

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**FITOTECNIA**

**TESE**

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS, REPRODUTIVOS, MOLECULARES E**  
**QUÍMICOS COMO BASE AUXILIAR NO MELHORAMENTO**  
**GENÉTICO DA ERVA-CIDREIRA BRASILEIRA (*Lippia alba*),**  
**QUIMIÓTIPO CITRAL**

**TATIANA DE OLIVEIRA PINTO**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS, REPRODUTIVOS, MOLECULARES E  
QUÍMICOS COMO BASE AUXILIAR NO MELHORAMENTO  
GENÉTICO DA ERVA-CIDREIRA BRASILEIRA (*Lippia alba*),  
QUIMIÓTIPO CITRAL**

**TATIANA DE OLIVEIRA PINTO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Pedro Corrêa Damasceno Junior**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora em  
Fitotecnia** ao Curso de Pós-Graduação  
em Fitotecnia, Área de concentração em  
Produção Vegetal/ Melhoramento  
vegetal.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P659e Pinto, Tatiana de Oliveira, 1981-  
Estudos citogenéticos, reprodutivos, moleculares e  
químicos como base auxiliar no melhoramento genético  
da erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*), quimiótipo  
citral / Tatiana de Oliveira Pinto. - Seropédica, RJ,  
2020.  
86 f.: il.

Orientador: Pedro Corrêa Damasceno Junior.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Programa de pós-graduação em Fitotecnia,  
2020.

1. Estabilidade reprodutiva. 2. Autofecundação . 3.  
Barreiras à autofecundação. 4. Qualidade de óleo  
essencial. 5. Marcadores ISSR. I. Damasceno Junior,  
Pedro Corrêa, 1973-, orient. II Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa de pós-graduação em  
Fitotecnia III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**TATIANA DE OLIVEIRA PINTO**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Fitotecnia, no Curso de Pós-graduação em Fitotecnia da UFRRJ, área de concentração em Produção Vegetal.

TESE APROVADA EM 20/02/2020.

---

Pedro Corrêa Damasceno Júnior. Dr. Genética e Melhoramento de Plantas. UFRRJ.  
(Orientador)

---

Bruna Rafaela da Silva Menezes. Dra. Genética e Melhoramento de Plantas. UFRRJ.  
(Membro Titular)

---

Marilene Hilma dos Santos. Dra. Genética e Melhoramento de Plantas. UFRRJ.  
(Membro Titular)

---

Márcia Soares Vidal. Dra. Ciências Biológicas. Embrapa.  
(Membro Titular)

---

Roberto dos Santos Trindade. Dr. Genética e Melhoramento de Plantas. Embrapa.  
(Membro Titular)

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir receber essa oportunidade de desenvolvimento pessoal e intelectual e por me capacitar a cumpri-la.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGF) pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Pedro Corrêa Damasceno Júnior pela orientação e por compartilhar suas experiências e conhecimentos.

À Assistente do laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas, Fernanda da Silva Ferreira Oliveira, por todo apoio, suporte e amizade, fundamentais para a execução desta pesquisa.

Ao Professor Marco André Alves de Souza, do Departamento de Química, da UFRRJ, pelo auxílio durante as análises químicas dos óleos essenciais.

Ao Professor Leandro Azevedo Santos, do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, pelo apoio nas análises de quantificação do DNA genômico.

À Assistente em Administração, da Secretaria do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Tatiane Dantas Garcez, por todo auxílio, orientações e amizade, muito importantes para o correto desenvolvimento da pesquisa e cumprimento das normas.

Aos Engenheiros agrônomos do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ Evandro Silva Pereira Costa e Antônio de Amorim Brandão, pelo suporte na manutenção das plantas no campo experimental.

Aos funcionários do Campo experimental do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ, Srs. Reginaldo, Jorge, Pedro, Henrique, Cristina e Joel, pela ajuda na manutenção das plantas no campo.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas Janaína, Gustavo, Vivian, Amanda, Caris Mariana, Leônidas, Carlos Henrique, Isabela, Ana Rafaela, Mayara, Thaísa e Matheus, pelo apoio e contribuições na pesquisa e pela amizade durante esses quatro anos de convívio.

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 0001 (**PORTARIA Nº 206 DE 4 DE SETEMBRO DE 2018 DA CAPES**) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ.

## RESUMO

PINTO, Tatiana de Oliveira. **Estudos citogenéticos, reprodutivos, moleculares e químicos como base auxiliar no melhoramento genético da erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*), quimiótipo citral**. 2020. 86p. Tese (Doutorado em Fitotecnia, Produção Vegetal). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) possui grande potencial medicinal. Porém, genótipos selecionados se fazem necessários, já que existe uma grande variação química no seu óleo essencial. Portanto, conhecer sua estabilidade reprodutiva e como se processa a reprodução na espécie são pontos de grande importância. Tecnologias modernas que contribuem para seleção de plantas para qualidade do óleo também devem ser implementadas. Assim, a presente pesquisa teve por objetivos analisar, em genótipos de erva-cidreira brasileira quimiótipo citral, o comportamento meiótico durante a formação dos grãos de pólen, investigar evidências de autofecundação e de barreiras para sua ocorrência e verificar possibilidades de se aplicar marcadores de DNA *ISSR* (*Inter Simple Sequence Repeats*) na seleção de genótipos, para qualidade química de óleo essencial. Para tal, analisaram-se genótipos de erva-cidreira brasileira da coleção de germoplasma do Departamento de Fitotecnia/Instituto de Agronomia da UFRRJ. No primeiro capítulo, foram coletados botões florais e fixados em ácido acético e etanol 70% até o uso. Anteras dos botões foram retiradas e digeridas com pectinase/celulase. As células meióticas foram coradas com carmim acético, e grãos de pólen com Solução Tripla de Alexander. As lâminas foram observadas em microscópio óptico. Analisaram-se as fases da meiose, número de cromossomos, nível de ploidia e estimaram-se os índices meióticos (IM) e viabilidade dos grãos de pólen (VB). Também foram estimados o coeficiente de determinação genotípico e outros importantes parâmetros genéticos a partir do IM e VB. O segundo capítulo envolveu a coleta de botões florais, após autopolinização natural e artificial, e após polinização livre. Os botões foram amaciados com NaOH e corados com azul de anilina. As lâminas foram observadas sob microscopia de fluorescência. Observaram-se a presença/ausência de tubos polínicos no estigma, estilo e cavidade ovariana dos botões. O terceiro capítulo constou da análise de 27 genótipos da coleção, oriundos de Minas Gerais e Rio de Janeiro, que tiveram seu óleo extraído via hidrodestilação, a partir de folhas secas e analisados em cromatografia gasosa (CG-DIC e CG-EM – com detector de ionização em chama e espectrômetro de massas). Os genótipos também tiveram seu DNA extraído e analisado via marcadores do tipo *ISSR*. Estimaram-se as diversidades química e molecular, utilizando agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean*). Os dendrogramas foram correlacionados para obtenção do coeficiente de entrelaçamento, cujo objetivo foi verificar o quanto os marcadores *ISSR* contribuem na seleção de plantas para qualidade de óleo essencial. Os resultados demonstraram meiose sem alterações. A espécie é diploide com  $2n=2x=30$  cromossomos. O IM (94,48%) e VB (94,32%) tiveram maior controle genético ( $H^2=91,50$  e  $76,77\%$ , respectivamente). Os genótipos não apresentaram sistemas de autoincompatibilidade genética, já que se detectaram tubos polínicos no estigma, estilo e cavidade ovariana destes. Conclui-se que a erva-cidreira brasileira pode ser autofecundada. Barreiras físicas à autofecundação são prováveis. Nas análises química e molecular, os genótipos foram agrupados conforme perfil químico dos óleos essenciais. O coeficiente de entrelaçamento foi estimado em 0,24, indicando alta correspondência química e molecular. Foi possível aplicar os marcadores *ISSR* para seleção de plantas para qualidade de óleo essencial em erva-cidreira brasileira.

**Palavras-chaves:** Meiose, Reprodução vegetal, Óleos Essenciais.

## ABSTRACT

PINTO, Tatiana de Oliveira. **Cytogenetic, reproductive, molecular and chemical studies as auxiliary basis in the plant breeding of bushy mat grass (*Lippia alba*), citral chemotype.** 2020. 86p. Thesis (Doctorate degree in Phytotechnics, Plant Production). Agronomy Institute, Phytotechnics Department. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Bushy mat grass (*Lippia alba*) has great medicinal potential. However, selected genotypes are necessary, as there is a great chemical variation in their essential oil. Therefore, knowing its reproductive stability and how it reproduces are points of great importance. Modern technologies that contribute to the selection of plants for oil quality must also be implemented. Thus, the present research aimed to analyze meiotic behavior during the formation of pollen grains in Bushy mat grass genotypes, to investigate evidence of self-fertilization and barriers to their occurrence and to verify possibilities of applying DNA markers. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) in the selection of genotypes, for chemical quality of essential oil. To this end, genotypes of Bushy mat grass from the germplasm collection of the Department of Phytotechnics / Institute of Agronomy at UFRRJ were analyzed. In the first chapter, flower buds were collected and fixed in acetic acid and 70% ethanol until use. Anthers of the buds were removed and digested with pectinase / cellulase. Meiotic cells were stained with acetic carmine, and pollen grains with Alexander Triple Solution. The slides were observed under an optical microscope. The phases of meiosis, number of chromosomes, ploidy level and the meiotic indices (IM) and viability of pollen grains (VB) were analyzed. The genotypic determination coefficient and other important genetic parameters were also estimated from the IM and VB. The second chapter involved the collection of flower buds, after natural and artificial self-pollination, and after free pollination. The buds were softened with NaOH and stained with aniline blue. The slides were observed under fluorescence microscopy. The presence / absence of pollen tubes was observed in the stigma, style and ovarian cavity of the buds. The third chapter consisted of the analysis of 27 genotypes from the collection, from Minas Gerais and Rio de Janeiro, which had their oil extracted via hydrodistillation, from dry leaves and analyzed in gas chromatography (CG-DIC and CG-EM - with detector flame ionization and mass spectrometer). Genotypes also had their DNA extracted and analyzed via ISSR-type markers. Chemical and molecular diversity were estimated using UPGMA (Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean). The dendrograms were correlated to obtain the entanglement coefficient, whose objective was to verify how much the ISSR markers contribute in the selection of plants for essential oil quality. The results demonstrated meiosis without changes. The species is diploid with  $2n = 2x = 30$  chromosomes. IM (94.48%) and VB (94.32%) had greater genetic control ( $H^2 = 91.50$  and  $76.77\%$ , respectively). The genotypes did not present systems of genetic self-incompatibility, since pollen tubes were detected in their stigma, style and ovarian cavity. It is concluded that Bushy mat grass can be self-fertilized. Physical barriers to self-fertilization are likely. In chemical and molecular analysis, genotypes were grouped according to the chemical profile of essential oils. The entanglement coefficient was estimated at 0.24, indicating a high chemical and molecular correspondence. It was possible to apply ISSR markers for plant selection for essential oil quality in Bushy mat grass.

**Key-words:** Meiosis, Plant reproduction, Essential oils.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
2.1 Espécies vegetais fornecedoras de princípios ativos utilizados nas indústrias química, de cosmético e farmacêuticas .....	2
2.2 Principais rotas bioquímicas na síntese de metabólitos secundários em plantas e aspectos gerais do óleo essencial.....	4
2.2.1 Óleos essenciais.....	6
2.3 Classificação botânica e origem da <i>Lippia alba</i> .....	7
2.4 Aspectos morfológicos e de produção de óleo essencial em erva-cidreira brasileira.....	8
2.5 Melhoramento genético da erva-cidreira brasileira no Brasil.....	9
2.5.1 Melhoramento assistido por marcadores moleculares .....	11
2.6 Gametogênese e citogenética em <i>Lippia alba</i> .....	12
2.6.1 Gametogênese em plantas e citogenética em erva-cidreira brasileira.....	13
2.6.2 Número de cromossomos e nível de ploidia em <i>Lippia alba</i> .....	13
2.6.3 Meiose e viabilidade dos grãos de pólen de <i>Lippia alba</i> .....	14
2.7 Aspectos gerais da reprodução em Angiospermas .....	15
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>ESTABILIDADE REPRODUTIVA ACESSADA ATRAVÉS DE ANÁLISES DO CICLO, DO ÍNDICE MEIÓTICO E DA VIABILIDADE DOS GRÃOS DE PÓLEN EM GENÓTIPOS DE ERVA-CIDREIRA BRASILEIRA DO QUIMIÓTIPO CITRAL.....</b>	<b>18</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>19</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>20</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
2.1 Localização da pesquisa e condições experimentais .....	22
2.2 Material Vegetal e coleta de material .....	23
2.3 Análise do ciclo meiótico .....	24
2.4 Análise do Índice meiótico .....	25
2.5 Análise da viabilidade dos grãos de pólen.....	25
2.6 Análises estatísticas .....	26
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>A ERVA-CIDREIRA BRASILEIRA APRESENTA SISTEMAS DE AUTOINCOMPATIBILIDADE GENÉTICA?.....</b>	<b>43</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>44</b>

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>45</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
2.1 Local da Pesquisa e condições experimentais .....	47
2.2 Material vegetal utilizado .....	47
2.3 Autopolinização natural, artificial e polinização livre, em flores de <i>Lippia alba</i> .....	47
2.4 Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos em <i>Lippia alba</i> .....	48
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
3.1 Autopolinização natural, artificial e polinização livre, em flores de <i>Lippia alba</i> .....	49
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>DIVERSIDADE QUÍMICA E APLICAÇÃO DE MARCADORES ISSR NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ERVA-CIDREIRA BRASILEIRA VISANDO A QUALIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL.....</b>	
	<b>57</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>58</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>59</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
2.1 Localização da pesquisa e condições experimentais .....	61
2.2 Material Vegetal .....	61
2.3 Composição química do óleo essencial .....	61
2.3.1 Extração do óleo essencial .....	62
2.3.2 Cromatografia.....	62
2.4 Marcador ISSR .....	62
2.4.1 Extração do DNA .....	62
2.4.2 Quantificação e qualidade do DNA genômico.....	63
2.4.3 Condições de amplificação.....	63
2.4.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR): .....	64
2.4.5 Fotodocumentação e obtenção da matriz binária .....	64
2.5 Análises estatísticas .....	65
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
3.1 Diversidade química .....	65
3.2 Diversidade molecular .....	74
3.3 Relação entre análise química e molecular – Seleção de plantas quanto a qualidade do óleo essencial .....	75
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>80</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>86</b>

# 1 INTRODUÇÃO

As espécies medicinais, que consistem em plantas que possuem propriedades terapêuticas ou exercem efeito farmacológico benéfico no corpo humano ou animal (NAMDEO, 2018), representam um fator de grande importância na manutenção da saúde humana e sua utilização faz parte da cultura de diversos povos, sendo tais conhecimentos utilizados e difundidos pelas populações ao longo de várias gerações (KLEIN *et al.*, 2009; SIANI *et al.*, 2004).

As propriedades terapêuticas das espécies medicinais estão relacionadas com a atividade biológica dos compostos orgânicos sintetizados, principalmente durante o metabolismo secundário destas (FERREIRA; PINTO, 2010). Através do metabolismo secundário são produzidos compostos responsáveis pela interação entre as plantas e o ambiente onde se desenvolvem, como a defesa a pragas e doenças, a herbivoria, atração de polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbiotes, competição entre plantas, respostas ao estresse hídrico, mudanças climáticas, tolerância aos raios ultravioletas e deficiência nutricional (FANG; FERNIE; LUO, 2019; KERBAUY, 2004; TAIZ *et al.*, 2017).

Dentre os compostos provenientes do metabolismo secundário os óleos essenciais, também conhecidos como óleos etéreos, óleos voláteis ou essências, representam uma pequena fração lipofílica da composição química das plantas, que as proporcionam aromas singulares, sendo empregados, rotineiramente, nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, assim como na aromaterapia (KLEIN *et al.*, 2009; MACHADO; JUNIOR, 2011; PAVARINI *et al.*, 2012).

Os óleos essenciais podem ser definidos como uma mistura complexa de compostos químicos (terpenoides e fenilpropanoides) de origem vegetal, voláteis e aromáticos. Quimicamente são classificados como terpenos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos, derivados do fenilpropano, como também aromáticos, com algumas propriedades como antissépticos, refrescantes, anti-inflamatório e anestésico local (SANTOS *et al.*, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2004). Tais propriedades, presentes na grande maioria dos óleos essenciais representam uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos, ou atraindo polinizadores (FERREIRA; PINTO, 2010; PERES, 2015; SIANI *et al.*, 2004).

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) possui um grande potencial para exploração comercial das propriedades terapêuticas e aromáticas de seus óleos essenciais. Trata-se de um arbusto, cujo Brasil é um importante centro de diversidade, podendo ser encontrado em praticamente todas as regiões do país, e ainda de ocorrência em países das Américas Central e do Sul (HENNEBELLE *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2005). A cultura destaca-se pela grande variação química, tanto qualitativa quanto quantitativa de seu óleo essencial, principalmente do grupo dos terpenos, o que a levou à subdivisão em diferentes quimiótipos como citral, limoneno, carvona, linalol, cariofileno,  $\beta$ -cariofileno, mirceno, entre outros, e que se deve a fatores genéticos e ambientais (SILVA *et al.*, 2006; TAVARES *et al.*, 2005). Um quimiótipo compreende as subespécies de uma planta que têm as mesmas características morfológicas, mas produzem diferentes quantidades de componentes químicos em seus óleos essenciais. (CLARKE, 2008). O nome do quimiótipo corresponde, portanto, àquele componente que se apresenta em maior concentração.

O óleo essencial da erva-cidreira brasileira possui propriedades antibacterianas, antifúngicas, antiviral, analgésica, anti-inflamatória, neurosedativa, antioxidante, citotóxica, entre outras, sendo de grande importância no tratamento de disfunções digestivas, respiratórias, cardiovasculares e de ansiedade (HENNEBELLE *et al.*, 2008; LOUCHARD; ARAÚJO, 2019). No entanto, a variação na produção, e na composição do óleo essencial da erva-cidreira

brasileira, representa um fator limitante ao seu cultivo para a exploração comercial. Desta forma, há uma grande necessidade de desenvolvimento de genótipos que sejam produtivos, estáveis e que mantenham a uniformidade química exigida pela indústria. Até o momento não existem genótipos disponíveis para o plantio comercial quando se pretende explorar a produção do óleo essencial e de princípios ativos presentes neste (BRASIL, 2020).

Programas de melhoramento genético de erva-cidreira brasileira são escassos no Brasil. Pode-se destacar os programas desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP), pertencente ao Departamento de Fitotecnia, do Instituto de Agronomia da UFRRJ, e pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da UNICAMP. Neste sentido a aplicação de métodos de melhoramento na cultura são de grande importância para o prosseguimento destes programas de melhoramento. Porém para a viabilidade desta aplicação, conhecer os mecanismos de reprodução é um passo essencial para a correta aplicação dos métodos. Assim como a aplicação de tecnologias que auxiliem na seleção de genótipos superiores, de interesse.

Assim, a presente pesquisa teve por objetivos realizar análises genéticas e químicas em genótipos de erva-cidreira brasileira, quimiótipo citral, pertencentes a coleção de germoplasma do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), que possam auxiliar na condução de programas de melhoramento genético da espécie.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Espécies vegetais fornecedoras de princípios ativos utilizados nas indústrias química, de cosmético e farmacêuticas

As plantas e seus derivados estão presentes em nosso dia a dia de variadas formas, nos proporcionando desde melhoria da qualidade de vida até o tratamento e cura de enfermidades. Diversas substâncias de origem vegetal são utilizadas na composição de produtos para cuidados e higiene pessoal, limpeza, defensivos agrícolas, cosméticos e medicamentos.

A atividade antimicrobiana, característica de determinados compostos vegetais, é também explorada na fabricação de produtos de higiene pessoal e limpeza. Como exemplo de composto com tais atividades pode-se citar o citral, encontrado como majoritário no óleo essencial de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*), assim como no de alguns genótipos de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*), que possui importante ação antibacteriana (OLIVEIRA *et al.*, 2017; PORFÍRIO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017) e antifúngica (EBANI *et al.*, 2018), podendo ser utilizado na formulação de cremes dentais, sabonetes e desinfetantes.

Os inseticidas e fungicidas produzidos a base de piretroides (ésteres de monoterpenos) são de grande importância no combate a pragas e patógenos em ambientes agrícolas e domésticos, pois além de sua eficiência, possuem baixa persistência no ambiente e baixa toxicidade para mamíferos. Esta substância é derivada de plantas do gênero *Chrysanthemum* (CHEN *et al.*, 2018). Outros inseticidas importantes são aqueles a base de citronela, extraída principalmente de *Cymbopogon winterianus* (SILVA *et al.*, 2017) e *Cymbopogon nardus* (VELOSO *et al.*, 2012), são exemplos de produtos obtidos pela indústria química a partir de espécies vegetais.

Certos compostos de origem vegetal, como o timol, o carvacrol, o mentol e o linalol são também exemplos de substâncias importantes na formulação de produtos com atividade antimicrobiana e/ou antioxidante. Estas substâncias são utilizadas, entre outros fins, na

conservação e armazenamento de alimentos. Estes monoterpenos são os constituintes principais dos óleos essenciais de genótipos de espécies como alecrim-pimenta (*Lippia origanoides* e *Lippia sidoides*) (BRITO *et al.*, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2014) e tomilho (*Thymus vulgaris*), ricos em timol, o orégano (*Origanum vulgare*), rico em carvacrol, o hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), rico em mentol, o manjeriço (*Ocimum basilicum*) (SOKOVIĆ *et al.*, 2010; VALERIANO *et al.*, 2012) e a erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*), (TOMAZONI *et al.*, 2016), ricos em linalol.

A indústria de perfumaria e cosméticos é um dos setores que mais se destacam no Brasil. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC, 2017) o país é o quarto maior consumidor de cosméticos do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos da América, China e Japão, ocupando a liderança absoluta na América Latina, com quase 50% de participação no mercado brasileiro. A riqueza da biodiversidade brasileira permite ao setor de cosméticos a elaboração de uma gama de produtos, tanto por empresas nacionais quanto internacionais. Substâncias extraídas de cascas, folhas, raízes, sementes e frutos de espécies aromáticas oferecem uma infinidade de fragrâncias, assim como de princípios ativos e por esta razão são alvos do setor de perfumaria e cosméticos (LÓPEZ *et al.*, 2008).

Algumas das espécies mais utilizadas no ramo dos cosméticos são: a lavanda (*Lavandula angustifolia*), devido ao aroma proporcionado pela combinação de compostos de seu óleo essencial como linalol e acetato de linalina, mas também pela atividade antioxidante de componentes como a luteolina e apigenina (HA *et al.*, 2019); a castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*), principalmente pela presença de compostos fenólicos antioxidantes como o ácido gálico, galocatequina, ácido protocatecuico e catequina, entre outros (JOHN; SHAHIDI, 2010); a babosa (*Alloe vera*), por suas propriedades cicatrizantes e antioxidantes (HEKMATPOU *et al.*, 2019; WALID *et al.*, 2018); a amêndoa (*Prunus dulcis*), devido ao alto teor de compostos fenólicos e flavonoides, que resultam em alta atividade antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2018); a copaíba (*Copaifera langsdorffii*), entre outras razões, pelo seu potencial cicatrizante (GUSHIKEN *et al.*, 2017), e muitas outras espécies das quais se obtém perfumes, cremes, *shampoos*, sabonetes e loções.

Algumas das espécies vegetais utilizadas pela indústria de cosméticos, mencionadas acima, são também empregadas na elaboração de medicamentos pela indústria farmacêutica, devido a seus potenciais terapêuticos relatados acima. Contudo, certas espécies merecem destaque, devido a ampla utilização, assim como, ao elevado potencial terapêutico no tratamento de determinadas enfermidades. Dentre as inúmeras espécies vegetais exploradas pela indústria farmacêutica pode-se destacar a castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum*L.), indicada no tratamento de insuficiências venosas, através da ação da escina, uma saponina triterpeno (ZHANG *et al.*, 2013); o maracujá (*Passiflora incarnata*), com suas propriedades ansiolítica e sedativa leve, resultantes do metabolismo de flavonoides como a vitexina, isovitexina, orientina e apigenina, entre outros (MIRODDI *et al.*, 2013); o guaco (*Mikani aglomerata*), que possui ação broncodilatadora e expectorante promovida pela presença de cumarina (PASQUA *et al.*, 2019); a centella (*Centellae folium*) indicada no tratamento e profilaxia da insuficiência venosa dos membros inferiores, proporcionados pela ação cicatrizante de saponinas como o ácido asiático e o asiaticosídeo (MANEESAI *et al.*, 2017); o *ginkgo biloba* L., para o tratamento de vertigens e zumbidos provocados por problemas circulatórios ou por insuficiência vascular cerebral, através da ação de flavonoides glicosilados e de lactonas terpênicas (ANVISA, 2016).

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Lippia*, possuem também diversos fins terapêuticos. A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) é, sem dúvida, uma das espécies do gênero mais estudadas para aplicação medicinal, o que se deve aos diferentes empregos possíveis, proporcionados pela também diversa composição de seu óleo essencial. De acordo com o

quimiótipo utilizado, tem-se uma determinada ação terapêutica, podendo esta ser: sedativa, antiespasmódica e vaso relaxante (citral), analgésica (citral e carvona) e anticonvulsivante (citral, mirceno, limoneno e linalol) (HELDWEIN *et al.*, 2014), ansiolítico (citral, mirceno, limoneno e carvona) (SOUSA *et al.*, 2015), entre outras (ANVISA, 2011; SILVA *et al.*, 2018; SIQUEIRA-LIMA *et al.*, 2018).

Estes são apenas alguns exemplos das principais espécies de importância para a indústria farmacêutica. Contudo, mais de 200 espécies são listadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por suas propriedades terapêuticas atestadas e diversas delas já são utilizadas na fabricação de fármacos, baseados na atividade biológica de compostos provenientes do metabolismo vegetal secundário (ANVISA, 2016; 2017).

## **2.2 Principais rotas bioquímicas na síntese de metabólitos secundários em plantas e aspectos gerais do óleo essencial**

O metabolismo vegetal compreende uma série de reações químicas, ocorridas no interior das células vegetais e que exercem papéis de fundamental importância no desenvolvimento e na manutenção da vida da planta. Tais reações dividem-se em metabolismo primário e metabolismo secundário.

Através do metabolismo primário são formados compostos essenciais à planta como aminoácidos, carboidratos, lipídeos, ácidos graxos, nucleotídeos, proteínas, polissacarídeos, DNA e RNA, que participam de processos vitais como fotossíntese e respiração, entre outros, sendo imprescindíveis para que a planta complete seu ciclo e vida. Todas as espécies vegetais produzem estes metabólitos primários, diferentemente dos metabólitos secundários que além de serem sintetizados em um órgão, tecido ou tipo de célula específico, em determinado estágio de desenvolvimento, são ainda espécie-específicos (RAVEN, 2014; TAIZ *et al.*, 2017).

As interações ocorridas entre as plantas e o ambiente onde vivem são governadas por respostas do metabolismo secundário, uma vez que os produtos deste metabolismo têm a função de defesa contra pragas, patógenos e herbivoria, atração de polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbiotes, bem como na competição entre plantas. O mesmo ocorre com relação a fatores abióticos como estresse hídrico, mudanças climáticas, tolerância aos raios ultravioletas e deficiência nutricional (FANG; FERNIE; LUO, 2019; KERBAUY, 2004; TAIZ *et al.*, 2017).

Os metabólitos secundários, também chamados de produtos secundários, metabólitos especiais ou produtos naturais, pertencem a três principais classes de moléculas: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Deve-se lembrar, no entanto, que existem muitos constituintes diversos, que não se enquadram nessas classes específicas (HARBORNE, 1999; TAIZ *et al.*, 2017).

Os terpenos constituem a maior classe de metabólitos secundários, em sua maioria insolúveis em água e com a principal função de proteção da planta contra ataques de patógenos, insetos e herbívoros (KERBAUY, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004; ZAYNAB *et al.*, 2018). Os terpenos atuam ainda como pigmentos fotossintéticos (carotenoides), hormônios (giberelinas, ácido abscísico), componentes estruturais de membranas (esteróis) ou como transportadores de elétrons (ubiquinona, plastoquinona) (RAVEN, 2014). Todos os terpenos são derivados de fusões repetidas de unidades ramificadas de cinco carbonos (isoprenos), com base no esqueleto de isopentano (CROTEAU *et al.*, 2015). Por esta razão são classificados de acordo com o número de unidades pentacarbonadas, podendo estes serem monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenoides.

Misturas de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis formam os óleos essenciais. Tais substâncias tem como importante característica o fato de serem aromáticos, com o propósito de repelir potenciais herbívoros, antes mesmo do ataque, proteger a planta contra fungos (TOMAZONI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016) e bactérias, enquanto outros são conhecidos por serem alelopáticos (RAVEN, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2004; VERMA *et al.*, 2018).

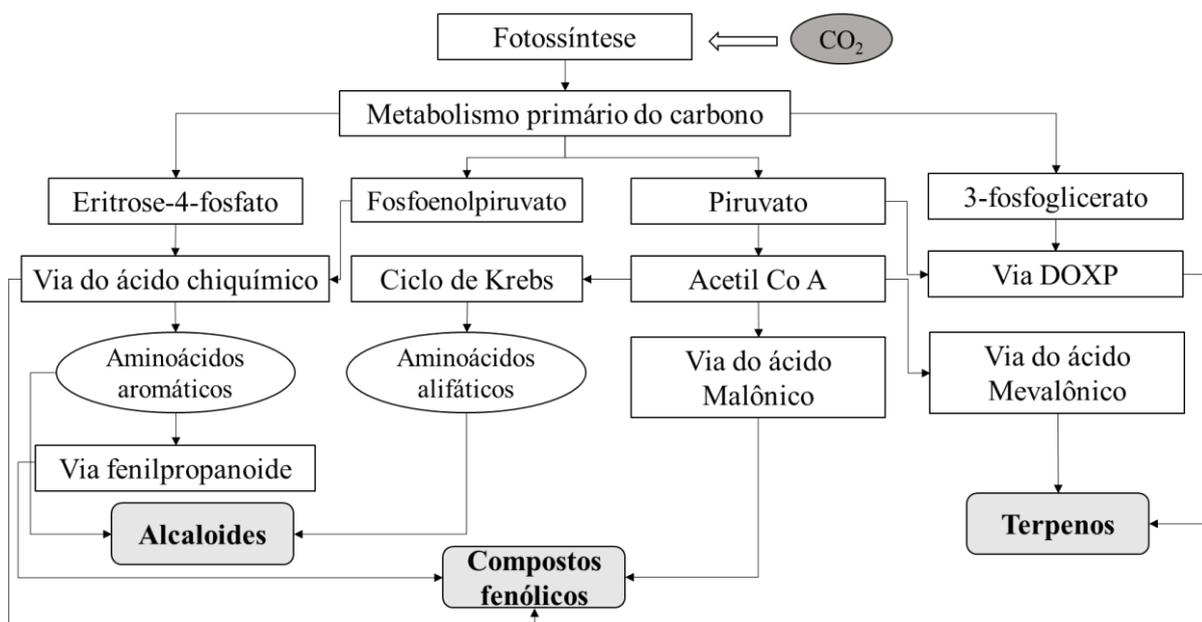
A forma mais adequada para a classificação dos metabólitos vegetais, de acordo com Harborne (1999) é a partir de sua biogênese ou origem biossintética. Assim, os terpenoides podem ser classificados como um grupo único de constituintes vegetais com base em sua origem comum dos precursores, ácido mevalônico e 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (DOXP), (CROTEAU *et al.*, 2015; HARBORNE, 1999; WALTON *et al.*, 1999) (Figura 1). Alguns terpenos são produzidos no citosol e no retículo endoplasmático (RE), enquanto que outros se originam, principalmente, nos plastídios. As vias biossintéticas para a formação dos isômeros do isopreno diferem acentuadamente nesses compartimentos, com a via do ácido mevalônico sendo ativa no citosol e RE e a via DOXP operando nos plastídios (CROTEAU *et al.*, 2015; SANGWAN *et al.*, 2001).

A classe dos compostos fenólicos é formada por metabólitos secundários que contém um grupo fenol, um grupo hidroxila funcional e um anel aromático. Trata-se de um grupo quimicamente bastante heterogêneo, o que faz com que apresentem uma grande variedade de funções nas plantas, como defesa contra herbívoros e patógenos - taninos, lignina; suporte mecânico – lignina; atrativo de polinizadores e dispersores de sementes– antocianinas e flavonoides, proteção contra radiação ultravioleta – flavonoides - e alelopatia (MACÍAS; MEJÍAS; MOLINILLO, 2019; RAVEN, 2014). As rotas básicas pelas quais são sintetizados compreendem a rota do ácido chiquímico e a do ácido malônico, sendo a primeira de maior importância nas plantas.

Os compostos fenólicos contribuem substancialmente para certos aromas (sabores e odores) nas plantas e são derivados principalmente de fenilpropanoide, fenilpropanoide-acetato e vias bioquímicas relacionadas, como as que levam a taninos "hidrolisáveis" (CROTEAU *et al.*, 2015; HARBORN, 1999). É a partir da fenilalanina que se deriva a classe mais abundante de compostos fenólicos secundários (TAIZ; ZEIGER, 2004). Estes são formados tanto pela via do ácido chiquímico quanto pela via do ácido malônico (CROTEAU *et al.*, 2015) (Figura 1). São ainda classificados em subclasses de acordo com o esqueleto de carbono, ex. quinolina, isoquinolina, etc (HARBORN, 1999).

Entre as substâncias voláteis presentes nos óleos essenciais encontram-se alguns compostos fenólicos, responsáveis pela ação antioxidante, além de antifúngica e antibacteriana (CID-PÉREZ *et al.*, 2019; FARHAT *et al.*, 2009).

Os alcaloides são importantes metabólitos secundários que fazem parte do grupo de compostos nitrogenados e, juntamente com os glicosídeos cianogênicos, estão entre os mais importantes compostos ativos do ponto de vista farmacológico ou medicinal, devido a seus efeitos tóxicos para humanos, bem como por suas propriedades medicinais (RAVEN, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2004). Formados por compostos nitrogenados com anéis heterocíclicos, a classe dos alcaloides inclui diversos compostos biossintetizados, principalmente a partir de aminoácidos aromáticos, os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (Figura 1). Possuem grande importância por atuarem no sistema nervoso central, como ocorre, por exemplo com a cafeína, cocaína, morfina, atropina e nicotina (KERBAUY, 2004; RAVEN, 2014). A principal função dos alcaloides na planta é de defesa, principalmente contra herbivoria por mamíferos (GREEN *et al.*, 2019; TAIZ; ZEIGER, 2004; ZAYNAB *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Resumo das principais vias de síntese dos metabólitos secundários Terpenos, Compostos fenólicos e Alcaloides (CROTEAU *et al.*, 2015; HARBORN, 1999; SANGWAN *et al.*, 2001; WALTON *et al.*, 1999).

