

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

Juliana Mainenti Leal Lopes

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES DE
MICROSSATÉLITES E DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE
Lippia alba (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae)**

JUIZ DE FORA - MG

2015

JULIANA MAINENTI LEAL LOPES

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES DE
MICROSSATÉLITES E DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS
DE *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae)**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Juiz de Fora

2015

Dedico este trabalho aos meus pais,
Humberto e Heloisa, que me
escutaram, aconselharam e
incentivaram em todas as escolhas e
decisões importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de pós-graduação pela oportunidade de concretizar o trabalho, a Universidade Federal de Juiz de Fora e aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG pela bolsa que me permitiu dedicar-me exclusivamente a pesquisa e por financiar o projeto.

Agradeço aos meus pais pelo amor incondicional e suporte em todos os momentos, participando e torcendo por cada passo que eu dou.

Ao meu irmão Alexandre, que sempre teve uma dualidade entre pai e irmão, obrigada pelo carinho.

Ao meu irmão Vitor, em especial, que esteve presente em toda minha trajetória acadêmica, me aconselhando nos momentos difíceis e vibrando nas conquistas.

Ao meu irmão Igor com conselhos acadêmicos de quem já passou pela mesma dificuldade, sempre com uma maneira peculiar de me indicar o caminho.

Ao meu namorado pelo apoio moral e efetivo, compreensão e capaz de fazer esquecer problemas nos momentos em que precisava relaxar.

Aos meus amigos da graduação Bárbara, Daniel, Erick e Papel pela amizade e torcida pelo meu sucesso.

À minha amiga Danielle que me aconselhou, me ensinou, me ajudou e me divertiu, fazendo mais que seu papel de amiga durante o mestrado.

Ao Vinicius que sempre me socorreu nos momentos que achei que iria dar tudo errado, além de sempre estar disponível para conversas duradouras.

À Sirlei que com uma recente amizade foi capaz de alegrar os meus dias.

Às amigas de turma do mestrado Christiane e Cynthia que compartilhamos ideias sempre querendo melhorar a pós-graduação e a nós mesmas em todos os aspectos.

Aos companheiros da molecular, Cristiane Zorzatto, Flávia, Humberto e Mateus, pela ajuda efetiva nos experimentos e análise de dados, assim como pelo apoio e cumplicidade.

Aos meus amigos do laboratório 1, Aline, Ana Luiza, Ana Paula, Aryane, Camila, Elisa, Laís, Marta, Melvis, Romena, Shaiany e Victória. Sem eles não seria capaz de realizar o trabalho de forma tão gratificante.

Aos amigos do laboratório 2, Rafaella, Francisco, Gustavo e Leonardo, sempre disponíveis a me ajudar, além da crescente amizade que tenho por eles.

Aos colaboradores dos Laboratórios de Biologia Celular, Bioquímica e Toxicologia, pela disponibilidade em ajudar, ao emprestar reagentes e água *MiliQ*.

Ao meu orientador Dr. Lyderson, por ter me aceitado e acreditado em mim e por todos os ensinamentos durante a iniciação científica e o mestrado, me inspirando com seu anseio por novos conhecimentos.

Ao professor Dr. Carlos pela disponibilidade em ajudar, companheirismo e exemplo de integridade.

Ao professor Dr. José Marcello, pela amizade e carinho, por me incentivar e tranquilizar quando precisava, foi muito importante na minha trajetória acadêmica.

A professora Ma. Letícia, pelo companheirismo e por despertar a filosofia yoga em mim.

Ao professor Dr. Marcelo, pelos empréstimos de reagentes e de alunos, além de compartilhar a tradicional piada nos churrascos.

Ao professor Saulo, pelas conversas de filosofia de vida nos momentos difíceis e apoio significativo.

À Embrapa Gado de Leite por disponibilizar o seu espaço para elaboração de parte do trabalho e aos funcionários e alunos Bel, Daniele, Raquel e Sabine pelo auxílio e momentos de descontração.

Aos colaboradores Dra. Ana Luisa e Dr. Marco Antônio por sua disponibilidade e ajuda na realização do trabalho.

Resumo

Estudos recentes sugerem que a duplicação completa dos genomas é muito mais comum do que sua estabilidade, ocorrendo em todas as angiospermas. Nesse contexto, *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) constitui um modelo interessante de estudo, pois além de ser a espécie mais estudada dentro do gênero *Lippia*, é amplamente utilizada na medicina popular apresentando importância econômica, sobretudo em função da riqueza de seus óleos essenciais. Estudos recentes demonstraram a existência de pelo menos cinco diferentes níveis de ploidia em *Lippia alba*, revelando grande plasticidade do genoma. A fim de contribuir para entender a variação genética e o processo de poliploidização em *Lippia alba*, o presente trabalho objetivou identificar novos marcadores genéticos do tipo microssatélite e estimar a diversidade genética em 100 acessos de *Lippia alba*. Foram avaliados nove *loci* já descritos e 16 novos marcadores. O tamanho dos fragmentos foi detectado por eletroforese capilar usando o sequenciador MegaBACE1000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). A identificação dos alelos foi inferida utilizando o *software* Fragment Profile (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Os dados finais foram exportados para uma planilha do Excel® e foram transformados nos arquivos de entrada específicos para cada programa computacional. Os valores de PIC (*polymorphism information content*) e heterozigosidade foram calculados por meio do programa Cervus v3.0.7. Os coeficientes de similaridades de Jaccard e Dice foram calculados para construir um dendrograma de acordo com o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) por meio dos *softwares* NTSYS e PAST. Para a análise por inferência Bayesiana, foi utilizado o programa STRUCTURE v 2.3.4. Foi possível observar a formação de grupos de acordo com o nível de ploidia e inferir a possível origem de alguns citótipos baseada na similaridade genética entre os acessos. Os resultados contribuem para fortalecer a hipótese de que os acessos tenham surgido por autoploidia.

Palavras-chave: *Lippia alba*, Verbenaceae, Sequenciamento paralelo em massa, Microssatélite, Diversidade genética

Abstract

Recent studies suggest that complete genome duplication is much more common than its stability, occurring in almost all angiosperms. *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae), is the most studied species within the genus *Lippia*, and it is widely used in folk medicine presenting economic importance mainly due to the richness of their essential oils. Recent studies have demonstrated the existence of at least five different ploidy levels in *Lippia alba* revealing a large genome plasticity making the species an interesting model of study. To better understand the genetic variation and the polyploidization process in *Lippia alba*, this study aimed to identify new genetic microsatellite markers and estimate the genetic diversity for 100 *Lippia alba* accessions. We assessed 9 *loci* already described and 16 new markers. The size of the fragments was detected by capillary electrophoresis using MegaBACE1000 sequencer (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The identification of alleles was inferred using the Fragment Profile software (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Final data were exported to an Excel spreadsheet according to the input files of each software used. PIC values (polymorphism information content) and heterozygosity were calculated using Cervus v3.0.7 software. Jaccard and Dice similarity coefficient were calculated to construct a dendrogram according to UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) using NTSYS and PAST softwares. Bayesian inference analysis was performed using STRUCTURE v 2.3.4 program. It was possible to observe the formation of groups according to the ploidy level and infer the possible origin of some cytotypes based on genetic similarity among accessions. Results contribute to support the hypothesis that the cytotypes have emerged by autopolyploidy.

Keywords: *Lippia alba*, Verbenaceae, Massive parallel sequencing, Microsatellite, Genetic diversity

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Acessos de *Lippia alba*. (A) Acessos de *L. alba* cultivados na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora. (B) Detalhe da inflorescência de *L. alba*.....19

Figura 2 – Mapa com a indicação dos locais de coleta dos acessos de *L. alba* (Círculos). Mapa obtido através do programa Quantum-gis versão 2.8.2).....25

Figura 3 – Géis representativos dos testes de amplificação utilizando os *primers* de microssatélites em *L. alba*. (A) Amplificação utilizando os *primers* LAC4, LAC5 e LAC 14. (B) Amplificação utilizando os *primers* Phc17, Phc18 LAL3, LAL4, LAL6 e LAL7. (C) Amplificação utilizando os *primers* P2 e P8. (D) Ocorrência de bandas inespecíficas em LAL6 e LAL7.....28

Figura 4 – Géis representativos dos testes de amplificação utilizando os novos *primers* de microssatélites desenvolvidos em *L. alba*. Amplificação utilizando os *primers* p249, p294, p370, p432, p473, p412, p378, p229, p440, p60, p270, p248, p484, p283 e p166.....39

Figura 5 – Dendrogramas de similaridade genética por UPGMA com coeficientes JACCARD de 100 acessos de *L. alba*. As cores dos ramos representam diferentes níveis de ploidia, sendo diploide em amarelo, triploide em verde, tetraploide em vermelho, hexaploide em roxo, aneuploide em azul e mixoploide em cinza. (A) Dendrograma realizado a partir dos dados de nove *loci* descritos na literatura (SANTOS et al., 2012; RAY et al., 2012). (B) Dendrograma realizado a partir de 16 novos *loci* desenvolvidos neste trabalho.....44

Figura 6 – Dendrogramas de similaridade genética por UPGMA com coeficientes JACCARD a partir de 25 *loci* de microssatélites de 100 acessos de *L. alba*. (A) As cores dos ramos representam diferentes regiões do Brasil, sendo Sudeste em amarelo, Nordeste em verde, Centro-oeste em rosa, Sul em azul e Norte em cinza. (B) As cores dos ramos representam diferentes níveis de ploidia sendo diploide amarelo, triploide em verde, tetraploide em vermelho, hexaploide em roxo, aneuploide em azul e mixoploide em cinza. * representa valores de *bootstrap* acima de 50 e ** valores de *bootstrap* acima de 90. Os dendrogramas com coeficientes de JACCARD e DICE foram idênticos.....47

Figura 7 – Análise bayesiana da estrutura genética de 58 acessos diploides de *L. alba* (K=4). Na porção inferior de cada barra encontra-se a identificação do acesso colorido de acordo com região de origem: Rosa (Centro-oeste), Amarelo (Sudeste), Verde (Nordeste), Azul (Sul) e Preto (não há informação de origem do acesso). Indivíduos foram agrupados por similaridade do genoma. Nos histogramas, as cores mostram, para cada indivíduo, a proporção do

genoma compartilhado. Genomas similares são representados pela barra da mesma cor.....50

Figura 8 – Análise bayesiana da estrutura genética de 58 acessos diploides de *L. alba* (K=4). Indivíduos são organizados por região de origem CO (Centro-oeste), SE (Sudeste), NE (Nordeste) e S (Sul). Nos histogramas, as cores mostram, para cada indivíduo, a proporção do genoma compartilhado. Genomas similares são representados pela mesma cor.....50

