

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Aline Amália do Vale

**PLASTICIDADE FENOTÍPICA EM ACESSOS DE *LIPPIA ALBA*
(MILL.) N. E. BR EX BRITTON & P. WILSON (VERBENACEAE)**

Juiz de Fora
2010

ALINE AMÁLIA DO VALE

**PLASTICIDADE FENOTÍPICA EM ACESSOS DE *LIPPIA ALBA*
(MILL.) N. E. BR EX BRITTON & P. WILSON (VERBENACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientador: Prof. Lyderson Facio Viccini

Juiz de Fora
2010

Aline Amália do Vale

**PLASTICIDADE FENOTÍPICA EM ACESSOS DE *LIPPIA ALBA* (MILL.) N. E. BR
EX BRITTON & P. WILSON (VERBENACEAE)**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em
Genética e Biotecnologia, da
Universidade Federal de Juiz de Fora,
como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Saúde.**

Aprovada em: 26/02/2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Lyderson Facio Viccini (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Marcelo de Oliveira Santos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Fátima Regina Gonçalves Salimena
Universidade Federal de Juiz de Fora

Alessandra Schnadelbach
Universidade Federal da Bahia

“Não é a mais forte ou a mais inteligente das espécies que sobrevive, mas a que é mais suscetível a mudanças.”

Charles R. Darwin (1859)

À Vera Lúcia que, com todos seus
atributos de mãe fantástica e amorosa,
me faz sempre
chegar até o fim.

DEDICO

Agradecimentos

- À minha amada família: meus pais - Vera e Alaor e meu irmão Alison, pelo amor, apoio e confiança incondicionais. Obrigada por me fazer sentir a filha mais amada do mundo!
- À professora e amiga Dra. Fátima Salimena por acreditar em meu trabalho, por me indicar e colocar sua “mão no fogo” por mim... Obrigada pelas dicas, palavras e pela confiança em mim depositada.
- Ao professor e orientador Dr. Lyderson Facio Viccini, pela orientação, pela disposição em acompanhar o trabalho e pelos conselhos válidos.
- À Universidade Federal de Juiz de Fora.
- Ao Programa de Pós-Graduação de Imunologia, Genética e Biotecnologia.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo fomento.
- Ao professor Dr. Marcelo de Oliveira Santos pelos aprendizados, pela ajuda com a orientação e pelas conversas divertidas no laboratório.
- À professora Dra. Alessandra Schnadelbach pelo auxílio com algumas análises realizadas, pelas dicas e pela disposição em participar da banca na defesa.
- À Embrapa/Cenargen e ao Dr. Roberto Fontes Vieira pelo envio dos acessos de *Lippia alba*.
- Ao querido companheiro Vinícius Dittrich, pelos maravilhosos momentos vividos desde o dia que o conheci. Obrigada pelo apoio e presença constantes e pelo importante auxílio na reta final deste trabalho.
- Ao querido amigo e professor MSc Luiz Menini Neto, pela sua sempre enorme e desinteressada boa vontade em ajudar. Obrigada pela orientação em vários aspectos deste trabalho, pelos conselhos, pelo auxílio com a morfologia, pelas fotos e também pela confecção das pranchas.
- Ao professor Dr. Paulo Pereira Peixoto, pelo auxílio com a propagação *in vitro* e pela disponibilidade do laboratório de Fisiologia Vegetal.
- Ao amigo Dr. Saulo Marçal por ajudar com as análises citogenéticas, estomáticas e palinológicas e pelas ótimas dicas no desenrolar deste trabalho.
- À toda equipe formada neste trabalho: Aryane Reis, Shaiany Lopes, Juliana Mainenti, Lucas Pinheiro e Rachid Aref, obrigada pela imensa ajuda e boa vontade na realização deste. Sem vocês este trabalho não teria sido feito!

- À saudosa amiga baiana Suzana Meira pela grande ajuda com a aclimação e transferência das plantas para a casa de vegetação, por dividir as angústias das disciplinas (as noites em *claro...*) e pela sua importante amizade e carinho. Muito obrigada, minha querida.
- À amiga Priciane Ribeiro pela amizade, pelas edificantes conversas do dia-a-dia e pelo auxílio com a dissertação e com todos os problemas inerentes a ela. Obrigada pela sua agradável companhia.
- À inesquecível “amiga-irmã” Luisa Brasil, pela eterna amizade, pela companhia constante mesmo à enorme distância, pelo apoio, amor e pelo carinho de sempre.
- À amiga Fernanda Sampaio pela amizade e pela imensa ajuda no processo seletivo para o mestrado e durante as disciplinas. Também devo a você, querida, ter conseguido passar por isso tudo!
- Aos amigos do laboratório de Fisiologia – Rodolfo Abrantes e Leandro Elias, pela imensa ajuda no cultivo *in vitro* e pelos incontáveis dias divertidos que desfrutei com vocês.
- Aos colegas do laboratório de Genética: Junya, Osmar, Ana Paula, Letícia, Neima, João e José Marcello.
- Aos colegas do herbário CESJ pelas conversas engraçadas e pelo ótimo clima de trabalho.
- Ao querido e saudoso Ariosto, pelo incalculável aprendizado, pelo ótimo partilhar na ciência, na filosofia e em outras áreas da vida.
- Ao meu muito querido tio Luís pelo seu enorme carinho e disposição em sempre estar ao meu lado; aos meus amados primos pelo carinho de sempre: Stanley, Elaine e Odair, e aos meus avós: Antônia e Antônio – obrigada pelo amor com que sempre me receberam.
- Às amadas amigas que me ajudaram muito com seu apoio durante o trabalho: Carolina, Amanda, Eveline, Miriam, Renata e Roberta.
- **E às plantinhas por serem os seres mais lindos, incríveis, fantásticos e misteriosos do planeta!**

O meu muito obrigada!

RESUMO

Lippia alba (Verbenaceae), popularmente conhecida no Brasil como erva cidreira, é amplamente distribuída nas Américas, onde ocorre em praticamente todos os tipos de ambientes, sendo muito cultivada para uso medicinal. A espécie apresenta grande plasticidade fenotípica, sendo possível observar variações quanto ao hábito, filotaxia, forma e dimensão das folhas, o que dificulta sua classificação taxonômica e a sua utilização na farmacologia. Análises anteriores revelaram a existência de diferentes quimiotipos com diferentes atividades farmacológicas. A proposta deste trabalho foi entender a ampla variação fenotípica existente em *L. alba*, por meio de uma abordagem multidisciplinar, utilizando 32 acessos da espécie coletados em diferentes regiões do Brasil e mantidos sob as mesmas condições ambientais. Além disso objetivou-se contribuir para a caracterização dos acessos e entender melhor os padrões de especiação em *Lippia*. Dentre os acessos analisados foram encontradas variações morfológicas tanto em caracteres vegetativos quanto em caracteres reprodutivos. Por meio da estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo foi possível dividir os acessos em sete grupos com quantidades significativamente diferentes de DNA. Os grupos variaram de 2,31 pg a 6,70 pg de DNA. Na contagem cromossômica realizada por análises em células meióticas e mitóticas foram observados seis números cromossômicos diferentes, $2n=30$, $2n=34$, $2n=51$, $2n=58$, $2n=60$ e $2n=93$, evidenciando níveis de ploidia diferentes na espécie. Na análise palinológica foram observados grãos de pólen com abertura di, tri ou tetracolporadas. Os grupos com acessos diplóides e com menores quantidades de DNA apresentaram apenas grãos tricolporados. Os grãos di e tetracolporados foram observados em acessos com maiores níveis de ploidia. Apesar dos resultados do presente estudo não terem auxiliado na divisão de grupos morfológicos bem definidos, eles demonstram que mesmo sob condições controladas os acessos apresentaram variações morfológicas evidenciando a existência de variação genética como um fator importante para explicar a grande plasticidade fenotípica observada. A existência de níveis de ploidias diferentes sugere que a espécie *Lippia alba* pode estar em processo de especiação. Além das variações morfológicas e citogenéticas, as variações estomáticas e palinológicas reforçam essa conclusão.

Palavras-chave: *Lippia Alba*. Variação morfológica. Variação cromossômica. Variação palinológica. Variação estomática. Plasticidade fenotípica.

ABSTRACT

Lippia alba (Verbenaceae), commonly known as *erva cidreira* in Brazil, is largely widespread in the Americas, where it grows in almost all environments. It is frequently grown for medicinal use. The species presents a high phenotypic plasticity, varying in habit, phyllotaxy, leaf form and size, thus putting difficulties to its taxonomical classification and use in pharmacology. Past analyses revealed the existence of different chemotypes with different pharmacological activities. The proposal of this work was understanding the great phenotypic variation observed in *L. alba* by making use of a multidisciplinary approach, using 32 accessions of the species collected in different Brazilian regions, and maintained in the same environmental conditions. Furthermore, another goal was characterizing the accessions and to better understand the speciation patterns occurring in *Lippia*. Were found morphological variations, among the analyzed accessions, in vegetative and reproductive characters. As a result of estimating DNA quantity by means of flow cytometry, it was possible to split the accessions in seven groups with significant different quantities of DNA. Groups varied between 2.31pg and 6.70pg of DNA. In the chromosomal counting made by means of analyses in meiotic and mitotic cells, were observed six distinct chromosomal numbers ($2n=30$, $2n=34$, $2n=51$, $2n=58$, $2n=60$ e $2n=93$), showing different ploidal levels in the species. In the pollen grains analysis were observed di, tri or tetracolporate pollen aperture. Groups with diploid accessions and smaller amounts of DNA showed only tricolporate grains. Even though the results of this study have not contributed in the division of well-defined morphological groups, they demonstrate that even under controlled conditions the accessions present morphological variations showing the existence of genetic variation as an important factor for explaining the great phenotypic plasticity observed. The existence of different ploidal levels suggests that *L. alba* can be in progress of speciation. Besides morphological and cytogenetic variations, those stomatal and palynological reinforces this conclusion.

Keywords: *Lippia alba*. Morphological variation. Chromossomal variation. Palynological variation. Stomatal variation. Phenotypic plasticity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. A: Hábito decumbente do acesso CL 3; B: Hábito ereto do acesso CL 4236
- Figura 2. A: Filotaxia oposta no acesso CL 16; B: Filotaxia verticilada em Var. minor.37
- Figura 3. A: Bráctea ovada com ápice aristado, acesso CL 16; B: Bráctea orbicular com ápice cuspidado, acesso CL 29; C: Bráctea elíptica com ápice aristado, acesso CL 42; D: Bráctea ovada com ápice agudo, acesso Var. minor.....43
- Figura 4. A: Cálice 1-laciniado, acesso CL 40; B: Cálice 3-laciniado, acesso CL 29; C: Cálice levemente 3-laciniado, acesso Var. minor; D: Cálice 1 e 2-laciniado, acesso CL 42; E: Cálice 2-laciniado (lacínios desiguais), acesso CL 43; F: Cálice 2-laciniado (lacínios iguais), acesso CL 3.....44
- Figura 5. A-B: Corola com uma constrição quase imperceptível no tubo: A: acesso CL 16; B: acesso CL 3; C-F: Corolas com constrição forte no tubo: C: acesso CL 29; D: acesso CL 43; E: acesso CL 42; F: acesso Var. minor.....46
- Figura 6. Histogramas representativos da estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo em pg.(A) Grupo I; (B) Grupo II; (C) Grupo III; (D) Grupo IV; (E) Grupo V; (F) Grupo VI; (G) Grupo VII.....51
- Figura 7. A-E: Representação do acesso CL 43 pertencente ao grupo I com média de 2,39 pg de DNA; F-J: Representação do acesso Var. minor pertencente ao grupo VII com média de 6,70 pg de DNA.....52

Fotografia 1. A: Lâmina ovada, acesso CL 26; B-C: Lâminas elíptica e ovada, acesso Paranoá; D-E: Lâminas elíptica e lanceolada, acesso 31;F-G:Lâminas ovada e obovada, acesso CL 43.....	38
Fotografia 2. A-B: Lâminas ovada e lanceolada, acesso CL 36; C-D: Lâminas ovada e espatulada, acesso Var. minor.....	38
Fotografia 3. A-C: Folhas muito desenvolvidas encontradas nos acessos CL 42, CL 30 e CL 26; D-E: Folhas de tamanho reduzido, observadas nos acessos CL 41, CL 18, CL 5 e CL 3.....	39
Fotografia 4. A: Tricomas tectores unicelulares; B: tricomas tectores bicelulares.....	40
Fotografia 5. A: Tricomas glandulares: A: Tricoma glandular subséssil com cabeça formada por uma célula; C: Tricomas glandulares capitados; D: Tricoma glandular subséssil com cabeça formada por duas células.....	41
Fotografia 6. A: Corola lilás, acesso CL 36; B: Corola rosa, acesso CL 32; C: Corola branca, acesso LAP 63.....	46
Fotografia 7. Figuras representativas da variação de números cromossômicos encontrados. (A) Metáfase ($2n=30$) de um acesso do grupo I (CL 43); (B) Metáfase ($2n=30$) de um acesso do grupo II (CL 23); (C) Pró-metáfase (ca $2n=34$) do acesso do grupo III (CL 16); (D) Metáfase (ca $2n=51$) de um acesso do grupo IV (CL 29); (E) Metáfase (ca $2n=58$) de um acesso do grupo V (CL 27); (F) Metáfase (ca $2n=58$) de um acesso do grupo VI (CL 40); (G) Pró-metáfase (ca $2n=93$) do acesso do grupo VII (Var. minor).....	54
Fotografia 8. Figuras representativas da variação de números cromossômicos encontrados. (A) Diacinese ($n=15$) de um acesso do grupo I (CL 43); (B) Diacinese ($n=15$) de um acesso do grupo II (CL 23); (C) Diacinese (ca $n=26$) de	

um acesso do grupo IV (CL 29); (D) Diacinese (ca n=30) de um acesso do grupo V (CL 27). Barra= 10 µm.....55

Fotografia 9. Pólen encontrados nos sete acessos pertencentes aos sete grupos com quantidades diferentes de DNA, dentro de *L. alba*. (A) Pólen triangular do acesso CL 43 pertencente ao grupo I; (B) Pólen triangular do acesso CL 42 pertencente ao grupo II; (C-E) Pólen retangular (C), triangular (D) e quadrangular (E) do acesso CL 16 pertencente ao grupo III; (F-H) Pólen retangular (F), triangular (G) e quadrangular (H) do acesso CL 29 pertencente ao grupo IV; (I-J) Pólen triangular (I) e quadrangular (J) do acesso CL 3 pertencente ao grupo V; (K-M) Pólen retangular (K), triangular (L) e quadrangular (M) do acesso CL 40 pertencente ao grupo VI; (N-O) Pólen triangular (N) e quadrangular (O) do acesso Var. minor pertencente ao grupo VII.....60

Fotografia 10. Estômato do tipo diacítico. Barra= 30 µm.....63

Fotografia 11. Densidade de estômatos. A: Menor frequência em um acesso poliplóide (Var. minor); B: Maior frequência em um acesso diplóide (CL 43).....64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Números de registro e localidade de 32 acessos de *Lippia alba*. 29
- Tabela 2 Análise de variância para estimativas da quantidade de DNA de 32 acessos de *Lippia alba* oriundos de diferentes regiões do país..... 49
- Tabela 3 Média das estimativas da quantidade de DNA (pg) de 32 acessos de *L. alba* obtidas a partir de cinco repetições e classificação em sete grupos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).....50
- Tabela 4 Número de cromossomos ($2n$) por acessos de *L. alba*. 53
- Tabela 5 Relação entre os acessos pertencentes aos grupos divididos pela análise da estimativa da quantidade de DNA e o número cromossômico.....56
- Tabela 6 Forma (âmbito) e número de aberturas polínicas de sete acessos representantes dos sete grupos com quantidades diferentes de DNA, em *L. alba*. T = triangular; R = retangular; Q = quadrangular.....58
- Tabela 7 Morfometria polínica de sete acessos representantes dos sete grupos com quantidades diferentes de DNA, dentro de *L. alba*. P = média do diâmetro polar; E = média do diâmetro equatorial; Exina= média da exina (endoexina + ectoexina); $\pm dp$ = desvio padrão; (AP) = amplitude.....59
- Tabela 8 Média dos diâmetros polar (P) e equatorial (E), média das estimativas da quantidade de DNA (pg) (Q), número cromossômico ($2n$) e número de aberturas de sete acessos representantes dos sete grupos com quantidades diferentes de DNA, dentro de *L. alba*.....61
- Tabela 9 Densidade estomática (DEST), diâmetro polar dos estômatos (DP), diâmetro equatorial dos estômatos (DE), relação entre diâmetro polar e equatorial (DP/DE) e índice estomático (IE) de sete acessos pertencentes aos sete grupos.....63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
AM	Amazonas
ANOVA	Análise de Variância
BA	Bahia
CENARGEN	Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia
CESJ	Herbário Leopoldo Krieger, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil
CL	Clone
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GO	Goiás
h	Hora
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
min	Minuto
mL	Mililitro
ML	Microscopia de luz
mM	Milimolar
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
pg	Picograma
PR	Paraná
RNase	Ribonuclease

rpm	Rotações por minuto
SC	Santa Catarina
SE	Sergipe
SP	São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
TO	Tocantins
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 A importância do estudo das plantas medicinais.....	15
1.2 O gênero <i>Lippia</i> L.: distribuição geográfica, taxonomia e importância Econômica.....	16
1.3 <i>Lippia alba</i>: distribuição, taxonomia e variação.....	18
1.4 Plasticidade Fenotípica e Variabilidade Genética.....	20
1.5 Ferramentas auxiliares no estudo da biodiversidade e da plasticidade fenotípica.....	23
2. OBJETIVO.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. METODOLOGIA.....	28
3.1 Material Biológico.....	28
3.2 Análise Morfológica.....	28
3.3 Estimativa da quantidade de DNA por Citometria de Fluxo.....	30
3.4 Citogenética.....	31
3.4.1 Análise Meiótica.....	31
3.4.2 Análise Mitótica.....	32
3.5 Análise Palinológica.....	32
3.6 Análise Estomática.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Análise Morfológica.....	34
4.1.1 Hábito.....	35
4.1.2 Filotaxia.....	36
4.1.3 Folha.....	37
4.1.4 Inflorescência.....	42
4.1.5 Bráctea.....	42
4.1.6 Flor.....	43

4.1.6.1 Cálice.....	43
4.1.6.2 Corola.....	45
4.2 Estimativas das quantidades de DNA.....	48
4.3 Análise Citogenética.....	52
4.4 Análise Palinológica.....	57
4.5 Análise Estomática.....	62
5. CONCLUSÕES.....	65
6. REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a biologia evolutiva vem passando por mudanças notáveis face às descobertas sobre o funcionamento do genoma. Por meio de uma abordagem integrada, abrem-se novas possibilidades para o entendimento de processos relacionados à interação do genoma com o ambiente, sem deixar de considerar as forças evolutivas que acabam por moldar a rica diversidade que conhecemos. Gerar tais conhecimentos é uma tarefa que requer um conjunto de dados oriundos de diferentes níveis da organização biológica. Entretanto, mantendo-se o foco nas grandes alterações biológicas que aconteceram recentemente, sobretudo documentadas com eventos naturais, é possível aumentar as chances de compreender as variações existentes, identificar alterações genotípicas e fenotípicas oriundas de seleção e talvez, determinar a repetibilidade de processos associados à evolução dos organismos.

Entender a origem de novas espécies constitui um ponto importante para elaborar estratégias de uso e conservação havendo grande interesse nos processos através dos quais a biodiversidade é gerada.

Neste contexto, o gênero *Lippia* L. (Verbenaceae) constitui um modelo interessante de estudo não somente pelas inúmeras questões taxonômicas sem resposta, e que estão intrinsecamente relacionadas ao processo de especiação, mas também pela importância econômica do gênero em função de possuir várias espécies de interesse medicinal. Dentre estas espécies, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britton & P. Wilson se destaca e constitui um modelo particular pela ocorrência de vários tipos químicos e morfológicos (Ricciardi *et al.*, 2000; Santos-Mendes, 2001; Tavares, 2003; Yamamoto, 2006; Schocken, 2007, Hennebelle *et al.*, 2008). Algumas análises até o momento produziram informações inéditas sobre a espécie e levantaram uma questão importante no que diz respeito à ocorrência de números cromossômicos diferentes dentro de uma mesma espécie provavelmente oriundos de poliploidia (Brandão, 2003; Pierre, 2004; Pierre, 2008). É de grande interesse estudar a amplitude destas variações por meio de ferramentas citogenéticas clássicas, pela estimativa da quantidade de DNA e também por meio de análises morfológicas e palinológicas.