### 2.2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de diferentes classes de substâncias, principalmente, terpenoides e fenilpropanoides, os quais possuem estruturas químicas diversificadas e fazem parte do metabolismo secundário (SANGWAN *et al.*, 2001). A composição química do óleo essencial pode ainda variar de acordo com a metodologia de extração utilizada, que por sua vez, interfere no perfil químico quanto ao número, ao tipo de constituintes, bem como na sua concentração (SOUZA, 2010). Suas funções ecológicas permitem que as plantas interajam com o ambiente e estão relacionadas a fatores como a inibição da germinação de sementes (EL SAWI *et al.*, 2019), proteção contra herbivoria e predadores (FARAONE; HILLIER; CUTLER, 2015; NICULAU *et al.*, 2013), atração de polinizadores (CSEKE; KAUFMAN; KIRAKOSYAN, 2007), efeitos alelopáticos, entre outros (ALVES *et al.*, 2014; EL SAWI *et al.*, 2019).

Segundo o *Aromatic natural raw materials — Vocabulary* (Vocabulário Internacional para Matérias-Primas Aromáticas) (ISO, 1997), os óleos essenciais são produtos obtidos a partir de matérias-primas vegetais, através de destilação a vapor com ou sem água, ou do epicarpo de frutos de *Citrus spp.* por um processo mecânico, à temperatura ambiente ou ainda por destilação a seco (BICCHI; JOULAIN, 2018). Outros métodos adotados na extração de óleos essenciais compreendem ainda o uso de solventes orgânicos, fluidos supercríticos e micro-ondas (SANTOS *et al.*, 2004; STRATAKOS; KOIDIS, 2016). A forma de obtenção ou extração dos óleos essenciais varia de acordo com a finalidade destes e das características do material vegetal a ser utilizado. Estes podem ser obtidos de raízes, caules, folhas e flores, separadamente ou de todas as partes em conjunto.

O quimiótipo citral é um dos mais estudados em relação ao óleo essencial da erva-cidreira brasileira (JANUZZI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2015). Este, por sua vez, é um aldeído monoterpene, representado por uma mistura de isômeros trans e isômeros cis, chamados geranial e neral, respectivamente. O citral possui ainda sinônimos como: 3,7-dimethyl-2,6-octadienal; trans-Citral; Citral-alpha; lemonal; beta-geranial; cis-Citral; beta-Citral, entre outros (APROTOSOAIIE *et al.*, 2018; PubChem, 2020).

Sua fórmula molecular é C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O, tem a aparência de um líquido amarelo claro, com odor semelhante ao do limão. Menos denso que a água e insolúvel em água, é tóxico por ingestão e utilizado na fabricação de outros produtos químicos (PubChem, 2020).

Assim como a maioria dos monoterpenos, citral é derivado do difosfato de geranil (GPP), que é sintetizado a partir da fusão (cabeça a cauda) do difosfato de isopentenil (IPP) e seu isômero, difosfato de dimetilalila (DMAPP) (GANJEWALA; LUTHRA, 2010; GUPTA; GANJEWALA, 2015). Através da ação da fosfatase (GPPase) sobre o GPP é formado o geraniol, que, ao ser acetilado pela ação da geraniol acetil transferase (GAT), leva à formação de acetato de geranil, que, por sua vez, através da desacetilação do acetato de geranil, catalisada por geraniol acetato esterase (GAE), forma novamente o geraniol. Assim, o nível de geraniol depende da quantidade relativa e atividade das três enzimas acima mencionadas (GANJEWALA; LUTHRA, 2010). Em algumas espécies vegetais dos generos *Ocimum* e *Cinnamomum*, a formação de geraniol, a partir de GPP é mediada pela enzima geraniol sintase (GES). Em *Cymbopogon flexuosus*, o geraniol é submetido à oxidação pela enzima geraniol desidrogenase para produzir citral, enquanto que em outras espécies esta etapa pode ser metabolicamente bloqueada, levando a uma quantidade alta de geraniol em seus óleos essenciais (GANJEWALA; LUTHRA, 2010).

As principais estruturas secretoras de óleos essenciais são os tricomas glandulares, as cavidades secretoras, as células parenquimáticas diferenciadas, os canais oleíferos e as bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (SIMÕES; SPITZER, 2017). Nas flores, a epiderme glandular das pétalas exerce também essa função, e são responsáveis por armazenarem ou emitirem óleos essenciais importantes no estímulo a polinização por insetos (CROTEAU *et al.*, 2015). A produção de óleos essenciais por tricomas glandulares é uma característica de várias famílias, como: Verbenaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Rubiaceae, Geraniaceae, Solanaceae e Plumbaginaceae (METCALFE; CHANLK, 1983). Santos; Innecco e Soares (2004) identificaram em folhas de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*), a presença de tricomas glandulares com três tipos diferentes de arranjos celulares, responsáveis pelo armazenamento e secreção de óleos essenciais, na espécie.

### 2.3 Classificação botânica e origem da *Lippia alba*

A espécie *Lippia alba* pertence à família Verbenaceae, uma família composta por 34 gêneros e cerca de 1200 espécies, com algumas espécies na América, Europa, Ásia, África e Madagascar. A família Verbenaceae também inclui diversas outras plantas de importância medicinal como *Aloysiatriphylla* (L'H'erit.) Britt. e *Verbena officinalis* L., por exemplo (ATKINS, 2004; HENNEBELE *et al.*, 2008).

O gênero *Lippia* é um dos mais representativos da família Verbenaceae, distribuindo-se por toda América do Sul, América Central e África Tropical. A maioria das espécies do gênero *Lippia* ocorrem no Brasil, Paraguai e Argentina, e algumas delas são restritas a África. A flora brasileira é constituída por 82 espécies do gênero *Lippia*, compreendendo espécies herbáceas, arbustos e subarbustos (SALIMENA; MÚLGURA, 2015; SANDERS, 2001). Alguns pontos de ampla diversidade de *Lippia* no Brasil são a Cadeia do Espinhaço, no estado de Minas Gerais e a Chapada Diamantina, no estado da Bahia (CAMPOS *et al.*, 2011).

A espécie *Lippia alba* cujo nome científico completo é *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson, foi descrita pela primeira vez em 1925 na publicação “*Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson (Britton & Wilson, 1925)”. Com algumas sinonímias como *Lantana alba*, *Lantana geminata*, *Camara alba*, *Lippia citrata* e *Lippia globiflora*, entre muitos outros, distribui-se desde o sul dos Estados Unidos e ao longo das Américas Central e do Sul, podendo ser encontrada em todas as regiões do Brasil (HENNEBELLE *et al.*, 2008; SALIMENA, 2014). Não há relatos na literatura sobre o centro de origem da erva-cidreira

brasileira, contudo, por ocorrer em todas as regiões do Brasil e por apresentar uma grande diversidade dentro e entre estas regiões, o país consiste, no mínimo, em um importante centro de diversidade da espécie.

Alguns nomes populares mais comuns para a espécie no Brasil são erva-cidreira brasileira, erva-cidreira, falsa-melissa, erva-cidreira de arbusto, lípia, alecrim do campo e chá da febre (ANVISA, 2011; BARACUHY *et al.*, 2016; HOLETZ *et al.*, 2002;). Os nomes tradicionais ou populares para *Lippia alba* são numerosos na América Latina, e estão geralmente relacionados ao seu uso tradicional generalizado. Muitos desses nomes populares derivam de seu aroma característico ou de suas propriedades medicinais (HENNEBELLE *et al.*, 2008).

A ampla distribuição geográfica de *Lippia alba* resulta em uma grande plasticidade fenotípica, e na descrição de muitos táxons relacionados às variações encontradas nas folhas, incluindo principalmente características relacionadas à forma da lâmina e indumento (SALIMENA; MÚLGURA, 2015). Outro importante resultado da ampla distribuição geográfica da espécie é a diversidade em sua composição química.

#### **2.4 Aspectos morfológicos e de produção de óleo essencial em erva-cidreira brasileira**

A espécie *Lippia alba* consiste em uma planta de porte arbustivo ou sub-arbustivo, que pode atingir cerca de 1,7m de altura (BARACUHY *et al.*, 2016; HENNEBELLE *et al.*, 2008), é muito ramificada, com ramos finos, eretos ou decumbentes, longos e quebradiços (BARACUHY *et al.*, 2016), com tricomas tectores simples e glandulares (SANTOS; INNECCO; SOARES, 2004; VIEIRA; SILVA; SALIMENA, 2018). Suas folhas são inteiras, decussadas ou verticiladas, com pecíolo medindo de 3 à 8mm de comprimento, ásperas, com lâmina oval ou elíptica, de bordos serrados ou crenados e ápice agudo ou obtuso, base cuneada, face adaxial hirsuta, face abaxial tomentosa (BARACUHY *et al.*, 2016; VIEIRA; SILVA; SALIMENA; 2018).

Suas diminutas flores medem entre 3 e 5 mm de comprimento, têm a corola hipocrateriforme, de coloração que varia dentro de uma nuance que vai desde o branco até azul-arroxeadado com a fauce e interior do tubo amarelos (HENNEBELLE *et al.*, 2008; VIEIRA; SILVA; SALIMENA; 2018). Dispõem-se em 1 ou 2 inflorescências capituliformes por axila, com espigas globosas, hemisféricas ou cilíndricas com cerca de 1 a 0,8 cm de comprimento, possui brácteas ovais com ápice agudo (VIEIRA; SILVA; SALIMENA; 2018). A corola é zigomorfa, e possui quatro pétalas unidas num formato tubular, com uma delas mais alargada. As flores são hermafroditas, de androceu com quatro estames didínamos soldados na corola, com anteras de cor amarela e deiscência longitudinal, com estames epipétalos (aderentes às pétalas). O gineceu é sincárpico medindo cerca de 1,5 mm de comprimento, possui pistilo de cor verde e ovário súpero (MUÑOZ *et al.*, 2007; VENANCIO *et al.*, 2016).

Os frutos são drupas globosas, do tipo esquizocárpico, com cerca de 3mm de diâmetro e de cor rosa-arroxeadado dividindo-se em dois mericarpos que facilmente se separam quando maduros (BARACUHY *et al.*, 2016; TRONCOSO, 1974; VIEIRA; SILVA; SALIMENA; 2018). Seu pericarpo é branco, duro e seco e epicarpo com vilosidades (MUÑOZ *et al.*, 2007).

A principal forma de propagação de *Lippia alba* é a vegetativa, a partir de ramos (estacas), o que se deve a facilidade com que seus ramos enraízam ao tocarem o solo (BARACUHY *et al.*, 2016).

Assim como apresenta diversidade em suas características morfológicas, *Lippia alba* possui também perfis químicos bastante diversos, com relação à composição de seu óleo essencial, principal produto de interesse comercial. Segundo Viccini *et al.* (2014) esta variação possivelmente deve-se a fatores genéticos como a presença, ausência ou supressão de

determinado gene necessário para a codificação e subsequente biotransformação de certos compostos, além de fatores ambientais.

Devido às diferentes substâncias identificadas como componente majoritário, ou seja, como constituinte presente em maior concentração, nos óleos essenciais de diferentes genótipos da espécie, *Lippia alba* subdivide-se em vários quimiótipos (BLANK *et al.*, 2015). Um quimiótipo descreve as subespécies de uma espécie que têm as mesmas características morfológicas (relativas à forma e estrutura), mas produzem diferentes quantidades de componentes químicos em seus óleos essenciais. Alguns exemplos de espécies que produzem óleos essenciais com diferentes quimiótipos incluem lavanda, melissa, hortelã-pimenta, manjeriço, alecrim, sálvia e tomilho (CLARKE, 2008).

O nome do quimiótipo corresponde, portanto, àquele componente que se apresenta em maior concentração. Para erva-cidreira brasileira são relatados os quimiótipos citral, carvona, linalol, limoneno, mircenol,  $\beta$ -cariofileno, tagetona,  $\gamma$ -terpineno, canfora-1,8-cineol, estragol, entre outros (HENNEBELLE *et al.*, 2008; MATOS *et al.*, 1996; PASCUAL *et al.*, 2001; YAMAMOTO *et al.*, 2008).

Conforme mencionado anteriormente, a variação química na composição dos óleos essenciais deve-se a fatores genéticos e ambientais. Porém, a estabilidade qualitativa e quantitativa do óleo essencial é fundamental para a manutenção de sua qualidade e de sua eficiência em termos de atividade biológica, quando se pretende explorá-lo comercialmente. Assim, a produção agrícola de erva-cidreira brasileira exige um alto nível de previsibilidade, com relação ao rendimento e composição do óleo essencial gerado, que pode ser alcançado através do melhoramento genético da espécie.

Em programas de melhoramento de erva-cidreira brasileira, a seleção de genótipos que apresentem estabilidade na expressão dos metabólitos secundários no óleo essencial durante o ano, é especialmente importante.

## **2.5 Melhoramento genético da erva-cidreira brasileira no Brasil**

Embora a espécie erva-cidreira brasileira esteja amplamente distribuída em vários estados brasileiros e possua reconhecida importância como planta medicinal e aromática, ainda são poucos os estudos envolvendo o melhoramento genético e o comportamento agrônomo desta espécie no Brasil e no mundo.

O Programa de Melhoramento Genético de Espécies Vegetais com Potencial Medicinal desenvolvido no âmbito do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de plantas do Departamento de Fitotecnia, pertencente ao Instituto de Agronomia (DFITO/IA), da UFRRJ teve início no ano de 2010, com pesquisas relacionadas à erva-cidreira brasileira. O objetivo do programa é a geração de cultivares com alta produção e qualidade de princípios ativos de interesse para a saúde humana. Ações relativas à extração e caracterização química dos princípios ativos, contidos nos óleos essenciais da erva-cidreira brasileira, são conduzidas em parceria com o Instituto de Química, da UFRRJ. Após caracterizados os princípios ativos, as informações são enviadas ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do DFITO/IA/UFRRJ, onde são processadas estatisticamente e relacionadas a outras informações relativas aos aspectos fenotípicos (variáveis morfológicas e de produção) e genotípicos das plantas avaliadas.

A primeira coleção de germoplasma da espécie na UFRRJ estruturou-se após coletas de genótipos em municípios que compõem a região metropolitana do Rio de Janeiro. Inicialmente, em 2010, esta coleção abrigava apenas 20 clones de erva-cidreira brasileira. Após caracterização química da coleção, identificou-se nove genótipos de quimiótipo citral entre os 20 existentes. Entre os anos de 2013 e 2014, a coleção foi ampliada com a inserção de mais 20 genótipos de erva-cidreira brasileira coletados no Estado de Minas Gerais e 3 genótipos

coletados no Espírito Santo. Atualmente, a coleção possui 43 genótipos de erva-cidreira brasileira. Gomes (2017) identificou todos os genótipos quanto ao seu quimiótipo, caracterizou e avaliou extensamente a coleção, em relação a aspectos morfológicos, moleculares e agrônômicos.

Em 2015, pela primeira vez, foi idealizado e proposto um parâmetro para auxiliar a seleção de genótipos de erva-cidreira brasileira com estabilidade do perfil químico do óleo essencial, denominado Índice de Estabilidade do Perfil Química do Genótipo (IEPQG) (SOARES, 2017), através do qual foi possível selecionar o genótipo UFRRJ EBC005 quimiótipo citral, com alto IEPQG, estimado em 96% (SOARES, 2017; SOARES *et al.*, 2019).

Ainda no âmbito da UFRRJ, em 2017, foi proposto um projeto de pesquisa com objetivo de conhecer os custos de produção do genótipo UFRRJ ECB005 (GARCEZ, 2019), selecionado por Soares (2017) e Soares *et al.* (2019). Os resultados indicaram que o referido genótipo apresentou lucro bastante satisfatório para a produção de biomassa seca de folhas, cultivado em pequenas propriedades, sob agricultura familiar, no município de Seropédica, RJ (GARCEZ, 2019).

Além do programa de melhoramento de erva-cidreira brasileira da UFRRJ, vale destacar também, um outro importante programa de melhoramento da espécie, porém, agora, desenvolvido no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). O objetivo principal do referido programa é viabilizar o plantio da erva-cidreira brasileira como substituta à forma extrativista do linalol. Este programa de melhoramento já gerou 40 clones resultantes de dois ciclos de recombinações, avaliados para determinação de rendimentos de massa e óleos essenciais (IAC, 2016).

Segundo Schocken (2007), a espécie *Lippia alba* pode ser classificada pelo seu modo de reprodução como preferencialmente alógama. Em plantas alógamas, diferentemente das autógamas, a seleção de plantas individuais não é efetiva para se estabelecer uma variedade, pois a segregação faz com que a progênie se desvie do tipo parental e ainda porque a redução no tamanho da população conduz a efeitos desfavoráveis sobre o vigor e a produtividade. Desta forma a seleção massal e seus procedimentos de seleção de progênies, são mais utilizados do que a seleção de plantas isoladamente (ALLARD, 1977).

Os cultivares obtidos de espécies alógamas são: híbridos de linhagem endogâmica ou parcialmente endogâmica e variedades de polinização aberta. Para espécies muito sensíveis à depressão por endogamia, somente híbridos de linhagens parcialmente endogâmicas podem ser usados. Populações de polinização aberta (variedades) são usadas como cultivares em espécies muito sensíveis à depressão por endogamia, que não permitem o desenvolvimento de linhagens endogâmicas, ou em espécies de culturas nas quais os programas de melhoramento não estão bem desenvolvidos (SOUZA Jr, 2011).

O melhoramento genético da erva-cidreira brasileira deve se basear em um ideótipo que possua: porte ereto, que facilite o manejo das plantas, tanto durante seu desenvolvimento, quanto no momento da colheita; alta produção de biomassa, associada à um alto rendimento na produção do óleo essencial; estabilidade na composição química do óleo essencial, em diferentes épocas e estabilidade reprodutiva, que viabilize a obtenção de híbridos férteis de interesse no decorrer do programa de melhoramento.

Até o presente momento não há registros nem disponibilidade para o plantio comercial de cultivares de erva-cidreira brasileira no Brasil (BRASIL, 2020). Desta forma há a necessidade de realização de estudos citogenéticos, reprodutivos, moleculares e químicos, em genótipos contidos nos bancos de germoplasma, pois, estes servem como base essencial no melhoramento genético da erva-cidreira brasileira.

Somente com uma caracterização e avaliação minuciosa dos acessos de erva-cidreira brasileira em bancos de germoplasmas, é que os programas de melhoramento alcançarão sucesso na seleção de genótipos superiores e de genitores utilizados no progresso destes

programas. Sem dúvida, o uso de ferramentas biotecnológicas tende a auxiliar no processo de seleção de genótipos superiores, concedendo rapidez e eficiência aos programas. Neste sentido, a implementação do melhoramento genético assistido por marcadores de DNA em programas de erva-cidreira brasileira será de suma importância para o progresso da cultura no país.

### 2.5.1 Melhoramento assistido por marcadores moleculares

O Melhoramento Genético assistido por marcadores moleculares é de grande importância na caracterização de germoplasmas, através da avaliação da variabilidade genética dentro e entre espécies, pois permite revelar a presença de polimorfismos (BERED *et al.*, 1997; MONDINI *et al.*, 2009), possibilitando assim, o planejamento de cruzamentos, de forma a maximizar as diferenças genéticas entre os genótipos elites e desta forma obter um melhor desempenho nos híbridos (heterose) (AGHAEI *et al.*, 2012). Outra aplicação, de grande relevância, para os marcadores moleculares, é na avaliação do sucesso de hibridações, pela análise do genótipo obtido de cruzamentos, em comparação com os genótipos dos genitores (MICHALCZUK *et al.*, 2015; POOLER *et al.*, 2002).

Um marcador molecular consiste em qualquer fenótipo molecular que, de alguma forma seja analisável, resultante tanto de um gene expresso, quanto de um segmento específico de DNA e para o qual os alelos em *loci* individuais segregam de uma maneira mendeliana (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; TURCHETTO *et al.*, 2017). Suas aplicações vão desde a genética de populações, filogeografia, filogenia molecular, mapeamento genético, diagnósticos de doenças genéticas, testes de paternidade, investigação das relações entre genótipo e fenótipo, análises de diversidade e divergência genética (AGARWAL *et al.*, 2008; TURCHETTO *et al.*, 2017).

Os marcadores podem ser classificados em três categorias principais, os de hibridização e os de amplificação do DNA e marcadores baseados em sequenciamento. Os principais marcadores identificados por hibridização são RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minissatélites ou locus VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (ZANELLA *et al.*, 2017). Outros como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) e STS (*Sequence Tagged Sites*) foram desenvolvidas a partir do surgimento da PCR, para amplificação do DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; TURCHETTO *et al.*, 2017). Os principais marcadores baseados em sequenciamento são os marcadores microssatélites gênicos (SSR-EST ou SSR's gênicos) e *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 1994).

Lande e Thompson (1990), foram pioneiros na aplicação e proposição da seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), com o propósito de aumentar a eficiência do processo de seleção baseado em dados fenotípicos. Esta forma de seleção consiste em uma seleção indireta, na qual o caráter indireto apresenta herdabilidade igual a 100%, uma vez que marcadores moleculares não são influenciados pelo ambiente, excluindo-se quando estes são obtidos a partir de sequências expressas (EST's, *Expressed Sequence Tag*). Outra vantagem apresentada pela SAM é a falta de epistasia em marcadores moleculares, que poderá possibilitar a seleção para vários caracteres ao mesmo tempo. O tempo é também uma vantagem no processo de seleção, uma vez que vários ciclos de seleção poderão ser praticados a cada ano, visto que a seleção com marcadores moleculares independe do ambiente (BERED *et al.*, 1997).

A maioria das características de importância agrônoma, incluindo produtividade, qualidade nutricional e tolerância ao estresse, são herdadas quantitativamente (HALLAUER; MIRANDA FILHO, 1988). Desta forma, para a aplicação da SAM se faz necessário o mapeamento dos caracteres de interesse agrônomo, de forma a maximizar a correlação

genética. Este procedimento requer a construção de mapas de ligação genética, próxima à locos controladores de tais características quantitativas (QTLs), saturados de marcadores. Os mapas genéticos permitem definir, com certa probabilidade estatística, regiões do genoma, delimitadas por marcadores moleculares, que controlam parte da variabilidade fenotípica (TANKSLEY; NELSON, 1996).

## 2.6 Gametogênese e citogenética em *Lippia alba*

A citogenética é uma ciência híbrida que correlaciona eventos celulares, especialmente aqueles dos cromossomos, com fenômenos genéticos. A maioria dos organismos superiores são diploides, podendo ocorrer variações no número de conjuntos cromossômicos (ploidia) de forma natural. De acordo com o nível de ploidia os organismos podem ser classificados como: monoploides, triploides, tetraploides (autotetraploides e alotetraploides), por exemplo. O termo poliploide é aplicado aos organismos com o número gamético maior que duas vezes o conjunto básico de cromossomos da espécie (SINGH, 2002; STANSFIELD, 1930).

Algumas variações podem ocorrer também, no que diz respeito ao número de cromossomos, que altera a quantidade normal dos cromossomos presentes em um indivíduo. Elas podem ser tanto aditivas, quanto subtrativas. Estas variações são chamadas aneuploidias e tratam-se do surgimento de organismos monossômicos, trissômicos, tetrassômicos, trissômico-duplo ou ainda nulissômicos, de acordo com a ausência ou adição de um ou mais cromossomos no grupo. Os cromossomos podem sofrer ainda variações no tamanho, no arranjo de seus segmentos e no número de segmentos (GUERRA, 1988; STANSFIELD, 1930). Alterações ou rearranjos cromossômicos, bem como alterações numéricas, podem influenciar em sua segregação, recombinação e conteúdo gênico.

Os estudos citogenéticos incluem a manipulação de cromossomos (técnicas de coloração cromossômica), função e movimento de cromossomos (divisão celular, mitose, meiose), número e estrutura de cromossomos (análise de cariótipo) e numerosas modificações de estrutura e comportamento em relação à recombinação, transmissão e expressão de genes (SINGH, 2002).

Visando aumentar as chances de uma hibridização bem-sucedida, o melhorista deve estar familiarizado com as relações genéticas entre os genótipos envolvidos no trabalho e suas potenciais fertilidades, que podem ser avaliadas por análises citogenéticas (DAMASCENO JÚNIOR *et al.*, 2010). Desta forma estudos sobre número de cromossomos, nível de ploidia, cariotipagem, padrão meiótico e viabilidade dos grãos de pólen são de extrema importância, pois auxiliam programas de melhoramento genético no direcionamento de cruzamentos, a fim de que seja possível evitar problemas de fertilidade nas progênes selecionadas causadas por alterações do nível de ploidia e problemas no pareamento cromossômico.

Anormalidades, poliploidia, mixoploidia e citomixia induzem a produção de gametas desequilibrados e conseqüentemente podem contribuir para a formação de aneuploides e de indivíduos poliploides, podendo ocasionar a baixa viabilidade dos grãos de pólen. Quando genótipos instáveis, porém com elevado valor agrônômico, são detectados, dentro de um programa de melhoramento, uma alternativa é a seleção de linhas estáveis nos genótipos instáveis. Desta maneira, a seleção assistida via citogenética torna-se de fundamental importância. Esta seleção pode ser efetuada eliminando os tipos aberrantes em linhas puras, além da avaliação do índice meiótico (BRAMMER, 2008).

O melhoramento genético de plantas busca combinar alelos desejáveis, encontrados em diferentes genótipos em uma única variedade elite. O sucesso de um programa de melhoramento genético depende da habilidade do melhorista de transferir esses alelos desejados para um híbrido, construindo combinações desejadas de alelos nos cromossomos e projetando a

combinação certa de cromossomos (WIJNKER; JONG, 2008). Neste sentido, técnicas de citogenética podem contribuir de forma significativa.

### **2.6.1 Gametogênese em plantas e citogenética em erva-cidreira brasileira**

No grupo das angiospermas os gametas feminino e masculino são formados por dois processos distintos – megasporogênese e microsporogênese - que ocorrem nos aparelhos reprodutores feminino e masculino, denominados gineceu e androceu, respectivamente. O gineceu apresenta o estigma, o estilete e o ovário; e o androceu apresenta a antera, o conectivo e o filete (KARASAWA, 2009).

A geração gametofítica feminina tem início quando a célula-mãe do megásporo inicia o processo de meiose. O megasporócito diploide se divide por meiose para formar quatro megásporos haploides, os quais geralmente se dispõem em tétrade linear (KARASAWA, 2009; RAVEN *et al.*, 2014). Três dos quatro megásporos se degeneram e aquele mais distante da micrópila é mantido e se desenvolve no megagametófito (gametófito feminino). O megásporo funcional cresce ao mesmo tempo que se dá a expansão do nucelo, e o núcleo do megásporo se divide mitoticamente. Cada núcleo resultante se divide mitoticamente, o que é seguido ainda de outra divisão mitótica dos quatro núcleos resultantes. Ao final do terceiro ciclo mitótico, os oito núcleos se organizam em dois grupos de quatro (RAVEN *et al.*, 2014). A celularização ocorre a seguir, com a formação de sete células no saco embrionário (o gametófito feminino) maduro: três antípodas calazais (junto ao polo calazal), uma célula média binucleada central e, compondo o chamado aparelho oosférico, duas sinérgides e uma oosfera (SANTOS, 2016).

Durante a microsporogênese, a antera em fase inicial de desenvolvimento, consiste em um conjunto de células uniformes, exceto pela epiderme parcialmente diferenciada. A seguir, quatro agrupamentos de células férteis ou esporogênicas tornam-se evidentes no interior da antera (células-mãe de micrósporos) (KARASAWA, 2009). As células esporogênicas tornam-se microsporócitos, os quais se dividem meioticamente. Cada microsporócito diploide dá origem a uma tétrade de micrósporos haploides. A microsporogênese é completada com a formação dos micrósporos unicelulares e com o início da microgametogênese, quando os micrósporos se dividem mitoticamente, formando duas células no interior da parede original do micrósporo. A divisão forma uma célula vegetativa (célula do tubo) grande e uma célula geradora pequena (RAVEN *et al.*, 2014). Em 70% das angiospermas o grão de pólen é liberado com apenas duas células. Nos restantes 30%, o grão de pólen é liberado com três células onde, ainda na antera, por mitose, a célula geradora dá origem a duas células espermáticas que são integralmente incorporadas no citoplasma da célula vegetativa. Nos grãos de pólen bicelulares a divisão da célula geradora ocorre mais tarde, durante o alongamento do tubo polínico no estilete da planta polinizada (AGUIAR, 2013).

### **2.6.2 Número de cromossomos e nível de ploidia em *Lippia alba***

Diversas pesquisas no campo da citogenética vêm sendo realizadas para a erva-cidreira brasileira, abordando análises comparativas entre diferentes quimiótipos da espécie (PIERRE *et al.*, 2011; REIS; SOUSA; VICCINI, 2016; SOUSA *et al.*, 2009), bem como entre espécies relacionadas (BRANDAO; VICCINI; RECCO-PIMENTEL, 2005; BRANDAO *et al.*, 2007; SOUSA; TORRES; VICCINI, 2012). Tais trabalhos, em sua grande maioria, têm como principal objetivo elucidar relações filogenéticas e classificações taxonômicas, porém seus resultados são de grande valor também para o melhoramento genético da espécie.

O conhecimento do número de cromossomos, ou do nível de ploidia, além de importante para a caracterização de germoplasmas é imprescindível para os trabalhos de melhoramento

genético, quando são programados cruzamentos (SCHIFINO-WITTMANN, 2001). Normalmente, a ocorrência de diferentes números cromossômicos nos genitores, em cruzamentos, pode ocasionar incompatibilidade, aborto de híbridos e esterilidade. Desta forma, estudos que caracterizem o número de cromossomos e o nível de ploidia de uma espécie, são de grande importância, servindo como base para o planejamento de cruzamentos em programas de melhoramento genético das espécies.

Nas pesquisas conduzidas por Brandao, Viccini e Recco-Pimentel (2005) e Brandão *et al.* (2007) 15 bivalentes foram observados durante o diplóteno, em análises de diferentes estágios da meiose, realizadas em anteras de erva-cidreira brasileira. Sousa *et al.* (2009) também relatam o número de cromossomos como  $2n = 30$ , para cinco diferentes acessos de erva-cidreira brasileira, provenientes de diferentes regiões brasileiras e pertencentes aos quimiótipos neral (ou citral) e linalol.

Diferentes níveis de ploidia, como a ocorrência de associações trivalentes e quadrivalentes e indivíduos mixoploides são relatados por Pierre *et al.* (2011) em erva-cidreira brasileira. Neste estudo os diferentes níveis de ploidia corresponderam à diferentes quimiótipos, sendo estes de  $2n = 2x = 30$  para o quimiótipo citral,  $2n = 4x = 60$  para carvona e para o quimiótipo linalol, todos os indivíduos analisados apresentaram diferentes números de cromossomos, variando de  $2n = 12$  a  $2n = 60$  cromossomos, em células distintas do mesmo indivíduo, indicando a presença de mixoploidia. Segundo King; Stansfield; Mulligan (2006) mixoploidia é definida como a presença de mais de um número de cromossomos em uma população celular. Análises de 106 acessos de erva-cidreira brasileira, coletados em 14 estados brasileiros também demonstraram números cromossômicos distintos, sendo estes de  $2n = 30, 38, 45, 60, 90$  (REIS *et al.*, 2014)

Um estudo citológico de doze espécies brasileiras pertencentes ao gênero *Lippia*, dentre as quais a erva-cidreira brasileira, sugeriu que o gênero possui um número cromossômico variável (de  $2n = 20$  a  $2n = 56$ ) originado por disploidia e poliploidia (SOUSA; TORRES; VICCINI, 2012). A disploidia consiste de um rearranjo cromossômico que resulta em um cariótipo genomicamente semelhante, que contém um ou alguns cromossomos a mais ou a menos que o original, enquanto que na poliploidia ocorre um erro de divisão celular que produz uma duplicação inteira do genoma (Guerra, 1988).

### **2.6.3 Meiose e viabilidade dos grãos de pólen de *Lippia alba***

A recombinação meiótica desempenha um papel fundamental no sucesso da reprodução, uma vez que o *crossing over* ocorre apenas durante a meiose. Portanto, a meiose é essencial para a reprodução, uma vez que se torna uma das fontes de variabilidade genética, além de explicar fenômenos reprodutivos e mecanismos de hereditariedade (WIJNKER; JONG, 2008). Irregularidades meióticas geram micrósporos e megásporos, cromosomicamente desequilibrados, resultando em redução da viabilidade dos grãos de pólen e óvulos. Por outro lado, algumas mutações meióticas apresentam características que podem ser exploradas com sucesso nos programas de melhoramento genético vegetal, devido ao fato de causarem esterilidade masculina total (PAGLIARINI, 2000).

Segundo Brandao, Viccini e Recco-Pimentel (2005), nenhuma anormalidade cromossômica foi observada em seu estudo, através de análises de diferentes fases meióticas durante a formação dos grãos de pólen da erva-cidreira brasileira. Porém a ocorrência de citomixia em células meióticas (cariótipo tetraploide) é relatada por Reis, Sousa e Viccini (2016). Segundo estes autores um alto índice de irregularidades durante a meiose foi observado, bem como grão de pólen inviáveis com tamanhos heterogêneos. Aproximadamente 80% das células de zigóteno apresentaram troca de material genético. Os autores concluíram que os

diferentes números de cromossomos relatados para erva-cidreira brasileira podem dever-se à presença de citomixia.

Altas taxas de irregularidades meióticas são relatadas principalmente para citótipos de erva-cidreira brasileira com maior número de cromossomos, o que é refletido na viabilidade dos grãos de pólen. Acessos com  $2n = 30$  apresentam maior frequência de grãos de pólen viáveis (69 e 75%). A baixa viabilidade dos grãos de pólen de acessos com 38, 45 e 90 cromossomos corresponde aos altos níveis de irregularidade meiótica observados nestes níveis de ploidia. Com relação ao tamanho dos grãos de pólen, os poliploides produziram grãos de pólen 30-40% maiores que o diploide (REIS *et al.*, 2014).

Várias anormalidades meióticas são relatadas também por Pierre *et al.* (2011), sendo estas observadas principalmente nos quimiótipos carvona e linalol de erva-cidreira brasileira. Para o quimiótipo citral algumas anormalidades ocorrem (13,8% em 282 células analisadas), porém a maioria de suas células apresentam 15 bivalentes e meiose regular. A presença de univalentes em diacinese, segregação cromossômica precoce na metáfase I e também cromossomos retardatários na anáfase I e na telófase I é relatada. Anormalidades cromossômicas em células-mãe de grãos de pólen compreendem a diferentes associações cromossômicas em diacinese, incluindo células com univalentes, bivalentes e cromossomos multivalentes. Disjunção precoce de cromossomos na metáfase I e II, pontes e fragmentos na anáfase I, cromossomos retardatários na telófase I, células com núcleos assíncronos, tétrades com cromossomos perdidos, mônades e díades foram também observadas. As anormalidades, poliploidia e mixoploidia relatadas, refletem na viabilidade dos grãos de pólen, que consequentemente também varia entre os quimiótipos, sendo de 82,0% para o citral, 52,0% para o quimiótipo carvona e 35,0% para o linalol.

## 2.7 Aspectos gerais da reprodução em Angiospermas

As Angiospermas ao atingirem a fase adulta emitem ramos diferenciados, que darão origem as flores. Quando completamente formada, a flor abre as sépalas e pétalas expondo os estames e o gineceu, a esta fase chamamos antese. Com a deiscência da antera – isto é, a abertura dos sacos polínicos – os grãos de pólen são transferidos aos estigmas de várias formas (RAVEN *et al.*, 2014). Para realizar este transporte, em espécies alógamas ou até autógamas, mas com taxas de alogamia, o grão de pólen conta com o auxílio da natureza, podendo ser transportado pelo vento, insetos, aves e pela água.