Figura 9 – Possíveis origens dos diferentes níveis de ploidia evidenciado por cruzamentos naturais entre os citótipos. As setas cinza claro representam cruzamentos envolvendo gametas reduzidos e as setas cinza escuro representam cruzamentos envolvendo gametas não reduzidos (Adaptado de REIS et al., 2014). (A) Todas as possibilidades de origem dos citótipos. (B) Origem mais provável de acordo com as distâncias genéticas entre os citótipos.....56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos <i>primers</i> selecionados para estudo de microsatélite em <i>L. alba</i>	31
Tabela 2 - Descrição dos <i>primers</i> desenvolvidos para estudo de microsatélite em <i>L. alba</i>	30
Tabela 3 – Tabela com resumo dos testes e referência dos <i>primers</i>	36
Tabela 4 Caracterização de 25 <i>loci</i> de microsatélites amplificados em <i>L. alba</i>	37
Tabela 5 – Caracterização de acessos de <i>L. alba</i> quanto a presença de alelos únicos e o número máximo de alelos em 25 marcadores microsatélites.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGEN	Nomenclatura utilizada para os acessos de <i>Lippia alba</i> do nosso banco de germoplasma
CESJ	Herbário Leopoldo Krieger
CTAB	“Cetyl trimethylammonium bromide” Brometo trimetilamônio de cetilo
DNA	“Deoxyribonucleic acid” – Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	“Deoxynucleotide triphosphates” – Desoxinucleotidos Trifosfatos
USA	“United States of America” – Estados Unidos da América
Gpb	Giga pares de bases
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NGS	“Next-generation sequencing” – Sequenciamento de nova geração
pb	Pares de bases
PCR	“Polymerase Chain Reaction” – Reação em Cadeia da Polimerase
PIC	“Polymorphism information content”- Conteúdo de informação polimórfica
PVP	Polivinilpirrolidona
s	Segundos
SSR	“Simple Sequence Repeats” – Sequências Simples Repetidas
Ta	Temperatura de anelamento
Tris-HCl	N-tris[hidroximetil]aminoetano – ácido clorídrico
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UK	“United Kingdom” – Reino Unido
UPGMA	“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” - Método de agrupamento não ponderada com Média Aritmética
v/v	Volume por volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	Poliploidia	14
1.2	Variação genômica Intraespecífica.....	16
1.3	<i>Lippia alba</i> : taxonomia, variação e uso medicinal	17
2.	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral.....	23
2.2	Objetivos específicos	23
3.	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Material vegetal.....	24
3.2	Extração de DNA.....	26
3.3	Seleção dos <i>primers</i>	26
3.4	Amplificação dos marcadores de microssatélites	29
3.5	Detecção do tamanho do fragmento de DNA	34
3.6	Análise de dados.....	34
4.	RESULTADOS	36
4.1	Caracterização dos <i>loci</i>	36
4.2	Análise de diversidade	43
4.3	Análise bayesiana	49
5.	DISCUSSÃO	51
6.	CONCLUSÕES	58
7.	REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

Um evento muito frequente em plantas e que provavelmente constitui uma estratégia evolutiva comum entre os vegetais, é a poliploidia. Esse processo, que envolve a duplicação do genoma, é largamente reconhecido como a maior força evolutiva em plantas (STEBBINS, 1971; GRANT, 1981; OTTO e WHITTON, 2000). Além disso, estudos indicam que a duplicação completa do genoma é um processo mais comum do que a estabilidade dos mesmos (VAN DE PEER, 2004; MEYER e VAN DE PEER, 2005).

Estimativas recentes sugerem que 100% das angiospermas já tiveram eventos de poliploidização em algum momento de sua história evolutiva (JIAO et al., 2011; ALBERT et al., 2013).

1.1 Poliploidia

Poliploides em geral são bons colonizadores, podendo ocupar habitats pioneiros nos quais os ancestrais diploides não são bem sucedidos (DE WET, 1980). Isso provavelmente ocorre devido a sua estrutura plástica, com a existência de mais cópias gênicas. Alelos mutantes sofrem menor pressão seletiva, já que sequências extras podem suprir a produção da proteína fundamental, levando a uma variabilidade oculta e conseqüentemente possibilitando maior capacidade de adaptação (LEITCH e LEITCH, 2008). Contudo, logo que a poliploidização acontece, é um evento caótico para a célula, devido às inúmeras modificações a que esta deve se adequar (VAN DE PEER, 2009).

O cruzamento de gametas não reduzidos é o principal processo na formação de poliploides (BRETAGNOLLE e THOMPSON, 1995; RAMSEY e SCHEMSKE, 1998). Algumas discussões têm centrado no modo como os poliploides se estabelecem e persistem no ambiente natural (FOWLER e LEVIN, 1984; FELBER, 1991; THOMPSON e LUMARET, 1992; RODRIGUEZ, 1996).

Um poliploide recém-formado será submetido à seleção da mesma forma que seu ancestral diploide, sendo improvável o seu pronto

estabelecimento, uma vez que adaptações celulares naturais serão necessárias devido à alteração no número cromossômico. Além disso, naturalmente, existe no início uma proporção maior de diploides em relação aos poliploides, levando a cruzamentos que terão em sua maioria uma prole infértil, como pode ser observado na hibridização de tetraploides com os diploides gerando triploides que não apresentam descendentes férteis (LEVIN, 1975).

Quando um poliploide está plenamente estabelecido, observa-se um aumento de sua frequência. Duas hipóteses podem auxiliar no entendimento sobre a persistência dos poliploides na população: (1) por substituição competitiva em relação ao ancestral diploide; (2) ou pela mudança do habitat do poliploide imediatamente após sua origem permitindo a existência simultânea dos dois níveis de ploidia (FOWLER e LEVIN, 1984; RODRIGUEZ, 1996). Contudo os dois processos, substituição do ancestral diploide e diferenciação do habitat, não devem ser considerados mutuamente exclusivos (GREGORY, 2005). Além desses, ainda destacam-se como mecanismos de estabelecimento dos poliploides a reprodução assexuada e o hábito perene, que favorecem a coexistência e o aumento da frequência dos citótipos poliploides em populações simpátricas (TATE e SIMPSON, 2004; KAO, 2007).

O processo de poliploidização é acompanhado de mudanças genéticas e epigenéticas, levando a uma extensa reestruturação em todos os níveis do genoma, como rearranjos cromossômicos, silenciamento gênico, novos padrões de expressão gênica, ação de transposons e aumento da taxa de autofecundação (SOLTIS e SOLTIS, 2000; SCHIFINO-WITTMANN, 2004). Após essas modificações, muitas vezes os poliploides são mais adaptáveis às mudanças ambientais e pressões seletivas, culminando no seu maior êxito em se adaptar a um ambiente (SOLTIS e SOLTIS, 2000).

Muitos genomas poliploides se comportam como diploides após algumas modificações. Esse processo é chamado de diploidização, sendo comum a ocorrência de rearranjos cromossômicos, eliminação de sequências redundantes no genoma e a formação de homeólogos no caso dos aloploiploides. Essas alterações são adaptações evolutivas que acabam por tornar os genomas poliploides mais estáveis (COMAI, 2000; MA e

GUSTAFSON, 2005).

A poliploidia é o principal fator de evolução em angiospermas (SOLTIS et al, 2009). Mais especificamente, a especiação por poliploidia é predominante em espécies simpátricas, pois contribui para o isolamento reprodutivo dos diferentes níveis de ploidia (OTTO e WHITTON, 2000). Investigações durante a segunda metade do século XX destacaram a frequência de poliploides na natureza e levantaram discussões sobre a importância desse evento no processo evolutivo de plantas (STEBBINS, 1950; 1971; GRANT, 1981). Porém, nesses estudos, as frequências de poliploidização foram subestimadas como consequência do método utilizado para a discriminação dos poliploides. Com o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e o advento de técnicas moleculares foi possível uma melhor identificação, rastreamento, detecção dos poliploides e de seu papel na especiação (GREGORY, 2005).

1.2 Variação genômica intraespecífica

Há anos pesquisadores perguntam-se se as variações no número cromossômico estão relacionadas com a morfologia e a distribuição de espécies vegetais. Bennett (1985) apresentou a hipótese de que a anatomia do seu genoma poderá influenciar onde e como a espécie irá crescer. Dependendo de seu nível de ploidia e do tamanho dos cromossomos, a espécie pode modificar-se em um contexto ecológico e celular.

Em plantas, o número cromossômico varia amplamente (BENNETT, 1985), porém tais variações podem ocorrer dentro da mesma espécie, não refletindo necessariamente diferenças morfológicas (STEBBINS, 1971; LEWIS, 1980b).

Os primeiros relatos sobre a detecção de variação genômica intraespecífica são atribuídos à Furuta et al. (1975) que observaram uma variação da quantidade de DNA maior do que 20% entre indivíduos pertencentes à espécie *Aegilops squarrosa*. Embora este fato tenha sido considerado uma exceção, cada vez mais relatos sobre a ocorrência de variação genômica intraespecífica tem sido encontrados na literatura. Em 1981, foi relatado que as espécies de *Microseris sp* possuíam mais de 20% de

variação no tamanho do seu genoma sendo que tal variação não seria responsável por gerar mudanças morfológicas (PRICE et al., 1981a, b). Bennett (1985) constatou variabilidade intraespecífica de até 50% em *Glycine max* e 80% em *Poa annua*. O número de estudos, que relatam variação genômica dentro da mesma espécie, não para de aumentar (DÍEZ et al., 2013; HUANG et al., 2013; SANCHEZ et al., 2014; WOLF et al., 2014; HANUŠOVÁ et al., 2014). Entre eles destaca-se o relato recente de Reis et al. (2014) de cinco números cromossômicos em *Lippia alba*, modelo de estudo do presente trabalho.

1.3 *Lippia alba*: taxonomia, variação e uso medicinal

A família Verbenaceae está incluída na ordem Lamiales (JUDD et al., 2002), sendo constituída por 36 gêneros e 1.035 espécies encontradas nos mais diversos ambientes, incluindo os campos rupestres. Diversos gêneros dentro desta família têm se destacado por suas propriedades medicinais e ornamentais.

O gênero *Lippia* é um dos mais representativos e importantes da família Verbenaceae no Brasil. Segundo Troncoso (1974) o gênero compreende cerca de 200 táxons e 160 espécies distribuídas principalmente no Brasil, México, América Central, África, Paraguai e Argentina, com poucas espécies endêmicas da África e o Brasil se destaca como o centro de diversidade do gênero (SALIMENA e MÚLGURA, 2012).

O gênero *Lippia*, reúne várias espécies com propriedades medicinais, que apresentam óleos essenciais complexos constituídos principalmente por sesquiterpenos e monoterpenos (CRAVEIRO et al., 1981). As espécies de *Lippia* têm sido frequentemente utilizadas no tratamento de doenças respiratórias, gastrointestinais, hepáticas, infecções cutâneas, queimaduras, úlceras, diarreia, gonorreia entre outras afecções (MORTON, 1981; DI STASI et al, 1994; PASCUAL et al., 2001a; TAVARES et al., 2005).

Lippia alba (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) é uma das espécies mais bem estudadas dentro do gênero *Lippia* em função da sua importância econômica e ampla utilização na medicina popular (TAVARES et al., 2005; OLIVEIRA et al.,

2006; HENNEBELLE et al., 2008). A espécie é conhecida popularmente como erva-cidreira, cidreira-brava, erva-cidreira brava, erva-cidreira do campo, carmelitana, falsa melissa, chá de tabuleiro, salva-limão e salva do Brasil (Figura 1).



Figura 1 - Acessos de *Lippia alba*. (A) Acessos de *L. alba* cultivados na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora. (B) Detalhe da inflorescência de *L. alba*.

A espécie é amplamente distribuída nas Américas, desde o México até a Argentina e Uruguai, onde ocorre em praticamente todos os tipos de ambientes, desde florestas, brejos e campos até em beira de estradas (SALIMENA, 2000).

L. alba é caracterizada por sua grande variabilidade morfológica e química. Tal variação, além de uma questão evolutiva interessante, ganha maior importância ao considerar-se que os seres humanos usam de forma indiferenciada qualquer quimiotipo encontrado.

Ainda que bastante estudada do ponto de vista químico e farmacológico, muito pouco se sabe sobre a biologia e evolução da espécie. Brandão et al. (2007) corroboraram as primeiras sugestões de Bose e Choudhury (1960) de que *L. alba* seria uma espécie diploide.

Pierre et al. (2011) estudaram a citologia de três quimiotipos de *L. alba* (citrinal, carvona e linalol) e observaram que estes apresentam diferenças em relação ao número e morfologia dos cromossomos, sendo que o quimiotipo citrinal apresentou $2n=30$ cromossomos, o quimiotipo carvona $2n=60$, e o quimiotipo linalol uma grande variação numérica de $2n=12$ à 60 , tratando-se, portanto de um mixoploide.

Estudos recentes demonstraram a existência de cinco números cromossômicos ($2n=30$, $2n=38$, $2n=45$, $2n=60$ e $2n=90$) e a existência de um complexo poliploide na espécie (REIS et al., 2014). Além disso, a caracterização química de genótipos de *L. alba* sob condições controladas de cultivo revelou a relação entre um tipo químico específico e um dos níveis de ploidia (VICCINI et al., 2014).

