UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Victória Rabelo Campos

BIOLOGIA REPRODUTIVA EM ACESSOS DE *Lippia alba* (MILL.) N.E. BROWN (VERBENACEAE)

Juiz de Fora

2017

VICTÓRIA RABELO CAMPOS

BIOLOGIA REPRODUTIVA EM ACESSOS DE *Lippia alba* (MILL.) N.E. BROWN (VERBENACEAE)

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área: Genética e Biotecnologia como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Professor Doutor Lyderson Facio Viccini

Co-orientador: Professor Doutor Saulo Marçal de Sousa

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Campos, Victória Rabelo .
Biologia reprodutiva em acessos de Lippia alba (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) / Victória Rabelo Campos. -- 2017.
80 f. : il.

Orientador: Lyderson Facio Viccini
Coorientador: Saulo Marçal de Sousa
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. Lippia alba. 2. Complexo poliploide. 3. Biologia reprodutiva. I. Viccini, Lyderson Facio, orient. II. Sousa, Saulo Marçal de, coorient. III. Título.

VICTÓRIA RABELO CAMPOS

Biologia reprodutiva em acessos de *Lippia alba* (MILL.) N.E.Brown (Verbenaceae)

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 22 / 02 / 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini
Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Saulo Marçal de Sousa
Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Wagner Campos Otoni
Universidade Federal de Viçosa

Prof.ª Dr.ª Ana Luisa Sousa Azevedo
Embrapa

Aos mestres e companheiros de trabalho, pelos ensinamentos e amizade

OFEREÇO

Às três mosqueteiras (amada mãe Luzia e amadas irmãs Luiza e Giovanna)

Amado pai Luiz,

Amado companheiro e amigo Robson,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força e coragem em toda minha trajetória acadêmica e principalmente pela criação da matéria-prima de estudo;

À Universidade Federal de Juiz de Fora juntamente com o programa de pós graduação em Genética e Biotecnologia pela oportunidade de execução do trabalho proposto;

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa durante a execução do projeto;

Ao meu orientador Lyderson Facio Viccini, pela confiança em me proporcionar um grande desafio, ensinando-me que nada resiste ao esforço e à dedicação;

Ao meu coorientador Saulo Marçal de Sousa por me mostrar o que é amar a Ciência e por ser exemplo de profissional;

Ao professor José Marcello Salabert de Campos, pelos ensinamentos, conversas e grande apoio desde minha entrada no laboratório;

Aos demais professores Marcelo de Oliveira Santos, Michelle Munk e Carlos Maranduba, pelas ajudas e conselhos do dia a dia;

Aos professores da botânica Fátima Salimena, Luiz Menini, Paulo Peixoto, Nádia Somavilla e Ana Paula Gelli de Faria, por compartilharem seus conhecimentos e pela ajuda sempre que preciso;

Ao professor Wagner Campos Otoni e à pesquisadora Ana Cláudia F. Cruz, pela disponibilidade e grande ajuda em parte dos experimentos;

Aos pesquisadores da Embrapa Gado de Leite Ana Luisa de Sousa Azevedo e Marco Antônio Machado, por ajudarem no compartilhamento de conhecimentos e disponibilização de materiais;

Aos também pesquisadores da Embrapa Gado de Leite Tiago Teixeira de Resende e Alexander Machado Auad, pela boa vontade em ajudar, disponibilizando aparelhos para obtenção de dados;

Aos pesquisadores e amigos Elyabe Monteiro e Christiane Zorzatto pela incansável ajuda na busca de dados, estando sempre disponíveis com um sorriso no rosto;

À Ana Luiza Franco e Flávia Rangel de Sousa pela grande amizade e oportunidade de caminharmos juntas; mostrando-me sempre que, apesar dos obstáculos, nunca podemos desistir;

Às queridas companheiras de graduação Ludymila Cruz, Paola Rosa e Ludemila Martins, que embora tenhamos seguido caminhos diferentes, estarão sempre em meu coração;

Aos queridos amigos de laboratório: Camila Neves, Shayani Lopes, Sirley Julião, Marizia Trevizani, Amanda Lima, Paula Mazza, Laís Stehling, Elisa Cabral, Matheus Aguiar, Renan Augusto, Geovana Onorato, Rafaela Zanetti, Danielle Amaral e Silvioney, pelo companheirismo, tanto nas horas boas quanto nas horas mais difíceis;

À doutoranda Juliana Mainenti, pela paciência, persistência e ensinamento nos experimentos moleculares, não desistindo de mim;

À doutoranda Aryane Reis pelas boas discussões sobre *Lippia alba* e por ter sempre feito parte do meu trabalho de alguma forma;

Às secretárias da pós-graduação Graça e Fernanda pelo auxílio quando necessário;

Aos amigos de infância que mesmo de longe torcem sempre por mim;

À minha mãe Luzia, exemplo para mim de ser humano e de vida. Ao meu amado pai Luiz, que mesmo distante sempre me apoiou na busca de minha felicidade; às minhas amadas irmãs Luiza e Giovanna pela admiração e amor ao longo de toda uma vida;

Ao Robson, pela admiração, companheirismo e amor que trouxe para meu trabalho e minha vida;

À grande amiga Rita Mota;

A todos os meus familiares que sempre fizeram parte da minha trajetória,

Aos que partiram e deixaram saudades eternas;

Aos mestres da minha caminhada!

“A neve e as tempestades matam as flores, mas nada podem contra as sementes”

Khalil Gibran

“I see trees of green,
Red roses too
I see them bloom
For me and you
And I think to myself,
What a wonderful world”

What a Wonderful World

George David Weiss / George Douglas

RESUMO

A biologia reprodutiva de uma espécie está intimamente relacionada com a base genética de uma população e constitui um dos principais fatores relacionados à dispersão e sucesso das angiospermas. *Lippia alba* (Verbenaceae) é conhecida por vários nomes populares como erva cidreira, falsa melissa e chá de tabuleiro, sendo amplamente utilizada na medicina popular, principalmente devido aos seus componentes do óleo essencial. A espécie pode ser facilmente encontrada desde regiões tropicais até temperadas possuindo ampla plasticidade fenotípica. Estudos recentes indicam uma possível origem autopoliploide para a espécie, sendo encontrado indivíduos diploides (2n=30), aneuploides (2n=38), triploides (2n=45), tetraploides (2n=60) e hexaploide (2n=90). Apesar da importância, poucas informações sobre o sistema reprodutivo da espécie estão disponíveis.O presente trabalho teve como objetivo estudar a estratégia reprodutiva da espécie a fim de melhor compreender a origem dos cinco citótipos descritos assim como auxiliar na elucidação da base genética da espécie. Inflorescências de 41 indivíduos foram isoladas no período de março de 2015 a dezembro de 2016. Foram comparados o número de sementes produzidas entre inflorescências isoladas e não isoladas. Sementes recém coletadas de 20 acessos foram avaliadas quanto ao comprimento e largura. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em placa de petri contendo papel filtro umedecido e submetidas a temperaturas que variaram de 18ºC-25ºC-40ºC (em ciclos de 24 horas). Para avaliação da quantidade de DNA, uma única semente por vez foi macerada em tampão Marie a 4°C. A solução obtida foi filtrada em malha de 30 µm e corada com iodeto de propídeo. Para genotipagem, extraiu-se o DNA de sementes oriundas de inflorescências isoladas, não isoladas e de folhas da planta-mãe de oito acessos que foram comparados utilizando oito primers de microssatélites. Para uma análise citohistológica do desenvolvimento de botões, amostras foram coletadas anteriormente à antese e foram fixadas em solução de glutaraldeído por 24h. Análises morfológicas comparativas entre acessos diploide, triploide e tetraploide também foram realizadas, utilizando-se cinco medidas florais. Sementes oriundas de diploides apresentaram maior índice de germinação quando comparado àquelas oriundas dos poliploides. Sementes oriundas de inflorescências isoladas em geral não germinaram. O conjunto de resultados permitiu concluir que *Lippia alba* possui um comportamento reprodutivo preferencialmente alogâmico, com comportamento diferenciado entre diploides e poliploides. As análises citohistológicas e citométricas não permitiram excluir a ocorrência de reprodução por apomixia. Os resultados sugerem que *Lippia alba* possua vias alternativas de reprodução.

Palavras chave: *Lippia alba*; complexo poliploide; biologia reprodutiva

ABSTRACT

The reproductive biology of a species is closely related to the genetic basis of a population and is one of the main factors related to the dispersion and success of angiosperms. *Lippia alba* (Verbenaceae) is known by several common names as erva cidreira, falsa melissa, chá de tabuleiro, being widely used in folk medicine mainly due to its essential oil components. The species can be easily found from tropical to temperate regions, having broad phenotypic plasticity. Recent studies indicate a possible autopoliploidy origin for the species having diploids (2n = 30), aneuploids (2n = 38), triploids (2n = 45), tetraploids (2n = 60) and hexaploid (2n = 90) individuals. Despite the importance of *Lippia alba*, little information about the species' reproductive system is available. The goal of the present work was to study the reproduction strategy of the species to better understand the origin of the five cytotypes as well as to help the elucidation of the genetic basis of the species. Inflorescences of forty-one individuals were isolated from March 2015 to December 2016. The number of produced seeds was compared between isolated and non-isolated inflorescences. Fresh seeds from 20 accessions were collected and the measures of length and width were taken. Then the seeds were placed to germinate in petri dishes with moistened filter paper under temperatures ranging from 18°C-25°C-40°C (in 24 hour cycles). To estimate the DNA content, a single seed at a time was chopped in Marie nuclear extraction buffer at 4°C. The solution was filtered through a 30 µm filter and stained with propidium iodide. For genotyping, DNA was extracted from seeds collected in isolated and non-isolated inflorescences. Leaves were used for DNA extraction of the mother plant of eight accessions that were compared using microsatellite primers. For a cytohistological analysis of the buds' development, samples were collected before the anthesis and were fixed in glutaraldehyde solution for 24h. Comparative morphological analyzes between diploid, triploid and tetraploid accessions were also performed, using five floral measures. Seeds originating from diploids had a higher germination index when compared to those from the polyploids and the ones originated from isolated inflorescences generally did not germinate. The set of results allowed to conclude that *Lippia alba* has preferentially an allogamic reproductive behavior, being different between diploids and polyploids. The cytohistological and cytometric analyzes did not allow to exclude the occurrence of apomixis reproduction. The results suggest that *Lippia alba* has alternative ways of reproduction.

Keywords: *Lippia alba*; polyploid complex; reproductive biology

Lista de figuras

Figura 1 Esquema simplificado adaptado da reprodução sexuada em angiospermas (Informações completas podem ser obtidas no site: https://doterra.com/US/en/botany-living-organism-plant-reproduction).....17

Figura 2 Tipos básicos de apomixia em angiospermas. Baseado em Nogler (1984); Naumova (1992); Richards (1997); Koltunow et al. (1995); Koltunow e Grossniklaus (2003).....21

Figura 3 A: Inflorescência da espécie Lippia alba cultivada na Estação Experimental de Plantas da UFJF. B: Morfologia interna da flor de *L.alba*.....26

Figura 4 Hipótese para a formação de diferentes citótipos no complexo poliploide *Lippia alba* (REIS et al., 2014).....28

Figura 5 Representação do isolamento de inflorescências em Lippia alba cultivadas na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.....31

Figura 6 Média de sementes produzidas em inflorescências isoladas e não isoladas de acessos diploides de Lippia alba. O asterisco indica diferença não significativa entre as médias pelo teste do qui-quadrado ($p<0,05$).....36

Figura 7 Média de sementes produzidas em inflorescências isoladas e não isoladas de acessos triploides (BGEN-24, BGEN-27, BGEN-01, BGEN-49 e BGEN-59) e tetraploides (BGEN-47, BGEN-31, BGEN-64, BGEN-45, BGEN-07, BGEN-86, BGEN-03, BGEN-06 e BGEN-87) de Lippia alba. O asterisco indica diferença significativa entre as médias pelo teste do qui-quadrado ($p<0,05$).....37

Figura 8 A e B: Número de sementes germinadas provindas de inflorescências não isoladas em diferentes acessos diploides.....39

Figura 9 Número de sementes germinadas provindas de inflorescências não isoladas em acessos triploides (BGEN-59 e BGEN-01) e tetraploides (BGEN-06, BGEN-79, BGEN-45 e BGEN-87).....40

Figura 10 Número de sementes germinadas provindas de inflorescências isoladas do acesso triploide BGEN-59 e tetraploide BGEN-86.....40

Figura 11 Variação de largura (A) e comprimento (B) de sementes oriundas de inflorescências não isoladas em acessos diploides e poliploides de *Lippia alba*.....41

Figura 12 Variação de largura (A) e comprimento (B) de sementes oriundas de inflorescências isoladas em acessos diploides e poliploides de *Lippia alba*.....42

Figura 13 Histogramas representativos da estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo do acesso tetraploide de *Lippia alba* BGEN-31. A: folha de *Lippia alba* macerada em conjunto com o padrão *Pisum sativum*; B: Semente oriunda de inflorescência isolada de *L. alba*; C-D: Semente oriunda de inflorescência não isolada de *L. alba*.....44

Figura 14 Eletroferogramas representativos dos primers 77 (A, B e C) e 229 (D, E, e F) do indivíduo diploide BGEN-97 de *Lippia alba*. A sequência das amostras correspondem à planta-mãe, sementes oriundas de inflorescências isoladas e sementes de inflorescências não isoladas.....46

Figura 15 Eletroferogramas representativos dos primers 432 (A, B e C), 440 (D, E e F) e 484 (G, H e I) do indivíduo diploide BGEN-97 da espécie *Lippia alba*. A sequência das amostras corresponde à planta-mãe (PM), sementes oriundas de inflorescências isoladas (II) e sementes de inflorescências não isoladas (INI).....47

Figura 16 Eletroferogramas representativos dos primers 77 (A e B), 60 (C e D) e 432 (E e F) do indivíduo triploide BGEN-59 da espécie *Lippia alba*. A sequência das amostras corresponde à planta-mãe (PM) e um indivíduo germinado (IG) provindo de inflorescência isolada.....48

Figura 17 Eletroferogramas representativos dos primers 229 (A e B), 473 (C e D) e 440 (E e F) do indivíduo triploide BGEN-59 da espécie *Lippia alba*. A sequência das amostras corresponde à planta-mãe (PM) e um indivíduo germinado (IG) provindo de inflorescência isolada.....49

Figura 18 Eletroferogramas representativos dos primers 432 (A, B e C) e 473 (D, E e F) do indivíduo tetraploide BGEN-07 da espécie *Lippia alba*. A sequência das amostras corresponde à planta-mãe (PM), sementes oriundas de inflorescências isoladas (II) e sementes de inflorescências não isoladas (INI).....50

Figura 19 Eletroferogramas representativos dos primers 77 (A, B e C) e 484 (D, E e F) do indivíduo tetraploide BGEN-07 da espécie *Lippia alba*. A sequência das amostras corresponde à planta-mãe (PM), sementes de inflorescências isoladas (II) e sementes de inflorescências não isoladas (INI).....51

Figura 20 Cortes citohistológicos de diferentes acessos de *L.alba*. A e B: BGEN-75 (diploide), dias 0 e 15 respectivamente; C e D: BGEN-64 (tetraploide), dias 0 e 45; E e F: BGEN-31 (tetraploide), dias 15 e 30. Legendas: AN (anteras); TE (tegumento); SE (saco embrionário); NU (nucelo); OVL (óvulo).....53

Lista de tabelas

Tabela 1 Descrição dos primers selecionados para estudo de microssatélite em *Lippia alba*.....34

Tabela 2 Número de sementes submetidas à germinação, oriundas de inflorescências isoladas e não isoladas de acessos diploides, triploides e tetraploides de *Lippia alba*.....38

Tabela 3 Média e desvio padrão de largura (mm) e comprimento (mm) de sementes oriundas de inflorescências isoladas e não isoladas em acessos diploides e poliploides de *Lippia alba*.....43

Tabela 4 Comprimento (Cpm) e largura (Lpm) da pétala maior, abertura da corola (Ac), maior diâmetro da corola (MaDc) e menor diâmetro da corola (MeDc), antes (amarela) e depois (depois) da polinização em acessos diploide, triploide e tetraploide de *Lippia alba*.....54

Lista de siglas

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BGEN	Banco do Germoplasma de Espécies Nativas
CESJ	Herbário Leopoldo Krieger
DNA	“Deoxyribonucleic Acid” - Ácido Desoxirribonucléico
EEP-UFJF	Estação Experimental de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora
G_2	Valor 4C de DNA
IP	Iodeto de Propídeo
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

Sumário

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 Reprodução nas Angiospermas..... 15
1.2 Reprodução sexuada 16
1.3 Apomixia..... 18
1.4 Ferramentas para análise reprodutiva em plantas..... 22
1.5 *Lippia alba* 25
1.6 Biologia reprodutiva e a formação de poliploides 28
2 OBJETIVOS 30
3 MATERIAL E MÉTODOS 31
3.1 Material biológico 31
3.2 Produção de sementes..... 31
3.3 Teste de germinação..... 32
3.4 Estimativa da quantidade de DNA..... 32
3.5 Análise por microssatélite 32
3.6 Análise citohistológica de botões florais 34
3.7 Avaliação de variáveis morfológicas..... 35
4 RESULTADOS 36
4.1- Produção de sementes..... 36
4.2- Germinação de sementes 38
4.3- Estimativa da quantidade de DNA 43
4.4- Análise por microssatélite 45
4.5- Análise citohistológica 52
4.6- Análise morfológica..... 54
5 DISCUSSÃO 56
6 CONCLUSÃO 63
7 REFERÊNCIAS 64

1 Introdução

1.1 Reprodução nas Angiospermas

Estima-se que o número de Angiospermas atuais ultrapasse 350.000 espécies (THE PLANT LIST, 2017). O padrão reprodutivo é um dos fatores chave na abundância, distribuição e diversidade genética dos organismos. Nas angiospermas, uma diversidade de características florais e sistemas reprodutivos evoluíram podendo variar desde a fertilização cruzada obrigatória à autofertilização obrigatória (TAKEBAYASHI e MORRELL, 2001). A polinização mais eficiente e um mecanismo de dispersão de sementes mais especializado também são fatores chaves no sucesso desses indivíduos (KARASAWA, 2009). Assim, diferentes espécies de angiospermas puderam ocupar diferentes tipos de *habitats*, tais como o deserto, montanhas e águas rasas, deixando de se desenvolver apenas em mar aberto e nas regiões polares. Outros fatores preponderantes para o sucesso das angiospermas foram: fase diploide desenvolvida e autotrófica, fase haploide reduzida, dupla fertilização e o desenvolvimento de carpelos para maior proteção das sementes (PATERNIANI, 1974). Acredita-se que as primeiras angiospermas experimentaram uma grande variedade de agentes polinizadores, sendo polinizadas pela água, vento ou animais. Contudo, foi a associação com animais que proporcionou a sua maior diversificação ao longo de sua história evolutiva (ARMBRUSTER, 2014).

O sistema reprodutivo das angiospermas, de forma geral, pode ser classificado, quanto ao modo de reprodução, nas formas sexuada e assexuada. Diversas espécies de plantas podem apresentar exclusivamente um modo de reprodução (sexual ou assexual). No caso da reprodução sexuada, o sistema de cruzamento pode ser autógamo (i.e. plantas que se autofertilizam), alógamo (plantas que apresentam fertilização cruzada, normalmente são autoincompatíveis) ou misto (plantas que se autofecundam e que apresentam fertilização cruzada) (FRYXEL, 1957; HARDER e BARRET, 2006). Normalmente, há um modo de reprodução e um

sistema de cruzamento predominante e eventos esporádicos do outro (BODANESE-ZANETTINI e CAVALLI 2003).

As formas assexuadas, por sua vez, compreendem todos os mecanismos que originam clones (geneticamente idênticos à planta mãe) tais como a propagação vegetativa, que está ligada à formação de um novo indivíduo por brotamento ou ramificação a partir de raízes, caules, folhas e inflorescências (SILVERTOWN, 2008), e a reprodução apomítica, que é a formação assexuada de sementes, com o desenvolvimento de um ou mais embriões a partir de tecidos do óvulo e omissão da meiose e dupla fecundação (BICKNELL e KOLTUNOW, 2004). Embora a origem da assexualidade provavelmente seja multifatorial (HOJSGAARD, 2014) há estudos que sugerem, como no gênero *Boechera* (Brassicaceae)**,** que uma interação entre genomas divergentes dentro de um indivíduo híbrido diploide pode permitir a transição da sexualidade para a assexualidade (BECK et al., 2011). Em outros trabalhos ainda com o gênero *Boechera*, há indícios de que a hibridação possa ser um fator associado indiretamente com a reprodução assexuada (LOVELL et al., 2013).

1.2 Reprodução sexuada

A reprodução sexuada nas plantas envolve mais especificamente os processos de formação dos gametas que ocorrem nos óvulos e no tubo polínico e que culminam com a fertilização. Como não podem escolher diretamente os parceiros reprodutivos, o resultado da reprodução sexuada nas plantas depende do pólen que chega ao estigma. O sistema de reprodução sexuado tem como consequências o aumento da recombinação gênica e a possibilidade de uma progênie competitivamente superior, assim como a redução da homozigoze (MEYNARD-SMITH, 1971).

Além destas consequências, também estão presentes neste processo a transmissão de apenas metade do material genético à próxima geração, assim como uma dependência de vetores externos e maior dispêndio estrutural e fisiológico, visto que é um processo complexo e lento quando comparado à reprodução assexuada.

Sendo assim, a reprodução sexuada nos eucariontes envolve formas de divisão celulares complexas, que terminam na manutenção dos níveis de ploidia (Fig.1) (NIKLAS, 1997, GROSBERG e STRATHMANN, 2007). Nas plantas com flores, observa-se a alternância entre duas gerações: uma esporofítica diploide e uma gametofítica haploide. Durante o desenvolvimento das linhagens germinativas, células diploides sofrem o processo de meiose formando gametas reduzidos (pólen – masculino e saco embrionário – feminino). Posteriormente, as células espermáticas se fundem à célula-ovo e ao núcleo central ocasionando a dupla-fertilização, dando origem ao embrião e ao endosperma respectivamente. O embrião por sua vez, constituirá a próxima geração esporofítica reiniciando o ciclo (SCHMIDT et al., 2015).

