

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Thalita Bordignon da Cunha

Aspectos Reprodutivos no Complexo Poliploide *Lippia alba* (Mill) N.E. Br

Juiz de Fora

2023

Thalita Bordignon da Cunha

Aspectos Reprodutivos no Complexo Poliploide *Lippia alba* (Mill) N.E. Br

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Coorientadora: Dra. Victória Rabelo Campos

Juiz de Fora

2023

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

Bordignon da Cunha, Thalita.

Aspectos Reprodutivos no Complexo Poliploide *Lippia alba* (Mill)
N.E. Br / Thalita Bordignon da Cunha. – 2023.
47 f. : il.

Orientador: Lyderson Facio Viccini

Coorientadora: Victória Rabelo Campos

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2023.

1. Poliploidia. 2. Reprodução. 3. *Lippia alba*. I. Facio Viccini, Lyderson, orient. II. Rabelo Campos, Victória, coorient. III. Título.

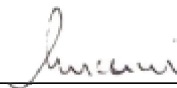
Thalita Bordignon da Cunha

Aspectos Reprodutivos no Complexo Poliploide *Lippia alba* (Mill) N.E. Br

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em 18 de janeiro de 2023

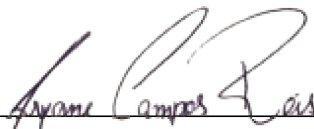
BANCA EXAMINADORA



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



Dra. Victória Rabelo Campos
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dra. Aryane Campos Reis
Universidade Federal de Juiz de Fora

A Deus, que todos os dias me presenteia com
força e coragem para continuar;

À minha mãe, Ildair Bordignon, sinônimo de
incomparável amor, esteio e fortaleza que me
permitiram chegar até aqui;

À minha avó, Ildair Ramos Bordignon, que
sempre me ensinou a importância das criações
divinas e o amor pelas plantas;

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer tão presente em minha vida e nunca deixar eu me sentir sozinha, e por me conceder força e coragem para chegar até aqui;

À Universidade Federal de Juiz de Fora, à Coordenação de Ciências Biológicas e ao CNPq pelo apoio e oportunidade concedidos a mim;

Ao meu querido orientador, Prof. Dr Lyderson Facio Viccini, que tantas vezes ouviu minhas angústias e com carinho e paciência me apoiou, me incentivou e acreditou em mim, e pela grande amizade e aprendizado desses quase cinco anos de trabalho;

À minha coorientadora e amiga, Victória Rabelo Campos, que com admirável carinho e dedicação pelo que faz me ensinou tanto e tão pacientemente. Não poderia existir melhor pessoa para me apresentar o fascinante mundo de *Lippia alba*.

Aos professores Dr. José Marcello Salabert de Campos, Dr. Marcelo de Oliveira Santos, Dra. Michelle Munk, Dr. Carlos Maranduba, Dra. Juliane Medeiros, e Dr. Saulo Marçal de Sousa por todo apoio, conversas e auxílio ao longo da minha jornada acadêmica;

A todos os meus amigos de laboratório, pelo apoio, pelos divertidos cafês e por fazerem meus dias mais alegres, Juliana Siqueira, Rafael Valotti, Moisés Gusmão, Luiza Carvalho, Carine Lugato, Vivian, Silvioney, e em especial, Dr Elyabe Monteiro de Matos, pelo carinho, amizade e presteza em me ajudar sempre que precisei, e Dra. Aryane Reis pela ajuda e companheirismo ao longo do trabalho;

À minha amada mãe, Ildair Bordignon, meu exemplo e minha fortaleza, pelo incomparável apoio, companheirismo e amor;

Ao meu pai, Delias da Cunha, por acreditar em mim, me apoiar e permitir que eu realizasse esse sonho;

À minha amada avó Ildair Ramos, pelas orações, por todo amor e incentivo;

Ao meu grande companheiro de vida, Bernardo Martins, por tanto amor, espera e apoio e por vibrar a cada conquista minha;

À minha família, em especial meus padrinhos, Edna e Márcio, que caminham junto a mim e compartilham dos meus sonhos, e meu irmão Jonathan, meu grande incentivador;

Às minhas amigas, Yasmim e Mariangela, laços que tornaram minha vivência em outra cidade muito mais agradável e, hoje, representam para mim uma família;

A todos os professores que contribuíram para a minha formação;

Muito obrigada!

RESUMO

A poliploidia é considerada um dos principais mecanismos relacionados à evolução e especiação em plantas estando muitas vezes relacionada ao sucesso evolutivo de diferentes espécies. A duplicação do genoma contribui para ampliar as plasticidades genômicas e fenotípicas, favorecendo a adaptação e o estabelecimento das plantas nos mais diversos ambientes. A espécie *Lippia alba* (Verbenaceae) é conhecida por vários nomes populares como erva cidreira, falsa melissa e chá de tabuleiro, possuindo importância medicinal devido a presença de diferentes componentes químicos em seus óleos essenciais. Mesmo com muitos estudos acerca de suas propriedades, muito pouco se sabe sobre a biologia da espécie. Estudos recentes revelaram cinco números cromossômicos para *L. alba*, sendo eles: $2n= 30, 38, 45, 60$ e 90 , o que torna a espécie um modelo particular para estudos de poliploidia de origem tropical. No presente trabalho, reuniu-se informações que visam contribuir para o entendimento da reprodução e da variação genômica da espécie. Com o intuito de identificar a possível presença de gametas não reduzidos na espécie, analisou-se a morfometria polínica de 29 indivíduos diploides, assim como a quantidade de DNA de sementes de diploides e tetraploides. A taxa de germinação de sementes providas de polinização aberta e controlada, em indivíduos de diferentes ploidias, assim como a quantidade de DNA da progênie oriunda destes indivíduos, foram objetos de estudo. Além disso, a germinação polínica de indivíduos de diferentes números cromossômicos foi também avaliada, e o cruzamento artificial entre indivíduos de diferentes números cromossômicos foi realizado. Dentre os resultados obtidos, foi possível inferir que a espécie *Lippia alba* apresenta uma preferência pela alogamia, ou seja, os indivíduos tendem a cruzar entre si, sendo possível observar também uma tendência dos indivíduos diploides produzirem progênie diploide, com pouquíssimas exceções. A medição polínica nos forneceu indícios de uma grande variação dentro de um mesmo citótipo. Pólenes com medidas acima da média sugerem que a não-redução gamética seja o principal meio de formação de poliploides na espécie. Destaca-se o comportamento reprodutivo diferenciado entre indivíduos diploides e poliploides do complexo *Lippia alba*. A germinação das sementes e análise de progênie nos permitem inferir que a espécie realiza o processo de autofecundação, mas que alguns indivíduos podem apresentar algum grau de autoincompatibilidade. A média de germinação polínica entre indivíduos diploides apresentou-se significativamente maior do que entre os poliploides. O surgimento de aneuploides evidencia a necessidade de se investigar com mais detalhes o papel dos mesmos na formação do complexo.

Palavras-chave: Poliploidia. Reprodução. *Lippia alba*.

ABSTRACT

Polyploidy is considered one of the main mechanisms related to evolution and speciation in plants and is often related to the evolutionary success of different species. The genome duplication contributes to increase the genomic and phenotypic plasticity, favoring the adaptation and establishment of plants in the most diverse environments. The *Lippia alba* (Verbenaceae) species is known by several popular names such as "erva cidreira", "falsa melissa" and "chá de tabuleiro", having medicinal importance due to the presence of different chemical components in its essential oils. Despite many studies about its properties, very little is known about the biology of the species. Recent studies have revealed five chromosome numbers for *L. alba*, which are: $2n= 30, 38, 45, 60$ and 90 , making the species a particular model for studies of tropical origin of poliploidy. In the present work, information was gathered to contribute to the understand of the reproduction and genetic variation of the species. In order to identify the possible presence of unreduced gametes in the species, the pollen morphometry of 29 diploid individuals was analyzed, as well as the amount of DNA from diploid and tetraploid seeds. The germination rate of open and controlled pollination seeds in individuals of different ploidies of the species, as well as the amount of DNA of the germinated progeny from these individuals were studied. In addition, pollen germination of individuals with different chromosome numbers was also evaluated, and the artificial crossing between individuals of different chromosomal numbers was performed. Among the results obtained, it was possible to infer that *Lippia alba* species presents a preference for allogamy, the individuals tend to cross among themselves, and it was also possible to observe a tendency of diploid individuals to produce diploid progeny, with few exceptions. The pollen measurement provided us with evidence of a large variation within the same cytotype. Pollen measurements above average suggest that gametic non-reduction is the main mechanism of polyploid formation in the species. The differentiated reproductive behavior between diploid and polyploid individuals *Lippia alba* complex is noteworthy. Seed germination and progeny analysis allow us to infer that the species performs the process of self-fertilization but that some individuals may present some degree of self-incompatibility. The average pollen germination rate among diploid individuals was significantly higher than among polyploids. The emergence of aneuploids highlights the need to investigate in more detail their role in the formation of the complex.

Keywords: Polyploidy. Reproduction. *Lippia alba*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1A	– Inflorescência da espécie <i>Lippia alba</i> coletada para análise polínica.....	20
Figura 1B	– Flor individual e anteras de <i>L. alba</i>	20
Figura 2	– Inflorescências isoladas e submetidas ao cruzamento artificial em <i>L. alba</i>	21
Figura 3A	– Representação da distribuição de medidas polínicas em indivíduos diploides de <i>Lippia alba</i> (BGEN-58)	22
Figura 3B	– Representação da distribuição de medidas polínicas em indivíduos diploides de <i>Lippia alba</i> (BGEN-89)	22
Figura 4A	– Representação da distribuição de medidas polínicas em indivíduos diploides de <i>Lippia alba</i> (BGEN-21)	22
Figura 4B	– Representação da distribuição de medidas polínicas em indivíduos diploides de <i>Lippia alba</i> (Planta F)	22
Figura 5	– Representação de Grãos de pólen de <i>L. alba</i> com diferentes tamanhos.....	23
Figura 6	– Gráfico representativo da taxa de germinação de grãos de pólen provindos de inflorescências da espécie <i>Lippia alba</i>	25
Figura 7A	– Comparação de médias de germinação polínica entre diploides e poliploides da espécie <i>L. alba</i>	27
Figura 7B	– Pólens da espécie <i>L. alba</i>	27
Figura 8A	– Histogramas representativos da quantidade de DNA em sementes de indivíduos diploides de <i>L. alba</i> (BGEN-98).....	28
Figura 8B	– Histogramas representativos da quantidade de DNA em sementes de indivíduos diploides de <i>L. alba</i> (BGEN-71).....	28
Figura 9A	– Histogramas representativos da quantidade de DNA em sementes de indivíduos tetraploides de <i>L. alba</i> (BGEN-45).....	28
Figura 9B	– Histogramas representativos da quantidade de DNA em sementes de indivíduos tetraploides de <i>L. alba</i> (BGEN-64).....	28
Figura 10	– Taxa de germinação de sementes provindas de inflorescências de polinização aberta da espécie <i>Lippia alba</i>	29
Figura 11	– Taxa de germinação de sementes provindas de inflorescências de polinização controlada da espécie <i>Lippia alba</i>	30
Figura 12	– Nível de ploidia da progênie oriunda de indivíduos diploides, triploides e tetraploides da espécie <i>Lippia alba</i> provindos de polinização aberta.....	31

Figura 13	–	Nível de ploidia da progênie oriunda de indivíduos triploides da espécie <i>Lippia alba</i> provindos de polinização controlada.....	31
Figura 14	–	Esquema representando os cruzamentos artificiais realizados na espécie <i>Lippia alba</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Distribuição das medidas polínicas de um acesso diploide de <i>Lippia.alba</i> (BGEN-38)	23
Tabela 2	– Distribuição das medidas polínicas de um acesso diploide de <i>Lippia.alba</i> (BGEN-55)	24
Tabela 3	– Representação da distribuição homogênea entre quartis para um acesso diploide de <i>Lippia alba</i> (BGEN-72)	24
Tabela 4	– Germinação polínica em indivíduos diploides, aneuploide, triploides e tetraploides da espécie <i>Lippia alba</i>	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Reprodução nas angiospermas	12
1.2 Poliploidia.....	14
1.3 Reprodução e poliploidia	15
1.4 Autopoliploides naturais.....	166
1.5 <i>Lippia alba</i>	177
2 MATERIAL E MÉTODOS	1919
2.1 Material Biológico	19
2.2 Metodologia.....	19
2.2.1 Morfometria Polínica	19
2.2.2 Germinação Polínica	19
2.2.3 Citometria de fluxo de sementes	20
2.2.4 Taxa de germinação de sementes e estimativa de DNA da progênie	190
2.2.5 Cruzamento Artificial	200
3 RESULTADOS.....	22
3.1 Morfometria polínica	22
3.2- Germinação polínica.....	255
3.3 Citometria de fluxo de sementes	29
3.4 Taxa de germinação de sementes.....	309
3.5 Estimativa de DNA da progênie de polinização aberta e controlada de indivíduos de diferentes ploidias.....	25
3.6 Cruzamento Artificial	32
4 DISCUSSÃO	333
5 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 Reprodução nas angiospermas

Em sua história evolutiva, as angiospermas são um grupo de plantas com sementes com características especiais: flores, frutos e um ciclo de vida distinto, que as tornam diferentes de todas as outras plantas. Com relação às suas características vegetativas e florais, as angiospermas são extremamente diversas, e há mais de 100 milhões de anos, as plantas com flor têm dominado o ambiente terrestre, sendo o maior filo de organismos fotossintetizantes (RAVEN, 2014). Atualmente, estima-se que existam 352.000 espécies de Angiospermas pertencentes a 405 famílias e 14.559 gêneros, constituindo o maior e mais diverso grupo de plantas (THE PLANT LIST, 2023).