L. alba apresenta ampla plasticidade fenotípica e tais variações dificultam a correta identificação dessas. Assim, é importante utilizar técnicas auxiliares para identificação precisa dessas fontes de princípios ativos, com o objetivo de uma correta utilização econômica e medicinal (PIERRE, 2004).

Além de estudos citogenéticos e químicos, o uso de ferramentas moleculares é de grande utilidade podendo contribuir não somente para a caracterização dos acessos, mas também para entender a origem das variações já observadas em *L. alba*.

O uso destas variações em nível do DNA tem revelado o grau de parentesco e a divergência entre as espécies, ampliando as informações sobre a origem e a formação de grupos em diferentes níveis da organização biológica (MARX et al., 2010; RONSTED et al., 2012). A existência desta variação genômica em *L. alba* associada às informações de distâncias genéticas, abre uma possibilidade particular de utilizar-se modelos naturais para compreender as variações intraespecíficas.

Como ferramentas para o entendimento das relações entre diferentes citótipos e conseqüente tentativa de compreender a poliploidia como um dos processos mais importantes na evolução das plantas, diferentes abordagens têm sido empregadas destacando-se entre elas o uso de microssatélites.

Entre os marcadores moleculares, os microssatélites se destacam por apresentarem-se hipervariáveis, de natureza multialélica, herança codominante, alta reprodutibilidade e ocorrerem de forma abundante e com boa cobertura do genoma (KALIA et al., 2011). Devido à diferentes padrões de número de repetições, esse marcador apresenta um grau de variação genética que permite a diferenciação de indivíduos e a estimativa da diversidade genética entre eles (PFEIFFER et al., 2011; KALIA et al., 2011; REHMAN et al., 2012). Por conseqüência, eles tornaram-se a classe mais informativa e popular utilizados para fins diversos, como estudo de diversidade genética, seleção assistida por marcadores moleculares, melhoramento genético, mapeamento, filogenia e filogeografia, sistemática, entre outras aplicações (GHAFARI e HASNAOUI, 2013).

Marcadores do tipo microssatélite tem sido largamente empregados em estudo de diversidade genética em espécies poliploides (FATEMI e GROSS, 2008; PFEIFFER et al., 2011; WAYCOTT et al., 2011; FEHLBERG e FERGUSON, 2012; JUSTY e MAURICE, 2012; SHI et al., 2013; BERTIOLI et al., 2014). Alguns destes estudos foram empregados em espécies da família Verbenaceae (FATEMI e GROSS, 2008; MORI et al., 2008; RAY et al., 2012; RAY e QUADER, 2014; THODE et al., 2013; OHTSUKI et al., 2014). Em *L. alba*, dois trabalhos foram publicados com o desenvolvimento de microssatélites, sendo que em um deles investigou-se um número restrito de acessos e populações de cruzamentos controlados (SANTOS et al., 2012) e

em outro, apesar de mencionar um maior número de acessos, não há menção quanto a origem dos mesmos e a eficiência dos marcadores na delimitação da diversidade genética (ROCHA et al., 2014). Até o presente momento, não há um trabalho com um grande número de acessos naturais da espécie e, sobretudo, relacionando a diversidade genética com a variação cromossômica intraespecífica existente na espécie.

O entendimento do número de cópias gênicas existentes e suas modificações são fundamentais para estudos evolutivos de plantas. Assim o presente trabalho objetivou em linhas gerais, contribuir para a compreensão das relações genéticas existentes entre acessos de *L. alba* oriundos de vários locais do Brasil. Vale ressaltar que muitas das informações existentes na literatura sobre a poliploidia e suas consequências decorrem de plantas tradicionalmente cultivadas (BOWERS, CHAPMAN e PATERSON, 2003; XU et al., 2009) sendo a maioria de origem temperada (BROCHMANN et al., 2004 ; MABLE, 2004; HUSBAND et al., 2013). Portanto o estudo de um modelo natural oriundo dos trópicos abre novas perspectivas para a compreensão do processo de evolução e especiação em plantas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver novos *loci* de microssatélites com vistas a estimar a diversidade genética em *Lippia alba* e contribuir para o entendimento do processo de poliploidização na espécie, sobretudo, relacionando a diversidade existente à variação cromossômica observada.

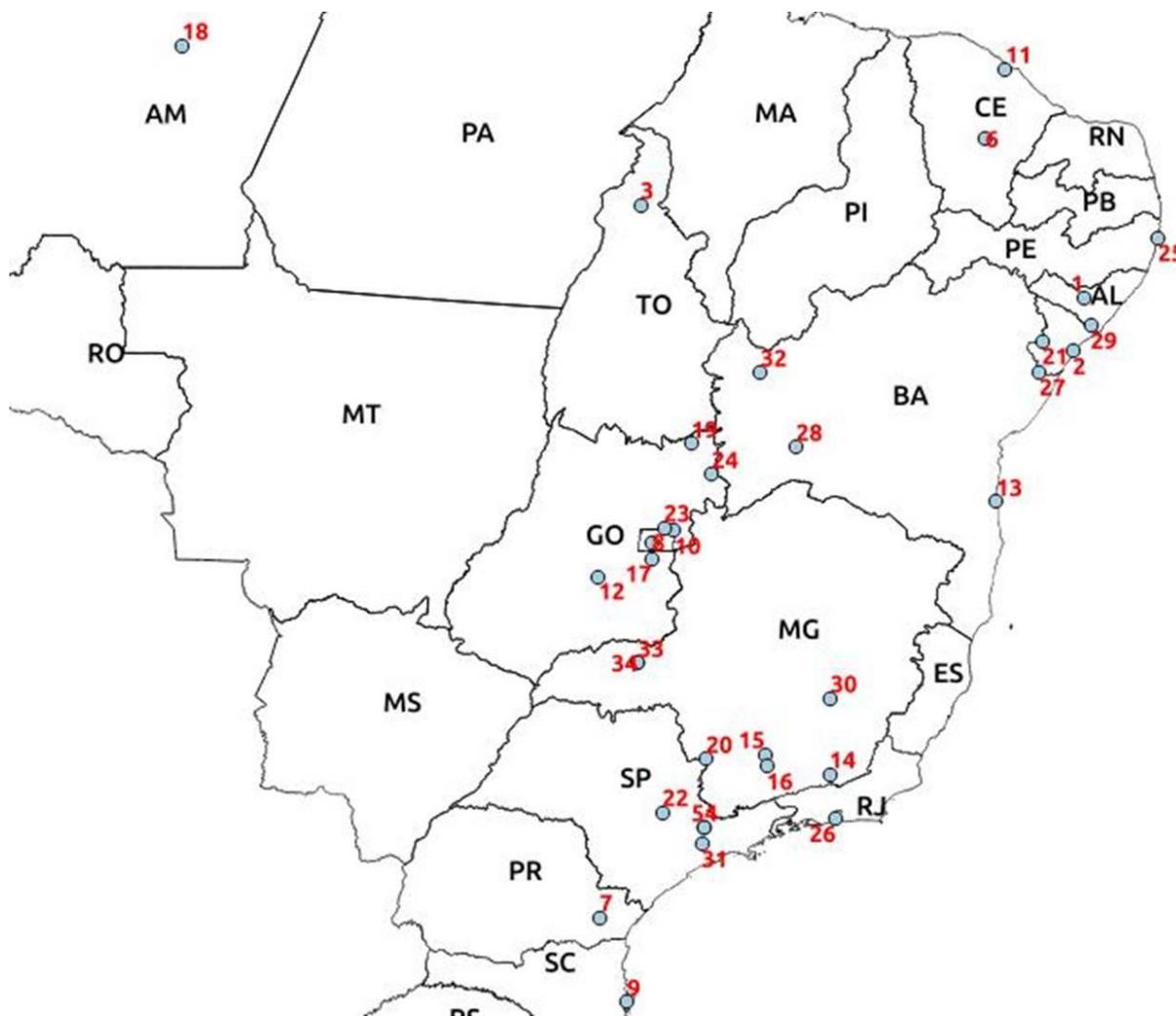
2.2 Objetivos específicos

- Validar os microssatélites descritos na literatura para o banco de acessos de *L. alba* da Universidade Federal de Juiz de Fora;
- Desenvolver novos *loci* de microssatélites para *L. alba*;
- Estimar a diversidade genética para 100 acessos de *L. alba*;
- Relacionar a diversidade genética observada aos diferentes níveis de ploidia observados;
- Elaborar hipóteses que possam auxiliar no entendimento do processo de poliploidização em *L. alba*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram estudados 100 acessos de *L. alba* provenientes de diferentes estados brasileiros, a origem de cada acesso pode ser visualizado no mapa gerado por meio do programa Quantum-gis versão 2.8.2 (QUANTUM, 2012) (Figura 2). Do total, 32 acessos foram cedidos pela EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, coletados nos estados de MG, SP, DF, TO, GO, SC, PR. Tais plantas foram cultivadas na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora (Figura 1). Os acessos foram previamente identificados. Os vouchers estão depositados no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) conforme as técnicas usuais (Anexo 1). Os demais acessos foram cedidos pela ESALQ-USP ou foram coletados pelo nosso grupo de pesquisa sendo provenientes dos estados de MG, PE, BA, AM, CE, RJ, SE e AL.



Numeração no mapa	Nomenclatura	Local de coleta
1	BGEN-89, BGEN- 101	Alagoas
2	BGEN-80, BGEN-81	Aracaju, SE
3	BGEN-02, BGEN-44	Araguaina, TO
4	BGEN-03, BGEN-45	Atibaia, SP
5	BGEN-05, BGEN-40	Botucatu, SP
6	BGEN-103	Ceará
7	BGEN-38, BGEN-75	Curitiba, PR
8	BGEN-01, BGEN-06, BGEN-07, BGEN-08, BGEN-09, BGEN-10, BGEN-11, BGEN-12, BGEN-13, BGEN-14, BGEN-15, BGEN-16, BGEN-19, BGEN-22, BGEN-29, BGEN-34, BGEN-36, BGEN-37, BGEN-42, BGEN-46, BGEN-47, BGEN-48, BGEN-49, BGEN-50, BGEN-51, BGEN-54, BGEN-56, BGEN-58, BGEN-63, BGEN-70, BGEN-71, BGEN-73, BGEN-74, BGEN-76, BGEN-77	Distrito Federal
9	BGEN-52	Florianópolis, SC
10	BGEN-18, BGEN-53	Formosa, GO
11	BGEN-99	Gararu, SE
12	BGEN-20, BGEN-55, BGEN-106	Goiânia, GO
13	BGEN-21, BGEN-57	Ilhéus, BA
14	BGEN-41	Juiz de Fora, MG
15	BGEN-23, BGEN-59	Lavras, MG
16	BGEN-24	Luminárias, MG
17	BGEN-25, BGEN-60	Luziânia, GO
18	BGEN-26, BGEN-61	Manaus, AM
19	BGEN-79	Monte Alegre de Goiás, GO
20	BGEN-27, BGEN-105	Muzambinho, MG
21	BGEN-100	Paripiranga, BA
22	BGEN-28, BGEN-62	Piracicaba, SP
23	BGEN-30	Planaltina de Goiás, GO
24	BGEN-31, BGEN-64	Posse, GO
25	BGEN-65	Recife, PE
26	BGEN-66, BGEN-102	Rio de Janeiro, RJ
27	BGEN-90, BGEN-91, BGEN-88 BGEN-86, BGEN-82, BGEN-85, BGEN-87, BGEN-83	Rio Real, BA
28	BGEN-67	Santa Maria da Vitória, BA
29	BGEN-94, BGEN-95, BGEN-96, BGEN-97, BGEN-98	Santana do São Francisco, SE
30	BGEN-04	São Gonçalo Rio Abaixo, MG
31	BGEN-32, BGEN-33, BGEN-68, BGEN-69, BGEN-104	São Paulo, SP
32	BGEN-84	Telha, SE
33	BGEN-35, BGEN-72	Uberlândia, MG
34	BGEN-78	Viçosa, MG

Figura 2 - Mapa com a indicação dos locais de coleta dos acessos de *L. alba* (Círculos). Mapa obtido através do programa Quantum-gis versão 2.8.2.

