennett et al. 1982).

A partir dos resultados observados no presente trabalho, percebe-se que a determinação da quantidade de DNA nuclear por citometria de fluxo traz informações importantes sobre variações genômicas entre espécies vegetais, visto que há uma diferença expressiva no tamanho do genoma a nível infragenérico, a qual pode ser utilizada para a demarcação de várias taxa (Ohri 1998). Quando descartados diferentes níveis de ploidia, estas diferenças podem estar associadas a um maior ou menor grau de DNA repetitivo (Martel et al. 1997), visto que este compõe mais de 80% do genoma nuclear das Angiospermas (Souza-Chies 2003).

As variações observadas em análises por citometria de fluxo são expressas em um coeficiente de variação (CV) e estão relacionadas com a metodologia de isolamento dos núcleos, com a coloração dos fluorocromos específicos de DNA e com a precisão do próprio aparelho utilizado (Marie e Brown 1993). Quando se trata de quantificações que incluem estimativas do tamanho do genoma em espécies vegetais, ou mesmo quando se tratam de espécies “difíceis” (ricas em compostos fenólicos ou alcaloides), os coeficientes de variação menores que 5% são aceitáveis (Doležel e Bartoš 2005). Dessa forma, pode-se perceber que as análises aqui realizadas, que apresentaram coeficientes de variação entre 4% a 4,9% (Tabela 2), indicam a confiabilidade da interpretação dos resultados obtidos com espécies até o momento não conhecidas em níveis genômicos.

Segundo Hanson et al. (2005), nem sempre há uma correlação entre a quantidade de DNA nuclear e o número de cromossomos de uma espécie, de forma que organismos com maior número de cromossomos podem apresentar um menor conteúdo de DNA, assim como o contrário. Isso pode ser observado no presente trabalho, pois A.

*integerrima*, com  $2n = 20$  cromossomos (Molero et al. 2006, Tedesco et al. 2019), apresentou um conteúdo de DNA menor (1,43 pg) do que *S. punicea* (1,55 pg), que possui  $2n = 12$  cromossomos (Forni-Martins et al. 1994). O mesmo foi relatado por Silva et al. (2017) em um trabalho de determinação do número cromossômico e conteúdo de DNA em plantas alimentícias não-convencionais. Os autores observaram que *Rumex acetosa* L., com  $2n=14$  cromossomos possui um conteúdo de DNA 2C de 7,04 pg e *Hibiscus sabdariffa* L., com  $2n= 72$  cromossomos, apresentou 5,12 pg de conteúdo de DNA.

Uma das aplicações mais comuns da citometria de fluxo em programas de melhoramento é a detecção de híbridos interespecíficos. Nestes programas, a hibridização interespecífica é frequentemente utilizada para transferir caracteres desejados de uma espécie para outra. Dessa forma, se as espécies parentais diferem relativamente em seus conteúdos de DNA nuclear, a citometria de fluxo pode detectar os híbridos interespecíficos de acordo com seus valores intermediários de DNA (Doležel 1997). O conhecimento do valor C de uma espécie também pode direcionar a escolha de metodologias para análise da diversidade genética, como microssatélites e AFLP, além de facilitar a escolha de espécies-alvo para programas de sequenciamento genômico, visto que o custo e o tempo destas análises dependem da quantidade de DNA do material (Leitch e Bennet 2007).

## **Conclusões**

*A. integerrima* apresenta um conteúdo nuclear 2C estimado de 1,43 pg, *C. aurea* de 0,97 pg e *S. punicea* de 1,55 pg, não havendo diferença significativa neste conteúdo entre os acessos dentro de cada espécie analisada.

## Referências

Arumuganathan K e Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter** **9**: 208-218.

Bennet MD, Smith JB e Heslop-Harrison JS (1982) Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Proceedings of the Royal Society of London** **216**: 179-199.

Bennet MD e Leitch IJ (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany** **76**: 113-176.

Bennett MD e Smith JB (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London** **274**: 227-274.

Bennett MD, Smith JB e Heslop-Harrison JS (1982) Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Proceedings of the Royal Society of London** **216**: 179-199.