As plantas, diferentemente da maioria dos animais, são organismos imóveis (sésseis) necessitando, no caso das espécies alógamas, de agentes externos para a sua reprodução sexuada. As angiospermas desenvolveram um conjunto de características que permitem que elas controlem ativamente a sua escolha de parceiros. Esse conjunto de características está reunido na flor, que apresenta uma diversidade extraordinária de formas e cores, o que pode estar ecologicamente relacionado à influência de vários fatores (bióticos e abióticos), que atuam na evolução dessas estruturas, sendo a pressão seletiva por parte dos polinizadores de grande importância (FIRETTI-LEGGIERI e EL OTTRA, 2013). 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). A seleção de tais aspectos florais podem estar diretamente relacionados à especiação e diversificação dos táxons por afetarem o sucesso reprodutivo das plantas (FIRETTI-LEGGIERI e EL OTTRA, 2013).

Dentre os principais fatores reprodutivos relacionados ao sucesso desses indivíduos destaca-se a presença de uma fase diploide desenvolvida e autotrófica; fase haploide reduzida; dupla fertilização e o desenvolvimento de carpelos para maior proteção das sementes (PATERNIANI, 1974). Nesses indivíduos a reprodução pode ocorrer sexuada ou assexuadamente.

A reprodução sexuada é decorrente da alternância de gerações regular entre meiose e fecundação produzindo uma enorme variabilidade genética, o que ajuda na manutenção da diversidade (FIRETTI-LEGGIERI e EL OTTRA, 2013). A variabilidade genética obtida através da recombinação entre os genótipos, permite adaptações rápidas

às mudanças ecológicas e climáticas (HAMILTON, 1980; KONDRASHOV, 1988; WEST et al. 1999; SARHANOVÁ et al., 2012). Nas angiospermas, a reprodução sexuada não requer apenas a produção de gametas, mas também o desenvolvimento das flores e de vários outros dispositivos que aumentam as possibilidades de fecundação dos mesmos. O sistema de cruzamento pode ser autógamo (ex.: 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). Muitas plantas evitam a autopolinização e, deste modo, as consequências da depressão endogâmica, desenvolvendo mecanismos que favoreçam a polinização cruzada. Tal impedimento é alcançado pela separação dos gametas femininos e masculinos no tempo ou no espaço e por mecanismos de auto-incompatibilidade. (FIRETTI-LEGGIERI e EL OTTRA, 2013).

Já a reprodução assexuada, compreende todos os mecanismos que originam clones (geneticamente idênticos à planta mãe), podendo ocorrer através da apomixia e da reprodução vegetativa (SILVERTOWN, 2008). Caracteriza-se pela vantagem da geração de numerosos propágulos em um curto espaço de tempo e sem a dependência da transferência de gametas, mas também pode ser desvantajosa evolutivamente devido à ausência de variabilidade genética. A reprodução vegetativa consiste na produção de clones a partir de tecidos vegetativos, produzidos pela formação de plântulas aéreas e também de estolões, rizomas, bulbos, e outros que podem ser dispersos para longe da planta-mãe. (FIRETTI-LEGGIERI e EL OTTRA, 2013).

A apomixia por sua vez, 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). Em plantas apomíticas, o desenvolvimento sexual é desregulado em vários momentos: (1) a meiose é alterada ou está ausente para a produção de um gametófito feminino não reduzido e geneticamente idêntico à planta-mãe; (2) a fertilização é evitada, produzindo um embrião autônomo (partenogênese); (3) o desenvolvimento do endosperma é espontâneo ou sexual. (FIRETTI-LEGGIERI e EL OTTRA, 2013). Sua vantagem em comparação à propagação vegetativa consiste no fato de que as unidades de dispersão na apomixia (sementes) permitem uma área maior de ocupação. É importante ressaltar que no processo apomítico, os indivíduos têm origem de uma única célula (célula ovo não fertilizada ou célula somática) enquanto que na propagação vegetativa o desenvolvimento ocorre a partir de tecidos multicelulares (MOGIE, 1992).

Frequentemente, as plantas se reproduzem sexuada e assexuadamente, garantindo-se com as duas estratégias evolutivas (FIRETTI-LEGGIERI e EL OTTRA, 2013). Normalmente, há um modo de reprodução e um sistema de cruzamento predominante e eventos esporádicos do outro (BODANESE- ZANETTINI e CAVALLI, 2003).

1.2 Poliploidia

Durante a evolução das plantas, a duplicação de todo o genoma (poliploidização) constitui um dos principais mecanismos propulsores da especiação (STEBBINS, 1971; JIAO et al., 2011; ALBERT et al., 2013; SOLTIS e SOLTIS, 2016). Estudos revelam que todas as angiospermas são paleopoliploides, tendo experimentado um ou vários eventos de poliploidia durante sua história evolutiva (OTTO, 2007; SONG et al, 2012).

Ao longo do tempo, cinco extinções em massa aconteceram devido a catástrofes naturais ao longo da escala de tempo geológico com perda de habitat e degradação do ambiente. No entanto, essa crise impulsionou novos nichos ecológicos, permitindo a especiação e o estabelecimento de novas espécies. Muitas plantas em floração resistiram à quinta extinção em massa no final do Cretáceo, em consequência da duplicação de seus genomas.

A origem de novas espécies via poliploidia requer uma série de eventos de probabilidade aparentemente baixa, incluindo hibridação, formação de gametas não reduzidos, estabelecimento e sobrevivência. Apesar destas aparentes barreiras, espécies poliploides são comuns em toda a flora do mundo e são particularmente abundantes em altitudes elevadas (SOLTIS, 2015). Comparações nas taxas de diversificação sugerem que a duplicação do genoma pode ter levado a um aumento dramático da riqueza de espécies em várias linhagens de angiospermas, incluindo Poaceae, Solanaceae, Fabaceae e Brassicaceae (SOLTIS, 2009; SONG et al, 2012; AVILA et al, 2015). Estima-se que novas espécies poliploides provavelmente aumentarão por conta de sua vantagem adaptativa competitiva sobre parentes diploides, e a incidência de ocorrência de autopoliploides sob as ameaças das mudanças climáticas pode ser de 33% (LEVIN, 2019; LAVANIA, 2020). Tais poliploides podem substituir competitivamente seus ancestrais, ou podem invadir novos territórios. Isso é proporcional aos episódios de duplicações genômicas que ocorreram como uma fuga para as alterações ambientais na era da 5ª extinção em massa, levando à evolução das linhagens terrestres dominantes (JIAO, 2011, LAVANIA, 2020)

Em contraste com o processo de evolução gradual, onde as novas espécies evoluem a partir de populações isoladas, a especiação pode também surgir repentinamente. O mecanismo mais comum de especiação abrupta é através da poliploidia (RANNEY, 2006; REIS, 2013). Por exemplo, quando um tetraploide surge numa população, geralmente hibridiza com outros tetraploides e diploides. Esta hibridização cria, muitas vezes, barreiras reprodutivas que podem contribuir para a especiação (REIS, 2013).

A presença da poliploidia é concomitante com a hibridização e é mais prevalente em plantas do que em outros táxons. Essa duplicação do genoma pode aumentar a heterozigosidade, facilitar a autopolinização e aumentar a plasticidade fenotípica (SUTHERLAND. et al, 2021). O sucesso dos poliploides é frequentemente atribuído ao aumento da diversidade genética mantida dentro de um único indivíduo poliploide em relação ao de seus progenitores diploides. Além disso, essa diversidade genética pode se manifestar como "novidade" a níveis bioquímicos, fisiológicos, morfológicos e ecológicos, dando aos poliploides uma vantagem, pelo menos a curto termo, sobre seus parentais diploides (SOLTIS, 2015). A poliploidia pode estar presente em células de um tecido, em partes de um organismo ou em organismos inteiros, e representa uma importante característica na evolução de muitos eucariotas (OTTO, 2007; SONG et al., 2012; REIS,2013).

1.3 Reprodução e poliploidia

Os indivíduos poliploides podem surgir pela duplicação de células somáticas e pela fusão de gametas não reduzidos, sendo essa última a forma mais comum na natureza (HARLAN e DE WETT, 1975; RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; KREINER et al, 2017).

Os poliploides podem ser classificados em três classes de acordo com sua origem: (1) os que surgiram pela união de um gameta não reduzido com um gameta normal; (2) pela união de dois gametas não reduzidos e (3) por duplicação somática. Entretanto as duas primeiras classes são mais comuns (HARLAN e DE WETT, 1975; KREINER et al, 2017). Gametas não reduzidos são resultados de um processo meiótico anormal em que a redução do número cromossômico não ocorre (PELOQUIM, 1981; SCHIFINO-WITTMANN e DAL'AGNOL, 2001). Além do controle genético, fatores ambientais como temperatura, herbivoria, ferimentos, déficit hídrico e escassez de nutrientes influenciam a produção de gametas não reduzidos (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; KREINER et al, 2017).

Estudos sobre algumas espécies que apresentaram anormalidades na microsporogênese desencadeando uma segregação cromossômica desbalanceada, sugerem 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 inicialmente quando aliada à propagação vegetativa ou associada à apomixia (QUARIN, 2001). Após o estabelecimento dos poliploides, estes terão mais sucesso se realizarem a autofecundação e/ou puderem se reproduzir assexuadamente. Duas mudanças no sistema reprodutivo desses indivíduos refletem justamente estas condições: quebra do sistema de auto-incompatibilidade, que induz ao aumento das taxas de autofecundação e reprodução assexuada, mais precisamente a apomixia. A literatura ressalta que a maioria das plantas apomíticas é poliploide (OTTO & WHITTON, 2000).

Com relação à biologia reprodutiva, alguns estudos associam taxas diferenciais da germinação de tubos polínicos ao nível de ploidia de determinadas espécies e apontam que a poliploidia pode contribuir negativamente neste parâmetro (GREEN, 1946; AVILA et al, 2015). Além disso, na autoploidia, 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 (REIS, 2014). Assim, as espécies clonais podem possuir uma capacidade competitiva mais alta para persistir em ambientes em mudança e habitats marginais sem investir energia na reprodução sexuada (HARDION et al, 2015). Por outro lado, a poliploidia pode acarretar vantagens adaptativas reprodutivas em espécies invasoras colonizando novos ambientes e aumentando a distribuição geográfica (TE BEEST et al. 2012).