1.1 A importância do estudo das plantas medicinais

Embora as plantas sejam utilizadas pelo homem há muitos anos, na maioria dos casos sua utilização ocorre de forma empírica sem comprovação ou mesmo sem nenhuma eficácia do tratamento. Estimativas afirmam que mais de 50% das drogas utilizadas no mundo são direta ou indiretamente derivadas de produtos de origem natural sendo que as fanerógamas contribuem com mais de 25% deste valor. De acordo com levantamento feito nos Estados Unidos entre 1959 e 1980, 25% das prescrições continham extratos de plantas ou princípios ativos derivados de plantas sendo 119 substâncias derivadas de apenas 90 espécies consideradas como importantes e de larga utilização também em outros países (Farnsworth *et al.*, 1985). Destes 119 compostos, 74% foram descobertos como resultado de estudos de isolamento de substâncias ativas oriundas de plantas. Uma análise realizada de 1981–2002 revelou que apenas 39% das novas moléculas sintetizadas não tinham nenhuma semelhança ou origem relacionada a um produto natural. Neste particular, o Brasil assume uma posição estratégica se considerarmos que aproximadamente metade das angiospermas podem ser encontradas nas florestas tropicais e que aproximadamente apenas 1% delas foi estudada com finalidade farmacológica. No caso do Brasil, que abriga aproximadamente 55.000 espécies de plantas, existem relatos para apenas 0,4% de sua flora (Gurib-Fakim, 2006). A existência deste universo ainda desconhecido tem sido relatada como uma das principais razões para que plantas oriundas de países tropicais sejam conservadas e investigadas.

Nesta busca por novas fontes de princípios ativos, a etnobotânica tem um papel muito importante uma vez que boa parte das plantas identificadas como possuidoras de princípios ativos foram identificadas com base em sua utilização pela população (Gurib-Fakim, 2006). Um ponto importante a ser destacado é o acesso a um material biológico bem identificado sempre confirmado por um taxonomista que seja de preferência especialista no gênero em estudo. Ferramentas auxiliares, como a constituição química, aspectos citogenéticos, genéticos e moleculares, além de outras características botânicas adicionais à morfologia clássica são muito bem vindas sobretudo nos

casos em que houver dúvida na identificação ou quando existirem possíveis sinonímias para a espécie.

1.2 O gênero *Lippia* L.: distribuição geográfica, taxonomia e importância econômica

O gênero *Lippia* foi descrito por Linnaeus em 1753, baseado em *Lippia americana* L., uma espécie da América Central. De acordo com Salimena (2000), este possui cerca de 200 espécies distribuídas nos trópicos e subtropicais das Américas e África, com três grandes centros de diversidade: Brasil, México e Argentina, sendo o Brasil o maior deles, contendo 111 espécies.

Após a subdivisão do gênero proposta por Schauer (1851) e Briquet (1895), Troncoso (1974) apresentou um amplo estudo sobre a taxonomia de *Lippia*, no qual foram revistas as delimitações dos táxons infragenéricos resultando em uma proposta que tem sido seguida pelos especialistas na família. O gênero foi então subdividido em sete seções baseadas no padrão da inflorescência: *Lippia*, *Dipterocalyx* Cham., *Goniostachyum* Schauer, *Zapania* Schauer, *Rhodolippia* Schauer, *Pseudoalloysia* Troncoso e *Dioicolippia* Troncoso.

Segundo Salimena (2000), durante mais de 20 anos Moldenke descreveu dezenas de novas espécies e variedades para *Lippia*, sem, contudo, apresentar uma discussão sobre os limites infragenéricos e suas descrições, na maioria dos casos, apresentam apenas características vegetativas e no máximo uma breve descrição das inflorescências, e, portanto, caracteres relacionados à morfologia da flor, importantes na separação de espécies e seções foram omitidos. Segundo a mesma autora, não há também em suas publicações comentários sobre as afinidades dos novos táxons com outros descritos para o gênero, nem ilustrações das espécies. Toda essa problemática levou a um grande desconhecimento do gênero e a dificuldades de identificação e delimitação de seus táxons.

As relações de *Lippia* com gêneros próximos como *Lantana* L., *Acantholippia* Gris, *Alloysia* Ort. Et Palau, *Phyla* Loureiro e *Nashia* Millsp. aumentaram as dificuldades no reconhecimento de caracteres úteis para delimitação das espécies do gênero, ampliando os limites morfológicos dessas

espécies e sobrepondo caracteres, o que resultou no aumento da problemática taxonômica atualmente reconhecida para o gênero (Salimena, 2000).

Embora com tantas questões taxonômicas pendentes, o gênero tem se destacado por sua riqueza química e farmacológica. Do ponto de vista químico, as espécies de *Lippia* se caracterizam por produzir metabólitos secundários derivados das rotas biossintéticas do acetato/mevalonato, que são os seus marcadores químicos, e estas substâncias são frequentemente utilizadas em estudos sobre evolução e sistemática de famílias incluídas na ordem Lamiales e ordens próximas (Menezes *et al.*, 1995; Sampaio-Santos *et al.*, 1995).

As espécies de *Lippia* produzem muitos derivados dessa rota biossintética, entre os quais predominam os sesquiterpenóides e monoterpenóides, presentes em seus óleos essenciais (Craveiro *et al.*, 1981). *Lippia* reúne várias espécies com propriedades medicinais, como por exemplo, a atividade antimicrobiana em *L. aff. gracillis* (Pessoa *et al.*, 2005), efeitos contra problemas respiratórios, ação antimicrobiana e larvicida em *L. javanica* (Viljoen *et al.*, 2005; Lukwa, 1994), propriedade antibacteriana e antifúngica em *L. chevalieri* (Mevy *et al.*, 2007), atividades anti-helmíntica em *L. sidoides* (Vasconcelos, 2006) além de efeitos antisséptico, antiinflamatório e cicatrizante (Costa *et al.*, 1998); propriedades gastroprotetora, antioxidante, antiinflamatória tópica (Monteiro *et al.*, 2007) e antinociceptiva (Marçal *et al.*, 2006) e atividade antimalárica em *L. multiflora* (Valentin *et al.*, 1995). Na maioria desses estudos é ressaltada a importância dos constituintes do óleo essencial dessas plantas, isto é, dos monoterpenóides e sesquiterpenóides, na atividade farmacológica observada.

Em uma das espécies mais bem estudadas do gênero, *Lippia alba*, foram encontrados constituintes químicos com ação sedativa, ansiolítica, analgésica e anti-infecciosa (Hennebelle *et al.*, 2008); bactericida e fungicida (Vale *et al.*, 1999; Aguiar *et al.*, 2008), propriedades estomática e antiespasmódica (Gomes *et al.*, 1993) e atividade antiulcerogênica (Pascual *et al.*, 2001a). A espécie também é utilizada popularmente como antipirético e antiinflamatório, no tratamento de gripe, desordens hepáticas e menstruais, infecções cutâneas, diarreia, reumatismo e hipertensão (Morton, 1981; Girón e Cáceres, 1994; Di Stasi *et al.*, 1994; Tavares *et al.*, 2005).

1.3 *Lippia alba*: distribuição, taxonomia e variação

Entre as espécies do gênero, *Lippia alba* se destaca por apresentar várias características importantes do ponto de vista econômico. A espécie *L. alba* é amplamente distribuída nas Américas, desde o México e Índias Ocidentais até a Argentina e Uruguai, onde ocorre em praticamente todos os tipos de ambientes, desde florestas, brejos e campos até em beira de estradas, sendo muito cultivada para uso medicinal (Salimena, 2000).

L. alba possui hábito arbustivo e pode chegar até dois metros de altura, floresce o ano todo e recebe destaque no gênero devido às suas inúmeras propriedades medicinais (Salimena, 2000). Suas folhas são simples, inteiras, serrilhadas, oblongas agudas, opostas, ocorrendo geralmente em número de duas folhas por nó (Schocken, 2007). Essas folhas podem ser membranáceas, pecioladas, pubescentes e com aroma cítrico (Castro, 2001). De acordo com Salimena (2002) as brácteas podem ser violáceas, rosas ou brancas, membranáceas, acrescentes na frutificação, formando com o cálice frutífero uma unidade dispersora adaptada à anemocoria e encontram-se reunidas em capítulo axilar. A espécie pode ser encontrada em solos arenosos e nas margens de rios, açudes, lagos e lagoas, desde regiões com clima tropical até temperado (Correa *et al.*, 1994; Stefanini *et al.*, 2001). O táxon é conhecido por vários nomes populares, como, erva cidreira, falsa melissa, chá de tabuleiro, erva cidreira do campo, salva do Brasil, salva-limão e erva cidreira brava (Pierre, 2004).

Lippia alba inclui 4 variedades: *L. alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britton e P. Wilson var. *alba*, *L. alba* var. *carterae* Moldenke, *L. alba* var. *globiflora* (L'Hér.) Moldenke e *L. alba* var. *lanceolata* (Griseb.) Múlgura. Os critérios para diferenciação dessas variedades, entretanto, são inconsistentes, baseados na altura dos indivíduos, forma da base foliar, densidade de tricomas ou cor da corola. Esses caracteres muitas vezes se sobrepõem, causando confusão na determinação de indivíduos pertencentes à espécie. Além disso, em condições diferentes é difícil uma conclusão precisa.

De acordo com Sanders (2001) a forma de reprodução predominante de *Lippia* é por alogamia, com dicogamia protândrica, sendo algumas espécies autocompatíveis e autógamas facultativas, quando a alogamia falha. *Lippia*

alba é uma espécie polimórfica devido à sua vasta distribuição geográfica, apresentando, portanto uma ampla plasticidade fenotípica e diferentes quimiotipos dificultando sua classificação (Schocken, 2007).

Zoghbi *et al.* (1998) e Vale *et al.* (1999) identificaram 3 quimiotipos em *L. alba*: La1, La2 e La3. Eles possuem como componentes majoritários, respectivamente, o citral, a carvona e linalol, os quais apresentam diferentes atividades farmacológicas, como, a atividade analgésica, hipotérmica, bactericida, fungicida, anticonvulsivante, antiinflamatória e também de efeitos sedativos. Além destes, outros quimiotipos foram identificados e classificados de acordo com sua constituição química (Hennebelle, 2008)

De acordo com Yamamoto (2006) o óleo essencial é produzido principalmente nas folhas, durante o desenvolvimento da planta e em resposta a estresses ambientais. A produção desses metabólitos secundários depende não só de estímulos externos, mas também da constituição genética da planta e por isso cada planta apresenta um conjunto de substâncias, sendo que aquelas em maior proporção relativa no óleo, definem seu grupo químico (quimiotipo).

Esses óleos essenciais são compostos principalmente por mono e sesquiterpenos (Gomes *et al.*, 1993; Mattos, 2000) e em *L. alba*, os terpenos que ocorrem com maior frequência são o linalol, 1,8-cineol, carvona, limoneno, β -mirceno, cariofileno, cânfora, germacreno e citral (Matos *et al.*, 1996; Julião *et al.*, 2001; Hennebelle, 2008).

Brandão (2003) concluiu que *Lippia alba* é uma espécie diplóide que apresenta $2n=30$ cromossomos. Pierre (2004) estudou a cariologia de três quimiotipos de *L. alba* (citral, carvona e linalol) e observou que estes apresentam diferenças em relação ao número e morfologia dos cromossomos, sendo que o quimiotipo citral apresentou $2n=30$ cromossomos, o quimiotipo carvona $2n=60$, o que poderia ser um autopoliplóide do quimiotipo citral, e o quimiotipo linalol com uma grande variação numérica de $2n=12$ a 60, tratando-se, portanto, de um quimiotipo mixoplóide. Sousa (2006) ao estudar diferentes acessos de *Lippia alba* com $2n= 30$, observou que o número cromossômico não está relacionado com o quimiotipo, visto que dois dos acessos com $2n=30$ cromossomos e estabelecidos sobre as mesmas condições ambientais, apresentaram-se ricos em linalol e citral, sendo portanto quimiotipos diferentes.

Tavares (2003) analisou a morfologia, anatomia e análise dos óleos essenciais e aromas desses três quimiotipos, observando que a diversidade morfológica e química entre eles manteve-se após cultivo sob as mesmas condições, de forma que foi possível estabelecer parâmetros morfo-anatômicos e químicos para distingui-los.

Em suas análises, Moldenke (1965) já classificava a espécie como amplamente distribuída. Segundo Pierre (2004) vários autores relataram que essa espécie apresenta ampla plasticidade fenotípica resultante de adaptações às condições ambientais encontradas no local de procedência. De acordo com a mesma autora, tais variações dificultam a correta identificação desses materiais. Assim, é de grande importância utilizar técnicas que auxiliem na identificação precisa dessas fontes de princípios ativos, subsidiando uma correta padronização para a utilização econômica e na medicina popular além de facilitar a manutenção da qualidade e o planejamento de cultivo para a obtenção de fitofármacos que não prejudiquem a saúde de quem venha utilizá-los (Pascual *et al.*, 2001, Lima *et al.*, 2003).

1.4 Plasticidade Fenotípica e Variabilidade Genética

Um dos pontos centrais da biologia evolutiva é entender a origem de novas espécies otimizando possivelmente o uso de espécies de interesse face ao maior entendimento do genoma. Neste sentido, há grande interesse nos processos através dos quais a biodiversidade é gerada e na elucidação completa do espectro de mecanismos intrínsecos e extrínsecos que atuam no processo de especiação. Adaptações a ambientes heterogêneos incluem tanto diferenciação genética quanto uma expressão alternativa de fenótipos, comumente conhecida como plasticidade fenotípica (West-Eberhard, 1989; Scheiner, 1993; Jump e Penuelas, 2005).

Os ambientes naturais são altamente heterogêneos em espaço e tempo, e em condições adversas, os organismos devem se adequar ou escapar desses meios (Valladares *et al.*, 2007). A habilidade de espécies para adaptar-se às mudanças ambientais (potencial adaptativo) é conhecida como grande dependente da diversidade genética disponível para os caracteres sujeitos, ou potencialmente sujeitos à seleção (Noel *et al.*, 2007). Assim, os indivíduos

podem responder plasticamente a essas variações ambientais, e a plasticidade fenotípica poderia ser considerada uma força evolutiva potencial, especialmente em plantas, as quais não podem escapar do seu ambiente local (Noel *et al.*, 2007). Portanto, a plasticidade fenotípica, ou a capacidade de um dado genótipo desenvolver diferentes fenótipos sob diferentes condições ambientais, é um meio particularmente adequado para organismos sésseis enfrentarem essa heterogeneidade ambiental (Bradshaw, 1965; Sultan, 2000).

Um ambiente heterogêneo pode favorecer a heterogeneidade genética entre populações, assim, tanto as adaptações locais quanto as adaptações a novos ambientes podem resultar em mudanças genéticas subsequentes (Hufford e Mazer, 2003). Nesse contexto, a plasticidade fenotípica pode promover divergência adaptativa, evolução e especiação (West-Eberhard, 2003). Se as divergências fenotípicas geradas dentro de uma população forem mantidas por seleção disruptiva, haverá favorecimento para o surgimento de subespécies, raças ou ecótipos (Via e Lande, 1985; Thompson, 1991).

De acordo com West-Eberhard (2003) a evolução adaptativa envolve quatro estágios: (i) Origem da característica: o aparecimento inicial de uma variação qualitativa desenvolvida distintivamente, a qual ocorre quando surgem novas “informações”, como por exemplo, mutações ou mudanças no meio ambiente; (ii) Acomodação fenotípica pelos indivíduos: a acomodação imediata à mudança, devido à flexibilidade adaptativa multidimensional do fenótipo; (iii) Retorno ou dispersão inicial: devido ao retorno do fator inicial, se ambiental ou mutacional, isto pode originar uma subpopulação de indivíduos que expressam a característica; (iv) Acomodação genética: mudança na frequência gênica devido à seleção na regulação, forma ou efeitos colaterais da nova característica na subpopulação de indivíduos que a expressam. Adicionalmente, a inovação adaptativa começa com a reorganização de um genótipo altamente adaptado, no qual os efeitos negativos são neutralizados pelo desenvolvimento da plasticidade adaptativa.

É esperado que uma população que ocupe um ambiente heterogêneo apresente grande potencial plástico em suas características fisiológicas e/ou morfológicas (Fuzeto e Lomônaco, 2000) e conseqüentemente a formação de ecótipos ou variedades poder ser favorecida em ambientes de transição ou

ambientes que apresentam gradientes edáficos, por exemplo, no caso de áreas ocupadas pelo bioma do cerrado (Cardoso e Lomônaco, 2003).

Muitos estudos têm mostrado que plantas apresentam respostas plásticas para numerosas características ecologicamente importantes, desde a morfologia, fisiologia, anatomia, desenvolvimento e tempo de reprodução, aos sistemas de produção e padrões de desenvolvimento da prole (Sultan, 2000).

Exemplos clássicos de plasticidade fenotípica descrevem variações na forma e tamanho de folhas em plantas terrestres e heterofilia em folhas aéreas e submersas de espécies aquáticas (Bradshaw, 1965). Vários métodos podem ser utilizados para o estudo da plasticidade em plantas, como por exemplo, os estudos morfológicos e anatômicos. Gardoni *et al.* (2007) ao analisarem três morfotipos de *Marctia taxifolia* (A. St.-Hil.) DC., encontraram uma ampla plasticidade fenotípica tanto em condições de campo quanto em condições de cultivo. He *et al.* (2007), ao investigarem a forma de desenvolvimento e como o *habitat* de origem afeta o fenótipo em indivíduos de *Stipa capillacea* Keng e *Carex montis-everestii* Kük. submetidos à três níveis de intensidade de luz e dois níveis de suprimento de nutrientes, encontraram diferenças na biomassa, nos números de ramos, tamanhos da área foliar e comprimento da bainha em indivíduos. Por meio de parâmetros morfológicos e genéticos, Ungerer *et al.* (2003) observaram variações fenotípicas em 13 caracteres da inflorescência de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. em função da interação genótipo-ambiente.

Existem evidências de que espécies e populações de plantas podem diferir na extensão de respostas plásticas em mudanças ambientais parecidas e essas divergências de respostas plásticas entre espécies e populações devem refletir diferentes pressões de seleção ou diferentes limitações que atuam na maximização da plasticidade (Valladares *et al.*, 2007). Em *Ranunculus nodiflorus* L., utilizando análise de lócus de microssatélites e de características morfológicas, não foram encontradas diferenças genéticas entre os indivíduos apesar de os mesmos apresentarem uma ampla plasticidade fenotípica (Noel *et al.*, 2007). Por meio de marcadores RAPD, resultados similares foram obtidos em seis populações de *Pistacia lentiscus* L. (Nahum *et al.*, 2008)

De acordo com Kleunen e Fischer (2005) para entender os mecanismos da plasticidade fenotípica e seus custos, é necessário integrar dados de

plasticidade em todos os níveis juntamente com as vias do genótipo ao fenótipo, e relacionar essas plasticidades com o “fitness” do organismo estudado. Os mesmos autores indicam que mais estudos como esses precisam ser realizados para o melhor entendimento sobre a evolução das respostas plásticas às mudanças ambientais, já que as espécies não se encontram isoladas e que muitos fatores ambientais atuam em conjunto.

1.5 Ferramentas auxiliares no estudo da biodiversidade e da plasticidade fenotípica

Muitas vezes a distinção entre espécies morfologicamente similares é contraditória em função da ausência de caracteres que auxiliem nessa tarefa. A análise citogenética tem sido extensivamente reconhecida como uma ferramenta auxiliar para a taxonomia de plantas, visto que o número cromossômico não é influenciado por fatores ambientais, constituindo, portanto, um bom referencial para a caracterização de espécies, assim como para o entendimento da evolução das mesmas (Sttebins, 1971; Shan *et al.* 2003). Um bom exemplo disso tem sido os trabalhos realizados por Smarda *et al.* (2003, 2005), segundo os quais as espécies representantes do gênero *Festuca* (Poaceae) apresentam grande similaridade morfológica. Apenas por tais caracteres, a identificação e caracterização dos vários táxons têm sido muito problemática e às vezes impossível para os taxonomistas. Nesse caso, o nível de ploidia tem sido usado como critério básico de classificação e descrição destas espécies, sendo possível inclusive a separação de sinónimas. Por outro lado, Artelari e Georgiou (2003), sinonimizaram duas espécies do gênero *Limonium* (Plumbaginaceae) uma vez que apresentam o mesmo número cromossômico e diversas similaridades morfológicas.

Desta forma, é grande o número de trabalhos que utilizam a citogenética como ferramenta auxiliar a taxonomia. Dentre estes podemos citar os estudos realizados por Sanzo (2003) com o gênero *Alstromeria* (Alstromeriaceae), Windham (2003) com o gênero *Draba* (Brassicaceae), Brysting *et al.* (2004) com o gênero *Dupontia*, Conterato e Wittmann (2006) com o gênero *Lupinus* (Leguminosae), Escudero *et al.* (2007) com o gênero *Carex*, Lim (2008) com o gênero *Globba*, entre outros.