Através da polinização os grãos de pólen entram em contato com o estigma, absorvendo água da superfície deste e emitem o tubo polínico (RAVEN *et al.*, 2014). O revestimento do estigma o define como um local permeável à água na planta. Proteínas e lipídios estão envolvidos na adesão, hidratação e na emissão do tubo polínico pelos grãos de pólen. Os estigmas do tipo seco possuem locais de compatibilidade do grão de pólen, com suporte seletivo de hidratação e emissão do tubo polínico, enquanto os estigmas úmidos geralmente são cobertos por exsudatos de células apoptóticas e bloqueiam a polinização incompatível apenas em etapas posteriores. No ponto de contato entre o grão de pólen e o estigma, os revestimentos de ambos podem se misturar, num processo que medeia a conversão de revestimento, a hidratação, a emissão do tubo polínico e a penetração no estigma (EDLUND; SWANSON; PREUSS, 2004). À medida que o tubo polínico se desenvolve, ao longo do estilete, em direção a micrópila no saco embrionário, a célula germinativa (célula geradora) se divide por mitose, formando dois anterozoides haploides (gametas masculinos), denominados primeiro e segundo anterozoide. A célula vegetativa, que vai à frente, orientando o crescimento do tubo polínico, ao entrar em contato com o saco embrionário se degenera (SANTOS, 2010). O terceiro núcleo pode surgir dentro do grão de pólen ou dentro do tubo polínico. Espécies que formam o terceiro núcleo

dentro do grão de pólen suportam um período menor de armazenamento do grão de pólen, pois consomem mais energia (LOPES, 2016).

Um dos gametas masculinos ao penetrar o gametófito feminino se unirá com a oosfera para formar o embrião de uma nova planta e o outro gameta masculino se unirá com os dois núcleos polares, no centro do gametófito feminino, para formar o endosperma, tecido de reserva, que em algumas sementes nutrirá o embrião. Portanto, o óvulo assim fecundado passa a se desenvolver formando a semente (GASPARINO; CRU-BARROS, 2006; RAVEN *et al.*, 2014). A fecundação nos vegetais é denominada singamia.

Algumas espécies vegetais são essencialmente alógamas ou autógamas, porém, é bastante comum que uma espécie apresente ao mesmo tempo autogamia e alogamia (CRUDEN, 1977). De acordo com Cruden (1977), as espécies vegetais podem ser classificadas como cleistogâmica, autógama ou alógama obrigatória e autógama ou alógama facultativa. Damasceno Junior *et al.* (2009), por exemplo, classificou o mamoeiro (*Carica papaya*) como uma espécie autógama facultativa, ou seja, há a predominância da autofecundação (neste caso, até reforçada pela cleistogamia), entretanto, existe também a polinização cruzada. Como exemplo de espécie medicinal alógama pode-se citar a *Camellia sinensis* (XIA *et al.*, 2020), e dentro do gênero *Passiflora*, as espécies *P. capsularis* e *P. rubra*, que podem se reproduzir, tanto por autopolinização, quanto por polinização cruzada, segundo Amorim *et al.* (2011).

O modo preferencial de reprodução de uma espécie é de grande importância quando se pretende iniciar atividades de melhoramento genético pois, os procedimentos ou métodos de melhoramento a serem adotados dependem diretamente dessa informação. Trabalhos de melhoramento genético da erva-cidreira têm sido desenvolvidos no Brasil (RUFINO, 2008; RUFINO *et al.*, 2010; SCHOCKEN, 2007; YAMAMOTO, 2006), porém, aspectos básicos importantes no melhoramento da planta ainda não são conhecidos para a cultura, como por exemplo, a capacidade de se autofecundar, bem como sua estabilidade reprodutiva. Este fator determina a estrutura genética da espécie, sendo o seu conhecimento, portanto, um fator decisivo na escolha do método de seleção a ser utilizado nos programas de melhoramento genético.

Conforme relatos sobre a ocorrência de autoincompatibilidade em erva-cidreira brasileira (BOTTIGNON *et al.*, 2011; RUFINO *et al.*, 2010; 2012) é possível inferir que tal mecanismo torne a espécie exclusivamente alógama. Nesta situação, e em condições naturais, plantas de erva-cidreira brasileira não seriam capazes de se autofecundar. No entanto, tais estudos não mostram procedimentos técnicos e específicos que comprovem a existência da autoincompatibilidade. Diante disso, progênies de meios-irmãos de erva-cidreira brasileira obtidas via polinização aberta, podem não ser, indubitavelmente, meios-irmãos. Mediante esse quadro, pode-se afirmar que até o momento o modo de reprodução preferencial em erva-cidreira brasileira ainda não foi satisfatoriamente elucidado.

A autoincompatibilidade é a incapacidade de uma planta fértil formar sementes quando fertilizada por seu próprio grão de pólen (SCHIFINO-WITTMANN; D'ALL AGNOL, 2002). Trata-se de um mecanismo fisiológico para promoção da alogamia, que é explicado geneticamente. De acordo com Brewbaker (1957), a autoincompatibilidade ocorre em diversas espécies, como por exemplo, nas brássicas. A autoincompatibilidade pode ser de dois tipos: gametofítica e esporofítica. O primeiro tipo é gerado pelo gene *S* contido no genoma haploide dos grãos de pólen, já o segundo tipo é ocasionado pelo genótipo diploide da planta adulta que originou o grão de pólen. As reações de autoincompatibilidade, na prática, podem resultar no impedimento da emissão do tubo polínico por parte dos grãos de pólen no estigma da flor, no rompimento do tubo polínico no interior da flor, ou, ainda, na interrupção, por paralisação, do tubo polínico no estilete da flor (DE NETTANCOURT, 1997; HESLOP-HARRISON, 1983). Em suma, a autoincompatibilidade é o resultado do fracasso dos grãos de pólen da mesma planta

de emitirem tubo polínico no estigma, ou mesmo no fracasso dos tubos polínicos de penetrarem ou se desenvolverem através do estigma (SCHIFINO-WITTMANN; D'ALL AGNOL, 2002).

**CAPÍTULO I**  
**ESTABILIDADE REPRODUTIVA ACESSADA ATRAVÉS DE ANÁLISES DO**  
**CICLO, DO ÍNDICE MEIÓTICO E DA VIABILIDADE DOS GRÃOS DE PÓLEN EM**  
**GENÓTIPOS DE ERVA-CIDREIRA BRASILEIRA DO QUIMIÓTIPO CITRAL**

## RESUMO

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*), uma espécie hermafrodita que apresenta variação no número de cromossomos de  $2n=12-90$ , possui uma grande importância medicinal e grande potencial para exploração pelas indústrias química e de cosméticos, devido às características químicas e aromáticas de seu óleo essencial. Por não existirem atualmente cultivares recomendadas para seu plantio comercial, torna-se de fundamental importância a realização do melhoramento genético da espécie para que se possa então obter tais cultivares. A realização de pesquisas básicas, como a análise do número de cromossomos, nível de ploidia, análises sobre o comportamento cromossômico e viabilidade dos grãos de pólen, fornecem um importante suporte à implementação de um programa de melhoramento genético para a espécie, visando cruzamentos compatíveis e progênies estáveis. Desta forma a presente pesquisa avaliou o comportamento meiótico de genótipos de erva-cidreira brasileira, pertencentes ao quimiótipo citral, seus respectivos índices meióticos (IM) e viabilidades dos grãos pólen (VB) e a partir dessas informações estimou parâmetros genéticos que auxiliam na definição de estratégias de seleção para programas de melhoramento genético da espécie. Para isso oito genótipos de erva-cidreira brasileira, pertencentes ao quimiótipo citral, mantidos na coleção de germoplasma do Departamento de Fitotecnia, do Instituto de Agronomia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro tiveram as diferentes fases meióticas e a presença/ausência de anormalidades na divisão celular analisadas, por microscopia de campo claro, a partir de anteras em estágios jovens de desenvolvimento. Foram observados também o número de cromossomos e o nível de ploidia da espécie em estudo, bem como o número de pares cromossômicos associados ao nucléolo, o índice de recombinação, o número de produtos pós-meiótico (mônades, díades, tríades, tétrades e políades). A presença de grãos de pólen viáveis/férteis foi detectada pela presença da cor vermelha ou púrpura, enquanto grãos de pólen inviáveis apresentaram coloração verde/azul. Não foi observada a presença de anormalidades na divisão celular dos genótipos de erva-cidreira brasileira estudados. Foi possível observar a presença de um paquíteno e um diplóteno com regiões de quiasmas, onde é visível a ocorrência de 1 par cromossômico em bastão ('rod') e 14 em anel ('ring'). O índice de recombinação foi estimado em 44,33. Confirmou-se o nível de ploidia como diploide, com  $2n=2x=30$  cromossomos, pela observação de 15 pares cromossômicos ou bivalentes durante o diplóteno. Para a fonte de variação genótipo, ambas as variáveis (IM e VB) foram estatisticamente distintas pelo Teste F à 1 e a 5%, respectivamente. O IM apresentou elevado coeficiente de determinação genotípico ( $H^2 = 91,50\%$ ) indicando que a influência genética prevalece sobre a de ambiente. A VB alcançou uma estimativa para herdabilidade de  $H^2 = 76,77\%$ , que demonstra maior efeito genético sobre esta característica. Estes resultados permitem boas perspectivas na seleção de plantas para estabilidade reprodutiva dentre os genótipos de erva-cidreira brasileira analisados, visto que as variáveis estudadas se mostraram mais influenciadas por fatores genéticos do que ambientais. Os oito genótipos estudados apresentam alta fertilidade de seus gametas masculinos e os dados obtidos servem de base para a adoção de estratégias de seleção para programas de melhoramento genético da espécie.

**Palavras-chave:** Seleção, *Lippia alba*, Gameta masculino.

## ABSTRACT

Bushy mat grass (*Lippia alba*), a hermaphrodite species that presents a variation in the number of chromosomes from  $2n = 12-90$ , has great medicinal importance and great potential for exploration by the chemical and cosmetic industries, due to the chemical and aromatic characteristics of your essential oil. As there are currently no recommended cultivars for commercial planting, it is of fundamental importance to carry out the genetic improvement of the species so that one can then obtain such cultivars. The performance of basic researches, such as the analysis of the number of chromosomes, ploidy level, analyzes of the chromosomal behavior and viability of pollen grains, provide an important support to the implementation of a genetic improvement program for the species, aiming at compatible crossings and stable progenies. Thus, this research evaluated the meiotic behavior of Bushy mat grass genotypes, belonging to the citral chemotype, their respective meiotic indexes (IM) and pollen grains viability (VB) and based on this information, estimated genetic parameters that help in the definition of selection strategies for breeding programs of the species. For this, eight Bushy mat grass genotypes, belonging to the citral chemotype, kept in the germplasm collection of the Department of Phytotechnics, of the Institute of Agronomy, of the Federal Rural University of Rio de Janeiro had the different meiotic phases and the presence / absence of abnormalities in cell division analyzed, by bright field microscopy, from anthers in young stages of development. The number of chromosomes and the ploidy level of the species under study were also observed, as well as the number of chromosomal pairs associated with the nucleolus, the recombination index, the number of post-meiotic products (monads, dyads, triads, tetrads and polyads). The presence of viable / fertile pollen grains was detected by the presence of red or purple color, while non-viable pollen grains showed a green color. No abnormalities were observed in the cell division of the Bushy mat grass genotypes studied. It was possible to observe the presence of a pachytene and a diploid with chiasma regions, where the occurrence of 1 chromosomal pair in rod ('rod') and 14 in ring ('ring') is visible. The recombination index was estimated at 44.33. The level of ploidy was confirmed as diploid, with  $2n = 2x = 30$  chromosomes, by observing 15 chromosomal or bivalent pairs during the diplotene. For the source of genotype variation, both variables (IM and VB) were statistically different by Test F à 1 and 5%, respectively. The MI showed a high coefficient of genotypic determination ( $H^2 = 91.50\%$ ) indicating that the genetic influence prevails over the environment. BV reached an estimate for  $H^2$  heritability = 76.77%, which demonstrates a greater genetic effect on this trait. These results allow good perspectives in the selection of plants for reproductive stability among the Bushy mat grass genotypes analyzed, since the studied variables were more influenced by genetic than environmental factors. The eight genotypes studied show high fertility in their male gametes and the data obtained serve as a basis for the adoption of selection strategies for breeding programs for the species.

**Key-words:** Selection, *Lippia alba*, Male gamete.

## 1 INTRODUÇÃO

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*), pertencente à família Verbenaceae, é uma espécie hermafrodita que apresenta variação no número de cromossomos e, de acordo com Brandão, Viccini e Recco-Pimentel. (2005) e Brandão *et al.* (2007) é igual à 15 bivalentes. Sousa *et al.* (2009) também relataram o número de cromossomos como  $2n = 30$ , no entanto diferentes níveis de ploidia, como a ocorrência de associações trivalentes e quadrivalentes e indivíduos mixoploides são relatados por Pierre *et al.* (2011), onde os diferentes níveis corresponderam à diferentes quimiótipos da espécie, sendo estes de  $2n = 12-60$  cromossomos. Reis *et al.* (2014) também relataram números cromossômicos distintos para acessos de erva-cidreira brasileira, sendo estes de  $2n = 30, 38, 45, 60, 90$  cromossomos.

A erva-cidreira brasileira se distribui desde o sul dos Estados Unidos, México, Caribe até o norte da Argentina e Uruguai, e ocorre nos mais variados ambientes (SALIMENA; MÚLGURA, 2015; SANDERS, 2001). Não há relatos sobre o centro de origem da erva-cidreira brasileira, contudo, por ocorrer em todas as regiões do Brasil (TAVARES *et al.*, 2005), inclusive com alta ocorrência de espécies relacionadas. Por isso, o país consiste em um importante centro de diversidade da espécie.

A destacada importância medicinal e grande potencial para exploração pelas indústrias química e de cosméticos, apresentada pela erva-cidreira brasileira, se devem às características químicas, aromáticas e atividade biológica (no uso como droga vegetal) de seu óleo essencial (ANVISA, 2011; SILVA *et al.*, 2018; TAREAU *et al.*, 2017). A variação química do óleo essencial da erva-cidreira brasileira divide a espécie em diferentes tipos químicos, ou quimiótipos. Estes, representam subgrupos dentro de uma espécie, cuja organização se dá pela síntese e/ou pela produção diferenciada de substâncias químicas em seus óleos essenciais. O quimiótipo citral em erva-cidreira brasileira apresenta alto potencial de utilização comercial, o que se deve às suas propriedades antibacteriana, antifúngica (PORFÍRIO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017), e sua ação terapêutica, como: ansiolítico, sedativo, analgésica, anticonvulsivante (SOUSA *et al.*, 2015), antiespasmódico e vaso relaxante, entre outras (SILVA *et al.*, 2018; SIQUEIRA-LIMA *et al.*, 2018). Além do aroma cítrico característico, semelhante ao do limão (PubChem, 2020).

Atualmente não há cultivares recomendadas para o plantio comercial quando se pretende explorar a produção do óleo essencial e dos princípios ativos presentes no mesmo (BRASIL, 2020). Desta forma torna-se fundamental a implementação de programas de melhoramento genético da espécie para que se possa obter cultivares com alta performance agrônômica. A erva-cidreira brasileira trata-se ainda de uma espécie silvestre, ou seja, não domesticada.

A realização de pesquisas básicas, como por exemplo, a análise do comportamento cromossômico, do nível de ploidia e da viabilidade dos grãos de pólen, geram informações importantes para a caracterização de germoplasmas em programas de melhoramento genético de plantas. Principalmente, em espécies vegetais ainda silvestres ou em fase de domesticação, como é o caso da erva-cidreira brasileira. Espécies silvestres tendem a apresentar uma série de anomalias durante o ciclo meiótico. Estas anomalias podem gerar gametas não viáveis.

De acordo com Love (1951), estas informações são também importantes quando são programados cruzamentos. Neste caso, identificar genitores com alto potencial agrônômico, e que apresentem, simultaneamente, estabilidade reprodutiva, é realmente um passo importante para a obtenção de progênies para fins de seleção e férteis ao longo do programa de melhoramento. A estabilidade reprodutiva está intimamente relacionada a capacidade dos genitores em produzir sementes para compor novas gerações. Por isso, pode-se dizer que tal estabilidade é vital para a longevidade de qualquer programa de melhoramento de plantas. A

presença de instabilidades meióticas, que acarretem em anormalidades genéticas e/ou aberrações cromossômicas, pode resultar na formação de plantas com baixo potencial ou até incapazes de produzir sementes (BRAMBATTI *et al.*, 2016).

Assim sendo, conhecer a fertilidade de genótipos de interesse em um programa de melhoramento genético é uma informação imprescindível para o seu sucesso, pois contribui para que o melhorista obtenha sucesso nos cruzamentos realizados.

Desta forma o objetivo deste trabalho foi investigar a estabilidade reprodutiva relacionada aos gametas masculinos em genótipos de erva-cidreira brasileira pertencentes ao quimiótipo citral. Para tal, de forma geral, foram analisadas as diferentes fases da meiose com vistas a investigar a possibilidade de ocorrência de anomalias durante o referido ciclo celular, o número de cromossomos, o nível de ploidia, e o número de cromossomos associados ao nucléolo. Além disso, foi mensurado o índice de recombinação. Especificamente, em relação aos genótipos analisados, foram estimados o índice meiótico e a viabilidade dos grãos de pólen, cujo objetivo foi inferir sobre a estabilidade reprodutiva destes genótipos. Por fim, a partir destes dois últimos parâmetros, estimaram-se parâmetros genéticos a fim de se conhecer a influência genética e de ambiente sobre tais variáveis.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Localização da pesquisa e condições experimentais

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP) (Figura 1) e Campo experimental do Setor de Grandes Culturas, ambos no Departamento de Fitotecnia (DFito), Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no município de Seropédica, Rio de Janeiro (22°45' S; 43° 41' W) (RAMOS; CASTRO; CAMARGO, 1973). De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw, sendo caracterizado pela alternância entre a estação chuvosa no verão e seca durante o inverno, com precipitação anual variando entre 930 mm/ano a 1.475 mm/ano (INMET, 2017). A temperatura média anual é de 24,5°C (CARVALHO *et al.*, 2006).

Os genótipos encontram-se na área experimental dispostos em espaçamento 1,2 x 1,2 metros, e em delineamento em blocos ao acaso com oito tratamentos (genótipos), duas repetições (blocos) e seis plantas por parcela, totalizando 12 plantas por genótipo. Esta área experimental foi inicialmente instalada em agosto de 2015, por Soares (2017).



**Figura 1.** Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP) do Departamento de Fitotecnia (DFito), do Instituto de Agronomia (IA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

## 2.2 Material Vegetal e coleta de material

Utilizou-se oito genótipos de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*), pertencentes ao quimiótipo citral, oriundos de propagação vegetativa. Os genótipos utilizados estão codificados como: UFRRJ ECB001, UFRRJ ECB002, UFRRJ ECB005, UFRRJ ECB011, UFRRJ ECB015, UFRRJ ECB018, UFRRJ ECB019 e UFRRJ ECB020 (Figura 2). Estes genótipos estão depositados no Herbário da UFRRJ <http://rbr.jbrj.gov.br/v2/consulta.php>. A correspondência entre os códigos UFRRJ ECB's e do Herbário podem ser observados na Tabela 1.

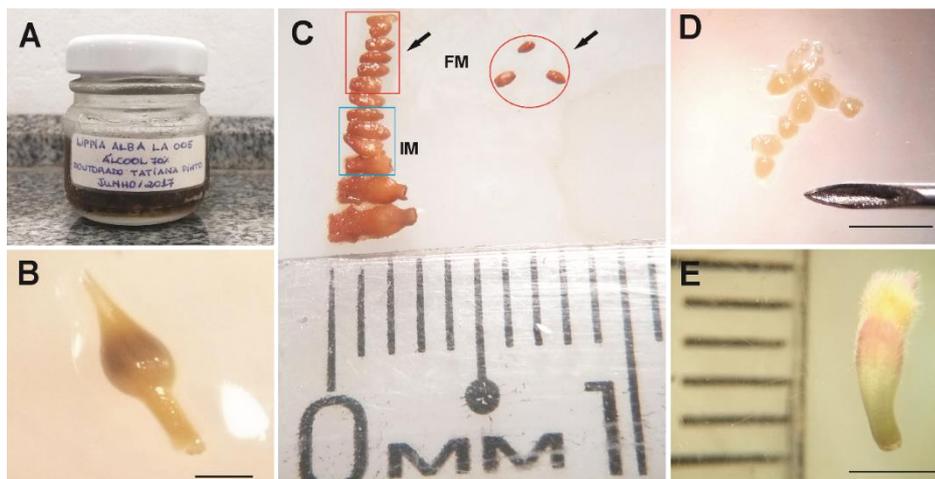


**Figura 2.** Coleção de germoplasma de erva-cidreira brasileira do Departamento de Fitotecnia (DFito), do Instituto de Agronomia (IA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

**Tabela 1.** Dados de registro dos genótipos de erva-cidreira brasileira no Herbário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Genótipos	Número de Registro no Herbário	Número de etiqueta para Consulta
UFRRJ ECB001	RBR00045072	45072
UFRRJ ECB002	RBR00045071	45071
UFRRJ ECB005	RBR00045070	45070
UFRRJ ECB011	RBR00045069	45069
UFRRJ ECB015	RBR00045068	45068
UFRRJ ECB018	RBR00045067	45067
UFRRJ ECB019	RBR00045066	45066
UFRRJ ECB020	RBR00045065	45065

Nos dias 05 e 06 de junho de 2017, no período da manhã, entre 7 e 8h, foram coletados em todos os genótipos nos dois blocos do experimento, botões florais, a partir de inflorescências em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 3). Para as análises das fases da meiose os botões foram fixados em solução de etanol e ácido acético, na proporção de 3:1 (Solução Carnoy) e armazenados em freezer até o início das análises. Para as análises do índice meiótico e da viabilidade de grãos de pólen os botões florais foram fixados em etanol 70% (Figura 3A), mantendo-os conservados a 12° C em refrigerador, até as análises.



**Figura 3.** Coleta e triagem de botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento. (A) Frasco de vidro contendo botões florais fixados em etanol 70%, para análise do índice meiótico e da viabilidade de grãos de pólen (ou em solução Carnoy, para análise das fases da meiose); (B) Inflorescência jovem após fixação em Carnoy, contendo botões florais em estágios iniciais de desenvolvimento; (C) Triagem e medição dos botões florais selecionados para análise das fases da meiose (FM) e do índice meiótico (IM); Setas indicam botões selecionados para análise das fases da meiose. (D) Botões florais utilizados na obtenção de protoplastos; (E) Botão floral em pré-antese utilizado na análise da viabilidade dos grãos de pólen. Setas indicam botões selecionados para análise das fases da meiose. Barra de escala = 2,5mm.

### 2.3 Análise do ciclo meiótico

Para definição do tamanho ideal do botão floral a ser utilizado na obtenção de células em meiose via suspensão de protoplasto, foi realizada uma triagem prévia (Figuras 3C e 4). Para tal, botões florais de diferentes tamanhos foram coletados, identificados e acondicionados em frascos depositados em caixa contendo gelo. Rapidamente, os botões florais foram levados para o laboratório e dissecados em estereomicroscópio (BEL *Photonic*s SZT, Itália). Todas as anteras (4 anteras) do botão floral foram retiradas, cortadas e esmagadas em 1% de carmim acético sobre uma lâmina de microscópio. Após retirados os debrís e o excesso de corante, foi montado o conjunto lâmina/lamínula. Estas foram observadas sob campo claro em microscópio óptico (Olympus BX43, USA) para verificação da presença de fases da meiose (Figura 4).

Para obtenção de células em meiose através de suspensão de protoplasto foram removidas 100 anteras a partir dos botões florais selecionados. O comprimento destes foi mensurado entre 0,5 e 1,0 mm (Figura 3C e 3D). Todas as anteras foram fixadas em solução Carnoy. Após remoção do fixador, as anteras foram centrifugadas com água destilada a 2000 rpm por 10 min, a água foi vertida e as anteras secas ao ar por 10 min. Foram adicionados 200 µl de solução enzimática (2% de pectinase P4716-5KU SIGMA + 2% de celulase CELLULYSIN® Merck) e levadas ao aquecimento em banho-maria à 37°C por 3 horas e 30 minutos (Figura 4). Logo após, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 10 min e após a centrifugação, a solução enzimática foi vertida e, em seguida, foi acrescentado 200 µl de água destilada. As células foram ressuspensas e centrifugadas novamente a 2000 rpm por 10 min. A água foi vertida, sendo então adicionado 100 µl de Solução Carnoy para a fixação dos protoplastos obtidos.

Para a montagem das lâminas foram depositados 10 µl da suspensão de protoplasto e, após secagem ao ar, foi adicionada uma gota de carmim acético. Em seguida foi montado o conjunto lâmina/lamínula. A lâmina foi observada sob campo claro em microscópio óptico

(Olympus BX43, USA) (Figura 4).

As diferentes fases meióticas e a e a possível ocorrência de anormalidades na divisão celular foram analisadas. Imagens foram obtidas em câmera digital de alta resolução (Olympus Q-Color3, USA) (Figura 4). O número de cromossomos e o nível de ploidia da espécie em estudo foram também observados, bem como, o número de pares cromossômicos associados ao nucléolo. O índice de recombinação (IR), que estima a troca de genes durante a meiose, foi calculado de acordo com Darlington (1958), onde:

$IR = ([\sum n^{\circ} \text{ total de quiasmas} \div n^{\circ} \text{ de células analisadas}] + \text{valor de } n) \times 100$ , sendo  $n$  o número haploide. Para o cálculo do IR, foi contada a ocorrência de quiasmas do tipo anel (“ring”) e do tipo bastão (“rod”) em células em diplóteno. A configuração em bastão descreve a ocorrência de apenas um quiasma, enquanto que a configuração em anel, dois quiasmas.

## 2.4 Análise do Índice meiótico

Foram preparadas quatro lâminas por genótipo de cada um dos dois blocos. Em cada lâmina foram depositadas anteras de cinco botões em estágio previamente definido em triagem. As anteras foram cortadas e esmagadas em carmim acético a 1% e, após a montagem do conjunto lâmina/lamínula, foram observadas sob campo claro em microscópio óptico (Olympus BX43, USA) (Figura 4). Registrou-se o número de produtos pós-meióticos (mônades, díades, tríades, tétrades e políades). Imagens dos produtos pós-meióticos obtidos foram capturadas em câmera digital de alta resolução (Olympus Q-Color3, USA).

Em seguida, estimou-se o índice meiótico (IM) de acordo com Love (1951), conforme estimador abaixo:

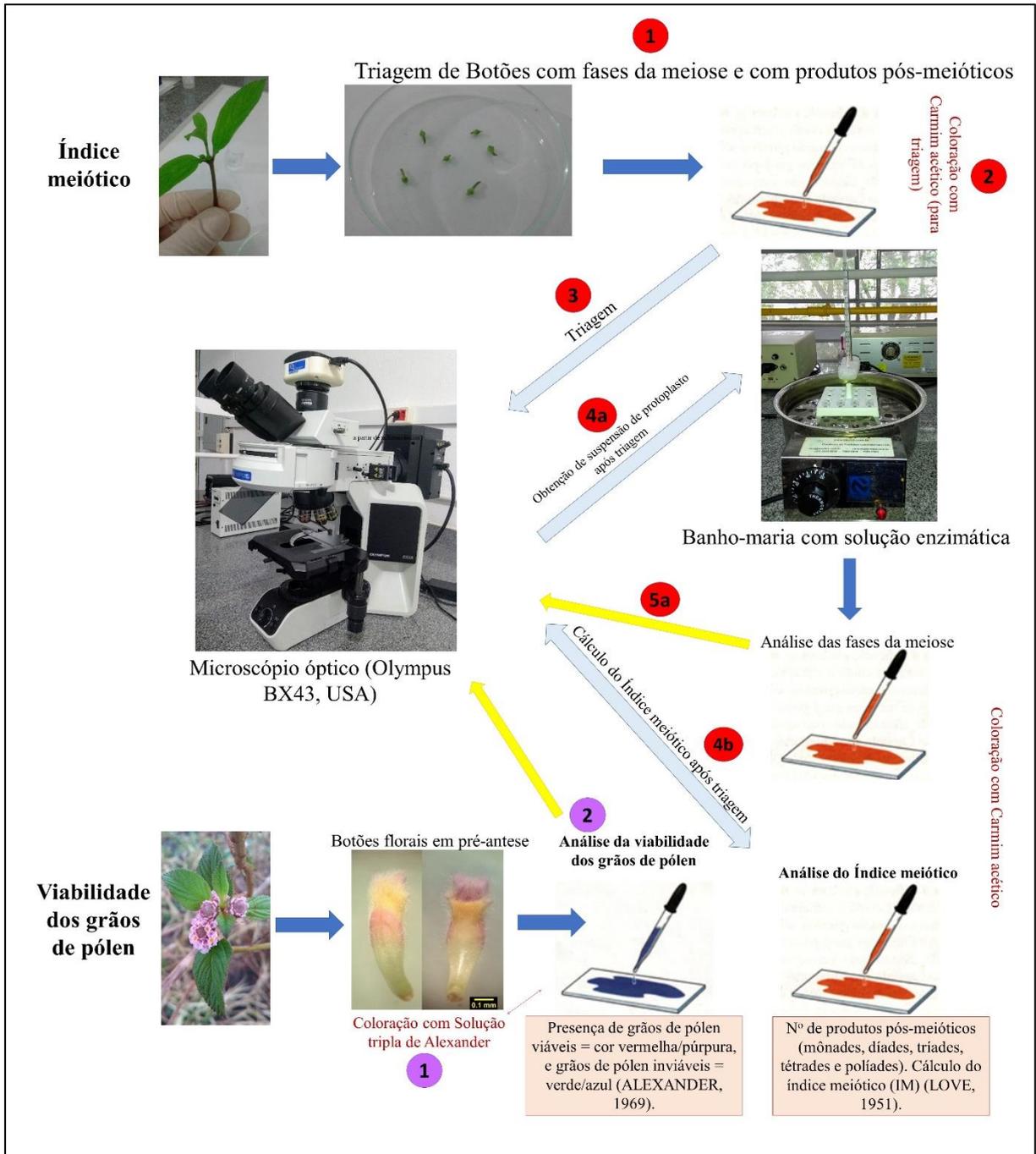
$$IM = \frac{\text{número de tétrades normais}}{\text{número de tétrades anormais}} \times 100$$

Os valores médios do IM foram submetidos a análise de variância, considerando cada lâmina como uma repetição, num total de quatro lâminas por genótipo em cada bloco.

## 2.5 Análise da viabilidade dos grãos de pólen

Foram preparadas quatro lâminas por genótipo considerando os dois blocos. Para a montagem das lâminas foram utilizadas anteras de dois botões florais em pré-antese por genótipo. As anteras foram removidas dos botões florais e hidratadas em água destilada por 1h (uma) hora. Após a remoção do excesso de água com papel filtro, as anteras foram cortadas e esmagadas em uma gota de solução tripla de Alexander (10 mL de etanol, 1 mL de verde malaquita a 1% em etanol a 95%, 50 mL de água destilada, 25 mL de glicerol, 5 gm de fenol, 5 gm de hidrato de cloral, 5 mL de fucsina ácida a 1% em água, 0,5 mL de *Orange G* a 1% em água e 4 mL ácido acético glacial) para a liberação dos grãos de pólen. Os debrís e o excesso de corante foram retirados com papel filtro e, após 1h (uma) hora, foi montado o conjunto lâmina/lamínula. As lâminas foram observadas sob campo claro em microscópio óptico (Olympus BX43, USA).

A presença de grãos de pólen viáveis/férteis foi detectada pela presença da cor vermelha ou púrpura, enquanto grãos de pólen inviáveis apresentaram coloração verde/azul (ALEXANDER, 1969) (Figura 4). Ao todo, 500 grãos de pólen foram contados por lâmina. Imagens dos grãos de pólen viáveis e inviáveis foram obtidas em câmera digital de alta resolução (Olympus Q-Color3, USA).



**Figura 4.** Protocolo para análise das fases da meiose, do índice meiótico e da viabilidade dos grãos de pólen sob microscopia de campo claro.

## 2.6 Análises estatísticas

Inicialmente as variáveis índice Meiótico (IM) e viabilidade dos grãos de pólen (VB) foram submetidas ao teste Lilliefors para verificação da normalidade. Em seguida, estas foram submetidas à análise da variância (ANOVA), com modelo fixo ajustado para o delineamento em blocos ao acaso, contendo 8 tratamentos (genótipos) e duas repetições (blocos).

Segue abaixo o modelo estatístico utilizado:

$$Y_{ijk} = \mu + b_k + g_i + e_{ijk}, \text{ onde:}$$

$Y_{ijk}$  = valor observado referente ao  $i$ -ésimo genótipo do  $j$ -ésimo nível (ambiente) na  $k$ -

ésimo repetição.

$\mu$  = constante geral;

$b_k$  = efeito da k-ésima repetição

$g_i$  = efeito fixo do i-ésimo genótipo;

$e_{ijk}$  = erro experimental associado à observação  $Y_{ijk}$ .

**Quadro 1.** Esquema da análise de variância do Índice Meiótico (IM) e da Viabilidade dos grãos de pólen (VB) de oito genótipos de erva-cidreira brasileira avaliados em Seropédica, RJ.