1.4 Autopoliploides naturais

Segundo Van Drunen e Husband (2018), os autopoliploides podem diferir ecologicamente e fenotipicamente de seus pais de ploidias inferiores (STEBBINS, 1950; LEVIN, 1983; RAMSEY e SCHEMSKE, 2002; HUSBAND et al., 2016), mas como estudos são comumente realizados em citotipos há muito estabelecidos, não está claro se as diferenças são devido a alterações instantâneas associadas ao evento de duplicação do genoma inteiro (WGD) (STEBBINS, 1971; OTTO e WHITTON, 2000; COMAI, 2005) ou divergência através da seleção após o processo (BRETAGNOLLE e LUMARET, 1995; WEISS-SCHENEEWEISS et al., 2013).

Um dos principais critérios para o reconhecimento de um autopoliploide tem sido a herança polissômica. No entanto, a detecção de autopoliploides foi há muito dificultada

pela falta de ferramentas fáceis para avaliar a diversidade genética e os padrões de herança. Estudos sobre eletroforese revelaram uma série de autoploidos não reconhecidos anteriormente, levando a que cada vez mais espécies fossem adicionadas à lista de autoploidos naturais (LAVANIA, 2020).

Alguns exemplos de poliploides naturais incluem: banana (*Musa sapientis*), *Dactylis glomerata*, capim “timothy” (*Phleum pratense*), *Agropyron cristatum* (HERMSEN, 1984), trevo branco (*Trifolium repens*) (ZOHARY & HELLER, 1984) e cornichão (*Lotus corniculatus*) (BEUSELINCK et al., 2003).

Destaca-se também *Chamerion angustifolium*, uma erva perene, autocompatível, polinizada por insetos e que ocorre amplamente em todo o hemisfério norte em habitat predominantemente aberto ou perturbado. Esta espécie apresenta ploidia variante, com diploide ($2n = 2x = 36$), tetraploide ($2n = 4x = 72$) e indivíduos triploides pouco frequentes que ocorrem naturalmente na América do Norte (SABARA et al., 2013; VAN DRUNEN e HUSBAND, 2018). Os tetraploides são autotetraploides, derivados da duplicação do genoma diploide de *C. angustifolium* (ROY, 2008; VAN DRUNEN e HUSBAND, 2018).

Além desses, *Lippia alba*, espécie de variada importância, é um exemplo de autoploid natural de grande interesse do nosso grupo de estudo. As informações e estudos desenvolvidos, atualmente, com a espécie serão explicitados mais detalhadamente no próximo tópico.

1.5 *Lippia alba*

A espécie *Lippia alba* (Verbenaceae) 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 (CORREA et al., 1994; STEFANINI et al., 2001). A espécie possui importância medicinal, devido a presença de diferentes componentes químicos, apresentando diversas atividades biológicas, dentre elas analgésica, antitérmica, antioxidante, bactericida, acaricida, fungicida, inseticida, anticonvulsivante, antiinflamatória, antiparasitária, antiespasmódica, sedativa e também na utilização como repelente (SHUKLA et al., 2009; DA 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; DE FREITAS SOUZA et al., 2018; NUNES et al., 2018; SANTOS, 2021).

Nativa da América do Sul, a espécie possui ampla distribuição ocorrendo desde regiões de clima tropical até regiões de clima temperado, podendo ser encontrada em margens de rios, lagos e açudes onde os solos são mais arenosos. Apesar da existência de

diversos estudos relacionados às 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. De acordo com Reis et al. (2014), *L. alba* constitui um complexo poliploide, possuindo indivíduos com número cromossômico $2n = 30, 38, 45, 60$ e 90 e as alterações meióticas sugerem que pólenes desbalanceados e não reduzidos estariam envolvidos na origem destes cinco citótipos. Segundo este mesmo estudo, a hipótese de que gametas não reduzidos estão relacionados com a formação de novos conjuntos cromossômicos evidencia-se pela presença de pólenes de maiores tamanhos, principalmente em indivíduos diploides. Com relação à reprodução, o grupo do Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora obteve os primeiros resultados nos quais revelaram um modo de reprodução singular e diferenciado entre diploides e poliploides quando seus botões eram submetidos ao isolamento (CAMPOS, 2017).

Contudo, maiores informações relacionadas ao modo reprodutivo da espécie ainda são escassas. A análise do comportamento reprodutivo entre os indivíduos de mesma ploidia ou de ploidias diferentes através de seus cruzamentos é de suma importância para agregar à compreensão da origem dos diferentes citótipos em *Lippia alba*, bem como elucidar questões relacionadas à viabilidade de seus gametas e suas características reprodutivas.

Além da importância do levantamento de informações sobre sua biologia, a representação de um complexo poliploide com cinco números cromossômicos torna a espécie um modelo particular para estudos de poliploidia em espécies de origem tropical. Com base nisso, no presente trabalho, reuniu-se informações que contribuam para se entender a reprodução e a base genética da espécie.

Dessa forma, foram propostas as seguintes abordagens: avaliação da presença de gametas não reduzidos nos indivíduos diploides da espécie *L. alba* por meio da morfometria polínica; análise da taxa de germinação polínica de indivíduos de diferentes números cromossômicos; análise da taxa de germinação das sementes nos diferentes níveis de ploidia e em diferentes situações (polinização aberta e controlada), assim como a estimativa da quantidade de DNA da progênie desses mesmos indivíduos, através da citometria de fluxo e a realização de cruzamentos artificiais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Biológico

Foram utilizados Indivíduos de diferentes ploídias da espécie *Lippia alba* sob cultivo na Estação Experimental de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora (EEP-UFJF), de acordo com a qualidade e disponibilidade de material.

2.2 Metodologia

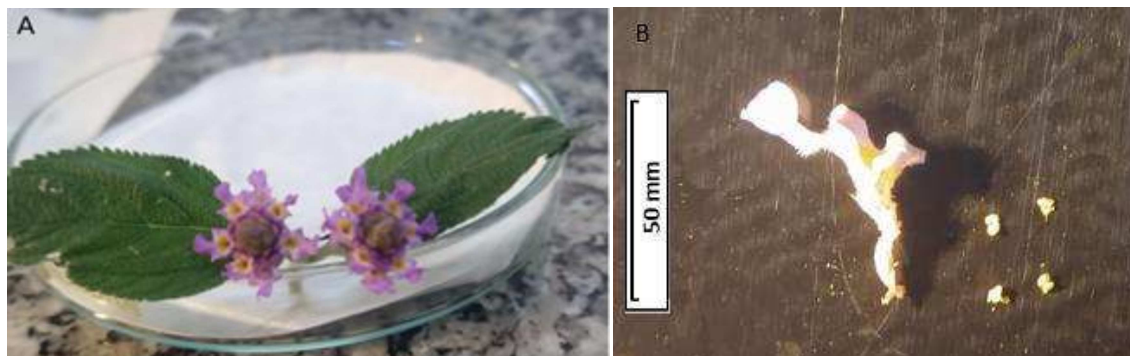
2.2.1 Morfometria Polínica

Foi avaliado o tamanho de 1000 grãos de pólen de um total de 29 indivíduos diploides que floresceram durante o desenvolvimento do projeto. Anteras frescas e maduras foram inicialmente fixadas em uma solução Carnoy (3 álcool: 1 ácido acético) por pelo menos 24 horas. Posteriormente, foram dispostas em lâminas, maceradas com agulha para a exposição dos grãos de pólen, coradas com orceína acética e cobertas com lamínula. Através do software ImageProPlus 4.1 (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, EUA), foi realizada a média das medidas de três dimensões de cada pólen para se obter média final de cada estrutura. Para análise dos dados, foi realizado o teste t ($p < 0,05$) para comparação da média do pólen reduzido (n) e não-reduzido (2n).

2.2.2 Germinação Polínica

Botões florais de indivíduos de diferentes números cromossômicos, sendo 22 diploides, 4 triploides, 4 tetraploides e 1 aneuploide, foram coletados de acordo com a disponibilidade de material. As inflorescências que se apresentavam recém-abertas, com o interior das flores de cor amarelo intenso, indicando anteras frescas e presença dos pólenes, foram selecionadas (Fig.1A). Em uma lâmina, as anteras foram extraídas e maceradas para liberação dos pólenes (Fig.1B). O material foi exposto a uma solução de sacarose a 50% e coberto com lamínula, que por sua vez foi selada com esmalte incolor para impedir a dessecação do material. As lâminas foram levadas à estufa à 37°, overnight, e posteriormente foram analisadas em microscópio. Para a análise foi estipulado o seguinte padrão: foram contabilizados os pólenes que germinaram em uma amostra de 500 pólenes por indivíduo. Foi considerado germinado os pólenes que apresentaram extensão do tubo polínico maior que o dobro de seu tamanho. Para análise de comparação de médias foi realizado o teste t a 5%

Figura 1. A - Inflorescência da espécie *Lippia alba* coletada para análise polínica. **B** - Flor individual e anteras de *L. alba*



. Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2.3 Citometria de fluxo de sementes

Sementes individuais verdes foram embebidas em água por pelo menos 30 min. Posteriormente, sementes individuais foram trituradas em 300 μ l de tampão WPB (LOUREIRO et al., 2007) e filtradas em malha de 30 μ m. Em seguida foi adicionado 25 μ l de iodeto de propídeo. A análise foi realizada no citômetro Cytoflex (Beckman Coulter).

2.2.4 Taxa de germinação de sementes e estimativa de DNA da progênie

Sementes dos indivíduos de diferentes ploidias, em diferentes condições (polinização aberta e controlada), foram coletadas e, posteriormente colocadas para germinar em placa de petri (9 cm de diâmetro), com papel filtro umedecido. As condições de germinação foram padronizadas como a seguir: 6 horas a 25°C, seguidas de 4 horas a 40°C, 4 horas a 25°C e 10 horas a 18°C. Para a estimativa da quantidade de DNA, folhas das plântulas germinadas em placa de petri, foram maceradas individualmente em tampão WBP (LOUREIRO et al., 2007), filtradas em malha de 30 μ m e coradas com iodeto de propídeo. A análise foi realizada em citômetro modelo Cytoflex (Beckman Coulter).

2.2.5 Cruzamento Artificial

O cruzamento foi realizado a partir da planta mãe BGEN77 (diploide). O critério para a utilização desse indivíduo está relacionado a resultados anteriores obtidos pelo grupo de pesquisa no qual não foi observada a presença de autofecundação. Sendo assim, qualquer semente produzida por esse indivíduo sob condição de isolamento reprodutivo terá sua origem do cruzamento artificial realizado. No total, três cruzamentos foram realizados, com polens de progenitores diploide (BGEN-12), triploide (BGEN-59) e tetraploide (BGEN-64), selecionados de acordo com a disponibilidade de material e dados

de germinação polínica obtidos por este mesmo trabalho. Com o auxílio de uma agulha, os pólenes foram retirados de flores frescas dos indivíduos selecionados e introduzidos nas flores da planta mãe, em inflorescências já isoladas anteriormente. Após o processo, as inflorescências foram novamente isoladas (Fig. 2). O experimento foi acompanhado frequentemente até que as inflorescências cruzadas estivessem completamente secas. Nessas condições, as mesmas foram coletadas e abertas, avaliando-se a possível presença de sementes.

Figura 2 - Inflorescências isoladas e submetidas ao cruzamento artificial em *Lippia alba*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

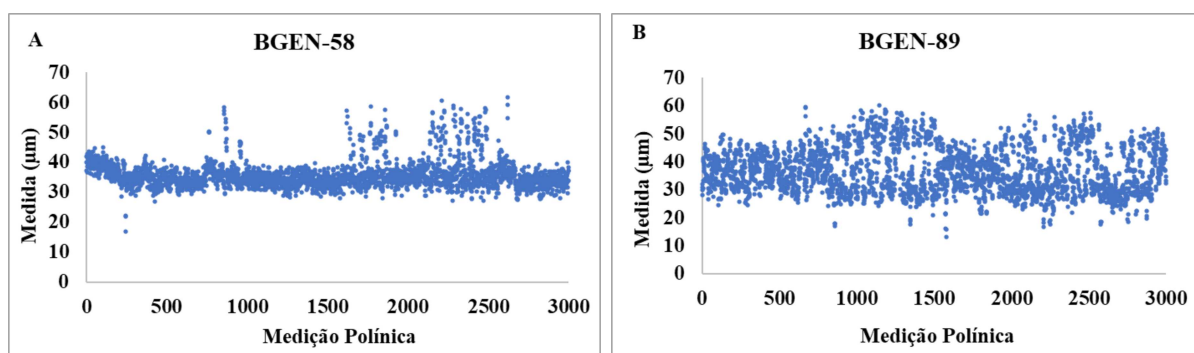
Quando originadas sementes, estas foram colocadas para germinar em placas de petri com papel filtro umedecido, nas seguintes condições: 2 horas à 24°C; 4 horas à 26°C; 5 horas à 25°C; 5 horas à 23°C e 8 horas à 25°C.