Assim como a citogenética, a palinologia tem sido extensivamente utilizada para a caracterização da biodiversidade vegetal (Edlund *et al.*, 2004). Segundo Blackmore (2007), a variação na forma, presença de diferentes ornamentações na exina, variação do diâmetro polar e equatorial e no número e tipo de aberturas polínicas entre os diferentes grupos vegetais, fazem do grão de pólen um importante elemento utilizado na caracterização de espécies. Além disso, os estudos estratigráficos associados à paleopalinologia têm permitido a realização de várias inferências na evolução dos ecossistemas, nas modificações climáticas que levam às mudanças da biodiversidade e a um entendimento mais profundo da filogenia de vários grupos vegetais (Doyle, 2005; Judd e Olmstead, 2004, Simpson *et al.*, 2003).

Na taxonomia vegetal, a palinologia tem contribuído imensamente na delimitação de táxons. Um bom exemplo disso têm sido os estudos com espécies da tribo Trifolieae (Fabaceae: Papilionoidea) do Egito. Lashin (2006) ao estudar nove espécies de cinco gêneros desta tribo: *Melilotus*, *Trigonella*, *Medicago*, *Trifolium* e *Ononis*, observou que apesar da morfologia polínica entre todos os taxa ser muito semelhante, as espécies de *Ononis* apresentam ornamentações na exina completamente diferentes dos padrões observados nas espécies dos outros gêneros. Estas observações, juntamente com vários caracteres morfológicos, reafirmaram a transferência do gênero *Ononisi* para a subtribo Ononidae, que já havia sido proposta anteriormente por Gupta (1980) ao estudar caracteres morfológicos das espécies do gênero. Atualmente, com o desenvolvimento da microscopia eletrônica de varredura, transmissão e a melhoria dos microscópios de luz, inúmeros detalhes das mais diversas características polínicas têm sido obtidos nos estudos. E muitos destes trabalhos têm indicado que vários tratos palinológicos em alguns grupos vegetais apresentam correlações com a ploidia, morfologia dos cromossomos, tamanho do genoma das espécies, hábitos de crescimento entre outros (Ressayre *et al.*, 2002; Tsou e Fu, 2007).

No gênero *Lippia* existem alguns trabalhos que abordam a palinologia para melhor delimitação das espécies dentro do gênero. Um dos principais trabalhos com a família Verbenaceae foi feito em 1983 por Raj, citado por Sanders (2001), abordando apenas quatro espécies. Além deste trabalho, Silva (2008) também analisou os grãos de pólen de quatro espécies de *Lippia*,

Pierre (2008) analisou três citótipos de *L. alba* e Sousa (2008) analisou quatorze espécies dentro do gênero também com a abordagem palinológica.

Em seu trabalho, Sousa (2008) encontrou variação em relação ao âmbito dos grãos de pólen, triangulares ou quadrangulares, em relação ao número de aberturas, três ou quatro, e também observou variação no tamanho dos grãos das quatorze espécies analisadas. Pierre (2008) também observou variação em relação âmbito, de triangulares a quadrangulares, e número de aberturas, de três a quatro, e variação do tamanho dos grãos pertencentes aos citótipos de *L. alba*. Em ambos trabalhos os autores encontraram uma relação direta entre o tamanho do grão de pólen e o número de aberturas com o nível de ploidia dos indivíduos.

De acordo com Pierre (2008) o número cromossômico dos diferentes citótipos pode estar relacionado com a morfologia do grão de pólen, já que indivíduos diplóides com $2n=30$ apresentaram somente três aberturas e âmbito triangular, e o citótipo poliplóide com $2n = 60$ apresentou número de aberturas variando entre três a quatro e âmbitos triangulares ou quadrangulares. Como comentado anteriormente, muitos trabalhos mostram que em alguns grupos de plantas essa relação entre ploidia e morfologia polínica é direta. Entre esses trabalhos estão as análises realizadas por Almada *et al.* (2006) nas quais os autores estudaram 18 populações de oito espécies de *Crotalaria*. Nessas populações os autores observaram a existência de indivíduos octaplóides e constataram que, com o aumento da ploidia nas populações ocorria o aumento no diâmetro dos grãos de pólen.

Cramer (1999) verificou que em *Geranium* os indivíduos tetraplóides apresentam um maior número de aberturas e Cuadrado (2003) em seu trabalho realizado com algumas espécies de Malvaceae, observou que plantas com maiores números básicos de cromossomos apresentavam grãos de pólen com um maior número de aberturas, mostrando que além de variações no tamanho do grão, variações em relação ao número de aberturas podem estar relacionadas com a ploidia.

Como ferramenta adicional ao estudo da biodiversidade, as estimativas da quantidade de DNA e nível de ploidia por meio da técnica de citometria de fluxo têm auxiliado no estudo de problemas taxonômicos e evolutivos (Moscone *et al.*, 2003). Esse método tem se mostrado eficiente no estudo do genoma de

plantas principalmente pela reproducibilidade, precisão e rapidez, além de requerer pequenas quantidades de tecido vegetal (Souza *et al.*, 2004).

Na biosistemática o conhecimento da quantidade de DNA e do nível de ploidia tem sido um critério adotado para a identificação de táxons em grupos vegetais com problemas taxonômicos (Suda, 2004). A citometria permite, por exemplo, a distinção de duas espécies com o mesmo número cromossômico, mas que apresentam estimativas da quantidade de DNA diferentes. Outros exemplos da aplicação da citometria em aspectos taxonômicos podem ser encontrados para os gêneros *Passiflora* (Souza *et al.*, 2004); *Hypochoeris* (Cerbah *et al.*, 1999); *Colchicum* (Fridlender *et al.*, 2002); *Hydrangea* (Cerbah *et al.*, 2001); *Lilium* (Siljak-Yakovlev *et al.*, 2003); *Oxalis* (Emshwiller, 2002) e *Lupinus* (Naganowska *et al.*, 2006) entre outros.

Em Verbenaceae poucos são os trabalhos que estimam a quantidade de DNA nas espécies que constituem a família. Silva (2008) estimou a quantidade de DNA por citometria de fluxo de 17 espécies de Verbenaceae e dentre elas duas espécies de *Lippia*, *Lippia martiana* Schau, com 2,36 pg, e *L. aff. microphylla* Cham., com 2,37 pg. Em seu trabalho com três citótipos de *L. alba*, Pierre (2008) encontrou uma variação de 1,86 a 3,42 pg de DNA, sendo os indivíduos com maiores números de cromossomos, os indivíduos com maiores quantidades de DNA. Neste trabalho a autora também confirmou a presença de mixoploidia observada no quimiotipo La2, carvona.

Além de análises genéticas e palinológicas, alguns trabalhos têm utilizado a análise estomática para inferir o nível de ploidia de plantas submetidas à indução de poliploidia (Vandenhout *et al.*, 1995; Magallanes *et al.*, 1996; Souza e Queiroz, 2004). De acordo com Vichiato *et al.* (2006) a análise estomática é uma metodologia fácil e simples que permite a identificação de supostos poliplóides e testemunhas diplóides de um ensaio, através da contagem e medição comparativa de estômatos, uma vez que o comprimento dos mesmos normalmente aumenta com o número de cromossomos. Neste mesmo trabalho os autores observaram o tamanho dos estômatos sendo inversamente proporcional ao nível de ploidia entre diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* L.. Em uma revisão de Knight e Beaulieu (2008) sobre a relação entre tamanho do genoma e o fenótipo de algumas espécies de angiospermas e gimnospermas, foram analisadas oito

características fenotípicas, sendo uma delas a densidade de estômatos. Os autores encontraram uma diminuição na densidade estomática com o aumento do genoma, mas não foi observada nenhuma diminuição na taxa fotossintética.

Com relação ao gênero *Lippia*, Cantino (1990) observou estômatos anomocíticos e diacíticos em *L. graveolens* Kunth, Morretes (1969) constatou a ocorrência de estômatos paracíticos e anisocíticos em *L. lupulina* Cham. e Matos e Oliveira (1998) observaram estômatos anomocíticos em *L. sidoides* Cham.. O único trabalho utilizando a análise estomática em *Lippia alba* foi realizado por Tavares (2003). A autora observou tipos diferentes de estômatos, diacíticos, anisocíticos e anomocíticos que podem servir como caráter auxiliar para a identificação, porém, não como um caráter para auxiliar na delimitação dos quimiotipos. No mesmo trabalho também foi constatado que o comprimento médio das células estomáticas não variou significativamente entre os quimiotipos estudados. Até o momento nenhum trabalho relacionando a densidade de estômatos e o nível de ploidia foi realizado para esta espécie.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

A presente proposta, por meio de uma abordagem multidisciplinar, objetiva entender a ampla variação fenotípica existente em *Lippia alba*. Paralelamente pretende-se contribuir para a caracterização dos acessos, elucidar a delimitação taxômica dos mesmos e entender melhor os padrões de especiação em *Lippia*.

2.2 Objetivos específicos

Utilizando 32 acessos de *L. alba* coletados em diferentes regiões do Brasil e mantidos sob as mesmas condições ambientais, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- ✓ Comparar os acessos por análise morfológica
- ✓ Estimar a quantidade de DNA dos acessos por citometria de fluxo
- ✓ Caracterizar os acessos do ponto de vista citogenético
- ✓ Avaliar as possíveis diferenças palinológicas e estomáticas entre os acessos
- ✓ Verificar se as diferenças encontradas entre os acessos podem ser relacionadas aos diferentes graus de ploidia existente na espécie
- ✓ Auxiliar na caracterização dos acessos e contribuir para sua caracterização taxonômica

3. METODOLOGIA

3.1 – Material Biológico

Vinte e oito acessos provenientes de diferentes localidades do Brasil (Tabela 1) cedidos pela Embrapa/CENARGEN e quatro acessos cedidos pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP) foram mantidos em casa de vegetação na Estação Experimental da Universidade Federal de Juiz de Fora, com controle de temperatura, fotoperíodo e suprimento de água. Todos os acessos foram identificados e 25 exsicatas estão depositadas no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ).

Além da manutenção dos acessos *in vivo*, todos os acessos foram mantidos *in vitro* cultivados em meio MS sem adição de hormônios reguladores conforme as técnicas usuais.

3.2 Análise Morfológica

Todos os acessos foram identificados através de consultas às obras de Moldenke (1965) e Múlgura de Romero *et al.* (2003) e pela especialista do grupo Dra. Fátima Salimena.

Tabela 1 Números de registro e localidade de 32 acessos de *Lippia alba*.

Acessos	Número de registro	Origem
1) CL2	48374	Araguaina/ TO
2) CL3	48373	Atibaia/SP
3) CL5	48371	Botucatu/SP
4) CL8	48392	Brazilândia/Cafuringa/ DF
5) CL9	48393	Ceasa de Brasília/DF
6) CL16	48395	Loteamento Estrutural/ DF
7) CL17	48396	Florianópolis/SC
8) CL18	48397	Formosa/GO
9) CL20	48456	Goiânia/GO
10) CL23	48459	Lago Norte/Brasília
11) CL24	48460	Lavras/MG
12) CL26	48461	Luziânia/GO
13) CL27	48463	Manaus/AM
14) CL28	48464	Muzambinho/MG
15) CL29	48465	Piracicaba/SP
16) CL30	48466	Planaltina/ DF
17) CL31	48467	Planaltina de Goiás/GO
18) CL32	48468	Posse/GO
19) CL36	48372	São Paulo/Ceasa/SP
20) CL37	48376	São Paulo/SP
21) CL40	48379	Uberlândia/MG
22) CL41	48380	Estação Biológica UNB/DF
23) CL42	48381	Fazenda Água Limpa UNB/DF
24) CL43	48382	Curitiba/PR
25) CL44	48383	Núcleo Rural Vargem Bonita/DF
26) Botucatu	55718	Botucatu/SP
27) Paranoá Gde	55719	Paranoá/DF
28) LAP 62	55720	Rio Real/ Rua Joaquim Matos/BA
29) LAP 63	55721	Santana do S. Francisco/ SE
30) LAP 70	55722	Cristinápolis/ SE
31) LAP 72	55723	Cristinápolis/ SE
32) Var. minor	55724	Brasília/DF

Os materiais foram examinados, quando necessário, sob microscópio estereoscópico Olympus SZ40 e descritos seguindo-se Múlgura de Romero *et al.* (2003) e Salimena (2000, 2002). A obra de Harris e Harris (2004) foi adotada como referência para os termos utilizados na descrição.

Para a análise morfológica foram analisadas características vegetativas e reprodutivas em quatro indivíduos de cada acesso. Foram analisados 37 caracteres: hábito, altura, ramificação, forma e indumento dos ramos, filotaxia, forma, tamanho e indumento do pecíolo, forma, tamanho e consistência da

folha, ápice, margem, base, indumento da face adaxial e abaxial das folhas, número, forma e tamanho das inflorescências, forma e tamanho do pedúnculo, forma das brácteas, ápice, base e indumento da face adaxial e abaxial das brácteas, número de lacínios do cálice, indumento externo e interno do cálice, cor da corola, cor da fauce, tamanho do tubo da corola, indumento externo e interno do tubo, inserção dos estames e tamanho do gineceu. Após uma ampla análise de todos os caracteres, alguns foram selecionados por apresentar uma variação morfológica evidente. Foi feita uma descrição geral da espécie e foram selecionados caracteres que apresentaram variações entre os acessos para a discussão dos dados.

Os esboços foram preparados à mão livre, baseados em materiais coletados na casa de vegetação onde estão aclimatados. A arte-final foi feita à nanquim sobre papel vegetal e posteriormente os desenhos foram digitalizados em alta resolução e as pranchas montadas. Todo o processo de confecção, dos esboços às pranchas, foi feito pelo MSc Luiz Menini Neto.

As análises foram desenvolvidas no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.3 Estimativa da quantidade de DNA por Citometria de Fluxo

Para determinação da quantidade de DNA, foram utilizadas amostras de aproximadamente 20 a 30 mg de tecido foliar jovem e o mesmo peso de tecido foliar de *Pisum sativum* (padrão interno de referência) foram macerados com auxílio de uma lâmina cortante em uma placa de Petri contendo 1mL do tampão LB01 gelado para liberação dos núcleos em suspensão (Dolezel *et al.*, 1989). O tecido macerado foi aspirado através de duas camadas de gaze com auxílio de uma pipeta plástica e posteriormente filtrado em uma malha de 50 µm sendo coletado em um tubo de poliestireno. Os núcleos foram corados com a adição de 25 µL de uma solução de 1mg/mL de iodeto de propídeo à suspensão. Adicionalmente 5 µL de RNase foram adicionados em cada amostra. As amostras foram armazenadas no escuro e analisadas até 1 h após preparo. Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados usando uma escala logarítmica para os histogramas obtidos.

A análise foi realizada com o citômetro FacsCalibur (Becton Dickinson) e os histogramas obtidos pelo software Cell Quest. A análise estatística foi realizada por meio do software WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA (em pg) para as espécies foi estimado como mostrado a seguir:

Amostra (2C) = (valor observado no canal do pico da espécie/ valor observado no canal do pico do padrão) x 9,09 pg

Para esta análise, quatro indivíduos de cada acesso e cinco amostras de cada indivíduo foram analisadas. A análise de variação no conteúdo de DNA entre os acessos foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Scott-Knott (1974) a 1%.

As estimativas da quantidade de DNA foram utilizadas para se fazer um “screening” dos acessos estabelecendo-se grupos que continham as mesmas quantidades de DNA. Dentro destes grupos as outras análises propostas foram realizadas.

3.4 Citogenética

3.4.1 Análise Meiótica

Suspensões celulares foram preparadas de acordo com Viccini *et al.* (2005). Foram utilizadas aproximadamente 40 anteras provenientes de 12 botões florais retirados de quatro indivíduos de cada acesso (CL 43, CL 42, CL 29 e CL 3). As anteras foram transferidas para um microtubo de 0,5 mL adaptado em sua extremidade com uma tela de poliéster (60 µm). O material foi lavado em água destilada e posteriormente imerso em solução enzimática concentrada (Ultrazym Nono NordiskTM) por 7h a 30°C. Após a digestão enzimática, as anteras foram lavadas e colocadas em outro microtubo contendo água destilada, aonde foram fragmentadas mecanicamente com auxílio de um estilete adaptado para a retirada das células-mãe do grão de pólen (PMCs). A suspensão celular resultante foi centrifugada a 2000 rpm por três vezes durante 10 min. Após a terceira centrifugação foi adicionada solução fixadora (etanol:ácido acético 3:1) gelada. Após a última centrifugação, a solução foi retirada e o volume completado com a mesma solução. Cerca de

cinco gotas da suspensão foram gotejadas em cada lâmina que foram posteriormente secas ao ar, submersas em ácido acético 45% gelado durante 10 segundos e coradas em solução de Giemsa 5%.

3.4.2 Análise Mitótica

Estacas de quatro indivíduos de cada acesso (CL 2, CL 3, CL 5, CL 16, CL 18, CL 20, CL 23, CL 27, CL 29, CL 31, CL 32, CL 37, CL 40, CL 41, CL 42, CL 43, Botucatu, LAP 63, Var. minor) foram mantidas em sistema de hidroponia em temperatura ambiente até a emissão das raízes. Posteriormente, as raízes foram submetidas a pré-tratamentos com 8-hidroxiquinoleína (3mM) por 8 h à 4°C. Em seguida, as raízes foram fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por no mínimo 24 h.

As raízes fixadas foram lavadas com água destilada e então submetidas à digestão enzimática com o complexo enzimático Pectinase (SIGMA™) e Celulase (SIGMA™) durante 8 h a 37°C. As lâminas foram preparadas por meio de técnicas de secagem ao ar com maceração enzimática (Carvalho, 1995) e coradas com Giemsa 5% durante 4 min. As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz Olympus Bx52 acoplado a um sistema de digitalização e análise de imagens (Image Pro-Plus 4.5 Media Cybernetics™).

3.5 Análise Palinológica

Grãos de pólen de sete acessos (CL 42, CL 43, CL 16, CL 29, CL 40, CL 3 e Var. minor) foram examinados por meio de microscopia de luz (ML). Foram analisados quatro indivíduos por acesso. Os acessos foram selecionados a partir das análises de citometria de fluxo na tentativa de estabelecer uma relação entre o nível de ploidia e os caracteres polínicos.

Para a ML, os grãos de pólen de cada indivíduo foram colocados em um microtubo contendo ácido acético por 3 min e então, acetolisados segundo metodologia descrita por Erdtman (1960). O meio de montagem das lâminas foi preparado com gelatina glicerinada e analisado sob microscópio Olympus Bx52. Foram avaliadas o número de aberturas, as medidas da exina (ecto e endoexina), o eixo polar e equatorial.

3.6 Análise Estomática

A fim de verificar a existência de relação entre o tamanho e densidade estomática com o nível de ploidia, foram selecionadas quatro folhas completamente expandidas por planta no mesmo estágio de desenvolvimento, retiradas do quarto nó dos acessos CL 42, CL 43, CL 16, CL 29, CL 3, CL 40 e Var. minor. As folhas foram fixadas em FAA 50, e conservadas em etanol 70%.

Para a técnica de diafanização fragmentos das folhas foram cortados na região mediana e transferidos para álcool etílico 50% por 5 min, seguida de imersão em álcool etílico 30% também por 5 min. Após esta etapa, o material foi colocado em hidróxido de sódio 10% por 60 min, lavado em água destilada por 15 min e transferido para hipoclorito 20% por 4 h. As amostras foram lavadas em água destilada por 10 min, submetidas a uma bateria crescente de álcool etílico por 30 min cada e foram coradas com fucsina alcoólica 50% por 17 h. Após este período, as amostras foram transferidas para uma bateria decrescente de álcool etílico por 10 min cada e para a montagem da lâmina foi utilizada gelatina glicerinada.

Foram avaliados a frequência de estômatos, os diâmetros polar e equatorial dos estômatos, o índice estomático e a relação entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial dos estômatos.

O índice estomático foi calculado pela expressão proposta por Lea *et al.* (1977): $I = S / (E + S) \times 100$, em que I representa o valor do índice estomático, S o número de estômatos por unidade de área da folha e E o número de células epidérmicas na mesma área.

Todos os dados anatômicos foram obtidos com auxílio de microscópio de luz BX 51 OlympusTM e o programa computacional Image Pro-Plus 4.5 Media CyberneticsTM. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Genes (Cruz, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise Morfológica

Foram utilizados 32 acessos oriundos de várias regiões do Brasil (Tabela 1), porém, cultivados e submetidos às mesmas condições ambientais por 14 meses para a análise das possíveis variações morfológicas existentes dentro da espécie. Os acessos foram transferidos para a casa de vegetação no mesmo período e foram coletados para a análise morfológica na mesma data. A descrição geral da espécie foi baseada em Britton (1925-1930) e Múlgura de Romero *et al.* (2003) e apresentada a seguir:

***Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britton & P. Wilson, *Scient. Surv. Porto Rico* 6: 141. 1925. Tipo: México, *Houstoun s.n.*, s.d. (BM).**

Lantana alba Mill. *Gard. Dict.* Ed. 8. 1768.