FV	GL	QM	F
Blocos (B)	b-1	QM <sub>b</sub>	
Genótipo (G)	g-1	QM <sub>g</sub>	QM <sub>g</sub> /QM <sub>r</sub>
Resíduo	(g-1)(b-1)	QM <sub>r</sub>	

A partir das estimativas obtidas na análise de variância foram estimados os seguintes parâmetros genéticos para cada uma das variáveis:

. Coeficiente de variação experimental:  $CV = (100\sqrt{\sigma^2})/\mu$

. Coeficiente de variação genotípico:  $CV_g = (100\sqrt{\sigma_g^2})/\mu$

. Coeficiente de determinação genotípico:  $H^2 = (QM_g - QM_r)/QM_g$

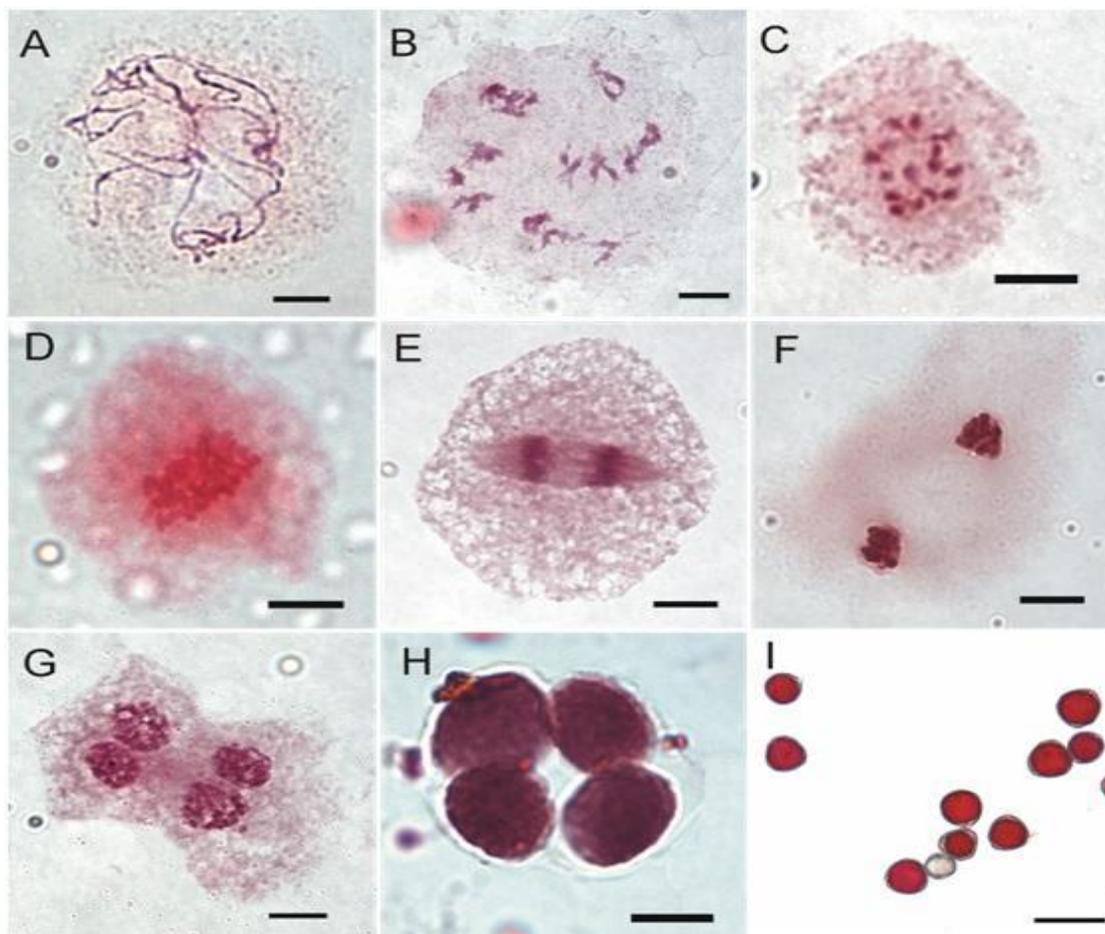
. Índice de variação genético:  $IV = CV_g/CV_e$

Todas as análises estatísticas foram realizadas no Programa GENES, versão 1990.2018.71 (CRUZ, 2007).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas análises do ciclo meiótico não foram observadas anormalidades na divisão celular dos genótipos de erva-cidreira brasileira estudados, visto que todos apresentaram células normais nas fases observadas. Mesmo diante destes resultados, não se descarta a presença de anormalidades no ciclo meiótico destes genótipos. Porém, deve-se mencionar que a sua ocorrência, possivelmente, ocorre em baixíssima frequência, talvez esse tenha sido o motivo de não se encontrar tais anomalias durante as análises aqui realizadas.

A Figura 5A mostra um paquíteno regular. Já a Figura 5B, evidencia e um diplóteno com regiões de quiasmas, onde é possível observar a presença de 1 (um) par cromossômico em bastão ('rod') e 14 em anel ('ring'). De acordo com Senda, Hiraoka e Tominaga, (2005), a ocorrência de cromossomos em bastões caracteriza a formação de apenas um quiasma, enquanto que a ocorrência de cromossomos em anéis, a formação de dois quiasmas. Foi possível observar ainda células em metáfase I (Figura 5D) e em anáfase I, (Figura 5E), regulares. Nas figuras 5F e 5G observam-se, respectivamente, telófases I e II normais. A figura 5H mostra uma tétrade normal na. Uma alta viabilidade dos grãos de pólen foi verificada. A figura 5I mostra evidencia tal tendência, cuja predominância é de grãos de pólen viáveis (de coloração vermelha), em comparação a quantidade de grãos de pólen inviáveis (verde/azul), observada através do teste de coloração com a solução tripla de Alexander.



**Figura 5.** Meiose em erva-cidreira brasileira. (A) Paquíteno; (B) Diplóteno com regiões de quiasmas e 15II; (C) 15II em diacinese; (D) Metáfase I regular; (E) Anáfase I regular (F) Telófase I; (G) Telófase II; (H) Tétrade aparentemente normal e (I) Grãos de pólen viáveis (vermelho) e inviável (verde/azul). Barra de escala A-G = 10 $\mu$ , H= 25  $\mu$  e I = 50  $\mu$ .

O índice de recombinação foi estimado em 44,33%. Esta estimativa reflete um alto grau de pareamento cromossômico. A figura 5B evidencia a alta frequência de quiasmas formados. Os quiasmas indicam homologia cromossômica ou, no mínimo, homologia em algumas regiões entre os cromossomos homólogos (NIKOLOVA e NIEMIROWICZ-SZCZYTT, 1995). Assim sendo, é possível inferir que genótipos de erva-cidreira brasileira, quimiótipo citral, tendem a manter uma alta frequência de pareamentos cromossômicos regulares. Esta regularidade pode ter sido uma das causas de se encontrar uma baixa frequência de irregularidades ou anomalias durante o ciclo meiótico analisado. Souza e Pereira (2011) estimaram o índice de recombinação em *Passiflora alata* em 17,6. Esses autores relataram um alto percentual de cromossomos retardatários durante a meiose. Através do índice de recombinação é possível estimar a frequência de recombinações ocorridas. Estas estimativas são de grande importância para o melhoramento genético, visto que, é durante o processo de permuta (recombinação) que ocorre a troca de alelos, e, conseqüentemente, a geração de variabilidade. Reis, Sousa e Viccini (2016) descreveram em seu estudo um alto índice de irregularidades para um acesso tetraploide de erva-cidreira brasileira durante a meiose, com destacada presença de citomixia, bem como a presença de grãos de pólen inviáveis e com tamanho heterogêneo. Na pesquisa citada o quimiótipo não foi mencionado.

Com base nas análises realizadas, foi possível concluir que os genótipos analisados

foram diploides com  $2n = 2x = 30$  cromossomos. A Figura 5B mostra 15 bivalentes durante o diplóteno e a Figura 5C, 15 bivalentes em células em diacinese. Estes resultados corroboram com os resultados encontrados por Brandão, Viccini e Recco-Pimentel (2005), Brandão *et al.* (2007) e Souza *et al.* (2009).

Ao contrário do observado para o quimiótipo citral, observa-se uma certa instabilidade dentro de outros quimiótipos de erva-cidreira brasileira, como relatado por Pierre *et al.* (2011), que além de observar diferentes números de cromossomos dentro da espécie, que variou de acordo com o quimiótipo, sendo de  $2n=30$  para o quimiótipo citral,  $2n=60$  para o quimiótipo carvona, observaram ainda a presença de indivíduos mixoploides para o quimiótipo linalol, onde todos os indivíduos analisados para este quimiótipo apresentaram o intervalo de números de cromossomos de  $2n = 12-60$  cromossomos, em células diferentes do mesmo indivíduo. Reis *et al.* (2014) e Sousa, Torres e Viccini (2012) também descreveram números cromossômicos distintos para diferentes acessos de erva-cidreira brasileira, em suas pesquisas.

Em relação ao índice meiótico (IM) e viabilidade dos grãos de pólen (VB) observou-se diferenças estatísticas significativas para a fonte de variação genótipo pelo Teste F, aos níveis de 1 e a 5% de probabilidade. De forma geral, tanto as estimativas IM quanto VB são consideradas altas, respectivamente de 94,48 e 94,32% (Tabela 2). De acordo com Love (1951), estimativas altas do índice meiótico, indicam estabilidade reprodutiva, no caso, masculina. Vale mencionar que a alta viabilidade dos grãos de pólen aqui encontrada, possivelmente é decorrente da formação regular dos produtos pós-meióticos. Por sua vez, a regularidade na formação destes produtos, possivelmente, é decorrente também de um ciclo meiótico regular. Assim sendo, as estimativas do índice meiótico e da viabilidade dos grãos de pólen aqui obtidas, corroboram com os resultados anteriormente citados, em que se supõe a ocorrência de baixa frequência de anomalias durante o ciclo meiótico dos genótipos de erva-cidreira brasileira analisados. De acordo com Damasceno Junior *et al.* (2009), a fertilidade de uma espécie é resultado da formação de gametas normais, balanceados e conseqüentemente viáveis.

O IM apresentou elevado coeficiente de determinação genotípico ( $H^2 = 91,50\%$ ) (Tabela 2). Isso indica que os efeitos genotípicos sobre essa variável prevalecem sobre os efeitos de ambiente. Resultados semelhantes, foram também obtidos para VB, que alcançou uma estimativa de 76,77% para  $H^2$ . Estes resultados também demonstraram um maior efeito genético sobre esta característica (Tabela 2). As estimativas de  $H^2$  para o IM e para o VB, apontam para a manutenção (ou até possibilidades de aumento) da capacidade de fertilidade masculina nas progênies a serem obtidas a partir dos genótipos analisados.

Conhecer as estimativas do coeficiente de determinação genotípico é fundamental para o sucesso no processo de seleção de plantas. Através deste coeficiente é possível inferir sobre o potencial que determinado indivíduo ou genótipo tem, de transferir, à sua descendência, do caráter em estudo. As estimativas dos índices de variação genético (IV) para o índice meiótico (IM) e para a viabilidade dos grãos de pólen (VB) sugerem que há variabilidade genética entre os genótipos de erva-cidreira brasileira analisados. Os índices foram estimados em 2,32 e 1,29, respectivamente. Valores de IV próximos a zero indicam baixa variabilidade genética.

Aliado ao controle genético favorável, dado pelas altas estimativas de  $H^2$  e altos IV's, os genótipos de erva-cidreira brasileira analisados apresentam características interessantes para serem utilizados em um programa de melhoramento genético da espécie quando se pretende a manutenção ou o aumento da fertilidade masculina nas progênies selecionadas. Vale mencionar que, além da estabilidade reprodutiva, tais genótipos, para serem incorporados em programas de melhoramento genético, precisam ser providos também de caracteres de interesse agrônomo, como por exemplo: alta produção de biomassa de folhas e alta qualidade de óleo essencial (estabilidade do quimiótipo e alto rendimento de óleo essencial).

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância em blocos ao acaso e Estimativas de parâmetros genéticos das características Índice meiótico (IM) e Viabilidade dos grãos de pólen (VB) em

genótipos de erva-cidreira brasileira, pertencentes à Coleção de germoplasma do Departamento de Fitotecnia (DFito) UFRRJ, localizada em Seropédica, RJ.

FV	GL	QM	
		IM	VB
<b>Bloco</b>	1	37,0530	0,6865
<b>Genótipo</b>	7	3,4877 **	34,1170 *
<b>Resíduo</b>	7	0,2963	7,9245
<b>Média</b>		94,48	94,32
<b>Máximo</b>		97,63	97,90
<b>Mínimo</b>		90,23	81,94
<i>CV</i> (%)		0,58	2,98
<i>CV<sub>g</sub></i> (%)		1,34	3,84
<i>IV</i> (%)		2,32	1,29
<i>S<sup>2</sup> genética</i>		1,5957	13,0963
<i>S<sup>2</sup> ambiental</i>		0,2963	7,9245
<i>H<sup>2</sup></i> (%)		91,50	76,77

\*\* e \* significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; CV% = Coeficiente de variação experimental; CV<sub>g</sub>(%) = Coeficiente de variação genotípico; IV = Índice de variação genético; S<sup>2</sup> genética = variância genética; S<sup>2</sup> ambiental = variância ambiental; H<sup>2</sup>(%) = Coeficiente de determinação genotípico.

Apesar das médias gerais terem sido altas para o índice meiótico (IM) e para a viabilidade dos grãos de pólen (VB), e que apontam para a existência de estabilidade reprodutiva nos genótipos citral analisados, a verificação e análise das médias individuais de IM e VB destes genótipos são ainda necessárias. Observa-se na Tabela 3 que o genótipo UFRRJ ECB002 (91,86%) apesar de apresentar a menor média do índice meiótico (IM), foi estatisticamente igual aos genótipos UFRRJ ECB001 (93,63%) e UFRRJ ECB005 (93,75%). Em relação à viabilidade dos grãos de pólen (VB), o genótipo UFRRJ ECB015 apresentou a menor média, de 85,85%, porém, diferiu estatisticamente apenas do genótipo com maior média, o UFRRJ ECB005 (Tabela 3).

**Tabela 3** Teste de médias para as variáveis Índice meiótico (IM) e Viabilidade de grãos de pólen (VB) de 8 genótipos de erva-cidreira brasileira avaliadas em Seropédica, RJ

Genótipo	IM (%)	VB (%)
UFRRJ ECB001	93,63ab	97,31ab
UFRRJ ECB002	91,86b	96,31ab
UFRRJ ECB005	93,75ab	97,61a
UFRRJ ECB011	94,85a	96,34ab
UFRRJ ECB015	95,45a	85,85b
UFRRJ ECB018	95,49a	93,27ab
UFRRJ ECB019	94,99a	97,00ab
UFRRJ ECB020	95,79a	90,91ab
Médias	94,48	94,33

Médias nas colunas seguidas da mesma letra não diferiram estaticamente ao nível 5% pelo teste Tukey.

Os valores observados para ambas as variáveis e para todos os genótipos podem ser considerados altos, corroborando com uma baixa ocorrência de anormalidades durante a meiose e por esta razão não sendo estas observadas nas imagens obtidas, o que resultou em uma alta viabilidade dos grãos de pólen. Anormalidades meióticas, poliploidia e mixoploidia acarretam em baixa viabilidade do grão de pólen, e quando são envolvidos em cruzamentos levam à baixa produção de sementes, uma vez que podem induzir a produção de gametas desbalanceados.

Com base nos resultados obtidos conclui-se que há uma alta estabilidade com relação a fertilidade dos gametas masculinos (grãos de pólen) dentro dos genótipos pertencentes ao quimiótipo citral. Visto que todos os genótipos de erva-cidreira brasileira, quimiótipo citral, analisados apresentaram altos índices meióticos e alta viabilidade de seus grãos de pólen.

Diante dos resultados aqui apresentados, é possível concluir que os oito genótipos de erva-cidreira brasileira, quimiótipo citral, aqui estudados, apresentam uma ótima estabilidade reprodutiva, verificada pela alta fertilidade de seus gametas masculinos. As informações aqui obtidas podem ser utilizadas como importantes ferramentas como base para a adoção de estratégias de seleção em programas de melhoramento genético da espécie.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, Vol. 27, n. 1, p. 617-631, 2008.

AGHAEI, M.; DARVISHZADEH, R.; HASSANI, A. Molecular characterization and similarity relationships among Iranian basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 312-320, abr-jun, 2012.

AGUIAR, C. Botânica para Ciências Agrárias e do Ambiente. Volume II Reprodução e evolução. Instituto Politécnico de Bragança, 2013.

ALEXANDER M. P. - Differential staining of aborted and no aborted pollen. **Stain Technology**, Vol. 44, p. 117-122, 1969.

ALLARD, R. W. Princípios do melhoramento genético em plantas. São Paulo: Ed. Blucher, 381p. 1977.

ALVES, M. C. S. *et al.* Allelopathic effect of essential oils of medicinal plants in *Bidens pilosa* L. **Rev. Bras. Pl. Med.** Vol.16, n.3, supl. I, p.731-736, 2014.

AMORIM, J. S. A. *et al.* Self-, cross- and interspecific pollinations in *Passiflora capsularis* and *P. rubra*. **Rev. bras. Bot.** Vol.34, n.4, 2011.

ANVISA. Brasil. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 1ª edição/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2011. 126p.

ANVISA. Brasil. Memento Fitoterápico - Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2016. 115p.

ANVISA. Brasil. Farmacopeia Brasileira. 5ª edição. Segundo Suplemento. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2017. 1016p.

APROTOSOAIÉ, A. C. *et al.* Antigenotoxic Potential of Some Dietary Non-phenolic Phytochemicals. p. 223-297. In: RAHMAN, A. Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier. Vol. 60, 522p. 2018.

Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos – ABIHPEC. Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Resultados 2017. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2018/>>. Consultado em 12/02/2019.

ATKINS, S. Verbenaceae. Pp. 449-468. In: K. Kubtzki; J.W. Kadereit (eds.). The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. 7. Berlin, Springer-Verlag. 2004.

BARACUHY, J. G. V. *et al.* Plantas Medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil. 2ª edição Revisada, Campina Grande, PB, EDUEFCG, 2016.

BERED, F.; NETO, J. F. B.; CARVALHO, F. I. F. de. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**. Vol. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

BICCHI, C. and JOULAIN, D. Techniques for preparing essential oils and aromatic extracts. **Flavour Fragr J**. Vol. 33, p. 133–134. 2018.

BLANK, A. F. *et al.* Chemical Diversity in *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Germplasm. **The Scientific World Journal**. Vol. 15, 11 pages, 2015.

BOTTIGNON, M. R. *et al.* Heterogeneity of linalool chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., based on clonal half-sib progenies. **Sci. Agric.**, Vol. 68, n. 4, p. 447-453, 2011.

BRAMBATTI, A. *et al.* Estabilidade genética em triticale estimada pela viabilidade polínica. **Arq. Inst. Biol.**, Vol.83, p. 1-7, 2016.

BRAMMER, S. P. A Citogenética e o Melhoramento de Plantas (2008). Grupo cultivar. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/noticias/artigo-a-citogenetica-e-o-melhoramento-de-plantas>.

BRANDÃO, A. D., VICCINI, L. V., RECCO-PIMENTEL, S. M. Meiotic analysis of two putative polyploidy species of Verbenaceae from Brazil. **CARYOLOGIA** Vol. 58, no. 4, p. 315-319, 2005.

BRANDÃO, A. D. *et al.* Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **J Plant Res**. Vol. 120, p. 317–321, 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Registro nacional de cultivares –RNC. Disponível em: [http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares\\_registradas.php](http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php) Consultado em: 10-01-2020.

BREWBAKER, J.L. Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. **The Journal of Heredity**, Vol.48, p. 271-277, 1957.

BRITO, D. I. V. *et al.* Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, Vol.17, n.4, supl. II, p. 836-844, 2015.

BRITTON; WILSON. *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson. **Sci. Surv. Porto Rico & Virgin Islands**. Vol. 6, n. 141, 1925.

CAMPOS, J.M.S. *et al.* Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Syst Evol**, Vol. 291, p. 133–140, 2011.

CARVALHO, D. F. *et al.* Avaliação da evapotranspiração de referência na região de Seropédica-RJ, utilizando lisímetro de pesagem. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Vol. 14, n. 2, p. 108-116, 2006.

CID-PÉREZ, T. S. *et al.* Antioxidant and Antimicrobial Activity of Mexican Oregano (*Poliomintha longiflora*) Essential Oil, Hydrosol and Extracts from Waste Solid Residues. **Plants**. Vol. 8, n. 22, p. 1-13, 2019.

CLARKE, S. Composition of essential oils and other materials. In: *Essential Chemistry for Aromatherapy*, 2 ed., p.123–229, 2008.

CHEN, M. *et al.* Action of six pyrethrins purified from the botanical insecticide pyrethrum on cockroach sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Vol. 151, p. 82-89, 2018.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B.; Gruissem, W.; Jones, R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Second Edition. Eds.© 2000, American Society of Plant Physiologist. 1280 Pages, August 2015.

CRUDEN, R. W. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**. Vol. 31, p.32-46. March. 1977.

CRUZ, C. D. (2007). Programa Genes, versão 2018. Universidade Federal de Viçosa, MG.

CSEKE, L. J.; KAUFMAN, P. B.; KIRAKOSYAN, A. The Biology of Essential Oils in the Pollination of Flowers. **Natural Product Communications**. Vol. 2, n.12, p. 1317 – 1336, 2007.

DAMASCENO JUNIOR, P. C. *et al.* Preferential reproduction mode of hermaphrodite papaya plant (*Carica papaya* L; *Caricaceae*). *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 1, p. 182-189, 2009.

DAMASCENO JUNIOR, P. C. *et al.* Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. **CARYOLOGIA**, Vol. 63, no. 3: 229-236, 2010.

DARLINGTON C. D., 1958 - *Evolution of genetic systems*. London: Oliver and Boyd.

DE NETTANCOURT, D. Incompatibility in angiosperms. **Sexual Plant Reproduction**, Vol.10, p.185-199, 1997.

EBANI, V. V. *et al.* Chemical Composition and *In Vitro* Antimicrobial Efficacy of Sixteen Essential Oils against *Escherichia coli* and *Aspergillus fumigatus* Isolated from Poultry. **Vet. Sci.**, Vol. 5, n. 62. P. 1-13, 2018.

EDLUND; SWANSON; PREUSS. Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. **The Plant Cell**. Vol. 16, S84–S97, Supplement 2004.

EL SAWI, S. A. *et al.* Allelopathic potential of essential oils isolated from peels of three citrus Species. **Annals of Agricultural Sciences**. Vol. 64, p.89–94, 2019.

FANG, C., FERNIE, A., LUO, J. Exploring the Diversity of Plant Metabolism. *Trends in Plant Science*, Vol. 24, No. 1, January 2019.

FARAONE, N; HILLIER, N. K.; CUTLER, G. C. Plant Essential Oils Synergize and Antagonize Toxicity of Different Conventional Insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **PLoS ONE**. Vol. 10, n. 5, p. 1-12, 2015.

FARHAT, M. B. *et al.* Variations in Essential Oil, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of Tunisian Cultivated *Salvia officinalis* L.J. **Agric. Food Chem**. Vol. 57, p. 10349–10356, 2009.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, p. 220, 1998.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 9, 1829, 2010.

GANJEWALA, D.; LUTHRA, R. Essential Oil Biosynthesis and Regulation in the Genus *Cymbopogon*. **Natural Product Communications**. Vol. 5, n.1, p. 163-172, 2010.

GARCEZ, T. D. **Plano Financeiro para a Produção de Biomassa a partir de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) Genótipo UFRRJ ECB005 quimiótipo citral**. 2019. 61 f. Dissertação de Mestrado (Programa de pós-graduação em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. Maio – 2019.

GASPARINO, E. C.; CRUZ-BARROS, M. A. V. Palinologia. Instituto de Botânica – IBt. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente Curso de Capacitação de monitores e educadores. São Paulo, outubro de 2006.

GOMES, J. G. **Descritores morfoagronômicos, diversidade genética e produção de óleo essencial em erva-cidreira-brasileira**. (Tese de Doutorado). Seropédica, RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de pós-graduação em Fitotecnia. Setembro – 2017.

GREEN, B. T. *et al.* The effect of alkaloid composition of larkspur (*Delphinium*) species on the intoxication of Angus heifers. **Journal of Animal Science**, 17 February 2019.

GUERRA, M. Introdução a citogenética geral; Rio de Janeiro. **Editora Guanabara Koogan**, 154p. 1988.

GUPTA, A. K.; GANJEWALA, D. A study on biosynthesis of “citral” in lemongrass (*C. flexuosus*) cv. Suvarna. **Acta Physiol Plant**, Vol. 37, n.240, p. 1-8, 2015.

GUSHIKEN, L. F. S. *et al.* Skin Wound Healing Potential and Mechanisms of the Hydroalcoholic Extract of Leaves and Oleoresin of *Copaifera langsdorffii* Desf. Kuntze in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Vol. 2017, 16 pages, 2017.

HA, J. H. *et al.* Anti-Aging Activity of *Lavandula angustifolia* Extract Fermented with *Pediococcus pentosaceus* DK1 Isolated from *Diospyros kaki* Fruit in UVB-Irradiated Human Skin Fibroblasts and Analysis of Principal Components. **J. Microbiol. Biotechnol**, Vol. 29, n. 1, p. 21–29, 2019.

HALLAUER A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1988.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary Products from plants. In: WALTON, N. J. and BROWN, D. E. Chemicals from Plants Perspectives on Plant Secondary Products. Imperial College Press. World Scientific. Pages: 436, 1999.

HEKMATPOU, D. *et al.* The Effect of *Aloe Vera* Clinical Trials on Prevention and Healing of Skin Wound: A Systematic Review. **Iran J Med Sci January**, Vol. 44, n. 1, 2019.

HELDWEIN, C. G. *et al.* S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, Vol. 41, 621–629, 2014.

HENNEBELLE, J.; *et al.* Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol.116, p. 211–222, 2008.

HESLOP-HARRISON, J. Self-incompatibility: phenomenology and physiology. **Proceedings of the Royal Society of London B**, Vol.218, p.371-395, 1983.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 97, n. 7, p. 1027-1031, October 2002.

IAC, Instituto Agronômico de Campinas. Página na internet. IAC Notícias. Disponível em <http://www.iac.sp.gov.br/noticiasdetalhes.php?pag=1&ano=2011&id=739>. Acesso em: 24 de junho de 2016.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesAutomaticas>. Acesso em: 02/10/2017.

ISO - International Organization for Standardization. 9235:1997. Aromatic natural raw materials — Vocabulary. Edition 1, 8 p. Disponível em < <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-1:v1:en>> Acessado em 18-01-2020.

JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of functional foods**, Vol. 2, p. 196-209, 2010.

KLEIN, T. *et al.* Fitoterápicos: um mercado promissor. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**; Vol. 30, n.3, p: 241-248, 2009.

KARASAWA, M. M.G. Diversidade Reprodutiva de Plantas. Uma Perspectiva Evolutiva e Bases Genéticas. Editora SBG. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP. 2009.

KERBAUY, G. B. Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004.470p.

KING, R. C.; STANSFIELD, W. D.; MULLIGAN, P. K. A Dictionary of Genetics. Oxford. New York, 609 p. 2006.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of Marker-Assisted Selection in the Improvement of Quantitative Traits. **Genetics**. Vol. 124, n. 3, p. 743-56, 1990.

LOPES, F. P. **Desenvolvimento da antera e do grão de pólen em espécies de *Mapania* Aubl. (Mapanioideae, Cyperaceae)**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal). Rio Claro, SP. Março – 2016.

LÓPEZ, C. *et al.* Riquezas da Floresta: Frutas, Plantas Medicinais e Artesanato na América Latina. CIFOR / DFID / EC / Overbrook Foundation. Indonésia. Tradução de Alfredo Celso Fantini. 154p. 2008

LOUCHARD, B. de O; ARAÚJO, T. G. Pharmacological effects of different chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas**. Vol.18, n.2, p. 95 – 105, 2019.

LOVE R. M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**, Vol. 43, p. 72-76, 1951.

MACÍAS, F. A.; MEJÍAS, F. J. R.; MOLINILLO, J. M. G. Recent advances in allelopathy for weed control. From knowledge to applications. **Pest Management Science**. Vol. 25 January 2019.

MACHADO, B. F. M. T; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cad. acad.**, Tubarão, Vol. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MANEESAI, P. *et al.* Effect of asiatic acid on the Ang II-AT1R-NADPH oxidase-NF- $\kappa$  B pathway in renovascular hypertensive rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, Vol. 390, Issue 10, p. 1073–1083, 2017.

MATOS, F. J. de A. *et al.* Essential Oil Composition of Two Chemotypes of *Lippia alba* Grown in Northeast Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, Vol. 8, p. 695-698, 1996.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. “Anatomy of the Dicotyledons”, 2nd ed, vol II, “Wood Structure and Conclusion of the General Introduction”. Clarendon Press, Oxford. 1983.

MIRODDI, M. *et al.* *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 150, p. 791–804, 2013.

MONDINI, L., NOORANI, A., A. PAGNOTTA, M. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. **Diversity**, Vol. 1, p. 19-35, 2009.

- MUÑOZ M., A. M; VALLEJO C., F. A. SÁNCHEZ O., M. S. Morphology and anatomy of flowers and seed of *Lippia alba*. **Acta Agron** (COLOMBIA) Vol.56, n.1, p 7-11, 2007.
- NAMDEO, A. G. Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants. In: MANDAL, S.G; MANDAL, V.; KONISHI, T. Natural Products and Drug Discovery An Integrated Approach. Elsevier, Netherlands. 749p. 2018.
- NICULAU, E dos S. *et al.* Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* l'Herit E *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 9, p. 1391-1394, 2013.
- NIKOLOVA, V; NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K. Evaluation of meiosis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) mono haploids. **CARYOLOGIA**. Vol. 48, n. 3-4: p. 275-283, 1995
- OLIVEIRA, M. A. C. *et al.* *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. **Braz. Oral Res.** Vol. 31, 2017.
- OLIVEIRA, I. *et al.* Morphological, mechanical and antioxidant properties of Portuguese almond cultivars. **J Food Sci Technol**. Vol. 55, n. 2, p. 467–478, 2018.
- PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, Vol. 23, n. 4, p. 997-1002, 2000.
- PASCUAL, M. E. *et al.* *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 76, p. 201–214, 2001.
- PASQUA, C. S. P. D. *et al.* Pharmacological Study of Anti-inflammatory Activity of Aqueous Extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *Mikania laevigata* (Sch. Bip. ex Baker). **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 231, n.1, p. 50-56, March 2019.
- PAVARINI, D. P. *et al.* Substâncias voláteis: técnicas de extrações das clássicas às avançadas. In: SOUZA, G. H. B; MELLO, J. C. P; LOPES, N. P. Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais. Editora UFOP. Ouro Preto. 2012.
- PERES, L. E. P. Metabolismo secundário das plantas. 2015. Disponível em: <http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/#fenolicos> consulta em junho, 2016.
- PIERRE, P. M. O. *et al.* Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). **An Acad. Bra. Ciênc.** Vol. 83, n.3, 2011.
- POOLER, R.M. *et al.* Molecular Markers Used to Verify Interspecific Hybridization between HemLock (*Tsuga*) Species. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** Vol. 127, n.4, p. 623-627. 2002.
- PORFÍRIO, E. M. *et al.* In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activity of *Lippia alba* Essential Oil, Citral, and Carvone against *Staphylococcus aureus*. **The Scientific World Journal**. Vol. 2017, 7 pages, 2017.

PubChem. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Bethesda, MD, USA. 2020. Consultado em 10-06-2020. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=Citral&page=1>>

QUEIROZ, M. R. A. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia organoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, Vol.16, n.3, supl. I, p.737-743, 2014.

RAMOS, D. P.; CASTRO, A. F.; CAMARGO, M. N. Levantamento detalhado de solos da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia, Brasília, Vol. 8, n. 1, p. 1-27, 1973.

RAVEN. Biologia vegetal / Ray F. Evert e Susan E. Eichhorn; revisão técnica Jane Elizabeth Kraus; tradução Ana Claudia M. Vieira *et al.* – 8. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

REIS, A. C. *et al.* *Lippia alba* (Verbenaceae): a new tropical autopolyploid complex? **American Journal of Botany**. Vol. 101, n. 6, p. 1002–1012. 2014.

REIS, A. C.; SOUSA, S. M.; VICCINI, L. F. High frequency of cytomixis observed at zygotene in tetraploid *Lippia alba*. **Plant Syst Evol**. Vol. 302, p.121–127, 2016.

RUFINO, E. R. **Estimativas de parâmetros genéticos e seleção de clones linalol em *Lippia alba***. (Dissertação de Mestrado). Campinas, SP. Instituto Agrônomo de Campinas. Curso de pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical. 2008.

RUFINO, E. R. *et al.* Estimativas de parâmetros genéticos de caracteres relacionados ao vigor de estacas em *Lippia alba*. **Bragantia**, Campinas, Vol. 69, n. 4, p.779-785, 2010.

RUFINO, E. R. *et al.* Selection of new clones of linalool chemotype from genetic recombination in *Lippia alba*. **Bragantia**, Vol. 71, n. 2, p.155-164, 2012.

SALIMENA, F. R. G. *Lippia*. In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15171>>. Acesso em: 27 mai. 2020.

SALIMENA, F. R. G; MÚLGURA, M. E. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. **Rodriguésia** Vol.66, n.1, p. 191-197. 2015.

SALIMENA, F. R. G.; MÚLGURA, M. 2015. *Lippia*. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15170>> Acesso em 24 junho 2016.

SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in the southeaster United States. **Havard papers in Botany**, Vol. 5, N.2, pp303-358, 2001.

SANGWAN, N.S. *et al.* Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Vol. 34, p. 3-21, 2001.

SANTOS, A. S. *et al.* Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. Embrapa. Comunicado técnico 99. 2004. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27902/1/com.tec.99.pdf>. Consultado em: 29/01/2020.

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

SANTOS, D. Polinização e fecundação nas espermatófitas. Blog do Prof. Djalma Santos Educação, Biologia e afins. 28 de novembro de 2010. Disponível em: <<https://djalmasantos.wordpress.com/2010/11/28/polinizacao-e-fecundacao-nas-espermatofitas/>> Acesso em: Julho/2016.

SANTOS, A. G. *et al.* Fitocosméticos. In: SOUZA, G. H. B; MELLO, J. C. P; LOPES, N. P. Farmacognosia Coletânea Científica. Editora UFOP. Ouro Preto. 2012.

SANTOS, R. P. Embriologia Vegetal: Esporogênese e gametogênese nas plantas com flores. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/napead/repositorio/objetos/embriologia-vegetal/mega4.php> Acesso em: Julho/2016.

SENDA, T.; HIRAOKA, Y; TOMINAGA, T. Cytological affinities and interfertilities between *Lolium temulentum* and *L. persicum* (Poaceae) accessions. **Hereditas**. Vol. 142, p. 45-50, 2005.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.897-902, 2001.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T; D'ALL AGNOL, M. Autoincompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.6, p.1083-1090, 2002.

SCHOCKEN, N. R. L. **Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (MILL) N.E. Brown**. 2007. 96 f. Dissertação (Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) - Instituto Agronômico de Campinas. Campinas, SP, 2007.

SIANI, A.C.; *et al.* Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Vol. 33, p 38-43, 2004.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. *et al.* Central nervous system and analgesic profiles of *Lippia* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Article in press. 2018.

SILVA, *et al.* Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, Vol.8, n.3, p.52-55, 2006.

SILVA, C. T. S. *et al.* Effects of citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) midgut and fat body. **Biotechnic & Histochemistry**, Vol. 93, n.1, p. 36–48, 2017.

SILVA, R. E. R. *et al.* Vasorelaxant effect of the *Lippia alba* essential oil and its major constituent, citral, on the contractility of isolated rat aorta. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 108, p.792–798, 2018.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O et al. (Org.). Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, 502 p., 2017.

SINGH, R. J. 2002. Plant Cytogenetics. 2nd Ed. **CRC Press**, Boca Raton.

SOKOVIĆ, M. *et al.* Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an *In Vitro* Model. **Molecules**, Vol. 15, p. 7532-7546, 2010.

SOARES, C. H. N. **Introdução e seleção de genótipos de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) com base na produção, estabilidade e qualidade do óleo essencial avaliados em duas épocas do ano em Seropédica, RJ.** 2017. 69 f. Dissertação de Mestrado (Programa de pós-graduação em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. Março – 2017.

SOARES, C. H. N. *et al.* Selection of genotypes (citral chemotype) of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown regarding seasonal stability of the essential oils chemical profile. **Industrial Crops & Products**. Vol. 139, 111497, 2019.

SOUSA, M. S. *et al.* Chromosome banding and essential oils composition of Brazilian accessions of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Biologia**. Vol. 64, n. 4, p. 711—715, 2009.

SOUSA, S. M.; TORRES, G.A.; VICCINI, L. F. 2012. Karyological studies in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 84, n. 4, p. 1029-1037, 2012.

SOUSA, D. G. *et al.* Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Braz J Med Biol Res**. Vol. 48, n. 8, 2015.