3.2 Extração de DNA

Para extração de DNA, foram coletadas folhas jovens e frescas de cada acesso de *L. alba* na Estação Experimental de Plantas da UFJF. Cerca de 300 a 500 mg de tecido vegetal fresco de cada amostra foram trituradas utilizando o macerador *Tissue Lyser* (Quiagen) até formar um pó fino. Imediatamente após a maceração foram adicionados 800µL de tampão CTAB, pré-aquecido a 65°C, contendo Tris-HCl 100 mM (pH 8), EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, 2% de CTAB, 1% de PVP e 0,002% de 2-mercaptoetanol. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos e homogeneizadas a cada 5 minutos. As proteínas foram removidas em duas etapas, com a adição de 2/3 do volume da amostra (aproximadamente 500µL) de uma solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As amostras foram posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 14000rpm, recuperando-se o sobrenadante. O DNA foi precipitado com 0,54% v/v de isopropanol gelado e 0,08% v/v de acetado de amônio a -20° C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 14000 rpm por 10 min descartando-se o sobrenadante e lavando-se o precipitado por duas vezes em 700µL de etanol 70% gelado e uma vez com etanol 95% também gelado. O *pellet* foi seco *overnight* à temperatura ambiente e ressuspendido em 50µL de água ultra pura autoclavada. As amostras foram incubadas a 4°C durante 24 horas para ressuspensão completa do DNA e foram armazenadas a -20 °C.

A concentração de DNA das amostras foi estimada por leitura em Nanodrop. Foram consideradas adequadas as amostras que apresentaram a razão 260/280 e a razão 260/230 entre 1,8 e 2,0. A análise da qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%. As amostras que não apresentaram o padrão considerado adequado tanto na pureza e concentração quanto na integridade, tiveram o DNA reextraído, conforme protocolo descrito acima.

3.3 Seleção dos *primers*

As sequências foram obtidas a partir de estudos anteriormente utilizados para espécies da família Verbenaceae. Ray et al. (2012) descreveram 10 *loci* polimórficos para a *Lantana camara* e *Phyla canescens*.

Santos et al. (2012) descreveram oito *loci* polimórficos para *L. alba*. Desses, quatro *primers* foram escolhidos por apresentarem maior polimorfismo para os acessos de *L. alba* estudados (Figura 3 A-C). Para os *loci* LA02 e LA08, *primers* foram desenhados de forma diferente dos relatados por Santos et al. (2012) utilizando-se o programa *Primer 3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Figura 3 C e Tabela 3).

Além destes, um conjunto de 16 novos *loci* foram avaliados durante a execução do presente trabalho. Para tanto o DNA do acesso BGEN30 foi extraído conforme descrito acima (ver item 3.2) e enviado para sequenciamento no Interdisciplinary Center for Biotechnology Research, University of Florida, USA. O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina MiSeq utilizando uma biblioteca *shotgun* e produziu 29 milhões de sequências paired-end. O *software* Trimmomatic foi utilizado para a remoção de sequências de baixa qualidade. Dezesesseis milhões de sequências de alta qualidade foram montadas por meio do programa SeqPrep. O aplicativo Blastn (1×10^{-15}) foi utilizado para a identificação de sequências de origem mitocondrial e plastidial. Após as etapas acima descritas um conjunto de dados final equivaleu a 4Gpb, o que equivale a aproximadamente uma cobertura de 2.9 vezes o genoma de *L. alba*.

Para identificar os *loci* de microssatélites em baixo número de cópias ou sequências não repetidas, uma montagem *de novo* foi realizada por meio da plataforma CLC Genomics Workbench 7.0. A montagem foi utilizada como genoma de referência para mapear as sequências nucleares inteiras. As sequências que não puderam ser mapeadas foram consideradas prováveis sequências que ocorriam em baixo número de cópias. A plataforma BatchPrimer3 foi utilizada para localizar *loci* de microssatélites de 2, 3, 4, 5 e 6 nucleotídeos e desenhar os *primers* para cada *loci*. Somente sequências de baixo número de cópias com mais de 350pb foram utilizadas para a localização dos microssatélites.

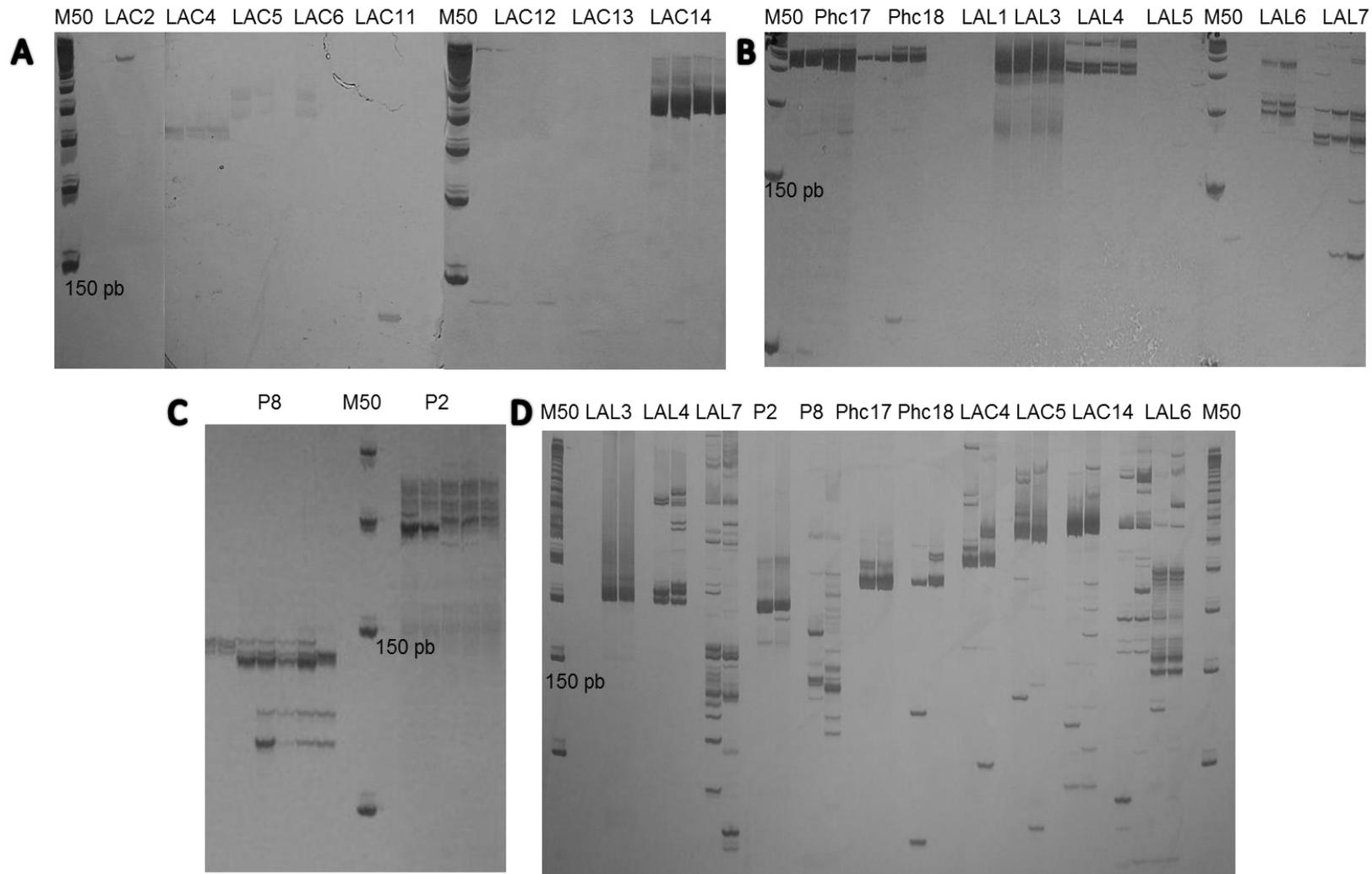


Figura 3 – Géis representativos dos testes de amplificação utilizando os *primers* de microsatélites em *L. alba*. (A) Amplificação utilizando os *primers* LAC4, LAC5 e LAC 14. (B) Amplificação utilizando os *primers* Phc17, Phc18 LAL3, LAL4, LAL6 e LAL7. (C) Amplificação utilizando os *primers* P2 e P8. (D) Ocorrência de bandas inespecíficas em LAL6 e LAL7

3.4 Amplificação dos marcadores de microssatélites

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), foi realizada a diluição das amostras em água ultra pura autoclavada a fim de obter a concentração final de 25ng/μl. Os *primers* foram testados inicialmente em quatro acessos selecionados de acordo com a variação do nível de ploidia e da região onde foi coletada (BGEN95, BGEN97, BGEN09 e BGEN31) para a padronização.

Após a definição da temperatura de anelamento dos *primers* e das condições da PCR, a técnica foi realizada com o kit GoTaq®Flexi Promega, em um volume de 10 μl: tampão 1X, 0,5 μM *primer*, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 1 unidade de Taq DNA Polimerase e 30ng de DNA genômico. A reação de PCR foi realizada em termociclador Mastercycler gradiente Eppendorf® e otimizada a partir das seguintes condições: 94°C (3 min), 35 ciclos a 94°C (45s), temperatura de anelamento 50 à 55°C para cada *primer* (45s) com *touch-down* seguida de 72°C (45s) e extensão final por 20 min a 72°C. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de poliacrilamida 8% (500 volts por 5 horas). O gel foi fixado em solução de 10% de etanol e 1% de ácido acético, corado com solução de nitrato de prata 12% e revelado em solução composta por 1% de formaldeído 37% e 10% de hidróxido de sódio. O tamanho dos fragmentos foi estimado utilizando marcadores de peso molecular de 50pb.

As diferenças na qualidade da amplificação e a reprodutibilidade foram utilizadas como parâmetros para a definição do conjunto de *primers* a serem utilizados para caracterizar os 100 acessos. Foram inicialmente selecionados nove conjuntos de *primers* (Tabela 1; Figura 3). Os *primers* foram resintetizados com marcação fluorescente (FAM, REX e TAMRA) para posterior detecção do tamanho dos fragmentos de cada *locus* no sequenciador.

Para a detecção dos novos *loci* isolados foi utilizado o *primer* M13 (5' - TGTAACGACGGCCAGT-3') com a marcação FAM ou HEX (Tabela 2). Para as reações de PCR foram utilizadas três *primers*; o *primer forward* para o *locus* com a adição cauda M13 (5' -TGTAACGACGGCCAGT-3') o *primer* M13 marcado com fluorescência e o *primer* reverso em concentração final por reação de 0,013μM; 0,5 μM e 0,5 μM, respectivamente.

Os componentes e o ciclo da PCR foram realizados conforme descrito acima ajustando-se as temperaturas de anelamento e concentração de $MgCl_2$. Foram realizadas duplicatas das reações de PCR. Os produtos de amplificação foram precipitados, ressuspensos em água e armazenados a $-20^{\circ}C$ até o uso.