3 RESULTADOS

3.1 Morfometria polínica

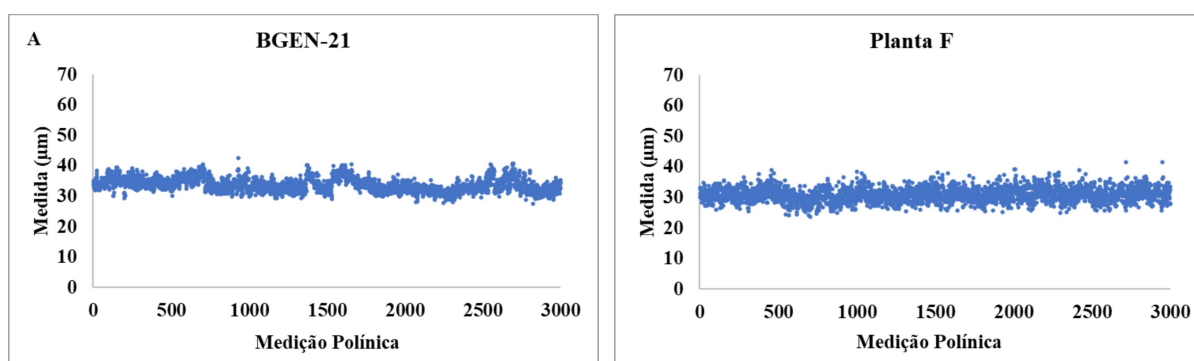
Dentre os indivíduos diploides analisados, foi possível observar diferenças na medição polínica. Alguns apresentaram uma maior variação, como BGEN-58, variando de 16,99 a 61,74 μm e BGEN-89, variando de 13,04 a 60,22 μm (Fig. 3A e 3B, respectivamente) enquanto outros uma menor variação, como BGEN-21, variando de 27,59 a 42,66 μm e Planta F, variando de 34,49 a 30,82 μm (Fig.4A e 4B, respectivamente), como ilustrado nos gráficos de dispersão abaixo.

Figura 3 A e B - Representação da distribuição de medidas polínicas em indivíduos diploides de *Lippia alba*. A- BGEN-58; B- BGEN-89



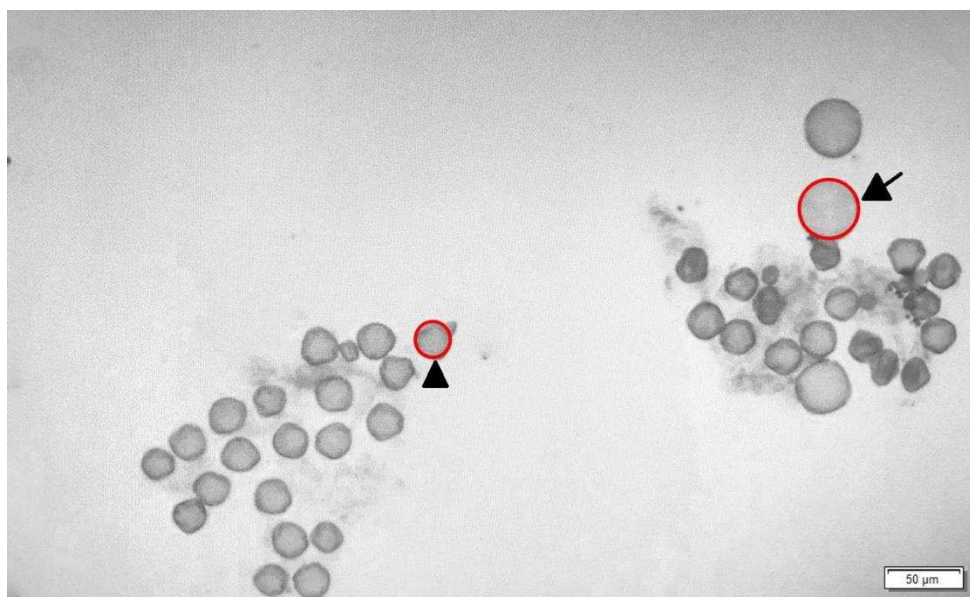
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 A e B - Representação da distribuição de medidas polínicas em indivíduos diploides de *Lippia alba* A- BGEN-21; B- Planta F.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 - Representação de Grãos de pólen de *L. alba* com diferentes tamanhos. A seta representa um pólen de diâmetro acima da média e a cabeça de seta, um pólen de tamanho normal. Barra: 50 μm .



Fonte: Elaborado pelo autor.

É importante salientar que na maior parte dos indivíduos que apresentaram pólen chegando a tamanhos extremos, a maioria de suas medidas se mantiveram em valores medianos, como por exemplo BGEN-12, que apresentou um máximo de 60,23 μm de medição, mas a maioria de suas medidas se concentraram na faixa de 24,78 a 51,38 μm . Um outro exemplo é o indivíduo BGEN-89 (Fig.3B), que possui um mínimo de 14,99 e um máximo de 58,4 μm , mas a maioria de suas medidas se mantiveram entre 25,85 e 47,56 μm . Em contribuição, com relação aos quartis calculados, a maior parte dos acessos apresentou a maior quantidade de medidas concentradas nos quartis centrais, de valor mediano, em detrimento dos quartis extremos para mais ou para menos. Os dados de quartis de BGEN38 (Tab.1) e BGEN55 (Tab.2) exemplificam esse resultado:

Tabela 1 - Distribuição das medidas polínicas de um acesso diploide de *L.alba* (BGEN-38).

Quartis (em μm)	Número de medições nos intervalos
23,17 - 29,24	90
29,25 - 35,32	699
35,33 - 41,4	179
41,5 - 47,44	32
Total	1000

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 - Distribuição das medidas polínicas de um acesso diploide de *L.alba*
(BGEN-55)

Quartis (em μm)	Número de medições nos intervalos
19,56 - 26,85	2
26,86 - 34,15	594
34,16 - 41,45	399
41,46 - 48,71	5
Total	1000

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dos 29 acessos analisados, 16 apresentaram mais de 75% das suas medidas concentradas nos quartis superiores ou inferiores. Desses, 12 acessos possuem medidas acima de 75% para os dois menores quartis, e alguns se destacaram por apresentar essa porcentagem bastante elevada, como: BGEN48 com 91,10%, BGEN65 com 90,90% e BGEN67 com 92,70%. Em contraponto, apenas 4 acessos possuem medidas acima de 75% para os dois maiores quartis, sendo eles: BGEN 11 com 79,60%, BGEN40 com 75,10%, BGEN75 com 76% e BGEN90 com 75,6%.

Alguns dos demais acessos, apresentaram a distribuição de suas medidas de forma mais homogênea entre os quartis inferiores e superiores, como BGEN72. Contudo, a maior quantidade de medições desse acesso também se concentra nos quartis centrais (Tab.3).

Tabela 3 - Representação da distribuição homogênea entre quartis para um acesso diploide de *Lippia alba* (BGEN-72).

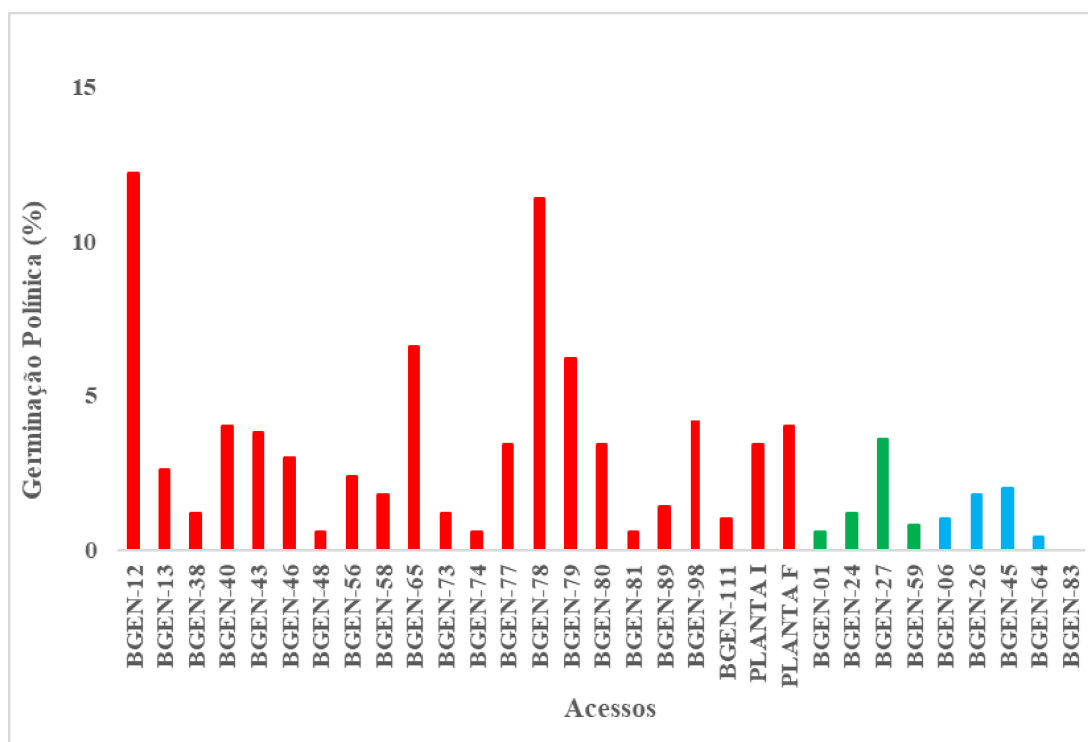
Quartis (em μm)	Número de medições nos intervalos
24,42 – 30,40	83
30,41 – 36,39	430
36,40 – 42,38	336
42,39 – 48,34	151
Total	1000
% Quartis inferiores	51,30%
% Quartis superiores	48,70%

Fonte: Elaborado pelo autor

3.2 Germinação polínica

Como resultado, foi possível observar baixa taxa de germinação polínica entre os indivíduos observados, sendo a mais alta de 12,2%. Os diploides (barras vermelhas) apresentaram as maiores taxas dentre as ploidias, variando de 0,6% a 12%. Já os triploides (barras verdes) apresentaram variação entre 0,6% e 3,6% e os tetraploides (barras azuis) entre 0,4% e 2%. O aneuploide por sua vez, não apresentou germinação polínica (Fig. 12; Tabela 4).

Figura 6 - Gráfico representativo da taxa de germinação de grãos de pólen provindos de inflorescências da espécie *Lippia alba*. Barras vermelhas: diploides; barras verdes: triploides; barras azuis: tetraploides; BGEN-83:aneuploide.



Fonte: Elaborado pelo autor.