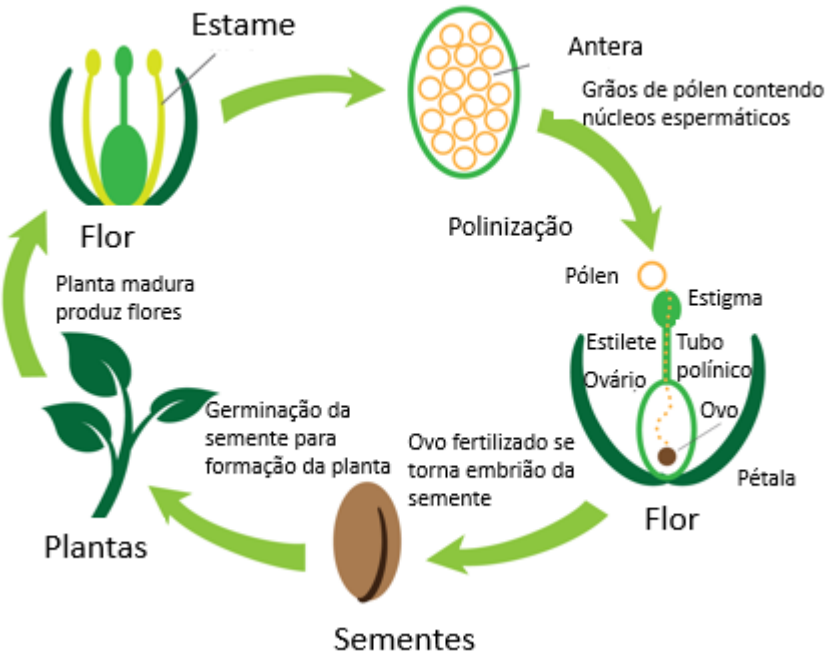


Figura 1- Esquema simplificado adaptado da reprodução sexuada em angiospermas (Informações completas podem ser obtidas no site: https://doterra.com/US/en/botany-living-organism-plant-reproduction).

1.3 Apomixia

O termo apomixia se refere ao processo de formação de sementes assexuadamente, no qual o embrião formado se origina de tecido materno, não ocorrendo o processo de meiose e fecundação (KOLTUNOW et al., 1995; SAVIDAN, 2000). O termo é sinônimo de agamospermia (RICHARDS, 1997). Visto que as plantas com sementes compreendem as gimnospermas e angiospermas, a definição de apomixia se limita a esses dois grupos. Os processos apomíticos são conhecidos em mais de 400 gêneros pertencentes a 40 famílias de plantas e é prevalente em Poaceae, Asteraceae, Rosaceae e Rutaceae (BASHAW, 1980; HANNA E BASHAW, 1987; CARMAN, 1997, HOJSGAARD et al., 2014). Embora a transição para a reprodução assexuada obrigatória seja relativamente rara entre os eucariotos, este parece ser um processo importante da evolução em plantas (MOGIE, 1990, 1992; ASKER e JERLING, 1992). No entanto, a distribuição da taxa de apomixia nas linhagens de plantas é desigual, com uma baixa taxa no grupo das angiospermas e com pouco ou nenhuma evidência em gimnospermas e antóceros (MOGIE, 1992; PICHOT et al., 2001; PARK e KATO, 2003; WHITTON et al., 2007).

Uma importante diferença entre a reprodução sexual e a apomítica é que na sexual os embriões formados são resultantes da fusão do gameta feminino e masculino, enquanto que os apomíticos são derivados apenas de tecidos maternos, sem a contribuição masculina (NOGLER, 1984; KOLTUNOW, 1993). Assim, as sementes férteis resultantes deste processo são clones com constituição genética idêntica à planta materna somada a mutações (ASKER e JERLING, 1992; KOLTUNOW, 1993; KOLTUNOW e GROSSNIKLAUS, 2003). Contudo, o que difere a apomixia de outros mecanismos de reprodução vegetativa é que a formação de sementes ocorre no órgão reprodutor feminino (CZAPIK, 1994). Dessa forma, para compreender o processo apomítico é preciso que se conheça bem o processo sexual. A compreensão dos mecanismos que regulam a apomixia é limitada devido ao caráter poliploide da maioria das plantas, baixa fertilidade em função da expressão de genes em tecidos esporofíticos e gametofíticos, e fatores como interações epistáticas entre genes, distorções na segregação, supressão de recombinação, entre outros (revisto por OZIAS-AKINS e VAN DIJK, 2007).

Devido à sua grande plasticidade ligada a linhagens poliploides, espécies apomíticas tendem a colonizar novos habitats promovendo maiores expansões geográficas (HORANDL e PAUN, 2007; DOS SANTOS et al., 2012; HOJSGAARD et al., 2014). Além disso, a apomixia acaba por se tornar uma garantia reprodutiva, principalmente em locais onde as plantas são isoladas ou em que seus polinizadores são escassos (BAKER, 1967; DOS SANTOS et al., 2012). Alguns estudos têm demonstrado que indivíduos apomíticos possuem distribuição mais ampla em regiões de maiores altitudes com relação aos de reprodução sexual, podendo ser encontrados também em grande número em regiões anteriormente glaciais (BIERZYCHUDEK, 1985; KEARNEY, 2005; HÖRANDL, 2006; HÖRANDL et al., 2008). A esse fenômeno encontrado dá-se o nome de “partenogênese geográfica” (HÖRANDL et al., 2008). Combinados ambos os tipos de reprodução (sexuada e assexuada), é possível uma rápida expansão e ao mesmo tempo manutenção da variabilidade genética, podendo levar a formação de linhagens sexuais isoladas geograficamente que se diversificam por especiação ecológica a alopátrica (HÖRANDL e HOJSGAARD, 2012).

A presença de diferentes grupos de angiospermas apresentando mecanismos apomíticos sugere que esse processo surgiu independentemente ao longo do tempo (CARMAN, 1997; VAN DIJK e VIJVERBERG, 2005). Mesmo ainda estando em discussão se é causa ou efeito da reprodução assexuada, a reprodução apomítica está normalmente associada à duplicação genômica e à hibridação, sendo encontrada em sua maioria em grupos de indivíduos alopoliploides (BICKNELL e KOLTUNOW, 2004). Apesar dessa afirmação, estudos têm demonstrado a mesma forma de reprodução em grupos autopoliploides como é o caso de *Townsendia hookeri* Beaman (THOMPSON e WHITTON, 2006), *Paspalum* L. (HOJSGAARD et al., 2008) e *Ranunculus kuepferi* Greut. et Burd. (COSENDAI et al., 2011).

O sucesso ecológico e evolutivo das plantas apomíticas está ligado à presença de uma reprodução uniparental, a um menor custo sexual, à manutenção de genótipos adaptados e também à maior habilidade de dispersão (HORANDL, 2006). Devido à possibilidade de encontrarmos a reprodução sexual e apomítica em um mesmo indivíduo ou até em um mesmo óvulo, acredita-se que a reprodução

assexuada nada mais seja do que uma desregulação no processo de gametogênese durante a reprodução sexuada (KOLTUNOW e GROSSNIKLAUS, 2003).

Burgess et al. (2014) relataram que no gênero *Amelanchier* (Rosaceae) a maior proporção de indivíduos assexuados foi encontrada nos poliploides do gênero. Alguns estudos genéticos realizados em populações naturais apomíticas, utilizando análises de compatibilidade de características revelaram um aparecimento regular de genótipos recombinantes e variantes de ploidia, sugerindo que elementos reprodutivos da sexualidade e da apomixia envolvem diferentes controles genéticos e epigenéticos que podem estar desacoplados (BASHAW et al., 1992; VAN DER HULST et al., 2000; PAUN et al., 2006; ALIYU et al., 2010; PAULE et al., 2011; COSENDAI et al., 2013; OGAWA et al., 2013). Acredita-se que o *impriting* genômico assim como a metilação do DNA em si também podem estar relacionados à complexidade do processo apomítico (CHAUDHURY, 2001; KRAVTCHENKO et al., 2014; TAŞKIN et al., 2017), regulando o desenvolvimento do embrião e do endosperma (LAW e JACOBSEN, 2010).

Os mecanismos apomíticos são subdivididos em duas categorias: gametofítica e esporofítica (Fig. 2), dependendo se o desenvolvimento embrionário ocorre a partir do saco embrionário (gametofítica) ou de células somáticas diploides presentes no óvulo (esporofítica) (NOGLER, 1984; KOLTUNOW, 1993).

O processo de apomixia gametofítica pode ser dividido em diplosporia ou aposporia, baseado na célula precursora que dará origem ao embrião diploide através de mitose (Fig. 2). Na chamada diplosporia, a célula precursora é a célula-mãe do megásporo que não sofre o processo regular de meiose se diferenciando diretamente em um saco embrionário. Já na aposporia, a célula precursora é uma célula diploide somática chamada célula inicial apospórica posicionada adjacente a célula-mãe do megásporo (HAND e KOLTUNOW, 2014).

Na chamada apomixia esporofítica temos que o processo de desenvolvimento do saco embrionário segue o mesmo processo da reprodução sexuada. No entanto, durante a mitose do megásporo funcional, células diploides somáticas do óvulo que se encontram ao redor do saco embrionário se diferenciam e passam a ter um comportamento embriogênico (Fig.2).

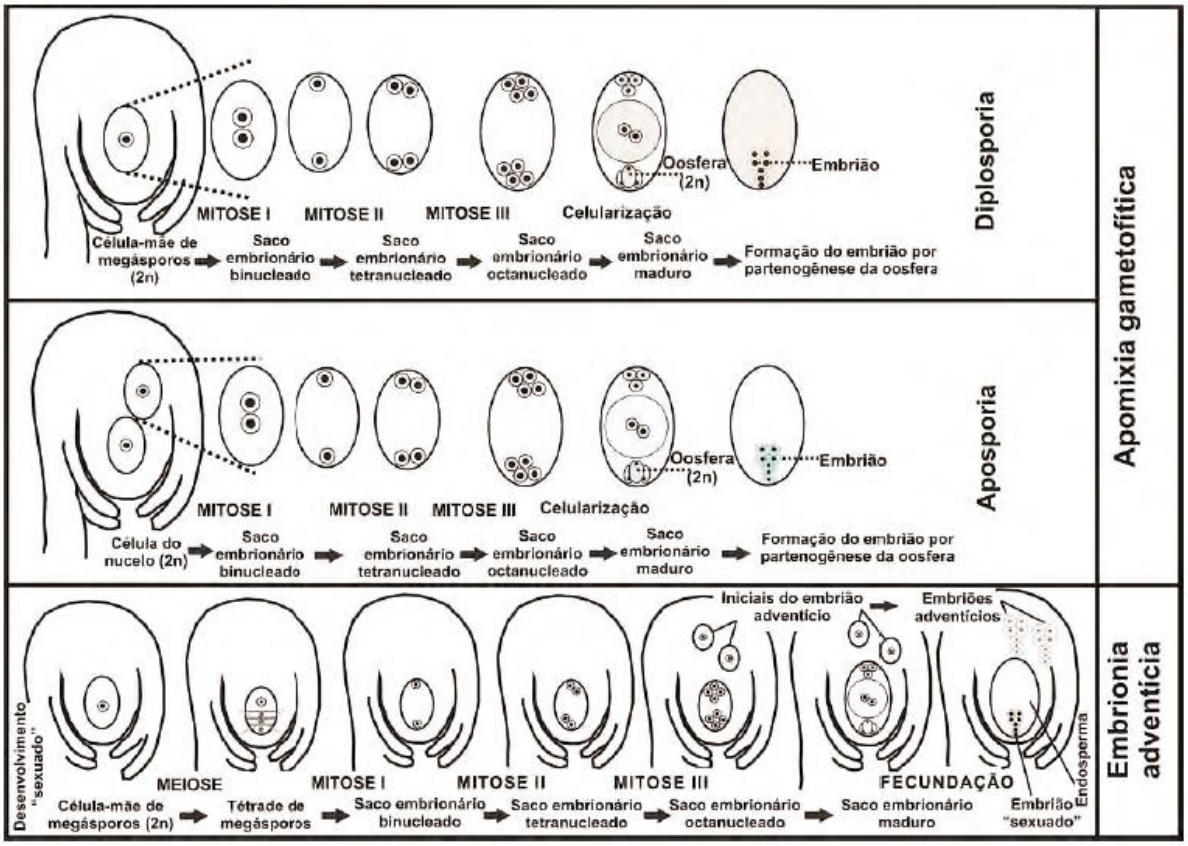


Figura 2: Tipos básicos de apomixia em angiospermas. Baseado em Nogler (1984); Naumova (1992); Richards (1997); Koltunow *et al.* (1995); Koltunow e Grossniklaus (2003).

De acordo com Hojsgaard et al. (2014), a aposporia se apresenta em maior frequência nas angiospermas do que a diplosporia. Devido a sua totipotência e flexibilidade genética, as células podem realizar várias rotas para uma possível apomixia. Já a diplosporia, como está relacionada com uma disfunção meiótica direta, é mais difícil de ser atingida em populações naturais. Sugere-se que as angiospermas em geral têm a capacidade de transitar da reprodução sexual para a apomixia, sendo principalmente a apomixia gametofítica observada em clados mais diversos e complexos. Táxons apomíticos tendem a se diversificar rapidamente através de mutações acumuladas levando a divergências alélicas vantajosas e deletérias (MARK WELCH e MESELSON, 2000; PELLINO et al., 2013).

Apesar de os estudos demonstrarem a apomixia como herança dominante com a presença de um único alelo responsável pelo controle do processo, em trabalhos com espécies do gênero *Taraxacum* e *Erigeron* foram identificados dois loci independentes controlando a diplosporia e a partenogênese (VAN DIJK et al., 1999; NOYES e RIESEBERG, 2000); situação similar ocorre com espécies de *Hypericum, Poa, Hieracium e Cenchrus* (ALBERTINI et al., 2001; CATANACH et al., 2006; SCHALLAU et al., 2010; CONNER et al., 2013). Em alguns casos, a compreensão da relação entre indivíduos de um mesmo táxon baseada no modelo de reprodução é dificultada pela presença de uma variação no sistema reprodutivo, como o que ocorre no gênero *Rubus l*. (PRATT e EINSET, 1955; GERLACH, 1965; ŠARHANOVA et al., 2012; SOCHOR et al., 2015).

O estudo da apomixia vem aumentando devido a interesses não só em pesquisas evolutivas mas do ponto de vista econômico, possibilitando abrir novas áreas no melhoramento de plantas e na agricultura (SAVIDAN e DUJARDIN 1992; DALL'AGNOL e SCHIFINO-WHITTMANN, 2005). O maior benefício de uma "tecnologia apomítica" (SPILLANE et al., 2004) para a agricultura seria a utilização generalizada da fixação do vigor de híbridos em plantas cultivadas.

1.4 Ferramentas para análise reprodutiva em plantas

Estudos moleculares e citológicos relacionados à reprodução de plantas especialmente ligados a apomixia gametofítica e esporofítica têm avançado em sistemas modelo como em *Arabidopsis* (GERASHCHENKOV et al., 2015) e *Brachiaria* (WORTHINGTON et al., 2016). Para alguns gêneros há uma considerável quantidade de informações acerca do controle genético e desenvolvimento citológico das principais características apospóricas. Dentre eles podemos citar *Hieracium sp*. (KOLTUNOW et al., 1998; TUCKER et al., 2001; OKADA et al., 2013; SHIRASAWA et al., 2015; RABIGER et al., 2016), *Poa pratensis* (MATZK, 1991; BARCACCIA et al., 1998; ALBERTINI et al., 2001; TIAN et al., 2013), *Brachiaria decumbens* (PESSINO et al., 1997), *Pennisetum squamulatum* (OZIAS-AKINS et al., 1993, 1998; GUSTINE e SHERWOOD, 1997; ROCHE et al., 1999), *Hypericum perforatum* (GALLA, 2011) e *Arabis holboellii* (NAUMOVA et al., 2001).

Em uma abordagem molecular, genes relacionados a respostas a estímulos, processos metabólicos e de desenvolvimento podem estar ligados a apomixia (CORDLE et al., 2012). Adicionalmente alguns retrotransposons identificados que carregam cópias de fragmentos de genes codificantes de proteínas ligados ao processo sexuado e assexuado foram descritos em *Paspalum notatum* (FELITTI et al., 2011). Em *Brachiaria brizantha*, por sua vez, os genes BbrizUBCE, BbrizE1F4 e BbrizE1F são os mais indicados para a análise de expressão em ovário para estudos reprodutivos (SILVEIRA et al.,2009). Já os marcadores moleculares tornaram-se ferramentas muito eficientes no melhoramento de plantas porque permitem uma investigação genética de traços quantitativos e a seleção precoce de genótipos desejados. Um exemplo foi o trabalho desenvolvido por GARCÍA et al.(1999), que objetivou identificar, através do controle genético do mecanismo apomítico do embrião nucelar em citrus, marcadores moleculares associados que possam ser utilizados para aplicar a seleção assistida por marcador (MAS). Já no trabalho de GE e SUN (1999), foram utilizados marcadores ISSR e aloenzimas para a detecção de taxa de cruzamento e estrutura genética populacional na espécie *Aegiceras corniculatum,* visando a conservação da mesma. Demais marcadores como RAPD, AFLP e microssatélites também podem estar ligados à detecção do processo assexuado como encontrado em triploides da espécie *Pospalum notatum* e até mesmo utilizados na detecção de troca genética entre populações de *Rubus idaeus, Taraxacum tortilobum, T. vindobonensis* e de espécies do gênero *Crataegus* (MES, 1998; LO et al.,2009; REBOZZIO et al.,2012). Os microssatélites por sua vez, têm se destacado no estudo de aspectos reprodutivos de angiospermas. São sequências de até dez pares de base que constituem uma subcategoria de repetições em tandem possuindo relevância em estudos evolutivos devido a sua instabilidade, visto que sua presença está ligada em sua maioria, a regiões não codificantes do DNA. Esses marcadores têm sido utilizados na genotipagem de plantas devido ao volume de informações fornecidas, à sua codominância e ao fato de serem marcadores genéticos multi-alélicos (MASON, 2015; VIEIRA et al., 2016). Segundo Levinson e Gutman (1987), essa variação no número de repetições pode ter sua origem no processo de *crossing-over* desigual ou erro durante a replicação do DNA.

Outras importantes características também podem ser utilizadas para a detecção de uma possível apomixia. Dentre elas, temos sua associação à incidência de poliploidia, normalmente detectada através de estudos citogenéticos e de estimativa da quantidade de DNA (CARMAN, 1997; PENTEADO et al., 2000). A presença de múltiplos embriões e a ausência de antípodas assim como a presença de múltiplos sacos embrionários apospóricos, através da realização de técnicas de clareamento ou por secções histológicas (YOUNG et al., 1979; LAKSHMANAN e AMBEGAOKAR, 1984; VIELLE et al., 1995), constitui outra abordagem bastante utilizada. O estudo de distúrbios na meiose feminina através da análise citogenética do processo também pode fornecer indícios da presença do processo apomítico (QUARIN, 1980; VALLE, 1986).

A citometria de fluxo tem demonstrado ser uma técnica rápida e eficiente na análise da reprodução de plantas. No trabalho de Hörandl et al. (2011) espécies de *Alpes europeus* foram analisadas indicando que a apomixia gametofítica é rara em altitudes muitos elevadas, sendo a autofecundação facultativa uma alternativa para esse ambiente (HÖRANDL, 2006). A partir da análise da quantidade de DNA do embrião e do endosperma é possível supor o modo de reprodução realizado pelo indivíduo. Sementes com quantidade 2C de DNA e endosperma 3C sugerem a ocorrência de reprodução sexual; já indivíduos com embriões que apresentam quantidade 2C e 3C associados com endosperma 4C (autônomo) e 5C (pseudogâmico) indicam sacos embrionários não-reduzidos. A partenogênese pode ser indicada com a presença de embriões 1C e 2C e endospermas 3C, 4C e 5C. A técnica de citometria utilizando sementes (FCSS) que utiliza sementes dormentes inteiras é uma ferramenta simples e eficiente para a triagem do modo de reprodução aplicável tanto em monocotiledôneas quanto em eudicotiledôneas (DOLEZEL et al., 2007).

1.5 *Lippia alba*

A espécie *Lippia alba* (Verbenaceae) (Fig.3), é conhecida por vários nomes populares como erva cidreira, falsa melissa, chá de tabuleiro, erva cidreira do campo, salva do Brasil, salva-limão e erva cidreira brava (PIERRE, 2004). Sua distribuição varia desde regiões de clima tropical até regiões de clima temperado, podendo ser encontradas em margens de rios, lagos e açudes onde os solos são mais arenosos (CORREA et al., 1994; STEFANINI et al., 2001). Seus componentes são de grande importância medicinal devido a diversas atividades biológicas como atividade analgésica, antitérmica, bactericida, acaricida, fungicida, inseticida, anticonvulsivante, antiinflamatória, antiparasitária, antiespasmódica, sedativa e também na utilização como repelente (VALE et al., 1999; PASCUAL et al., 2001; AGUIAR et al., 2008; SHUKLA et al., 2009 ; CUNHA et al., 2010; BLANCO et al., 2013; NICULAU et al., 2013; TONI et al., 2014; LIMA et al., 2015; PEIXOTO et al., 2015; SOUSA et al., 2015; SOARES et al., 2016). Seu extrato hidroetanólico também está ligado ao tratamento de enxaqueca em mulheres (CARMONA et al., 2013).

Os indivíduos da espécie apresentam hábito arbustivo e altura de cerca de dois metros, possuindo muitas ramificações laterais e um ciclo de vida perene com rápido crescimento (SALIMENA, 2000). As flores se apresentam nas colorações violácea, rosa ou branca, sendo consideradas alógamas e possuindo os insetos como principal polinizador (VENÂNCIO et al., 2016). Sua filotaxia é oposta dística apresentando folhas simples de limbo inteiro com disposição de um par por nó, sendo classificadas como serrilhadas oblongas agudas (SCHOCKEN, 2007).

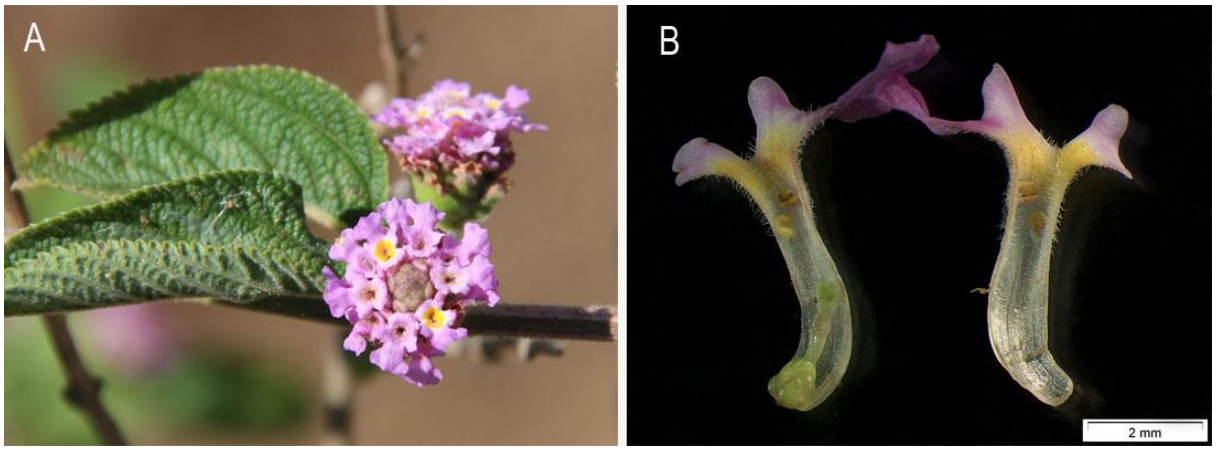


Figura 3- A: Inflorescência da espécie *Lippia alba* cultivada na Estação Experimental de Plantas da UFJF. B: Morfologia interna da flor de *L.alba*.