Tabela 1 - Descrição dos *primers* de microssatélite selecionados para estudo em *L. alba*

<i>Loci</i>	<i>Primers</i>	Sequência (5' – 3')	Tipo de fluorescência	Repetição	Tamanho dos fragmentos (pb)	Ta (°C)	Referência
LA02	P02F P02R	TTCGTGTGCTAGTGTGTGAGTG CGGGGTAAAATCCCTTCTTTT	FAM -	(TTAAT) ₂	181-196	55	*
LA03	LAL3F LAL3R	GTCAGAACCTAGAGTCAGTGTG AATCCCGGGTAAAAATCC	TAMRA -	(GT) ₇	196-202	50	SANTOS et al., 2012
LA04	LAL4F LAL4R	GCTTATGTTGCCAGTCATGG TCGTGTGAGATCGCGTAGAT	HEX -	(AC) ₆	195-207	54	SANTOS et al., 2012
LA08	P08F P08R	GCCTTGTGGTAAGATCCTGTTC GGTTTATGTCCAGATCAGCTCC	FAM -	(TA) ₅ C(GT) ₁₀	140-154	50	*
LAC4	LAC4F LAC4R	CCTACAGCCGAACGACCTAC TGCTTCCGCCTTTCTGTTAC	HEX -	(AAC) ₅	257-299	54	RAY et al., 2012
LAC5	LAC5F LAC5R	GCTTCGGACACGTATCCACT GGTTGAGGATTCGGTGAATG	FAM -	(CCT) ₈	307-328	50	RAY et al., 2012
LAC14	LAC14F LAC14R	CGCCCCTGTTTTCTTTAGGT CCTACCAACTGCCAAAGCAC	TAMRA -	(GT) ₇	299-334	55	RAY et al., 2012
Phc17	Phc17F Phc17R	GGAGGCCGTTTTCTTTGTTTT CCAAAGAATATGCTGATCAAAGAG	FAM -	(TC) ₁₄	213-233	55	RAY et al., 2012
Phc18	Phc18F Phc18R	TGGTCCTTGATGGCATT TTT CCCAGAGCGAGCTTAATCAG	HEX -	(ATG) ₈	225-237	50	RAY et al., 2012

Ta Temperatura de anelamento **Primers* desenhados e testado através do programa online *Primer 3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Tabela 2 - Descrição dos novos *primers* de microssatélite desenvolvidos para o estudo em *L. alba*

<i>Loci</i>	<i>Primers</i>	Sequência (5' – 3')	Tipo de Florescência	Repetição	Tamanho dos fragmentos (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
p60	60F	*TAGGAGTGGGGTTTCTATTTTC	HEX	(AAGA) ₄	102-176	57
	60R	CGTTACAGCTTGGTTAGAATG				
p77	77F	*AAGGTCACGTAAACATACCG	FAM	(AATAC) ₁₅	132-211	56
	77R	AGGAGAAGCATGAGCATGTA				
p166	166F	*ACTGTAAGAGACGGTCACAAA	HEX	(CA) ₁₁	247-319	52
	166R	CCGCACTGAACATGTGTAT				
p229	229F	*GAGGAAGTTTCCTGTACCAGT	HEX	(GCCCTT) ₄	118-184	50
	229R	GTGTACAGAGAGATGGCAAAG				
p248	248F	*CGGAGAAGGAGGTATATGTTT	HEX	(ATTG) ₄	190-191	60
	248R	CATTCTAGAGGTCCATTTTCCT				
p249	249F	*ACACCAGTTGATGAAGTCAGT	FAM	(CAA) ₆	101-199	46
	249R	TTGTTACACAGGACGATAAGC				
p270	270F	*GAAGTTGGAGATGTGTGTGTT	HEX	(GA) ₉	102-181	57
	270R	ACTGAAACATGGAGGACCTAT				
p283	283F	*CATTCTAGAGGTCCATTTTCCT	HEX	(CAAT) ₄	110-193	55
	283R	CGGAGAAGGAGGTATATGTTT				

Tabela 2 - Descrição dos novos *primers* de microssatélite desenvolvidos para o estudo em *L. alba* (cont.)

p294	294F	*CACCAGTGCGACTACATAGAT	FAM	(GACAC) ₅	110-194	55
	294R	CCTATGATTCTCGAACACTTC				
p370	370F	*ATGTCACAGGGATAGGTTTG	FAM	(GGAGG) ₅	138-184	55
	370R	TATCTCTCGGTCATCTGAGAA				
p378	378F	*CTTCACAAACCGCACATT	HEX	(GA) ₇	169	40
	378R	GACGGAAAGTGTGAAGACTC				
p412	412F	*CCTCTCTCGTTCTCACTGAC	FAM	(GTC) ₇	140-156	61
	412R	CAAGTTTTCTCACACTCGTTC				
p432	432F	*GTCTTCGTCGTCGTCATT	FAM	(GGC) ₆	163-200	56
	432R	CAATATAGTCGCCTGTGTCTC				
p440	440F	*GCAAACACTAGTGGAAGATGTC	HEX	(AAGTAG) ₅	103-199	50
	440R	CCAAACACTCACTGCTTTTAC				
p473	473F	*GAAACAATATCTCTCGTGTGC	FAM	(TATC) ₂₃	107-201	59
	473R	GGTAGCTTCCGAGAAAACA				
p484	484F	*GCCTAGTCAATCTTGGACAAT	HEX	(TG) ₇	136-182	55
	484R	TTGTCATCGAGACTTATCTCC				

*Cauda M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3').

3.5 Detecção do tamanho do fragmento de DNA

Os produtos fluorescentes foram detectados por eletroforese capilar utilizando-se o sequenciador MegaBACE1000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) que possibilita identificar diferenças de até 1pb entre um alelo e outro.

A identificação dos alelos e o tamanho dos fragmentos foi inferida utilizando o *software* Fragment Profile (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Quando necessário, a PCR e a aplicação na eletroforese capilar foram realizadas em duplicatas. Foram considerados os picos presentes nas duplicatas com fluorescência acima de 500.

Os dados finais foram exportados para uma planilha e transformados nos arquivos de entrada dos respectivos programas computacionais. Os dados foram utilizados para calcular frequência dos alelos para estimativas de heterozigidade e polimorfismo dos *loci*. Para a análise de similaridade, os mesmos foram transformados em matriz binária de 0 e 1 correspondendo a ausência e presença, respectivamente.

3.6 Análise de dados

Os valores de PIC (*polymorphism information content*) e heterozigidade foram calculados por meio do programa Cervus v3.0.7 (KALINOWSKI et al., 2007)

Os coeficientes de similaridade de Jaccard e Dice foram calculados para cada combinação de pares de acessos sendo utilizados para construir um dendrograma de acordo com o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) por meio do *software* NTSYS (ROHLF, 2000) e PAST (HAMMER, HARPER e RYAN, 2001).

A análise bayesiana foi baseada nas informações de tamanho dos fragmentos, onde cada fragmento representa alelos relativos aos acessos diploides. Os acessos poliploides foram excluídos dessa análise uma vez que os softwares de análise disponíveis não consideram a análise simultânea de

diferentes níveis de ploidia. Além disso, pressupõe-se que os dados estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (PRITCHARD, WEN e FALUSH, 2010).

Para a inferência Bayesiana dos acessos diploides, utilizou-se o programa STRUCTURE versão 2.3.4. Pritchard et al. (2000a)

4. RESULTADOS

Vinte e cinco *loci* de microssatélites foram utilizados sendo quatro desenvolvidos por Santos et al. (2012) e cinco por Ray et al. (2012). Os outros 16 *primers* foram desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa.

4.1 Caracterização dos *loci*

Os 18 *primers* (SANTOS et al., 2012 e RAY et al., 2012) foram testados para acessos de *L. alba*, 11 amplificaram, sendo que dois (LAL6 e LAL7) amplificaram de forma inespecífica (Tabela 3). Os nove conjuntos de *primers* inicialmente selecionados amplificaram para todos os acessos de *L. alba*. Na figura 3 é possível visualizar a imagem dos géis utilizados para a escolha dos *primers* descritos na literatura. Foi possível a obtenção de 51 alelos. O número de alelos por *locus* variou de 4 a 8 apresentando apenas um alelo monomórfico (196) referente ao *primer* P2 (Tabela 4).

Tabela 3 – Tabela com resumo dos testes e referência dos *primers*

<i>Primers</i>	Amplificação	Bandas inespecíficas	Referência
LAC2			RAY et al., 2012
LAC4	X		RAY et al., 2012
LAC6	X		RAY et al., 2012
LAC11			RAY et al., 2012
LAC12			RAY et al., 2012
LAC13			RAY et al., 2012
LAC14	X		RAY et al., 2012
Phc17	X		RAY et al., 2012
Phc18	X		RAY et al., 2012
LAL1			SANTOS et al., 2012
P2	X		SANTOS et al., 2012*
LAL3	X		SANTOS et al., 2012
LAL4	X		SANTOS et al., 2012
LAL5			SANTOS et al., 2012
LAL6	X	X	SANTOS et al., 2012
LAL7	X	X	SANTOS et al., 2012
P8	X		SANTOS et al., 2012*

* *Primers* desenhados por meio do programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Tabela 4 – Caracterização de 25 *loci* de microssatélites amplificados em *L. alba*

<i>Locus</i>	Número de alelos	He	PIC
p60	22	0,787	0,760
p77	20	0,865	0,850
p166	13	0,742	0,713
p229	9	0,824	0,798
p248	2	0,496	0,372
p249	25	0,774	0,754
p270	8	0,414	0,370
p283	7	0,525	0,415
p294	22	0,904	0,894
p370	7	0,569	0,510
p378	1	0,000	0,000
p412	4	0,509	0,457
p432	12	0,762	0,732
p440	15	0,810	0,785
p473	15	0,621	0,602
p484	12	0,722	0,689
LAC4	7	0,559	0,468
LAC5	7	0,648	0,592
LAC14	5	0,554	0,452
LAL3	4	0,516	0,397
LAL4	4	0,534	0,497
P2	4	0,068	0,067
P8	7	0,737	0,693
Phc17	9	0,333	0,318
Phc18	4	0,299	0,260
Média	9,760	0,5825	0,5375

He Heterozigosidade esperada; *PIC* Conteúdo de informação polimórfica.

Os 16 *primers* desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa permitiram observar 194 alelos. As imagens dos géis utilizados para os testes estão representadas na figura 4. Dos 16 *primers*, apenas o *locus* p378 foi monomórfico. De forma geral os *primers* desenvolvidos foram mais polimórficos que os descritos pela literatura, sendo a média do número de alelos por *locus* de 12,13 comparado com os *primers* descritos na literatura que apresentaram em média 5,56. Observou-se também maiores valores de heterozigosidade esperada (0,645) e PIC (0,606) para o novo conjunto de marcadores quando comparados com os *primers* descritos na literatura (0,471 e 0,415, respectivamente). Maior número de alelos foi observado para o *primer* p249 (25 alelos) e os maiores valores de heterozigosidade e PIC foram observados para o marcador p77 com 0,865 e 0,85, respectivamente (Tabela 4).

Dentre os 245 alelos, 71 (28,98%) foram observados em apenas um acesso (p60, p77, p166, p229, p248, p249, p270, p283, p294, p370, p432, p440, p473, p484, LAC4, LAC5, LAC14, LAL3, P2, P8, Phc17 e Phc18). A quantidade de alelos para cada acesso e os acessos que contém alelos únicos podem ser visualizados na Tabela 5. O acesso BGEN100 apresentou o maior número de alelos únicos e o acesso BGEN87 o maior número de alelos. Para os *primers* relatados na literatura, foram identificados 23,53% de alelos únicos enquanto os *loci* desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa apresentaram 62,76% de alelos únicos.