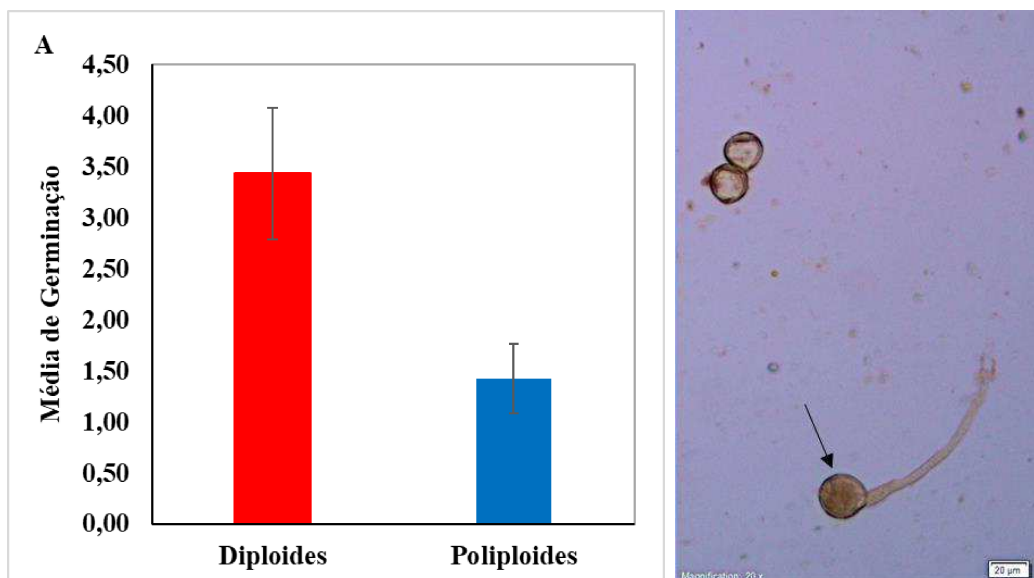
Tabela 4 - Germinação polínica em indivíduos diploides, aneuploide, triploides e tetraploides da espécie *Lippia alba*.

Indivíduo	Ploidia	Pólen germinados	Pólen não germinados	Germinação (%)
BGEN-12	2x	61	439	12,2
BGEN-13	2x	13	487	2,6
BGEN-38	2x	6	494	1,2
BGEN-40	2x	20	480	4
BGEN-43	2x	19	481	3,8
BGEN-46	2x	15	485	3,09
BGEN-48	2x	3	497	0,6
BGEN-56	2x	12	488	2,4
BGEN-58	2x	9	491	1,8
BGEN-65	2x	33	467	6,6
BGEN-73	2x	6	494	1,2
BGEN-74	2x	3	497	0,6
BGEN-77	2x	17	483	3,4
BGEN-78	2x	57	443	11,4
BGEN-79	2x	31	469	6,2
BGEN-80	2x	17	483	3,4
BGEN-81	2x	3	497	0,6
BGEN-89	2x	7	493	1,4
BGEN-98	2x	21	479	4,2
BGEN-111	2x	5	495	1
Planta I	2x	17	483	3,4
Planta F	2x	20	480	4
BGEN-83	Aneuploide	0	500	0
BGEN-01	3x	3	497	0,6
BGEN-24	3x	6	494	1,2
BGEN-27	3x	18	482	3,6
BGEN-59	3x	4	496	0,8
BGEN-06	4x	5	495	1
BGEN-26	4x	9	491	1,8
BGEN-45	4x	10	490	2
BGEN-64	4x	2	498	0,4

Fonte: Elaborado pelo autor.

É importante salientar que a média de germinação polínica entre os diploides e poliploides apresentou diferença significativa (Fig.13).

Figura 7 A-Comparação de médias de germinação polínica entre diploides e poliploides. B- Pólen da espécie *L. alba*. Médias significativamente diferentes pelo teste t a 5%. A seta evidencia um pólen germinado. Barra: 20 μ m.



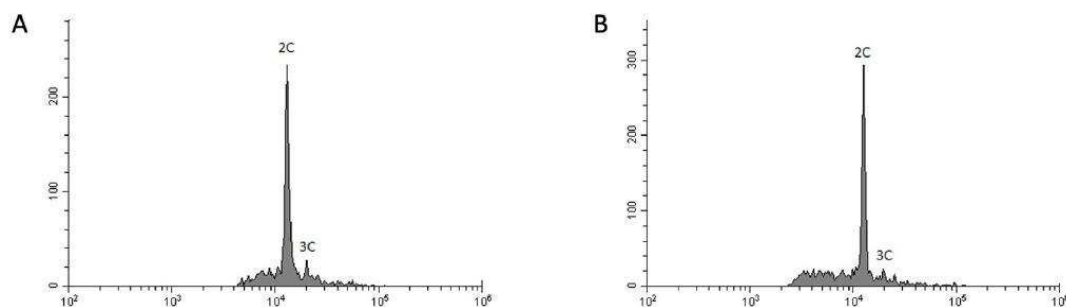
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3- Citometria de fluxo de sementes

A citometria de fluxo foi utilizada para se estimar a quantidade de DNA do embrião e do endosperma. Na citometria de sementes foram analisados 4 diploides e 2 tetraploides. A quantidade de amostras por indivíduo variou devido à qualidade e disponibilidade do material.

De forma geral, os indivíduos diploides apresentam uma progênie com pico diploide e quando possível a visualização do endosperma, concluiu-se que o mesmo seja triploide, sugerindo então a ocorrência de uma reprodução sexuada normal, como exemplificado nos histogramas da figura 6.

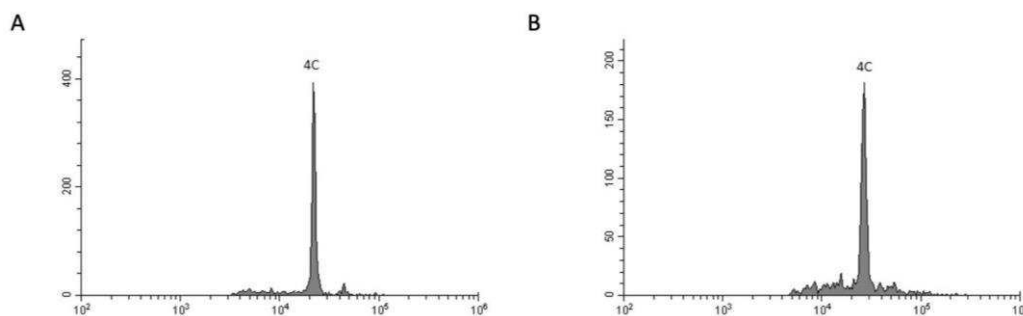
Figura 8A e B - Histogramas representativos da quantidade de DNA em sementes de indivíduos diploides de *L. alba* A- BGEN-98; B- BGEN-71.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre os tetraploides analisados foi possível observar a presença de embriões com quantidade de DNA próxima a dos tetraploides, mas podendo também ser indivíduos aneuploides. Para confirmação seria necessário a germinação e crescimento desses indivíduos para análise citogenética. Em alguns histogramas foi possível detectar o endosperma com ploidia compatível com a reprodução sexuada (Fig.7). Em outros, foi possível a detecção apenas do embrião.

Figura 9 A e B - Histogramas representativos da quantidade de DNA em sementes de indivíduos tetraploides de *L. alba*. A- BGEN-45; B- BGEN-64.

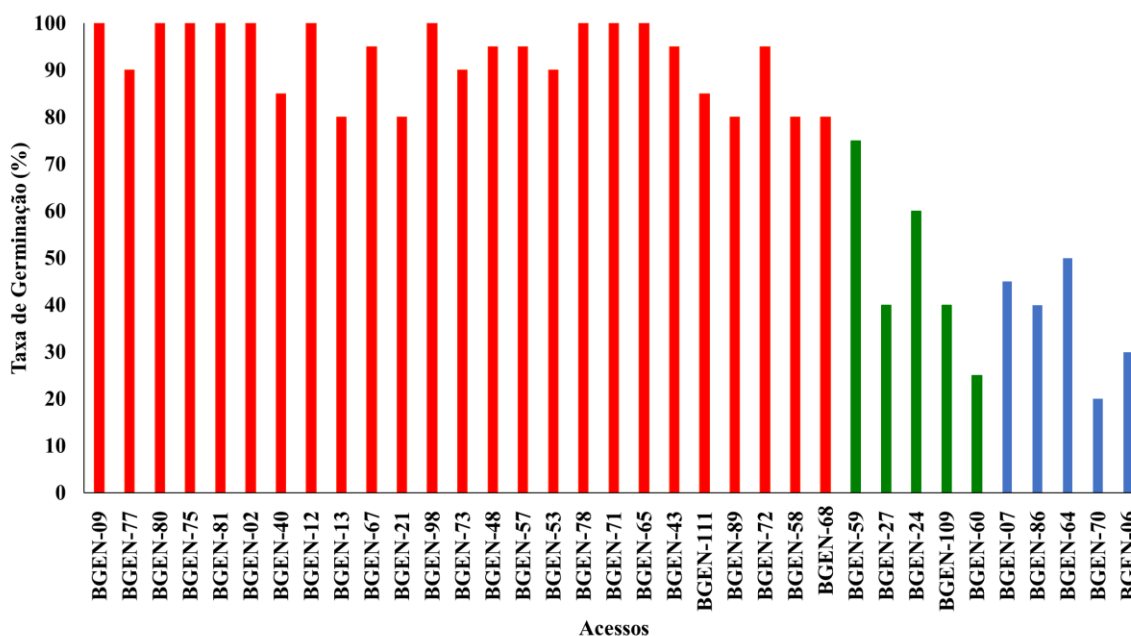


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Taxa de germinação de sementes

Quanto à germinação de sementes providas de inflorescências de polinização aberta, foram analisadas 20 sementes de 25 diploides, 5 triploides e 5 tetraploides. Como resultado, foi possível observar que os indivíduos diploides (barras vermelhas) apresentaram taxa de germinação variando de 80% a 100%. Já os triploides (barras verdes) apresentaram variação de 25% a 75%. Os tetraploides (barras azuis), por sua vez, variaram de 20% a 50% (Fig.8)

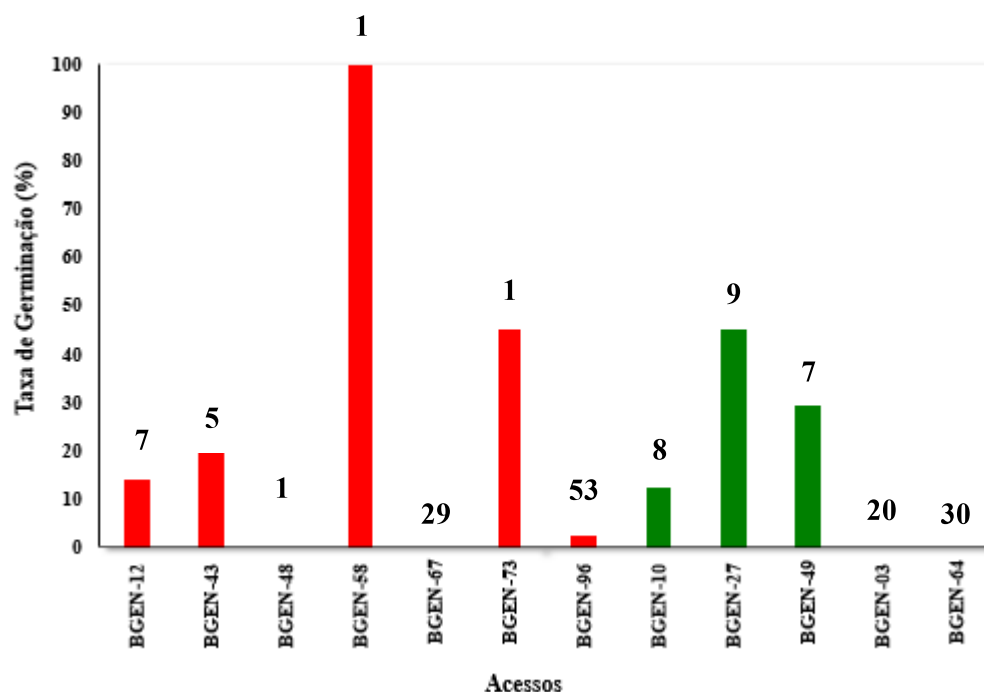
Figura 10 - Taxa de germinação de sementes providas de inflorescências de polinização aberta da espécie *Lippia alba*. Barras vermelhas: diploides; barras verdes: triploides; barras azuis: tetraploides.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação à germinação de sementes providas de inflorescências de polinização controlada, foram analisadas sementes de 7 indivíduos diploides, 3 triploides e 3 tetraploides. Como resultado, os diploides apresentaram variação 0% a 100% de taxa de germinação, os triploides de 0% a 45% e os tetraploides 0% (Fig. 9).