Lippia geminata H. B. K. *Nov. Gen.* 2:266. 1818.

Lantana geminata (Kunth) Spreng. *Syst. Veg.* 2: 763. 1825.

Lippia geminata microphylla Griseb. *Fl. Br. W. I.* 495. 1861.

Lippia lantanoides Coult. *Contr. U. S. Nat. Herb.* 2: 328. 1892.

Lippia globiflora var. *geminata* (Kunth) Kuntze. *Revis. Gen. Pl.* 3(3): 251. 1898.

Nomes Populares: Erva-cidreira, cidreira-brava, erva-cidreira brava, erva-cidreira do campo, carmelitana, falsa melissa, chá de tabuleiro, salva-limão salva do Brasil.

Arbustos ou subarbustos aromáticos, muito ramificados, ramos delgados, às vezes decumbentes e enraizantes, densamente pubescentes. Folhas opostas ou ternadas, ovadas ou oblongas, 2-7 cm compr., ápice agudo ou obtuso, estreitas na base, margem serrada, crenada ou crenulada, face adaxial pubescente, rugosa, pecíolo 1-10 mm. Espigas capituliformes, 1 ou 2 por axila, globosas, subglobosas ou oblongas, podendo ser globosas na antese e cilíndricas até 2 cm na frutificação; 8-12 mm compr., pedúnculos axilares,

1,5-2 cm compr., menores do que as folhas; brácteas imbricadas, pluriseriadas, ovadas, 3-6,5 mm, quase tão longas quanto as corolas, acuminadas, face adaxial glabra, face abaxial seríceo-pubescente e ciliada; cálice 1,5-2 mm, comprimido-tubuloso, densamente pubescente, 2-partido na maturidade, 2-denteado, corola lilás, roxa ou branca, com fauce amarela ou branca, zigomorfa, tubo da corola 4-5 mm compr., ovário globoso ou obovóide, 2,8-3 mm diâm., coberto pelo cálice acrescente, aquênios hemisféricos de superfície dorsal lisa. $2n=30$.

Lippia alba é uma espécie polimórfica que devido à sua ampla distribuição geográfica pode apresentar variações morfológicas notáveis. Dentre os 32 acessos analisados, foram encontradas variações quanto ao hábito, filotaxia, folha, inflorescência, bráctea, cálice e corola. Para as análises, foram utilizados 4 indivíduos de cada acesso.

4.1.1 Hábito:

a. Subarbustos: apresentam ramos lenhosos, delgados, eretos ou decumbentes (Fig. 1A), com pouca ramificação basal. Possuem 0,71-1,49 cm de altura. O hábito subarbusitivo ocorre em 9 acessos: CL 3, CL 40, CL 41, LAP 62, LAP 63, LAP 70, LAP 72, Botucatu e Paranoá.

b. Arbustos: o hábito arbustivo entre os acessos é definido pela produção de vários ramos lenhosos, espessos, eretos (Fig. 1B), com muita ramificação basal. Possuem 1,62-2,39 cm de altura. Este tipo de hábito ocorre nos 23 acessos restantes.

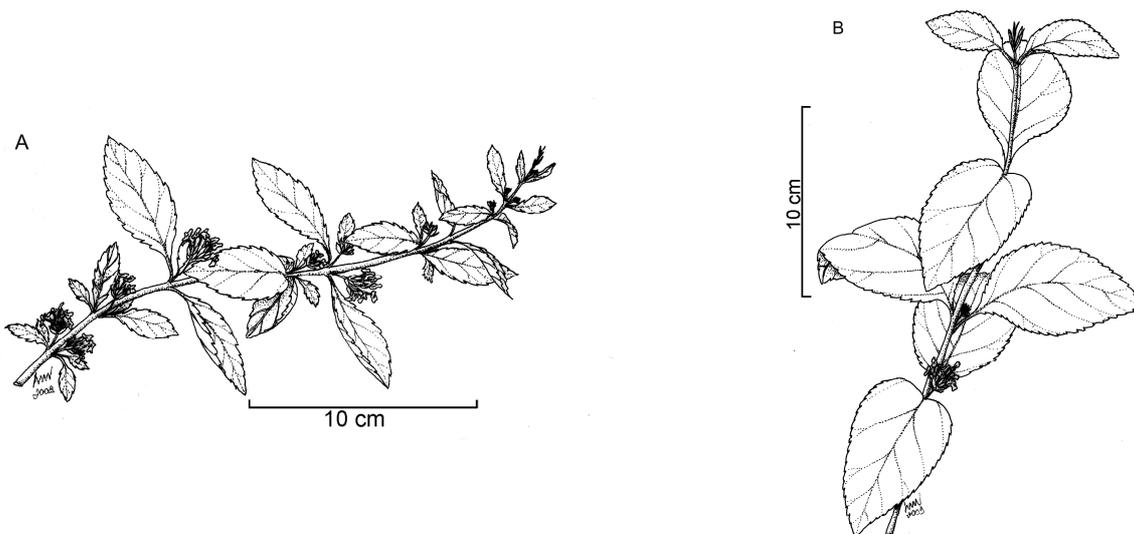


Figura 1. A: Hábito decumbente do acesso CL 3; B: Hábito ereto do acesso CL 42.

4.1.2 Filotaxia:

- a. Oposta: é a filotaxia encontrada em quase todos os acessos (Fig. 2A), com exceção do acesso Var. minor. É também a filotaxia mais comum em todo o gênero *Lippia* (Salimena, 2000).

- b. Verticilada: este tipo de filotaxia foi encontrado apenas no acesso Var. minor (Fig. 2B). Foram observadas de 4, 6 ou 8 folhas por nó. A filotaxia verticilada é mais incomum no gênero *Lippia*, mas ocorre em outras espécies da mesma seção de *L. alba*, como por exemplo, *L. lasiocalycina*. De acordo com Múlgura de Romero *et al.* (2003) e Moldenke (1965), *L. alba* pode apresentar filotaxia oposta ou ternada, porém, o acesso Var. minor apresenta mais de três folhas por nó, representando, então, um tipo de filotaxia verticilada, sendo este um novo tipo de filotaxia para a espécie.

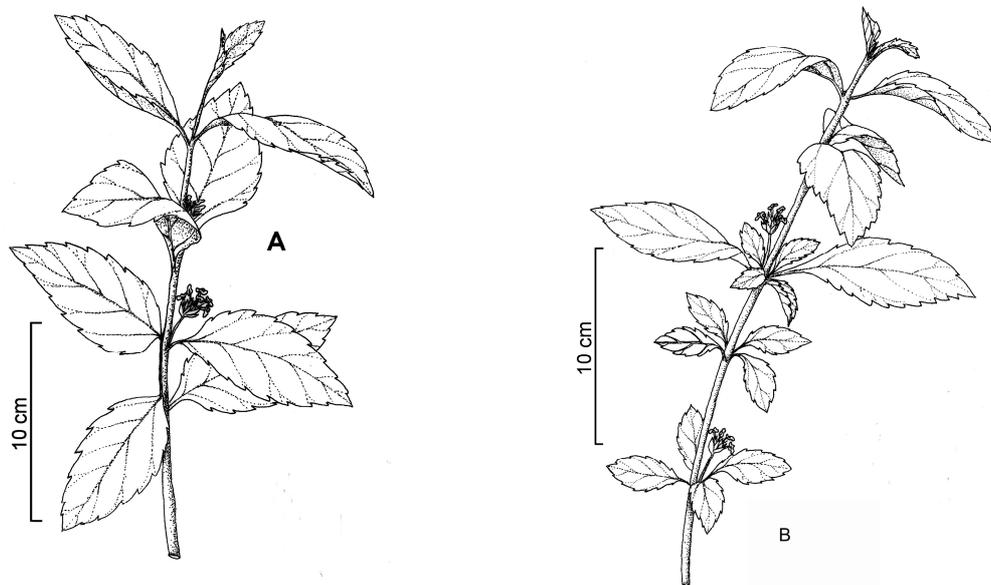
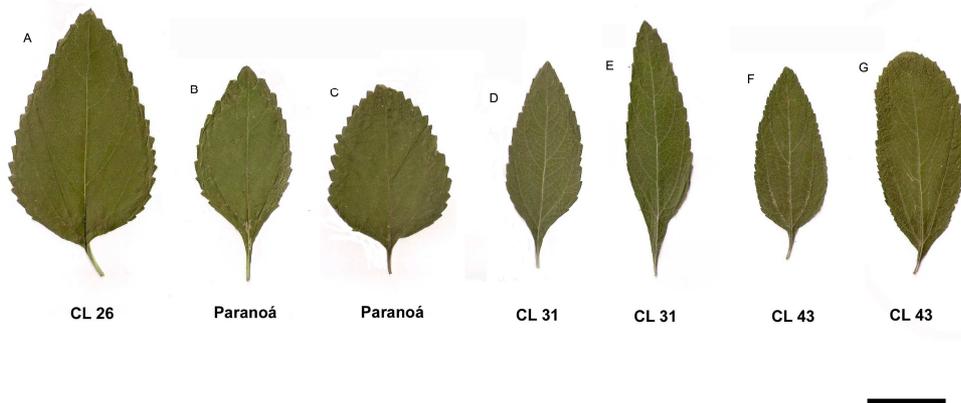


Figura 2. A: Filotaxia oposita no acesso CL 16; B: Filotaxia verticilada em Var. minor.

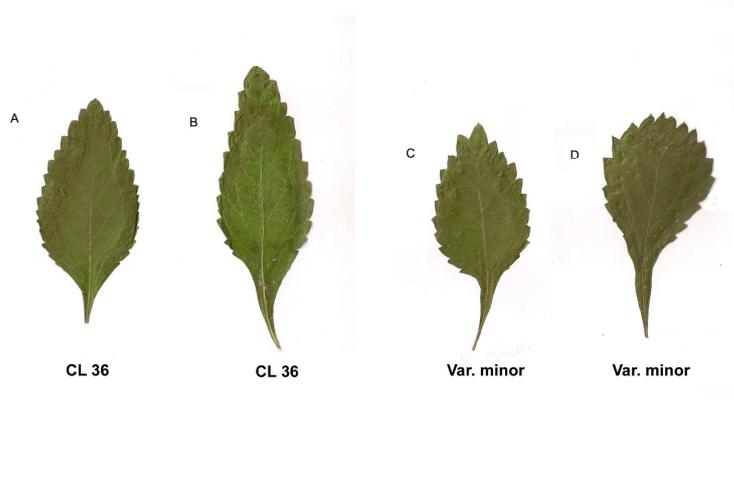
4.1.3 Folha:

A morfologia da lâmina foliar nos acessos analisados mostrou-se muito variável, com alguns formatos diferentes daqueles apresentados na descrição geral. De acordo com Britton (1925-1930) e Moldenke (1965) as folhas podem se apresentar ovadas ou oblongas. Dentre os acessos analisados neste trabalho, o padrão foliar mais comum foi o padrão de lâminas ovadas (Fig. 3A), observadas em 11 acessos (CL 2, CL 5, CL 8, CL 16, CL 20, CL 26, CL 29, CL 30, CL 37, CL 42, CL 40). Outro padrão comum encontrado foi a variação de lâminas elípticas a ovadas (Fig. 3B-C), observadas presentes em um mesmo indivíduo e encontradas em 16 acessos (CL 3, CL 9, CL 17, CL 18, CL 23, CL 24, CL 27, CL 28, CL 32, CL 41, CL 44, LAP 62, LAP 63, LAP 70, LAP 72, Paranoá). Outras variações nos padrões foliares, também observadas presentes em um mesmo indivíduo, foram: elípticas a lanceoladas (Fig. 3D-E), observadas em 2 acessos (CL 31, Botucatu); ovadas a obovadas (Fig. 3F-G), observadas em 1 acesso (CL 43); ovadas a lanceoladas (Fig. 4A-B) também

observada em 1 acesso (CL 36); e ovadas a espatuladas (Fig. 4A-B), encontradas em apenas 1 acesso (Var. minor).



Fotografia 1. A: Lâmina ovada, acesso CL 26; B-C: Lâminas elíptica e ovada, acesso Paranoá; D-E: Lâminas elíptica e lanceolada, acesso 31; F-G: Lâminas ovada e obovada, acesso CL 43. Barra=3cm.

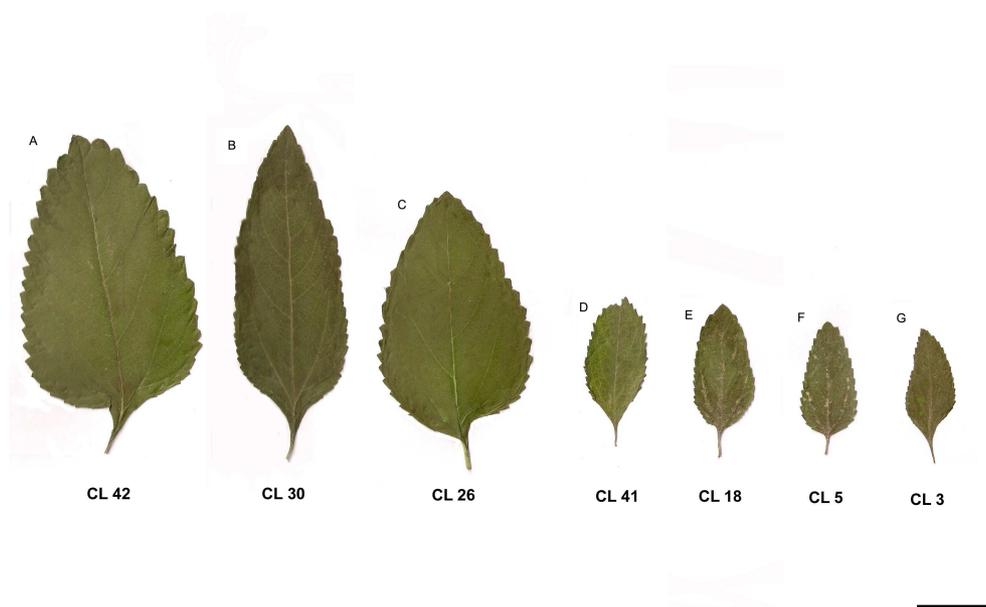


Fotografia 2. A-B: Lâminas ovada e lanceolada, acesso CL 36; C-D: Lâminas ovada e espatulada, acesso Var. minor. Barra=3cm.

Foram observados ápices agudos, na maioria dos acessos, e em menor frequência, ápices obtusos.

Os órgãos foliares são considerados um dos órgãos vegetais mais plásticos (Freitas e Bered, 2003) respondendo rapidamente às mudanças nas condições ambientais nas quais estão inseridos. Entretanto, neste trabalho todos os acessos permaneceram sob as mesmas condições ambientais em casa de vegetação e mesmo assim as dimensões do limbo foram variáveis. Foram observadas desde folhas com tamanho reduzido, que possuem de 2,9-5,1 cm de comprimento, como nos acessos CL 3, CL 5, CL 18 e CL 41 (Fig. 5D-G), até folhas muito desenvolvidas, que apresentam de 10-15,6 cm de comprimento, como nos acessos CL 42, CL 30, CL 26 (Fig. 5A-C).

As dimensões foliares encontradas em alguns acessos são consideravelmente diferentes das dimensões descritas por Britton (1925-1930) e Moldenke (1965) que relataram limbos foliares com 2,0-7,0 cm de comprimento.

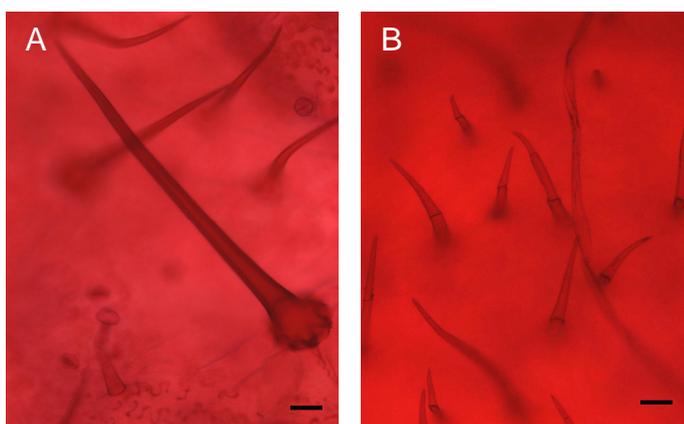


Fotografia 3. A-C: Folhas muito desenvolvidas encontradas nos acessos CL 42, CL 30 e CL 26; D-E: Folhas de tamanho reduzido, observadas nos acessos CL 41, CL 18, CL 5 e CL 3. Barra= 3 cm.

L. alba se caracteriza por apresentar arbustos e subarbustos aromáticos (Britton, 1925-1930; Moldenke, 1965; Múlgura de Romero *et al.*, 2003), apresentando caules e folhas contendo tricomas tectores e tricomas

glandulares. Foram observados dois tipos de tricomas tectores nos acessos analisados, os tricomas tectores uni e bicelulares (Fig. 6). Os dois tipos possuem base arredondada e ápice afilado, confirmando os resultados obtidos por Tavares (2003) em seu trabalho com três quimiotipos de *L. alba*. As células adjacentes à base dos tricomas tectores variaram em número, de duas a dezoito, dependendo do acesso analisado.

Para uma análise mais detalhada do limbo foliar, foi aplicada a técnica de diafanização em 7 acessos: CL 42, CL 43, CL 16, CL 29, CL 3, CL 40 e Var. minor. Os tricomas tectores unicelulares foram observados em todos esses acessos e os tricomas tectores bicelulares foram restritos aos acessos CL 29, CL 3, CL 40 e Var. minor, sendo neste último acesso os tricomas mais frequentes.

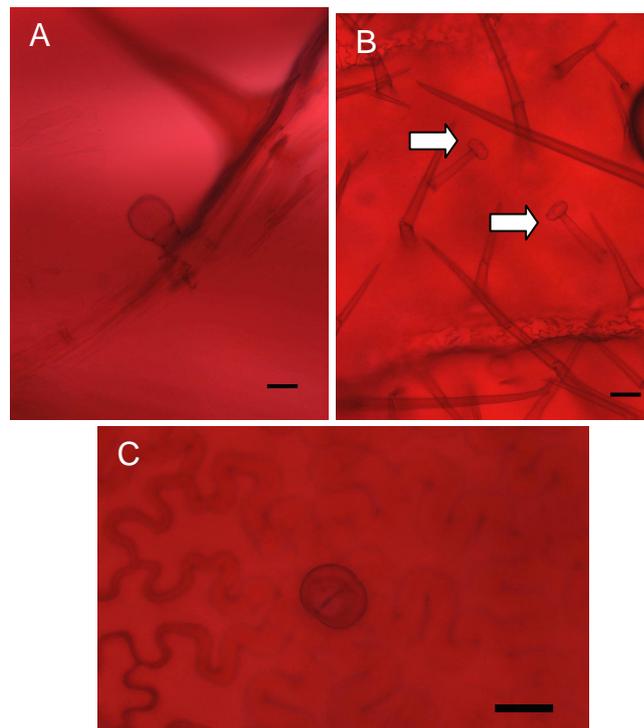


Fotografia 4. A: Tricomas tectores unicelulares; B: tricomas tectores bicelulares. Barra= 30 μ m

Cantino (1990) observou tricomas tectores unicelulares em *L. graveolens* e o mesmo autor destaca a presença deste tipo de tricoma na subfamília Verbenoideae. Morretes (1969) também observou esse tipo de tricoma em *L. lupulina*. Em *L. alba* Metcalfe e Chalk (1950), citado por Tavares (2003), relataram a ocorrência de tricomas tectores unicelulares mas não mencionam tricomas bicelulares. Já em seu trabalho, Tavares (2003) relatou a existência desses dois tipos de tricomas tectores e sugere que a ocorrência desses dois tipos pode ser utilizada como um caráter diagnóstico em *L. alba*.

Nos 32 acessos analisados, foram observados três tipos de tricomas glandulares nas folhas: tricoma glandular com célula intermediária mais longa

ou capitado e tricoma glandular com célula intermediária mais curta ou subsésil, com a cabeça sendo formada por uma ou duas células (Fig. 7). Segundo Cantino (1990), o tipo subsésil apresenta um pedicelo curto, discóide e a cabeça é formada por uma ou várias células, com formatos variáveis, esféricos, obovados ou caliciformes. Já o tipo capitado apresenta o pedicelo formado por duas a quatro células, mais longo do que o subsésil e cabeça esférica. Esses dados confirmam o resultado obtido por Tavares (2003) no qual a autora observou esses três tipos de tricomas glandulares.