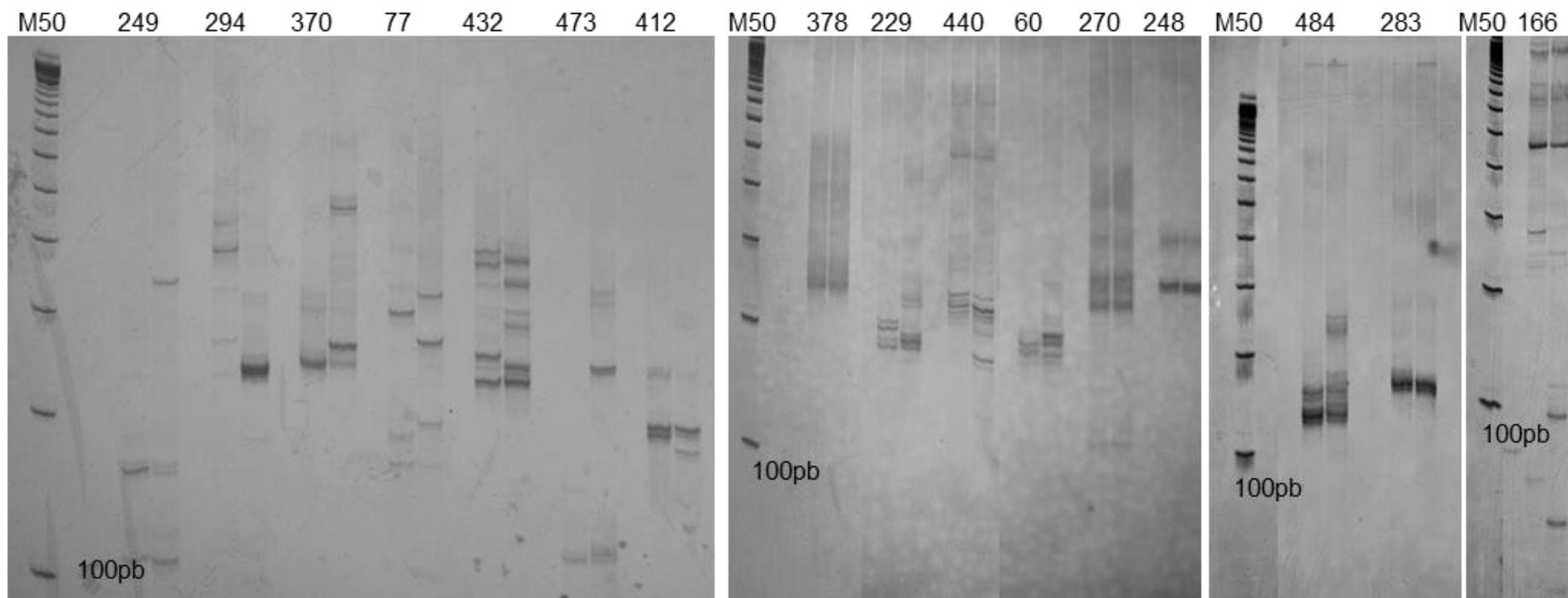


Figura 4 – Géis representativos dos testes de amplificação utilizando os novos *primers* de microssatélites desenvolvidos em *L. alba*. Amplificação utilizando os *primers* p249, p294, p370, p432, p473, p412, p378, p229, p440, p60, p270, p248, p484, p283 e p166

Tabela 5 – Caracterização de acessos de *L. alba* quanto a presença de alelos únicos e o número máximo de alelos em 25 marcadores microsatélites

Acessos	Presença de alelos únicos	Número de alelos
BGEN01	1	43
BGEN02	1	34
BGEN03	1	44
BGEN04	1	47
BGEN05	0	37
BGEN06	0	44
BGEN07	1	46
BGEN08	1	45
BGEN09	0	39
BGEN10	1	43
BGEN11	0	36
BGEN12	1	40
BGEN13	0	36
BGEN14	1	34
BGEN15	0	44
BGEN16	0	33
BGEN18	1	37
BGEN19	0	35
BGEN20	0	37
BGEN21	1	39
BGEN22	0	38
BGEN23	1	43
BGEN24	0	45
BGEN25	0	48
BGEN26	1	39
BGEN27	0	46
BGEN28	0	43
BGEN29	1	39
BGEN30	0	37
BGEN31	0	44
BGEN32	0	56
BGEN33	1	34
BGEN34	0	40
BGEN35	0	43
BGEN36	0	39
BGEN37	0	47
BGEN38	1	37
BGEN40	0	39
BGEN41	0	41
BGEN42	0	44
BGEN43	0	37
BGEN45	1	50

Tabela 5 – Caracterização de acessos de *L. alba* quanto a presença de alelos únicos e o número máximo de alelos em 25 marcadores microsatélites (cont.)

BGEN46	0	44
BGEN47	0	44
BGEN48	1	38
BGEN49	0	45
BGEN50	1	40
BGEN51	0	39
BGEN52	0	37
BGEN53	0	39
BGEN54	1	37
BGEN55	1	39
BGEN56	0	40
BGEN57	0	41
BGEN58	0	40
BGEN59	0	44
BGEN60	0	46
BGEN61	1	43
BGEN62	0	46
BGEN63	0	35
BGEN64	0	48
BGEN65	0	39
BGEN66	1	40
BGEN67	1	35
BGEN68	0	38
BGEN69	1	38
BGEN70	0	49
BGEN71	0	37
BGEN72	0	36
BGEN73	0	41
BGEN74	1	34
BGEN76	0	48
BGEN77	0	39
BGEN78	0	43
BGEN79	1	36
BGEN80	0	37
BGEN81	0	40
BGEN82	0	43
BGEN83	1	38
BGEN84	0	36
BGEN85	0	37
BGEN86	0	44
BGEN87	1	58
BGEN88	1	39
BGEN89	0	38
BGEN90	0	44

Tabela 5 – Caracterização de acessos de *L. alba* quanto a presença de alelos únicos e o número máximo de alelos em 25 marcadores microsatélites (cont.)

BGEN91	0	43
BGEN94	0	37
BGEN95	0	33
BGEN96	0	33
BGEN97	0	43
BGEN98	0	35
BGEN99	0	37
BGEN100	1	29
BGEN101	1	48
BGEN102	1	37
BGEN103	1	46
BGEN104	1	42
BGEN105	0	43
BGEN106	0	38

4.2 Análise de diversidade

Dentre as amostras estudadas, a maioria é diploide (59%) sendo oriundas principalmente da região Centro-oeste. Os acessos triploides (16%) têm como origem as regiões Centro-oeste e Sudeste e os tetraploides (21%) são principalmente oriundos da região Centro-oeste. Os acessos da região Nordeste 80% são diploides. O único acesso hexaploide é originário da região Centro-oeste.

Por meio do dendrograma de distâncias genéticas, associado aos dados de quantidade de DNA, foi possível identificar a maior capacidade de discriminação entre as amostras quando comparamos os *primers* descritos na literatura e os *primers* desenvolvidos no presente trabalho. A diferença de polimorfismo entre os dois conjuntos de *primers* pode ser visualizado na figura 5. Enquanto para os marcadores descritos na literatura não foi possível diferenciar alguns acessos (Figura 5A), o dendrograma obtido a partir do novo conjunto de *primers* foi capaz de diferenciar todos os acessos de *L. alba* (Figura 5B).

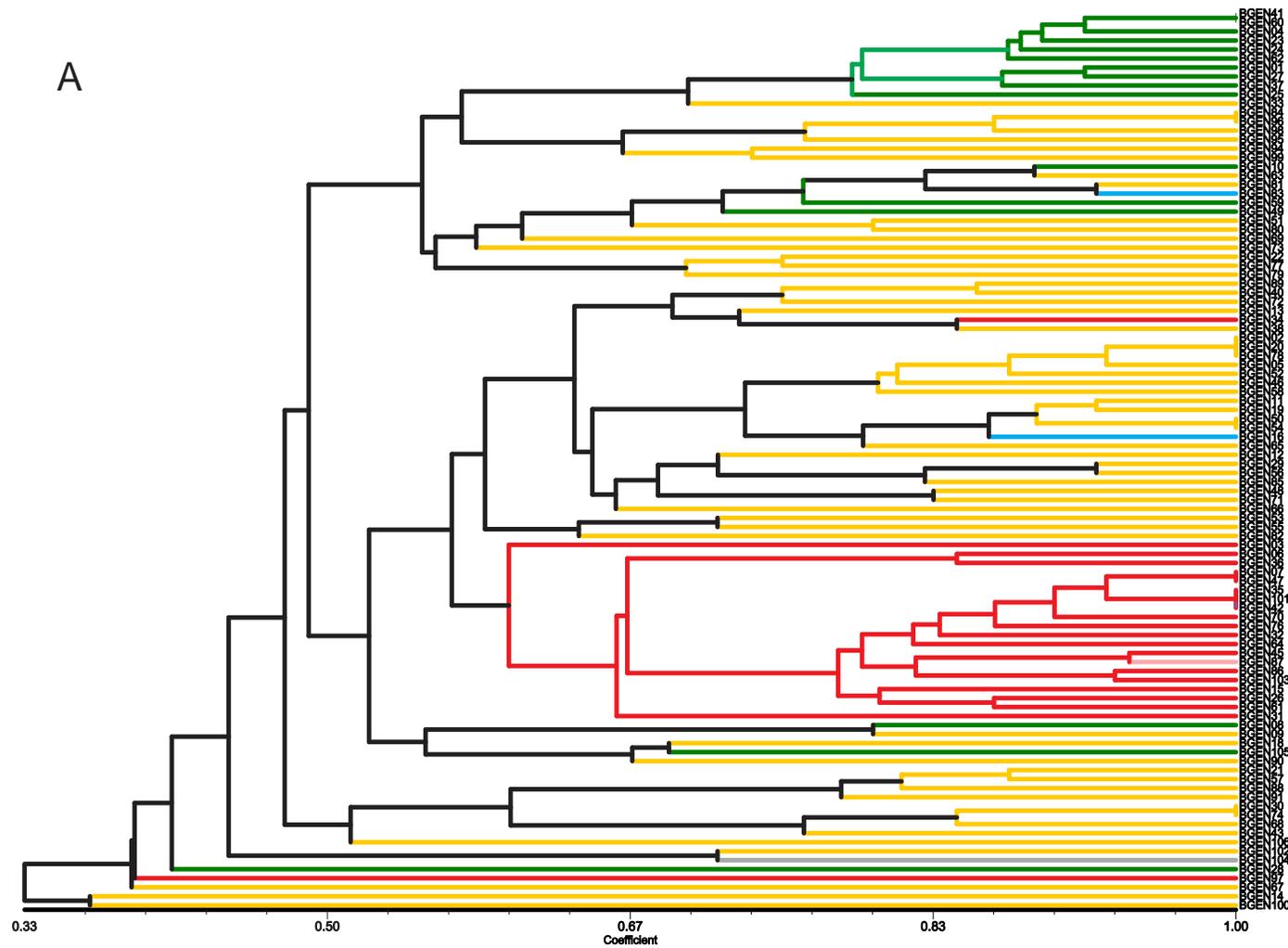


Figura 5 – Dendrogramas de similaridade genética por UPGMA com coeficientes JACCARD de 100 acessos de *L. alba*. As cores dos ramos representam diferentes níveis de ploidia, sendo diploide em amarelo, triploide em verde, tetraploide em vermelho, hexaploide em roxo, aneuploide em azul e mixoploide em cinza. (A) Dendrograma realizado a partir dos dados de nove *loci* descritos na literatura (SANTOS et al., 2012; RAY et al., 2012). (B) Dendrograma realizado a partir de 16 novos *loci* desenvolvidos neste trabalho.