Figura 11 - Taxa de germinação de sementes providas de inflorescências de polinização controlada da espécie *Lippia alba*. Barras vermelhas: diploides; barras verdes: triploides. Os números acima das barras representam o total de sementes analisadas.

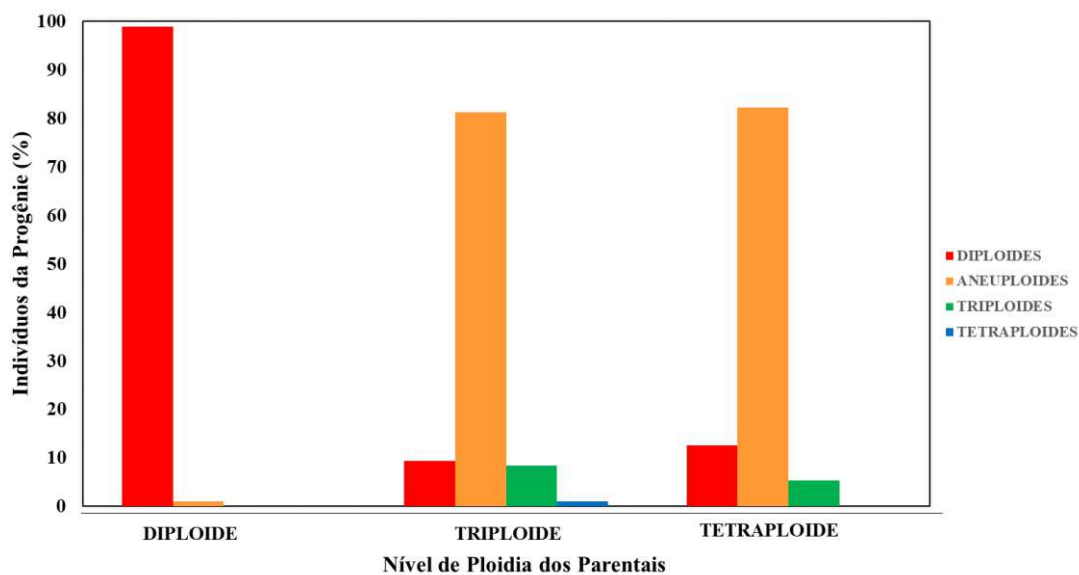


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 Estimativa de DNA da progênie de polinização aberta e controlada de indivíduos de diferentes ploidias

A análise da estimativa de DNA da progênie provida de polinização aberta revelou que os indivíduos diploides dão origem majoritariamente (98%) a indivíduos diploides, com uma porcentagem mínima de aneuploides. Já os triploides possuem sua progênie constituída por maior quantidade de aneuploides (73%), seguido de triploides (16,5%), diploides (9,37%) e por último, tetraploides (1,04%). Os tetraploides por sua vez, deram origem a aneuploides (82,14%); seguido de diploides (12,5%) e triploides (5,35%) (Fig.10).

Figura 12 - Nível de ploidia da progênie oriunda de indivíduos diploides, triploides e tetraploides da espécie *Lippia alba* provindos de polinização aberta.

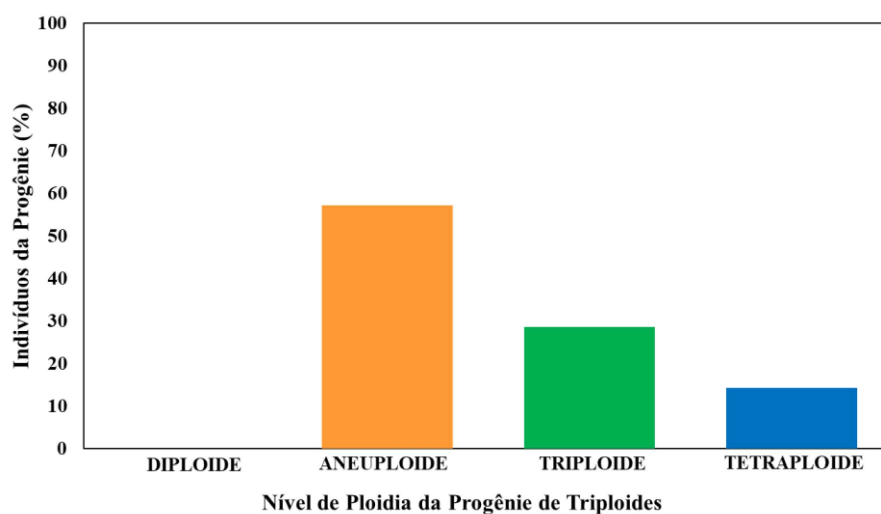


Fonte: Elaborado pelo autor.

Dos indivíduos de polinização controlada, foi possível analisar a progênie somente de triploides, devido à disponibilidade de material.

Como resultado foi possível observar que a grande maioria dos indivíduos são aneuploides, podendo ser encontrados também quantidade de DNA compatíveis com triploides e tetraploides (Fig.11).

Figura 13 - Nível de ploidia da progênie oriunda de indivíduos triploides da espécie *Lippia alba* provindos de polinização controlada.

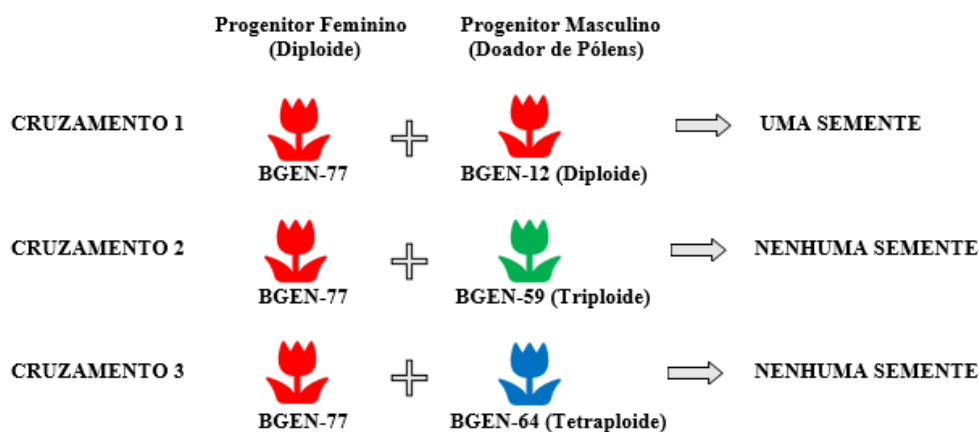


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 Cruzamento Artificial

O esquema abaixo ilustra os cruzamentos realizados e seus respectivos resultados:

Figura 14 - Esquema representando os cruzamentos artificiais realizados na espécie *Lippia alba*: 1- entre dois diploides; 2- entre um diploide e um triploide; 3- entre um diploide e um tetraploide.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi possível observar que o cruzamento 1 (entre dois indivíduos diploides) foi o único que apresentou produção de semente, com comprimento e largura de 1mm por 1mm. Esta mesma semente não apresentou germinação. Já os cruzamentos 2 (diploide com triploide) e 3 (diploide com tetraploide), não apresentaram produção de sementes.

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho representa uma continuidade da descrição inédita do 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.

Gametas não reduzidos ou gametas $2n$, formam-se devido a anormalidades nas fases meióticas durante a micro e megasporogênese (VEILLEUX, 1985). A maioria dos trabalhos relata a detecção de gametas não reduzidos na parte masculina (microsporogênese). Isto se deve a maior facilidade de estudar a meiose masculina, tétrades e grãos de pólen (SIMIONE, 2004). Em *Lippia alba*, dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa apresentaram indícios de não redução gamética em polens de diploides da espécie. Como se sabe, as frequências de gametas não reduzidos ($2n$) em populações naturais são importantes para determinar tanto a taxa de formação de neopoliploides quanto a probabilidade de seu estabelecimento. Frequências mais altas desses gametas $2n$ resultam em maiores taxas de formação de neopoliploides (FELBER, 1991; KREINER et al, 2017).

Reis et al (2014) utilizaram a morfometria polínica em seu estudo e analisaram indivíduos de diferentes ploidias de *L. alba* ($2n=30$), descrevendo como diâmetro médio $31,51\mu\text{m}$ para BGEN95, um indivíduo diploide. O presente estudo apresentou dados que corroboram com este trabalho. Apesar da grande variação existente entre os indivíduos, a média encontrada entre os diploides variou, porém se manteve próxima a esse valor. Ressalta-se então a importância do tamanho da amostragem para detecção de variações. Considerando como medida normal o valor de $31,51\mu\text{m}$, foi possível observar que todos os indivíduos apresentaram possíveis pólenes não reduzidos.

De forma semelhante, Simione et al (2004) analisaram pólenes produzidos no trevo vermelho (*Trifolium pratense*) com intuito de melhoramento genético, contribuindo tanto para a seleção de plantas produtoras de grãos de pólen gigantes quanto como um indicativo de não redução gamética. Segundo a autora, uma diferença que distingue o trevo vermelho diploide e tetraploide é a forma e o tamanho do grão de pólen maduro. Tais diferenças servem para uma rápida triagem de plantas para indução de tetraploidia (TAYLOR et al., 1976), ou identificação de plantas produtoras de gametas $2n$ (PARROTT & SMITH, 1984). Como resultados, encontraram que 80,5% da população original, produziram plantas com alguma porcentagem de macropólen. Este trabalho

reforça a hipótese da ocorrência de macropólens em outras angiospermas na natureza, além da correlação da produção de gametas $2n$ com a origem de novos citótipos poliploides, o que pode ocorrer similarmente em *L. alba*. Reis et al (2014) também observaram diferença no tamanho médio de grãos de pólen entre indivíduos diploides e poliploides em *Lippia alba* (Ex: BGEN-95 – Diploide: 31,5 μm ; BGEN-64 – Tetraploide: 42,49 μm). Sendo assim, o desenvolvimento de maiores estudos relacionados à caracterização polínica em indivíduos de diferentes citótipos, poderia colaborar com a possibilidade de inferência de ploidia dos organismos com base nas características de seus pólenes também nesta espécie, como sugere Simione et al para *Trifolium pratense* (2004).

As estimativas de quantidade de DNA em sementes via citometria de fluxo revelou que a espécie *Lippia alba* apresenta uma preferência reprodutiva sexuada, ou seja, os indivíduos tendem a cruzar entre eles. Até o momento não foi possível detectar o processo de apomixia, mas este não pode ser descartado visto que é necessário um aumento da amostragem. Alguns dados obtidos em um trabalho de doutorado sanduíche do nosso grupo de pesquisa com mais alguns acessos indicam o mesmo resultado. Os indivíduos diploides tendem a produzir embriões também diploides com endosperma triploide, apontando para uma reprodução sexuada convencional na espécie. Uma única exceção foi detectada em que um indivíduo diploide apresentou em duas amostras um embrião compatível com a ploidia triploide, sugerindo que apesar de rara, existe a presença da formação de poliploides a partir desses indivíduos. Os triploides por sua vez apresentaram maior variação de ploidia do embrião, podendo ser compatíveis com aneuploides, diploides e triploides e endosperma sugestivo de reprodução sexuada. Já na análise dos tetraploides, foram obtidos poucos histogramas, em que foi possível a detecção de embrião e endosperma. Quando detectados, esses embriões também apresentaram quantidades de DNA próximas a de tetraploides e alguns possíveis aneuploides. Houve a presença também de embriões possivelmente triploides com endosperma compatível com a reprodução sexuada (CAMPOS 2022).

Com relação à reprodução sexuada, na literatura é observado que a longevidade floral da espécie é maior que a encontrada nas demais espécies da mesma família como *Lantana camara*, *Stachytarpheta glabra* e *Stachytarpheta 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. Além disso, o trabalho de Venâncio et al. (2016), acerca de sua polinização e floração, relata a presença de flores abertas durante todo o ano, sendo visitadas por diferentes tipos de

insetos com potencial de polinização, incluindo o principal deles: a abelha. E ainda, destaca que o guia de néctar floral pode servir como um sinal atraente quando as flores de *L. alba* são receptivas à fertilização.