Fotografia 5. A: Tricomas glandulares: A: Tricoma glandular subsésil com cabeça formada por uma célula; B: Tricomas glandulares capitados; C: Tricoma glandular subsésil com cabeça formada por duas células. Barra= 30 μ m

Existe uma variação de tipos de tricomas glandulares no gênero *Lippia*. Em *L. graveolens* Cantino (1990) relata a presença de tricomas glandulares subsésseis com cabeça uni e bicelular; Morretes (1969) observou a existência de tricomas glandulares capitados, com pedicelos bicelulares e cabeças pluricelulares em *L. lupulina*; Bonzani *et al.* (2003) relataram a ocorrência de tricomas glandulares subsésseis e com cabeças bicelulares em *L. junelliana* (Moldenke) Tronc. enquanto Matos e Oliveira (1998) observaram tricomas

capitados com cabeças unicelulares e porções intermediárias formadas por uma ou três células.

Todos os 32 acessos analisados apresentaram tricomas glandulares subsésseis, com a cabeça formada por uma ou duas células. Este tipo de tricoma foi observado apenas nas faces adaxiais foliares de 11 acessos, porém, foi encontrado nas faces abaxiais de todos eles.

Os tricomas capitados foram encontrados em somente seis acessos (CL 3, CL 26, CL 29, CL 40, LAP 62, LAP 72 e Var. minor). De acordo com Cantino (1990) os tricomas capitados exibem muita variação infragenérica, porém, o autor não cita possíveis variações infraespecíficas. Nos seis acessos que apresentaram este tipo de tricoma, foi possível observar diferenças de tamanho no pedicelo, sendo interessante para um trabalho posterior uma análise mais detalhada dessas estruturas.

4.1.4 Inflorescência:

Segundo Britton (1925-1930) as inflorescências podem apresentar formas subglobosas ou oblongas e de acordo com Múlgura de Romero *et al.* (2003) elas podem ser globosas na antese e cilíndricas na frutificação. Na maioria dos acessos foram encontradas inflorescências subglobosas. Também foram observadas inflorescências globosas em menor frequência, e, inflorescências oblongas em apenas 1 acesso (Var. minor).

4.1.5 Bráctea:

A morfologia das brácteas é um importante caráter utilizado na taxonomia do gênero *Lippia*. Em *L. alba* as brácteas foram descritas somente com forma ovada e ápice agudo (Britton, 1925-1930; Moldenke, 1965; Múlgura de Romero *et al.* 2003). Dentre os 32 acessos analisados foram encontradas três formas: ovadas (Fig. 8A e 6D), elípticas (Fig. 8C) e orbiculares (Fig. 8B). Foram também observados três tipos de ápices: agudo (Fig. 8D), aristado (Fig. 8A e 8C) e cuspidado (Fig. 8- B) e um tipo de base: truncada.

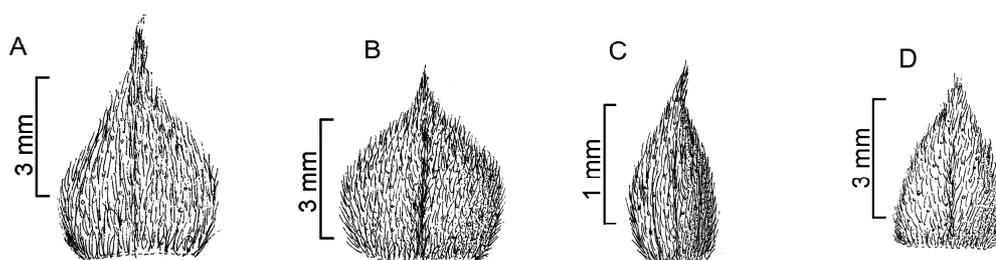


Figura 3. A: Bráctea ovada com ápice aristado, acesso CL 16; B: Bráctea orbicular com ápice cuspidado, acesso CL 29; C: Bráctea elíptica com ápice aristado, acesso CL 42; D: Bráctea ovada com ápice agudo, acesso Var. minor.

Todos os acessos apresentaram a face abaxial densamente pubescente, com tricomas tectores e glandulares subsésseis. Nos acessos que apresentaram tricomas glandulares capitados, estes também estavam presentes. A maioria dos acessos apresentaram a face adaxial glabra, com exceção dos acessos CL 3, CL 40, CL 41 e Var. minor. A presença de tricomas na face adaxial das brácteas é um novo estado de caráter descrito para a espécie neste trabalho, já que até o momento há apenas o registro de face adaxial glabra (Múlgura de Romero *et al.*, 2003).

O tamanho das brácteas também apresentou grande variação, estando as menores entre 1-2 mm de comprimento, como no acesso CL 42 (Fig. 8C) e na maioria dos acessos o comprimento das brácteas varia de 3-4 mm, como nos acessos CL 16, CL 29 e Var. minor (Fig. 8A-B e 8D). As descrições da espécie apresentam o tamanho das brácteas entre 3-6,5 mm de comprimento (Britton, 1925-1930; Moldenke, 1965; Múlgura de Romero *et al.* 2003), porém, neste trabalho, foi encontrada uma variação de 1-4 mm, portando brácteas com um tamanho menor do que o tamanho das brácteas mencionado nas descrições.

4.1.6 Flor:

4.1.6.1 Cálice:

O cálice na seção Zapania é tubular, às vezes 2-partido ou reduzido a duas pequenas folhas (Troncoso, 1974). Em *Lippia alba*, o cálice é descrito como tubular e bipartido (Britton, 1925-1930; Moldenke, 1965; Múlgura de Romero *et al.*, 2003). No material analisado, todos os cálices encontrados foram bipartidos e foi observada uma variação de 1-3 lacínios. Existe uma variação de cálices 2 ou 4-denteados dentro do gênero *Lippia* (Troncoso, 1974), porém, em nenhuma das descrições prévias de *L. alba* consultadas foi mencionado o número de lacínios ou dentes presentes no cálice, o que torna esses dados o primeiro relato de ocorrência de variações no número de lacínios para a espécie. Exemplos dos tipos diferentes de lacínios encontrados nos acessos estão na Figura 9.

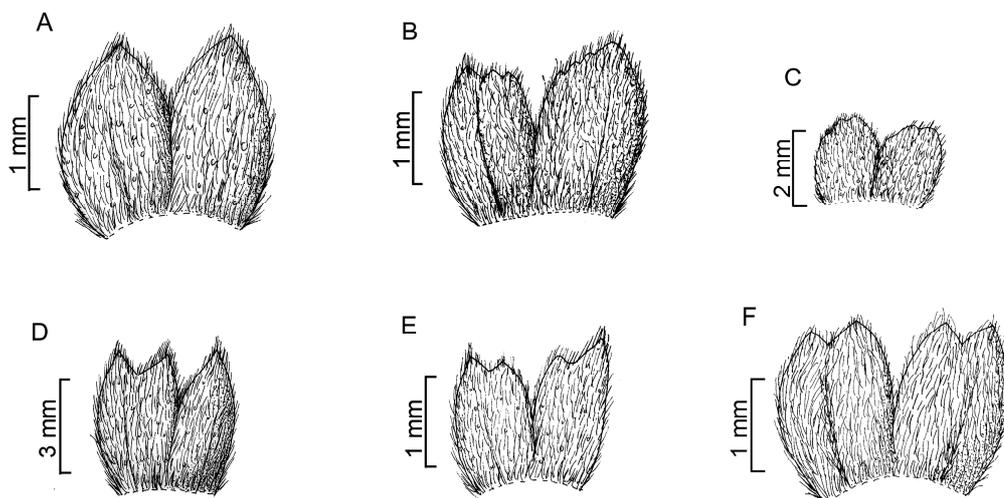


Figura 4. A: Cálice 1-laciniado, acesso CL 40; B: Cálice 3-laciniado, acesso CL 29; C: Cálice levemente 3-laciniado, acesso Var. minor; D: Cálice 1 e 2-laciniado, acesso CL 42; E: Cálice 2-laciniado (lacínios desiguais), acesso CL 43; F: Cálice 2-laciniado (lacínios iguais), acesso CL 3.

Nos cálices que apresentam lacínios desiguais, os dois lacínios anteriores são sempre menores. Os lacínios de todos os acessos são ciliados.

Os cálices são externamente densamente vilosos e hirsutos, com tricomas tectores e glandulares subssésseis e/ou capitados, estes últimos presentes nos acessos que apresentaram este tipo de tricoma.

O tamanho dos cálices apresentou variação, sendo os menores possuindo 1-2 mm de comprimento, como nos acessos CL 40, CL 29, CL 43, CL 3 (Fig. 9A-C, E-F) e os maiores entre 3-4 mm, como no acesso CL 42 (Fig. 9D). A maioria dos acessos apresentou os cálices entre 1-2 mm. Segundo Múlgura de Romero *et al.* (2003) o cálice de *L. alba* varia de 1,5-2,0 mm de comprimento, portanto, o material analisado neste trabalho mostrou uma variação de quase o dobro do tamanho descrito para a espécie.

4.1.6.2 Corola:

As corolas apresentaram variações quanto ao tamanho, ao diâmetro do tubo e à cor.

As maiores corolas apresentaram entre 5-6 mm, como nos acessos CL 16 e CL 3 (Fig. 10A-B) e as menores entre 3-4 mm, como nos acessos CL 29, CL 43, CL 42 e Var. minor (Fig. 10C-F). De acordo com Britton (1925-1930) e Moldenke (1965) o tamanho do tubo da corola está contido entre 4-5 mm de comprimento, o que certifica a variação do tamanho das corolas dos acessos analisados, que está entre 3-6 mm de comprimento.

O diâmetro do tubo da corola também apresentou variações entre os acessos. Em alguns acessos o diâmetro é maior, como nos acessos CL 16, CL 3 e CL 29 (Fig. 10A-C), e em outros acessos o tubo é mais estreito, com diâmetro menor, como nos acessos CL 43, CL 42 e Var. minor (Fig. 10D-F).

Em alguns acessos, a constrição do tubo é mais acentuada, como nos acessos CL 29, CL 43, CL 42 e Var. minor (Fig. 10C-F), enquanto em outros (CL 16 e CL 3) a constrição é quase imperceptível, (Fig. 10A-B).

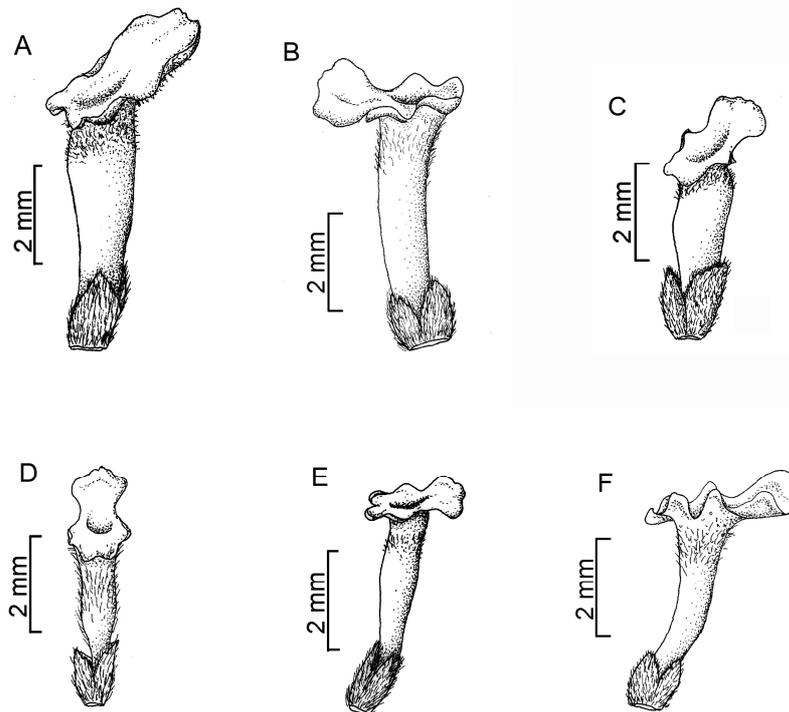


Figura 5. A-B: Corola com uma constrição quase imperceptível no tubo: A: acesso CL 16; B: acesso CL 3; C-F: Corolas com constrição forte no tubo: C: acesso CL 29; D: acesso CL 43; E: acesso CL 42; F: acesso Var. minor.

Em *L. alba* foi relatada uma imensa variação de cores das corolas por Moldenke (1965). Segundo o autor a corola pode variar de alguns tons de rosa, roxo, violeta, amarelo e branco e a fauce pode variar de branca a amarela. Nos acessos analisados, a cor da corola variou de lilás, rosa ou alva e a fauce apresentou variações entre amarela, lilás ou branca (Fig.11).



Fotografia 6. A: Corola lilás, acesso CL 36; B: Corola rosa, acesso CL 32; C: Corola branca, acesso LAP 63. Fotos A por Aline do Vale; B e C por Luiz Menini Neto.

Em 1965, Moldenke já considerava *L. alba* uma espécie amplamente distribuída e muito variável. De acordo com o autor o táxon ocorre amplamente distribuído nos neotrópicos, desde as Antilhas, México, América Central até América do Sul tropical e subtropical. Essa extensa distribuição provavelmente está relacionada com o alto grau de polimorfismo apresentado pela espécie, caracterizando a plasticidade fenotípica.

Neste trabalho, o objetivo de submeter o material às mesmas condições ambientais em uma casa de vegetação foi uma tentativa de isolar as variações ambientais, oferecendo sempre as mesmas condições para os acessos desde que foram retirados do cultivo *in vitro* e aclimatados em casa de vegetação. Portanto, espera-se que toda variação morfológica encontrada entre os acessos seja majoritariamente oriunda da variabilidade genética e não de possíveis alterações ambientais.

Como descrito nos resultados foram observadas variações consideráveis tanto em caracteres vegetativos quanto reprodutivos nos 32 acessos analisados neste trabalho. Órgãos vegetativos, como já comentado anteriormente, são conhecidos como órgãos plásticos, pois, respondem com rapidez às variações ambientais. Todavia, como as variações observadas, como por exemplo, no formato e tamanho das folhas não estão ligadas às alterações ambientais neste caso, evidencia-se a real diferença genotípica entre os acessos. Já os caracteres reprodutivos, muitas vezes usados pelos taxonomistas por serem caracteres conservados e que, portanto, não variam muito também apresentaram variações, como por exemplo, do tamanho e formato das brácteas, dos números de lacínios do cálice e do tamanho do tubo da corola.

Dentre os acessos analisados não foi encontrada nenhuma relação entre as variações observadas nos estados de caracteres e a distribuição geográfica dos acessos. Também não foram observados padrões morfológicos, não sendo possível nenhuma subdivisão em grupos morfológicos entre os acessos.

Como a espécie apresenta caule enraizantes (Múlgura de Romero *et al.*, 2003) o uso de estacas pode ser feito para a sua propagação vegetativa. Devido a isso, a dispersão de alguns indivíduos pelos Estados ou até mesmo pelo país pode ter sido realizada por pessoas que transportavam estacas, e não somente por dispersão de frutos. Isso pode justificar a ausência de um

padrão morfológico relacionado com a localidade geográfica dos acessos, já que eles podem ter sido transportados de diversas regiões para um determinado local em um período relativamente recente.

4.2. Estimativas das quantidades de DNA

Variações morfológicas podem estar relacionadas às variações na quantidade de DNA desses acessos, como mostram alguns trabalhos que associam o aumento da ploidia e o conseqüente aumento da quantidade de DNA relacionados ao aumento do tamanho de alguns órgãos das plantas, sendo este evento conhecido como efeito “gigas” (Stebbins, 1971).

A fim de se identificar possíveis variações nas quantidades de DNA entre os diversos acessos foram determinadas as quantidades de DNA dos mesmos por citometria de fluxo. No experimento realizado, foram adotadas cinco repetições para cada acesso, sendo pelo menos 10.000 núcleos processados em cada análise. Os valores médios das estimativas para cada acesso encontram-se na tabela 2. Neste experimento foi possível detectar a existência de sete grupos com quantidades significativamente diferentes de DNA através da análise de variância (ANOVA) (Tabela 3), seguida do teste de Scott-Knott (1974) a 1%. A separação dos grupos pode ser vista na Tabela 3 e os histogramas ilustrativos de cada grupo podem ser vistos na Figura 12.

Para o Grupo I foi encontrada uma variação de 2,31 a 2,44 pg, para o Grupo II foi observada uma variação de 2,45 a 2,56 pg, para o Grupo III o valor foi de 3,11 pg, para o Grupo IV foi encontrada uma variação de 3,65 a 3,77 pg de DNA, para o Grupo V os valores ficaram entre 4,51 a 4,59 pg de DNA, para o Grupo VI a variação foi de 4,66 a 4,71 e para o Grupo VII foi encontrado o valor de 6,70 pg de DNA (Tabela 3).

Segundo Dolezel *et al.* (2007), a estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo tem auxiliado a taxonomia e sistemática de vários grupos de plantas, principalmente as que apresentam semelhanças ou diferenças morfológicas devido à plasticidade fenotípica, porém, poucos são os trabalhos relacionados à estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo para o gênero *Lippia*.

Dentre eles pode-se destacar o trabalho realizado por Sousa (2008) com duas espécies morfológicamente similares pertencentes a este gênero. De acordo com o autor, *Lippia rotundifolia* Cham. e *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer também apresentaram diferenças significativas na estimativa da quantidade de DNA, apresentando cada uma 3,14 pg e 3,05 pg de DNA, respectivamente. Um resultado relevante para a espécie *L. alba*, uma das espécies mais polimórficas do gênero, foi apresentado no trabalho realizado por Pierre (2008), no qual os três quimiotipos La1, La2 e La3 apresentaram 1,86 pg, 3,42 pg e uma variação de 2,05 a 3,41 pg de DNA respectivamente.

De acordo com Murray (2005) a quantidade de DNA pode estar diretamente relacionada com muitos caracteres nos vegetais, inclusive com a diferenciação morfológica das espécies, sendo que no mesmo no nível intra-específico essas diferenças na quantidade de DNA podem levar a tal diferenciação morfológica a ponto de impedir o fluxo gênico entre populações e, com isso, aumentar as chances para eventos de especiação. Dessa forma, a quantidade de DNA pode ser uma característica relevante para estudos taxonômicos.