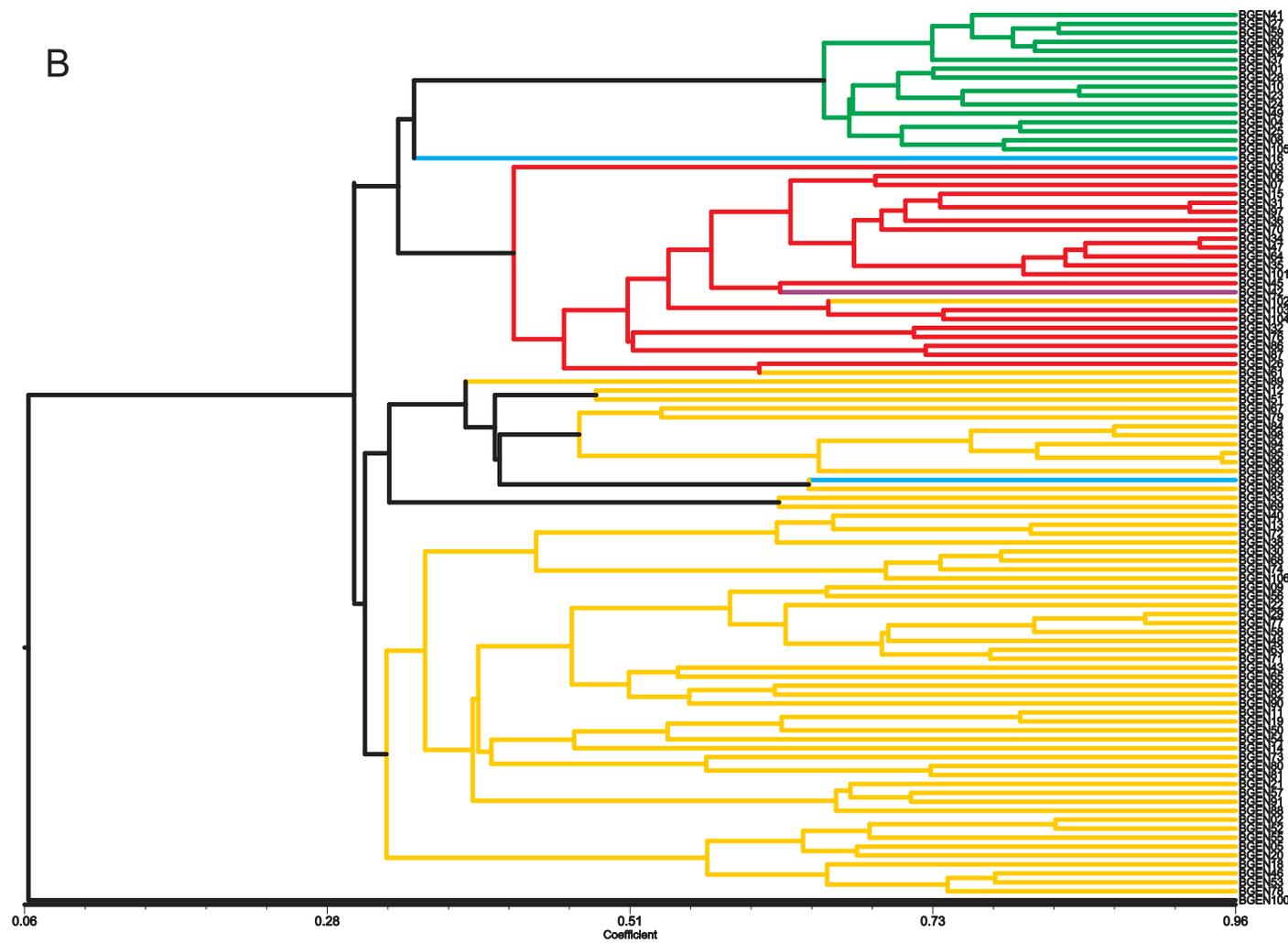


Figura 5 – Dendrogramas de similaridade genética por UPGMA com coeficientes JACCARD de 100 acessos de *L. alba*. As cores dos ramos representam diferentes níveis de ploidia, sendo diploide em amarelo, triploide em verde, tetraploide em vermelho, hexaploide em roxo, aneuploide em azul e mixoploide em cinza. (A) Dendrograma realizado a partir dos dados de nove *loci* descritos na literatura (SANTOS et al., 2012; RAY et al., 2012). (B) Dendrograma realizado a partir de 16 novos *loci* desenvolvidos neste trabalho. (cont.)

O menor valor de similaridade genética (0,12) foi observado entre os acessos BGEN100 e BGEN88 e o maior valor de similaridade genética (0,89) entre os acessos BGEN95 e BGEN96. Foram obtidos 28 ramos com valores de *bootstrap* acima de 50%, sendo que desses seis foram acima de 90% (Figura 6).

A partir do dendrograma gerado com todos os *loci* estudados (Figura 6A e B) observou-se quatro grupos principais. Os dendrogramas foram coloridos de acordo com dois critérios: local de coleta dos acessos (Figura 6A) e nível de ploidia (Figura 6B). O agrupamento por nível de ploidia revelou-se mais consistente. Contudo, foi possível identificar três grupos relacionados à origem dos acessos, o grupo I proveniente apenas do Centro-oeste, todos do Distrito Federal e os grupos II e III que foram compostos apenas por acessos da região Nordeste.

O agrupamento por nível de ploidia permitiu observar grupos com acessos diploides e triploides (Grupo I, Figura 6B), merecendo destaque o fato dos triploides estarem todos reunidos no mesmo grupo com similaridade 0,36. Outros grupos contendo principalmente acessos diploides (Grupos II e IV, Figura 6B) e tetraploides (Grupo III, Figura 6B) foram observados.

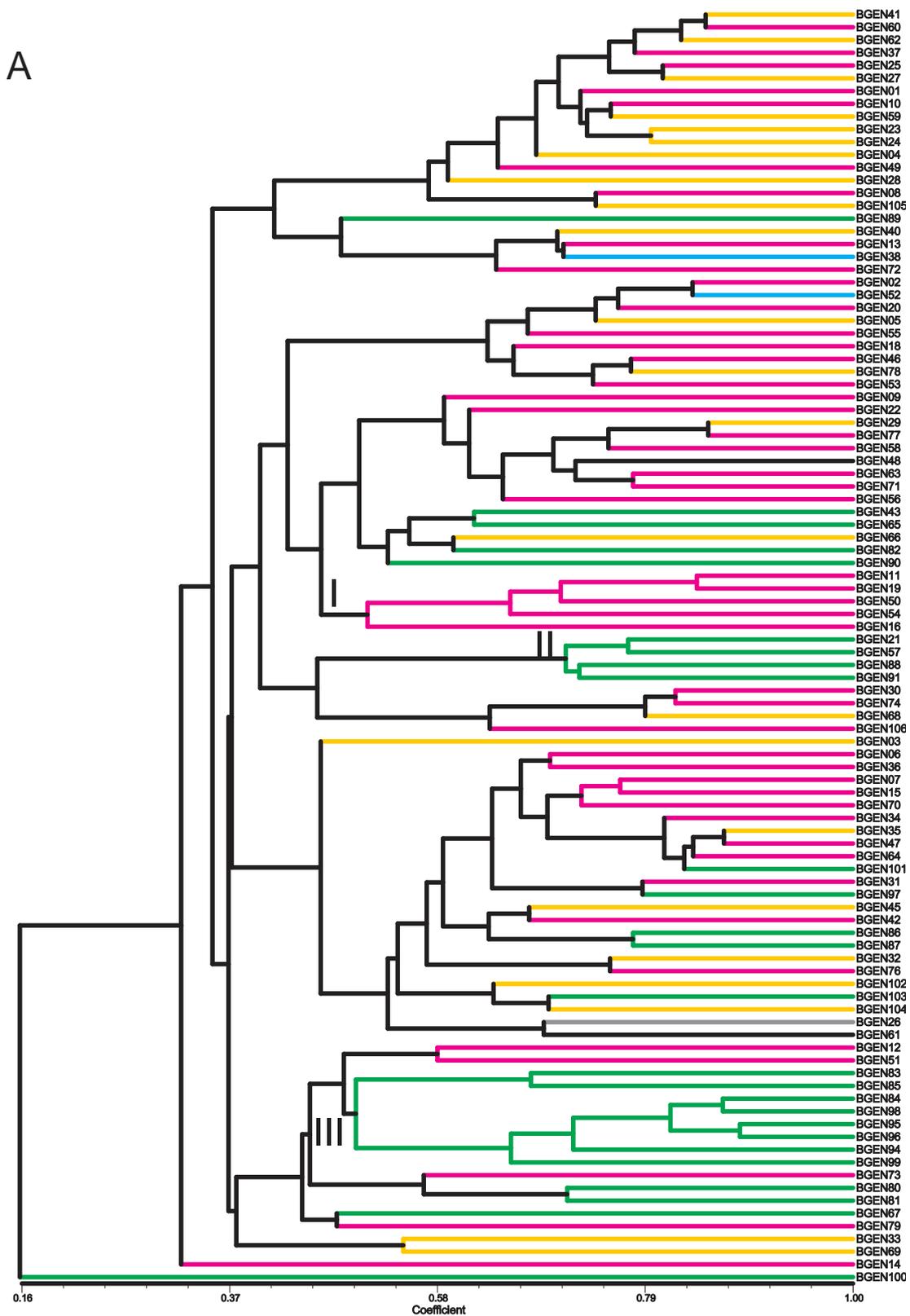


Figura 6 – Dendrogramas de similaridade genética por UPGMA com coeficientes JACCARD a partir de 25 *loci* de microssatélites de 100 acessos de *L. alba*. (A) As cores dos ramos representam diferentes regiões do Brasil, sendo Sudeste em amarelo, Nordeste em verde, Centro-oeste em rosa, Sul em azul e Norte em cinza. (B) As cores dos ramos representam diferentes níveis de ploidia sendo diploide amarelo, triploide em verde, tetraploide em vermelho, hexaploide em roxo, aneuploide em azul e mixoploide em cinza. * representa valores de *bootstrap* acima de 50 e ** valores de *bootstrap* acima de 90. Os dendrogramas com coeficientes de JACCARD e DICE foram idênticos.