Como já citado anteriormente, as consequências evolutivas da poliploidia são numerosas e dinâmicas (RAMSEY & SCHEMSKE, 2002; COMAI, 2005; OTTO, 2007; WENDEL, 2015; BARKER et al., 2016; SOLTIS et al., 2016) e imediatamente após esse fenômeno, os poliploides recém-formados (neopoliploides) experimentam um forte isolamento reprodutivo de seus progenitores diploides (MUÑZING, 1936). É importante salientar que os dados de citometria apontam que os indivíduos diploides da espécie *L. alba* tendem a produzir somente indivíduos diploides com poucas exceções. A partir desses resultados é possível sugerir que esse fenômeno de isolamento dos diploides pode estar ocorrendo no complexo poliploide *L. alba* se considerarmos esse complexo relativamente recente (neopoliploides). De alguma forma, a estrutura feminina das plantas diploides tende a ser fertilizada por gametas de outros diploides, surgindo assim em sua grande maioria, indivíduos diploides, porém sendo possível encontrar também uma pequena porcentagem de poliploides.

Os dados obtidos de gametas não reduzidos são de extrema importância para determinar tanto a taxa de formação de neopoliploides quanto a probabilidade de seu estabelecimento. Frequências mais altas desses gametas $2n$ resultam em taxas mais altas de formação de neopoliploides, independentemente da via (FELBER, 1991; KREINER et al, 2017). Coincidentemente, baseado em dados de meiose masculina já obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, esse mesmo indivíduo diploide apresenta uma alta taxa de irregularidade meiótica podendo influenciar tanto na produção de gametas não reduzidos quanto na própria meiose feminina. Além disso, para os poliploides se estabelecerem como neopoliploides, esses gametas não reduzidos devem ser gerados a uma taxa suficiente para que eles persistam em face da desvantagem de acasalamento dependente da frequência esperada (exclusão de citotipos minoritários) (KREINER et al., 2017).

Stevens et al., 2020, ao estudarem aspectos relacionados à germinação e progênie de indivíduos diploides e tetraploides da espécie *Themeda triandra*, notaram uma diferença marcante na dormência das sementes entre os citótipos. As sementes dos indivíduos poliploides possuíam um status de dormência mais alto e maior grau de dormência do que a semente diploide e que isso não é relacionado com clima ou região. A princípio, o mesmo pode estar ocorrendo com os poliploides de *L. alba*, que possuem uma menor taxa de germinação quando comparados aos diploides. Juntas, essas

características aumentam a probabilidade de que a germinação ocorra em um momento em que as condições favorecem o estabelecimento de mudas com sucesso e o crescimento inicial, garantindo assim maior sobrevivência da progênie. Em climas extremamente variáveis e extremos, regular o momento e a localização da germinação é crucial para o sucesso reprodutivo.

Ainda sobre os dados de germinação de sementes, o fato de os diploides apresentarem maior taxa de germinação está ligado a dados já obtidos em *L. alba* por Reis et al. (2014), sendo mostrado que estes indivíduos são os detentores de maior quantidade de polens viáveis. Os poliploides, por sua vez, tendem a apresentar maior taxa de inviabilidade do pólen, estando estritamente relacionado com as irregularidades meióticas encontradas nesses organismos. Sua menor taxa de germinação também pode estar relacionada ao próprio evento de poliploidização, ocasionando, principalmente, alterações cromossômicas numéricas. Além disso, esse processo também faz com que aumentem 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). 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).³

As diferenças na morfometria polínica de indivíduos diploides da espécie corroboram com a hipótese de não redução gamética em *Lippia alba*, considerando que a duplicação do genoma resulta tipicamente em aumento do tamanho celular (TATE & SIMPSON, 2004), e conseqüentemente sua possível contribuição para a formação de neopoliploides. Contudo, os dados encontrados não apresentaram correlação direta com os resultados de germinação polínica do presente trabalho, não sendo possível estabelecer relações entre o tamanho e o potencial de germinação dos pólenes dos diferentes acessos estudados para a formação de novos indivíduos da espécie. Devido às irregularidades

meióticas presentes nos indivíduos, e considerando a alteração do tamanho polínico típico como indicativo de não redução gamética, espera-se que pólenes com tamanhos aumentados, possíveis pólenes não reduzidos, possuam menor taxa de germinação. Além disso, a baixa germinação polínica encontrada também pode estar relacionada a uma preferência da espécie pela reprodução vegetativa visto que *Lippia alba* apresenta uma grande facilidade de propagação clonal quando comparada a outras espécies do gênero *Lippia* (PIMENTA et al., 2007). De acordo com Budeguer et al., (2013), a presença de rizomas pode ser uma adaptação à baixa viabilidade do pólen e das sementes. Embora a reprodução assexuada por apomixia não tenha sido confirmada em *L. alba* até o momento, a reprodução clonal parece ser um importante fator de dispersão na espécie. Nesse cenário, uma possível hipótese seria que mesmo a baixa porcentagem de germinação polínica encontrada seria suficiente para o surgimento dos diferentes citótipos, e a ocorrência predominante da reprodução vegetativa seria majoritariamente responsável pela manutenção da espécie.

Contudo, é importante ressaltar que a simulação artificial de condições adequadas à germinação pode não representar suficientemente o cenário natural, interferindo na germinação dos pólenes. Além disso, a baixa germinação polínica também pode estar atrelada à inviabilidade dos mesmos, porém, neste trabalho, não foi realizado um estudo de viabilidade desses pólenes para que esses dados pudessem ser correlacionados. No entanto, estudos anteriores de Reis et al (2022), foi encontrada menor viabilidade nos pólenes de indivíduos poliploides da espécie, o que pode ser relacionado ao fato de que indivíduos triploides tendem a apresentar maiores irregularidades meióticas, seguidos de tetraploides e diploides, segundo os resultados desse mesmo estudo.

Com relação aos cruzamentos artificiais realizados, apenas o primeiro, de ambos parentais diploides, apresentou produção de semente. Apesar da análise de um "n" amostral muito pequeno, devido a disponibilidade de material, o não surgimento de sementes a partir dos cruzamentos envolvendo doadores poliploides, pode ser indicativo de obstáculos no pareamento cromossômico, visto que possuem maior irregularidade meiótica e inviabilidade polínica (em especial, os triploides, chegando a 78%) (REIS et al., 2022). No entanto, no trabalho anterior de Campos et al. (2022), foi possível observar a produção de uma semente viável provinda dos mesmos parentais do cruzamento 2. Ainda, o mesmo estudo revelou, a partir de análises anatômicas, que pólenes de diferentes indivíduos foram capazes de germinar ainda no interior das anteras, indicando que é possível que os obstáculos encontrados não estejam relacionados apenas especificamente

às condições de germinação dos pólenes. Esse fato reforça ainda mais a complexidade existente na reprodução de poliploides naturais.

Esses resultados também podem ser associados com resultados anteriores, que indicam um parcial isolamento reprodutivo dos diploides em relação a outros níveis de ploidia, sendo que plantas mães diploides apresentam uma tendência maior ao cruzamento com pólenes de outros indivíduos diploides.

Outro dado interessante obtido no presente trabalho está relacionado às medidas da única semente obtida de cruzamento. Seu comprimento e largura são de 1mm x 1mm. Dados anteriores obtidos dos parentais diploides desse mesmo cruzamento apontam tamanhos de 1,86mm x 2,08mm (genitor materno) e 1,73mm x 2,19mm (genitor paterno). Essa diferença de medidas pode estar associada às dificuldades de germinação enfrentadas por esta semente, sendo válido notar que em polinizações controladas anteriores, feitas com diploides, sementes de dimensões menores também foram produzidas. Segundo Haig e Westobi (1991), o desequilíbrio da 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 também sugerem que o tamanho da semente pode ser influenciado por esse desequilíbrio, pois a expressão gênica é diferenciada dependendo de qual genitor (materno ou paterno) é herdada. Quando a herança é materna, as sementes tendem a ser menores enquanto as sementes que receberam o gene pelo pai paterno tendem a ser maiores. Apesar de no presente trabalho o cruzamento ser entre o mesmo número cromossômico, algum desbalanceamento também pode estar relacionado a esse resultado. É importante salientar a necessidade de análises da formação de gametas femininos para a compreensão do quanto podem ser viáveis ou inviáveis.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com a germinação polínica permitiram melhor compreensão de alguns aspectos da biologia reprodutiva de *Lippia alba*. É possível inferir que a espécie realiza o processo de autofecundação, mas que alguns indivíduos podem apresentar algum grau de autoincompatibilidade. E ainda, apresenta uma preferência pela alogamia, ou seja, os indivíduos tendem a cruzar entre si, sendo possível observar também uma tendência dos indivíduos diploides produzirem progênie diploide, com pouquíssimas exceções. A medição polínica forneceu indícios de uma grande variação comportamental dentro do mesmo citótipo, nos levando a acreditar que a não-redução gamética seja o principal meio de formação de poliploides na espécie. O complexo poliploide apresenta, em geral, uma baixa taxa de germinação polínica, sendo que a média dessa taxa, entre diploides e poliploides, varia significativamente.

Já os resultados do cruzamento artificial corroboram com a hipótese de que os diploides apresentam parcial isolamento reprodutivo, beneficiando a reprodução cruzada entre diploides. Porém, neste caso, se faz necessária a ampliação da amostragem, para melhor esclarecer esse cenário. Os resultados também contribuem para demonstrar a complexidade existente na reprodução de poliploides naturais e evidenciar o comportamento diferenciado entre diploides e poliploides.

De forma geral, os dados obtidos acrescentaram novas informações à base de dados da espécie, visando uma elucidação cada vez maior dos aspectos relacionados à reprodução e evolução em complexos poliploides tropicais.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, V. A. et al. The Amborella genome and the evolution of flowering plants. *Science*. pp: 342: 1241089, 2013.
- 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*. v. 34(4), pp. 555-564.2005.
- ARMBRUSTER, W. S. Floral specialization and angiosperm diversity: phenotypic divergence, fitness trade-offs and realized pollination accuracy. *AoB Plants* 6. plu003, 2014.
- AVILA, R. S.; URDAMPILLETA, J.; GIL, A. B. Qualidade polínica, anormalidades meióticas e poliploidia em *Sisyrinchium commutatum* (Iridaceae). *Rodriguésia* [online]. v. 66, n. 3, 2015.
- 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*. v. 50(4), pp. 498-504.2006.
- BARKER, M.S.; HUSBAND, B.C.; PIRES, J.C. Spreading wing and flying high: The evolutionary importance of polyploidy after a century of study. *American Journal of Botany*. v: 103.pp: 1139–1145.2016.
- 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*. v. 57, pp. 1-14.2001.
- BEUSELINCK, P.R.; STEINER, J.J.; RIM, Y.W. Morphological comparison of progeny derived from 4X-2X and 4X-4X hybridizations of *Lotus glaber* Mill. and *L. corniculatus* L. *Crop Science*., Madison, v. 43, p. 1741-1746, 2003.
- BICKNELL, R. A.; KOLTUNOW, A. M. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell*.v:16. pp: S228-S245, .2004.
- BLANCO, M. A. et al. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. *Journal of ethnopharmacology*, v. 149, n. 3, p. 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.pp: 177-188, 2003.
- BRETAGNOLLE, F., LUMART, F. Bilateral polyploidization in *Dactylis glomerata* L. subsp. lusitanica: occurrence, morphological and genetic characteristics of first polyploids. *Euphytica* 84: 197–207, 1995.