Tabela 2 Análise de variância para estimativas da quantidade de DNA de 32 acessos de *Lippia alba* oriundos de diferentes regiões do país:

FV	GL	SQ	QM	Fc
Acesso	31	193,190	6,232	1257,679
Erro	128	0,634	0,004	
Total	159	193,832		
CV (%)=	2,04			
Média geral:	3,44			

Tabela 3 Média das estimativas da quantidade de DNA (pg) de 32 acessos de *L. alba* obtidas a partir de cinco repetições e classificação em sete grupos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Grupos	Acessos	Média/ Desvio padrão
Grupo I	CL 18	2,31 ($\pm 0,09$) ^a
	CL 37	2,36 ($\pm 0,03$) ^a
	CL 43	2,39 ($\pm 0,04$) ^a
	CL 30	2,39 ($\pm 0,01$) ^a
	CL 2	2,43 ($\pm 0,05$) ^a
	CL 5	2,45 ($\pm 0,05$) ^a
	CL 20	2,44 ($\pm 0,03$) ^a
Grupo II	Botucatu	2,45 ($\pm 0,10$) ^b
	CL 17	2,45 ($\pm 0,06$) ^b
	CL 42	2,47 ($\pm 0,04$) ^b
	CL 23	2,47 ($\pm 0,04$) ^b
	CL 44	2,49 ($\pm 0,03$) ^b
	CL 9	2,53 ($\pm 0,16$) ^b
	CL 31	2,53 ($\pm 0,07$) ^b
	LAP 63	2,56 ($\pm 0,12$) ^b
Grupo III	CL 16	3,11 ($\pm 0,04$) ^c
Grupo IV	CL 26	3,65 ($\pm 0,05$) ^d
	CL 29	3,67 ($\pm 0,15$) ^d
	Paranoá	3,68 ($\pm 0,02$) ^d
	CL 8	3,71 ($\pm 0,06$) ^d
	CL 28	3,75 ($\pm 0,09$) ^d
	CL 24	3,77 ($\pm 0,04$) ^d
Grupo V	CL 27	4,51 ($\pm 0,05$) ^e
	CL 41	4,56 ($\pm 0,05$) ^e
	CL 3	4,56 ($\pm 0,03$) ^e
	CL 36	4,56 ($\pm 0,03$) ^e
	CL 32	4,59 ($\pm 0,05$) ^e
Grupo VI	CL 40	4,66 ($\pm 0,08$) ^f
	LAP 62	4,72 ($\pm 0,05$) ^f
	LAP 70	4,72 ($\pm 0,10$) ^f
	LAP 72	4,71 ($\pm 0,08$) ^f
Grupo VII	Var. minor	6,70 ($\pm 0,04$) ^g

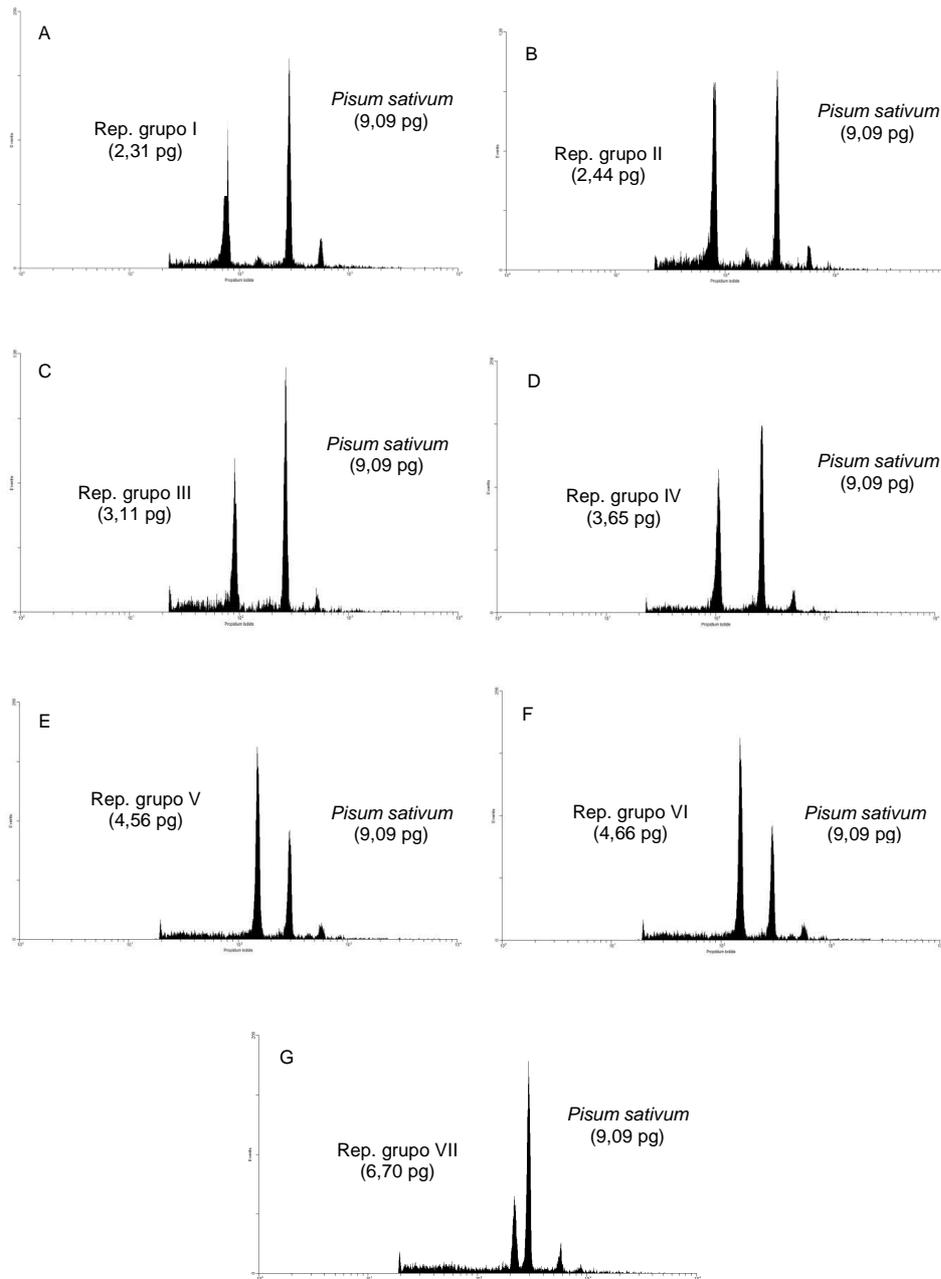


Figura 6. Histogramas representativos da estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo em pg.(A) Grupo I; (B) Grupo II; (C) Grupo III; (D) Grupo IV; (E) Grupo V; (F) Grupo VI; (G) Grupo VII. (* Rep.- representante)

Os grupos observados na análise de citometria de fluxo através do teste estatístico de Scott-Knott não foram relacionados aos grupos morfologicamente diferentes. Porém, o grupo com maior quantidade de DNA (6,70 pg) correspondente ao acesso Var. minor, é o acesso que apresenta as maiores variações morfológicas, sendo o único com filotaxia verticilada, folhas ovadas a

espatuladas, com ápices agudo a obtusos, dentadas e cálice 3-laciniado. Na figura 13 está representado o acesso Var. minor em comparação a um acesso do grupo I com caracteres morfológicos mais comuns em *L. alba*.

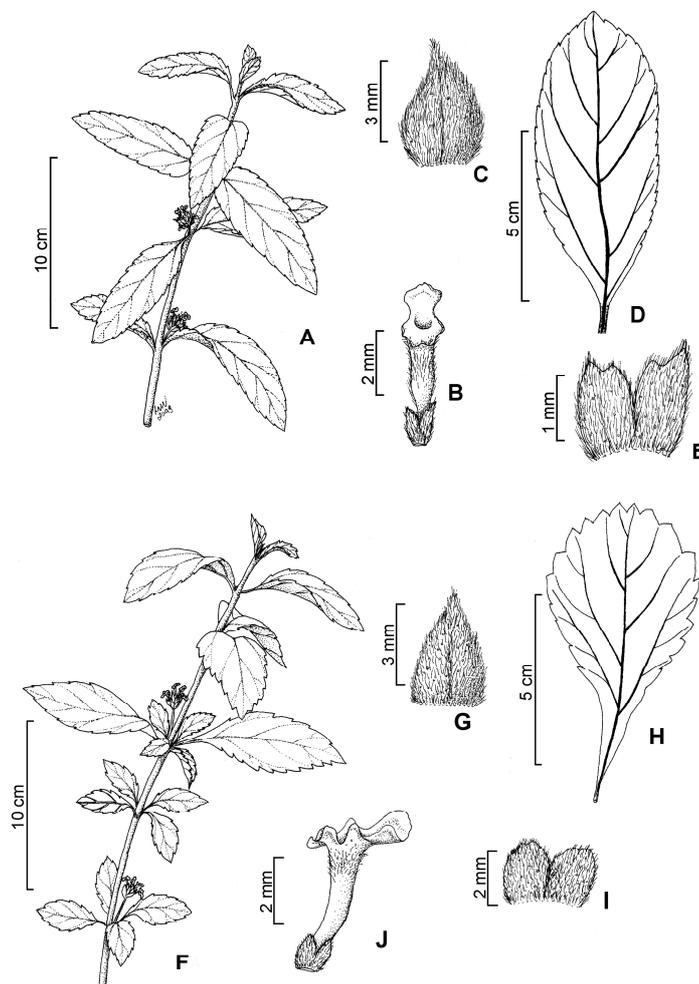


Figura 7. A-E: Representação do acesso CL 43 pertencente ao grupo I com média de 2,39 pg de DNA; F-J: Representação do acesso Var. minor pertencente ao grupo VII com média de 6,70 pg de DNA.

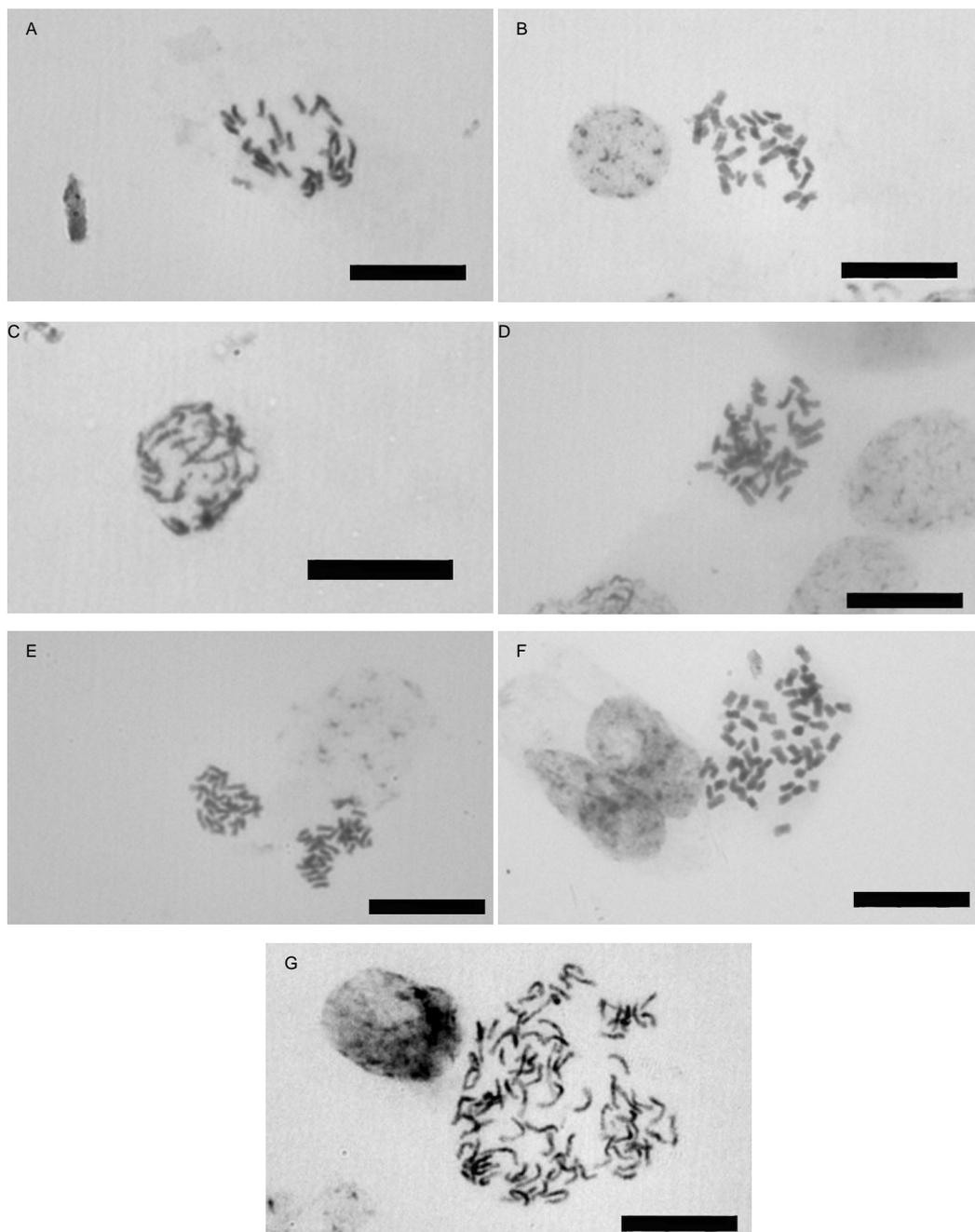
4.3. Análise Citogenética

As variações morfológicas podem também estar associadas às variações genéticas. Neste contexto, o número de cromossomos é um caráter que muito pode contribuir para a compreensão destas variações.

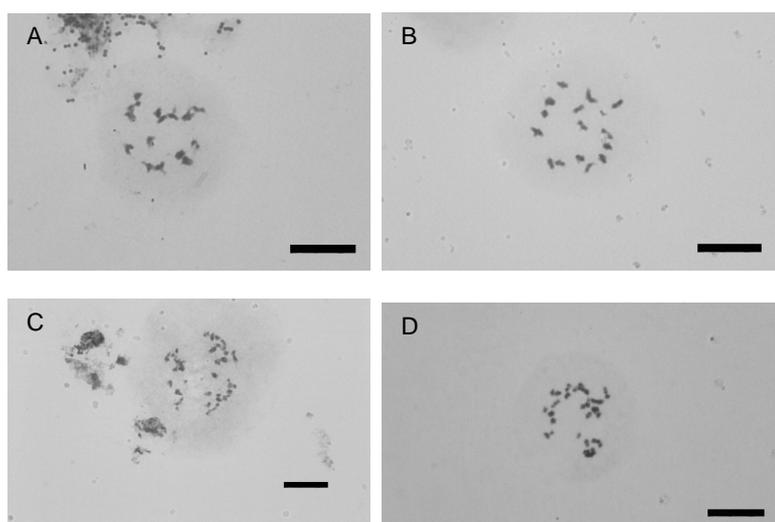
Análises em células meióticas e mitóticas foram feitas a fim de determinar o número cromossômico e conseqüentemente a ploidia dos acessos. Foram analisados 19 acessos e os números observados estão indicados na tabela 4. Foram encontrados seis números diferentes, $2n=30$, $2n=34$, $2n=51$, $2n=58$, $2n=60$ e $2n=93$ (Fig. 14 e 15). A fim de possuir representantes de cada grupo obtido pela estimativa de DNA, alguns acessos foram priorizados devido à impossibilidade de determinar o número de todos.

Em 2003, Brandão concluiu que *Lippia alba* é uma espécie diplóide que apresenta $2n=30$ cromossomos e em 2004, Pierre estudou a cariologia dos três quimiotipos de *L. alba* observando que dois destes apresentaram variações de $2n=30$ cromossomos (quimiotipo La1) e $2n=60$ cromossomos (quimiotipo La2), sugerindo um processo de autoploidização do primeiro. O terceiro quimiotipo (quimiotipo La3) apresentou uma grande variação numérica de $2n=12$ a 60 , sendo classificado como mixoplóide. Os resultados encontrados neste trabalho confirmam essas análises, apresentando uma variação de $2n=30$ (diplóides), $2n=60$ (possivelmente tetraplóides), $2n=30$ a $2n=60$ (possivelmente diplóides, tetraplóides e níveis intermediários de ploidia) e ainda apresentam um novo número ca $2n=93$, que possui cerca de seis vezes o número cromossômico básico do acesso considerado diplóide ($n=15$), o que sugere que este acesso seja hexaplóide (Tabela 4, Fig. 14).

Os resultados da contagem cromossômica corroboram os resultados encontrados na citometria de fluxo, sendo observada uma relação direta entre o número cromossômico e o conteúdo de DNA dos acessos (Tabela 5).



Fotografia 7. Figuras representativas da variação de números cromossômicos encontrados. (A) Metáfase ($2n=30$) de um acesso do grupo I (CL 43); (B) Metáfase ($2n=30$) de um acesso do grupo II (CL 23); (C) Pró-metáfase (ca $2n=34$) do acesso do grupo III (CL 16); (D) Metáfase (ca $2n=51$) de um acesso do grupo IV (CL 29); (E) Metáfase (ca $2n=58$) de um acesso do grupo V (CL 27); (F) Metáfase (ca $2n=58$) de um acesso do grupo VI (CL 40); (G) Pró-metáfase (ca $2n=93$) do acesso do grupo VII (Var. minor). ca= contagem aproximada. Barra= 10 μm .



Fotografia 8. Figuras representativas da variação de números cromossômicos encontrados. (A) Diacinese (n=15) de um acesso do grupo I (CL 43); (B) Diacinese (n=15) de um acesso do grupo II (CL 42); (C) Diacinese (ca n=26) de um acesso do grupo IV (CL 29); (D) Diacinese (ca n=30) de um acesso do grupo V (CL 3). Barra= 10 μ m.

Tabela 4 Número de cromossomos (2n) por acessos de *L. alba*.

Acesso (grupo)	Número cromossômico (2n)	Acesso (grupo)	Número cromossômico (2n)
1) CL 2 (I)	30	11) LAP 63 (II)	30
2) CL 5 (I)	30	12) CL 16 (III)	34(ca)
3) CL 18 (I)	30	13) CL 29 (IV)	51(ca)
4) CL 20 (I)	30	14) CL 3 (V)	60
5) CL 37 (I)	30	15) CL 27 (V)	58
6) CL 43 (I)	30	16) CL 32 (V)	60
7) CL 23 (II)	30	17) CL 41 (V)	60
8) CL 31 (II)	30	18) CL 40 (VI)	56-58(ca)
9) CL 42 (II)	30	19) Var. minor(VII)	91-93(ca)
10) Botucatu(II)	30		

(ca)- contagem aproximada

Tabela 5 Relação entre os acessos pertencentes aos grupos divididos pela análise da estimativa da quantidade de DNA e o número cromossômico.

Acessos	Grupos	Média da estimativa quantidade DNA (pg)	Número cromossômico
CL 42	I	2,39	30
CL 43	II	2,49	30
CL 16	III	3,11	34 (ca)
CL 29	IV	3,70	51 (ca)
CL 3	V	4,55	60
CL 40	VI	4,70	58 (ca)
Var. minor	VII	6,70	93 (ca)

Pierre (2008) encontrou uma relação direta entre o número cromossômico dos três quimiotipos e o conteúdo de DNA, entretanto, a autora não observou correspondência entre o conteúdo 2C de DNA das plantas tetraplóides (quimiotipo La2) e um múltiplo exato do genoma das plantas diplóides (quimiotipo La1), já que os indivíduos tetraplóides apresentaram 83,87% a mais de DNA em relação aos indivíduos diplóides. Segundo a autora esses resultados evidenciam que além de rearranjos cromossômicos, perdas de DNA podem ter atuado na evolução do genoma tetraplóide nos quimiotipos analisados.

Nos acessos analisados neste trabalho, pode ser observado em indivíduos tetraplóides ($2n=60$ e 4,55 pg de DNA) valores próximos ao dobro do encontrado em plantas diplóides ($2n=30$ e 2,39-2,49 pg de DNA), sugerindo uma relação direta entre o aumento da plodia e o aumento da quantidade de DNA.

Em relação às características morfológicas, as variações relevantes encontradas em caracteres como hábito, filotaxia, folha e tricomas foram observadas nos acessos poliplóides. Indivíduos com hábito decumbente e tricomas do tipo tectores bicelulares e glandulares capitados só foram observados em acessos poliplóides. Esses acessos também apresentaram variações nos formatos das folhas em um mesmo indivíduo. O acesso que se apresentou mais discrepante foi o Var. minor, com maior quantidade de DNA e

com o maior número cromossômico, sendo o único a portar filotaxia verticilada e folhas espatuladas.

Eventos de poliploidia são comuns nas angiospermas, nas quais provavelmente pelo menos um evento de poliploidização ocorreu em sua história evolutiva (Blanc e Wolfe, 2004). Por formar uma barreira reprodutiva, a poliploidia constitui o fator principal para que ocorra especiação abrupta em plantas, sendo um processo evolutivo de extrema importância que normalmente está associada a eventos de hibridação natural (Freitas e Bered, 2003). Segundo Otto e Whitton (2000) a especiação via poliploidia é provavelmente uma das formas mais comuns de especiação simpátrica em plantas. Como consequência os efeitos potenciais em larga escala na regulação gênica e em processos no desenvolvimento podem provocar mudanças imediatas na morfologia, sistemas de reprodução e capacidade de tolerar alterações ecológicas. As variações genéticas observadas nesses acessos, juntamente com as variações morfológicas, sugerem que os eventos de poliploidização sejam relevantes na evolução da espécie.

4.4 Análise Palinológica

Outra análise que revelou diferenças entre os acessos foi o estudo dos tratos palinológicos. Em relação ao número de aberturas, foram observados grãos de pólen di, tri ou tetracolporados, sendo o estado dicolporado o mais raro. Os grupos com acessos diplóides e com menores quantidades de DNA apresentaram apenas grãos tricolporados (Tabela 6), confirmando os resultados obtidos por Pierre (2008).

Diferentemente destes, além dos grãos tricolporados, os grãos di e tetracolporados foram observados nos grupos poliplóides. Pierre (2008) também observou variação no número de aberturas em grupos poliplóides, estes variando entre grãos tri e tetracolporados, sendo os tricolporados os mais frequentes.

Tabela 6 Forma (âmbito) e número de aberturas polínicas de sete acessos representantes dos sete grupos com quantidades diferentes de DNA, em *L. alba*. T = triangular; R = retangular; Q = quadrangular.

Acessos	Âmbito (Percentual de ocorrência)	Número de aberturas
CL 43	T (100%)	3
CL 42	T (100%)	3
CL 16	R (4%), T (76%) e Q (20%)	2, 3 e 4
CL 29	R (4%), T (70%) e Q (26%)	2, 3 e 4
CL 3	T (96%) e Q (4%)	3 e 4
CL 40	R (4%), T (94%) e Q (2%)	2, 3 e 4
Var. minor	T (62%) e Q (38%)	3 e 4

Para a análise do tamanho dos grãos de pólen foram feitas 50 medições de 4 indivíduos por acesso e os valores médios estão na tabela 6. Os grãos apresentaram uma amplitude de 6,58 μm - 27,17 μm no eixo polar (P), de 8,05 μm - 27,59 μm no eixo equatorial (E). Apesar dos baixos valores de algumas amostras, a média dos grãos entre os 7 acessos pertencentes aos 7 grupos variaram de 19,17 μm - 23,03 μm no eixo polar (P) e 19,36 μm - 23,02 μm no eixo equatorial (E). Essa pequena variação entre as médias dos acessos representantes de cada grupo sugere que não há relação entre o aumento da amplitude nos eixos polar e equatorial com o aumento da ploidia dos acessos (Tabela 7).