Bennett MD, Price HJ e Johnston JS (2008) Anthocyanin inhibits propidium iodide DNA fluorescence in *Euphorbia pulcherrima*: implications for genome size variation and flow cytometry. **Annals of Botany** **101**: 777-790.

Carrion NA e Brack P (2012) Eudicotiledôneas ornamentais dos campos do bioma Pampa no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** **18**: 23-37.

Cavallini A e Natali L (1990) Nuclear DNA variability within *Pisum sativum* (Leguminosae): cytophotometric analyses. **Plant Systematics and Evolution** **173**: 179-185.

Clement CR (2001) Melhoramento de espécies nativas. In: Nass LL, Valois ACC, Melo IS, Valadares-Inglis MC (Eds.) **Recursos Genéticos & Melhoramento - plantas**. Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso - Fundação MT, Rondonópolis, MT, pp. 423-441. (Brasil)

Costa IR, Dornelas MC e Forni-Martins ER. (2008) Nuclear genome size variation in fleshy-fruited Neotropical Myrtaceae. **Plant Systematics and Evolution** **276**: 209-217.

Costa IR e Forni-Martins ER (2006) Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pávon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). **Caryologia** **1**: 7-13.

Dolezel J (1997) Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. In: Lelley T. **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna: WUV-Universitätsverlag, p.80-90.

Dolezel J e Bartos J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany** **95**: 99-110.

Dolezel J, Greilhuber J e Suda J (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols 2**: 2233-2244.

Forni-Martins ER, Franchi-Tanibata M e Lucena MAC (1994) Karyotypes of species of *Sesbania* Scop. (Fabaceae). **Cytologia 59**: 479-482.

Greilhuber J (1998) Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. **Annals of Botany 82**: 27-35.

Hanson L, Boyd A, Johnson MA e Bennett MD (2005) First nuclear DNA C-values for 18 eudicot families. **Annals of Botany 96**: 1315-1320.

Heiden G, Barbieri RL, Stumpf ERT e Grolli PR (2007) Uso de plantas arbóreas e arbustivas nativas do Rio Grande do Sul como alternativa a ornamentais exóticas. **Revista Brasileira de Agroecologia 2**: 851-853.

Kron P, Suda J e Husband BC (2007) Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 38**: 847-876.

Leitch IJ, Chase MW e Bennett MD (1998) Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. **Annals of Botany 82**: 85-94.

Leitch IJ e Bennett MD (2007) Genome size and its uses: the impact of flow cytometry. In: Dolezel J, Greilhuber J e Suda J (eds.) **Flow Cytometry with Plant Cells**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., pp. 153-176.

Leitch IJ, Johnston E, Pellicer J, Hidalgo O e Bennett MD (2019) **Angiosperm DNA C-values database** (release 9.0, Apr 2019). Disponível em: <https://cvalues.science.kew.org/>

Leus L, Van Laere K, Dewitte A e Van Huylbroeck J (2009). Flow cytometry for plant breeding. **Acta Horticulture 836**: 221-226.

Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J e Santos C (2006). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany 98**: 679-689.

Marie D e Brown SC (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2c values for seventy species. **Biology of the Cell 78**: 41-51.

Marques ER, Assis JGR, Bustamante FO, Andrade DB, Carvalho MLM e Lopes CA (2019). Distinção de espécies e estádios de maturação de sementes de *Comanthera* spp. por análise de imagem e citometria de fluxo. **Revista de Ciências Agrárias 42**: 11-20.

Martel E, DeNay D, Siljak-Yakovlev S, Brown S e Sarr A (1997) Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **Journal of Heredity 88**: 139-143.

Molero J, Daviña JR, Honfi AI, Franco D e Rovira A (2006) Chromosome studies on plants from Paraguay II. **Candollea** **61**: 373-392.

Ohri D (1998) Genome size variation and plant systematics. **Annals of Botany** **82**: 75-83.

Pustahija F, Brown SC, Bogunic F, Bašić N, Muratovic E, Ollier S, Hidalgo O, Bourge M, Stevanovic V e Sijak-Yakovev S (2013) Small genomes dominate in plants growing on serpentine soils in West Balkans, an exhaustive study of 8 habitats covering 308 taxa. **Plant and Soil** **373**: 427-453.