Adicionalmente, a espécie apresenta ampla plasticidade fenotípica, possuindo variação morfológica significativa (TORRES e LOPEZ, 2007), assim como diferenças nas dimensões da lâmina foliar e na densidade e tipo de tricomas presentes no limbo. Estudo relacionado ao porte e hábito de diferentes acessos da espécie mantidos sob mesmas condições ambientais também indicou ampla variação dos indivíduos (VALE, 2010).

Com relação a biologia reprodutiva da espécie, pouco se sabe sobre seu comportamento, destacando-se o estudo recente de Venâncio et al. (2016), acerca de sua polinização e floração em que é relatado a presença de flores abertas durante todo o ano, sendo visitadas por diferentes tipos de insetos, incluindo o principal deles, a abelha.

Apesar de diversos estudos realizados acerca das propriedades farmacológicas e constituição química de *L. alba*, pouco se sabe sobre a biologia da espécie, ressaltando-se que os principais trabalhos foram realizados pelo nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Como inicialmente descrito por Bose e Choudhy (1960) e Brandão (2007) *L. alba* é possivelmente uma espécie diploide que apresenta 2n=30 cromossomos. Já no trabalho de Pierre *et al*. (2011) estudou-se a cariologia de três quimiotipos de *L. alba* (citral, carvona e linalol). Foi observado que estes apresentam

diferenças no número e morfologia dos cromossomos. O quimiotipo citral apresentou 2n=30 cromossomos enquanto o quimiotipo carvona 2n=60, ao passo que no quimiotipo linalol houve uma grande variação numérica de 2n=12 a 60 cromossomos, tratando-se de um quimiotipo mixoploide. Variações nas quantidades de DNA estimadas por citometria de fluxo também foram observadas para estes quimiotipos (CAMPOS, 2011), tendo-se detectado variações compatíveis com a hipótese de autopoliploidia natural. Por outro lado, Sousa et al. (2009) observaram quimiotipos distintos em cinco acessos de *L. alba* com 2n=30. Este fato aponta para a complexidade dentro da espécie e a necessidade de investigações mais amplas, envolvendo maior número de acessos. Recentemente, análises revelaram outros três novos números cromossômicos para a espécie, evidenciando que a variação é ainda maior que aquela anteriormente descrita (REIS et al., 2014).

De acordo com Reis et al. (2014), a observação de pólens maiores principalmente nos diploides e outros citótipos pode estar relacionado à não redução gamética, podendo este ser o principal mecanismo de formação de poliploides na espécie, assim como ocorre em outros sistemas (RAMSEY e SCHEMSKE, 2002; SOLTIS et al., 2004; LARROSA et al., 2012). Viccini et al. (2014) relataram variação na produção de metabólitos secundários entre diferentes citótipos de *L.alba*. Os diploides e tetraploides apresentaram citral como componente principal, e o linalol como componente principal em triploides, sugerindo uma possível correlação entre os químicos e a quantidade de DNA.

Técnicas como a hibridização fluorescente *in situ (*FISH), bandeamento e impregnação com nitrato de prata auxiliaram na análise de indivíduos diploides (2n=30) e tetraploides (2n=60) da espécie (BRANDÃO et al., 2007; SOUSA et al., 2009; PIERRE, 2004; 2008). Esses trabalhos demonstram que além da plasticidade fenotípica, a espécie apresenta ampla plasticidade genômica. Com base nos diferentes dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa foi proposto por Reis et al. (2014) uma hipótese para a formação do complexo poliploide (Fig.4).

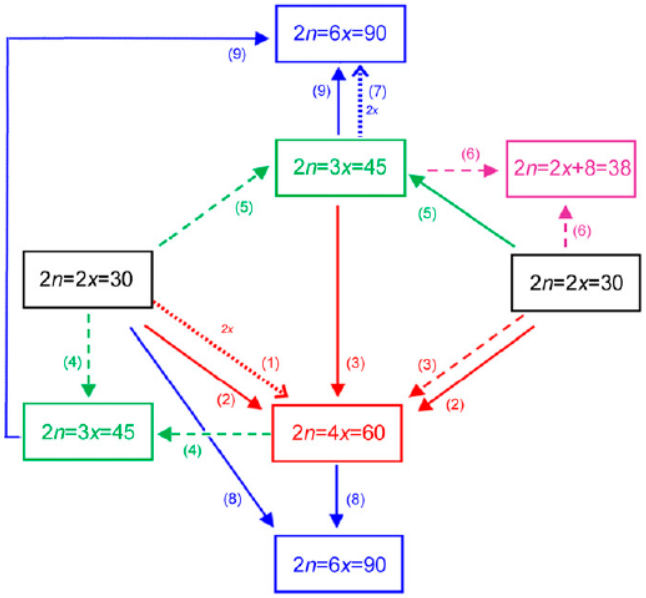


Figura 4- Hipótese para a formação de diferentes citótipos no complexo poliploide *Lippia alba* (REIS et al., 2014).

1.6 Biologia reprodutiva e a formação de poliploides

A poliploidização é conhecida como o aumento do tamanho do genoma provocado por uma herança de um conjunto adicional (ou conjuntos) de cromossomos. Esses conjuntos duplicados podem ser provenientes do mesmo indivíduo ("autopoliploidia") ou ainda da hibridação de duas espécies diferentes ("alopoliploidia") (OTTO, 2007). A análise através de pequenas sequências do genoma, definidas como EST (*Expressed Sequence Tag*) e também de regiões duplicadas, levaram à conclusão de que o processo de duplicação genômica ocorreu repetidamente durante a evolução das plantas e mesmo aquelas que possuem pequenos genomas, tais como *Arabidopsis thaliana*, foram impactadas pela poliploidia (WENDEL, 2000; SEOIGHE, 2003).

Análises genômicas indicam que uma poliploidização remota pode ter ocorrido anteriormente à radiação das plantas com flores (BOWERS et al., 2003), sugerindo que 100% das angiospermas são paleopoliploides (JIAO et al., 2011). Como exemplo, algumas espécies possuem uma variação intraespecífica natural como é encontrado em *Paspalum quadrifarium*, Poaceae (SPERANZA et al.,2003); *Senecio carniolicus,* Asteraceae (SUDA et al., 2007); *Solidago altissima*, Asteraceae

(HALVERSON et al., 2008); *Medicago sativa*, Fabaceae (HAVANANDA et al., 2011); *Turnera sidoides*, Turneraceae (KOVALSKY e NEFFA, 2012) e *Phragmites australis*, Poaceae (NAKAGAWA et al., 2013), entre outros.

Sabe-se que a biologia reprodutiva de determinada espécie pode influenciar de maneira significativa sua trajetória evolutiva assim como seu sucesso a longo prazo (BARRINGER, 2007). Por ser um fator modelado tanto pelo ambiente como pelos genes, a reprodução por si não é um evento estático, mas sim em constante mudança (BARRET e ECKERT, 1990).

Na natureza, a formação de indivíduos poliploides pode ocorrer de duas maneiras de acordo com DeWet (1980): a primeira é através de duplicação cromossômica somática, sendo um método muito utilizado em programas de melhoramento, mas dificílimo de ocorrer naturalmente; a segunda é através de uma não redução gamética durante a gametogênese (RAMANNA e JACOBSEN, 2003). Em suma, a formação de gametas não reduzidos acaba por ser a principal força que leva à formação de poliploides naturais (BRETAGNOLLE e THOMPSON, 1995; RAMSEY e SCHEMSKE, 1998).

Como sugerido no caso de *Lippia alba*, na autopoliploidia, o processo de meiose é afetado pela presença de múltiplas cópias de homólogos além de levar à formação de gametas inviáveis quando a segregação cromossômica é desbalanceada. Essas anormalidades na microsporogênese têm como consequência a baixa fertilidade de poliploides (HE et al., 2011; REIS et al., 2014). Sendo assim, propõe-se que a condição poliploide só é viável quando aliada à propagação vegetativa ou associada à apomixia (QUARIN, 2001). Neste sentido, o presente estudo visa contribuir para melhor entender a estrutura genética em *Lippia alba* elucidando aspectos de sua biologia reprodutiva que venham, por consequência, trazer novas informações sobre a possibilidade de origem dos diferentes citótipos.

2 Objetivos

O trabalho teve como objetivo geral investigar aspectos da biologia reprodutiva do complexo poliploide *Lippia alba*.

Os objetivos específicos foram:

a) Analisar a quantidade de sementes produzidas por botões isolados e não isolados de três níveis de ploidia;
b) Avaliar a capacidade de germinação de sementes obtidas de botões isolados e não isolados de acessos pertencentes a diferentes níveis de ploidia;
c) Estimar, por citometria de fluxo, a quantidade de DNA em sementes obtidas a partir de botões isolados e não isolados;
d) Genotipar, por meio de marcadores microssatélites, o perfil genômico comparado de sementes e suas respectivas plantas-mãe;
e) Analisar o padrão de desenvolvimento de botões de inflorescências em diferentes fases de desenvolvimento através da citohistologia;
f) Analisar variáveis morfológicas florais entre três diferentes citótipos.

3 Material e métodos

3.1 Material biológico

Quarenta e um acessos da espécie *Lippia alba* representativos de diferentes números cromossômicos mantidos na Estação Experimental de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora (EEP-UFJF) foram utilizados no estudo. Exemplares voucher foram depositados no Herbário CESJ conforme técnicas usuais.

3.2 Produção de sementes

Botões florais de 41 acessos de diferentes níveis de ploidia de *Lippia alba* (27 diploides; 5 triploides e 9 tetraploides) foram isolados durante o período de março de 2015 a dezembro de 2016. Após o período de floração, quantificou-se o número de sementes oriundas de cada inflorescência isolada e não isolada (Figura 5). Após a coleta e quantificação das sementes, comparou-se o número médio de sementes por inflorescência através do teste do qui-quadrado a 5%.



Figura 5: Representação do isolamento de inflorescências em *Lippia alba* cultivadas na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

3.3 Teste de germinação

Sementes recém coletadas oriundas de inflorescências isoladas e não isoladas de 20 acessos (14 diploides; 2 triploides e 4 tetraploides) foram coletadas e, posteriormente, seu comprimento e largura foram medidos por meio de um paquímetro de aço 6. Em seguida as sementes foram colocadas para germinar em placa de petri (9 cm de diâmetro) umedecida e submetidas ao regime de temperatura de 6 horas a 25°C, seguidas de 4 horas a 40°C, 4 horas a 25°C e 10 horas a 18°C.

3.4 Estimativa da quantidade de DNA

Foram utilizadas sementes provindas de inflorescências isoladas e não isoladas de um único acesso tetraploide BGEN-31, devido a disponibilidade de sementes nos experimentos finais. Uma única semente por vez foi macerada por meio de um bisturi em uma placa de Petri contendo 0,5 mL do tampão de extração nuclear Marie (MARIE e BROWN, 1993) a 4°C. A solução foi filtrada em malha de 30 µm e corada com iodeto de propídeo. A amostra de folha, representando o controle, foi triturada em 0,8 mL do tampão LB01, filtrada em malha de nylon (Partec®) de 30 µm e corada com iodeto de propídeo. As amostras foram avaliadas no equipamento Facscanto II (Beckton Dickinson).

3.5 Análise por microssatélite

A fim de se obter quantidade de DNA suficiente para análise, optou-se por extrair o DNA de um grupo de quatro sementes (Doyle, 1990 com modificações). Cada grupo de quatro sementes constituiu uma amostra. O procedimento foi adotado para sementes oriundas de inflorescências isoladas e não isoladas. Além das amostras de DNA obtidas das sementes, folhas das plantas-mãe dos oito acessos selecionados previamente com base nos diferentes comportamentos de produção de sementes entre os diferentes citótipos (BGEN-75; BGEN-97; BGEN-24; BGEN-31; BGEN-86; BGEN-59; BGEN-03 e BGEN-07) foram maceradas em nitrogênio líquido para extração do DNA. A amostra do indivíduo BGEN-59 foi a

única em que a extração de DNA da progênie foi realizada a partir de folha, visto que foi o único acesso para o qual houve germinação de semente provinda de inflorescência isolada. Imediatamente após a maceração, foram adicionados 800 µL de tampão CTAB, pré-aquecido a 65ºC, contendo Tris-HCl 100 mM (pH 8), EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, 2% de CTAB, 1% de PVP e 0,002% de 2-mercaptoetanol. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65ºC por 30 min e homogeneizadas a cada 5 min. As proteínas foram removidas em duas etapas, com a adição de 2/3 do volume da amostra (aproximadamente 500 µL) de uma solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As amostras foram posteriormente centrifugadas por 10 min a 14000rpm, recuperando-se o sobrenadante. O DNA foi precipitado com 0,54% (v/v) de isopropanol gelado e 0,08% (v/v) de acetado de amônio a -20° C por 30 min. O material foi centrifugado a 14000 rpm por 10 min descartando-se o sobrenadante e lavando-se o precipitado em 700 µL de etanol 70% gelado e uma vez em etanol 95% também gelado. O *pellet* foi seco *overnight* à temperatura ambiente e ressuspendido em 30 µL de água ultra pura autoclavada. As amostras foram incubadas a 4°C durante 24 horas para ressuspensão completa do DNA e foram armazenadas a -20 °C. A concentração de DNA das amostras foi estimada por leitura em espectrômetro nanométrico (Nanodrop).

Para amplificação do DNA foram utilizados 8 primers (Tabela 1) desenvolvidos para *Lippia alba* (dados não publicados). Os produtos florescentes foram detectados no laboratório de genética molecular da Embrapa Gado de Leite, por eletroforese capilar usando o sequenciador MegaBACE1000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) que possibilita identificar diferenças de até 1 pb entre um alelo e outro.

A identificação dos alelos e tamanho dos fragmentos foi aferido utilizando o software *Fragment Profile* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Tabela 1: Descrição dos primers selecionados para estudo de microssatélite em *Lippia alba.*

Loci	Primers	Sequência	Tipo de Fluorescência	Temperatura de anelamento (°C)
60	60F	*TAGGAGTGGGGTTTCTATTTC	HEX	57
	60R	CGTTACAGCTTGGTTAGAATG		
77	77F	*AAGGTCACGTAAACATACCG	FAM	56
	77R	AGGAGAAGCATGAGCATGTA		
229	229F	*GAGGAAGTTTCCTGTACCAGT	HEX	50
	229R	GTGTACAGAGAGATGGCAAAG		
412	412F	*CCTCTCTCGTTCTCACTGAC	FAM	61
	412R	CAAGTTTTCTCACACTCGTTC		
432	432F	*GTCTTCGTCGTCGTCATT	FAM	56
	432R	CAATATAGTCGCCTGTGTCTC		
440	440F	*GCAAACTAGTGGAAAGATGTC	HEX	50
	440R	CCAAACACTCACTGCTTTTAC		
473	473F	*GAAACAATATCTCTCGTGTGC	FAM	59
	473R	GGTAGCTTCCGAGAAAACA		
484	484F	*GCCTAGTCAATCTTGGACAAT	HEX	55
	484R	TTGTCATCGAGACTTATCTCC		

3.6 Análise citohistológica de botões florais

Amostras dos botões florais coletados em diferentes estágios de desenvolvimento de *Lippia alba* foram fixadas em solução de glutaraldeído (Karnovsky, 1965, modificado – 2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 3% sacarose, $CaCl_2$ 5 µM em tampão cacodilato 0,1 M pH 6,8), por 24 horas. Todo o procedimento de preparo das lâminas foi realizado no Laboratório de Anatomia e Morfogênese Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Primeiramente, as amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Após a polimerização, as amostras foram seccionadas com auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 - Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) e com utilização de navalhas de vidro descartáveis. Os cortes, de 5 µm de espessura, foram aderidos em lâminas

histológicas e corados com azul de toluidina (O'BRIEN e MCCULLY, 1981), com pH 4,4. Após a secagem, as lâminas foram montadas em resina sintética Permount. A captura de imagens foi realizada utilizando fotomicroscópio (AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema U-Photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic. Os resultados apresentados pertencem a coletas realizadas de 15 em 15 dias (0, 15, 30 e 45) em acessos diploides e tetraploides de acordo com a disponibilidade de material biológico.

3.7- Avaliação de variáveis morfológicas

Foi realizada a coleta de seis inflorescências frescas de cada indivíduo representativo de três níveis de ploidia (diploide, triploide e tetraploide). Para cada nível de ploidia, foram coletadas três inflorescências com corola amarela (antes da polinização) e três com corola roxa (depois da polinização). Dentro de cada inflorescência foram retiradas três flores. A média dessas flores por sua vez foi a medida utilizada para a análise estatística. As imagens foram documentadas em microscópio acoplado à lupa pertencente ao Laboratório de Entomologia da Embrapa Gado de Leite. Avaliou-se o comprimento e largura da pétala maior, diâmetro de abertura da corola, maior diâmetro da corola e menor diâmetro da corola. As médias foram comparadas pelo teste t a 5%.

4 Resultados

4.1- Produção de sementes

Com relação aos indivíduos diploides, pode-se observar a presença de 13 acessos que não produziram nenhuma semente quando suas inflorescências foram isoladas: BGEN-39, BGEN-77, BGEN-71, BGEN-67, BGEN-74, BGEN-30, BGEN-89, BGEN-11, BGEN-73, BGEN-17, BGEN-20, BGEN-58 e BGEN-56. Outros 14 foram capazes de produzir sementes sendo a maioria deles em pequena quantidade: BGEN-72, BGEN-02, BGEN-57, BGEN-21, BGEN-65, BGEN-48, BGEN-13 e BGEN-78, BGEN-88, BGEN-46, BGEN-80, BGEN-75, BGEN-09 e BGEN-97. Apenas um indivíduo (BGEN-02) apresentou diferença não significativa entre as médias de sementes provindas do isolamento e não isolamento, provavelmente devido ao menor tamanho amostral.

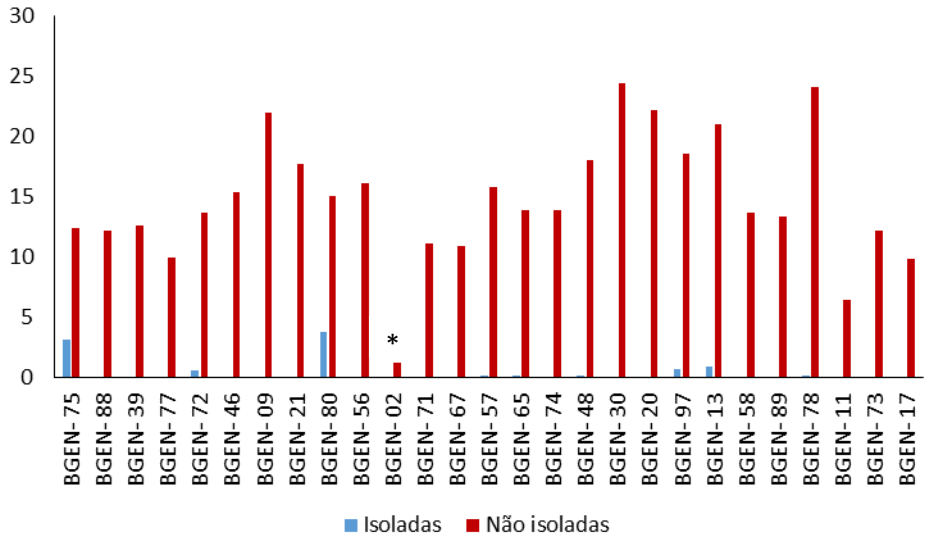


Figura 6- Média de sementes produzidas em inflorescências isoladas e não isoladas de acessos diploides de *Lippia alba*. O asterisco indica diferença não significativa entre as médias pelo teste do qui-quadrado ($p<0,05$).

Ao se analisar a produção de sementes dos indivíduos poliploides (triploides e tetraploides) (Fig.7), observou-se, com exceção do triploide BGEN-49, que todos os indivíduos produziram sementes quando as inflorescências foram isoladas. Diferentemente dos diploides, praticamente todos os acessos não tiveram diferença significativa entre as médias de sementes provindas do isolamento e não isolamento, com exceção do indivíduo BGEN-27.

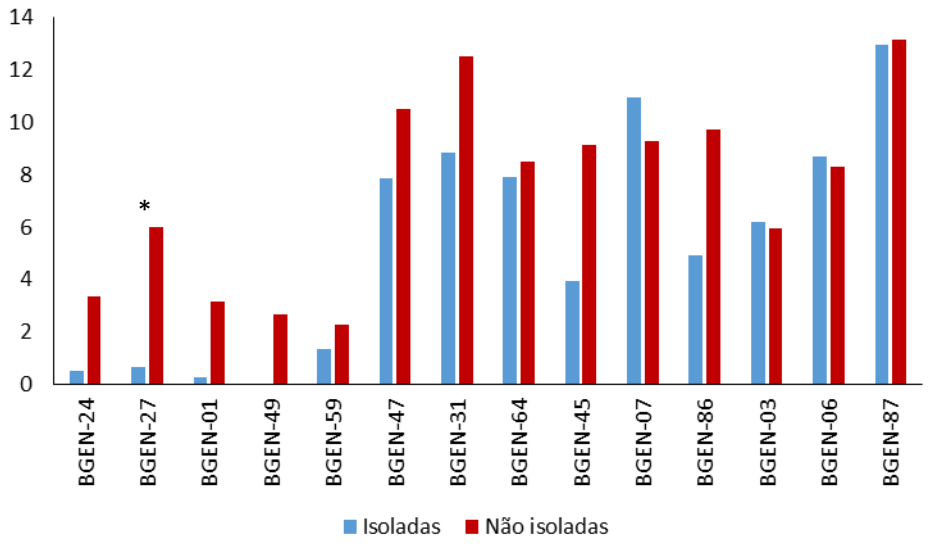


Figura 7- Média de sementes produzidas em inflorescências isoladas e não isoladas de acessos triploides (BGEN-24, BGEN-27, BGEN-01, BGEN-49 e BGEN-59) e tetraploides (BGEN-47, BGEN-31, BGEN-64, BGEN-45, BGEN-07, BGEN-86, BGEN-03, BGEN-06 e BGEN-87) de *Lippia alba*. O asterisco indica diferença significativa entre as médias pelo teste do qui-quadrado ($p<0,05$).