SOUZA, M. A. A. de. **Expressão Gênica Relacionada à Produção de Óleo Essencial e Avaliação do metabolismo de *Mentha arvensis* L. Sob Diferentes Condições de Cultivo.** Seropédica, RJ. (Tese de Doutorado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em química/ Química agrária. 2010.

SOUZA Jr. Cultivar development of allogamous crops. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** S1: 8-15, 2011.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S. Meiotic behavior in wild and domesticated species of *Passiflora*. **Revista Brasil. Bot.**, Vol.34, n.1, p.63-72, 2011.

SOUZA, R. C. *et al.* Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysiatriphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. **Microbial Pathogenesis**. Vol. 113, p. 29–33, 2017.

STANSFIELD, W. D. 1930. Genética: resumo da teoria, 500 problemas resolvidos; Tradução de Orlando Águeda, revisão técnica de Mary Nobuko Shiotsuky. São Paulo, **McGraw-Hill do Brasil**, 1974, 1977 reimpressão. 373 p.

STRATAKOS, A. Ch; KOIDIS, A. Methods for Extracting Essential Oils. In: Preedy, V. R. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, Academic Press, Pages 31-38, 2016.

TANKSLEY, S, D.; NELSON, J. C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. **Theor Appl Genet**. Vol. 92, p. 191-203, 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal, tradução: Eliane Santarém *et al.*– 3. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAIZ, L. *et al.* Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal. Artmed, 6ª ed. Porto Alegre-RS, 888 p. 2017.

TAREAU, M. A.; PALISSE, M.; ODONNE, G. As vivid as a weed... Medicinal and cosmetic plant uses amongst the urban youth in French Guiana. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 203, p. 200–213, 2017.

TAVARES, E. S. *et al.* Análise do óleo essencial de folhas de três quimiótipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.** Vol. 15, n.1, p. 1-5, 2005.

TOMAZONI, E. Z. *et al.* *In vitro* antifungal activity of four chemotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils against *Alternaria solani* (Pleosporaceae) isolates. **An Acad Bras Cienc**, Vol.8, n. 2, p. 999-1010, 2016.

TURCHETTO, C. *et al.* Marcadores genéticos baseados em DNA. In: Turchetto-Zolet *et al.* Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 181 p, 2017.

TURCHETTO-ZOLET, *et al.* Polimorfismo de Nucleotídeo único (SNP): metodologias de identificação, análise e aplicações. In: Turchetto-Zolet *et al.* Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 181 p, 2017.

VALERIANO, C. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, Vol.14, n.1, p.57-67, 2012.

VELOSO, R. A. *et al.* Composição e fungitoxicidade do óleo essencial de capim citronela em função da adubação orgânica. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, Vol.47, n.12, p.1707-1713, 2012.

VENANCIO, D. F. A. *et al.* F. Flower-Visiting Insects and Phenology of *Lippia alba* (Lamiales: Verbenaceae): Floral Color Changes and Environmental Conditions as Cues for Pollinators. **Environmental Entomology**, Vol. 45, n. 3, p. 1–9, 2016.

VERMA, R. S. *et al.* Chemical composition and antibacterial, antifungal, allelopathic and acetylcholinesterase inhibitory activities of cassumunar-ginger. **J Sci Food Agric**, Vol. 98, p. 321–327, 2018.

VICCINI, L. F. *et al.* Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products**. Vol.59, p. 14–19, 2014.

VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; SALIMENA, F. R. G. Capítulo 5 – Aromáticas *Lippia alba* Erva-cidreira. In: VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro - Região Centro-Oeste. Brasília, DF: MMA. 1.160 p. (Série Biodiversidade; 44). 2018.

XIA, E-H, *et al.* Tea plant genomics: achievements, challenges and perspectives. **Horticulture Research**. Vol. 7, n.7, p. 1-19. 2020.

WALTON, N. J. *et al.* Characterization and control of plant secondary metabolism. In: WALTON, N. J. and BROWN, D. E. Chemicals from Plants Perspectives on Plant Secondary Products. Imperial College Press. World Scientific. Pages: 436, 1999.

WALID, R *et al.* Beneficial effects of *Aloe vera* gel on lipid profile, lipase activities and antioxidant/antioxidant status in obese rats. **Journal of Functional Foods**. Vol. 48, p. 525–532, 2018.

WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 1-6, 1994.

YAMAMOTO, P. Y. **Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** 2006. (Dissertação de Mestrado) Instituto Agrônomo de Campinas. Curso de pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical. Campinas, SP. 2006.

YAMAMOTO, P. Y. *et al.* Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, v.65, n.5, p.481-489, September/October 2008.

ZANELLA, C. M. *et al.* Microssatélites: Metodologias de identificação e análise. In: Turchetto-Zolet *et al.* Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 181 p, 2017.

ZAYNAB, M. *et al.* Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**. Vol. 124, p. 198-202, 2018.

ZHANG, F. *et al.* Synergistic protective effects of escin and low-dose glucocorticoids on blood-retinal barrier breakdown in a rat model of retinal ischemia. **Molecular medicine reports**. Vol. 7, p. 1511-1515, 2013.

ZHANG, Z. *et al.* Antifungal activity of monoterpenes against wood white-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Vol. 106, p.157-160, 2016.

WIJNKER E.; JONG H. Managing meiotic recombination in plant breeding. *Trends in Plant Science* 13: 640-646. 2008.

**CAPÍTULO II**  
**A ERVA-CIDREIRA BRASILEIRA APRESENTA SISTEMAS DE**  
**AUTOINCOMPATIBILIDADE GENÉTICA?**

## RESUMO

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) possui grande potencial para exploração comercial pelas indústrias farmacêutica, de cosméticos e aromática, o que se deve à grande variação química de seu óleo essencial, tanto qualitativa, quanto quantitativa. Para que se tenha qualidade no óleo essencial são necessários: bom rendimento e estabilidade na composição, o que pode ser obtido através do melhoramento genético da espécie, e tem como base a obtenção de conhecimentos sobre seus aspectos reprodutivos. Pesquisas apontam a existência de autoincompatibilidade na espécie. Através de microscopia de fluorescência é possível observar a emissão e o desenvolvimento do tubo polínico desde o estigma até o ovário após a polinização, constituindo um método eficiente na avaliação da ocorrência de autofecundação. Assim, o presente estudo avaliou a ocorrência de uma possível autofecundação em erva-cidreira brasileira através de microscopia de fluorescência. Os genótipos utilizados foram UFRRJ ECB001, UFRRJ ECB002 e UFRRJ ECB005, quimiótipo citral, pertencentes a coleção de germoplasma do Departamento de Fitotecnia, do Instituto de Agronomia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, selecionados com base no potencial para exploração comercial, apontado pela alta estabilidade do perfil químico do genótipo e/ou pela alta concentração relativa de citral, geranial e neral, em seus óleos essenciais, identificados em pesquisa anterior. Foram coletadas 10 flores em antese, sem autopolinização, autopolinizadas artificialmente outras 10 flores (todas previamente protegidas por sacos de papel em fase de pré-antese, com propósito de evitar contaminação por pólenes externos) e coletadas dez flores de polinização livre, em antese, de cada genótipo. Devido ao tamanho das flores desenvolveu-se uma técnica de autopolinização artificial eficiente para a espécie, a partir de corte longitudinal da pétala e condução dos grãos de pólen ao estigma. Para detecção de tubos polínicos nas porções dos pistilos, fixaram-se as flores em FAA (formalina, ácido acético e álcool etílico) por 24 horas, a 10°C. Após, armazenou-as em álcool 70%. Os pistilos foram removidos, lavados, imersos em hidróxido de sódio por 12 horas para amaciamento do tecido e, após nova lavagem, imersos em 0,1% de azul de anilina por quatro horas. Lâminas foram montadas com os pistilos esmagados sob lamínula e observadas em microscópio óptico para detecção de tubos polínicos. Analisaram-se o percentual de pistilos que apresentaram grãos de pólen no estigma, tubos polínicos no estigma, no estilo e no ovário, para cada tratamento. Para os genótipos que apresentaram tubos polínicos em seus ovários em mais de 50% dos pistilos analisados foi descartada a ocorrência de autoincompatibilidade genética. Pistilos de todos os genótipos foram analisados também quanto à presença de camada de mucilagem sobre seus estigmas, sob microscopia de campo claro e uso de corante solução tripla de Alexander, discutindo uma possível barreira à autopolinização. O método de autopolinização artificial mostrou-se eficiente, pois foi possível depositar um volume significativo de grãos de pólen nos estigmas autopolinizados. O genótipo UFRRJ ECB002 apresentou o maior percentual de pistilos contendo tubos polínicos em seus ovários, sendo de 83,3%, seguido de UFRRJ ECB005 com 70%. UFRRJ ECB001 apresentou o menor percentual, com 54,5%. Os genótipos analisados não possuem sistemas de autoincompatibilidade genética, seja esporofítica ou gametofítica. Pistilos de flores apenas protegidas não apresentaram grãos de pólen em seus estigmas, indicando a presença de uma possível barreira física. Em todos os genótipos, 100% dos pistilos de polinização livre exibiram tubos polínicos em seus estigmas, estilos e ovários. Os resultados obtidos indicam a ausência de sistemas de autoincompatibilidade genética nos genótipos estudados, que impediriam a autofecundação. A presença de mucilagem sobre os estigmas dos genótipos pode indicar um fator limitante a autopolinização natural e representar uma barreira física e/ou química à autofecundação.

**Palavras-chave:** *Lippia alba*, autopolinização *in vivo*, reprodução vegetal.

## ABSTRACT

Bushy mat grass (*Lippia alba*) has great potential for commercial exploitation by the pharmaceutical, cosmetic and aromatic industries, which is due to the great chemical variation of its essential oil, both qualitative and quantitative. In order to have quality in the essential oil, good yield and stability in the composition are necessary, which can be obtained through the genetic improvement and is based on knowledge about its reproductive aspects. Research points to the existence of self-incompatibility in the species. Through fluorescence microscopy it is possible to observe the emission and development of the pollen tube from the stigma to the ovary after pollination, constituting an efficient method in the evaluation of the occurrence of self-fertilization. Thus, the present study evaluated the occurrence of a possible self-fertilization in bushy mat grass through fluorescence microscopy. The genotypes used were UFRRJ ECB001, UFRRJ ECB002 and UFRRJ ECB005, citral chemotype, belonging to the germplasm collection of the Phytotechnics Department, Institute of Agronomy, of the Universidade Federal Rural of Rio de Janeiro, selected based on the potential for commercial exploitation, pointed out due to the high stability of the chemical profile of the genotype and / or the high relative concentration of citral, geranial and neral, in its essential oils, identified in previous research. Ten flowers were collected in anthesis, without self-pollination, artificially self-pollinated another 10 flowers (all previously protected by paper bags in the pre-anthesis phase, with the purpose of avoiding contamination by external pollens) and ten free-pollination flowers, in anthesis, were collected. Due to the size of the flowers, an efficient artificial self-pollination technique was developed for the specie, from the longitudinal cut of the petal and the conduction of pollen grains to the stigma. The flowers were fixed in FAA (formalin, acetic acid and ethyl alcohol) for 24 hours, at 10 ° C. Afterwards, they were stored in 70% alcohol. The pistils were removed, washed, immersed in sodium hydroxide for 12 hours for tissue softening and, after a new wash, immersed in 0.1% aniline blue for four hours. Blades were assembled with the crushed pistils under a coverslip and observed under an optical microscope to detect pollen tubes. The percentage of pistils that showed pollen grains in the stigma was analyzed, pollen tubes in the stigma, in the style and in the ovary, for each treatment were analyzed. For genotypes that presented pollen tubes in their ovaries in more than 50% of the analyzed pistils, the occurrence of genetic self-incompatibility was ruled out. Pistils of all genotypes were also analyzed for the presence of mucilage layer over their stigmas, under bright field microscopy and use of Alexander triple solution dye, discussing a possible barrier to self-pollination. The method of artificial self-pollination proved to be efficient, since it was possible to deposit a significant volume of pollen grains in self-pollinated stigmas. The UFRRJ ECB002 genotype showed the highest percentage of pistils containing pollen tubes in their ovaries, being 83.3%, followed by UFRRJ ECB005 with 70%. UFRRJ ECB001 had the lowest percentage, with 54.5%. The analyzed genotypes do not have systems of genetic self-incompatibility, whether sporophytic or gametophytic. Pistils of flowers only protected did not show pollen grains in their stigmas, indicating the presence of a possible physical barrier. In all genotypes, 100% of the free-pollinated pistils exhibited pollen tubes in their stigmas, styles and ovaries. The results obtained indicate the absence of systems of genetic self-incompatibility in the studied genotypes, which would prevent self-fertilization. The presence of mucilage on the stigmas of the genotypes may indicate a limiting factor to natural self-pollination and represent a physical and / or chemical barrier to self-fertilization.

**Key-words:** *Lippia alba*, Self-pollination, Plant reproduction.

## 1 INTRODUÇÃO

*Lippia alba*, popularmente conhecida como erva-cidreira brasileira, é um arbusto com indivíduos hermafroditas, pertencente à família Verbenaceae, que apresenta o número de cromossomos igual à 15 bivalentes, de acordo com Brandao, Viccini e Recco-Pimentel (2005); Brandão *et al.* (2007) e Sousa *et al.* (2009). A espécie encontra-se amplamente distribuída desde o sul dos Estados Unidos, México, Caribe até o norte da Argentina e Uruguai, nos mais variados ambientes (SALIMENA; MÚLGURA, 2015; SANDERS, 2001). Não há relatos na literatura sobre o centro de origem de erva-cidreira brasileira, contudo, por ocorrer em todas as regiões do Brasil, o país consiste, no mínimo, em um importante centro de diversidade da espécie (TAVARES *et al.*, 2005).

A erva-cidreira brasileira possui um grande potencial para exploração comercial por parte das indústrias farmacêuticas, de cosméticos e aromática, o que se deve à grande variação química de seu óleo essencial, tanto qualitativa quanto quantitativa, o que subdivide a espécie em diferentes quimiótipos, de acordo com o constituinte majoritário encontrado no óleo essencial. Esta variação química confere à espécie diversas propriedades terapêuticas como antibacteriana (HENNEBELLE *et al.*, 2008; SUTILI *et al.*, 2015), antifúngica, antiviral, analgésica, anti-inflamatória, neurosedativa (HENNEBELLE *et al.*, 2008), ansiolítico, sedativo leve (ANVISA, 2011), antiespasmódico (ANVISA, 2011; TAREAU, *et al.*, 2017) e antioxidante (CHIES *et al.*, 2013), bem como, uma diversidade de aromas.

Atualmente, não existem cultivares recomendadas para o plantio comercial quando se pretende explorar a produção do óleo essencial e de princípios ativos presentes neste. Uma das razões para tal fato é a escassez de estudos a respeito do sistema reprodutivo da erva-cidreira brasileira, o que consiste em um fator determinante na adoção de um método de melhoramento genético adequado para a espécie. Tal escassez certamente relaciona-se à dificuldade de manipulação de suas flores e deve-se ao diminuto tamanho destas (3 – 5 mm) (HENNEBELLE *et al.*, 2008; VIEIRA; SILVA; SALIMENA; 2018). Bottignon *et al.*, 2011 e Rufino *et al.* (2010; 2012) citam a existência de autoincompatibilidade em erva-cidreira brasileira. No entanto, os métodos adotados na avaliação de tal condição não são mencionados. A presença de sistemas de autoincompatibilidade favoreceria a utilização de determinados métodos de melhoramento genético em detrimento de outros.

A autoincompatibilidade é uma condição controlada por um único locus multialélico, o *S*-locus (*S* para *Self-incompatibility* ou SI) (GAUDE; MCCORMICK, 1999). Tal condição pode ser ainda do tipo gametofítica ou esporofítica, onde a inibição do crescimento do tubo polínico pode ocorrer no estilo ou nas papilas estigmáticas, respectivamente, quando autopolinizadas. Este fato é ocasionado pela deposição de calose e engrossamento da extremidade do tubo, que pode romper-se (ALLARD, 1977; GAUDE; MCCORMICK, 1999; ÜNAL; VARDAR; AYTÜRK, 2013).

Através de microscopia de fluorescência é possível avaliar claramente a emissão e o desenvolvimento do tubo polínico desde o estigma até o ovário após a polinização, constituindo, desta forma, um método eficiente na avaliação da ocorrência de autofecundação (DORDEVIC *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2015; MILATOVIC *et al.*, 2013; NICOLIK; MILATOVIC, 2010).

Além da autoincompatibilidade genética algumas outras estratégias reprodutivas foram desenvolvidas pelas angiospermas com o propósito de evitar a autopolinização e consequentemente promover a alogamia. As estratégias mais comuns são a hercogamia e a dicogamia (FRANKEL; GALUN, 1977). Na hercogamia ocorre um impedimento físico à autopolinização, onde androceu e gineceu são posicionados de modo que a autopolinização espontânea não ocorra. Já nas espécies que apresentam dicogamia o amadurecimento do

androceu e do gineceu se dão em épocas diferentes, consistindo, portanto, em um impedimento temporal à autopolinização (BERTIN; NEWMAN, 1993; FRANKEL; GALUN, 1977).

Diante disto, o presente estudo objetivou investigar uma possível ocorrência de autofecundação em erva-cidreira brasileira, por meio da análise do desenvolvimento do tubo polínico ao longo do pistilo de flores autopolinizadas artificialmente. Uma técnica de autopolinização artificial foi também desenvolvida e avaliada quanto sua eficiência, devido ao reduzido tamanho das flores. Permitindo, desta forma, a adoção de técnicas de reprodução (cruzamentos) adequadas para o melhoramento genético da espécie.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local da Pesquisa e condições experimentais

A pesquisa foi conduzida no campo experimental e no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas, ambos pertencentes ao Departamento de Fitotecnia (DFito), Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ (22°45' S; 43° 41' W) (RAMOS; CASTRO; CAMARGO, 1973), região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw, sendo caracterizado pela alternância entre a estação chuvosa no verão e seca durante o inverno, com precipitação anual variando entre 930 mm/ano a 1.475 mm/ano (INMET, 2017). A temperatura média anual é de 24,5°C (CARVALHO *et al.*, 2006).

### 2.2 Material vegetal utilizado

Os genótipos de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) utilizados neste estudo foram: UFRRJ ECB001, UFRRJ ECB002 e UFRRJ ECB005, todos pertencentes ao quimiótipo citral e à coleção de germoplasma de erva-cidreira brasileira do DFito. Os genótipos foram selecionados com base no grande potencial para exploração comercial destes, apontado por seus altos 'Índices de Estabilidade do Perfil Químico do Genótipo' (IEPQG) e/ou pela alta concentração relativa de citral, geranial e neral, encontrada em seus óleos essenciais, de acordo com a pesquisa realizada por Soares *et al.* (2019). Estes genótipos estão depositados no Herbário da UFRRJ (link: <http://rbr.jbrj.gov.br/v2/consulta.php>) conforme Tabela 1.

**Tabela 1.** Dados de registro dos genótipos de erva-cidreira brasileira no Herbário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Genótipos	Número de Registro no Herbário	Número de etiqueta para Consulta
UFRRJ ECB001	RBR00045072	45072
UFRRJ ECB002	RBR00045071	45071
UFRRJ ECB005	RBR00045070	45070

### 2.3 Autopolinização natural, artificial e polinização livre, em flores de *Lippia alba*

Para verificar a ocorrência de autopolinização natural em flores de erva-cidreira brasileira (não polinizadas artificialmente) e, desta forma, atestar sobre a presença de possíveis barreiras à autofecundação natural, foram coletadas 10 flores em antese, por genótipo (previamente protegidas por sacos de papel, quando em fase de pré-antese).

Foi realizada a autopolinização artificial de 10 flores por genótipo, previamente protegidas por sacos de papel em fase de pré-antese (com o propósito de evitar a contaminação no momento entre a abertura dos botões e a realização da autopolinização artificial) (Figuras 1A, 1B e 1C).

Devido ao reduzido tamanho das flores de erva-cidreira brasileira (3 – 5 mm) foi desenvolvida uma técnica de autopolinização artificial eficiente para a espécie (Figura 1). Foi utilizada uma agulha com 0,38 mm de diâmetro e 13 mm de comprimento (Figura 1D), com a qual realizou-se um corte longitudinal nas pétalas das flores (Figura 1E), de forma a expor o estigma e as anteras deiscuentes (Figura 1F). Os grãos de pólen foram conduzidos com a agulha até o estigma (Figura 1G). Após as autopolinizações, as flores foram novamente protegidas com sacos de papel afim de se evitar a contaminação por grãos de pólen externos (Figura 1H) e mantidas nas plantas por 24 horas, quando foram então coletadas. As polinizações artificiais foram realizadas entre as 7:00 e 8:00.

Dez flores de polinização livre em antese, de cada genótipo, foram também coletadas e analisadas.



**Figura 1.** Autopolinização artificial. (A e B) Inflorescências contendo botões florais em pré-antese, antes de serem protegidos por saco de papel. (C) Inflorescências protegidas por saco de papel. (D e E) Corte longitudinal na corola da flor em antese (seta), realizado com agulha, para exposição do estigma. F) Exposição do estigma que será autopolinizado (seta) e anteras deiscuentes com grãos de pólen expostos. (G) Grãos de pólen aderidos à agulha, antes de serem depositados no estigma. (H) Grãos de pólen aderidos à superfície do estigma após autopolinização. (I) Flores protegidas por saco de papel, após autopolinização. **gp** = grãos de pólen.

#### 2.4 Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos em *Lippia alba*

Para verificar a presença de grãos de pólen no estigma, a emissão de tubos polínicos por estes, o desenvolvimento dos tubos polínicos ao longo do estilo, a presença de tubos na porção

superior do ovário, bem como verificar uma possível singamia a partir das flores provenientes dos tratamentos, coletaram-se e fixaram-se as mesmas em FAA (37% de formalina, ácido acético e 30% de álcool etílico, na proporção de 5: 5: 90) por 24 horas, a 10°C. Após esse período retirou-se as flores do FAA e armazenou-as em álcool a 70%. Os pistilos foram removidos, lavados e imersos em hidróxido de sódio a 8 N, por 12 horas para amaciamento do tecido. Lavou-se novamente os pistilos e os manteve em água destilada por uma hora para remoção do hidróxido de sódio, com posterior imersão em 0,1% de azul de anilina diluído em tampão de acetato de potássio a 0,1 N, por quatro horas, conforme Dafni, (1992).

Lâminas foram montadas com os pistilos esmagados sob lamínula e observadas em microscópio óptico (Olympus BX43, USA) com filtro de excitação 370 nm e filtro de emissão 509 nm para detecção de tubos polínicos.

Em todos os tratamentos analisaram-se o percentual de pistilos que apresentaram grãos de pólen no estigma, tubos polínicos no estigma, no estilo e no ovário, conforme proposto por Damasceno Junior *et al.* (2009). Imagens foram obtidas em câmera digital de alta resolução (Olympus Q-Color 3, USA). Para verificar a ocorrência de sistemas de autoincompatibilidade genética considerou-se o percentual de pistilos que contiveram ao menos 3 tubos polínicos na porção superior do ovário, bem como os que penetraram o ovário e os que atingiram a micrópila. Para os genótipos que apresentaram tubos polínicos em seus ovários em mais de 50% dos pistilos analisados (os 10 pistilos autopolinizados), conforme critério adaptado de Dordevic *et al.* (2014), foi descartada a ocorrência de autoincompatibilidade genética.

A inibição do desenvolvimento dos tubos polínicos nas papilas do estigma caracteriza a presença de autoincompatibilidade do tipo esporofítica, no genótipo analisado. Enquanto que, a observação de tubos polínicos interrompidos nas porções superior, média e inferior do estilo, indicara a presença de autoincompatibilidade do tipo gametofítica (ALLARD, 1977; DE NETTANCOURT, 2001; GAUDE; MCCORMICK, 1999). Para constatar a presença de tais sistemas de autoincompatibilidade (esporofítica e gametofítica) foram analisadas a presença de inibições dos tubos polínicos nos estigmas e de interrupções com inchaços nas extremidades dos tubos polínicos, ocasionados pela deposição de calose e característicos de uma possível autoincompatibilidade (gametofítica) (ÜNAL; VARDAR; AYTÜRK, 2013).

Pistilos de todos os genótipos foram analisados também quanto à presença (ou ausência) de uma camada de mucilagem sobre seus estigmas, sob microscopia de campo claro e uso de corante solução tripla de Alexander (com o propósito de visualizar os grãos de pólen aderidos à mucilagem e/ou à papila do estigma (ALEXANDER, 1969), sendo discutida a possibilidade de esta representar uma barreira à autopolinização.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

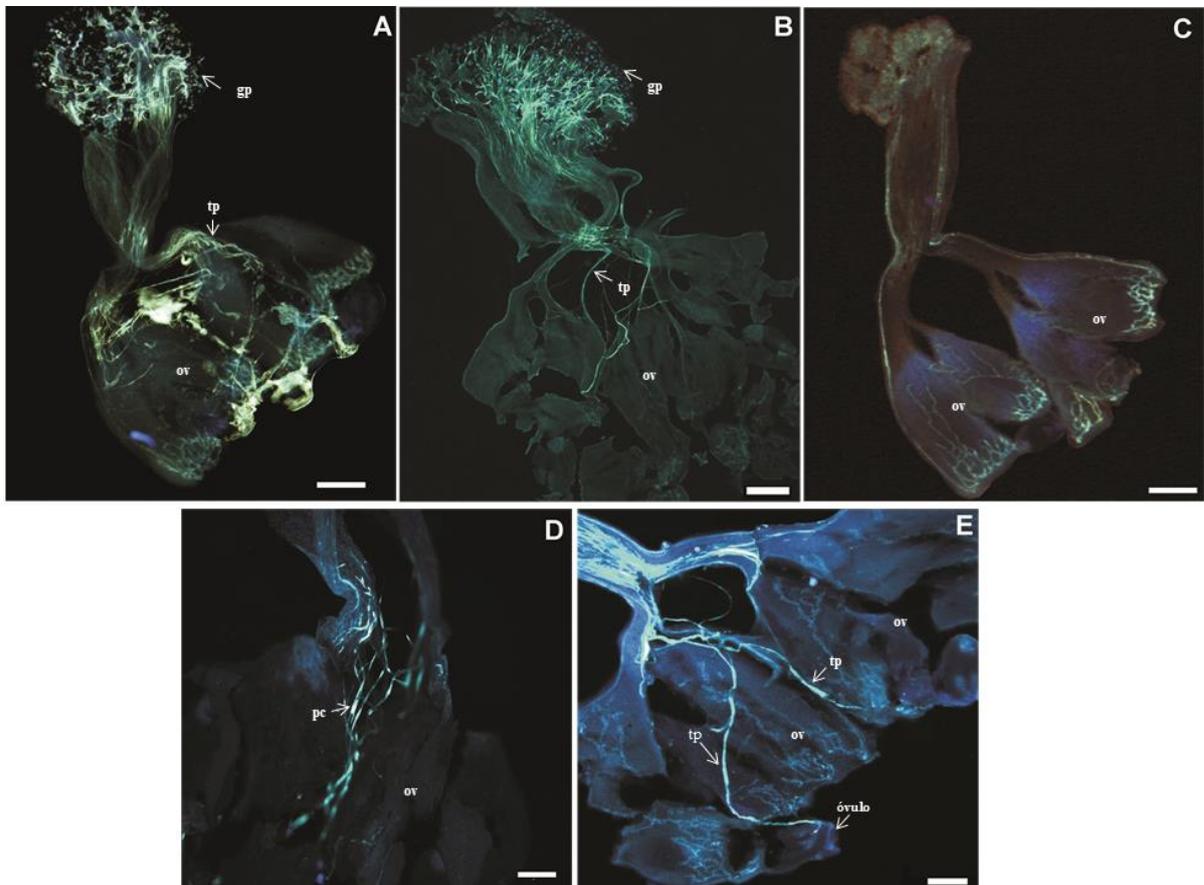
#### 3.1 Autopolinização natural, artificial e polinização livre, em flores de *Lippia alba*

O método de autopolinização artificial adotado mostrou-se eficiente, pois foi possível depositar um volume significativo de grãos de pólen nos estigmas autopolinizados quando comparada com a quantidade de pólen depositada pela polinização livre (Figuras 2B e 2A, respectivamente). Tal eficiência possibilitou a observação, por microscopia de fluorescência, de grãos de pólen nos estigmas de todos os pistilos em todos os genótipos autopolinizados.

Em flores autopolinizadas artificialmente, foi possível observar a presença de tubos polínicos no estigma, no estilete (Figura 2B) e ovário (Figuras 2D e 2E) dos pistilos. Um total de 100% dos pistilos autopolinizados, de todos os genótipos apresentaram tubos polínicos em seus estigmas e estiletos. A Figura 2D mostra a presença de plugs de calose em tubos polínicos

de flores autopolinizadas artificialmente. Os plugs de calose separam o citoplasma do restante do tubo polínico. Assim, estes são depositados em intervalos regulares conforme o tubo polínico cresce, deixando para trás regiões vacuoladas que fazem com que o citoplasma permaneça concentrado na porção frontal do tubo polínico, independentemente do seu comprimento (FRANKLIN-TONG, 1999). Os resultados aqui observados indicam uma provável ausência de sistemas de autoincompatibilidade, seja do tipo esporofítica ou gametofítica, nos genótipos de erva-cidreira brasileira analisados, do quimiotipo citral.

O genótipo UFRRJ ECB002 foi o que apresentou o maior percentual de pistilos contendo tubos polínicos em seus ovários, sendo de 83,3%, seguido de UFRRJ ECB005 com 70%. O genótipo UFRRJ ECB001 apresentou o menor percentual, com 54,5% de seus pistilos com tubos polínicos em seus ovários. Apesar dessas diferenças é improvável que os genótipos analisados possuam sistemas de autoincompatibilidade genética, visto que todos apresentaram tubos polínicos em seus ovários.



**Figura 2.** Polinização livre e Autopolinização artificial em erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*). Coloração com azul de anilina e observação sob microscopia de fluorescência. (A) Grãos de pólen emitindo tubos polínicos ao longo de todo o pistilo de flor de polinização livre e (B) autopolinizada artificialmente, após 24 horas. (C) Pistilo de flor apenas protegida (não autopolinizada). (D) Tubos polínicos contendo plugs de calose, na base do estilo e ovário e (E) tubos polínicos no interior dos ovários, ambos de flor autopolinizada artificialmente. gp = grãos de pólen; tp = tubo(s) polínico(s); ov = ovário; pc = plug de calose. Barra de escala (A e B) = 200  $\mu$  e (C e D) = 50  $\mu$ .

Tal fato implica em considerar a possibilidade de ocorrência de autofecundações nos genótipos analisados, quando expostos a ação de polinizadores, visto que estes, além de trazerem consigo grãos pólen de outras flores, facilitam também o contato do grão de pólen da

própria flor com seu estigma. Da mesma forma, técnicas de polinização artificial, como cruzamentos, com o propósito de se obter híbridos, devem levar em conta a possibilidade de ocorrência de autofecundações, caso as flores polinizadas não sejam previamente emasculadas.

Os pistilos das flores mantidas protegidas por sacos de papel (sem autopolinização artificial), com o propósito de verificar uma possível autofecundação natural, não apresentaram grãos de pólen em seus estigmas e, conseqüentemente, a ausência de tubos polínicos nos estilos e ovários, em todos os genótipos (Figura 2 C). Ainda que os grãos de pólen, presentes nas anteras deiscidas da própria flor, venham a entrar em contato com o estigma desta, (sem a interferência de agentes polinizadores ou polinização artificial) a presença de uma camada mucilaginosa sobre o estigma deve, ainda, dificultar ou impedir a autopolinização natural. Na presença de barreiras físicas à ocorrência de autopolinização natural a ação de polinizadores é de fundamental importância. De acordo Venancio *et al.* (2016), a erva-cidreira brasileira é visitada por uma variedade de insetos com grande potencial para polinizar, sendo os da ordem Hymenoptera os visitantes mais frequentemente observados.

Para as flores de polinização livre, 100% dos pistilos, de todos os genótipos exibiram tubos polínicos em seus estigmas, estilos e ovários (Figura 2A).

Não foi observada a presença de tubos polínicos contendo inchaços em suas extremidades, característico da interrupção deste em decorrência da deposição de calose, pela presença de autoincompatibilidade gametofítica, conforme foi observado no estudo realizado por Nicolik; Milatovic, (2010) em ameixa. No estudo citado as cultivares foram consideradas autocompatíveis quando ao menos um tubo polínico atingiu a base do estilo na maioria dos pistilos polinizados, enquanto que em cultivares autoincompatíveis o desenvolvimento dos tubos polínicos encerrou-se no terço superior do estilo, acompanhado pelo inchaço. O mesmo critério foi também adotado por Milatovic *et al.* (2013), que avaliaram a presença de autoincompatibilidade em cultivares de damasco através do percentual de pistilos com pelo menos um tubo polínico atingindo a base do estilo e o óvulo. As cultivares foram considerados autocompatíveis se na maioria dos pistilos pelo menos um tubo polínico atingisse o ovário.

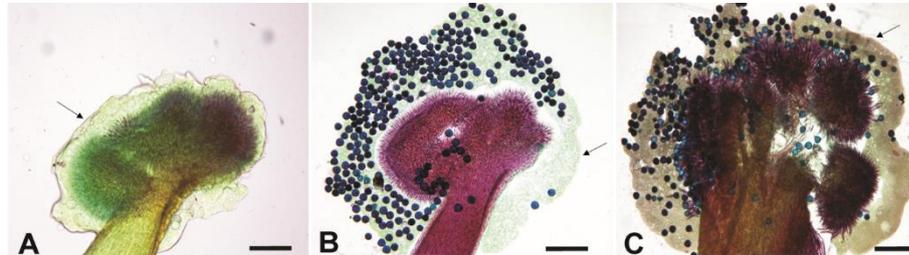
Dordevic *et al.* (2014) analisaram a ocorrência de autoincompatibilidade em flores de ameixa autopolinizadas e consideraram as cultivares com mais de 50% de pistilos com tubos polínicos atingindo a base do estilo como autocompatíveis, enquanto que aquelas com menos de 25% de pistilos com tubos polínicos na base do estilo foram considerados autoincompatíveis.

A presença de ao menos 3 tubos polínicos nos ovários de mais de 50% dos pistilos das flores de erva-cidreira brasileira autopolinizadas, de todos os genótipos, bem como a ausência de tubos polínicos contendo inchaços em suas extremidades, indicaram uma possível ausência de sistemas de autoincompatibilidade genética, seja do tipo esporofítica, seja gametofítica.