- BUDEGUER, C. J.; NASIF, A.; MARTÍNEZ PULIDO, L.; PASTORIZA, A.; ANDRADA MANSILLA, B. Cytogenetics of *Lippia alba* (Mill.) Brown from Lules, Tucumán. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*. v. 33(1), pp. 11-14.2013.
- 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* (Verbanaceae). *Plant Systematic and Evolution*. v. 291, pp.133-140.2011.
- CAMPOS, Victória Rabelo. *Biologia reprodutiva em acessos de Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). Tese de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.
- CAMPOS, Victória Rabelo. *Reproductive strategies and cytotypes formation in Lippia alba* (MILL.) N.E. Brown (Verbenaceae) Poliploid complex. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2022.
- COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*6: 836–846, 2005.
- CORREA, J.R.C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M. *Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas* (2ed). FUNEP, Jaboticabal. p.151.1994
- DA CUNHA, Mauro Alves et al. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, v. 306, n. 1-4, p. 403-406, 2010.
- DE FREITAS SOUZA, Carine et al. Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 44, n. 1, p. 21-34, 2018.
- DE NITTANCOURT, D.; GRANT, W. F. La cytogenetique de Lotus (Leguminosae) III. Un cas de cytomixie dans un hybride interspecific. *Cytologia*. v. 29, pp. 191–195.1964.
- FELBER, F. Establishment of a tetraploid cytotype in a diploid population – effect of relative fitness of the cytotypes. *Journal of Evolutionary Biology*. v: 4. pp: 195–207.1991.
- FIRETTI-LEGGIERI, Fabiana; EL OTTRA, Juliana. *Polinização e Tipos de Reprodução em Angiospermas*. BOTÂNICA NO INVERNO, p. 103, 2013.
- FRYXEL, P. Mode of reproduction of higher plants. *Botanical Review*. v:23. pp: 135-233, 1957.
- GOTTSCHALK, W. Chromosome and nucleus migration during microsporogenesis of *Pisum sativum*. *Nucleus*. v. 13, pp.1–9.1970.
- GREEN, J.M. Comparative rates of pollen tube establishment. *Journal of Heredity* 37: 117, 1946.

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*. v. 11, pp. 121–130.2012.

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*. v. 333(1266), pp: 1-13.1991.

HAMILTON WD. Sex versus non-sex versus parasite. *Oikos*. 35:282–290, 1980

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

HARDION, Laurent et al. Impact of polyploidy on fertility variation of Mediterranean *Arundo L.* (Poaceae). *Comptes rendus biologiques*, v. 338, n. 5, p. 298-306, 2015.

HARLAN, J.R.; DE WETT, J.M.M.J. On ö Winge and prayer: the origin of polyploidy. *The Botanic Review*, v.41, n.4, p.311-390, 1975.

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* v: 291(3-4). pp: 257-265.2011.

HERMSEN, J.G. Nature, evolution, and breeding of polyploids. *Iowa State Journal*, v. 58, n. 4, p. 411-420, 1984

HUSBAND, B.C.; BALDWIN, S.J.; SABARA, H.A. Direct vs. indirect effects of wholegenome duplication on prezygotic isolation in *Chamerion angustifolium*: implications for rapid speciation. *American Journal of Botany*103: 1259–1271, 2016.

JIAO, Y. et al. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*. V:5;473(7345). pp:97-100, 2011.

KONDRASHOV, A.S. Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature*. 336:435–440, 1988.

KREINER, J.M.; KRON, P.; HUSBAND, B.C. Frequency and maintenance of unreduced gametes in natural plant populations: Associations with reproductive mode, life history and genome size. *New Phytologist*. v.214. pp: 879–889, 2017.

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*. v. 31, pp. 629–637.2006.

- LAVANIA, U.C. Plant speciation and polyploidy: in habitat divergence and environmental perspective. *Núcleo* 63, 1-5, 2020.
- LEVIN, D.A. Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist*.v. 122, pp. 1–25.1983.
- LEVIN, D. A. Plant speciation in the age of climate change. *Annals of Botany*, v. 124, n. 5, p. 769-775, 2019.
- LI, X.F.; SONG, Z.Q.; FENG, D.S.; WANG, H.G. Cytomixis in *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum* and its hybrids with wheat. *Cereal Research Communication*. v. 37, pp.353– 361.2009.
- 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*.v: 33(2). pp: 230-235.2015.
- MA, X. F.; GUSTAFSON, J. P. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. *Cytogenetic and genome research*. v. 109(1-3), pp. 236-249.2005.
- MOGIE, M. The evolution of asexual reproduction in plants. London: Chapman and Hall.1992.
- MUNTZING, A. The evolutionary significance of autopolyploidy. *Hereditas*.v. 21, pp. 263– 378.1936.
- MURSALIMOV, S.R.; SIDORCHUK, Y.V.; DEINEKO, E.V. New insights into cytomixis: specific cellular features and prevalence in higher plants. *Planta*. v. 238, pp. 415– 423.2013.
- MURSALIMOV, S. R.; DEINEKO, E. V. How cytomixis can form unreduced gametes in tobacco. *Plant Systematics and Evolution*. v. 301(4), pp. 1293-1297.2015
- NICULAU, E. D. S et al. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Herit e *Lippia alba* (Mill) NE. *Química Nova*.v: 36(9). pp: 1391-1394.2013.
- NUNES, M.R. et al. Antioxidant and antimicrobial methylcellulose films containing *Lippia alba* extract and silver nanoparticles. *Carbohydrate polymers*. v. 192, pp. 37-43.2018.
- OTTO, S.P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*. n.34, p. 401-437, 2000.
- OTTO, S. P. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*,131: 452–462, 2007.
- PARROTT, W.A.; SMITH, R.R. Production of 2n pollen in red clover. *Crop Science*. Madison, v. 24, p. 469-472.1984.

- PATERNIANI, E. Evolução dos sistemas reprodutivos. In: Salzano, F. A Natureza do processo evolutivo. Ciência e Cultura. v:26 (5). pp: 476-481.1974
- PEIXOTO, M. G et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. Veterinary parasitology. v. 210(1), pp. 118-122.2015.
- PELOQUIN, S.J. Chromosomal and cytoplasmic manipulation. In. FREY, S. (Ed.) Plant Breeding II. p.117- 147, 1981
- PIERRE, P. M. O.; DE SOUSA, S. M. Citomixia em plantas: causas, mecanismos e consequências. Revista Brasileira de Biociências. v. 9(2).2011.
- PIMENTA, M. R. et al. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). Brazilian Journal of Botany. v. 30(2), pp. 211-220.2007.
- QUARIN, C.L. et al. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. Sexual Plant Reproduction.v: 13. pp: 243–249, 2001.
- RAMSEY, J & SCHEMSKE, DW Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review of Ecology, Evolution & Systematics 29: 467-501,1998.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D W. Neopolyploidy in flowering plants. Annual review of ecology and systematics, p. 589-639, 2002.
- RANNEY, T. G. Polyploidy: From evolution to new plant development. In: Combined proceedings international plant propagators society. p. 137-142. 2006.
- RAVEN, P H.; EVERT, R F.; EICHHORN, S.E. Biologia vegetal. 8ª edição. Guanabara Koogan SA. p. 456, 2014.
- REIS, D. T. N. Ensaio de poliploidização in vitro em vários explantes de tamarilho *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt). Tese (Mestrado em Ciências da Vida) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra. Coimbra, p. 2, 2013.
- REIS A.C. et al. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae): a new tropical autopolyploid complex? American Journal of Botany. 101 1002–1012, 2014.
- REIS, A.C.; SOUSA, S.M.; VICCINI, L.F. High frequency of cytomixis observed at zygotene in tetraploid *Lippia alba*. Plant Systematics and Evolution. v. 302, pp. 121–127.2016.
- REIS, A. C.; CHESTER, M.; DE SOUSA, S. M.; CAMPOS, V. R.; DE QUEIROZ NASCIMENTO, L. S.; PACHECO JUNIOR, S.; FRANCO, A.L.; VICCINI, L. F. Chromosomal view of *Lippia alba*, a tropical polyploid complex under genome stabilization process. Protoplasma. v. 259(1), pp. 33-46.2022.
- ROY, Y. The evolutionary history of polyploidy in the herbaceous plant, *Chamerion angustifolium*. Tese de Doutorado. University of Guelph.2008

SABARA H.A., KRON P., HUSBAND B.C. Cytotype coexistence leads to triploid hybrid production in a diploid–tetraploid contact zone of *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *American Journal of Botany* 100: 962–97, 2013.

SANTOS, Vitoria Ruana Sales et al. Potencial antibacteriano do óleo essencial de *Lippia alba* Mill. associado a luzes de LED. *Infarma-Ciências Farmacêuticas*, v. 33, n. 2, p. 188-196, 2021.

ŠARHANOVA, P., VAŠUT, R.J., DANCĀK, M., BUREŠ, P., TRAVNICĀK, 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*. v: 25.pp: 319–335, 2012.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL’AGNOL, M. Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. *Ciência Rural*, v.31, n.1, p.169-171, 2001.

SHUKLA, Ravindra et al. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. *International Journal of Food Microbiology*, v. 135, n. 2, p. 165-170, 2009.

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

SIMIONI, Carine. Seleção para aumento da produção de gametas não reduzidos e poliploidização sexual em trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.). Tese de Doutorado.2004.

SINGHAL, V.K.; KUMAR, P. Impact of cytotoxicity on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of Himalayan poppy (*Meconopsis aculeata* Royle). *Journal of Biosciences*. v. 33, pp. 371–380.2008.

SOARES, B. V. et al. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture*. v. 452, pp. 107-114.2016.

SOLTIS, D.E. et al. Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany*. v. 96, pp. 336– 348.2009.

SOLTIS, Pamela S. et al. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current opinion in genetics & development*, v. 35, p. 119-125, 2015.

SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. Ancient WGD events as drivers of key innovations in angiosperms. *Current Opinion in Plant Biology*. V

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Ancient WGD events as drivers of key innovations in angiosperms. *Current opinion in plant biology*, v. 30, p. 159-165, 2016.

- SONG C. et al. Polyploid organisms. *Science China Life Science* 55: 301-311, 2012.
- SOUSA, D. G. et al. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 48, p. 697-702. 2015
- STEBBINS, G.L. Variation and evolution in plants. New York: Columbia University Press, 1950.
- STEBBINS, G.L. Chromosomal evolution in higher plants. Reading: AddisonWesley. 216 p., 1971.
- STEFANINI, M.B.; RODRIGUES, S.D.; MING, L.C. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. *Horticultura Brasileira*. v. 20, pp.18-23.2001.
- SUTHERLAND, B. L. et al. Botany is the root and the future of invasion biology. *American Journal of Botany*. doi:10.1002/ajb2.1642, 2021.
- TATE, J.A.; SIMPSON, B.B. Breeding system evolution in Tarasa (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploid species. *American Journal of Botany*. v:2. pp:207-13.2004.
- TAYLOR, N.L.; ANDERSON, M.K.; QUESENBERRY, K.H.; WATSON, L. Doubling the chromosome number of *Trifolium* species using nitrous oxide. *Crop Science*. Madison, v. 16, p. 516-518.1976.
- TE BEEST, M. et al. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany* 109:19-45, 2012.
- The Plant List. Disponível em: <http://www.theplantlist.org>. Acesso em: 08 jan 2023.
- TONI, C. et al. 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*. v: 40(3).pp: 701-714.2014.
- VAN DRUNEN, W. E.; HUSBAND, B.C. Immediate vs. evolutionary consequences of polyploidy on clonal reproduction in an autopolyploid plant. *Annals of botany*, v. 122, n. 1, p. 195-205, 2018.
- VEILLEUX, R. Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding. *Plant breeding reviews*. v:3.pp:253-88.1985.
- VENÂNCIO, Daniele de Fátima Alves et al. Flower-visiting insects and phenology of *Lippia alba* (Lamiales: Verbenaceae): floral color changes and environmental conditions as cues for pollinators. *Environmental entomology*, v. 45, n. 3, p. 685-693, 2016.
- WEISS-SCHNEEWEISS, H.; EMADZADE, K.; JANG, T.S.; SCHNEEWEISS, G.M. Evolutionary consequences, constraints and potential of polyploidy in plants. *Cytogenetic and Genome Research*140: 137–150, 2013.

WENDEL, J.F. The wondrous cycles of polyploidy in plants. *American Journal of Botany*.v: 102.pp: 1753–1756.2015.

WEST, S.A.; LIVELY, C.M.; READ, A.F. A pluralist approach to sex and recombination. *Journal of Evolutionary Biology*. 12:1003–1012, 1999.

ZOHARY, M.; HELLER, D. The genus *Trifolium*. Jerusalem: The Israel Academy of Sciences and Humanities, 1984. 606 p. Caps: General part; Taxonomic part; Section six: *Trifolium*