4.2- Germinação de sementes

Sementes de vinte acessos representativos de três níveis de ploidia (diploide, triploide e tetraploide) foram submetidas à germinação (Tabela 2).

Tabela 2: Número de sementes submetidas à germinação, oriundas de inflorescências isoladas e não isoladas de acessos diploides, triploides e tetraploides de *Lippia alba*.

Acessos	Nível de Ploidia	Inflorescências Isoladas	Inflorescências não isoladas
BGEN- 65	DIPLOIDE	3	10
BGEN- 75	DIPLOIDE	0	10
BGEN- 77	DIPLOIDE	0	20
BGEN- 89	DIPLOIDE	0	20
BGEN- 11	DIPLOIDE	0	20
BGEN- 56	DIPLOIDE	0	20
BGEN- 73	DIPLOIDE	0	20
BGEN- 97	DIPLOIDE	1	20
BGEN- 80	DIPLOIDE	20	20
BGEN- 46	DIPLOIDE	0	20
BGEN- 39	DIPLOIDE	0	20
BGEN- 17	DIPLOIDE	0	20
BGEN- 58	DIPLOIDE	0	20
BGEN- 48	DIPLOIDE	0	20
BGEN- 59	TRIPLOIDE	20	20
BGEN- 01	TRIPLOIDE	2	20
BGEN- 79	TETRAPLOIDE	8	5
BGEN- 45	TETRAPLOIDE	14	14
BGEN- 87	TETRAPLOIDE	37	37
BGEN- 86	TETRAPLOIDE	20	20

A porcentagem de germinação desses acessos pode ser observada nas figuras 8, 9 e 10. Os maiores índices de germinação foram encontrados, em sua maioria, nos indivíduos diploides que compreendem os acessos BGEN-65, BGEN-75, BGEN-77, BGEN-89, BGEN-11, BGEN-56, BGEN-73, BGEN-97, BGEN-80, BGEN-46, BGEN-39, BGEN-17, BGEN-58 e BGEN-48. Dentre os poliploides (Fig. 9) o indivíduo que apresentou a maior porcentagem de germinação foi o acesso triploide BGEN-59, sendo este acesso juntamente com o BGEN-86, os únicos que tiveram sementes oriundas de inflorescências isoladas germinadas (Fig. 10).

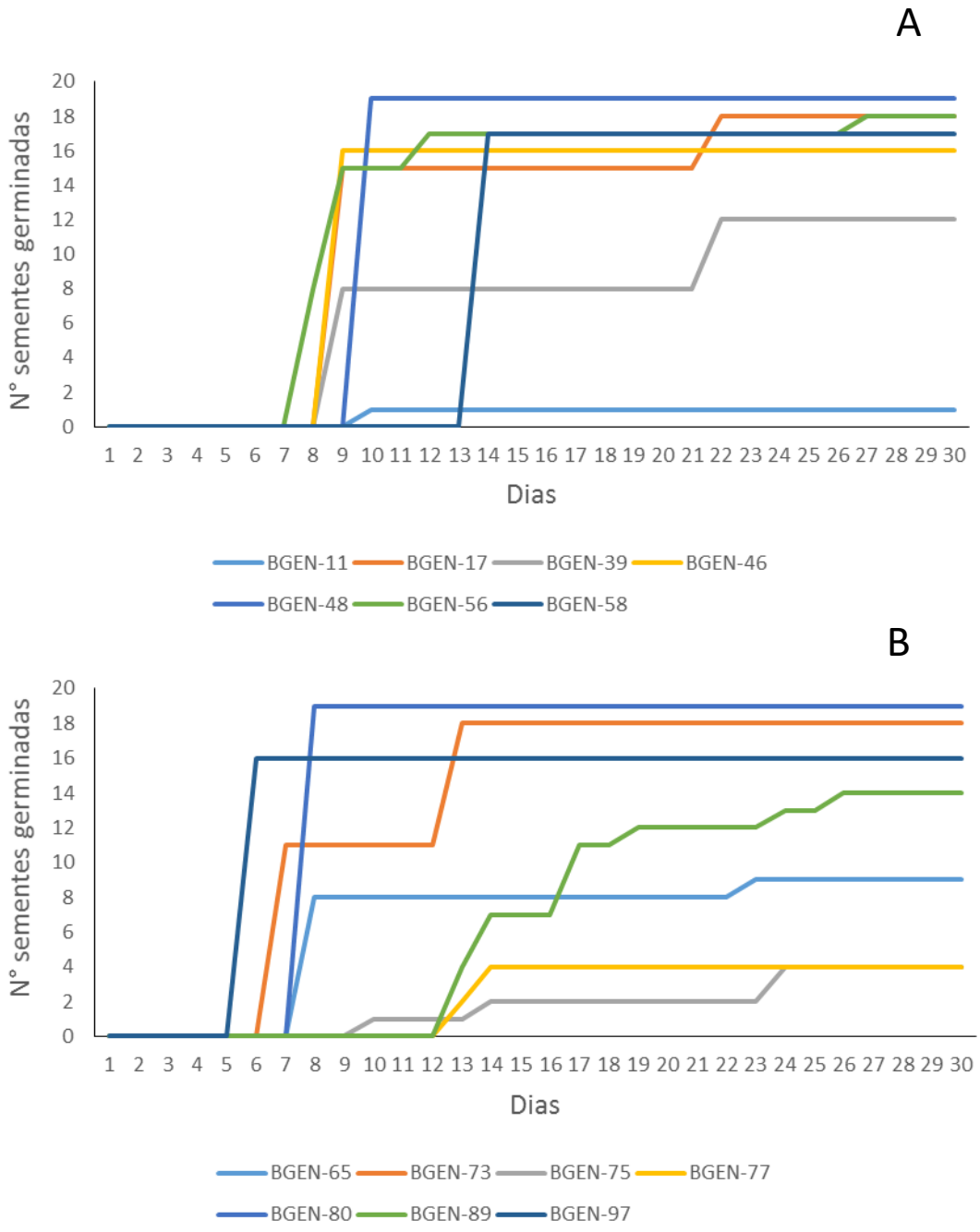


Figura 8: A e B: Número de sementes germinadas provindas de inflorescências não isoladas em diferentes acessos diploides.

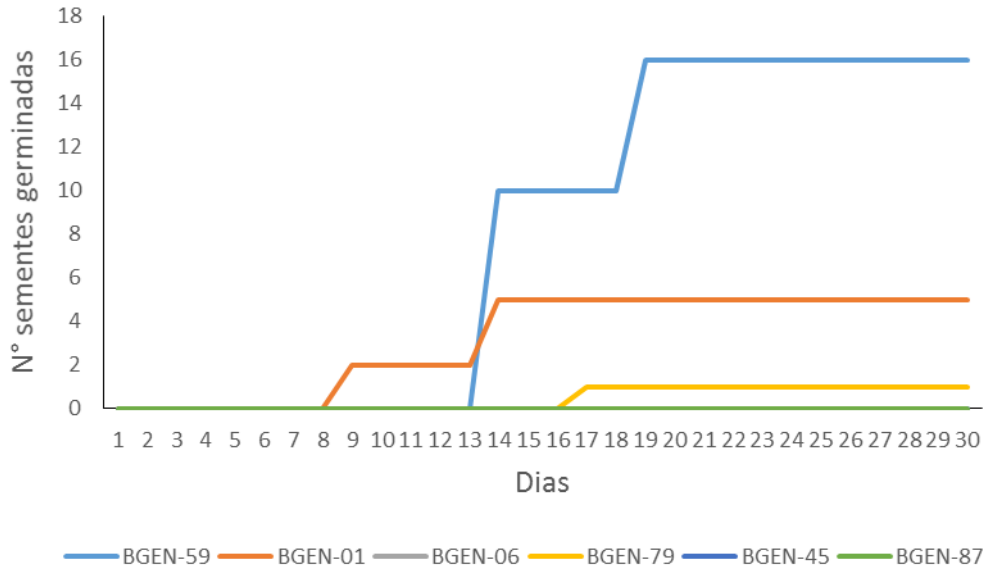


Figura 9: Número de sementes germinadas provindas de inflorescências não isoladas em acessos triploides (BGEN-59 e BGEN-01) e tetraploides (BGEN-06, BGEN-79, BGEN-45 e BGEN-87).

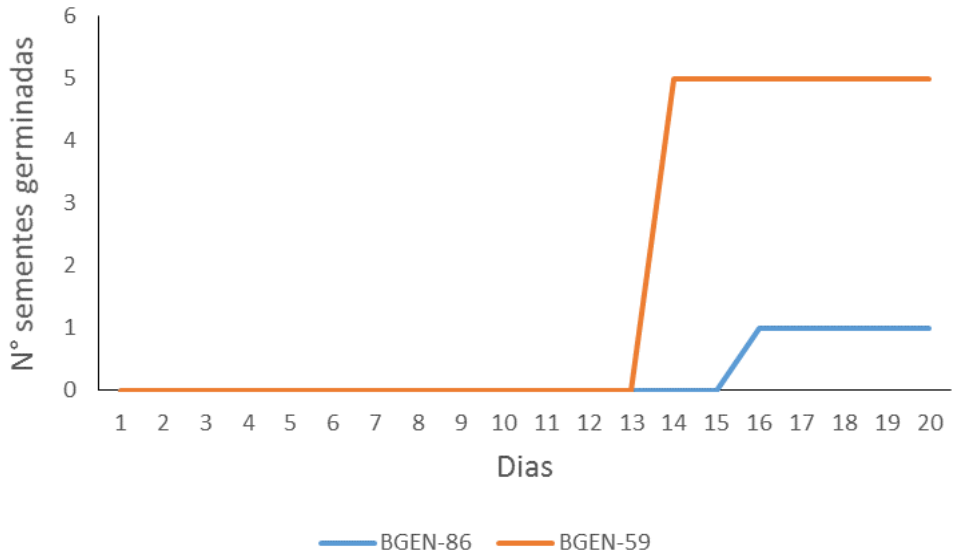


Figura 10: Número de sementes germinadas provindas de inflorescências isoladas do acesso triploide BGEN-59 e tetraploide BGEN-86.

Com relação as medidas de comprimento e largura das sementes oriundas de inflorescências não isoladas e submetidas ao teste de germinação, observou-se que o grupo dos diploides composto por 14 acessos apresentaram menor variação quando comparados aos acessos poliploides (Figura 11A e B) representados nesta análise por 2 triploides e 4 tetraploides. A tabela 3 descreve a média e o desvio padrão de cada caracter analisado.

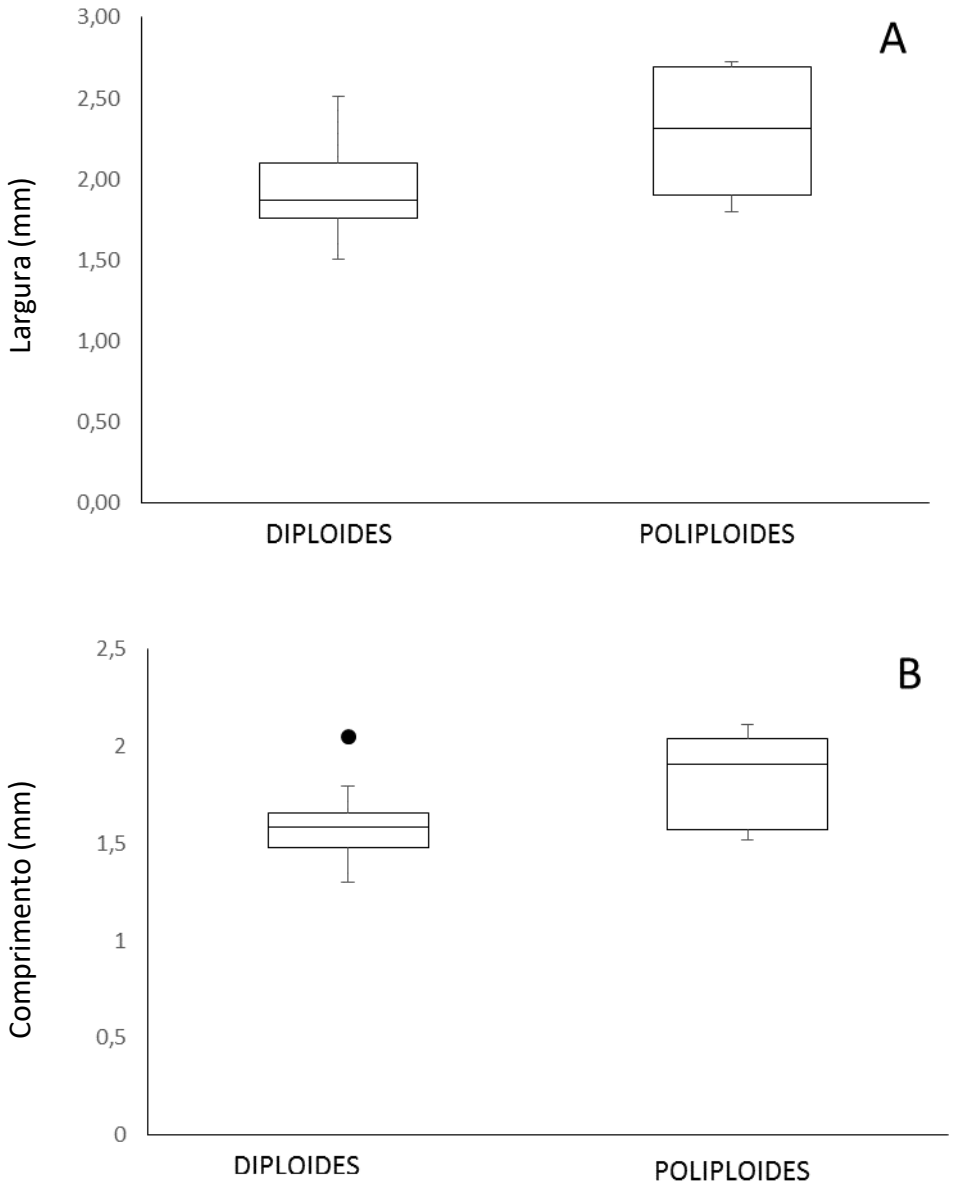


Figura 11: Variação de largura (A) e comprimento (B) de sementes oriundas de inflorescências não isoladas em acessos diploides e poliploides de *Lippia alba.*

As sementes oriundas de inflorescências isoladas também apresentaram uma diferença de variação entre os diploides e os poliploides. O grupo dos diploides foi composto por apenas três acessos visto que os demais não apresentaram produção de semente quando as inflorescências foram isoladas. Pode-se observar na tabela 3 que as medidas (largura e comprimento) da sementes isoladas foram relativamente menores quando comparadas às sementes não isoladas.

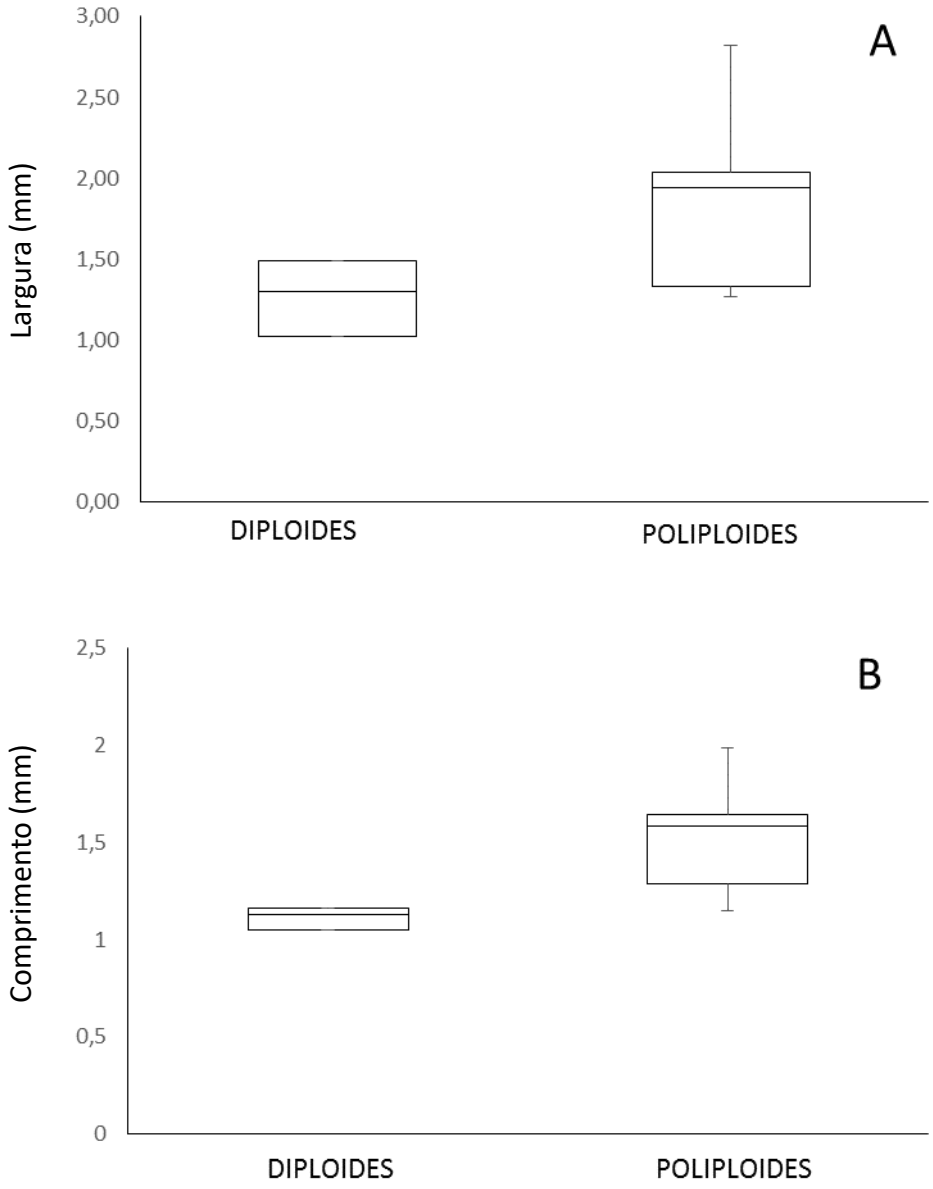


Figura 12: Variação de largura (A) e comprimento (B) de sementes oriundas de inflorescências isoladas em acessos diploides e poliploides de *Lippia alba.*

Tabela 3: Média e desvio padrão de largura (mm) e comprimento (mm) de sementes oriundas de inflorescências isoladas e não isoladas em acessos diploides e poliploides de *Lippia alba*.

	Inflorescência isolada		Inflorescência não isolada	
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
Diploide	1,11 ± 0,06	1,27 ± 0,24	1,60 ± 0,17	1,93 ± 0,26
Poliploide	1,54 ± 0,27	1,89 ± 0,52	1,84 ± 0,24	2,29 ± 0,38

4.3- Estimativa da quantidade de DNA

Nesta etapa, foram utilizadas cinco sementes de inflorescências isoladas e cinco sementes de inflorescências não isoladas do acesso tetraploide BGEN-31. As sementes provindas do isolamento reprodutivo apresentaram todas elas um padrão de comportamento representado na figura 13B. Observou-se a presença de um pico 2C possivelmente representativo da junção de tecido materno com o embrião e um pico 4C compatível com o G_2 do embrião juntamente com o endosperma. Já nas sementes que não foram isoladas, observamos dois tipos de comportamento (Fig.13C e D). No primeiro (Fig. 13C) observou-se um pico 2C representativo da junção de tecido materno com o embrião, um pico 3C provindo do endosperma da semente e um pico 4C representantivo do G_2 do embrião. Já na figura 13D, observou-se o mesmo padrão das sementes isoladas: um pico 2C e um 4C.

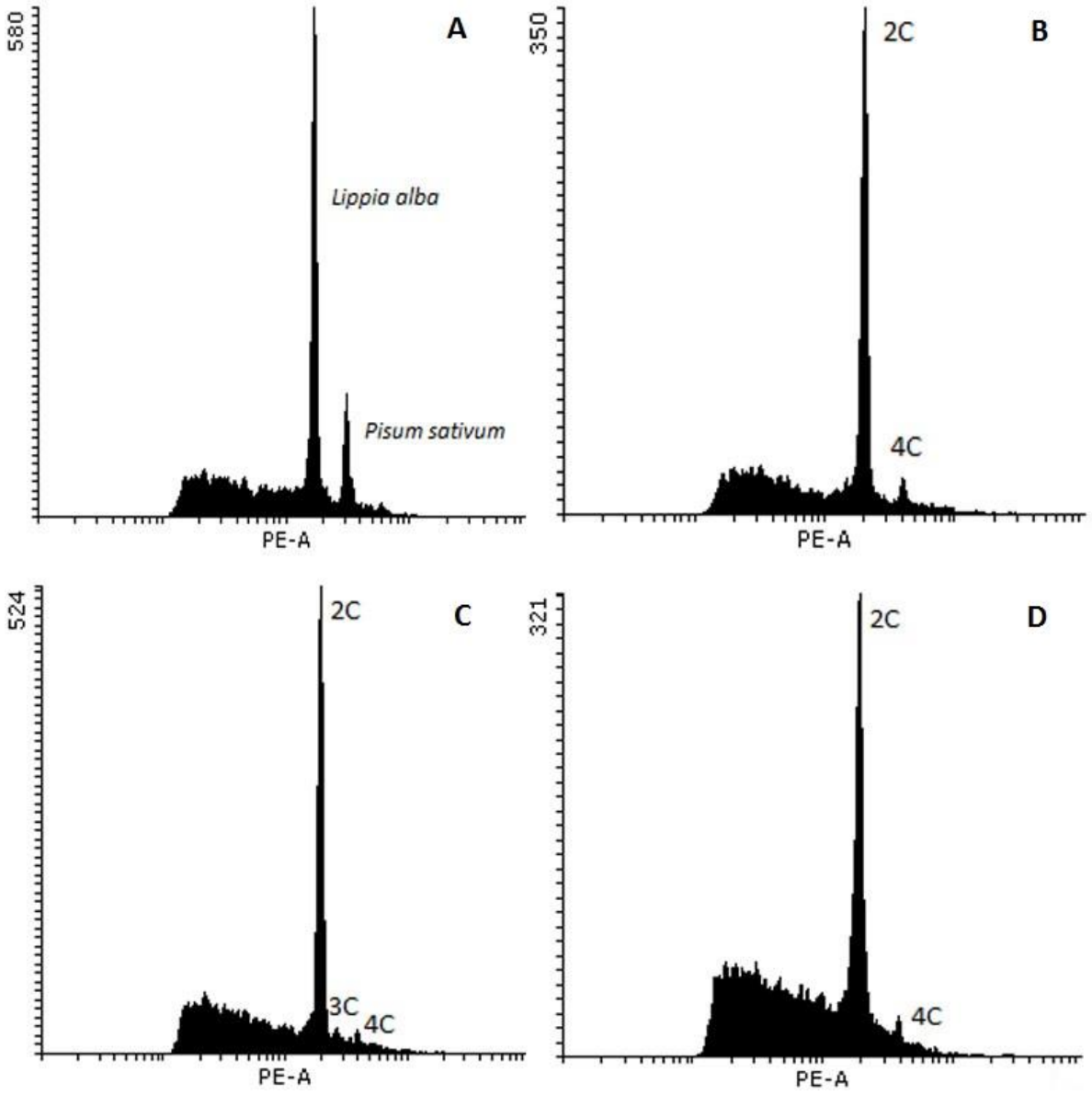


Figura 13- Histogramas representativos da estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo do acesso tetraploide de *Lippia alba* BGEN-31. A: folha de *Lippia alba* macerada em conjunto com o padrão *Pisum sativum*; B: Semente oriunda de inflorescência isolada de *L. alba*; C-D: Semente oriunda de inflorescência não isolada de *L. alba*.