Silva LFL, Techio VH, Resende LV, Braz GT, Resende KFM de e Carolina Queiroz Samartini CQ (2017) Unconventional vegetables collected in Brazil: chromosome number and description of nuclear DNA content. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **17**: 320-326.

Sliwinska E, Zielińska E e Jędrzejczyk I (2005). Are seeds suitable for flow cytometric estimation of plant genome size? **Cytometry Part A** **64**: 72-79.

Souza-Chies TT (2003) Genomas vegetais. In: Freitas LBF e Bered F. **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 463p.

Souza VC e Lorenzi H (2012) **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas e nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. Instituto Plantarum 768p.

Stumpf ERT, Barbieri RL e Heiden G (Org.) (2009a) **Cores e Formas no Bioma Pampa**: plantas ornamentais nativas. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 276 p.

Stumpf ERT, Romano CM, Barbieri RL, Heiden G, Fischer SZ e Corrêa LB (2009b) Características ornamentais de plantas do Bioma Pampa. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** **15**: 46-62.

Stumpf ERT, Silva OS, Romagnoli ID, Fischer SZ e Mariot MP (2015) Espécies nativas que podem substituir as exóticas no paisagismo. **Ornamental Horticulture** **21**: 165-172.

Soltis DE, Soltis PS, Bennett MD e Leitch IJ (2003) Evolution of genome size in the Angiosperms. **American Journal of Botany** **90**: 1596-1603.

Sosa MM, Angulo MB, Greppi JA e Bugallo V (2016) Chromosome numbers and DNA content in some species of *Mecardonia* (Gratiolae, Plantaginaceae). **Comparative Cytogenetic** **10**: 769-780.

Suda J, Krahulcová A, Trávníček P, Rosenbaumová R, Peckert T and Krahulec F (2007) Genome size variation and species relationships in *Hieracium* subgenus *Pilosella* (Asteraceae) as inferred by flow cytometry. **Annals of Botany** **100**: 1323-1335.

Tanaka H, Chotekajorn A, Kai S, Ishigaki G, Hashiguchi M e Akashi R (2016) Determination of genome size, chromosome number and genetic variation using Inter-Simple Sequence Repeat markers in *Lotus* spp. **Cytologia** **81**: 95-102.

Tedesco M, Emer AA, Winhelmann MC, Avrella ED, Krycki KC, Simioni C e Schafer G (2019) Cytogenetic characterization of *Angelonia integerrima* Sprengel, a native species with ornamental potential. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **19**: 118-125.

Wong C e Murray BG (2012) Variable changes in genome size associated with different polyploid events in *Plantago* (Plantaginaceae). **Journal of Heredity** **103**: 711-719.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho de tese está vinculado a um projeto mais amplo que visa contribuir com o conhecimento de diversos aspectos relacionados a espécies nativas do Rio Grande do Sul identificadas pelo seu valor ornamental. Já foram realizados por discentes que também participaram do projeto trabalhos de propagação (vegetativa e sexuada), além de outros, com as três espécies-alvo aqui estudadas: *Angelonia integerrima* Spreng., *Campomanesia aurea* O. Berg e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth, estando grande parte destes estudos já publicada. Dessa forma, buscou-se realizar a caracterização citogenética destas espécies para preencher uma das lacunas de conhecimento que ainda não haviam sido estudadas.

As análises realizadas para as espécies em questão são, em sua maioria, estudos inéditos. Até o momento só eram conhecidos os números cromossômicos somáticos de *A. integerrima* (determinado a partir de uma única população da Argentina) e de *S. punicea* (determinado a partir de uma única população do sudeste do Brasil). Assim, buscou-se caracterizar as espécies a partir de diversas populações (cada qual composto por inúmeros indivíduos), coletadas *in situ* em diferentes localidades do Rio Grande do Sul, de forma a se obter um conhecimento mais abrangente acerca do comportamento dos cromossomos, tanto com relação ao complemento diploide dos indivíduos (número cromossômico somático), quanto à estabilidade meiótica e posterior formação dos gametas masculinos (grão de pólen), aspectos que estão diretamente relacionados à



perpetuação dessas espécies na natureza. Além disso, também foi determinado o conteúdo de DNA nuclear 2C para as três espécies, sendo estes também dados inéditos, inclusive para o gênero *Angelonia*.