Foi observada a presença de uma camada de mucilagem sobre os estigmas dos pistilos de todos os genótipos analisados, tanto para as flores protegidas em estágio de pré-antese e não polinizadas (Figura 3A), quanto para as autopolinizadas (Figura 3B) e de polinização livre (Figura 3C). De acordo com Heslop-Harrison e Shivanna (1977) o estigma de espécies pertencentes à família Verbenaceae, como *Lippia alba*, apresentam uma secreção mais ou menos abundante e por esta razão são classificados como sendo do tipo úmido. O exsudado do estigma é frequentemente emulsificado, com gotas lipídicas dispersas. Em alguns gêneros há uma camada lipídica subjacente, formando a "cutícula líquida" (HESLOP-HARRISON, 1975). Análises mais detalhadas, sobre a composição desta camada de mucilagem, presente nos estigmas da erva-cidreira brasileira, se fazem necessárias a fim de se verificar se a mesma pode representar uma barreira química com propósito de dificultar à ocorrência da autopolinização natural. Porém, observa-se que a mucilagem pode ainda representar uma barreira física à autopolinização natural, dificultando o contato direto dos grãos de pólen com a papila do estigma. Esta barreira seria, então, 'superada' pelo contato dos polinizadores diretamente com a papila estigmática, bem como pelo contato direto da agulha, durante a polinização artificial,

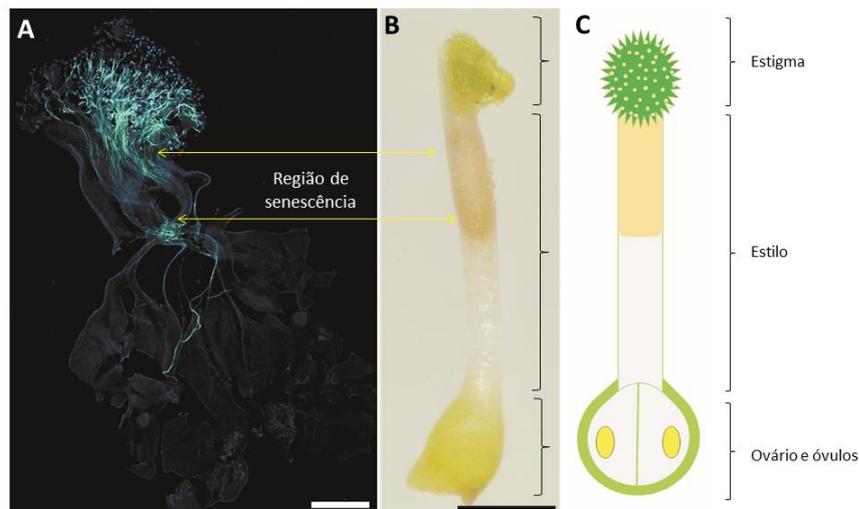
permitindo assim a deposição dos grãos imediatamente no estigma e possibilitando o início das reações necessárias à emissão do tubo polínico.

Portanto, a presença de mucilagem sobre os estigmas dos genótipos analisados pode indicar um fator limitante a ocorrência de autopolinização natural e desta forma representar uma barreira física e/ou química à autofecundação.



**Figura 3.** Estigmas de flores de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) (A) apenas protegida na fase de pré-antese e mantida isolada por 24 h, (B) de flor autopolinizada artificialmente e (C) de polinização livre. Coloração com solução tripla de Alexander e observação sob microscopia de campo claro. Setas indicam a presença de camada de mucilagem sobre os estigmas. Barra = 200  $\mu$ m.

A não observação de tubos polínicos nas porções superior e média dos estilos não deve ser confundida com uma possível interrupção dos tubos polínicos. Tal fato ocorreu tanto nos pistilos de flores de polinização livre (Figura 2A), quanto nos autopolinizados artificialmente (Figura 2B). Em ambos os casos os tubos polínicos são visualizados nos estigmas e logo abaixo destes e voltam a ser observados na porção inferior dos estilos e ovários. Contudo, pôde ser verificado, através de análise em estereomicroscópio (BEL Photonics SZT, Itália) de pistilos no mesmo estágio de desenvolvimento que, especificamente nestes locais onde não se observou a presença de tubos polínicos, ocorre também um possível início da senescência da região, devido ao seu amadurecimento (Figura 4).



**Figura 4.** Pistilos de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) submetido à coloração com azul de anilina e observação sob microscopia de fluorescência (A) e sem coloração, observado em estereomicroscópio (B). Em destaque região de ‘ausência’ de tubos polínicos (A) e região correspondente de senescência no estilo. (C) Ilustração esquemática de pistilo e suas porções. Barra de escala (A) = 200  $\mu$  e (B) = 250  $\mu$

Assim, a não observação de tubos polínicos nas porções mencionadas dos estilos da erva-cidreira brasileira, pode tratar-se, na verdade, de uma região que contém tecido vegetal apresentando necrose inicial, devido ao amadurecimento natural do pistilo, ocorrido após a autopolinização e quando submetido ao preparo para observação em microscopia.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que os genótipos de erva-cidreira brasileira analisados não apresentam sistemas de autoincompatibilidade genética, seja do tipo esporofítica, seja gametofítica, sendo, portanto, necessário considerar a possibilidade destes se autofecundarem quando autopolinizados artificialmente ou ainda quando sob ação de polinizadores.

A autoincompatibilidade ocorre em várias famílias e gêneros de angiospermas, inclusive em muitas plantas de interesse econômico (BREWBAKER, 1957), sendo atualmente alvo de diversas pesquisas, principalmente para espécies da família Brassicaceae (HIROI *et al.*, 2013; LAO *et al.*, 2014; SAMUEL *et al.*, 2011), para *Theobroma cacao* (LANAUD *et al.*, 2017; ROYAERT *et al.*, 2011), *Helianthus* (ASTIZ *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2012), entre outras, onde os mecanismos da autoincompatibilidade são estudados sob aspectos fisiológicos e genéticos/moleculares.

A técnica de autopolinização artificial desenvolvida mostrou-se eficiente e, desta forma adequada ao reduzido tamanho das flores da erva-cidreira brasileira, no entanto, a autofecundação natural de tais genótipos encontra limitações. O que pode estar relacionado a presença de barreiras físicas e/ou químicas, como a presença de uma camada de mucilagem sobre a papila estigmática, que seria ‘superada’ pela ação de polinizadores, na polinização livre e pelo contato direto da agulha, durante a polinização artificial.

O melhoramento genético da erva-cidreira brasileira, com propósito de obtenção de híbridos com alto valor agregado para características de interesse comercial, deve considerar que é possível a autofecundação em genótipos da espécie. Para isso, devem-se adotar técnicas de autopolinização artificial específicas, como a técnica desenvolvida no presente trabalho, a fim de viabilizar, desta forma, a produção de linhas puras e, posteriormente, de híbridos.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER M. P. Differential staining of aborted and non aborted pollen. **Stain Technology**, Vol. 44, p. 117-122, 1969.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético em plantas**. São Paulo: Ed. Blucher, 1977. 381p.

ANVISA. Brasil. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 1ª edição/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2011. 126p.

ASTIZ, V. *et al.* Self-compatibility in modern hybrids of sunflower (*Helianthus annuus* L.). fruit set in open and self-pollinated (bag isolated) plants grown in two different locations. **HELIA**, Vol. 34, n. 54, p. 129-138, 2011.

BERTIN, R. I.; NEWMAN, C. M. Dichogamy in Angiosperms. **The Botanical Review**. Vol. 59, p. 112-152, Apr.-June, 1993.

BOTTIGNON, M. R. *et al.* Heterogeneity of linalool chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., based on clonal half-sib progenies. **Sci. Agric.**, Vol. 68, n. 4, p. 447-453, 2011.

BREWBAKER, J. L. Pollen cytology and selfincompatibility systems in plants. **The Journal of Heredity**. Vol.48, p.271-277, 1957.

CARVALHO, D. F. *et al.* Avaliação da evapotranspiração de referência na região de Seropédica-RJ, utilizando lisímetro de pesagem. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Vol. 14, n. 2, p. 108-116, 2006.

CHIES, C. E. *et al.*, Antioxidant Effect of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. **Antioxidants**, Vol. 2, p. 194-205, 2013.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1992. 249p.

DAMASCENO JUNIOR P. C. *et al.* Preferential reproduction mode of hermaphrodite papaya plant (*Carica papaya* L; *Caricaceae*). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, Vol. 31, n. 1, p. 182-189, 2009.

DE NETTANCOURT, D. **Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants** 2nd ed., Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2001. 322p.

DORDEVIC, M., CEROVIC, R., RADICEVIC, S., NIKOLIC, D. Incompatible pollen tubes in the plum style and their impact on fertilization success. **GENETIKA**, v. 46, n.2, p. 411-418, 2014.

FRANKEL, R.; GALUN, E. **Pollination Mechanisms, Reproduction and Plant Breeding**. Berlin Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1977. 283p.

FRANKLIN-TONG, V. E. Signaling and the Modulation of Pollen Tube Growth. **The Plant Cell**, v. 11, p. 727–738, April 1999.

GAUDE, T.; MCCORMICK, S. Signaling in pollen–pistil interactions. **Seminars in CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY**, v. 10, p. 139-147, 1999.

HESLOP-HARRISON, J. Incompatibility and the pollen-stigma interaction. **Ann. Rev. Plant Physiol.** v.26, p. 403-425, 1975.

HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K. R. The Receptive Surface of the Angiosperm Stigma. **Ann. Bot.**, Vol. 41, p. 1233-1258, 1977.

HENNEBELLE, J.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 116, p. 211–222, 2008.

HIROI, K. *et al.* Time-lapse imaging of self- and cross-pollinations in *Brassica rapa*. **Annals of Botany**. Vol. 112, p. 115–122, 2013.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesAutomaticas>. Acesso em: 02/10/2017.

- LANAUD, C. *et al.* Deciphering the *Theobroma cacao* self-incompatibility system: from genomics to diagnostic markers for self-compatibility. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 68, No. 17 pp. 4775–4790, 2017.
- LAO, X. *et al.* Physiological and genetic analysis of CO<sub>2</sub>-induced breakdown of self-incompatibility in *Brassica rapa*. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 65, n. 4, p. 939–951, 2014.
- MARTINS, K. C. *et al.* Crossability and evaluation of incompatibility barriers in crosses between *Capsicum* species. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.15, p.139-145, 2015.
- MILATOVIC, D. *et al.* Testing of self-(in)compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. **Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus**, Vol. 12, n. 6, p. 103-113, 2013.
- NICOLIK, D; MILATOVIC, D. Examining self-compatibility in plum (*Prunus domestica* L.) by fluorescence microscopy. **GENETIKA**, Vol. 42, n. 2, p. 387-396, 2010.
- RAMOS, D. P.; CASTRO, A. F.; CAMARGO, M. N. Levantamento detalhado de solos da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Série Agronomia, Brasília, Vol. 8, n. 1, p. 1-27, 1973.
- ROYAERT, S. *et al.* Identification of marker-trait associations for self-compatibility in a segregating mapping population of *Theobroma cacao* L. **Tree Genetics & Genomes**. Vol. 7. p.1159–1168, 2011.
- RUFINO, E. R. *et al.* Estimativas de parâmetros genéticos de caracteres relacionados ao vigor de estacas em *Lippia alba*. **Bragantia**, Campinas, Vol. 69, n. 4, p.779-785, 2010.
- RUFINO, E. R. *et al.* Selection of new clones of linalool chemotype from genetic recombination in *Lippia alba*. **Bragantia**, Campinas, Vol. 71, n. 2, p.155-164, 2012.
- SALIMENA, F. R. G; MÚLGURA, M. E. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. **Rodriguésia**, Vol.66, n.1, p. 191-197, 2015.
- SAMUEL, M. A. *et al.* Proteomic Analysis of *Brassica* Stigmatic Proteins Following the Self-incompatibility Reaction Reveals a Role for Microtubule Dynamics During Pollen Responses. **Molecular & Cellular Proteomics** Vol.10, n.12, 2011.
- SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in the southeaster United States. **Havard papers in Botany**, v. 5, n.2, p. 303-358, 2001.
- SOARES, C. H. N. *et al.* Selection of genotypes (citral chemotype) of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown regarding seasonal stability of the essential oils chemical profile. **Industrial Crops & Products**. Vol. 139, 111497, 2019.
- SOUSA, M. S.; SILVA, P. S.; TORRES, G. A.; VICCINI, L. F. Chromosome banding and essential oils composition of Brazilian accessions of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Biologia**, Vol. 64, n. 4, p. 711-715, 2009.

SUN, Y. *et al.* Factors Controlling Self-Fertility in Sunflower: The Role of GCA/SCA Effects, Alleles, and Floret Characteristics. **Crop Science**. Vol.52, n.1, p. 128-135, 2012.

SUTILI, F. J. *et al.* *Lippia alba* essential oil promotes survival of silver catfish (*Rhamdia quelen*) infected with *Aeromonas* sp. **An Acad Bras Cienc**. Vol. 87, n.1, p. 95-100, 2015.

TAREAU, M. A.; PALISSE, M.; ODONNE, G. As vivid as a weed... Medicinal and cosmetic plant uses amongst the urban youth in French Guiana. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 203, p. 200–213, 2017.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiótipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn**, Vol.15, n.1, jan/mar. 2005.

ÜNAL, M., VARDAR, F.; AYTÜRK, Ö. Callose in Plant Sexual Reproduction. In: SILVA-OPPS, M. **Current Progress in Biological Research**. Intech, April 24, p. 319-344, 2013.

VENANCIO, D. F. A. *et al.* F. Flower-Visiting Insects and Phenology of *Lippia alba* (Lamiales: Verbenaceae): Floral Color Changes and Environmental Conditions as Cues for Pollinators. **Environmental Entomology**, Vol. 45, n. 3, p. 1–9, 2016.

**CAPÍTULO III**  
**DIVERSIDADE QUÍMICA E APLICAÇÃO DE MARCADORES ISSR NA SELEÇÃO**  
**DE GENÓTIPOS DE ERVA-CIDREIRA BRASILEIRA VISANDO A QUALIDADE**  
**DE ÓLEO ESSENCIAL**

## RESUMO

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) é uma planta de porte arbustivo, pertencente à família Verbenaceae. Seu modo de reprodução preferencialmente alógamo faz com que a espécie apresente uma alta heterozigosidade e, conseqüentemente, alta diversidade genética e por sua vez, ampla diversidade química de seus metabólitos secundários. Sua diversidade química confere um grande potencial de uso da espécie por parte das indústrias química, farmacêutica, aromática e de perfumaria. O objetivo desta pesquisa foi verificar a possibilidade de se aplicar marcadores de DNA do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) na seleção de genótipos, para qualidade química de óleo essencial. Foram estudados 27 genótipos de erva-cidreira brasileira, pertencentes à Coleção de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia, do Instituto de Agronomia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, oriundos de propagação vegetativa de plantas de diferentes procedências. Os óleos essenciais dos 27 genótipos foram extraídos por hidrodestilação, em aparelho Clevenger e submetidos à Cromatógrafo Gasoso, equipado com detector de ionização de chama (CG-DIC), para identificação da composição química destes. O DNA vegetal dos 27 genótipos foi extraído através do protocolo baseado em CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*), com adaptações. Após realização de *screening* com 51 *primers* ISSR, 14 apresentaram qualidade na amplificação dos fragmentos de DNA e polimorfismo, sendo estes utilizados nas reações de PCR. Os perfis ISSR foram obtidos pela presença ou ausência de bandas de alta intensidade nos géis de eletroforese em gel de agarose. Após análise das bandas foi obtida a matriz binária, a qual foi submetida a análise estatística. Análises de agrupamento foram realizadas através do algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean*) para os dados da composição química e moleculares. As similaridades dentro e entre os grupos foram estimadas via algoritmo ANOSIM (Análise de Similaridade) tanto para os dados químicos, quanto para os moleculares. Os dendrogramas UPGMA, Molecular e Químico, foram comparados e o coeficiente de entrelaçamento entre os dendrogramas foi calculado, com objetivo de verificar a relação entre os mesmos e a possibilidade de seleção de perfis químicos a partir dos marcadores moleculares ISSR. A importância das variáveis (componentes químicos) na variância química foi também calculada. As análises foram realizadas no Programa R. Foram identificados 61 componentes químicos, dos quais 36 apresentaram concentração superior a 0.5%. Assim como para o perfil químico de óleo essencial, os marcadores de DNA do tipo ISSR também apontaram para uma ampla diversidade genotípica entre estes mesmos genótipos. A análise molecular proporcionou um agrupamento de genótipos baseados mais no perfil químico de óleo essencial, do que com base na região de origem das plantas. Limoneno, oxido de cariofileno, mirceno, elemol, g-terpineno, guaiol e  $\beta$ -cariofileno foram os metabólitos que apresentaram médias notadamente superior em um grupo ou outro. Os *primers* ISSR utilizados foram eficientes em distinguir genótipos de erva-cidreira brasileira quimiótipo citral com alta concentração dos metabólitos citados e, desta forma, possuem um grande potencial para serem utilizados na seleção de genótipos, com o propósito de se obter tais compostos, visando a exploração comercial dos mesmos. Outros aspectos, relacionados ao potencial produtivo, devem também ser levados em consideração na seleção, como produção de biomassa e rendimento de óleo essencial.

**Palavras-chave:** Agrupamento, Composição química, Diversidade genética.

## ABSTRACT

Bushy mat grass (*Lippia alba*) is a shrub-like plant, belonging to the Verbenaceae family. Its reproductive mode, preferably allogamous, causes the species to present a high heterozygosity and, consequently, high genetic diversity and, in turn, a wide chemical diversity of its secondary metabolites. Its chemical diversity provides a great potential for the use of the specie by the chemical, pharmaceutical, aromatic and perfumery industries. The objective of this research was to verify the possibility of applying ISSR DNA markers (Inter Simple Sequence Repeats) in the selection of genotypes, for chemical quality of essential oil. 27 genotypes of bushy mat grass, belonging to the Germplasm Collection of the Department of Phytotechnics, of the Institute of Agronomy, of the Federal Rural University of Rio de Janeiro, from vegetative propagation of plants of different origins, were studied. The essential oils of the 27 genotypes were extracted by hydrodistillation in Clevenger apparatus and submitted to a Gas Chromatograph, equipped with a flame ionization detector (GC-FID), to identify their chemical composition. The plant DNA of the 27 genotypes was extracted using a protocol based on CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide), with adaptations. After screening with 51 ISSR *primers*, 14 showed quality in the amplification of DNA fragments and polymorphism, which are used in PCR reactions. ISSR profiles were obtained by the presence or absence of high intensity bands in agarose gel electrophoresis gels. After analyzing the bands, the binary matrix was obtained, which was subjected to statistical analysis. Cluster analyzes were performed using the UPGMA (Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean) algorithm for chemical and molecular composition data. Similarities within and between groups were estimated using ANOSIM (Similarity Analysis) algorithms for both chemical and molecular data. The UPGMA, Molecular and Chemical dendrograms were compared and the entanglement coefficient between the dendrograms was calculated in order to verify the relationship between them and the possibility of selecting chemical profiles from the ISSR molecular markers. The importance of the variables (chemical components) in the chemical variance was also calculated. The analyzes were performed in Program R. Sixty-one chemical components were identified, of which 36 had a concentration greater than 0.5%. As with the chemical profile of essential oil, ISSR-type DNA markers also pointed to a wide genotypic diversity among these same genotypes. The molecular analysis provided a grouping of genotypes based more on the chemical profile of essential oil, than based on the region of origin of the plants. Limonene, caryophyllene oxide, myrcene, elemol, g-terpinene, guaiol and  $\beta$ -caryophyllene were the metabolites that showed significantly higher averages in one group or another. The ISSR *primers* used were efficient in distinguishing bushy mat grass genotypes from the citral chemotype with a high concentration of the aforementioned metabolites and, therefore, have a great potential to be used in the selection of genotypes, with the purpose of obtaining such compounds, aiming at commercial exploitation. Other aspects, related to the productive potential, must also be taken into consideration in the selection, such as biomass production and essential oil yield.

**Key-words:** Grouping, Chemical composition, Genetical diversity.

## 1 INTRODUÇÃO

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) é uma espécie de porte arbustivo, pertencente à família Verbenaceae, com número de cromossomos de  $2n = 30-90$ , com variação entre os diferentes quimiótipos (BRANDAO; VICCINI; RECCO-PIMENTEL, 2005; BRANDÃO *et al.*, 2007; PIERRE *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2009). A ocorrência da erva-cidreira brasileira pode ser observada desde o sul dos Estados Unidos, México, Caribe até o norte da Argentina e Uruguai, nos mais variados ambientes (SALIMENA; MÚLGURA, 2015; SANDERS, 2001). A espécie é encontrada em todas as regiões do Brasil e, por esta razão, o país consiste em um importante centro de diversidade da mesma.

O modo de reprodução preferencialmente alógamo faz com que a espécie apresente uma alta heterozigosidade e, conseqüentemente, alta diversidade genética (LOVELESS; HAMRICK, 1984) e, por sua vez, ampla diversidade química de seus metabólitos secundários. Diversos estudos relataram a diversidade química encontrada para erva-cidreira brasileira em relação à síntese de metabólitos secundários (BLANK *et al.*, 2015; PARRA-GARCÉS *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2019; TELES *et al.*, 2012)

De acordo com Moore *et al.* (2014) as variações químicas qualitativas determinam fenótipos com diferentes perfis de metabólitos secundários, denominados ‘quimiótipos’. Desta forma, a erva-cidreira brasileira é subdividida em diferentes quimiótipos, de acordo com os componentes encontrados em maior concentração em seu óleo essencial (HENNEBELLE *et al.*, 2008; TAVARES *et al.* 2005). Dentre os quimiótipos relatados para a espécie pode-se citar: citral (geranial e neral), carvona (MATOS *et al.*, 1996); linalol, limoneno, mirceno (YAMAMOTO *et al.*, 2008),  $\beta$ -cariofileno, canfora-1,8-cineol,  $\gamma$ -terpineno (HENNEBELLE *et al.*, 2008; PASCUAL *et al.*, 2001), estragol (HENNEBELLE *et al.*, 2008), entre outros. A diversidade química confere ainda um grande potencial de uso da espécie por parte das indústrias química, farmacêutica, aromática e de perfumaria. Isto se deve ao fato de que seu óleo essencial representa uma fonte de vários compostos terpenoides comercialmente importantes (BLANK *et al.*, 2015; JANNUZZI *et al.*, 2011).

O Citral é um importante exemplo de quimiótipo de erva-cidreira brasileira, com alto potencial de utilização comercial, o que se deve às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, (PORFÍRIO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017), anestésica (SOUSA *et al.*, 2015), vaso relaxante (SILVA *et al.*, 2018), analgésica, anticonvulsivante (SIQUEIRA-LIMA *et al.*, 2018), ansiolítico (LOUCHARD; ARAÚJO, 2019) entre outras, além do aroma cítrico característico conferido ao óleo essencial e aos produtos que o contém.

A composição qualitativa e quantitativa de um óleo essencial é fator determinante em sua qualidade e valor comercial (COSTA *et al.*, 2012). Por essa razão, conhecer o perfil químico de um óleo essencial é de grande importância para sua melhor aplicação, seja pela indústria de cosméticos, seja pelo seu potencial terapêutico. Desta forma o uso de ferramentas que permitam o conhecimento prévio deste perfil a partir de análises do DNA da planta, possibilitam a identificação de genótipos que apresentem perfis químicos de interesse, ainda em fase inicial de desenvolvimento vegetal. Até o momento, no Brasil não há cultivares de erva-cidreira brasileira registradas ou disponíveis para plantio comercial (Brasil, 2020).

Dada a complexidade da composição química do óleo essencial da erva-cidreira brasileira, conforme mencionado, o objetivo desta pesquisa foi verificar a possibilidade de se aplicar marcadores de DNA do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) na seleção de genótipos para qualidade química do óleo essencial, conjuntamente com análises multivariadas de agrupamentos e correlações entre dados genéticos e químicos. Com base nisso, uma importante ferramenta auxiliar em programas de melhoramento genético da erva-cidreira brasileira é aplicada para seleção genótipos da espécie.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Localização da pesquisa e condições experimentais

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas, no Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais Professor Elson Viegas e no Campo experimental do Setor de Grandes Culturas, ambos no Departamento de Fitotecnia (DFito), Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no município de Seropédica, região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro (22°45' S; 43° 41' W) (RAMOS; CASTRO; CAMARGO, 1973). De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw, sendo caracterizado pela alternância entre a estação chuvosa no verão e seca durante o inverno, com precipitação anual variando entre 930 mm/ano a 1.475 mm/ano (INMET, 2017). A temperatura média anual é de 24,5°C (CARVALHO *et al.*, 2006).

### 2.2 Material Vegetal

Os genótipos estudados pertencem à Coleção de Germoplasma de erva-cidreira brasileira do DFito, conforme descritos na Tabela 1. Ao todo foram utilizados 27 genótipos, todos pertencentes ao quimiótipo citral. Os genótipos são oriundos de propagação vegetativa de plantas originalmente obtidas de diferentes procedências (Tabela 1).

**Tabela 1** Identificação e procedência dos genótipos da coleção de germoplasma de erva-cidreira brasileira do Departamento de Fitotecnia, do Instituto de Agronomia da UFRRJ utilizados.

Genótipo	Procedência	Genótipo	Procedência
UFRRJ ECB001	Rio de Janeiro – RJ	UFRRJ ECB024	Nova Era - MG
UFRRJ ECB002	Rio de Janeiro – RJ	UFRRJ ECB025	Nova Era - MG
UFRRJ ECB005	Seropédica – RJ	UFRRJ ECB027	Nova Era - MG
UFRRJ ECB011	Queimados – RJ	UFRRJ ECB029	Rio de Janeiro - RJ
UFRRJ ECB012	Queimados – RJ	UFRRJ ECB030	Nova Era - MG
UFRRJ ECB015	Queimados – RJ	UFRRJ ECB031	Nova Era - MG
UFRRJ ECB016	Queimados – RJ	UFRRJ ECB032	Antônio Dias - MG
UFRRJ ECB017	Queimados – RJ	UFRRJ ECB033	Hematita - MG
UFRRJ ECB018	Queimados – RJ	UFRRJ ECB035	Duque de Caxias - RJ
UFRRJ ECB019	Queimados – RJ	UFRRJ ECB036	Rio de Janeiro - RJ
UFRRJ ECB020	Queimados – RJ	UFRRJ ECB037	Volta Redonda - RJ
UFRRJ ECB021	Nova Era – MG	UFRRJ ECB038	Caeté - MG
UFRRJ ECB022	Funilândia – MG	UFRRJ ECB040	Rio de Janeiro - RJ
UFRRJ ECB023	Belo Oriente - MG		

### 2.3 Composição química do óleo essencial

### 2.3.1 Extração do óleo essencial

Plantas adultas tiveram suas folhas colhidas e identificadas por genótipo. O material vegetal foi colocado em estufa de circulação forçada de ar (Eletrolab EL 402, Brasil) a 37° C durante 48 horas, tempo em que atingiu o peso constante. Para a extração do óleo essencial 30 g de folhas secas foram transferidos para um balão de 1000 mL contendo 500 mL de água destilada, em seguida realizou-se a hidrodestilação do material, em aparelho de Clevenger, por 1 h e 30 min. O hidrolato obtido foi submetido à partição líquido-líquido com diclorometano, a fração orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada com fluxo de N<sub>2</sub> gasoso até atingir massa estável, a qual foi expressa em porcentagem (% m/m), com auxílio de uma balança analítica. Por fim, o óleo puro foi armazenado em frascos de vidro âmbar a -20°C.

### 2.3.2 Cromatografia

Para separar, detectar e quantificar os constituintes químicos dos óleos essenciais da erva-cidreira-brasileira foi injetado 1 µL de amostra em Cromatógrafo Gasoso (Hewlett-Packard 5890 Series II, Agilent, USA), equipado com um detector de ionização de chama (CG-DIC) e injetor no modo “split” (1:20). As substâncias foram separadas em uma coluna capilar de sílicas fundida modelo Agilent J&W VF-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O hélio foi utilizado como gás carreador com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. A programação da temperatura do forno foi de 60°C por 2 min com incremento de 5°C min<sup>-1</sup> até 110°C, seguido por incremento de 3°C min<sup>-1</sup> até 150°C e, finalmente, seguido por incremento de 15°C min<sup>-1</sup> até 290°C, mantidos por 15 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 e 290°C, respectivamente. Um Cromatógrafo Gasoso acoplado ao espectrômetro de massa QP-2010 Plus (Shimadzu, JPN) foi utilizado para separar e analisar as substâncias presentes nos óleos essenciais. O fluxo de hélio, a coluna capilar e a programação de temperatura para a análise por CG-EM foram as mesmas descritas para a análise por CG-DIC. As temperaturas do injetor e de interface foram de 220 e 250 °C, respectivamente. O espectro de massa foi obtido em um detector quadrupolo operando a 70 eV, com intervalo de massa entre 40 e 400 m/z e a razão de 0,5 scan s<sup>-1</sup>. A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada com base na comparação dos índices de retenção calculados (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963) e dos espectros de massa obtidos com aqueles descritos na literatura (ADAMS, 2007) e no banco de dados do equipamento (Biblioteca NIST 2008).

## 2.4 Marcador ISSR

### 2.4.1 Extração do DNA

Folhas jovens completamente expandidas foram utilizadas para obtenção do DNA genômico da erva-cidreira brasileira. Essas foram coletadas, identificadas, envolvidas em papel alumínio e mantidas resfriadas até a chegada ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas do DFitto/IA/UFRRJ. No laboratório, as folhas foram submetidas à extração imediata do DNA. O protocolo de extração adotado para a obtenção de DNA em quantidade e qualidade adequados para as reações de PCR foi o método baseado em CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*) proposto por Doyle e Doyle (1990), com as adaptações descritas a seguir.

Aproximadamente 250 mg de folhas frescas foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para tubos Eppendorf de 2 mL, previamente identificados. Em seguida foi

adicionado 850µL de tampão de extração, pré-aquecido a 65°C e incubado em banho-maria a 65°C por 60 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga Mikro 120 (Hettich®) a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 2 mL, em seguida adicionou-se 800 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA/24:1) e centrifugado por aproximadamente 10 minutos a 14.000 rpm. A fase aquosa superior foi transferida para novos tubos de 2 mL. O DNA foi precipitado pela adição de 450µl de isopropanol gelado, seguido da inversão suave e seu armazenamento a -20°C por duas horas e meia. O precipitado foi recuperado por meio de nova centrifugação dos tubos a 14.000 rpm durante 10 minutos. Depois do descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%, seguido de mais uma lavagem com etanol 95%. Após centrifugar os tubos com álcool etílico 95% por 5 minutos a 14000 rpm os precipitados foram secos a temperatura ambiente.

Os precipitados foram ressuspensos em 200 µl de TE [1 mL de Tris-HCl (1 M/pH 8,0), 0,2 mL de EDTA (0,5 M/pH 8,0)] contendo RNase e incubados em banho-maria a 37°C por 30 min. Em seguida, acrescentou-se ao material 20 µl de NaCl 5 M e 150 µl de isopropanol gelado. Os tubos foram armazenados a -4°C por um período *over night*. Procedeu-se uma nova centrifugação de 14.000 rpm e repetiu-se o processo de lavagem com etanol descrito anteriormente. Os precipitados foram ressuspensos em 200 µl de TE e armazenados em microtubos eppendorf (1,5 mL) e acondicionados em freezer.

#### **2.4.2 Quantificação e qualidade do DNA genômico**

A integridade do DNA foi observada por eletroforese em gel de agarose a 2%, onde utilizou-se 5 µl de DNA e 2 µl de uma solução de gel *red e blue juice*. As concentrações de DNA nas amostras foram estimadas em espectrofotômetro (*Thermo Scientific Nanodrop 2000*, USA). Em seguida, o DNA foi diluído para a concentração de 5ng.µL<sup>-1</sup> para as reações de polimerase em cadeia (PCR). Tanto o DNA estoque quanto as amostras de trabalho foram mantidas a -20°C.

#### **2.4.3 Condições de amplificação**

Foi realizado um *screening* com 51 *primers* do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), dentre os quais 14 apresentaram qualidade na amplificação dos fragmentos de DNA de erva-cidreira brasileira e polimorfismo. As sequências e temperaturas de anelamento encontram-se descritas na Tabela 2.

**Tabela 2** Relação de *primers* de marcadores ISSR utilizados com respectivas temperaturas de anelamento (TA).

Sequência 5'– 3'	TA (C°)
(AG) <sub>8</sub> T	52
DBD(AC) <sub>7</sub>	52
(AC) <sub>8</sub> CG	55
(AG) <sub>8</sub> YC	50
(GA) <sub>8</sub> T	52
(AC) <sub>8</sub> CT	47
(GAA) <sub>6</sub> A	50
(GA) <sub>8</sub> C	50
(GA) <sub>8</sub> YT	47
TA(CAG) <sub>4</sub>	50
(CT) <sub>8</sub> AC	40
(CA) <sub>6</sub> AG	40
(CAC) <sub>3</sub> GC	40
CGA(GA) <sub>6</sub>	50

Legenda: Y= C ou T; B= C, G ou T; D= A, G ou T

#### 2.4.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR):

As concentrações adotadas para um volume final de reação de 13 µl de solução foram: 1,5 µL de solução de dNTPs a 100 µM; 1,5 µL de solução tampão 20x para PCR; 0,5 µL de MgCl<sub>2</sub> à 2,4 mmol L<sup>-1</sup>; 0,12 µL da enzima Taq DNA Polimerase, 6,38 µL de água ultra-pura, 2 µL de DNA (5ng.µl<sup>-1</sup>) e 1 µl de *primer* a 0,3 µM.

As reações de PCR consistiram de: uma fase inicial de desnaturação (94°C/ 3 minutos), seguida por 40 ciclos de desnaturação (94°C/1 minuto), anelamento (1 minuto com temperatura dependente do *primer*), extensão (72°C/2minutos) e uma fase de extensão final de 72°C por sete minutos. Todas as reações foram realizadas em termociclador modelo Gene Amp PCR System Thermal cycler - Applied Biosystems®, USA).

#### 2.4.5 Fotodocumentação e obtenção da matriz binária

Os produtos das reações de PCR (volume 13 µl) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados após coloração com solução de *blue juice* (azul de bromofenol e gel *red*) completando o volume de 20 µl. Os produtos amplificados foram fotodocumentados por meio do Fotodocumentador MiniBis-Pro 16mm (*Bio-imaging System*, Israel) e as imagens capturadas no programa GelCapture. Os perfis *ISSR* foram obtidos pela presença ou ausência de bandas de alta intensidade.

Todos os géis obtidos foram avaliados manualmente, e a interpretação dos padrões de bandas exibidos pelos géis levou em consideração o princípio em que bandas geradas por um mesmo *primer* e que ocupam a mesma posição relativa referem-se à amplificação do mesmo fragmento de DNA, ou seja, pertencem ao mesmo loco gênico, enquanto bandas ocupando posições relativas diferentes são de locos distintos. As bandas polimórficas foram caracterizadas como presença (valor 1) ou ausência (valor 0). Somente as bandas com alta fluorescência foram consideradas. Após análise das bandas foi obtida a matriz binária, a qual foi submetida a análise estatística.

## 2.5 Análises estatísticas

Formada uma matriz de dados binários, a partir da análise das bandas obtidas dos perfis ISSR, a matriz de distância genética foi calculada utilizando o índice de similaridade de Jaccard (1908). Para os dados relacionados a composição química dos óleos essenciais, estimou-se a distância euclidiana. As análises de agrupamento foram realizadas usando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean*) (SOKAL; MICHENER, 1958) por meio das matrizes de distâncias obtidas anteriormente, tanto para os dados binários, quanto para os dados químicos.

Para estimar o número ótimo de grupos nos dendrogramas foi utilizada a técnica de Kelley *et al.* (1996) (*Kelley-Gardner-Sutcliffe penalty function*). A consistência dos agrupamentos foi avaliada por meio do cálculo da correlação entre a matriz fenética (matriz de distância original) e a matriz cofenética (matriz de agrupamento obtida), tanto para os dados moleculares, quanto para os químicos. As significâncias foram testadas por meio do Teste de Mantel (teste Z) com 1000 permutações (MANTEL, 1967).