4.4- Análise por microssatélite

A análise por microssatélites foi realizada a fim de verificar a presença de clones da planta-mãe dos acessos estudados, sugerindo dessa forma, um possível processo assexuado. A seguir, podem ser visualizados os perfis de genotipagem de três acessos de *Lippia alba* com diferentes primers. Os resultados são ilustrativos do comportamento observado em três níveis de ploidia. Em cada figura encontram-se, nesta ordem, o perfil da planta-mãe, de sementes oriundas de inflorescências isoladas e de sementes oriundas de inflorescências não isoladas.

Com relação ao acesso diploide (BGEN-97) observou-se um comportamento similar entre a planta-mãe e as sementes da progênie provindas de inflorescências isoladas, diferentemente do padrão das sementes oriundas de inflorescências não isoladas reprodutivamente (Figura 14, seta). Já na figura 15, pertencente ao mesmo indivíduo, observou-se uma grande semelhança entre as três amostras.

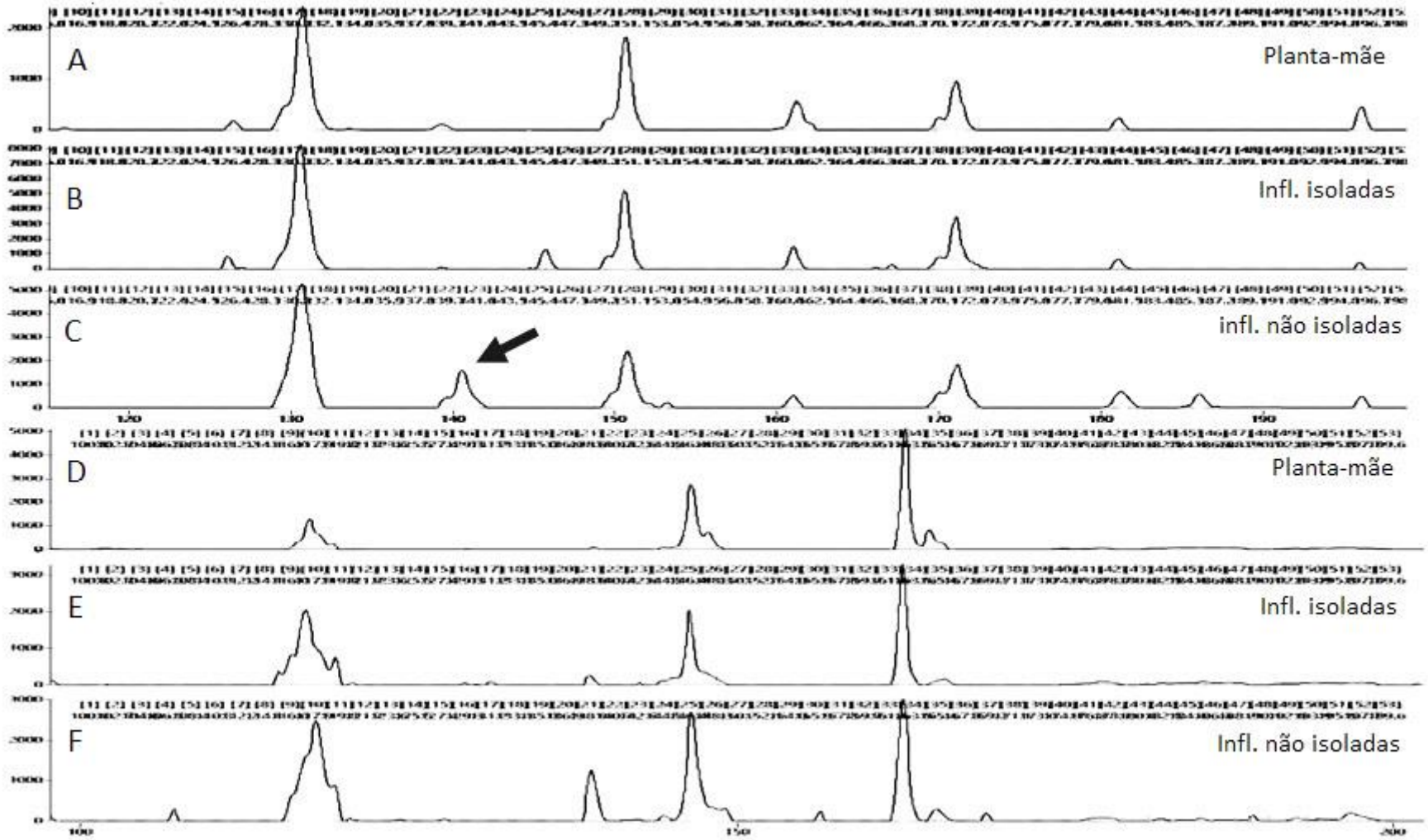


Figura 14: Eletroferogramas representativos dos primers 77 (A, B e C) e 229 (D, E, e F) do indivíduo diploide BGEN-97 de *Lippia alba*. A sequência das amostras correspondem à planta-mãe, sementes oriundas de inflorescências isoladas e sementes de inflorescências não isoladas.

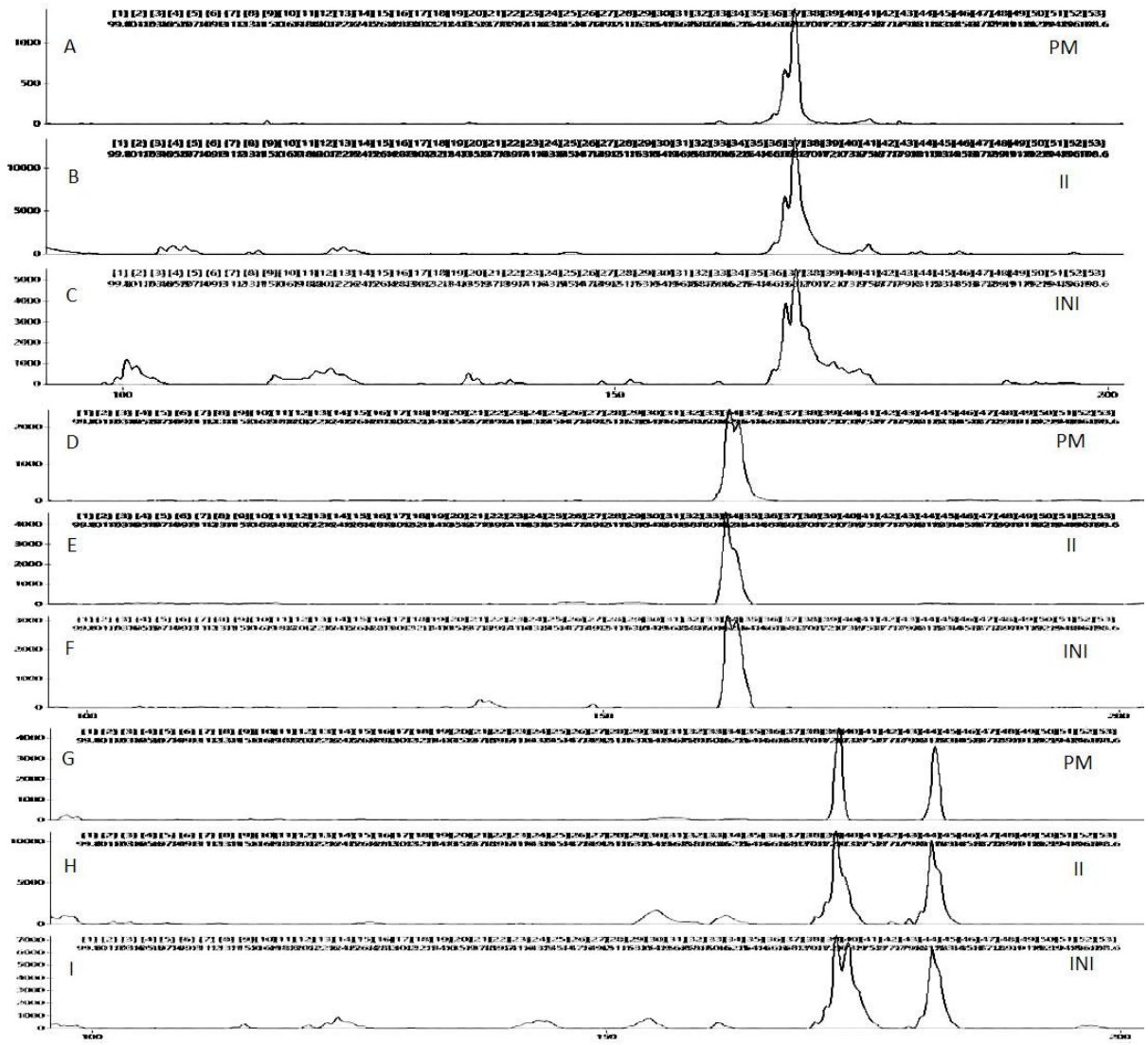


Figura 15: Eletroferogramas representativos dos primers 432 (A, B e C), 440 (D, E e F) e 484 (G, H e I) do indivíduo diploide BGEN-97 da espécie *Lippia alba*. A sequência das amostras corresponde à planta-mãe (PM), sementes oriundas de inflorescências isoladas (II) e sementes de inflorescências não isoladas (INI).

Já com relação ao acesso triploide (BGEN-59) observou-se um comportamento de bandas diferente entre a planta-mãe e o indivíduo germinado a partir de semente oriunda de inflorescência isolada (Figura 16, setas). O mesmo pode ser visto na figura 17, pertencente ao mesmo indivíduo, onde se observou a presença de bandas na planta-mãe que não estão presentes na planta filha.

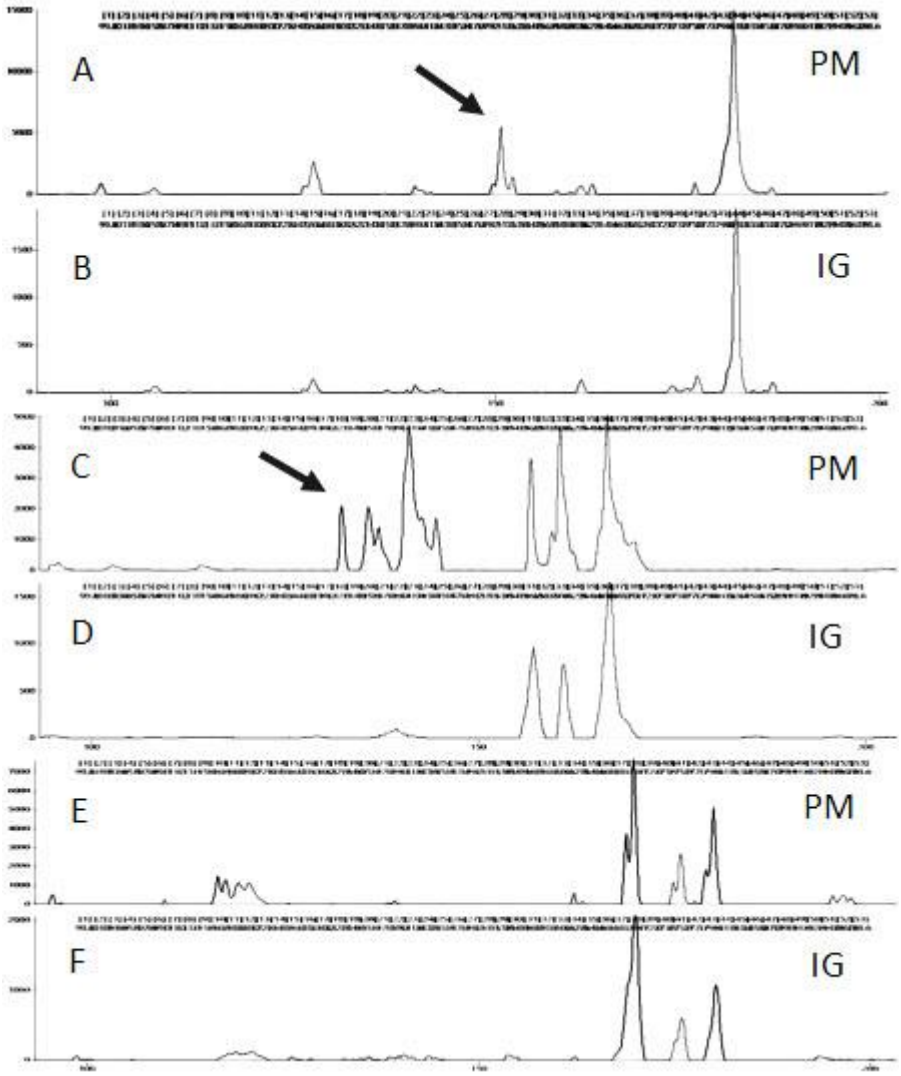


Figura 16: Eletroferogramas representativos dos primers 77 (A e B), 60 (C e D) e 432 (E e F) do indivíduo triploide BGEN-59 da espécie *Lippia alba*. A sequência das amostras corresponde à planta-mãe (PM) e um indivíduo germinado (IG) provindo de inflorescência isolada.

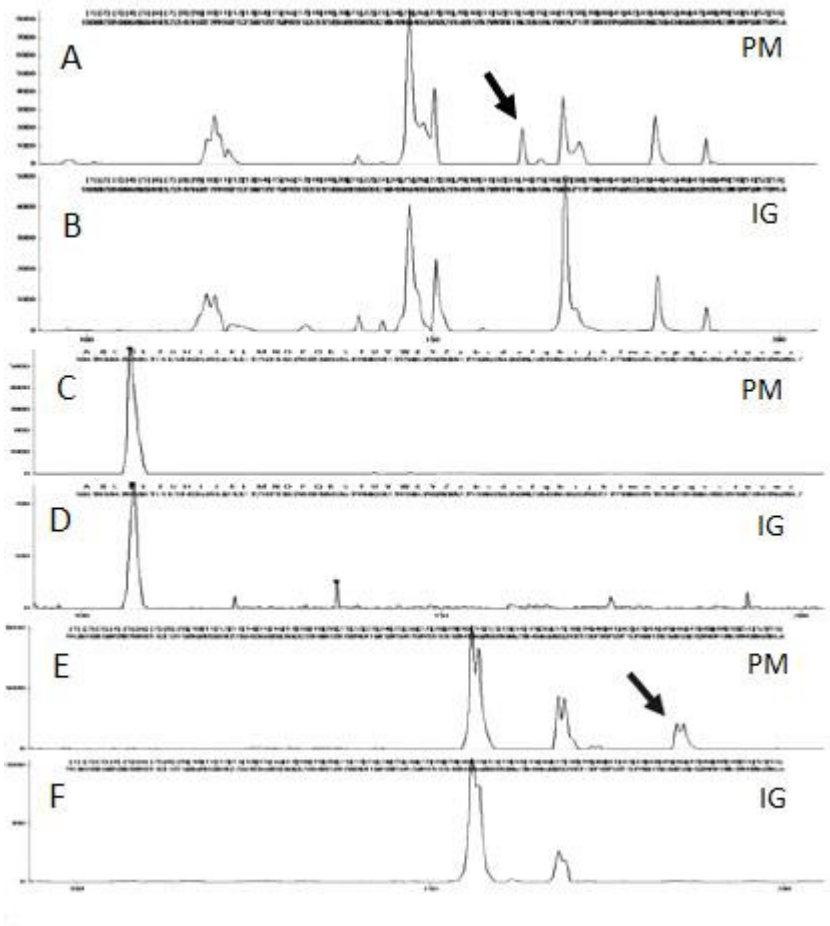


Figura 17: Eletroferogramas representativos dos primers 229 (A e B), 473 (C e D) e 440 (E e F) do indivíduo triploide BGEN-59 da espécie *Lippia alba*. A sequência das amostras corresponde à planta-mãe (PM) e um indivíduo germinado (IG) provindo de inflorescência isolada.

Nas figuras 18 e 19 observa-se o comportamento do indivíduo tetraploide BGEN-07. As setas representam bandas que estão presentes apenas nas sementes oriundas de inflorescências não isoladas. Tanto a planta-mãe quanto as sementes provindas de isolamento apresentam o mesmo padrão.

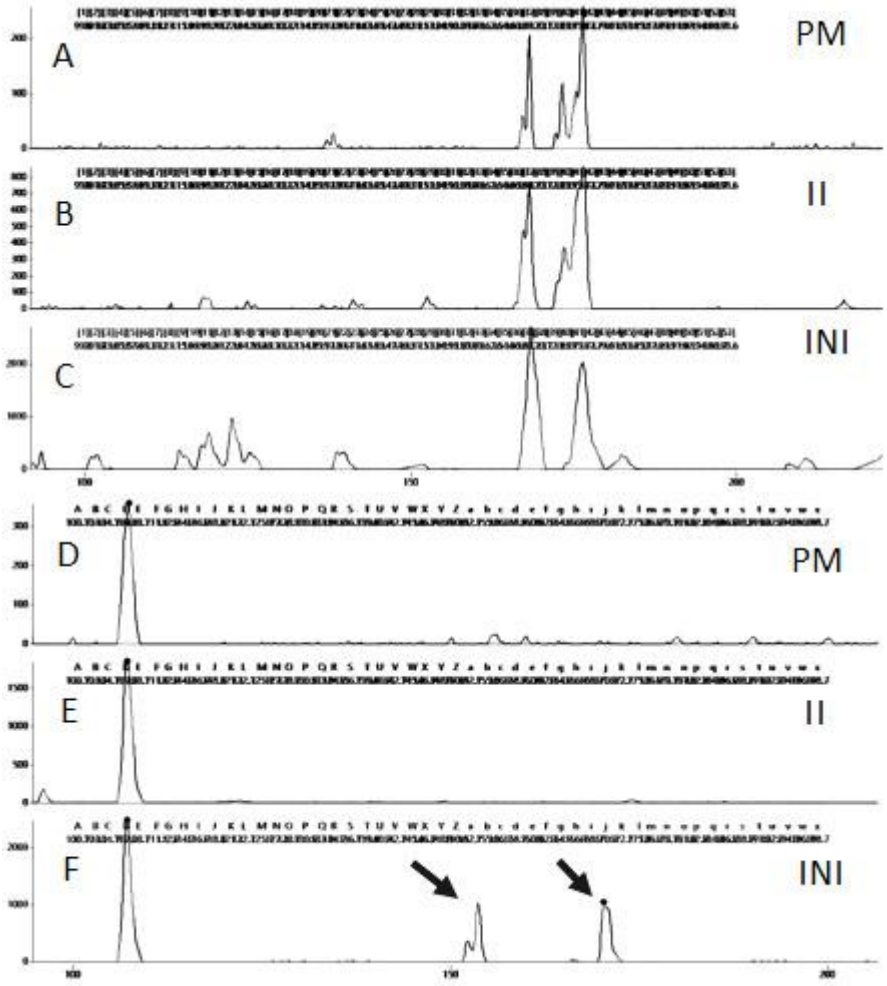


Figura 18: Eletroferogramas representativos dos primers 432 (A, B e C) e 473 (D, E e F) do indivíduo tetraploide BGEN-07 da espécie *Lippia alba*. A sequência das amostras corresponde à planta-mãe (PM), sementes oriundas de inflorescências isoladas (II) e sementes de inflorescências não isoladas (INI).

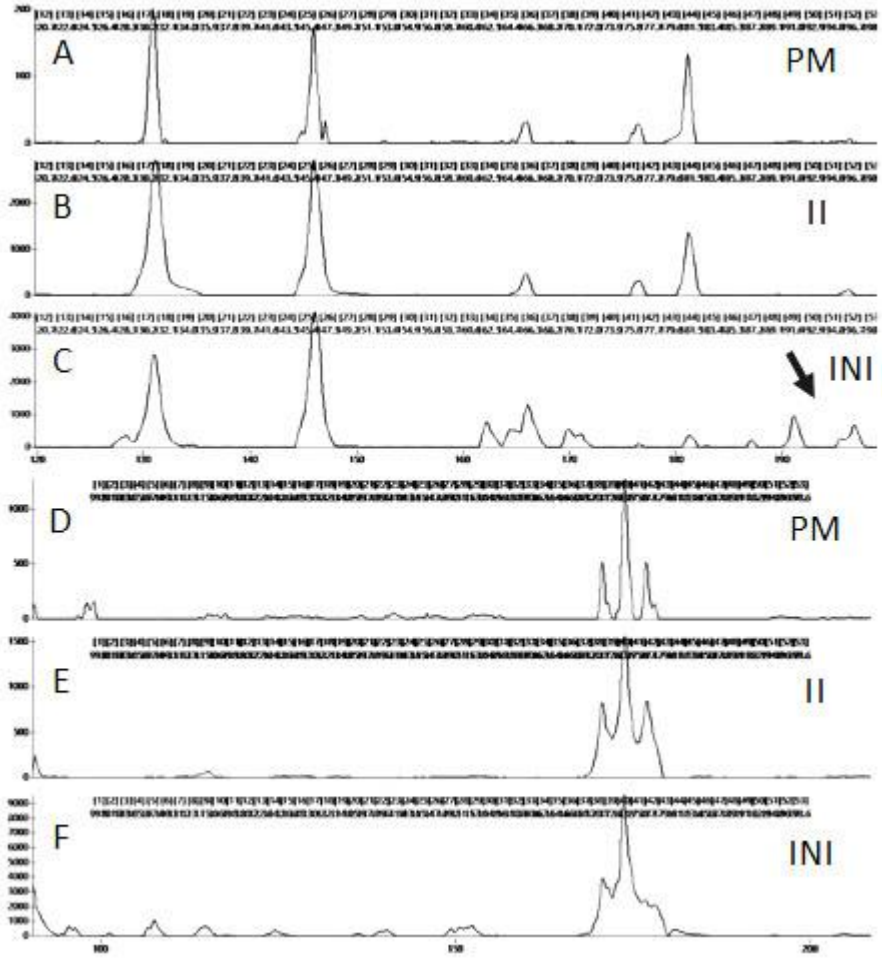


Figura 19: Eletroferogramas representativos dos primers 77 (A, B e C) e 484 (D, E e F) do indivíduo tetraploide BGEN-07 da espécie *Lippia alba*. A sequência das amostras corresponde à planta-mãe (PM), sementes de inflorescências isoladas (II) e sementes de inflorescências não isoladas (INI).