Os estudos de caracterização citogenética de espécies vegetais exigem um trabalho de laboratório extenso e minucioso. No caso de espécies nativas, onde grande parte permanece desconhecida quanto a aspectos citológicos, são necessários inúmeros testes para elaborar os protocolos mais adequados para as diferentes análises. No presente estudo, características intrínsecas ao próprio material, como cromossomos muito pequenos e aderentes (em *A. integerrima* e *C. aurea*), além de possíveis aspectos relacionados às coletas a campo, foram limitantes para o estudo completo do comportamento meiótico masculino para as espécies. No entanto, o índice meiótico foi determinado em um número significativo de indivíduos para as três espécies, além de ser possível analisar células durante a prófase I (diacinese) com bom espalhamento dos cromossomos em *S. punicea*, podendo-se, assim, realizar inferências sobre a regularidade cromossômica durante o processo de microsporogênese.

Os resultados encontrados para as populações analisadas das três espécies indicam que as mesmas apresentam estabilidade quanto ao número cromossômico, regularidade durante o processo de microsporogênese, alta viabilidade polínica e germinação satisfatória dos grãos de pólen. Estes resultados representam uma contribuição para ampliar os conhecimentos dos recursos nativos com potencial ornamental, podendo subsidiar futuros trabalhos com estas espécies. Além disso, esse trabalho pode direcionar estudos de conservação das espécies, visto que é crescente a conversão de áreas de campo nativo em monoculturas ou a perda desses ambientes por ação antrópica. Se não estudadas e conhecidas, estas espécies poderiam ser extintas antes mesmo de ter o seu valor reconhecido.

Sugere-se como futuros trabalhos a serem realizados estudos quanto à variabilidade genética entre e dentro das populações, os quais poderão ser obtidos com a utilização de marcadores moleculares, além de outros relacionados ao modo de reprodução das espécies. Esses estudos, juntamente com os demais realizados até o momento, poderão embasar a escolha de acessos para a composição de coleções ativas de pré-melhoramento, buscando futuramente a inserção dessas espécies em cultivos sustentáveis e em programas de melhoramento genético.

Salienta-se que além dos inúmeros trabalhos que relatam o potencial ornamental de *A. integerrima*, *C. aurea* e *S. punicea*, foi possível visualizar a cada coleta a beleza singular destas três espécies, as quais diferem da maioria dos cultivos utilizados atualmente no mercado da floricultura. Assim, os estudos de caracterização realizados representam um impulso para que a nossa flora nativa seja cada vez mais valorizada e melhor aproveitada.

## 9 APÊNDICES

TABELA 1. Informações sobre os locais de coletas, populações/ acessos e número de tombo do Herbário ICN (UFRGS).

<b>Espécie</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>População/Acesso</b>	<b>Características do local</b>	<b>Voucher ICN</b>
<i>Angelonia integerrima</i> <b>Spreng.</b>	Porto Alegre	Morro do Osso	Campo pedregoso	200787
	Porto Alegre	Morro Santana	Campo pedregoso	200789
	Viamão	Parque Saint-Hilaire	Campo nativo com vegetação elevada	200788
	Barão do Triunfo	Barão do Triunfo	Área particular com campo nativo e pisoteio animal	200786
<i>Campomanesia aurea</i> <b>O. Berg.</b>	Porto Alegre	Morro do Osso	Vegetação rasteira/capoeira	200791
	Eldorado do Sul	Estação Experimental Agrônômica	Vegetação rasteira com roçada	200793
	Viamão	Parque Saint-Hilaire	Campo nativo com vegetação elevada	200792
	Barão do Triunfo	Barão do Triunfo	Área particular com campo nativo e pisoteio animal	200790
<i>Sesbania punicea</i> (Cav.) <b>Benth</b>	Barra do Ribeiro	Barra do Ribeiro	Beira de estrada	200794
	Barra do Ribeiro	Tecnoplanta	Beira de estrada	200795
	Barão do Triunfo	Barão do Triunfo	Beira de estrada	200796
	Palmares do Sul	Palmares do Sul	Beira de estrada	200797