Na análise da composição química dos óleos essenciais foram considerados apenas as substâncias que apresentaram concentração superior a 0.5% em pelo menos um dos genótipos, os demais foram considerados como traços. Foi realizado teste de médias para as concentrações das substâncias, por meio do teste t, ao nível de 5 e 1%.

Para a caracterização da diversidade genética, de acordo com os perfis químicos identificados, as similaridades dentro e entre os grupos foram estimadas via algoritmo ANOSIM (Análise de Similaridade) (CLARKE; GREEN, 1988). Essa análise promove uma estatística *R* definida para o intervalo entre -1 e +1. A estatística ANOSIM *R* é baseada na diferença de classificações médias entre os grupos ( $r_B$ ) e dentro dos grupos ( $r_W$ ), de modo que:  $R = (r_B - r_W) / (N(N - 1) / 4)$ . Os valores de *R* são baseados na diferença das classificações médias entre e dentro dos grupos, onde zero indica agrupamento aleatório, ou seja, não há diferenças significativas entre os grupos, enquanto que valores próximos de +1 e -1 sugerem maior diferença entre e dentro dos grupos, respectivamente (OKSANEN *et al.*, 2019).

Os dendrogramas UPGMA, Molecular e Químico, baseados nas matrizes cofenéticas (matrizes de agrupamento obtidas), foram comparados e o coeficiente de entrelaçamento entre os dendrogramas foi calculado, com o objetivo de verificar a relação entre os mesmos e a possibilidade de seleção de perfis químicos a partir dos marcadores moleculares ISSR. A importância das variáveis (componentes químicos) na variância química foi calculada conforme Singh (1981).

Todas as análises foram realizadas no Programa R, versão 3.6.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Diversidade química

Com base nas substâncias contidas no óleo essencial dos genótipos de erva-cidreira brasileira quimiótipo citral, observa-se no dendrograma UPGMA (Figura 1 Químico – lado direito da figura), a existência de dois grandes grupos. Estes grupos contiveram em seu interior, seis subgrupos de genótipos, os quais foram estatisticamente distintos, conforme algoritmo kgs (Kelley-Gardner-Sutcliffe) (KELLEY *et al.*, 1996). A distância entre os dois grandes grupos foi estimada em 12,67 (Figura 1 Químico – lado direito da Figura). Um desses grupos foi

formado pelos subgrupos I e II (37,03% dos genótipos), e o outro, formado pelos demais grupos, a saber: III, IV, V e VI (62,97% dos genótipos) (Figura 1 Químico – lado direito da Figura). O subgrupo I foi formado apenas por 01 dos 27 genótipos estudados (3,70%), o subgrupo II, o maior, com 09 genótipos (33,33%), o subgrupo III com 03 genótipos (11,11%), o subgrupo IV com 01 genótipo (3,70%), V com 08 genótipos (29,63%) e o subgrupo VI com 05 genótipos (18,52%). Este alto número de subgrupos formados indica uma alta diversidade química entre os genótipos citral estudados. O coeficiente de correlação cofenética entre a matriz fenética euclidiana e cofenética UPGMA foi estimado em 94,9%, significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel. Esta correlação aponta para um ótimo ajuste entre as referidas matrizes. As dissimilaridades genéticas, com base na composição química dos óleos essenciais dos 27 genótipos, variaram de 0,74 a 12,67 respectivamente, entre os genótipos UFRRJ ECB 024 e UFRRJ ECB022, e entre os dois grandes grupos. A distância genética média foi estimada em 9,1.

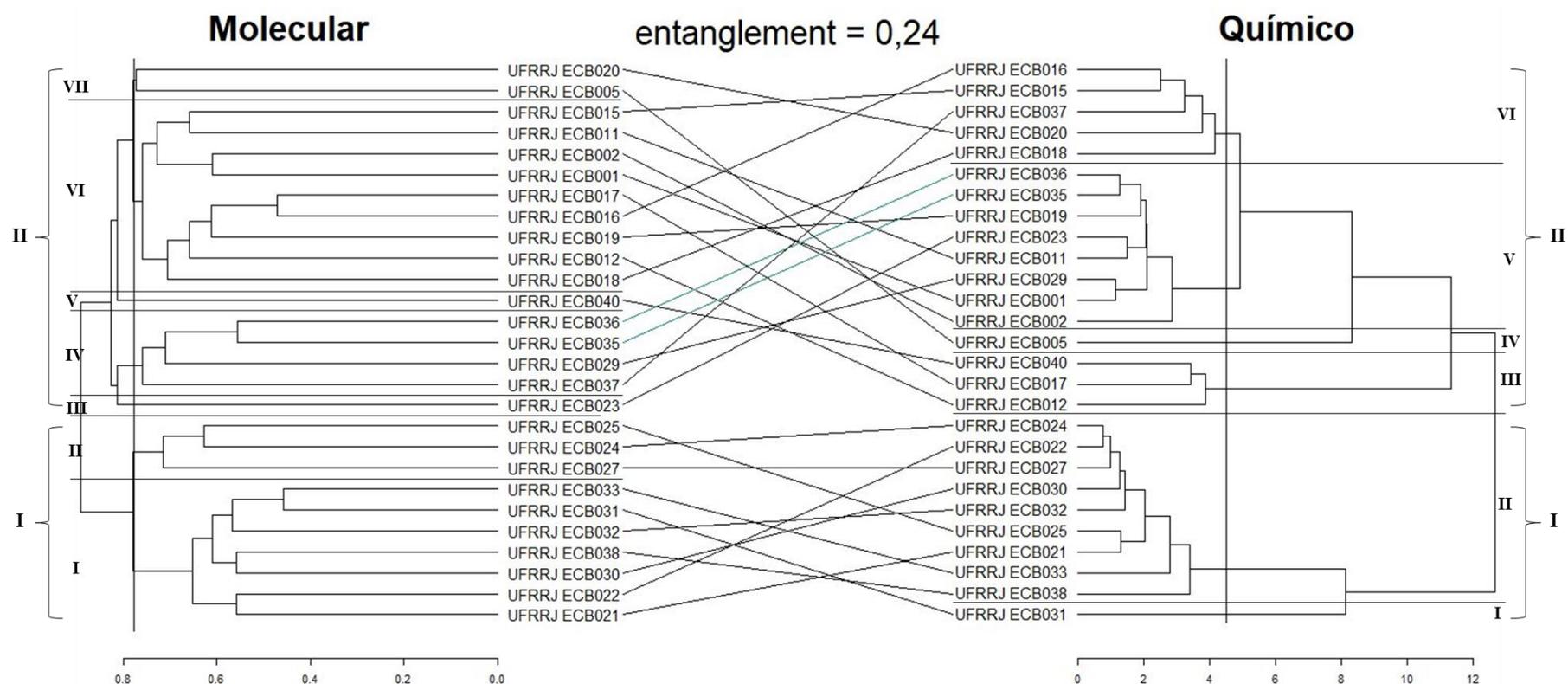
Embora os dois grandes grupos formados tenham sido divididos, em quase sua totalidade, por procedência - em suma, o grupo I conteve genótipos provenientes do Estado de Minas Gerais, já o grupo II, conteve genótipos em sua grande maioria, provenientes do Estado do Rio de Janeiro, exceção apenas para o genótipo UFRRJ ECB023 - é mais seguro inferir que o agrupamento se deu em função da composição química dos genótipos, e não pelas suas respectivas procedências, ou regiões de origem. Genótipos que se desenvolvem *in situ* nas duas regiões brasileiras estudadas (Rio de Janeiro e Minas Gerais), tendem, ‘na sua grande maioria’, a expressar características químicas do óleo essencial semelhantes, quando a comparação é realizada entre plantas do mesmo quimiótipo.

Ademais, os resultados aqui apresentados, também apontam alta diversidade química entre genótipos de um mesmo quimiótipo, provenientes de regiões diferentes. Blank *et al.* (2015) ao analisar a diversidade química presente em 48 acessos de erva-cidreira brasileira, provenientes de diferentes cidades, de 13 estados brasileiros, observaram variação significativa nas concentrações dos compostos entre os acessos, que, segundo os autores, foi devida a origem destes. Jannuzzi *et al.* (2011) também identificaram diferença significativa entre os compostos majoritários do óleo essencial de 17 acessos de erva-cidreira brasileira originados de sete estados brasileiros, todavia, os autores não mencionam similaridades por região.

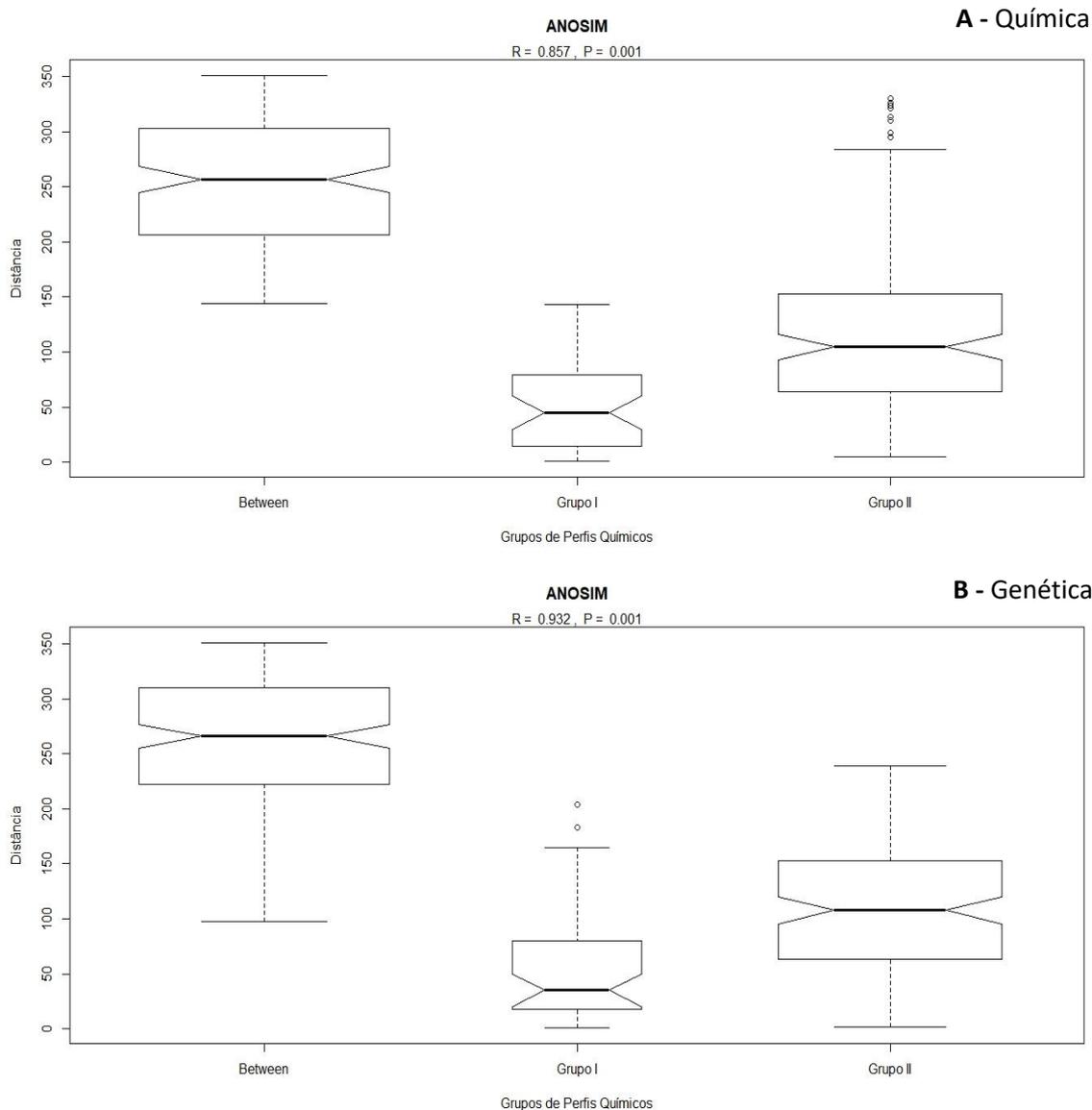
Os metabólitos secundários das plantas desempenham importantes papéis ecológicos e evolutivos, uma teoria clássica que explica a evolução da diversidade química das plantas é que novas defesas surgem através de relação co-evolucionária entre as plantas e seus inimigos naturais especializados (SALAZAR *et al.*, 2018). Desta forma a diversidade química observada entre as diferentes regiões de procedência dos genótipos, pode estar relacionada à presença de diferentes inimigos naturais, específicos de cada região, bem como as condições edafoclimáticas de cada ambiente, que ocasionaria e/ou favoreceria a ocorrência de determinados genótipos, que apresentem certos compostos químicos, em detrimento de outros. Toda variação fenotípica química é atribuível aos efeitos de genes, meio ambiente e interação desses, e isso se estende a variação fenotípica com ontogenia e fenologia das plantas (MOORE *et al.*, 2014).

O índice de diversidade estimado via algoritmo de ANOSIM, indicou que os genótipos do Rio de Janeiro (Grupo II) apresentam maior diversidade química quando comparado com os genótipos de Minas Gerais (Grupo I). Os índices foram estimados, respectivamente, em 104,50 e 45,00 (Figura 2). Os resultados obtidos via algoritmo ANOSIM, revelaram uma alta diversidade entre os dois grandes grupos identificados, e que essas foram estatisticamente distintas ( $R = 0,85$ ; significância = 0,001). ANOSIM tem a capacidade de detectar diferenças entre grupos através da comparação dos índices, mesmo em tamanho de amostras diferentes. Isso ratifica a alta diversidade química existente entre os genótipos do Estado do Rio de Janeiro (Grupo II). Porém, uma análise mais minuciosa permitiu inferir que, apesar da alta diversidade

química existente entre os genótipos de erva-cidreira brasileira do Rio de Janeiro, um dos genótipos de Minas Gerais foi o que exibiu um perfil químico de óleo essencial muito distinto dos genótipos de sua mesma origem. O genótipo UFRRJ ECB023 teve o perfil químico de seu óleo essencial mais parecido com genótipos da outra região, do que da sua própria região de origem (Figura 1 Químico – lado direito). Na pesquisa realizada por Sabino *et al.* (2012), com 35 indivíduos de *Lippia graveolens*, originados de oito populações de regiões distintas da Guatemala, foi observada uma tendência na distribuição geográfica dos quimiotipos, com ocorrência de uma área de transição, onde observou-se a presença de diferentes quimiotipos.



**Figura 1.** Comparação entre dois dendrogramas de dissimilaridade genética entre os 27 genótipos de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*), pertencentes à Coleção de germoplasma da UFRRJ. Dendrograma esquerdo: UPGMA baseado na matriz de dados binária e uso do coeficiente de similaridade de Jaccard (Molecular); Dendrograma direito: UPGMA baseado na matriz de dissimilaridade da distância euclidiana gerada com base na composição química do óleo essencial (Químico).



**Figura 2.** “*Boxplots*” representando a diversidade química (A) e genética (B), obtidas via algoritmo ANOSIM, utilizando-se a distância euclidiana e a similaridade de Jaccard, respectivamente, entre e dentro de genótipos pertencentes aos dois grupos de perfis químicos identificados, para os 27 genótipos de erva-cidreira brasileira analisados. Barra horizontal em negrito, na caixa, indica mediana; a parte inferior da caixa indica o 25º percentil; o topo da caixa indica o 75º percentil; as semirretas pontilhadas ligam respectivamente os quartis ao valor mínimo e ao máximo do conjunto de dados; círculos representam *outliers*.

Ao todo foram identificados 61 componentes, dos quais 36 apresentaram concentração superior a 0,5% em pelo menos um dos genótipos e por essa razão foram considerados nas análises, os demais foram considerados como traços (Tabela 3). Soares *et al.* (2019) identificaram 63 componentes, para oito genótipos do quimiótipo citral, de erva-cidreira brasileira, dos quais apenas 14 apresentaram concentração média geral maior ou igual a 0,5%. Silva *et al.* (2006) identificaram 24 compostos diferentes para um genótipo de erva-cidreira brasileira cultivado em Ilhéus, na Bahia. Silva Júnior *et al.* (2019) relatam 57 compostos em 20

indivíduos de erva-cidreira brasileira cultivados em São Raimundo, município de Santarém, Estado do Pará.

A variação na produção de diferentes compostos pelas plantas pode estar ligada tanto a fatores genéticos (VERMA; SHUKLA, 2015; WOLDEMARIAN *et al.*, 2013) quanto a fatores ambientais, tais como fertilidade e tipo do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura, poluição atmosférica (VERMA; SHUKLA, 2015) interações e adaptações coevolutivas entre planta-planta, planta-animal e planta-microrganismos (EHRLICH; RAVEN, 1964; SALAZAR, *et al.*, 2018). A existência de diversidade química entre os genótipos analisados confere a estes um importante potencial de utilização para fins também diversos. Como exemplo podemos citar diferentes propriedades terapêuticas proporcionadas pelas diferentes combinações naturais de compostos, na elaboração de fitoterápicos, que têm como princípio básico a atividade biológica relacionada a um determinado complexo fitoquímico de ocorrência natural (ANVISA, 2019). Da mesma forma, a diversidade química presente nos óleos essenciais aqui estudados permite que estes possam ser utilizados também na elaboração de cosméticos, perfumes, aditivos na indústria de alimentos (flavorizantes, aromatizantes) e no controle de pragas. Atividades estas que podem vir a se beneficiarem da ação conjunta das diferentes combinações de componentes contidos no óleo, assim como da diversidade de aromas proporcionados por estas diferentes combinações.

Devido ao potencial apresentado pela espécie, a erva-cidreira brasileira é uma espécie bastante estudada atualmente, tanto no que diz respeito à composição química de seu óleo essencial, seu teor e rendimento (JANNUZZI *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 1996; OSPINA *et al.*, 2016; TELES *et al.*, 2012; YAMAMOTO *et al.*, 2008), quanto com relação as aplicações deste (CHIES *et al.*, 2013; GEROMINI *et al.*, 2015; HELDWEIN *et al.*, 2014; LÓPEZ *et al.*, 2011; NICULAU *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2015;). Nos estudos mencionados, os principais componentes e/ou quimiótipos relatados, bem como avaliados quanto sua aplicação são o Citral, seguido da Carvona, Limoneno, Linalol e Germacreno-D.

**Tabela 3.** Percentuais dos componentes químicos presentes nos óleos essenciais de 27 genótipos de erva-cidreira brasileira (continua)

Substância	TRM	IA cal	IA tab	Genótipo								
				UFRRJ ECB001	UFRRJ ECB002	UFRRJ ECB005	UFRRJ ECB011	UFRRJ ECB012	UFRRJ ECB015	UFRRJ ECB016	UFRRJ ECB017	
α-pineno	8.38	932	932	0.23	0.41	0.03	0.33	0.21	0.31	0.35	0.21	
sabineno	9.73	972	969	0.20	0.37	0.51	0.22	0.21	0.27	0.16	0.13	
6-methyl-5-hepten-2-one	10.18	986	981	0.57	0.72	0.48	0.56	0.44	0.39	0.41	0.44	
mirreno	10.40	991	988	2.16	2.83	4.50	2.01	8.34	3.17	2.92	7.14	
1,4 cineol	11.47	1016	1012	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
p-cimeno	11.81	1023	1020	0.23	0.38	4.46	0.26	0.29	0.38	0.39	0.27	
limoneno	12.02	1028	1024	0.15	0.84	0.00	0.31	0.30	0.22	0.21	0.33	
(Z)-β-ocimeno	12.38	1037	1032	0.10	0.00	0.27	0.13	0.48	0.12	0.11	0.44	
(E)-β-ocimeno	12.81	1047	1044	0.54	0.68	1.32	0.46	0.72	0.86	0.76	0.82	
g-terpineno	13.36	1057	1054	0.00	0.00	1.46	0.11	0.00	0.00	0.08	0.07	
linalol	15.19	1101	1095	1.40	1.09	2.52	0.94	1.15	0.94	1.15	1.72	
exo-isocitral	17.28	1145	1140	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00	0.55	0.00	
trans-a-necrodol	17.51	1148	1144	0.42	0.45	0.00	0.51	0.64	0.00	0.29	0.72	
(Z)-isocitral	18.17	1164	1160	0.45	0.59	0.78	0.43	0.45	0.55	0.51	0.49	
epóxido de rosefuranal	18.70	1175	1173	0.26	0.17	0.44	0.41	0.28	0.58	0.32	0.30	
(E)-isocitral	19.05	1183	1177	0.55	0.74	0.84	0.65	0.40	0.66	0.70	0.39	
mirtenal	19.73	1195	1195	0.68	0.65	0.00	0.70	0.69	0.59	0.63	1.13	
<b>neral*</b>	22.01	1243	1138	32.22	31.58	30.31	31.77	26.42	31.44	30.35	27.47	
<b>geranial*</b>	23.44	1274	1264	44.92	42.62	43.28	44.08	34.74	45.85	44.29	37.84	
mirtenil acetato	25.86	1325	1324	0.29	0.26	0.00	0.34	1.20	0.42	0.49	1.56	
geranil acetato	28.49	1385	1379	0.00	0.00	0.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
β-bourbonene	28.51	1384	1387	0.00	0.00	0.00	0.17	1.19	0.29	0.24	1.25	
β-cubebeno	28.78	1389	1387	0.40	0.40	0.59	0.46	0.23	0.14	0.00	0.00	
β-elemeno	28.93	1391	1389	0.00	0.00	0.00	0.00	1.60	1.38	1.38	1.46	
β-cariofileno	30.22	1418	1408	3.93	4.12	1.49	3.87	5.06	3.61	4.32	4.36	
α-humuleno	31.68	1451	1452	0.00	0.00	0.53	0.56	0.97	0.40	0.47	1.02	
(E)-β-farneseno	32.00	1457	1454	0.00	0.00	0.00	0.09	0.31	0.13	0.15	0.30	
germacreno D	32.91	1480	1484	0.25	0.53	0.22	0.50	3.71	1.15	1.20	2.74	
biciclogermacreno	33.39	1495	1500	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Lavandulil-2 metil-butanoato	33.98	1508	1511	0.36	0.22	0.00	0.00	0.45	0.00	0.00	0.41	
d-cadineno	34.45	1523	1522	0.62	0.54	0.00	0.00	0.58	0.00	0.00	0.35	
elemol	35.74	1551	1548	0.09	0.39	0.00	0.00	0.56	0.00	0.00	0.00	
germacreno B	36.18	1555	1559	0.00	0.00	1.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
(E)-nerolidol	36.26	1566	1561	0.72	0.71	0.00	0.78	1.46	0.47	0.39	1.19	
óxido de cariofileno	37.28	1582	1582	7.43	7.39	1.70	8.26	5.24	4.81	6.03	4.03	
guaíol	37.86	1601	1600	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

TRM = tempo de retenção em minutos; IAcal e IAtab = índices de retenção calculado e de acordo com literatura (ADAMS, 2007), respectivamente. \* isômeros que formam o composto citral.

**Tabela 3.** Continuação

Substância	Genótipo									
	UFRRJ ECB018	UFRRJ ECB019	UFRRJ ECB020	UFRRJ ECB021	UFRRJ ECB022	UFRRJ ECB023	UFRRJ ECB024	UFRRJ ECB025	UFRRJ ECB027	UFRRJ ECB029
α-pineno	0.00	0.22	0.66	0.00	0.00	0.27	0.00	0.00	0.03	0.24
sabineno	0.11	0.17	0.76	0.48	0.40	0.25	0.39	0.47	0.44	0.22
6-methyl-5-hepten-2-one	0.48	0.56	0.67	0.32	0.27	0.65	0.32	0.33	0.29	0.70
mirreno	4.55	2.06	4.21	0.27	0.23	2.25	0.23	0.29	0.24	2.16
1,4 cineol	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.09	0.11	0.10	0.00
p-cimeno	0.28	0.26	0.80	2.40	2.01	0.36	2.12	2.11	2.09	0.30
limoneno	0.00	0.28	0.42	7.57	6.71	0.34	6.42	7.20	7.22	0.15
(Z)-β-ocimeno	0.39	0.54	0.58	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.15
(E)-β-ocimeno	0.89	0.00	1.08	0.30	0.32	0.48	0.28	0.31	0.32	0.53
g-terpineno	0.09	0.00	0.18	2.72	2.38	0.10	2.27	2.79	2.59	0.04
linalol	0.74	0.81	0.77	1.27	0.86	1.00	1.00	1.10	0.92	1.11
exo-isocitral	0.00	0.00	0.14	0.15	0.19	0.00	0.16	0.20	0.22	0.00
trans-a-necrodol	0.38	0.44	0.29	0.14	0.18	0.33	0.19	0.17	0.18	0.31
(Z)-isocitral	0.45	0.27	0.90	0.70	0.72	0.44	0.66	0.78	0.81	0.22
epoxido de rosefuranal	0.63	0.35	0.34	0.45	0.23	0.27	0.39	0.22	0.37	0.30
(E)-isocitral	0.53	0.31	1.13	0.97	0.94	0.60	0.83	1.00	1.10	0.33
mirtenal	0.32	0.66	0.51	0.00	0.00	0.66	0.15	0.14	0.15	0.71
<b>neral*</b>	30.46	31.22	31.75	29.63	29.56	31.43	30.04	28.77	29.90	32.14
<b>geranial*</b>	42.98	44.72	44.37	42.38	43.39	43.53	43.49	42.26	43.42	45.53
mirtenil acetato	0.00	0.10	0.26	0.00	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.26
geranil acetato	0.00	0.31	0.47	0.09	0.12	0.32	0.13	0.11	0.09	0.20
β-bourbonene	0.00	0.00	0.21	0.00	0.00	0.08	0.09	0.11	0.00	0.00
β-cubebeno	0.61	0.49	0.00	0.04	0.29	0.32	0.07	0.29	0.06	0.25
β-elemeno	0.00	0.00	0.00	0.03	0.17	0.07	0.04	0.17	0.03	0.00
β-cariofileno	5.88	4.76	2.42	0.32	0.34	3.07	0.29	0.33	0.25	3.58
α-humuleno	0.45	0.65	0.14	0.18	0.19	0.03	0.17	0.21	0.18	0.55
(E)-β-farneseno	0.25	0.01	0.12	0.15	0.18	0.53	0.17	0.18	0.16	0.06
germacreno D	1.82	0.33	0.77	2.93	3.03	0.18	2.86	3.26	2.83	0.15
biciclogermacreno	0.00	0.00	0.00	0.22	0.38	0.00	0.35	0.42	0.21	0.00
Lavandulil-2 metil-butanoato	0.79	0.23	0.00	0.10	0.15	0.17	0.14	0.17	0.09	0.33
d-cadineno	0.53	0.28	0.23	0.27	0.46	0.38	0.46	0.48	0.21	0.47
elemol	0.00	0.15	0.00	3.23	3.09	0.12	3.03	2.71	2.83	0.00
germacreno B	0.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
(E)-nerolidol	0.76	0.60	0.32	0.64	0.58	0.68	0.56	0.57	0.53	0.61
oxido de cariofileno	4.26	8.50	3.35	0.00	0.00	7.94	0.00	0.00	0.00	7.12
guaiol	0.00	0.00	0.00	0.56	0.51	0.00	0.53	0.52	0.42	0.00

TRM = tempo de retenção em minutos; IAcad e IAtab = índices de retenção calculado e de acordo com literatura (ADAMS, 2007), respectivamente. \* isômeros que formam o composto citral.

**Tabela 3.** Continuação

Substância	Genótipo								
	UFRRJ ECB030	UFRRJ ECB031	UFRRJ ECB032	UFRRJ ECB033	UFRRJ ECB035	UFRRJ ECB036	UFRRJ ECB037	UFRRJ ECB038	UFRRJ ECB040
$\alpha$ -pineno	0.04	0.00	0.03	0.00	0.12	0.19	0.60	0.00	0.44
sabineno	0.43	0.45	0.41	0.39	0.15	0.09	0.33	0.57	0.16
6-methyl-5-hepten-2-one	0.32	0.37	0.36	0.23	0.54	0.53	0.43	0.36	0.41
mirreno	0.24	0.24	0.22	0.22	1.58	2.06	4.29	0.31	7.00
1,4 cineol	0.10	1.89	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	0.00
p-cimeno	2.14	7.40	1.82	1.91	0.22	0.27	0.57	2.46	0.33
limoneno	6.45	2.47	7.31	6.62	0.00	0.21	0.35	9.46	0.26
(Z)- $\beta$ -ocimeno	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41	0.19	0.00	0.38
(E)- $\beta$ -ocimeno	0.28	0.26	0.30	0.28	0.47	0.00	0.86	0.37	0.81
g-terpineno	2.52	1.02	2.20	2.33	0.00	0.00	0.20	2.87	0.09
linalol	0.93	0.24	0.89	0.92	1.32	1.09	1.44	1.11	1.52
exo-isocitral	0.22	0.19	0.23	0.21	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00
trans-a-necrodol	0.20	0.19	0.18	0.18	0.34	0.50	1.01	0.18	0.75
(Z)-isocitral	0.82	0.35	0.88	0.74	0.46	0.34	0.60	0.89	0.42
epoxido de rosefuranal	0.39	0.12	0.22	0.40	0.42	0.26	0.27	0.25	0.47
(E)-isocitral	1.09	1.09	1.17	1.01	0.52	0.36	0.69	1.20	0.36
mirtenal	0.15	0.14	0.13	0.15	0.69	0.54	0.47	0.00	0.90
<b>neral*</b>	30.50	29.09	30.82	30.42	31.72	31.99	29.79	29.69	26.00
<b>geranial*</b>	44.09	41.56	43.55	45.58	44.90	45.55	43.09	42.07	37.07
mirtenil acetato	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.28	0.39	0.00	1.25
geranil acetato	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.34	0.00	1.42
$\beta$ -bourbonene	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$\beta$ -cubebeno	0.27	0.39	0.50	0.00	0.49	0.43	0.24	0.21	0.00
$\beta$ -elemeno	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.49	0.28	1.62
$\beta$ -cariofileno	0.23	0.36	0.20	0.00	4.09	3.74	3.45	0.21	5.57
$\alpha$ -humuleno	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.14	0.78
(E)- $\beta$ -farneseno	0.13	0.20	0.34	0.00	0.61	0.53	0.18	0.12	0.28
germacreno D	2.77	4.03	2.81	3.54	0.54	0.61	1.50	2.17	2.58
biciclogermacreno	0.46	0.72	0.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00
Lavandulil-2 metil-butanoato	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40
d-cadineno	0.72	0.84	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.44
elemol	2.74	3.95	2.99	2.80	0.67	0.61	0.00	2.41	0.00
germacreno B	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
(E)-nerolidol	0.48	0.73	0.52	0.54	0.81	0.66	0.51	0.42	1.31
oxido de cariofileno	0.00	0.00	0.00	0.00	8.71	8.41	4.71	0.12	5.88
guaiol	0.59	0.62	0.48	0.64	0.00	0.00	0.00	0.31	0.00

TRM = tempo de retenção em minutos; IAcad e IAtab = índices de retenção calculado e de acordo com literatura (ADAMS, 2007), respectivamente. \* isômeros que formam o composto citral.

### 3.2 Diversidade molecular

Assim como para o perfil químico de óleo essencial, os marcadores de DNA do tipo ISSR também apontaram para uma ampla diversidade genotípica entre estes mesmos genótipos. Esta tese é reforçada tanto pelo número de subgrupos estatisticamente distintos no dendrograma UPGMA, estimado em sete, como pela alta distância entre e dentro de grupos (Figura 1 Molecular – lado esquerdo). O número de subgrupos no dendrograma foi estimado conforme o algoritmo kgs (Kelley-Gardner-Sutcliffe) (KELLEY *et al.*, 1996). A correlação cofenética entre as matrizes fenética e cofenética foi estimada em 92,9%, significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel. A alta correlação indica que o dendrograma apresentou um bom ajuste entre a matriz fenética e a cofenética. De acordo com Sokal e Rohlf (1962), valores de correlação cofenética superiores a 80% indicam um bom ajuste entre a matriz original de distância e a análise de agrupamento resultante.

As dissimilaridades genéticas entre os 27 genótipos variaram de 0,46 a 0,89 e a distância genética média foi estimada em 0,82. Conforme a Figura 1 (Molecular – lado esquerdo), a menor dissimilaridade ocorreu entre os genótipos UFRRJ ECB031 e UFRRJ ECB033 (Grupo I), com distância de 0,46. Enquanto que a máxima dissimilaridade foi observada entre o genótipo UFRRJ ECB 040 (Grupo V) e os genótipos UFRRJ ECB031 e UFRRJ ECB033 (Grupo I) (Figura 1 Molecular – lado esquerdo). No dendrograma pode-se observar que o grupo V, formado apenas pelo genótipo UFRRJ ECB 040, foi o mais distante. Estes resultados confirmam a existência de alta diversidade genética entre os genótipos.

Observa-se no dendrograma que o subgrupo I foi formado por 07 dos 27 genótipos estudados (25,92%), o subgrupo II com 03 genótipos (11,11%), o grupo III com 01 genótipo (3,70%), o subgrupo IV com 04 genótipos (14,81%), o subgrupo V com 01 genótipo (3,70%), o subgrupo VI, o maior subgrupo, com 09 genótipos (33,33%) e o subgrupo VII com 02 genótipos (7,40%). Os sete subgrupos formados foram distribuídos em dois grandes grupos. O grupo I, o menor, agrupou 10 genótipos (37,04%), todos pertencentes aos subgrupos I e II. O maior grupo, conteve 17 genótipos (62,96%) dos 27 analisados, e agrupou, logicamente, os outros cinco grupos estatisticamente distintos. A distribuição dos genótipos entre esses grupos foi idêntica ao agrupamento relativo à composição química do óleo essencial (Figuras 1). Apenas a distribuição dos genótipos (subgrupos) dentro dos dois grandes grupos foi distinta entre os agrupamentos químico e molecular. O grupo I conteve os subgrupos I e II, e o grupo II, o maior, os demais subgrupos, a saber: III, IV, V, VI e VII. A distância entre os dois grandes grupos foi estimada em 0,89. Isso denota uma distância relativamente alta entre os genótipos agrupados nos grupos I e II. Portanto, com base nestes resultados e assim como na análise química, a análise molecular, no geral, também agrupou os genótipos com base na sua procedência. O grupo I agrupou genótipos com origem em Minas Gerais, enquanto que o grupo II, genótipos com origem no Rio de Janeiro e mais um de Minas Gerais (UFRRJ ECB023). Em se tratando dos dois grandes grupos, a análise molecular foi idêntica a análise do perfil químico. Interessante observar que, no caso molecular em específico, o genótipo UFRRJ ECB023, com origem em Minas Gerais, mostrou-se o mais distante entre os genótipos do grupo II, basicamente composto por genótipos do Rio de Janeiro. Mesmo assim, tanto na análise química quanto na molecular, este genótipo ainda foi mais próximo dos genótipos do Rio de Janeiro do que dos genótipos de Minas Gerais. Pierre *et al.* (2011) observaram o agrupamento de genótipos de erva-cidreira brasileira, provenientes de diferentes localidades, em um mesmo grupo, ao avaliarem a diversidade genética presente entre indivíduos de três quimiótipos distintos e de três estados brasileiros, através de marcadores moleculares do tipo RAPD. Já Manica-Cattani *et al.* (2009) ao analisar a variabilidade genética presente em 27 acessos de erva-cidreira-

brasileira, de diferentes localidades do estado do Rio Grande do Sul, por meio de marcadores ISSR e RAPD, não observaram a formação de grupos e concluíram que a variação genética não estava associada à origem geográfica.