Além desses caracteres, foi possível mensurar a espessura da exina através da análise com microscopia de luz dos grãos acetolisados (Fig. 16). A espessura variou de 1,19 μm - 4,36 μm . Porém a média entre os acessos pertencentes aos 7 grupos variou de 1,52 μm - 2,49 μm , não havendo também uma relação entre o aumento da espessura da exina com o aumento da ploidia dos acessos (Tabela 7). O acesso com a exina mais espessa foi o CL 3 pertencente ao grupo V, possivelmente um acesso tetraplóide e o acesso com a menor espessura da exina foi o acesso Var. minor, provavelmente um acesso hexaplóide.

Tabela 7 Morfometria polínica de sete acessos representantes dos sete grupos com quantidades diferentes de DNA, dentro de *L. alba*. P = média do diâmetro polar; E = média do diâmetro equatorial; Exina= média da exina (endoexina + ectoexina); $\pm dp$ = desvio padrão; (AP) = amplitude.

Acessos	P $\pm dp$ (AP) μm	E $\pm dp$ (AP) μm	P/E $\pm dp$ (AP) μm	Exina $\pm dp$ (AP) μm
CL 43	21,30 \pm 1,95 (17,34 – 24,98)	21,92 \pm 2,26 (17,62 – 25,48)	0,974 \pm 0,04 (0,88 – 1,05)	1,61 \pm 0,25 (1,20 – 1,99)
CL 42	19,17 \pm 1,31 (17,11– 21,84)	19,36 \pm 1,45 (17,03 - 21,39)	0,99 \pm 0,04 (0,89 – 1,06)	1,62 \pm 0,15 (1,41 – 1,85)
CL 16	23,03 \pm 3,63 (11,43– 27,17)	22,68 \pm 3,41 (9,88- 26,29)	1,01 \pm 0,04 (0,81 – 1,09)	2,28 \pm 0,32 (1,81 – 2,75)
CL 29	22,28 \pm 2,67 (8,91 - 27,06)	22,56 \pm 2,34 (11,85 – 26,01)	0,99 \pm 0,05 (0,87 – 1,09)	1,72 \pm 0,12 (1,42 – 1,91)
CL 3	21,92 \pm 1,78 (18,31 – 26,72)	23,02 \pm 1,70 (19,58 – 27,09)	0,95 \pm 0,06 (0,79 – 1,09)	2,49 \pm 0,66 (1,42 – 4,36)
CL 40	21,35 \pm 3,34 (6,58 – 26,42)	21,41 \pm 3,00 (8,05 – 27,59)	0,99 \pm 0,05 (0,81 – 1,09)	1,80 \pm 0,10 (1,62 – 1,95)
Var. minor	20,33 \pm 1,55 (17,92 – 23,35)	19,53 \pm 2,27 (15,76 – 25,54)	1,05 \pm 0,12 (0,90 – 1,17)	1,52 \pm 0,31 (1,19 – 2,24)

Em relação ao âmbito dos grãos de pólen, foram observados três tipos: retangulares, triangulares e quadrangulares (Tabela 6 e Fig. 16). Os acessos diplóides pertencentes aos grupos com menores quantidades de DNA apresentaram somente grãos triangulares, os acessos dos grupos com níveis de ploidia maiores apresentaram os demais tipos (Tabela 6). Essa variação apresentada entre os grupos mostra uma relação entre os tipos de âmbito e o aumento da ploidia dos acessos, assim como o número de aberturas.

De acordo com Otto e Whitton (2000) o aumento do tamanho dos grãos de pólen constitui uma evidência de poliploidia, pois, a idéia de que a duplicação do genoma resulta em um aumento do tamanho celular é amplamente aceita. Alguns trabalhos, porém, relatam que este aumento pode não estar relacionado diretamente com a poliploidia (Tate e Simpson, 2004). Cuadrado (2003) ressalta que além de trabalhos que mostraram variações no

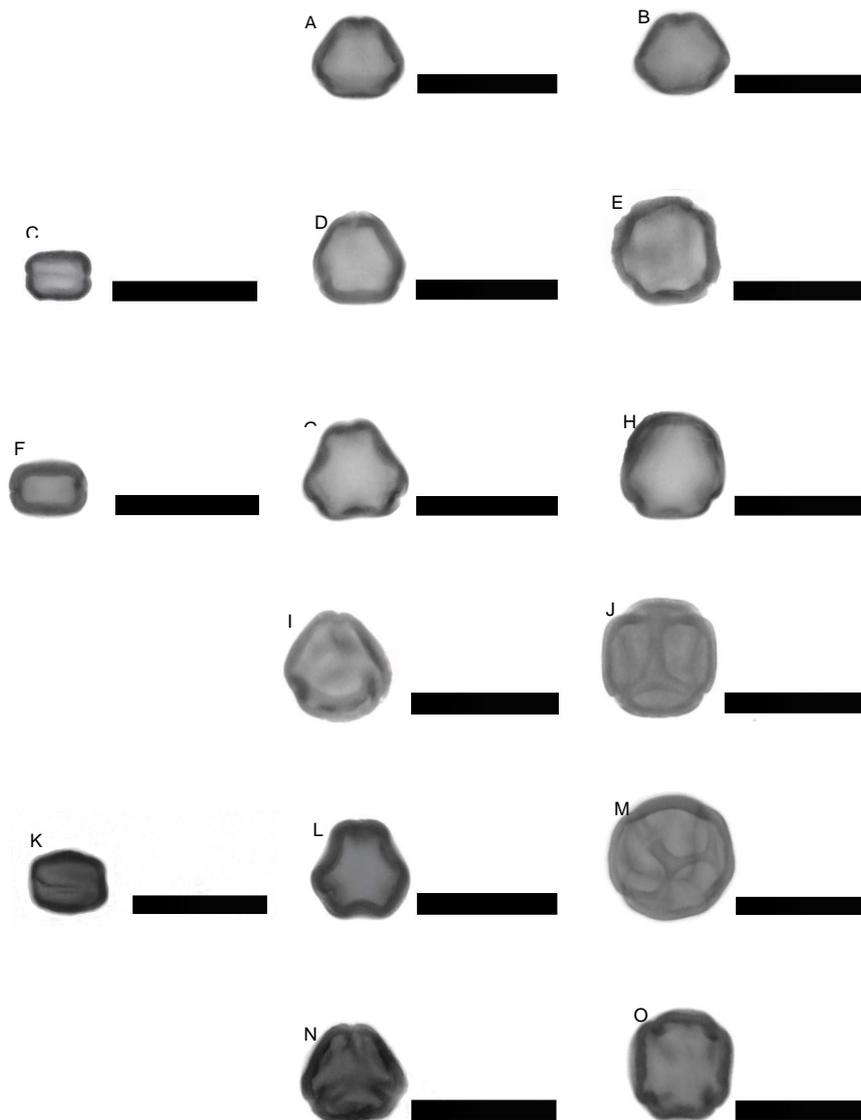


Figura 16. Pólen encontrados nos sete acessos pertencentes aos sete grupos com quantidades diferentes de DNA, dentro de *L. alba*. (A) Pólen triangular do acesso CL 43 pertencente ao grupo I; (B) Pólen triangular do acesso CL 42 pertencente ao grupo II; (C-E) Pólen retangular (C), triangular (D) e quadrangular (E) do acesso CL 16 pertencente ao grupo III; (F-H) Pólen retangular (F), triangular (G) e quadrangular (H) do acesso CL 29 pertencente ao grupo IV; (I-J) Pólen triangular (I) e quadrangular (J) do acesso CL 3 pertencente ao grupo V; (K-M) Pólen retangular (K), triangular (L) e quadrangular (M) do acesso CL 40 pertencente ao grupo VI; (N-O) Pólen triangular (N) e quadrangular (O) do acesso Var. minor pertencente ao grupo VII. Barra= 30 μ m.

tamanho do grão, outros mostraram também que o tamanho pode não variar com a ploidia, e sim o número de aberturas.

Na tabela 8 estão registradas as amplitudes dos eixos polar e equatorial, a quantidade de DNA em pg, os números cromossômicos e o número de aberturas de 7 acessos pertencentes aos 7 grupos. Nesta tabela é possível observar que à medida que ocorre o aumento da estimativa da quantidade de DNA e o aumento da ploidia, maior é a variação observada no número de aberturas (2 a 4), com exceção do acesso CL 3 (grupo V) e do acesso Var. minor (grupo VII), que possuem grãos com 3 e 4 aberturas. O tipo de pólen com 2 aberturas e âmbito retangular foi observado em pequenos percentuais (Tabela 6), porém, é o primeiro relato de ocorrência para a espécie.

Tabela 8 Média dos diâmetros (P) polar e (E) equatorial, (Q) média das estimativas da quantidade de DNA (pg), número cromossômico (2n) e número de aberturas de sete acessos representantes dos sete grupos com quantidades diferentes de DNA, dentro de *L. alba*.

Acessos	(P) μm	(E) μm	(Q) pg	2n	A
CL 43	21, 30	21, 92	2,39	30	3
CL 42	19,17	19,36	2,47	30	3
CL 16	23,03	22,68	3,11	34 (ca)	2, 3 e 4
CL 29	22,28	22,56	3,67	51 (ca)	2, 3 e 4
CL 3	21,92	23,02	4,56	60	3 e 4
CL 40	21,35	21,41	4,66	58 (ca)	2, 3 e 4
Var. minor	20,33	19,53	6,70	93 (ca)	3 e 4

Além de alterações em caracteres vegetativos, a poliploidia pode alterar caracteres reprodutivos, como os florais e palinológicos, exercendo efeitos relevantes sobre as interações entre plantas e polinizadores (Soltis *et al.*, 2003) e consequentemente atuando diretamente no sucesso de sobrevivência da espécie. De forma geral, as plantas poliplóides também possuem maiores chances de se adaptarem a uma grande variedade de condições ambientais, o que pode exercer uma grande influência na adaptação e evolução da espécie.

O presente estudo corrobora com estudos anteriores já realizados para *L. alba* e também fornece evidências da importância dos eventos de poliploidização na evolução do táxon.

4.5 Análise estomática

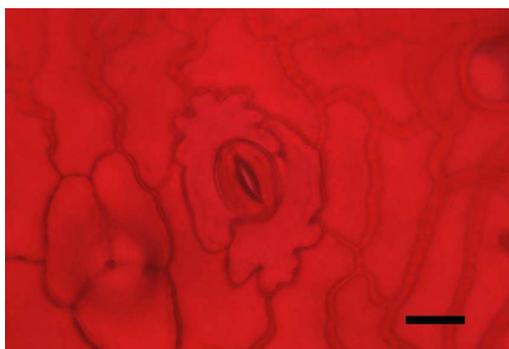
O estudo comparativo das características estomáticas analisadas neste trabalho também mostrou diferenças entre os acessos. Os estômatos observados foram do tipo diacítico (Fig. 17), ocorrendo em ambas as faces e em densidade maior na face abaxial. Tavares (2003) observou três tipos de estômatos, diacítico, anisocítico e anomocítico nos três quimiotipos pertencentes à *L. alba* analisados pela autora. No presente trabalho, tal variação não foi identificada entre os acessos analisados. Existem relatos da ocorrência de mais de um tipo de estômato em algumas espécies de *Lippia*. Cantino (1990) observou estômatos anomocíticos e diacíticos em *L. graveolens* e Morretes (1969) relatou estômatos paracíticos e anisocíticos em *L. lupulina*.

A análise estomática tem sido um método muito utilizado para inferir o nível de ploidia de plantas uma vez que o número e o tamanho dos mesmos varia de acordo com a quantidade de material genético (Souza e Queiroz, 2004; Vichiato *et al.*, 2006).

Como pode ser observado na Tabela 9, houve uma diferença significativa na densidade estomática das folhas dos acessos analisados. Nos acessos CL 3, CL 40 e Var. minor, que são acessos poliplóides, ocorreu uma diminuição na densidade dos estômatos por unidade de área.

A densidade estomática pode ser variável de acordo com a idade da planta e é diretamente influenciada pelas condições ambientais (Justo *et al.*, 2005). Esta característica está positivamente relacionada com a assimilação de CO₂ (Justo *et al.*, 2005) provavelmente devido à relação positiva da densidade estomática com trocas gasosas (Araus *et al.*, 1986) e com a maior condutância estomática (Boardman, 1977). Nos acessos analisados este caráter não sofreu diferentes influências das condições ambientais, já que essas foram mantidas sob controle, e, também, foram utilizados os mesmos critérios para a coleta do material analisado para todos os acessos.

O diâmetro polar e equatorial dos estômatos apresentou diferenças significativas entre os acessos analisados. Os estômatos dos acessos diplóides apresentaram menor tamanho em relação aos estômatos dos acessos poliplóides, corroborando a idéia de que o tamanho dos estômatos geralmente aumenta com o aumento do número cromossômico. Verificou-se uma relação inversamente proporcional, na qual indivíduos que possuem uma frequência maior de estômatos os possuem em tamanho menor e os indivíduos que possuem uma menor frequência de estômatos, os possuem em tamanho maior (Fig. 18).

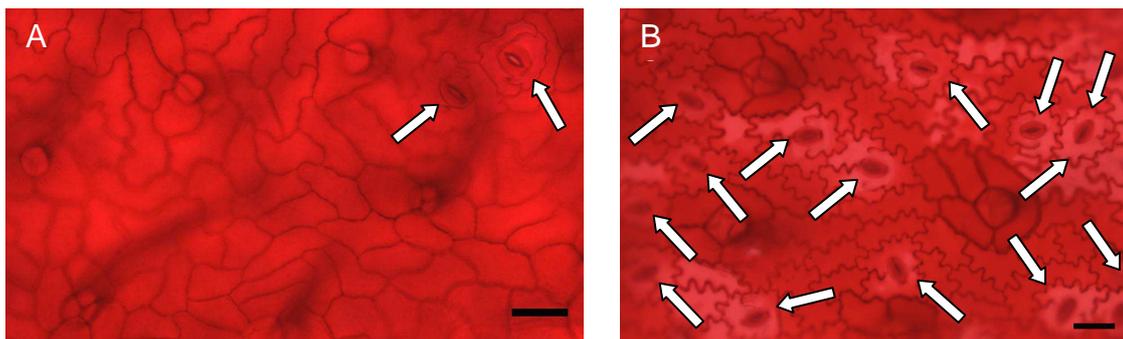


Fotografia 10. Estômato do tipo diacítico. Barra= 30 μm

Tabela 9 Densidade estomática (DEST), diâmetro polar dos estômatos (DP), diâmetro equatorial dos estômatos (DE), relação entre diâmetro polar e equatorial (DP/DE) e índice estomático (IE) de sete acessos pertencentes aos sete grupos.

Acesso (número cromossômico)	DEST (mm^2)	DP (mm^2)	DE (mm^2)	DP/DE	IE (%)
CL 42 (2n= 30)	1,399 ^d	19,362 ^a	11,990 ^a	1,614 ^b	5,013 ^a
CL 43 (2n= 30)	1,799 ^d	15,931 ^a	10,364 ^a	1,537 ^b	4,600 ^a
CL 16 (2n= 34)	1,199 ^c	23,285 ^b	15,161 ^b	1,535 ^b	5,571 ^a
CL 29 (2n= 51)	1,165 ^c	25,359 ^b	17,789 ^b	1,425 ^b	5,486 ^a
CL 3 (2n= 60)	0,531 ^b	25,712 ^b	16,271 ^b	1,580 ^b	7,764 ^b
CL 40 (2n= 58)	0,732 ^b	23,813 ^b	14,898 ^b	1,598 ^b	7,776 ^b
Var. minor (2n= 93)	0,265 ^a	26,532 ^c	21,441 ^c	1,237 ^a	6,701 ^a

* Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo Teste Skott Knott, a 5% de probabilidade.



Fotografia 11. Densidade de estômatos. A: Menor freqüência em um acesso poliplóide (Var. minor); B: Maior freqüência em um acesso diplóide (CL 43). Barra= 30 μ m

Conforme a Tabela 9, também houve diferença significativa entre a relação DP/DE entre os estômatos dos acessos analisados. Esse resultado mostra que existe diferença em relação ao tamanho e forma dos estômatos entre os acessos.

Em relação ao índice estomático, os acessos foram divididos em apenas dois grupos com diferenças significativas. O índice estomático é um parâmetro relativamente constante para cada espécie (Cutter, 1986), possuindo relevante importância taxonômica. Os dados deste trabalho mostram que podem existir variações no índice estomático em uma mesma espécie, porém, este caráter se mostrou mais constante entre os acessos. Porém, esse resultado permite sugerir que apesar da diferença na densidade estomática entre os acessos, o tamanho dos estômatos pode compensar a baixa freqüência dos mesmos em alguns indivíduos poliplóides.

Na análise morfológica os 32 acessos apresentaram amplas variações. Porém, não foi possível encontrar nenhum padrão morfológico e, conseqüentemente, nenhum grupo pôde ser formado. Entretanto, alguns acessos possuem características discrepantes, como o acesso Var. minor e o acesso CL 42, com amplas variações em caracteres vegetativos e reprodutivos. As variações observadas em características reprodutivas são importantes, pois as mudanças fenotípicas nesses caracteres podem alterar

estratégias de reprodução do indivíduo, influenciando diretamente o sucesso reprodutivo da espécie.

De acordo com a análise da estimativa de quantidade de DNA por citometria de fluxo os acessos foram divididos em 7 grupos e, dentro desses grupos, os acessos mais discrepantes do ponto de vista morfológico foram inseridos em grupos diferentes, sendo o acesso Var. minor (o que apresentou maiores variações fenotípicas) o com maior quantidade de DNA.

A análise citogenética confirmou os resultados da estimativa da quantidade de DNA e também conferiu ao acesso Var. minor uma diferença relevante em relação aos outros acessos, já que este possui $2n=93$ cromossomos. As demais análises mostraram que também existem diferenças nos pólenes e estômatos entre os acessos, e essas são relacionadas à poliploidia presente nos mesmos. A notável diferença apresentada pelo acesso Var. minor é intrigante e permite sugerir que este acesso seja uma possível variedade de *Lippia alba*, sendo que as quatro variedades já existentes de *L. alba* se mostram inconsistentes, pois além de serem definidas com base em poucos caracteres, estes apresentam ampla plasticidade fenotípica dentro da espécie.

A ausência de grupos morfológicos bem delimitados sugere que os citótipos tenham surgido recentemente na escala evolutiva. Portanto, o tempo pode ainda não ser suficiente para as variações fenotípicas refletirem as variações genotípicas.

5. CONCLUSÕES

- Sob condições controladas os acessos apresentaram variações morfológicas, o que indica que a variação morfológica encontrada entre os acessos seja majoritariamente oriunda de variação genética e não de possíveis alterações ambientais
- A existência de diferentes níveis de ploidias e de quantidades diferentes de DNA permite concluir que a espécie *Lippia alba* pode estar em processo de especiação.

- Em *L. alba*, variações no número de aberturas e âmbito dos grãos de pólen e também variações na frequência, diâmetro polar e equatorial dos estômatos podem ser relacionados aos diferentes níveis de ploidia observados.
- A ausência de formação de grupos morfológicos sugere que os citótipos poliplóides podem ter surgido recentemente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D.; NASCIMENTO, S.C. e SENA, K. X. F. R. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **18**(3): 436-440, 2008.
- ALMADA, R. D.; DAVINA, J. R.; SEIJO, J. G. Karyotype analysis and chromosome evolution in southernmost South America species of *Crotalaria* (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, **150**(3): 329-341, 2006.
- ANDRÉS-SÁNCHEZ, S; RICO, E.; HERRERO, A.; SANTOS-VICENTE, M. e MARTÍNEZ-ORTEGA, M. M. Combining traditional morphometrics and molecular markers in cryptic taxa: towards an updated integrative taxonomic treatment for *Veronica* subgenus *Pentasepalae* (Plantaginaceae *sensu* APG II) in the western Mediterranean. **Botanical Journal of the Linnean Society**, **159**(1): 68–87, 2009.
- ARAUS, J. L. *et al.* Relationship between photosynthetic capacity and leaf structure in several shade plants. **American journal of Botany**, **76** (12): 1760-1770, 1986.
- ARTELARI, R. e GEORGIU, O. Biosystematic study of the genus *Limonium* (Plumbaginaceae) in the Aegean area, Greece. III. *Limonium* on the Islands Kithira and Antikithira and the surrounding islets. **Nordic Journal of Botany**, **22**(4): 483-501, 2003.
- BERLYN, G. P. e MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. The Iowa State University Press: Ames, 212 p., 1976.
- BLACKMORE, S. Pollen and spores: Microscopic Keys to understanding the earth's biodiversity. **Plant Systematics and Evolution**, **263**(1-2): 3-12, 2007.

BLANC, G. e WOLFE, K.H. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. **Plant Cell**, **16**:1667-1678, 2004.

BOARDMAN, N. K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 28, p. 355-377, 1977.

BONZANI, N.E. et al. Particularidades epidérmicas en algunas especies de Verbenaceae. **Anales del instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma del México, Série Botânica**, **68**(2):47-56, 1997.