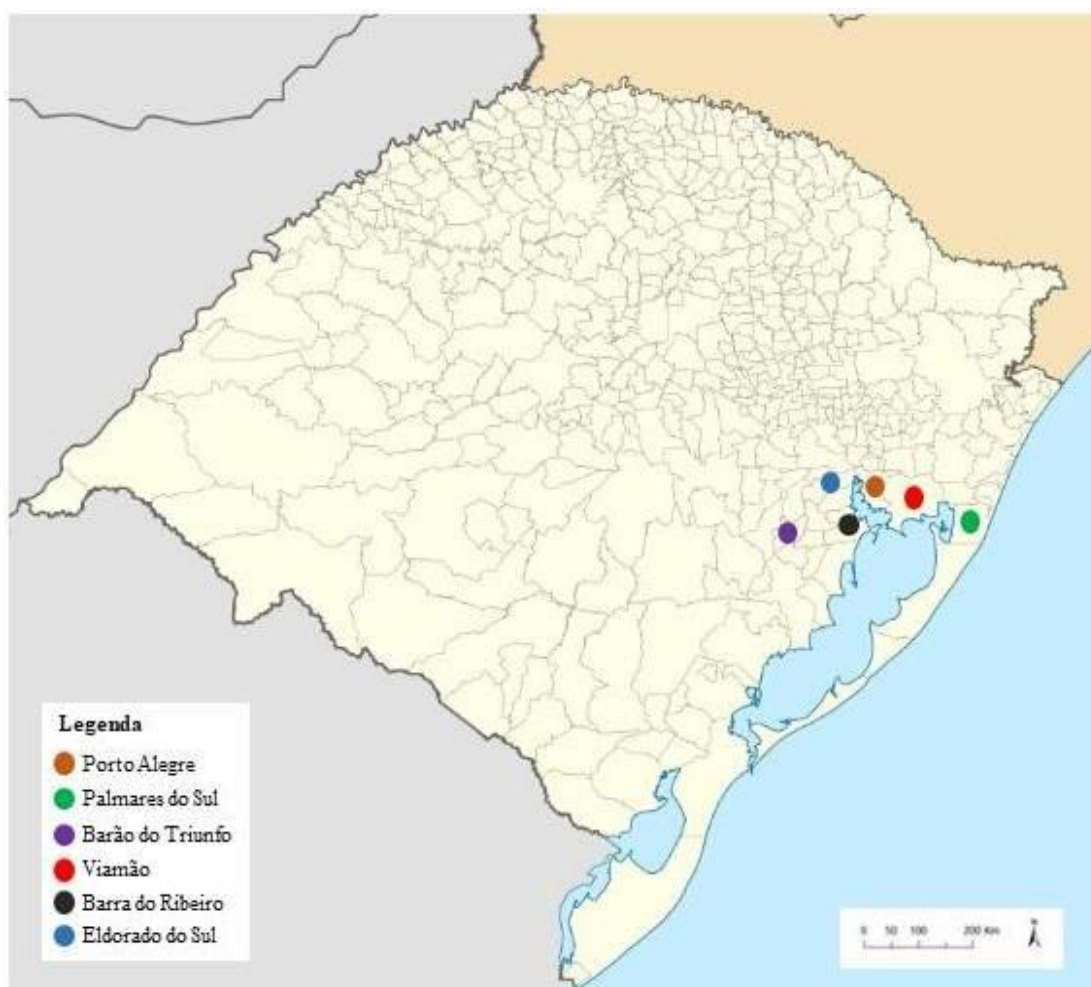


FIGURA 1. Municípios do Rio Grande do Sul onde foram realizadas as coletas de indivíduos de *Angelonia integerrima* Spreng., *Campomanesia aurea* O. Berg e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth para os estudos de caracterização citogenética. Fonte: Adaptada de Wikimedia Commons (CC BY 2.5), 2019.



FIGURA 2. Imagens representativas de locais de coletas de *Angelonia integerrima*, *Campomanesia aurea* e *Sesbania punicea*. a) Barra do Ribeiro; b) Barão do Triunfo; c) Parque Natural Morro do Osso; d) Parque Natural Municipal Saint'Hilaire. Imagens: Marília Tedesco, 2018.