Além de uma alta diversidade genética entre grupos citada anteriormente, verificou-se também a existência de uma razoável diversidade intragrupos (Figura 1 Molecular – lado esquerdo), principalmente, entre os genótipos distribuídos no grupo II, com origem no Rio de Janeiro (exceto o UFRRJ ECB023). Estimativas obtidas via algoritmo ANOSIM, também apontaram para o grupo II como detentor de maior diversidade genética em relação ao grupo I, com genótipos coletados em Minas Gerais. Estas estimativas foram de 107,75 e 35,00, respectivamente (Figura 2). Estes valores foram estatisticamente distintos ( $R = 0,93$ ; significância = 0,001). O que revela ainda uma alta diversidade entre os dois grandes grupos identificados. Portanto, com base nos resultados acima mencionados, verifica-se a ocorrência de uma alta diversidade genética presente entre os 27 genótipos de erva-cidreira brasileira quimiótipo citral estudados. Esses resultados apontam para a presença de variabilidade genética entre genótipos de erva-cidreira brasileira do mesmo quimiótipo. Resultados semelhantes foram encontrados por Jannuzzi *et al.* (2011), Manica-Catanni *et al.* (2009) e Soares *et al.* (2019), no que diz respeito a ocorrência de diversidade entre genótipos pertencentes ao mesmo quimiótipo. A diversidade genética entre quimiótipos de erva-cidreira brasileira foi também relatada por Almeida *et al.* (2018), enquanto que Morone-Fortunato *et al.* (2010) mostraram em sua pesquisa a ocorrência de diversidade genética tanto entre, quanto dentro do mesmo quimiótipo de *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *Italicum*.

### **3.3 Relação entre análise química e molecular – Seleção de plantas quanto a qualidade do óleo essencial**

A Figura 1 mostra o coeficiente de entrelaçamento (“*entanglement*”) entre o agrupamento químico e molecular, estimado em 0,24. O coeficiente de entrelaçamento reflete a qualidade do alinhamento entre dois dendrogramas. A sua estimativa varia de 1,0 a zero, respectivamente, esses valores informam entrelaçamento completo e nenhum entrelaçamento. Valores baixos do coeficiente de entrelaçamento indicam um bom alinhamento entre os dendrogramas (GALILI, 2015; 2019). Portanto, de forma geral, a correspondência entre os dendrogramas referentes a análise química e a análise molecular foram bastante satisfatórias (Figura 1), ou seja, houve uma tendência de que os genótipos permanecessem no mesmo grupo tanto nos dois tipos de análise. Esse apontamento é verdadeiro quando é analisado apenas os dois grandes grupos no dendrograma.

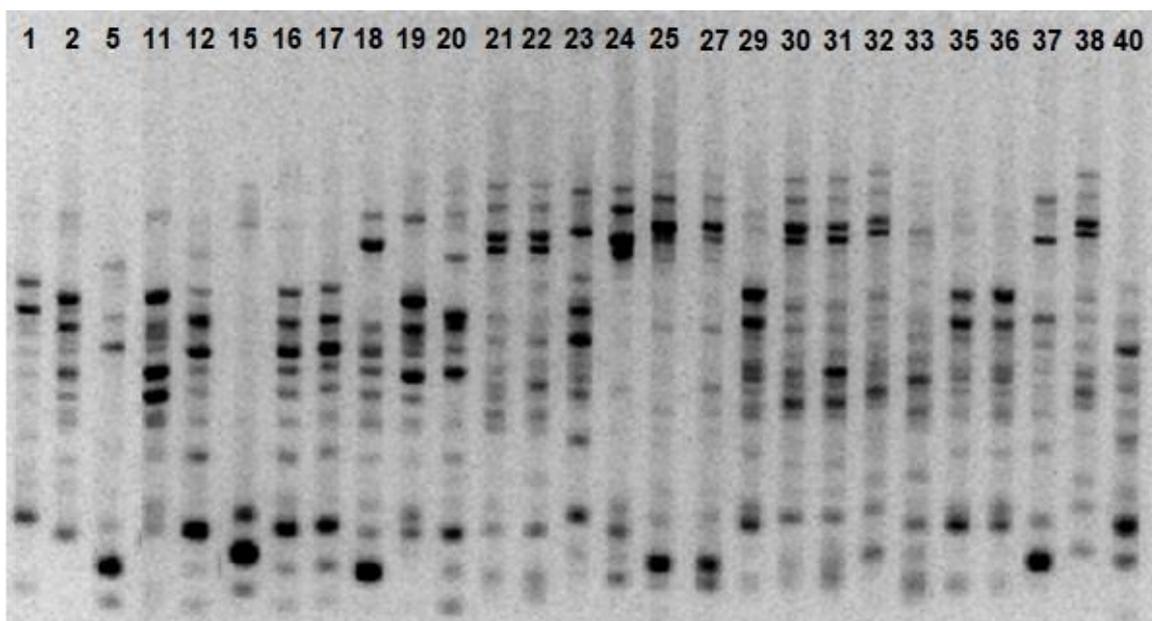
Com base nas semelhanças entre os referidos dendrogramas (Figura 1), pode-se inferir que a análise molecular proporcionou um agrupamento de genótipos baseados mais no perfil químico de óleo essencial, do que com base na região de origem das plantas. Essa inferência pode ser feita porque o genótipo UFRRJ ECB023, com origem em Minas Gerais, agrupou entre os genótipos com origem no Rio de Janeiro. Portanto, é mais seguro e correto dizer que os agrupamentos ocorreram com base no perfil químico do óleo essencial dos genótipos, ao invés da sua procedência.

Os marcadores moleculares consistem em uma importante ferramenta auxiliar na seleção de genótipos em programas de melhoramento genético, sendo atualmente amplamente empregado, inclusive na seleção de genótipos com base na qualidade da composição química, representada pela presença de metabólitos secundários de interesse (BHATTACHARYYA *et*

al., 2015; BOSZORMÉNYI *et al.*, 2009; ECHEVERRIGARAY *et al.*, 2001; KAUR *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2019).

Na pesquisa realizada por Echeverrigaray *et al.*, (2001) dois grupos foram formados, pelas cultivares de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.), tanto em análise via marcadores moleculares do tipo *Randomly Amplified Polymorphic* (RAPD), quanto na análise da composição química do óleo essencial. Houve também uma correspondência entre a posição dos cultivares nas análises de agrupamento, ocupando estas a mesma ordem, sugerindo uma alta relação entre o perfil químico e a variabilidade genética observada. Boszorményi *et al.* (2009) também relataram uma forte relação entre o perfil químico e a variabilidade genética presente em cultivares de sálvia (*Salvia officinalis* L.) e (*Salvia judaica* Boiss.) através de análises de agrupamentos baseadas na composição do óleo e em marcadores RAPD.

Em relação a análise molecular foram observadas 123 bandas, dessas, 109 (88,6%) foram polimórficas e 14 (11,4%) foram monomórficas. A média foi de 8,78 fragmentos (bandas) por *primer*. O *primer* (AC)8CG) apresentou o menor número de bandas, e o *primer* (GAA)6AA) (Figura 3), o maior, respectivamente de quatro e 15 bandas (Tabela 4). O polimorfismo gerado reflete um bom desempenho dos *primers* ISSR na avaliação da diversidade genética existente entre os genótipos analisados. Além disso, os *primers* ISSR utilizados na presente análise foram eficientes em distinguir os genótipos em relação a concentração de importantes substâncias presentes no óleo essencial dos genótipos analisados.

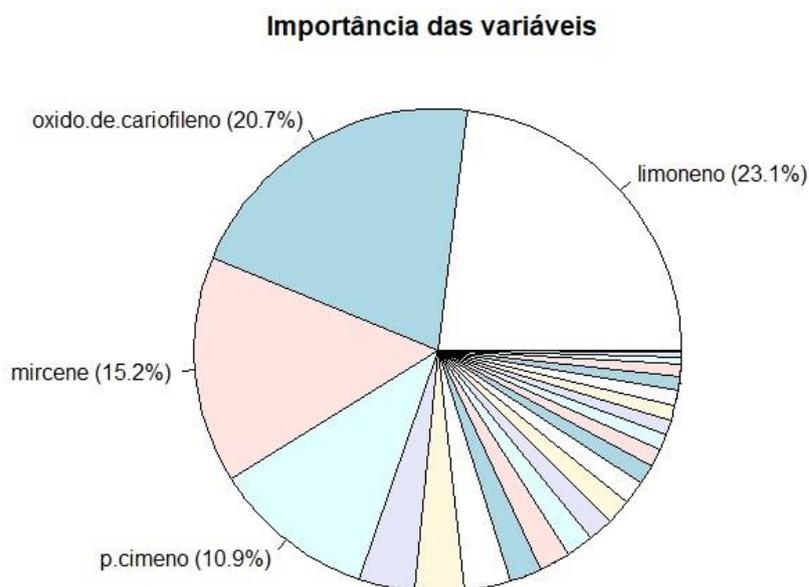


**Figura 3.** Padrão de amplificação pelo *primer* (GAA) 6A de ISSR em gel de agarose de 27 genótipos de erva-cidreira brasileira (números nos topos das colunas correspondem aos códigos dos genótipos, ex: 1 = UFRRJ ECB001; 2 = UFRRJ ECB002).

**Tabela 4.** Relação de *primers* de marcadores ISSR utilizados, com número de marcas registradas e porcentagem de polimorfismo dos fragmentos amplificados de DNA genômico de erva-cidreira brasileira.

Sequência 5'– 3'	Nº de marcas	% de polimorfismo
(AG) <sub>8</sub> T	13	92,3
DBD(AC) <sub>7</sub>	05	60
(AC) <sub>8</sub> CG	04	100
(AG) <sub>8</sub> YC	08	100
(GA) <sub>8</sub> T	10	100
(AC) <sub>8</sub> CT	07	85,7
(GAA) <sub>6</sub> A	15	100
(GA) <sub>8</sub> C	05	60
(GA) <sub>8</sub> YT	10	60
TA(CAG) <sub>4</sub>	14	100
(CT) <sub>8</sub> AC	06	100
(CA) <sub>6</sub> AG	06	100
(CAC) <sub>3</sub> GC	05	80
CGA(GA) <sub>6</sub>	08	100

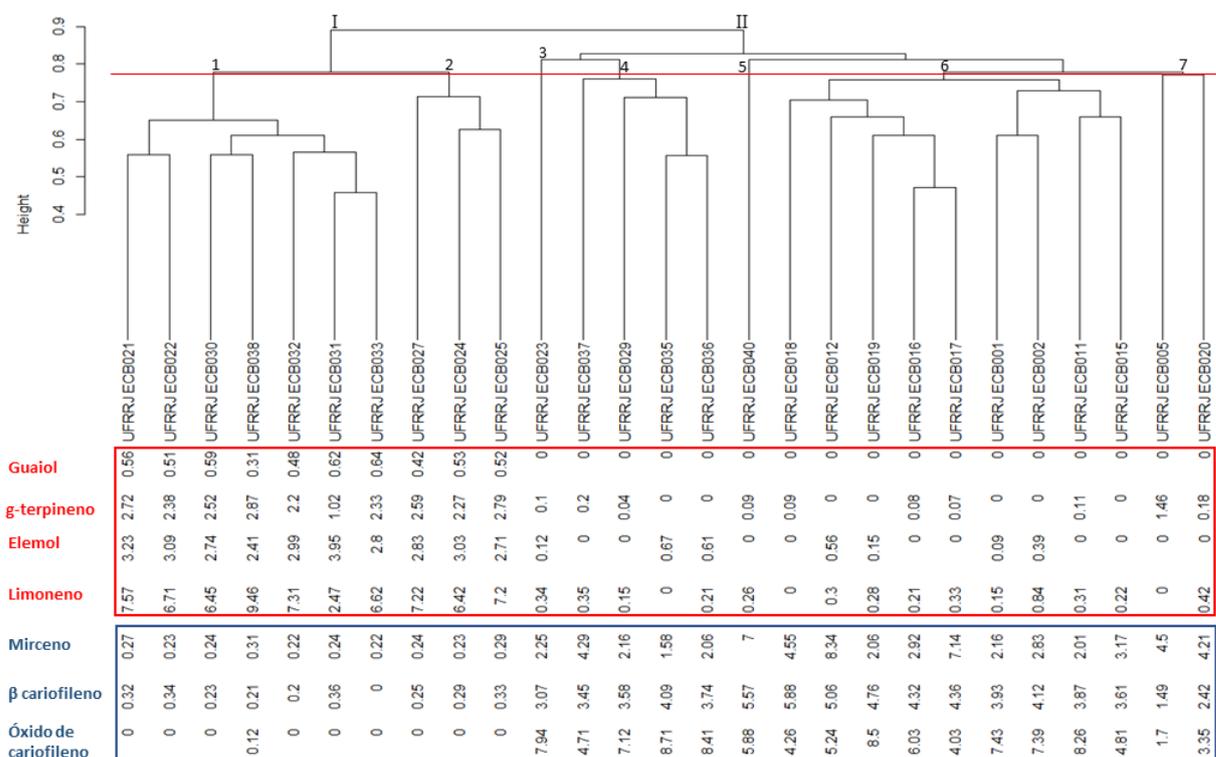
Em relação à análise química, as substâncias que mais influenciaram na definição dos grupos foram: limoneno, oxido de cariofileno, mirceno e p-mirceno. Juntas, estas três substâncias representaram 70,0% de toda a variância química (Figura 4). Estas estimativas foram obtidas conforme metodologia proposta por Singh (1981).



**Figura 4.** Importância das variáveis (componentes químicos) na variância química. Calculada conforme Singh (1981)

Conforme apresentado no dendrograma molecular (Figuras 1 e 5), nota-se que as concentrações em todos os genótipos do grupo I foram muito superiores a médias dos genótipos do grupo II em relação ao limoneno. Enquanto que para o oxido de cariofileno e mirceno, as médias superiores foram para os genótipos do grupo II. Estas médias foram estatisticamente distintas pelo Teste t para comparação de médias duas a duas ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 5). As médias para o limoneno foram de 6,74 e 0,26%, enquanto que para o oxido de cariofileno, de 0,01 e 6,11%, e para o mirceno, 0,25 e 3,72%, respectivamente para o grupo I e II (Tabela 5).

Além do limoneno, oxido de cariofileno e mirceno, acrescenta-se a esta lista as seguintes substâncias: elemol, g-terpineno, guaiol e  $\beta$ -cariofileno. Estes metabólitos também apresentaram médias notadamente superior em um grupo ou outro (Tabela 5). O elemol, g-terpineno e guaiol foram notadamente superiores no grupo I, enquanto que o  $\beta$ -cariofileno, superior no grupo II. Todas as médias foram estatisticamente distintas pelo Teste t para comparação de médias duas a duas ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 5). Vale destacar o guaiol, cuja média no grupo I foi de 0,52%, enquanto que no grupo II, nenhum dos genótipos teve esta substância detectada (Figura 5 e Tabela 5).



**Figura 5.** Dendrograma UPGMA, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard, de dados obtidos através de marcadores ISSR de 27 genótipos de erva-cidreira brasileira, pertencentes a Coleção de Germoplasma da UFRRJ, com componentes químicos e suas respectivas concentrações encontradas nos Grupos I e II.

**Tabela 5.** Concentração média (%) dos 36 componentes encontrados nos óleos essenciais dos 27 genótipos de erva-cidreira brasileira e percentuais correspondentes aos perfis químicos do Grupo I e do Grupo II.

Metabólito	Grupo I		Grupo II		Média			
	Média	(%) do total	Média	(%) do total				
Geranial	43.18 <sup>ns</sup>	73.02	42.90 <sup>ns</sup>	73.38	73,20			
Neral	29.84 <sup>ns</sup>		30.48 <sup>ns</sup>					
Limoneno	6.74 <sup>**</sup>	<b>12.61</b>	0.26 <sup>**</sup>	0.55	6,58			
Elemol	2.98 <sup>**</sup>		0.15 <sup>**</sup>					
g-terpineno	2.37 <sup>**</sup>		0.14 <sup>**</sup>					
Guaiol	0.52 <sup>**</sup>		0.00 <sup>**</sup>					
Oxido de cariofileno	0.01 <sup>**</sup>		6.11 <sup>**</sup>					
$\beta$ -cariofileno	0.25 <sup>**</sup>	0.51	3.96 <sup>**</sup>	<b>13.78</b>	7,15			
Mirceno	0.25 <sup>**</sup>		3.72 <sup>**</sup>					
$\rho$ -cimeno	2.64 <sup>**</sup>		0.59 <sup>**</sup>					
$\alpha$ -pineno	0.01 <sup>**</sup>		0.28 <sup>**</sup>					
Sabineno	0.44 <sup>**</sup>		0.25 <sup>**</sup>					
6-metil-5-hepten-2-one	0.32 <sup>**</sup>		0.53 <sup>**</sup>					
1,4 cineol	0.25 <sup>ns</sup>		0.01 <sup>ns</sup>					
(Z)-b-ocimeno	0.00 <sup>**</sup>		0.26 <sup>**</sup>					
(E)-b-ocimeno	0.30 <sup>**</sup>		0.66 <sup>**</sup>					
Linalol	0.92 <sup>*</sup>		1.22 <sup>*</sup>					
Exo-isocitral	0.20 <sup>**</sup>		0.05 <sup>**</sup>					
Trans-a-necrodol	0.18 <sup>**</sup>		0.43 <sup>**</sup>					
(Z)-isocitral	0.73 <sup>**</sup>		0.49 <sup>**</sup>					
Epoxido de rosefuranal	0.30 <sup>ns</sup>		0.36 <sup>ns</sup>					
(E)-isocitral	1.04 <sup>**</sup>		0.57 <sup>**</sup>					
Mirtenal	0.10 <sup>**</sup>		12.47			0.62 <sup>**</sup>	11.06	11,76
Myrtenil acetato	0.00 <sup>**</sup>					0.45 <sup>**</sup>		
Geranil acetato	0.05 <sup>ns</sup>					0.22 <sup>ns</sup>		
$\beta$ -boubonene	0.02 <sup>ns</sup>					0.20 <sup>ns</sup>		
$\beta$ -cubebeno	0.21 <sup>ns</sup>					0.30 <sup>ns</sup>		
$\beta$ -elemeno	0.07 <sup>*</sup>					0.53 <sup>*</sup>		
$\alpha$ -humuleno	0.11 <sup>**</sup>					0.41 <sup>**</sup>		
(E)- $\beta$ -farneseno	0.16 <sup>ns</sup>	0.21 <sup>ns</sup>						
Germacreno D	3.02 <sup>**</sup>	1.10 <sup>**</sup>						
Biciclogermacreno	0.37 <sup>**</sup>	0.00 <sup>**</sup>						
Lavandulil-2 metil-butanoato	0.06 <sup>*</sup>	0.20 <sup>*</sup>						
d-cadineno	0.38 <sup>ns</sup>	0.26 <sup>ns</sup>						
germacreno B	0.00 <sup>ns</sup>	0.13 <sup>ns</sup>						
(E)-nerolidol	0.56 <sup>ns</sup>	0.70 <sup>ns</sup>						
Metabólitos com concentração inferior a 0,5%	-	1,39		-	1,23	1,31		

\* e \*\*: médias na mesma linha significativamente distintas ao nível de 5 e 1% de probabilidade pelo teste t; ns: não significativo.

De posse das informações acima, pode-se inferir que as semelhanças genotípicas podem, na verdade, indicar que os *primers* ISSR aqui utilizados, amplificaram bandas de DNA que possam estar relacionadas com a expressão gênica de algumas substâncias contidas no óleo essencial dos genótipos analisados. Assim sendo, identificar, no presente trabalho, as substâncias que contribuem de forma efetiva para o padrão de agrupamento aqui encontrado é um passo importante no desenvolvimento de tecnologia baseada na seleção assistida por marcadores de DNA para qualidade de óleo essencial em erva-cidreira brasileira quimiótipo citral.

Diante do exposto, pode-se inferir que os *primers* ISSR utilizados foram eficientes em distinguir genótipos de erva-cidreira brasileira quimiótipo citral com alta concentração de limoneno, oxido de cariofileno, mirceno, elemol, g-terpineno, guaiol e  $\beta$ -cariofileno. Estes

resultados indicaram também que, os *primers* ISSR tiveram a capacidade de distinguir genótipos de erva-cidreira brasileira em relação a 13,72% da concentração de substâncias presentes no óleo essencial (Tabela 5). Esse percentual será especialmente alto quando se nota que todos os genótipos aqui analisados correspondem a um mesmo quimiótipo, o citral (neral + geranial). Esta substância, em média, é responsável por 73,20% da concentração dos óleos essenciais de todos os genótipos analisados (Tabela 5). Portanto, excluindo-se o percentual de citral, comum a todos os genótipos analisados, fica evidente que as substâncias limoneno, oxido de cariofileno, mirceno, elemol, g-terpineno, guaiol e  $\beta$ -cariofileno responderão por um percentual de 53,84% da concentração de substâncias presentes no óleo essencial dos genótipos citral, ao invés de 13,72% anteriormente apresentado. De acordo com Soares *et al.* (2019), as chances do citral (geranial + neral) serem drasticamente reduzidos no óleo essencial de quimiótipos citral em erva-cidreira brasileira são mínimas, já que o efeito de genótipo é muito mais importante do que o de ambiente na determinação dessas substâncias. Neste sentido, pode-se inferir que a análise molecular pode ser usada como uma importante ferramenta para distinguir selecionar genótipos de erva-cidreira quimiótipo citral em relação à qualidade do óleo essencial.

A seleção assistida por marcadores (SAM) tem a vantagem de não sofrer influências ambientais, por se tratar de uma análise à nível de DNA. Tratando-se de variáveis relacionadas a qualidade do óleo essencial, ou seja, a composição química do óleo, o uso de marcadores moleculares apresenta grande importância, pois permite a identificação de perfis químicos, independente do ambiente (seja este, época ou local). Pois, conforme observado por Soares *et al.* (2019), em análise da composição química do óleo essencial de oito genótipos de erva-cidreira brasileira, em duas épocas (verão e inverno), o ambiente (estação) influenciou fortemente a síntese de 24 metabólitos, dos 31 considerados no estudo. Citral e seus isômeros geranial e neral permaneceram estáveis durante as estações do ano.

Além da destacada importância comercial do citral, o limoneno é também muito utilizado comercialmente, como um importante aditivo em alimentos (FERRONATTO; ROSSI, 2018), cosméticos, produtos de higiene (MA *et al.*, 2020), devido ao seu agradável odor cítrico, e em repelentes e inseticidas naturais (MALACRINÒ *et al.*, 2016; SHOWLER *et al.*, 2019), além de seu potencial farmacológico (ALMEIDA *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2013). O limoneno, juntamente com outros terpenoides como mirceno,  $\beta$ -cariofileno e óxido de cariofileno, são componentes de sabor e fragrância comumente empregados em produtos para o consumo humano, por serem reconhecidos como seguros pelas agências reguladoras (HAO *et al.*, 2015).

Os marcadores ISSR aqui empregados permitiram a identificação de genótipos que apresentam importantes concentrações dos compostos acima citados, em seu óleo essencial e, desta forma, possuem um grande potencial para serem utilizados na seleção de genótipos, com o propósito de se obter tais compostos, visando a exploração comercial dos mesmos. Porém, outros aspectos, relacionados ao seu potencial produtivo, devem também ser levados em consideração na seleção, como produção de biomassa e rendimento de óleo essencial.

Através dessa tecnologia se faz possível a seleção de plantas com composição química conhecida em estágios iniciais de desenvolvimento da planta, com o propósito de se selecionar aquelas que apresentem a composição química do óleo essencial de interesse.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (No. Ed. 4). Allured publishing corporation. 2007.

ALMEIDA, A. A. C. *et al.* Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. Vol. 118, p. 69–78, 2014.

ALMEIDA, M. C. *et al.* Genetic diversity and chemical variability of *Lippia* spp. (Verbenaceae). **BMC Res Notes**, Vol. 11, n.725, 2018.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos Fitoterápicos. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/>> Consulta em 20-10-2019.

BHATTACHARYYA, P.; KUMARIA, S.; TANDON, P. Applicability of ISSR and DAMD markers for phyto-molecular characterization and association with some important biochemical traits of *Dendrobium nobile*, an endangered medicinal orchid. **Phytochemistry**. Vol. 117, p. 306–316, 2015.

BLANK, A. F. *et al.* Chemical Diversity in *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Germplasm. **The Scientific World Journal**, 11 pages, 2015.

BOSZORMÉNYI, A. *et al.* Chemical and Genetic Relationships among Sage (*Salvia officinalis* L.) Cultivars and Judean Sage (*Salvia judaica* Boiss.). **J. Agric. Food Chem.**, Vol. 57, p. 4663–4667, 2009.

BRANDÃO, A. D., VICCINI, L. V., RECCO-PIMENTEL, S. M. Meiotic analysis of two putative polyploidy species of Verbenaceae from Brazil. **CARYOLOGIA** Vol. 58, no. 4: 315-319, 2005.

BRANDÃO, A. D. *et al.* Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **J Plant Res**. 120:317–321, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Cultivar web – Gerenciamento de Informação. [WWW Document]. URL [http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares\\_protegidas.php](http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_protegidas.php) (Acessado em 28.01.20).

CARVALHO, D. F. *et al.* Avaliação da evapotranspiração de referência na região de Seropédica-RJ, utilizando lisímetro de pesagem. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Vol. 14, n. 2, p. 108-116, 2006.

CHIES, C. E. *et al.* Antioxidant Effect of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. **Antioxidants**, Vol. 2, p. 194-205, 2013.

CLARKE, K. R.; GREEN, R. H. Statistical design and analysis for a ‘biological effects’ study. **Marine Ecology Progress Series**. Vol. 92, p. 213-226, 1988.

COSTA, A. G. *et al.* Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta cultivada sob malhas. **Pesq. agropec. bras.** Vol.47 no.4, p.534-540, 2012.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. Vol. 12, p. 13-15, 1990.

ECHEVERRIGARAY, S. Correlation between the Chemical and Genetic Relationships among Commercial Thyme Cultivars. **J. Agric. Food Chem.**, Vol. 49, p. 4220-4223, 2001.

EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. **Evolution**, Vol. 18, n. 4, p. 586-608, Dec., 1964.

FERRONATTO, A. N.; ROSSI, R. C. Extraction and application of orange peel essential oil as a natural ingredient. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, Vol. 12, n. 2, p. 78-93, 2018.

GALILI, T. dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. **Bioinformatics**. v. 31(22): p. 3718–3720, 2015.

GALILI, T. *et al.* Package 'dendextend'- Extending 'dendrogram' Functionality in R. Version 1.12.0. 2019-05-11. Disponível em: < <https://cran.r-project.org/package=dendextend>>. Acessado em 17-09-2019.

GEROMINI, K. V. N. *et al.* Fungicidal effect of *Lippia alba* essential oil on a white-rot fungus. **Maderas. Ciencia y tecnología** Vol. 17, n.1 p. 29 - 38, 2015.

HAO, D. C.; GU, X-J; XIAO, P. G. Phytochemical and biological research of *Cannabis* pharmaceutical resources. In: **Medicinal Plants: Chemistry, Biology and Omics**. Elsevier Ltd. p. 431-464, 2015.

HELDWEIN, C. G. *et al.* S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, Vol. 41, p. 621–629, 2014.

HENNEBELLE, J.; *et al.* Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology** 116, 211–222, 2008.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesAutomaticas>. Acesso em: 02/10/2017.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles**. Vol.44, p: 223–270. 1908.

JANNUZZI, H. *et al.* Avaliação agrônômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown] - quimiótipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.3, p.258-264, 2011.

KAUR, P. *et al.* Assessment of genetic diversity among different population of five *Swertia* species by using molecular and phytochemical markers. **Industrial Crops & Products**. Vol. 138, p. 3-10, 2019.

KELLEY, L. A.; GARDNER, S. P.; SUTCLIFFE, M. J. An automated approach for clustering an ensemble of NMR derived protein structures into conformationally-related subfamilies. **Protein Engineering**, Vol. 9, p. 1063-1065, 1996.

LIMA, N. G. P. B. *et al.* Anxiolytic-like activity and GC–MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. Vol. 103, p. 450–454, 2013.

LIU, Z. *et al.* Metabolite profiles of essential oils and SSR molecular markers in *Juniperus rigida* Sieb. et Zucc. from different regions: A potential source of raw materials for the perfume and healthy products. **Industrial Crops & Products**. Vol. 133, 424–434, 2019.

LÓPEZ, M. A.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. **Genetics and Molecular Biology**, Vol. 34, n. 3, p. 479-488, 2011.

LOUCHARD, B. de O.; ARAÚJO, T. G. de. Pharmacological effects of different chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas**. Vol. 18, n. 2, p. 95 – 105, 2019.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Ann. Rev. Em/. Syst.** Vol. 15, p. 65-95, 1984.

MA, L. *et al.* Effects of lemon essential oil and limonene on the progress of early caries: *An in vitro* study. **Archives of Oral Biology**. Vol 111, 104638, 2020.

MALACRINÒ, A. *et al.* Fumigant and Repellent Activity of Limonene Enantiomers Against *Tribolium confusum* du Val. **Neotrop Entomol.** Vol. 45, p. 597–603, 2016.

MANICA-CATTANI, M. F. *et al.* Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, Vol. 69, n. 2, p. 375-380, 2009.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Vol. 27, n. 2, p. 209-202, 1967.

MATOS, F. J. de A. *et al.* Essential Oil Composition of Two Chemotypes of *Lippia alba* Grown in Northeast Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, 8,695-698, 1996.

MOORE, B. D. *et al.* Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. **New Phytologist**, Vol. 201, p. 733–750, 2014.

MORONE-FORTUNATO, I. *et al.* Essential oils, genetic relationships and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. **Industrial Crops and Products**. Vol. 32, p. 639–649, 2010.

NICULAU, E dos S. *et al.* Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* l'Herit E *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 9, 1391-1394, 2013.

OKSANEN, J., F. G. *et al.* Vegan: community ecology package. R package version 2.5-6. 2019 accessed through [<http://cran.r-project.org>]. 2019.

OSPINA, J. D.; OROZCO, M. S. S.; CORREA, C. R. B. Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson y *Lippia origanoides* Kunth. **Acta Agron.**, Vol. 65, n.2, p. 170-175, 2016.

PARRA-GARCÉS, M. I. *et al.* Morfología, anatomía, ontogenia y composición química de metabolitos secundarios en inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenaceae). **Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.** Vol. 58 (4): p. 1533-1548, December 2010.

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

PIERRE, P. M. O. *et al.* Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). **An Acad. Bra. Ciênc.** Vol. 83 (n.3), 2011.

PORFÍRIO, E. M. *et al.* *In Vitro* Antibacterial and Antibiofilm Activity of *Lippia alba* Essential Oil, Citral, and Carvone against *Staphylococcus aureus*. **The Scientific World Journal Volume**, 7 pages, 2017.

RAMOS, D. P.; CASTRO, A. F.; CAMARGO, M. N. Levantamento detalhado de solos da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia, Brasília, Vol. 8, n. 1, p. 1-27, 1973.

REIS, A. C. *et al.* *Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autopolyploid complex? **American Journal of Botany.** Vol. 101, n. 6, p. 1002–1012. 2014.

SABINO, J. F. P.; REYES, M. M.; BARRERA, C. D. F. Análise e discriminação de quimiotipos de *lippia graveolens* h.b.k. da Guatemala por microextração em fase sólida, CG-EM e análise multivariada. **Quim. Nova**, Vol. 35, n. 1, 97-101, 2012.

SALAZAR, D. *et al.* Origin and maintenance of chemical diversity in a species-rich tropical tree lineage. **Nature Ecology & Evolution.** Vol.2, p. 983–990, 2018.

SALIMENA, F. R. G; MÚLGURA, M. E. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. **Rodriguésia.** Vol. 66, n. 1, p. 191-197. 2015.

SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in the southeaster United States. **Havard papers in Botany**, Vol. 5, n. 2, p. 303-358, 2001.

SHOWLER, A.T.; HARLIEN, J. L.; de LÉON, A. A. P. Effects of Laboratory Grade Limonene and a Commercial Limonene-Based Insecticide on *Haematobia irritans irritans* (Muscidae: Diptera): Deterrence, Mortality, and Reproduction. **Journal of Medical Entomology**, Vol. 56, n. 4, p. 1064–1070, 2019.

SILVA, N. A. *et al.* Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, Vol. 8, n.3, p. 52-55, 2006.

SILVA, R. E. R. *et al.* Vasorelaxant effect of the *Lippia alba* essential oil and its major constituent, citral, on the contractility of isolated rat aorta. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Vol. 108, p.792–798, 2018.

SILVA JÚNIOR, A. Q. da. *et al.* Seasonal and circadian evaluation of a citral-chemotype from *Lippia alba* essential oil displaying antibacterial activity. **Biochemical Systematics and Ecology**. Vol. 85, p. 35–42, 2019.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics e Plant Breeding**, v.41, p.237-245, 1981.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. *et al.* Central nervous system and analgesic profiles of *Lippia* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Article in press. 2018.

SOARES, C. H. N. *et al.* Selection of genotypes (citral chemotype) of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown regarding seasonal stability of the essential oils chemical profile. **Industrial Crops & Products**. Vol. 139, 111497, 2019.

SOKAL, R. R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **Science Bulletin**. Vol. 38, p. 1409–1438. 1958.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Vol. 11, n. 2, p. 33-40, 1962.

SOUSA, M. S. *et al.* Chromosome banding and essential oils composition of Brazilian accessions of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Biologia**, Vol. 64, n. 4, p. 711—715, 2009.

SOUSA, D. G. *et al.* Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Braz J Med Biol Res**, Vol. 48, n. 8, 2015.

SOUZA, R. C. *et al.* Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. **Microbial Pathogenesis**. Vol. 113, p. 29–33, 2017.

TAVARES, E. S. *et al.* Análise do óleo essencial de folhas de três quimiótipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.** Vol. 15, n. 1, jan/mar. 2005.

TELES, S. *et al.* Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Industrial Crops and Products**. Vol. 37, 247– 252, 2012.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. Dec. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**. Vol. 2, n.4, p. 105-113, 2015.

WOLDEMARIAN, M *et al.* NaMYC2 transcription factor regulates a subset of plant defense responses in *Nicotiana attenuate*. **BMC Plant Biology**. Vol. 13, n. 73, p. 1-14, 2013.

YAMAMOTO, P. Y. *et al.* Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), Vol. 65, n.5, p.481-489, 2008.

XU, H-L. *et al.* Study on the correlation between genetic and chemical diversity of *Tetragymma hemsleyanum* on the basis of ISSR and UHPLC. **Process Biochemistry**. Vol. 84, p. 220–229, 2019.

## CONCLUSÕES GERAIS

- Uma alta estabilidade foi observada com relação a fertilidade dos gametas masculinos (grãos de pólen) dentro dos genótipos pertencentes ao quimiótipo citral.
- Os genótipos de *Lippia alba* analisados não apresentam sistemas de autoincompatibilidade genética, seja do tipo esporofítica, seja gametofítica. A autofecundação natural de tais genótipos encontra limitações, que podem estar relacionadas a presença de barreiras físicas e/ou químicas.
- Os *primers* ISSR utilizados foram eficientes em distinguir perfis químicos nos genótipos de erva-cidreira brasileira quimiótipo citral analisados.