4.5- Análise citohistológica

As figuras abaixo correspondem a acessos representativos de dois níveis de ploidia: BGEN-75 (diploide), BGEN-64 (tetraploide) e BGEN-31 (tetraploide). A escolha dos indivíduos foi realizada a partir da presença de produção de sementes em todos eles quando suas inflorescências foram isoladas.

Como podemos observar, em todos os três indivíduos foi possível detectar a presença da formação do saco embrionário. Um destaque se faz necessário na figura 20B na qual se observa a presença do saco embrionário sem a formação do embrião no indivíduo diploide. Já na figura 20F, observamos a formação de quatro sacos embrionários, dois em cada lóculo.

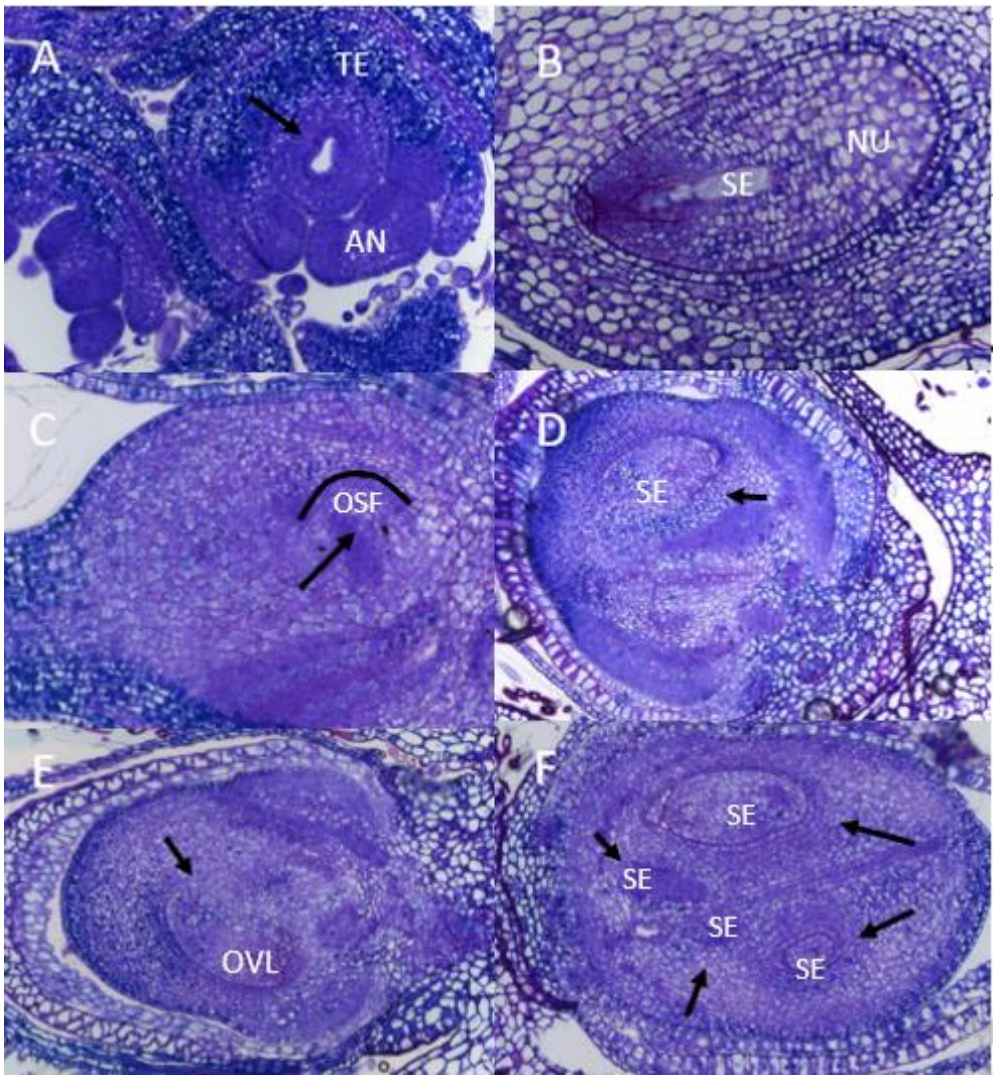


Figura 20: Cortes citohistológicos de diferentes acessos de *L.alba.* A e B: BGEN-75 (diploide), dias 0 e 15 respectivamente; C e D: BGEN-64 (tetraploide), dias 0 e 45; E e F: BGEN-31 (tetraploide), dias 15 e 30. Legendas: AN (anteras); TE (tegumento); SE (saco embrionário); NU (nucelo); OVL (óvulo).

4.6- Análise morfológica

Para análise morfológica foram avaliadas cinco características florais: comprimento e largura da pétala maior, abertura da corola, maior diâmetro da corola e menor diâmetro da corola. Essas características foram avaliadas antes (corola roxa) e depois (corola amarela) da polinização em acessos diploide, triploide e tetraploide de *L. alba* (Tabela 4).

Tabela 4: Comprimento (Cpm) e largura (Lpm) da pétala maior, abertura da corola (Ac), maior diâmetro da corola (MaDc) e menor diâmetro da corola (MeDc), antes (amarela) e depois (depois) da polinização em acessos diploide, triploide e tetraploide de *L. alba*.

	Cpm	Lpm	Ac	MaDc	MeDc
Diploide, corola amarela	2,499^{B}	1,412	0,609	1,074	0,462
Diploide, corola roxa	2,188^{B}	1,250^{B}	0,462	0,920	0,393^{B}
Triploide, corola amarela	1,988	1,451	0,664	1,164	0,526
Triploide, corola roxa	2,136^{C}	1,581^{C}	0,859	1,146	0,492^{C}
Tetraploide, corola amarela	1,376	1,126	0,535	0,825	0,344^{A}
Tetraploide, corola roxa	1,272	0,875	0,505	0,808	0,265

(Medidas tomadas em milímetros).
Valores seguidos da letra A representam diferença significativa dentro do mesmo nível de ploidia.
Valores seguidos da letra B representam diferença significativa entre o diploide e o tetraploide para a mesma cor da corola.
Valores seguidos pela letra C representam diferença significativa entre os triploides e tetraploides para a mesma cor da corola.

Aos observar a tabela acima, verifica-se que as características abertura da corola (Ac) e maior diâmetro da corola (MaDc) não apresentaram diferença significativa entre nenhum dos tratamentos.

Nota-se também que apenas um nível de ploidia apresentou variação, quando as cores da corola foram comparadas. Para o acesso tetraploide (valor seguido pela letra A) o menor diâmetro da corola roxa (MeDc) foi significativamente menor que o da corola amarela. Ao compararmos os diferentes níveis de ploidia, podemos observar que em três das características analisadas para flor roxa (Cpm, Lpm e MeDc), existe diferença significativa entre diploide e tetraploide, sendo as medidas

para o tetraploide menores que para o diploide. Com relação à corola amarela, apenas uma variável (Cpm) diferiu significativamente entre diploide e tetraploide.

Comparando-se triploide e tetraploide (valores seguidos da letra C), observamos diferença apenas para as corolas roxas, mais especificamente nas características Cpm, Lpm e MeDc. Os tetraploides apresentaram mais uma vez valores menores que o nível inferior de ploidia (triploide).

5 Discussão

O presente trabalho descreve pela primeira vez o comportamento reprodutivo de diferentes acessos de *Lippia alba*, levando em conta a variação de nível de ploidia existente na espécie. Estudos desta natureza incluindo diferentes níveis de ploidia intraespecífico são raros na literatura.

Baseado nos resultados apresentados no presente trabalho, é possível inferir que *Lippia alba* apresenta diferentes comportamentos reprodutivos até mesmo dentro de um mesmo citótipo como é o caso dos diploides (2n=30). Entre os acessos diploides podemos observar que alguns deles não produzem sementes ao serem impedidos de realizar a fecundação cruzada. Embora não tenha sido realizado um experimento específico para elucidar seu modo de reprodução, Schocken (2007) sugere que a espécie seja preferencialmente alógama. Segundo a autora, especula-se que na população possa ocorrer uma série alélica que está ligada a uma autoincompatibilidade, demonstrando uma tendência à fecundação cruzada e não realizando vias alternativas de reprodução. Por outro lado, entre os diploides há, em menor número, acessos que produzem sementes ainda que sejam privados da fecundação cruzada. Considerou-se até o momento duas possibilidades para explicar este fato: 1) Essas sementes são oriundas de autofecundação ou 2) são fruto do processo apomítico. O mesmo comportamento foi observado nos indivíduos poliploides, porém com maior frequência que nos diploides. Os poliploides, ao serem privados da fecundação cruzada conseguem produzir, muitas vezes, grande quantidade de sementes. Alguns autores sugerem que o efeito do aumento do genoma causado pela hibridação e poliploidia podem induzir a apomixia (CARMAN, 1997; COMAI et al., 2003; SHARBEL et al., 2010; WANG et al., 2004), estando ambos os fenômenos presentes em diversas linhagens apomíticas (PONGRATZ et al., 1997; BICKNELL e KOLTUNOW 2004; MOGIE, 1986; ASKER e JERLING 1992; NELSON-JONES et al., 2002).

A ocorrência de espécies vegetais que possuem apenas um sistema reprodutivo é rara na natureza. A polinização, por sua vez, exerce grande impacto na organização dos sistemas reprodutivos sexuados, sendo verificado que plantas polinizadas por animais (caso de *Lippia alba*), acabam por apresentar uma distribuição contínua entre os dois tipos de sistema reprodutivo, desde formas com

autogamia preferencial passando por formas intermediárias até indivíduos preferencialmente alógamos (VOGLER e KALISZ, 2001). De acordo com Venâncio et al. (2016), *Lippia alba*, que é hermafrodita, apresenta um período de receptividade do estigma de 72 horas. As anteras por sua vez, liberam os grãos de pólen até o terceiro dia de florescimento, sendo este período compatível com o da receptividade do estigma, o que possibilita a ocorrência de autofecundação. Ao analisarmos a morfologia da espécie, as anteras se encontram acima do estigma. Por outro lado, foi observado também que a longevidade floral da espécie é maior que a encontrada nas demais espécies da mesma família como *Lantana camara, Stachytarpheta glabra* e *Sthachytarpheta maximiliani* (BARROS et al., 2001; ANTONINI et al., 2005; BARBOLA et al., 2006) ampliando as possibilidades de atração de polinizadores que contribuiriam para o processo de fecundação cruzada.

O processo de autoincompatibilidade, por sua vez, é um dos principais sistemas entre as plantas com flores para evitar a auto-fecundação mantendo dessa forma uma diversidade genética na espécie (DE NETTANCOURT, 2001). Nas angiospermas, este processo se encontra presente em maior proporção (40% das espécies) do que o processo apomítico (RICHARDS, 1997). Uma hipótese a ser considerada para *Lippia alba* é a ocorrência de autoincompatibilidade nos indivíduos que não produziram sementes quando isolados ou até mesmo nos que produziram, mas cujas sementes não germinaram. É importante considerar que durante a evolução, para que ocorra o estabelecimento do sistema bioquímico de autoincompatibilidade é necessário que haja forte depressão por endogamia nos indivíduos oriundos de populações autocompatíveis. Na ausência desta depressão por endogamia, os alelos responsáveis pela autoincompatibilidade não aumentam em frequência já que ambas as plantas (autocompatíveis e autoincompatíveis) teriam a mesma vantagem reprodutiva. Após a depressão endogâmica, os níveis de autoincompatibilidade aumentariam gradativamente conferindo à espécie mais uma alternativa para a reprodução, em longo prazo, via apomixia (CLARK e KAO, 1994). Essa seria uma possibilidade para a espécie em estudo, visto que dentro de um mesmo nível de ploidia observou-se ambos os comportamentos. É possível que *L. alba* esteja passando por um processo de “busca” por caminhos alternativos para a reprodução.

Dados sobre a microsporogênese obtidos pelo nosso grupo de pesquisa indicam maior irregularidade meiótica nos indivíduos poliploides da espécie. Esse comportamento irregular tem sido associado à dificuldade de realização da reprodução sexuada em diversos grupos de plantas. Estudos anteriores , ressaltam o comportamento cromossômico anormal como sendo uma causa importante ligada ao aborto de pólens de híbridos de autotetraploides de arroz (LUAN et al., 2007, 2009 e o de HE et al., 2011a, 2011b). Em *Lippia alba*, especialmente nos indivíduos tetraploides, o processo meiótico pode estar desregulado a ponto de interferir não só na esterilidade do pólen mas também na formação do saco embrionário normal, estando esses indivíduos mais propensos ao processo apomítico. Numa perspectiva evolutiva, essas irregularidades assumem um papel importante na formação de novas espécies (KAMRA, 1960), especialmente através da poliploidização e de gametas não-reduzidos (FALISTOCCO et al., 1995; RAMANNA, 2003; LATTOO et al.,2006).

Os dados de germinação por sua vez, revelaram que apenas para um acesso triploide (BGEN-59) e um tetraploide (BGEN-86) foi possível observar a germinação de sementes oriundas de inflorescências isoladas. Nos demais acessos observou-se uma tendência de maior germinação de sementes oriundas de inflorescências não isoladas nos diploides. Os tetraploides, por sua vez, apresentam maior restrição nesse processo. Uma exceção à essa regra foi o fato de que um dos triploides (BGEN-59), apresentou alta taxa de germinação quando suas inflorescências não foram isoladas, revelando um comportamento similar aos diploides e se diferenciando dos demais poliploides. Como é sabido, indivíduos triploides (2n=45) tendem a ser inférteis devido ao desbalanceamento cromossômico na meiose. Os dados de genotipagem, utilizando microssatélites, sugerem no entanto, que o indivíduo triploide oriundo de germinação provêm, provavelmente, de um processo de autofecundação devido a presença de bandas na planta-mãe que não estão presentes na progênie (Figuras 18 e 19). A estimativa da quantidade de DNA desse indivíduo será importante para aferir seu nível de ploidia e ainda não foi realizada pela indisponibilidade de material foliar.

O fato de algumas sementes tanto de inflorescências isoladas quanto não isoladas não germinarem pode estar ligado à própria viabilidade polínica, ou seja, mesmo com pólens teoricamente viáveis pode ocorrer a presença da produção de

gametas desbalanceados. O fato dos diploides apresentarem maior taxa de germinação está ligado a dados já foi obtidos em *L. alba* por Reis et al. (2014), sendo mostrado que estes indivíduos são os detentores de maior quantidade de pólens viáveis. Dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa revelam que os poliploides tendem a ter maior taxa de inviabilidade do do pólen, estando estritamente relacionado com as irregularidades meióticas. Outra explicação para a ausência de germinação reside no fato de que com o evento de poliploidização aumentam as ocorrências de alterações cromossômicas estruturais como inversão, deleção e translocação podendo afetar a estrutura cariotípica e até mesmo a fertilidade do indivíduo (MA e GUSTAFSON, 2005; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2013). Reis et al. (2016), observaram em um indivíduo tetraploide de *L. alba*, o fenômeno chamado citomixia, que consiste na migração de material nuclear ou citoplasmático entre células adjacentes (LATTOO et al., 2006; SINGHAL e KUMAR 2008; GUAN et al., 2012; MURSALIMOV et al., 2013; MURSALIMOV e DEINEKO 2015). Frequentemente, indivíduos híbridos, aneuploides, poliploides e que fazem apomixia estão relacionados a esse fenômeno (DE NITTANCOURT e GRANT 1964; GOTTSCHALK, 1970; LI et al., 2009; PIERRE e SOUSA 2011). Independentemente de como a citomixia acontece, suas consequências genéticas são sérias podendo interferir inclusive na gametogênese e na fertilidade produzindo gametas não-balanceados devido ao aumento ou decréscimo de conteúdo de DNA (MURSALIMOV et al., 2013; MURSALIMOV e DEINEKO 2015).

Com relação ao tamanho das sementes oriundas de inflorescências isoladas e não isoladas dos acessos com diferentes níveis de ploidia, observamos que tanto em comprimento quanto em largura, os poliploides possuem maior variação nas medidas. Conhecido como efeito gigas (STEBBINS, 1971) com a duplicação do genoma, o tamanho de alguns órgãos fundamentais podem mudar, muitas vezes em consequência de um aumento do tamanho celular (MELARAGNO et al., 1993; LEVIN, 2002). A maior variação no tamanho das sementes observada nos poliploides pode ser consequência deste processo.

O tamanho das sementes pode também ser associado à dificuldade de germinação de sementes observada encontrada em alguns acessos de *L. alba* tanto quando isolados quanto não isolados. Segundo Haig e Westobi (1991), o desbalanceamento de dosagem gênica no endosperma de origem materna e

paterna está fortemente ligado a falhas no cruzamento entre diferentes níveis de ploidia de uma mesma espécie. Os autores afirmam também que o tamanho das sementes pode ser influenciado por esse processo, visto que quando determinado gene provém do genitor materno, as sementes tendem a ser menores enquanto que as sementes que possuem o gene transferido pelo genitor paterno, possuem sementes maiores. É importante observar, por sua vez, que quando comparadas dentro de um mesmo nível de ploidia, as sementes provindas de isolamento apresentam suas dimensões menores quando comparadas as não-isoladas. Ao se considerar a possibilidade de apomixia para a formação dessas sementes provindas do isolamento, apenas material materno estaria presente, corroborando a hipótese apresentada acima e contribuindo para explicar as menores dimensões dessas sementes. Neste contexto, as sementes oriundas de fertilização cruzada, possuiriam uma mistura de material materno e paterno, podendo o paterno ser mais expresso e com isso propiciando maior dimensão às sementes.

Os cortes histológicos permitiram observar na maior parte das imagens, a formação do saco embrionário necessário para a reprodução. No entanto, no indivíduo diploide BGEN-75, apesar da formação desse saco embrionário, não foi possível visualizar o embrião em formação. Isso pode ser devido ao próprio período de coleta, que inviabilizou a detecção desse embrião ou ao fato de o embrião não ter se desenvolvido pela ausência de fecundação. Dessa forma, apesar da formação da semente, não havendo um embrião em desenvolvimento, não há germinação. Estudos no gênero *Lantana* (também pertencente a família Verbenaceae), em especial o de Spies (1984) que compara diferentes espécies, não indicam até então a presença do processo apomítico no gênero. No entanto, uma exceção é o trabalho de Spies e Stirton (1982c) no qual foi detectado o desenvolvimento de um segundo saco embrionário de origem desconhecida durante a embriogênese de *Lantana camara*. Como se sabe, *Lippia alba* apresenta 1 ou 2 óvulos por lóculo, sendo precoce afirmar com os dados obtidos até o momento que se trata de apomixia. Um indício seria a presença de embriões em desenvolvimento antes da antese fato que demanda experimentos adicionais para sua observação.

Carman (1997) afirmou, ao analisar diversos gêneros, que normalmente as plantas apomíticas são poliploides, sendo a maioria tetraploide, enquanto que as de reprodução sexual são na maioria diploides. Entretanto, é importante salientar que

indivíduos diploides em populações naturais podem também, mesmo que em menor taxa realizar apomixia, como é encontrado no trabalho de Schinkel et al. (2016) com a espécie *Ranunculus kuepferi*. Os eletroferogramas observados para o acesso diploide BGEN-97 juntamente com o acesso tetraploide BGEN-07 de *L. alba* indicam, por sua vez, a possível ocorrência de apomixia devido a grande semelhança do perfil de bandas observado nas sementes e na planta-mãe. A variação no tamanho de produtos de PCR, geralmente resulta da ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do microssatélite. Se obtivéssemos sequências idênticas entre o *pool* de sementes e a planta-mãe nos oito primers analisados seria mais seguro afirmar que a espécie realiza o processo de apomixia. Um ponto para reflexão é o fato de que, em função da dificuldade de obtenção de quantidade suficiente de material para uma única semente, utilizamos um *pool* de sementes, sendo possível que no processo de amplificação do DNA via PCR, os primers se anelem a genomas diferentes em cada primer dificultando a análise de um único genoma.

Os dados de estimativa da quantidade de DNA das sementes por sua vez, sugerem que a apomixia possa estar ocorrendo no indivíduo tetraploide BGEN-31, visto que as cinco sementes isoladas analisadas apresentaram o mesmo padrão de comportamento, tendo picos 2C (embrião juntamente com tecido materno) e 4C (pico 2C do embrião juntamente com um endosperma 4C). Já as cinco sementes provindas de inflorescências que não foram isoladas apresentaram dois comportamentos diferentes: um deles foi similar ao das sementes oriundas de inflorescências isoladas (presença de picos 2C e 4 C) indicando uma possível apomixia; e o outro comportamento foi a presença de picos 2C (embrião juntamente com tecido materno), 3C (endosperma) e 4C (pico G_2 do embrião), normalmente associados à reprodução sexuada. Como relatado para diploides do gênero *Boechera* (ALIYU et al., 2010), aparentemente observou-se mais de um modo de reprodução em um mesmo indivíduo. A análise de uma maior quantidade de sementes se torna necessário para uma conclusão mais específica.

Os dados de morfologia floral por sua vez, vêm demonstrado que possuem importância principalmente na observação da reprodução dos indivíduos, visto que possuem fortes relações com ação de polinizadores, sendo seus aspectos intimamente ligados a especialização ecológica (MAGLIANESI et al., 2014; ROSAS-

GUERRERO et al., 2014). Diversos estudos de observação e mensuração morfológica de diferentes estruturas da planta são realizados visando uma maior compreensão taxonômica e genética (VISCOSI, 2011). De acordo com Venância et al., 2016, a liberação do pólen e viabilidade do estigma ocorrendo até o terceiro dia na espécie *L. alba* sugere que a mudança de cor das pétalas, que também ocorre no terceiro dia, deve estar ligado à fertilização da célula ovo. Com relação aos resultados, temos que aparentemente o indivíduo tetraploide é o que apresentou maior diferença nas variáveis quando comparado aos diploides e triploides. Apesar da ocorrência do aumento no genoma desses indivíduos, não houve um aumento em suas estruturas, tendo-se observado um resultado contrário, ou seja, redução no tamanho das estruturas analisadas. Quando se considera a cor da corola, as flores roxas apresentaram maior número de variáveis significativamente diferentes, indicando que após a polinização dessas flores, uma diferença de medidas da corola já não se faz tão importate como na fase de coloração amarela, em que é necessário um maior atrativo para os polinizadores.