BRADSHAW, A.D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. **Advances in Genetics**, **13**: 115-155, 1965.

BRANDÃO, A.D. **Citogenética comparativa dos gêneros *Lippia*, *Lantana* e *Aloysia* (Verbenaceae, Lamiales)**. 2003. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BRIQUET, I. Verbenaceae. In A. Engler e K. Prantl (eds.). **Die Natürlichen Pflanzenfamilien** 4 (3A): 132-182, 1895.

BRITTON, N. L. Botany of Porto Rico and the Virgin Islands: Myrtales to Lycopodiales. **Scientific Survey of Porto Rico and the Virgin Islands**. vi. (1925 - 1930).

BRYSTING, A. K., FAY, M. F.; LEITCH, I. J. e AIKEN, S. G. One or more species in the arctic grass genus *Dupontia*? – a contribution to the Panartic Flora project. **Taxon**, **53** (2), 365-382, 2004.

CANTINO, P. D. The phylogenetic significance of stomata and trichomes in the Labiatae and Verbenaceae. **Journal of the Arnold Arboretum**, **71**: 323-367, 1990.

CARDOSO, G. L. e LOMÔNACO, C. Variações fenotípicas e potencial plástico de *Eugenia calycina* Cambess. (Myrtaceae) em uma área de transição cerrado-vereda. **Revista Brasileira de Botânica**, **26**: 131-140, 2003.

CARVALHO, C. R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

CASTRO, D.M. **Efeito de variação sazonal, colheita selecionada e temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* N. E. Br. ex Britt. & Wilson (Verbenaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

CRAMER, C. Laboratory techniques for determining ploidy in plants. **Hortechology**, 9: 594-596, 1999.

CERBAH, M.; COULAUD, J.; BROWN, S.C. e SILJAK-YAKOVLEV, S.. Evolutionary DNA variation in the genus *Hypochaeris*. **Heredity** 82: 261-266, 1999.

CERBAH, M.; MORTREAU, E.; BROWN, S.C.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BERTRAND, H. e LAMBERT, C.. Genome size variation and species relationship in the genus *Hydrangea*. **Theoretical and Applied Genetics** 103:45-51, 2001.

CONTERATO, I. F. e WITTMANN, M. T. S. New chromosome numbers, meiotic behaviour and pollen fertility in American taxa of *Lupinus* (Leguminosae): contributions to taxonomic and evolutionary studies. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 150, 229-240, 2006.

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

COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q. E MATOS, F. J. A. Quinona dimérica (tectol) de *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **XV Simpósio de Plantas Medicinais**, Resumos, Águas de Lindóia, 1998.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W. e MACHADO, M.I.L. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Edições UFC. Fortaleza, 1981.

CRUZ, CD '**Programa Genes- Versão Windows, aplicativo computacional em genética e estatística**' UFV- Viçosa-MG, Brasil, 2001.

CUADRADO, G.A. Palinologia de los géneros *Modiola*, *Modiolastrum* y *Tropidococcus* (Malvaceae). **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas- Universidad Nacional del Nordeste**, B-014, 2003.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. Parte I – Células e tecidos. 2.ed. São Paulo: Roca, 1986. 304 p.

DI STASI, L. C.; HIRUMA, C. A.; GUIMARÃES, E. M. e SANTOS, C. M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, 65: 529- 540, 1994.

DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P. e LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, 31:113-120, 1989.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J. e SUDA, J. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**. Ed. Wiley-VCH, 2007.

DOYLE, J. A. Early evolution of angiosperm pollen as inferred from molecular and morphological phylogenetic analyses. **Grana**, 44: 227-251, 2005.

EDLUND, A. F.; SWASON, R. e PREUSS, D. Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. **The plant cell**, 16: 84-97, 2004.

EMSHWILLER, E. Ploidy levels among species in the “*Oxalis tuberosa* alliance” as inferred by flow cytometry. **Annals of Botany**, 89: 641-753, 2002.

ERDTMAN, G. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, 54(6): 561-564, 1960.

FAJARDO, D.; CASTILLO, R.; SALAS, A. e SPOONER, D. M. A Morphometric Study of Species Boundaries of the Wild Potato *Solanum Series Conicibaccata*: a Replicated Field Trial in Andean Peru. **Systematic Botany**, 33(1): 183–192, 2008.

FARNSWORTH, N., AKERELE, A. O., BINGEL, A.S., SOEJARTO, D. D. e GUO, Z. B. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization** 63: 965–981, 1985.

FREITAS, L. B. e BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. Ed. da UFRGS, Porto Alegre, 2003.

FRIDLENDER, A.; BROWN, S.; VERLAQUE, R. e CROSNIER, M.T.; Pech, N. Cytometric determination of genome size in *Colchicum* species (Liliales, Colchicaceae) of the western Mediterranean area. **Plant Cell Reports**, 21: 347-352, 2002.

FUZETO, A.P. e LOMÔNACO, C. Potencial plástico de *Cabralea canjerana* subsp. *polytricha* (Adr. Juss.) Penn. (Meliaceae) e seu papel na formação de ecótipos em área de cerrado e vereda, Uberlândia, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, 23:169-176, 2000.

GARDONI, L. C. P., ISAÍAS, R. M. S. e VALE, F. H. A. Morfologia e anatomia foliar de três morfotipos de *Marcetia taxifolia* (A. St.-Hil.) DC. (Melastomataceae) na Serra do Cipó, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, 30: 487-500, 2007.

GIRÓN, L.M. E CÁCERES, A. **Técnicas Básicas para el Cultivo y Procesamiento de Plantas Medicinales**. CEMAT. Guatemala, p51-52, 1994.

GOMES, E.C.; MING, L.C.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; CONTI, A. E FILHO, A.W. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, 74 (2): 29-32, 1993.

GUERRA, M. S. **Introdução à Genética Geral**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1988.

GUPTA, M. Anatomy of the flowers of *Ononis repens* and *Ononis e Ononis spinosa*. **Journal of Indian Botany Society**, 59: 366-369, 1980.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow molecular **Aspects of Medicine** 27:1–93, 2006.

HARRIS, J. e HARRIS, M. **Plant identification terminology: an illustrated glossary**. Spring Lake Publishing. Spring Lake. 2004.

HE, Z., HE, W., YU, F., SHI, P., ZHANG, X., HE, Y., ZHONG, Z. e DONG, M. Do clonal growth form and habitat origin affect resource-induced plasticity in Tibetan alpine herbs? **Flora**, 202:408-416, 2007.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H e BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology** 116 : 211–222, 2008.

HUFFORD, K.M. e MAZER, S.J. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. **Trends in Ecology and Evolution**, 18: 147– 155, 2003.

JUDD, W. S. e OLMSTEAD, R. G. A survey of tricolpate (Eudicot) Phylogenetic relationships. **American Journal of Botany**, 91 (10): 1627-1644, 2004.

JULIÃO, L. S.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S. e LEITÃO, S.G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (ervacidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 13: 36-38, 2001.

JUMP, A. S. e PENUELAS, J. Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. **Ecology Letters** 8: 1010–1020, 2005.

JUSTO, C. F. et al. Plasticidade anatômica das folhas de *Xylopia brasiliensis* Sprengel (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, **19**: 112-123, 2005.

KLEUNEN, V. M e FISCHER, M. Constrains on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. **New Phytologist**, 166: 49-60, 2005.

KNIGHT, C. A. e BEAULIEU, J. M. Genome Size Scaling through Phenotype Space. **Annals of Botany** 101: 759–766, 2008.

LASHIN, G. M. A., Comparative morphology of pollen grains of some taxa of tribe Trifolieae (Fabaceae: Papilionoideae) from Egypt. **International Journal of Botany**, **2**(3): 270-277, 2006.

LEA, H. Z., DUNN, G. M. e KOCH, D. W. Stomatal indexes in three ploidy levels of *Bromus inermis* Leyss. **Crop Science**, 17: 669-670, 1977.

LIMA, H. R. P., KAPLAN, M. A. C. e CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, **10**(2): 71-77, 2003.

LUKWA, N. Do traditional mosquito repellent plants work as mosquito larvicides? **Central African Journal of Medicine** **40** (11): 306-309, 1994.

MAGALLANES M. G. R., PINTO C. A. B. P. e DAVIDE, L. C. Determinação cito-morfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) obtidos por cruzamentos interespecíficos. **Ciência e Agrotecnologia** 20:480-484, 1996.

MANDÁKIVÁ, T. e MÜNZBERGOVÁ, Z. Morphometric and genetic differentiation of diploid and hexaploid populations of *Aster amellus* agg. in a contact zone. **Plant Systematics and Evolution** 274:155–170, 2008.

MARÇAL, R.M.; PTAK, D.M.; KREMPSER, R.R., KREMPSER, M.R.; CARDOSO, G.C.; SANTOS, R.B.; BLANK, A. F. e ALVES, P.B. Antinociceptive effect of the essential oil *Lippia sidoides* on mice. **Planta Medica**, 72, 2006.

MATOS, F. J. A. e OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. – farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmácia**, **79**(3/4): 84-87.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A. e ALENCAR, J.W. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, **8**: 695-698, 1996.

MATTOS, S.H. **Estudos fitotécnicos da *Mentha arvensis* L. var. *piperacens* Holmes como produtora de mentol no Ceará.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

MENEZES, F.S., KAPLAN, M.A.C. e GOTTLIEB, O.R. Chemo-evolutionary polarizations in the Lamiiflorae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **67** (3): 55-460, 1995.

MEVY, J. P.; BESSIERE, J. M.; DHERBOMEZ, M.; MILLOGO, J. E VIANO, J. Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. **Food Chemistry**, **101**(2): 682-685, 2007.

MOLDENKE, H. N. Materials towards a monograph of the genus *Lippia* L. **Phytologia**, **12**(1): 54-65, 1965.

MONTEIRO, M.V.B.; DE MELO-LEITE, A.K.R.; BERTINI, L.M.; DE MORAIS, S.M. e NUNES-PINHEIRO, D.C.S. Topical anti inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, **111**(2): 378-382, 2007.

MORRETES, B. L. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas de cerrado III. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Univerisdade de São Paulo**, 333(24):7-32, 1969

MORTON, J.F. **Atlas of Medicinal Plants of Middle America.** Vol 1. Springfield. Mincis. 745-750, 1981.

MOSCONE, E.A.; BARANYI, M.; EBERT, I.; GREILHUBER, J.; EHRENDORFER, F. e HUNZIKER, A.T.. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and Feulgen densitometry. **Annals of Botany**, 92: 21-29, 2003.

MÚLGURA DE ROMERO, M.E.; ROTMAN, A.D. e ATKINS, S. Flora fanerogâmica Argentina: fascículo 84. 253. Verbenaceae, parte 1. Subfamilia I. Verbenoideae, parte 1. Tribu II. Lantaneae, parte A (excepto *Lantana*, *Neosparton*, *Xeroaloyisia*). ProFlora Conicet, Cordoba, 46p. 2003.

MURRAY, B. C. When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? **Annals of Botany**, **95**(2): 119-125, 2005.

NAGANOWSKA, B.; WOLKO, B.; SLIWIŃSKA, E.; KACZMAREK, Z. e SCHIFINO-WHITTMAN, M.T.. 2C DNA variation and relationship among New World species of the genus *Lupinus* (Fabaceae). **Plant Systematics and Evolution**, 256: 147-157, 2006.

NAHUM, S., INBAR, M., NE'EMAN, G. e BEM-SHLOMO, R. Phenotypic plasticity and gene diversity in *Pistacia lentiscus* L. along environmental gradients in Israel. **Tree Genetics & Genomes** 4(4): 777-785, 2008.

NOEL, F., MACHON, N. & PORCHER, E. No Genetic Diversity at Molecular Markers and Strong Phenotypic Plasticity in Populations of *Ranunculus nodiflorus*, an Endangered Plant Species in France. **Annals of Botany**, 99: 1203–1212, 2007.

OLIVEIRA, R. P.; BORBA, E. L. e LONGHI-WAGNER, H. M. Morphometrics of herbaceous bamboos of the *Raddia brasiliensis* complex (Poaceae – Bambusoideae): implications for the taxonomy of the genus and new species from Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, 270: 159–182, 2008.

OTTO, S. P. e WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, 34:401–37, 2000.

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

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M.E. e VILLAR, A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown (Verbenaceae), **II Farmaco**, 56: 501, 2001.

PESSOA, O. D. L.; CARVALHO, C. B. M.; SILVESTRE, J. O. V. L .; LIMA, M. C. L.; NETO, R. M.; MATOS, F. J. A. e LEMOS, T. L. G. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia* aff. *gracillis*. **Fitoterapia**, 76, 712-714, 2005.

PIERRE, P. M.O. **Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

PIERRE, P. M.O. **Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae)**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

RESSAYRE, A.; RAQUIN, C.; MIGNOT, A.; GODELLE, B. e GOUYON, P. H. Correlated variation in microtubule distribution, callose deposition during male

post-meiotic cytokinesis, and pollen aperture number across *Nicotiana* species (Solanaceae). **American Journal of Botany**, **89**(3): 393-400, 2002.

RICCIARDI, G; RICCIARDI, A.I.A.; BANDONI, A.L. Fitoquímica de verbenaceas (*Lippias* y *Aloysias*) del Nordeste Argentino. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, UNNE**; Exactas 039; 2000.

SAMPAIO-SANTOS, M.I.; KAPLAN, M.A.C. e GOTTLIEB, O.R. Iridoid polarizations in Angiospermae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **67**(3): 413-423, 1995.

SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in Southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**, Harvard, **5**(2): 303-358, 2001.

SANTOS-MENDES, M.M.F.B. **Caracterização morfo-anatômica, fitoquímica e molecular de oito formas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex BRITT. & WILSON (VERBENACEAE)**. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, SP.

SANZO, A. M. Chromosome studies in Andean taxa of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, **138**, 451-459, 2003.

SALIMENA, F.R.G. **Revisão taxonômica de *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae)**. 582 p. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SALIMENA, F.R.G. Two new species of *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae) from South America. **Hickenia**, **3**(37): 145-149, 2002.

SCHAUER, J.C. Verbenaceae. In: Martius, C.F.P., Eichler, A. e Urban, I. **Flora Brasiliensis**, **9**(10): 169-308, 1851.

SCHEINER, S.M. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **24**: 35–68, 1993.

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

SCOTT, A. J. e KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, **30**: 507-512, 1974.

SHAN, F.; YAN, G. e PLUMMER; J. A. Karyotype evolution in the genus *Boronia* (Rutaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 142: 309-320, 2003.

SILJAK-YAKOVLEV, S.; PECCENINI, S.; MURATOVIC, E.; ZOLDOS, V.; ROBIN, O. e VALLÈS, J. Chromosomal differentiation and genome size in three European mountain *Lilium* species. **Plant Systematics and Evolution**, 236: 165-173. 2003.

SILVA, P. S. **Verbenaceae da Serra do Cipó: aspectos bio sistemáticos, químicos e farmacológico**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

SKVARLA, J. J. Techniques of pollen and spore electron microscopy. I Staining, dehydration, and embedding. **Oklahoma Geological Notes**, 26: 179-186, 1966.

SIMPSON, D. A.; FURNESS, C. A.; HODKINSON, T. R.; MUASYA, A. M. e CHASE, M. W. Phylogenetic relationships in Cyperaceae subfamily Mapanioideae inferred from pollen and plastid DNA sequence data. **American Journal of Botany**, 90(7): 1071-1086, 2003.

ŠMARDA, P. e KOČI, K. Chromosome number variability in Central European members of the *Festuca ovina* and *F. pallens* groups (sec. *Festuca*). **Folia Geobotanica**, 38: 65-95, 2003.

ŠMARDA, P.; MÜLLER, J.; VRÁNA, J. e KOČI, K. Ploidy level variability of some Central European fescues (*Festuca* subg. *Festuca*, Poaceae). **Biologia, Bratislava**, 60(1): 25-36, 2005.

SNEATH, P.H. e SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 513 p, 1973.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; TATE, J.A. ,Advances in the study of polyploidy since plant speciation. **New Phytologist**, 161:173-191, 2003.

SOUSA, S. M. **Bandeamento cromossômico em *Lippia alba* (Verbenaceae)**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SOUSA, S. M. **Contribuições à biosistemática do gênero *Lippia* L. (Verbenaceae)**. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

SOUZA, F.F. e QUEIRÓZ, M. A. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia. **Horticultura Brasileira** 22:516-520, 2004.

SOUZA M. M.; PALOMINO G.; PEREIRA T. N.; PEREIRA M. G. e VIANA A. P. Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. **Hereditas**, 141(1):31-38. 2004.

SPECKMANN, G. J.; POST, J. J. e DIJKSTRA, H. The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye grasses. **Euphytica** 14:35-42. 1965.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Arnold, London, 216p, 1971.

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

SUDA, J. **An employment of flow cytometry into plant biosystematics**. Tese de Doutorado. Univerzita Karlova, Praha, 2004.

SULTAN, S. E. Phenotypic plasticity for plant development function and life history. **Trends in Plant Science**, 5: 537-542, 2000.

TATE, J.A.; SIMPSON, B.B. ,Breeding system evolution in *Tarasa* (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploid species. **American Journal of the Botany**, 91(2): 207-213, 2004.

TAVARES, E. S. **Estudos integrados em *Lippia alba* (Verbenaceae) – uma planta de interesse econômico e medicinal**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2003.

TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H.R.; LAGE, C.L.S. e LEITÃO, S.G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15(1), 1-5. 2005.

THOMPSON, J.D. Phenotypic plasticity as a component of evolutionary change. **Trends in Ecology and Evolution**, 6: 246-249, 1991.

TRONCOSO, N. S. Los géneros de Verbenaceas de sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolívia, Paraguai, Uruguai y sur de Brasil). **Darwiniana**, 18 (3-4): 295-412, 1974.

TSOU, C. H. e FU, Y. L. Octad pollen formation in *Cymbopetalum* (Annonaceae) the binding mechanism. **Plant Systematics and Evolution**, 263: 13-23, 2007.

UNGERER, M. C., HALLDORSDDOTTIR, S.S., PURUGGANAN, M. D. e MACKAY, T. F. C. Genotype-Environment Interactions at Quantitative Trait Loci Affecting Inflorescence Development in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, 165: 353–365, 2003.

VALLADARES, F., GIANOLI, E. e GÓMEZ, J.M. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. **New Phytologist**, 176: 749-763, 2007.

VALE, T. G.; MATOS, F. J. A.; LIMA, T. C. M. e VIANA, G. S. B. Behavioral effects of essential Oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**, 167(2): 127-133, 1999.

VALENTIN, A.; PELISSIER, Y.; BENOIT, F.; MARION, C.; KONE, D.; MALLIE, M.; BASTIDE, J.M. e BESSIERE, J.M. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, 40(5):1439-1442, 1995.

VANDENHOUT, H. ORTIZ, R. VUYLSTEKE, D., SWENNEN, R. e BAI, K. V. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. **Euphytica**, 83:117-122, 1995.

VASCONCELOS, A. L. C. F. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos**. Tese de Doutorado – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

VIA, S. e LANDE, R. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. **Evolution**, 39: 505-522, 1985.

VICINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; SOUZA DA COSTA, D. C.; DA COSTA ROMANEL, E.; SOUSA, S. M.; PEREIRA PEIXOTO, P. H. e GONÇALVES SALIMENA, F. R. Chromosome numbers in *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, 256: 171-178, 2005.

VICHIATO, M.R.M, CASTRO, D.M., VICHIATO, M., GONÇALVES, S.V.B. e LIMA, M.P. Anatomia foliar de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). In: **Congresso Nacional de Botânica. Anais, Viçosa: UFV**. 2004.

VICHIATO, M. R.; VICHIATO, M.; CASTRO, D. M.; DUTRA, L. F.; PASQUAL, M.; MARCHIORI, W.; LIMA, C. D. F. e SALGADO, C. C. Análises estomática e

morfológica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. **Ceres**, **53**(310): 541-548, 2006.

VILJOEN, A. M.; SUBRAMONEY, S., VUUREN, S. F.; BAŞER, K. H. C. e DEMIRCI, B. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, 96: 271-277, 2005.

ZOGHBI, M. G. B.; LIZ, A. I. R. e RAMOS, L. S. Essential Oil of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. growing wild in brazilian amazon. **Flavour and Fragrance Journal**, **13**(1): 47-48, 1998.

WEST-EBERHARD, M.J. **Developmental Plasticity and Evolution**. New York, Oxford University Press, 2003.

WEST-EBERHARD, M.J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 20, 249–278, 1989.

WINDHAM, M.D. Chromosome counts and taxonomic notes on *Draba* (Brassicaceae) of the intermountain west. 2: Idaho, Nevada, and vicinity. **Madroño**, **50**(4): 221-231, 2003.

YAMAMOTO, P.Y. **Interação Genótipo X Ambiente na Produção e Composição de Óleos Essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E.Br.** Dissertação de Mestrado. Instituto Agrônomo (IAC), Campinas, 2006.