Os dados em geral sugerem a ocorrência de um complexo agâmico em *Lippia alba*, que consiste na presença de indivíduos diploides com uma maior tendência a reprodução sexuada normal enquanto que indivíduos poliploides tendem a apresentar vias alternativas de reprodução, como a apomixia. Assim como descrito para a espécie *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae) (ALVES et al., 2016), é possível que *Lippia alba* seja uma espécie neopoliploide e que, por isso, apresente ainda indivíduos que realizam o processo apomítico e ao mesmo tempo a presença de uma quebra de auto-incompatibilidade em outros indivíduos do mesmo complexo poliploide. Esse fenômeno ocorre em vários outros complexos como o encontrado em *Anemopaegma* (FIRETTI-LEGGIERI et al., 2011; 2013; SAMPAIO et al., 2013b) e *Handroanthus ochraceus* (COSTA et al., 2004; SAMPAIO, 2010).

6 Conclusão

Os dados aqui apresentados representam o primeiro estudo sistemático sobre a biologia reprodutiva em *Lippia alba*. A inexistência de qualquer informação prévia, associada à ocorrência de um complexo poliploide e ao diminuto tamanho da estrutura floral constituem um enorme desafio para uma conclusão definitiva sobre o modo de reprodução da espécie. A adoção de abordagens variadas aqui empregadas, objetivou a obtenção de um conjunto de informações que, reunidas, permitissem a elaboração de uma hipótese de trabalho, que precisa, com a ampliação da amostragem e uso de outros métodos, ser confirmada.

Com os dados até o momento obtidos foi possível concluir que:

- *Lippia alba* possui um comportamento reprodutivo preferencialmente alógamo;
- Os indivíduos diploides apresentaram um comportamento reprodutivo diferenciado quando comparados aos poliploides;
- Dentro de um mesmo nível de ploidia há diferença no modo de reprodução;
- Além da fertilização cruzada, observa-se a ocorrência de autofecundação ou apomixia;
- O complexo poliploide *Lippia alba* possui vias alternativas de reprodução.

7 Referências

AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D.; NASCIMENTO, S.C.; SENA, K. X. F. R. 2008.Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy.2008.v: 18(3).pp: 436-440.

ALBERTINI, E.;PORCEDDU, A.;FERRANTI, F.;REALE, L.;BARCACCIA, G. Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis*: a cytological investigation**.** Sexual Plant Reproduction.2001.v: 14.pp:213–217.

ALIYU, O. M.; SCHRANZ, M. E.; SHARBEL, T. F. Quantitative variation for apomictic reproduction in the genus *Boechera* (Brassicaceae). American Journal of Botany.2010.v: 97(10).pp: 1719-1731.

ALVES, M. F.; DUARTE, M. O.; BITTENCOURT JR, N. S.; OLIVEIRA, P. E.; SAMPAIO, D. S.Sporophytic apomixis in polyembryonic *Handroanthus serratifolius* (Vahl) SO Grose (Bignoniaceae) characterizes the species as an agamic polyploid complex. Plant Systematics and Evolution.2016. 302(6).pp: 651-659.

ANTONINI, Y.; SOUZA, H. G.; JACOBI, C. M. & MURY, F. B. Diversidade e comportamento dos insetos visitantes florais de Stachytarpheta glabra Cham. (Verbenaceae), em uma área de campo ferruginoso, Ouro Preto, MG. Neotropical Entomology.2005.v: 34(4).pp: 555-564.

ARMBRUSTER, W. S. Floral specialization and angiosperm diversity: phenotypic divergence, fitness trade-offs and realized pollination accuracy. AoB Plants 6.2014: plu003.

ASKER S, JERLING L. Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.1992.

BAKER, H. G. Support for Baker's law-as a rule. Evolution.1967.v: 21.4 .pp: 853-856.

BARRETT, S. C. H., AND C. G. ECKERT. Variation and evolution of mating systems in seed plants. Biological approaches and evolutionary trends in plants.1990.v: 14.pp:229-254.

BARBOLA, I. D. F., LAROCA, S., ALMEIDA, M. C. D., & NASCIMENTO, E. A. D. Floral biology of Stachytarpheta maximiliani Scham.(Verbenaceae) and its floral visitors. Revista Brasileira de Entomologia.2006.v: 50(4).pp: 498-504.

BARCACCIA, G.; MAZZUCATO, A.; ALBERTINI, E.; ZETHOF, J.; GERATS, A.; PEZZOTTI, M.; FALCINELLI, M. Inheritance of parthenogenesis in Poa pratensis L.: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. Theoretical and Applied Genetics.1998.v: 97(1-2).pp: 74-82.

BARRETT, S. C.; ECKERT, C. G. Current issues in plant reproductive ecology. Israel journal of botany.1990. 39(1-2).pp.: 5-12.

BARRINGER, B.C. Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. American Journal of Botany.2007.v: 94,pp:1527–1533.

BARROS, M. G.; RICO-GRAY, V. & DÍAZ-CASTELAZO, C. Sincronia de floração entre *Lantana camara* L.(Verbenaceae) e *Psittacanthus calyculatus* (DC.) G. Don (Loranthaceae) ocorrentes nas dunas de La Mancha, Veracruz, México. Acta Botanica Mexicana.2001.v: 57.pp: 1-14.

BASHAW, E. C. Apomixis and its application in crop improvement. Hybridization of crop plants. 1980.pp: 45-63.

BASHAW, E.C.; HUSSEY, M.A.; HIGNIGHT, K.W. Hybridization (n + n and 2n + n) of facultative apomictic species in the *Pennisetum* agamic complex. International Journal of Plant.1992. 153: 466–470.

BECK, J.B.;ALEXANDER, P.J.;ALLPHIN, L.; AL-SHEHBAZ,I.A.; RUSHWORTH, C.; BAILEY, D.; WINDHAM, M.D**.**Does hybridization drive the transition to asexuality in diploid *boechera*?Evolution 66-4.2011.pp: *985–995.*

BICKNELL, R. A.; KOLTUNOW, A. M. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. The Plant Cell.2004.v:16.pp: S228-S245.

BIERZYCHUDEK, P. Patterns in plant parthenogenesis. Experientia.1985. v*:*41.pp:1255–1264.

BLANCO, M.A., COLAREDA, G.A., BAREN, C.V., BANDONI, A.L., RINGUELET, J., CONSOLINI, A.E.Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. Journal of Ethnopharmacology.2013.v: 149.pp**:** 803–809.2013.

BODANESE-ZANETTINI, M.H.; CAVALLI, S.S. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. Genética e Evolução Vegetal. 1ª ed. Editora UFRGS. Porto Alegre.2003.pp: 177-188.

BOSE, R. B.; CHOUDHURY, J. K.Cytological studies in *L. alba* (Mill) NE Br. Bulletin of the Botanical Society of Bengal.1960. 14.pp.: 71-72.

BOWERS, J. E.; CHAPMAN, B. A.; RONG, J.; PATERSON, A. H. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. Nature.2003.v: 422(6930).pp: 433-438.

BRANDÃO, A.D..; VICCINI, L.F.; SALIMENA, F.R.G..; VANZELA, A.L.L.; RECCO PIMENTEL, S.M. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. Journal of Plant Research.2007.v: 120.pp: 317-321.

BRETAGNOLLE, F. AND, AND J. D. THOMPSON. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. New Phytologist.1995.v: 129.1.pp: 1-22.

BURGESS, M. B.; CUSHMAN, K. R.; DOUCETTE, E. T.; TALENT, N.; FRYE, C. T.;CAMPBELL, C. S.Effects of apomixis and polyploidy on diversification and geographic distribution in Amelanchier (Rosaceae). American journal of botany.2014.v: 101(8).pp: 1375-1387.

CAMPOS, J.M.S.; SOUSA, S.M.; SILVA, P.S.; PINHEIRO, L.C.; SAMPAIO, F.; VICCINI, L.F. Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbanceae). Plant Systematic and Evolution.2011.v: 291.pp:133-140.

CARMAN, J. G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. Biological Journal of the Linnean Society. 1997. v: 61.n:1.pp: 51–94.

CARMONA, F.; ANGELUCCI, M. A.; SALES, D. S.;CHIARATTI, T. M.; HONORATO, F. B.; BIANCHI, R. V.; PEREIRA, A. *Lippia alba* (Mill.) NE Brown hydroethanolic extract of the leaves is effective in the treatment of migraine in women. Phytomedicine.2013.v: 20(10).pp: 947-950.

CATANACH, A. S.;ERASMUSON, S.K.;PODIVINSKY, E.;JORDAN, B.R.;BICKNELL, R.Deletion mapping of genetic regions associated with apomixis in Hieracium**.** Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America.2006.v: 103.pp:18650–18655.

CHAUDHURY, A. M.; KOLTUNOW, A.; PAYNE, T.; LUO, M.; TUCKER, M. R.; DENNIS, E. S. PEACOCK, W. J. Control of early seed development. Annual review of cell and developmental biology.2001.v:17(1).pp: 677-699.

CLARK, AG.; KAO, T-H. Self-incompatibility: theoretical concepts and evolution. In: Williams, EG; Clarke, AE; Knox, BR. Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. ordrecht: Kluwer Academic Publishers.1994.pp: 220-244.

COMAI, L.; MADLUNG, A.; JOSEFSSON, C.; TYAGI, A. Do the different parental 'heteromes' cause genomic shock in newly formed allopolyploids? Philosophical transactions of the Royal Society of London B.2003.v: 358(1434).pp:1149–1155.

CONNER, J. A.;GUNAWAN, G.;OZIAS-AKINS, P. Recombination within the apospory specific genomic region leads to the uncoupling of apomixis components in Cenchrus ciliaris. Planta.2013.v: 238.pp:51–63.

CORDLE, A. R.; IRISH, E. E.;CHENG, C. L. Gene expression associated with apogamy commitment in Ceratopteris richardii. Sexual plant reproduction.2012. *25*(4). pp.: 293-304.

CORREA, J.R.C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas (2ed). FUNEP, Jaboticabal.1994. p.151.

COSENDAI, A. C.; RODEWALD, J.;HÖRANDL, E. Origin and distribution of autopolyploids via apomixis in the alpine species *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae). Taxon.2011. pp:355-364.

COSENDAI, A.C.; WAGNER, J.; LADINIG, U.; ROSCHE, C.; HÖRANDL, E. Geographical parthenogenesis and population genetic structure in the alpine species *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae). Heredity.2013.v: 110.pp: 560–569.

COSTA, M. E.; SAMPAIO, D. S.; PAOLI, A. A. & LEITE, S. C. Polyembryony and aspects of embryogenesis in Tabebuia ochracea (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). Brazilian Journal of Botany.2004.v: 27(2).pp: 395-406.

CUNHA, M.A.; BARROS, F. M. C.; GARCIA. L.O.; VEECK, A.P.L.; HEINZMANN, B. M.; LORO, V.L.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B.Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. Aquaculture.2010.v: 306.pp: 403–406.

CZAPIK, R. How to detect apomixis in Angiospermae. Polish Botanical Studies 1994.v:8.pp: 13-21.

DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. Current Agricultural Science and Technology.2005. v. 11, n. 2.

DE NETTANCOURT, D. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants.Springer Science & Business Media.2001.v:3.

DEWET, J. M. J. Origins of polyploids. Polyploidy: biological relevance. 1980.pp:3-15.

DOS SANTOS, A. P. M.; FRACASSO, C. M.; DOS SANTOS, M. L.; ROMERO, R.; SAZIMA, M.; OLIVEIRA, P. E. Reproductive biology and species geographical distribution in the Melastomataceae: a survey based on New World taxa. Annals of botany.2012.v: 110(3).pp: 667-679.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.;SUDA, J.Flow citometry with plant cells: Analysis of genes.Chromossomes and genomes. (livro).2007.

DOYLE, J. J.Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus.1990. 12.pp.:13-15.

FALISTOCCO, E.; TOSTI, N.; FALCINELLI , M. Cytomixis in pollen mother cells of diploid Dactylis, one of the origins of 2n gametes. Journal of Heredity.1995.v: 86.pp:448–453.

FELITTI, S. A.; SEIJO, J. G.; GONZÁLEZ, A. M.; PODIO, M.; LASPINA, N. V.; SIENA, L.; PESSINO, S. C. Expression of lorelei-like genes in aposporous and sexual Paspalum notatum plants. Plant molecular biology.2011.v: 77(4-5).pp: 337-354.

FIRETTI-LEGGIERI, F.; RIBEIRO DA COSTA, I.; LOHMANN, L. G.; SEMIR, J., & FORNI-MARTINS, E. R. Chromosome studies in Bignonieae (Bignoniaceae): the first record of polyploidy in Anemopaegma. Cytologia.2011.v: 76(2).pp: 185-191.

FIRETTI-LEGGIERI, F.; LOHMANN, L. G.; ALCANTARA, S.; DA COSTA, I. R., & SEMIR, J.2013. Polyploidy and polyembryony in Anemopaegma (Bignonieae, Bignoniaceae). Plant Reproduction.2013.v: 26(1).pp: 43-53.

FRYXEL, P. Mode of reproduction of higher plants. Botanical Review.1957. v:23.pp: 135-233.

GALLA, G.; BARCACCIA, G.; SCHALLAU, A.; MOLINS, M. P.; BÄUMLEIN, H.; SHARBEL, T. F. The cytohistological basis of apospory in *Hypericum perforatum* L. Sexual plant reproduction.2011.v: 24(1).pp: 47-61.

GARCÍA, R.; ASINS, M. J.; FORNER, J.; CARBONELL, E. A.Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. Theoretical and Applied Genetics.1999.v: 99(3-4).pp: 511-518.

GE, X. J.; SUN, M. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. Molecular Ecology.1999.v: 8(12).pp: 2061-2069.

GERASHCHENKOV, G. A.; YASYBAEVA, G. R.; ROZHNOVA, N. A.; CHEMERIS, A. V.Isolation of Promoters and Fragments of Genes Controlling Endosperm Development Without Fertilization in Arabidopsis and Engineering of the Antisense Constructions. European journal of molecular biotechnology.2015. (2), pp.: 56-62.

GERLACH, D. Befruchtung und Autogamie bei Rubus caesius. Biol. Zent. Bl.1965.v: 5.pp:611–633.

GOTTSCHALK, W. Chromosome and nucleus migration during microsporogenesis of *Pisum sativum*. Nucleus.1970.v: 13.pp:1–9.

GROSBERG, R. K.;STRATHMANN, R.R. The evolution of multicellularity: a minor major transition?. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics.2007.v*:* 38 .pp: 621-654.

GUAN, J.Z.; WANG, J.J.; CHENG, Z.H.; LIU, Y.; LI, Z.Y. Cytomixis and meiotic abnormalities during microsporogenesis are responsible for male sterility and chromosome variations in *Houttuynia cordata*. Genetics and Molecular Research.2012.v: 11.pp:121–130.

GUSTINE, D.L.; SHERWOOD, R.T. Apospory-linked molecular markers in buffelgrass**.** Crop Science.1997.v: 37.pp:947–951.

HAIG, D., & WESTOBY, M.Genomic imprinting in endosperm: its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of the same species, and its implications for the evolution of apomixis. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.1991.v: 333(1266).pp: 1-13.

HALVERSON, K.; HEARD, S. B.; NASON, J. D.; STIREMAN, J. O.Origins, distribution, and local co-occurrence of polyploid cytotypes in Solidago altissima (Asteraceae). American Journal of Botany.2008.v: 95(1).pp: 50-58.

HAND, M. L., & KOLTUNOW, A. M. The genetic control of apomixis: asexual seed formation. Genetics.2014.v: 197(2).pp: 441-450.

HANNA, W.W.; BASHAW, E.C. Apomixis: Its identification and use in plant breeding. Crop Science**,** 27.1987. pp: 1136–1139.

HARDER, L. D.; BARRETT, S. C. H. (Eds.). Ecology and evolution of flowers. Oxford: Oxford University Press.2006. pp. 61-80.

HAVANANDA, T.; BRUMMER, E. C.;DOYLE, J. J.2011. Complex patterns of autopolyploid evolution in alfalfa and allies (Medicago sativa; Leguminosae). American journal of botany.2011.v: 98(10).pp: 1633-1646.

HE, J. H.; SHAHID, M. Q.; CHEN, Z. X.; CHEN, X. A.; LIU, X. D.;LU, Y. G. Abnormal PMC microtubule distribution pattern and chromosome behavior resulted in low pollen fertility of an intersubspecific autotetraploid rice hybrid**.** Plant systematics and evolution.2011.v: *291*(3-4).pp: 257-265.

HOJSGAARD, D.; SCHEGG, E.; VALLS, J.F.M.; MARTINEZ, E.J.; QUARIN, C.L. Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus Anachyris (Poaceae). Flora.2008.v: 203.pp: 535–547.

HOJSGAARD, D.; KLATT, S.; BAIER, R.; CARMAN, J. G.; HÖRANDL, E. Taxonomy and biogeography of apomixis in angiosperms and associated biodiversity characteristics. Critical Reviews in Plant Sciences.2014.V: 33(5).pp: 414-427.

HORANDL, E. The complex causality of geographical parthenogenesis. New Phytologist.2006.v: 171.pp: 525–538.

HÖRANDL, E.; PAUN, O.Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials. Apomixis: Evolution, mechanisms and perspectives. 2007.ARG Gantner Verlag KG, Lichtenstein, 169-194.

HÖRANDL, E.; COSENDAI, A.;TEMSCH, E.M.Understanding the geographic distributions of apomictic plants: a case for a pluralistic approach.Plant Ecology & Diversity.2008. v: 1.pp:309–320.

H¨ORANDL, E.; HOJSGAARD, D.The evolution of apomixis in angiosperms: A reappraisal. Plant Biosystems.2012.v: 146.pp: 681–693.

JIAO, Y.; WICKETT, N.J.; AYYAMPALAYAM, S.; CHANDERBALI, .S.; LANDHERR, L.; RALPH, P.E.; TOMSHO, L.P.; HU, Y.; LIANG, H.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.; CLIFTON, S.W.; SCHLARBAUM, S.E.; SCHUSTER, S.C.; MA, H.; LEEBENS-MACK, J.; DEPAMPHILIS, C.W. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms.Nature. 2011. V:5;473(7345).pp:97-100.

KAMRA, O.P. Chromatin extrusion and cytomixis in pollen mother cells of *Hordeum*. Hereditas.1960.v: 46.pp:592–600.

KARASAWA, M.M.G.Diversidade Reprodutiva de Plantas – Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética– SBG.2009.

KEARNEY, M. Hybridization, glaciation and geographical parthenogenesis. Trends in Ecology and Evolution.2005.V: 20.pp: 495–502.

KOLTUNOW, A. M.Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. Plant Cell.1993.v: 5.pp:1425–1437.

KOLTUNOW, A. M.; BICKNELL, R.A.; CHAUDHURY, A.M.. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. Plant Physiology.1995.v: 108.4.pp : 1345.

KOLTUNOW, A.M.; JOHNSON, S.D.; BICKNELL, R.A. Sexual and apomictic development in Hieracium. Sexual Plant Reproduction.1998.v: 11.pp:213–230.

KOLTUNOW AM, GROSSNIKLAUS U.Apomixis: a developmental perspective. Annual Review of Plant Biology.2003.v:54.pp:547-574.

KOVALSKY , I. E.;V. G. S. NEFFA . Evidence of 2 *n* microspore production in natural diploid population of *Turnera sidoides* subsp. *Cárnea* and its relevance in the evolution of the *T. sidoides* (*Turneraceae*) autopolyploid complex. Journal of Plant Research.2012.v: 125.pp: 725 – 734.

KRAVTCHENKO, A. Y.; NAKAGAWA, H.; ABDYRAKHMANOVA, E. A.; SOKOLOV, V. A. Seed productivity and imprinting expression in apomictic maize-Tripsacum hybrids. In Doklady Biological Sciences. 2014.v: 458. No. 1. pp: 294-296.

LAKSHMANAN, K.K.; AMBEGAOKAR, K.B.Polyembryony. In Embryology of Angiosperms (ed. B.M. Johri). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.1984. pp. 445-474.

LARROSA, F. H.; MAUNE, J. F.; ERAZZÚ, L. E.;CAMADRO, E. L. Meiotic abnormalities underlying pollen sterility in wild potato hybrids and spontaneous populations. Plant Biology.2012.v: 14(1).pp: 223-233.

LATTOO, S.K.; KHAN, S.; BAMOTRA, S.; DHAR, A.K .Cytomixis impairs meiosis and influences reproductive success in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq.—an additional strategy and possible implications. Journal of Biosciences.2006.v: 31.pp:629–637.

LAW, J. A; JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. Nature Reviews Genetics.2010.v: 11.pp:204–220.

LEVIN, D. A.The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press.2002.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Molecular biology and evolution.1987.v: 4(3).pp: 203-221.

LI, X.F.; SONG, Z.Q.; FENG, D.S.; WANG, H.G. Cytomixis in *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum* and its hybrids with wheat. Cereal Res Commun.2009.v: 37.pp:353–361.

LIMA, C. B.; BOAVENTURA, A. C.; GOMES, M. M. Cuttings of *Lippia alba* with emphasis on time for seedling formation, substrates and plant growth regulators. Horticultura Brasileira.2015.v: *33*(2).pp: 230-235.

LO, E. Y.; STEFANOVIĆ, S.; DICKINSON, T. A. Population genetic structure of diploid sexual and polyploid apomictic hawthorns (Crataegus; Rosaceae) in the Pacific Northwest. Molecular ecology.2009.v: 18(6).pp: 1145-1160.

LOVELL, J. T.; ALIYU, O. M.; MAU, M.; SCHRANZ, M. E.; KOCH, M.; KIEFER, C.; SHARBEL, T. F. On the origin and evolution of apomixis in Boechera. Plant reproduction, 26(4).2013.pp: 309-315.

LUAN, L.; TU, S.B.; LONG, W.B.; WANG, X.; LIU, Y.H.; KONG, F.L.; HE, T.; YAN, W.G.; YU, M.Q.Cytogenetic studies on two F1 hybrids of autotetraploid Rice varieties showing extremely high level of heterosis. Plant Systematics and Evolution.2007.v: 267.pp:205–213.

LUAN, L.; WANG, X.; LONG, W.B.; LIU, Y.H.; TU, S.B.; XIAO, X.Y.; KONG, F.L. A comparative cytogenetic study of the rice (*Oryza sativa* L.) autotetraploid restorers and hybrids. Genetika.2009.v: 45.pp: 1225–1233.

MA, X. F., & GUSTAFSON, J. P.Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. Cytogenetic and genome research.2005.v: 109(1-3).pp: 236-249.

MAGLIANESI, M. A.; BLÜTHGEN, N.; BÖHNING-GAESE, K.; SCHLEUNING, M. Morphological traits determine specialization and resource use in plant–hummingbird networks in the neotropics. Ecology. 2014. v:95(12).pp: 3325-3334.

MARIE, D., BROWN, S. C.A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. Biology of the Cell.1993.v: 78(1-2).pp: 41-51.

MARK WELCH, D.B.;MESELSON, M. Evidence for the evolution of Bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange**.** Science.2000.v: 288.pp: 1211–1215.

MASON, A.S.SSR Genotyping. In: Batley J (ed) Plant Genotyping. Springer, New York.NY.2015.pp: 77-89.

MATZK, F. Euphytica.1991a.v: 55.pp: 65–72.

MATZK, F. Sexual Plant Reproduction.1991b.v: 4.pp:88–94.

MAYNARD SMITH, J. The origin and maintenance of sex. Group selection.1971.pp: 163-175.

MELARAGNO, J. E.; MEHROTRA, B., & COLEMAN, A. W. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of Arabidopsis. The Plant Cell.1993.v: 5(11).pp: 1661-1668.

MES, T. H. Character compatibility of molecular markers to distinguish asexual and sexual reproduction. Molecular Ecology.1998.v: 7(12).pp: 1719-1727.

MOGIE, M. Homospory and the cost of asexual reproduction. Evolution.1990. 44.pp: 1707–1710.

MOGIE, M. The evolution of asexual reproduction in plants. London: Chapman and Hall.1992.

MURSALIMOV, S.R.; DEINEKO, L.V. How cytomixis can form unreduced gametes in tobacco. Plant Systematics and Evolution.2015.v**:** 301.pp:1293–1297.

MURSALIMOV, S.R.; SIDORCHUK, Y.V.; DEINEKO, E.V.New insights into cytomixis: specific cellular features and prevalence in higher plants. Planta.2013.v: 238.pp:415–423.

NAKAGAWA, M.; OHKAWA, T.;KANEKO, Y. Flow cytometric assessment of cytotype distributions within local populations of *Phragmites australis* (Poaceae) around Lake Biwa, the largest lake in Japan. Plant Species Biology.2013.v: 28(1).pp: 94-100.

NAUMOVA, T. N. Apomixis in angiosperms. CRC press, 1992.160pp.

NAUMOVA, T. N.; VAN DER LAAK, J.; OSADTCHIY, J.; MATZK, F.; KRAVTCHENKO, A.; BERGERVOET, J.;BOUTILIER, K. Reproductive development in apomictic populations of *Arabis holboellii* (Brassicaceae). Sexual Plant Reproduction.2001.v: 14(4).pp: 195-200.

NELSON-JONES, B.; BRIGGS, D.; SMITH G. The origin of intermediate species of the genus *Sorbus*. Theoretical and Applied Genetics.2002.v: 105(6–7).pp:953–963.

NICULAU, E. D. S.; ALVES, P. B.; NOGUEIRA, P. C. D. L.; MORAES, V. R. D. S.; MATOS, A. P.; BERNARDO, A. R.; BLANK, A. F. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* l'Herit e *Lippia alba* (Mill) NE. Química Nova.2013.v: 36(9).pp: 1391-1394.

NIKLAS, KARL J. The evolutionary biology of plants. University of Chicago Press, 1997.

NOGLER, G.Gametophytic apomixis in Embryology of Angiosperms.1984.pp. 475–518, edited by B. M. Johri. Springer, Berlin.

NOYES, R. D.;RIESEBERG, L.H.Two independent loci control agamospermy (apomixis) in the triploid flowering plant Erigeron annuus. Genetics.2000.v: 155.pp: 379–390.

O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M.E. The study of plant structure: principles and selected methods. Melbourne – Australia: Termarcarphi Pty Ltd.1981. 45 p.

OGAWA, D.; JOHNSON, S. D.; HENDERSON, S. T.;KOLTUNOW, A. M. Genetic separation of autonomous endosperm formation (AutE) from the two other components of apomixis in *Hieracium***.** Plant reproduction.2013.v:26(2).pp: 113-123.

OKADA, T.; HU, Y.; TUCKER, M. R.; TAYLOR, J. M.; JOHNSON, S. D.; SPRIGGS, A.;KOLTUNOW, A. M. Enlarging cells initiating apomixis in *Hieracium praealtum* transition to an embryo sac program prior to entering mitosis. Plant physiology.2013. v: 163, n: 1, pp: 216-231.

OTTO, S. P. The evolutionary consequences of polyploidy. Cell.2007.v: 131(3).pp: 452-462.

OZIAS-AKINS, P.; LUBBERS, E. L.; HANNA, W. W.;MCNAY, J. W. Transmission of the apomictic mode of reproduction in Pennisetum: co-inheritance of the trait and molecular markers. Theoretical and Applied Genetics.1993.v:85(5).pp: 632-638.

OZIAS-AKINS, P.; ROCHE, D.; HANNA, W. W.Tight clustering and hemizygosity of apomixis-linked molecular markers in Pennisetum squamulatum implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. Proceedings of the National Academy of Sciences.1998.v: 95(9).pp: 5127-5132.

OZIAS-AKINS, P.; VAN DIJK, P.J. Mendelian genetics of apomixis in plants. Annual Review Genetics.2007.pp:509-37.

PARK, C.H.; KATO, M. Apomixis in the interspecific triploid hybrid fern Cornopteris christenseniana (Woodsiaceae). Journal of Plant Research.v: 116.2003. pp: 93–103.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ- MATA, D.; VILLAR, A.*Lippia:* traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology.2001.v: 76.pp: 201- 214.

PATERNIANI, E. Evolução dos sistemas reprodutivos. In: Salzano, F. A Natureza do processo evolutivo**.** Ciência e Cultura.v:26 (5). 1974.pp: 476-481.

PAULE, J.; SHARBEL, T.F.; DOBES, C. Apomictic and sexual lineages of the *Potentilla argentea* L. group (Rosaceae): Cytotype and molecular genetic differentiation. Taxon.2011. v: 60.pp: 721–732.

PAUN, O.; GREILHUBER, J.; TEMSCH, E.M.; HÖRANDL, E. Patterns, sources and ecological implications of clonal diversity in apomictic *Ranunculus carpaticola* (*Ranunculus auricomus* complex, Ranunculaceae). Molecular Ecology.2006.v: 15.pp: 897–910.

PEIXOTO, M. G.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; BLANK, A. F.; DA SILVA LIMA, A.; MENEZES, T. S. A.; DE ALEXANDRIA SANTOS, D.; DE FÁTIMA ARRIGONI-BLANK, M.Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. Veterinary parasitology.2015.v: 210(1).pp: 118-122.

PELLINO, M.; HOJSGAARD, D.; SCHMUTZER, T.; SCHOLZ, U.; HÖRANDL, E.; VOGEL, H.; SHARBEL, T. F. Asexual genome evolution in the apomictic *Ranunculus auricomus* complex: examining the effects of hybridization and mutation accumulation. Molecular ecology.2013.v: *22*(23). pp: 5908-5921.

PENTEADO, M.I.O; SANTOS, A.C.M.; RODRIGUES, I.F.; VALLE, C.C.; SEIXAS,M.A.C.; ESTEVES, A. Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria*. Boletim de Pesquisa Embrapa. Embrapa Gado de Corte. Campo Grande.2000. 32 p.

PESSINO, S. C.; ORTIZ, J. P. A.; LEBLANC, O.; DO VALLE, C. B.; EVANS, C.; HAYWARD, M. D. Identification of a maize linkage group related to apomixis in Brachiaria. Theoretical and applied genetics.1997.v: 94(3-4).pp: 439-444.

PICHOT, C.; MAATAOUI, M.; RADDI ,S.; RADDI P.Surrogate mother for endangered *Cupressus*. Nature.2001.v:412.pp: 39–39.

PIERRE, P. M.O. Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae). 80p. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.2004.

PIERRE, P.M.O.Poliploida em acessos de *Lippia alba* (Mill.)N.E.Br (Verbenaceae).Tese (Doutorado em genetica e melhoramento de plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.2008.

PIERRE, P.M.O.; SOUSA, S.M; DAVIDE, L. C.; MACHADO, M.A.; VICCINI, L.F. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). Annals of Brazilian Academy of Science.2011.v: 83(3).pp:993-1005.

PONGRATZ, N.; SHARBEL, T.F.; BEUKEBOOM, L.W.; MICHIELS, N.K.Allozyme variability in sexual and parthenogenetic freshwater planarians: evidence for polyphyletic origin of parthenogenetic lineages through hybridization with coexisting sexuals. Heredity.1997.v: 81.pp:38–47.

PRATT, C.; EINSET, J.Development of the embryo sac in some American blackberries. American Journal of Botany.1955.v: 42.pp: 637–645.

QUARIN, C.L.; HANNA, W.W. Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. Crop Science.1980.v: 20.pp: 69-75.

QUARIN, C.L.; ESPINOZA, F.; MARTINEZ, E.; PESSINO, S.; BOVO, O.A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. Sexual Plant Reproduction.2001.v: 13.pp: 243–249.

RABIGER, D. S.; TAYLOR, J. M.; SPRIGGS, A.; HAND, M. L.; HENDERSON, S. T.; JOHNSON, S. D.; MUKAI, Y.Generation of an integrated Hieracium genomic and transcriptomic resource enables exploration of small RNA pathways during apomixis initiation. BMC biology.2016. v: 14. n: 1. pp: 86.

RAMANNA, M. S.;JACOBSEN, E. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement—A review. Euphytica.2003.v: 133.pp: 3 – 18.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W.Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics.1998.pp: 467-501.

RAMSEY , J.;SCHEMSKE, D.W. Neopolyploidy in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics.2002.v: 33.pp: 589 – 639 .

REBOZZIO, R. N.; RODRÍGUEZ, M. P.; STEIN, J.; ORTIZ, J. P. A.; QUARIN, C. L.; ESPINOZA, F. Validation of molecular markers linked to apospory in tetraploid races of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. Molecular breeding.2012.v: 29(1).pp: 189-198.

REIS, A. C.; SOUSA, S. M.; VALE, A. A.; PIERRE, P. M.; FRANCO, A. L.; CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F. *Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autopolyploid complex?. American journal of botany.2014.v: 101(6).pp: 1002-1012.

REIS, A.C.; SOUSA, S.M.; VICCINI, L.F. High frequency of cytomixis observed at zygotene in tetraploid *Lippia alba.* Plant Systematics and Evolution.2016.v: 302.pp:121–127.

RICHARDS, A.J. Plant breeding systems. 2a. ed. Cambridge: Chapmann & Hall. 1997.529p.

ROCHE, D.; CONG, P.; CHEN, Z.; HANNA, W. W.; GUSTINE, D. L.; SHERWOOD, R. T.; OZIAS-AKINS, P. An apospory-specific genomic region is conserved between Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and *Pennisetum squamulatum* Fresen. The Plant Journal.1999.v: 19(2).pp: 203-208.

ROSAS-GUERRERO, V.; AGUILAR, R.; MARTÉN-RODRÍGUEZ, S.; ASHWORTH, L.; LOPEZARAIZA-MIKEL, M.; BASTIDA, J. M.; QUESADA, M. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators?. Ecology letters. 2014. v: 17(3).pp: 388-400.

SALIMENA, F. R. G.Revisão taxonômica de Lippia sect. Rhodolippia Schauer (Verbenaceae).Dissertação de doutorado.2000.

SAMPAIO, D.S. Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações nos sistemas de autoincompatibilidade. PhD thesis, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2010

SAMPAIO, D. S.; BITTENCOURT JÚNIOR, N. S. & OLIVEIRA, P. E. Sporophytic apomixis in polyploid Anemopaegma species (Bignoniaceae) from Central Brazil. Botanical Journal of the Linnean Society.2013.v: 173(1).pp: 77-91.

ŠARHANOVA, P., VAŠUT, R.J., DANCˇAK, M., BUREŠ, P., TRAVNICˇEK, B., 2.New insights into the variability of reproduction modes in European populations of *Rubus* subgen.*Rubus*: how sexual are polyploid brambles? Sexual Plant Reproduction.2012.v: 25.pp: 319–335.

SAVIDAN, Y.;DUJARDIN, M. Apomixie: la prochalne revolution verte?. Recherche.1992.v: 241.pp**:**326-334.

SAVIDAN, Y.Apomixis: Genetics and breeding.Plant Breeding Reviews.2000.v:18.pp:13-86.

SCHALLAU, A.;ARZENTON, F.;JOHNSTON, A.J.HÄHNEL, U.;KOSZEGI, D.2010. Identification and genetic analysis of the APOSPORY locus in *Hypericum perforatum* L. Plant Journal.2010.v: 62.pp**:** 773–784.

SCHINKEL, C. C.; KIRCHHEIMER, B.; DELLINGER, A. S.; KLATT, S.; WINKLER, M.; DULLINGER, S. & HÖRANDL, E.Correlations of polyploidy and apomixis with elevation and associated environmental gradients in an alpine plant. AoB Plants.2016.v: 8. plw064.

Schmidt, A., Schmid, M. W., & Grossniklaus, U.Plant germline formation: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction. Development.2015. v:142(2),pp: 229-241.

SEOIGHE, C.Turning the clock back on ancient genome duplication**.** Current Opinion in Genetics & Development.2003.v: 13.pp: 636-643.

SHARBEL, T.F.; VOIGT, M.L.; CORRAL, J.M.; GALLA, G.; KUMLEHN, J.; KLUKAS, C.; SCHREIBER, F.; VOGEL, H.; ROTTER, B.Apomictic and sexual ovules of *Boechera* display heterochronic global gene expression patterns. Plant Cell.2010. v:22(3).pp:655–671.

SHIRASAWA, K.; HAND, M. L.; HENDERSON, S. T.; OKADA, T.; JOHNSON, S. D.; TAYLOR, J. M.; TABATA, S.A reference genetic linkage map of apomictic Hieracium species based on expressed markers derived from developing ovule transcripts. Annals of botany.2015. v: 115, n: 4, pp: 567-580.

SILVEIRA, É. D.; ALVES-FERREIRA, M.; GUIMARÃES, L. A.; DA SILVA, F. R.; CARNEIRO, V. T. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. *BMC* Plant Biology.2009.v: 9(1).pp: 84.

SILVERTOWN, J. The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. International Journal of Plant Sciences.2008.v: 169.1.pp: 157-168.

SINGHAL, V.K.; KUMAR, P. Impact of cytomixis on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of *Himalayan poppy* (Meconopsis aculeata Royle). Journal of Biosciences.2008.v: 33.pp:371–380.

SCHOCKEN, N.R.L.Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill.).N.E.Brown.Dissertação de mestrado. Universidade estadual de Campinas, Campinas.2007.

SHUKLA, R.; KUMAR, A.; SINGH, P.; DUBEY, N.K**.**International Journal of Food Microbiology.2009. v:135(2). pp.165-170.

SOCHOR, M.; VAŠUT, R. J.; SHARBEL, T. F.;TRÁVNÍČEK, B. How just a few makes a lot: Speciation via reticulation and apomixis on example of European brambles (Rubus subgen. Rubus, Rosaceae). Molecular phylogenetics and evolution.2015.v: 89.pp: 13-27.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; PIRES, J. C.; KOVARIK, A.; TATE, J. A.; MAVRODIEV, E. Recent and recurrent polyploidy in Tragopogon (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. Biological Journal of the Linnean Society.2004.v: 82(4).pp: 485-501.

SOUSA, D. G.; SOUSA, S. D. G.; SILVA, R. E. R.; SILVA-ALVES, K. S.; FERREIRA-DA-SILVA, F. W.; KERNTOPF, M. R.; BARBOSA, R. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. Brazilian Journal of Medical and Biological Research.2015. (AHEAD), 00-00.

SOARES, B. V.; NEVES, L. R.; OLIVEIRA, M. S. B.; CHAVES, F. C. M.; DIAS, M. K. R.; CHAGAS, E. C. & TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. Aquaculture.2016.v: *452*.pp: 107-114.

SPERANZA , P.;VAIO, M.;MAZZELLA, Z. Karyotypes of two cytotypes of *Paspalum quadrifarium* Lam. (Poaceae). An alternative technique for small chromosomes in plants. Genetics and Molecular Biology.2003.v: 26**.**pp: 449 – 503.

SPIES, J. J. Embryo sac development in some South African *Lippia* species (Verbenaceae). South African Journal of Botany. 1984.v: 3.2.pp: 120-124.

SPIES, J. J.;STIRTON, C.H.Embryo sac development in some South African cultivars of *Lantana camara*. Bothalia.1982.v: 14.1.pp: 113-117.

SPILLANE, C.; CURTIS, M. D.; GROSSNIKLAUS, U. Nature Biotechnol.2004.v: 22.pp: 687–691.

STEBBINS, G.L. Chromosomal evolution in higher plants. Reading: Addison-Wesley. 1971. 216 p.

STEFANINI, M.B.; RODRIGUES, S.D.; MING, L.C.2001. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. Horticultura Brasileira.2001.v: 20.pp**:**18-23.

SUDA, J.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; TRIBSCH, A.; SCHNEEWEISS, G. M.; TRÁVNÍČEK, P.; SCHÖNSWETTER, P. Complex distribution patterns of di-, tetra-, and hexaploid cytotypes in the European high mountain plant *Senecio carniolicus* (Asteraceae). American Journal of Botany.2007.v: 94(8).pp: 1391-1401.

TAKEBAYASHI, N; MORRELL, P.L.Is self-fertilization an evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionary approach. American Journal of Botany 88.2001.pp: 1143–1150.

TAŞKIN, K. M.; ÖZBILEN, A.; SEZER, F.; HÜRKAN, K.; GÜNEŞ, Ş. Structure and expression of dna methyltransferase genes from apomictic and sexual Boechera species. Computational Biology and Chemistry.2017.v: 67.pp: 15-21.

The Plant List. http://www.theplantlist.org. Acessado em 2017.

THOMPSON, S.L.; WHITTON, J.Patterns of recurrent evolution and geographic parthenogenesis within apomictic polyploid Easter daises (Townsendia hookeri). Molecular Ecology.2006.v: 15.pp: 3389–3400.

TIAN, Z. X.; MA, H. L.; ZHANG, Y. M. Embryo types and characteristics of apomixis in *Poa pratensis.* Scientia Agricultura Sinica.2013. v: 46.pp: 2633-2642.

TONI, C.; BECKER, A. G.; SIMÕES, L. N.; PINHEIRO, C. G.; DE LIMA SILVA, L.; HEINZMANN, B. M.;BALDISSEROTTO, B. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Fish physiology and biochemistry.2014.v: 40(3).pp: 701-714.

TORRES, E.; LOPEZ, N.Phenotypic plasticity of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in responde to availability of light. Acta Biológica Colombiana.2007.v: 12.pp:91-102.

TUCKER, M.R.; PAECH, N.A.; WILLEMSE, M.T.M.; KOLTUNOW, A.M. Dynamics of callose deposition and ß-1, 3-glucanase expression during reproductive events in sexual and apomictic Hieracium. Planta.2001.v: 212.pp:487–498.

VALE, T. G., MATOS, F. J. A., LIMA, T. C. M., VIANA, G. S. B. Behavioral affects of essencial Oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Chemotypes. Journal of Ethnopharmacology.1999.v: 167.pp: 127-133.

VALE, A.A. Plasticidade fenotípica em acessos de *Lippia alba* (Verbenaceae). Dissertação (Mestrado em Biologia), Universidade Federal de Juiz de Fora.2010.

VALLE, C.B. Cytology, mode of reproduction and forage quality of selected species of Brachiaria Griseb. University of Illinois. 90p. PhD thesis.1986.

VAN DER HULST, R.G. M.; MES, T.H. M.; DEN NIJS, J.C. M.; BACHMANN, C. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers reveal that population structure of triploid dandelions (*Taraxacum officinale*) exhibits both clonality and recombination. Molecular Ecology.2000.v: 9.pp: 1–8.

VAN DIJK, P. J.; TAS, I. C.; FALQUE, M.; BAKX-SCHOTMAN, T.Crosses between sexual and apomictic dandelions (Taraxacum). II. The breakdown of apomixis. Heredity.1999.v: 83(6).pp: 715-721.

VAN DIJK, P. J.; VIJVERBERG, K.The significance of apomixis in the evolution of the angiosperms: a reappraisal. Regnum Vegetabile.2005.v: 143.pp: 101.

VENÂNCIO, D. D. F. A.; VICCINI, L. F.; LUIZI-PONZO, A. P. & PREZOTO, F. Flower-Visiting Insects and Phenology of *Lippia alba* (Lamiales: Verbenaceae): Floral Color Changes and Environmental Conditions as Cues for Pollinators. Environmental entomology.2016.v: *45*(3).pp: 685-693.

VICCINI, L. F.; SILVEIRA, R. S.; DO VALE, A. A.; DE CAMPOS, J. M. S.; REIS, A. C.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.;GRAZUL, R. M. Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). Industrial Crops and Products.2014.v: 59.pp: 14-19.

VIEIRA, M. L. C., SANTINI, L., DINIZ, A. L., & MUNHOZ, C. D. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. Genetics and molecular biology.2016.

VIELLE, J.P.; BURSON, B.L.; BASHAW, E.C.; HUSSEY, M.A. Early fertilization events in the sexual and aposporous egg apparatus of *Pennisetum ciliari* (L.) Link. The Plant Journal.1995.v: 8.pp: 309-316.

VISCOSI, V.; CARDINI, A. Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. PloS one .2011.v:6.10 e25630.

VOGLER, DW; KALISZ, S. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. Evolution.2001.v: 55(1).pp: 202-204.

WANG, J.; TIAN, L.; MADLUNG, A.; LEE, H.S.; CHEN, M.; LEE, J.J.; WATSON, B.; KAGOCHI, T.; COMAI, L.; CHEN, Z.J. Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. Genetics.2004. v:167(4).pp:1961–1973.

WEISS-SCHNEEWEISS, H.; EMADZADE, K., JANG, T. S. & SCHNEEWEISS, G. M. Evolutionary consequences, constraints and potential of polyploidy in plants. Cytogenetic and genome research.2013.v: 140(2-4).pp: 137-150.

WENDEL, J.F.Genome evolution in polyploids. Plant Molecular Biology.2000.v: 42.pp:225-249.

WHITTON, J.; SEARS, C.J.; BAACK, E.J.; OTTO, S.OP. The Dynamic Nature of Apomixis in the Angiosperms. International Journal of Plant Sciences.2007.

WORTHINGTON, M., HEFFELFINGER, C., BERNAL, D., QUINTERO, C., ZAPATA, Y. P., PEREZ, J. G.;Tohme, J. A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. Genetics.2016. v. 203, n. 3, pp: 1117-1132.

YOUNG, B. A.; SHERWOOD, R. T.; BASHAW, E. C. Cleared-pistil and thicksectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. Canadian Journal of Botany.1979.v: 57.pp: 1668-1672.