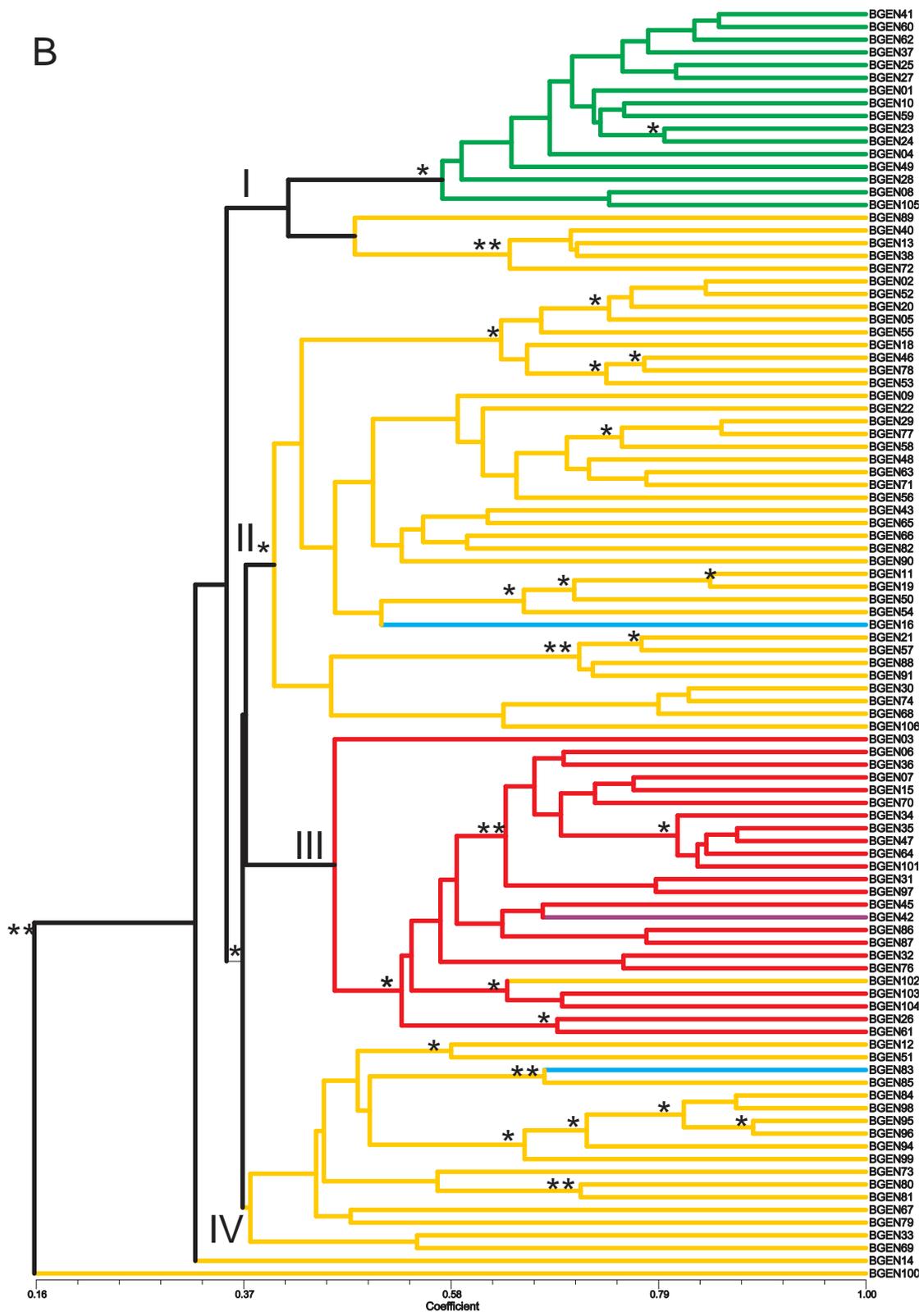


Figura 6 – Dendrogramas de similaridade genética por UPGMA com coeficientes JACCARD a partir de 25 *loci* de microssatélites de 100 acessos de *L. alba*. (A) As cores dos ramos representam diferentes regiões do Brasil, sendo Sudeste em amarelo, Nordeste em verde, Centro-oeste em rosa, Sul em azul e Norte em cinza. (B) As cores dos ramos representam diferentes níveis de ploidia sendo diploide amarelo, triploide em verde, tetraploide em vermelho, hexaploide em roxo, aneuploide em azul e mixoploide em cinza. * representa valores de *bootstrap* acima de 50 e ** valores de *bootstrap* acima de 90. Os dendrogramas com coeficientes de JACCARD e DICE foram idênticos. (cont.)

4.3 Análise bayesiana

A análise bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE permitiu reunir os acessos de acordo com a composição do genoma (Figura 7). Os acessos foram agrupados por similaridade dos genomas onde alelos iguais são representados pela mesma cor.

Essa análise permitiu visualizar a alta diversidade dos alelos em acessos diploides evidenciando quatro agrupamentos representados em vermelho, verde, azul e amarelo (Figura 7). A porção do genoma representado em vermelho variou de 60% a 100% entre os indivíduos agrupados. Valores similares foram observados para os acessos agrupados e representados pela cor azul. Os acessos com a porção majoritária do genoma representado em verde variou entre 97% e 100%, sendo esse o grupo que apresentou maior homogeneidade. Os indivíduos com alelos representados em amarelo revelaram uma variação de 50 a 100%.

Foi possível identificar acessos que apresentaram-se intermediários, isto é, com alelos representados por duas cores. Este fato foi principalmente observado entre dois grupos representados com barras azuis e amarelas e quase não observado nos acessos que apresentam predominantemente barras vermelhas e verdes.

Na figura 8 foi possível visualizar que acessos oriundos da mesma região apresentam genomas com diferentes tipos de alelos evidenciando a ausência de relação entre a variabilidade alélica e a região de origem.

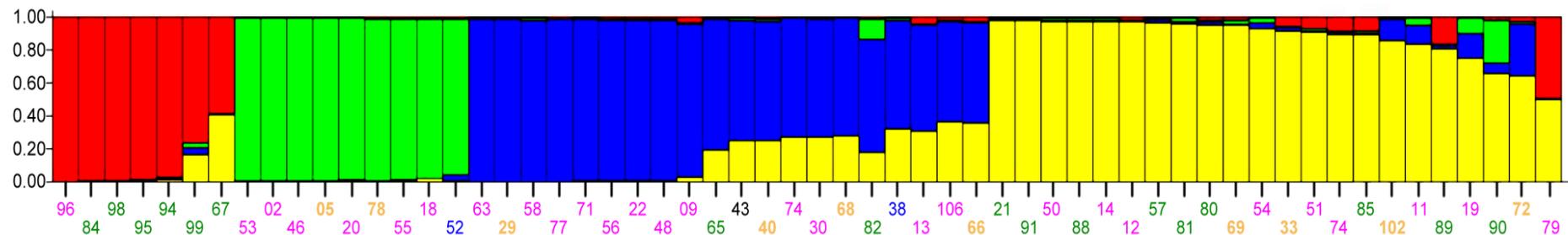


Figura 7 - Análise bayesiana da estrutura genética de 58 acessos diploides de *L. alba* (K=4). Na porção inferior de cada barra encontra-se a identificação do acesso colorido de acordo com região de origem: Rosa (Centro-oeste), Amarelo (Sudeste), Verde (Nordeste), Azul (Sul) e Preto (não há informação de origem do acesso). Indivíduos foram agrupados por similaridade do genoma. Nos histogramas, as cores mostram, para cada indivíduo, a proporção do genoma compartilhado. Genomas similares são representados pela barra da mesma cor.

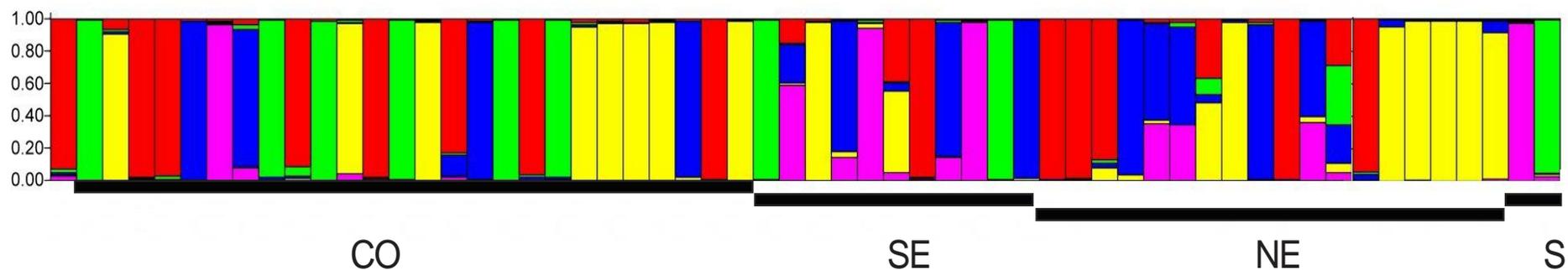


Figura 8 – Análise bayesiana da estrutura genética de 58 acessos diploides de *L. alba* (K=4). Indivíduos são organizados por região de origem CO (Centro-oeste), SE (Sudeste), NE (Nordeste) e S (Sul). Nos histogramas, as cores mostram, para cada indivíduo, a proporção do genoma compartilhado. Genomas similares são representados pela mesma cor.

5. DISCUSSÃO

A análise dos fragmentos de microssatélites em *Lippia alba* mostrou a presença de indivíduos com três e quatro alelos distintos sugerindo a ocorrência de poliploidia na espécie (SOLTIS e RIESEBERG, 1986; SOLTIS e SOLTIS, 1989; MAHY et al., 2000). Em *L. alba* identificamos 14 *loci* apresentando mais de dois alelos (p60, p77, p166, p229, p249, p270, p294, p370, p412, p432, p440, p484, P8 e LAL04). A maioria dos *loci* apresentou alelos com alta frequência na população e vários alelos apresentaram-se compartilhados por acessos com diferentes níveis de ploidia, ratificando a hipótese de poliploidização por autoploidia (LÓPEZ-PUJOL et al., 2007). Possivelmente por esse motivo alguns valores de *bootstrap* mostraram-se baixos em alguns ramos do dendrograma, uma vez que a ocorrência de alelos compartilhados aumenta a chance de que muitos ramos diferentes sejam formados (LU et al., 2013).

A comparação entre os *loci* desenvolvidos neste trabalho e aqueles previamente descritos na literatura revelou, de modo geral, melhor qualidade dos novos *loci*, tanto no que diz respeito à amplificação dos fragmentos quanto no poder de discriminação das amostras. Essa diferença pode ser devido à metodologia utilizada para identificação dos *loci*. Zalapa et al. (2012) compilaram os resultados de vários artigos relativos ao desenvolvimento de *primers* de microssatélite comparando-os em relação aos métodos utilizados: por clonagem em vetores ou *next-generation sequencing* (NGS). Nos trabalhos revisados, 85% utilizaram a metodologia clássica em que os *loci* são identificados por meio da análise de colônias contendo fragmentos do genoma da espécie em estudo. Apesar do maior número de publicações utilizando o método clássico, os autores classificaram o método de sequenciamento paralelo em massa como eficiente para o isolamento de novos *loci* de microssatélites, principalmente quando são comparados com testes de polimorfismo dos *primers*.

Embora os trabalhos com diferentes metodologias apresentem praticamente os mesmos números de *primers* polimórficos, aqueles realizados por meio da clonagem clássica foram submetidos a mais testes de

padronização (20%) que os *primers* gerados por NGS (1%) (ZALAPA et al., 2012).

No presente trabalho, comparando-se os *primers* previamente descritos e os desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa com relação ao polimorfismo dos *primers* também observou-se que aqueles desenhados utilizando a metodologia tradicional mostraram-se menos polimórficos que os que utilizaram sequenciamento paralelo em massa. Alguns trabalhos vêm utilizando essa técnica para o desenvolvimento de marcadores microssatélites (CSENCICS, BRODBECK e HOLDEREGGER, 2010; EKBLOM e GALINDO, 2011; DELMAS et al., 2011; JUN, MICHEL e MIAN, 2011; CELIK et al., 2014; KUROKOCHI et al., 2014), no entanto esse é o primeiro trabalho que utiliza este método para a identificação de *loci* de microssatélites para *L. alba*.

Cada vez mais estudos utilizam marcadores tipo microssatélite para entender a relação entre indivíduos com variação do nível de ploidia intraespecífico (BRUVO et al., 2004; PAIRON, JACQUEMART e POTTER, 2008; ANDREAKIS, KOOISTRA e PROCACCINI, 2009; LO, STEFANOVIĆ e DICKINSON, 2009; ASSOUMANE et al., 2013, TEIXEIRA, RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA e NABAIS, 2014). No presente estudo a relação entre os diferentes níveis de ploidia pode ser observada pelo dendrograma de similaridade genética a partir dos 25 *loci* de microssatélites utilizados, que evidenciam grupos de acessos que apresentaram uniformidade em relação ao nível de ploidia, sugerindo maior similaridade genética entre acessos que possuem o mesmo tamanho de genoma. Fehlberg e Ferguson (2012), através de estudos de microssatélites, relataram a possibilidade de falta de fluxo gênico entre citótipos do complexo *Phlox amabilis*- *P. woodhousei* (Polemoniaceae). Da mesma forma, Münzbergová, Surinová e Castro (2013), por meio da mesma técnica, sugeriram uma forte barreira reprodutiva entre os citótipos diploides e tetraploides de *Aster amellus* (Asteraceae).

Apesar de *L. alba* ser descrita com reprodução principalmente por alogamia (SCHOCKEN, 2007), observações de campo sugerem que os citótipos poliploides se reproduzam eficientemente por reprodução vegetativa.

Este modo de reprodução possibilita a manutenção de indivíduos geneticamente desbalanceados e a coexistência dos citótipos (TATE e

SIMPSON, 2004; KAO, 2007) possibilitando em longo prazo o cruzamento entre eles. Além disso, esse modo de reprodução permite, em um primeiro momento, o surgimento de clones que podem acumular mutações e com isso ampliar a variabilidade genética na espécie (LEITCH e LEITCH, 2008). No entanto, apesar das mutações tais clones podem permanecer ainda muito parecidos, corroborando os resultados aqui observados. Além da reprodução vegetativa não se pode descartar ainda a ocorrência de apomixia que também pode contribuir para esse padrão e está frequentemente relacionada com a poliploidia (MOGIE, BRITTON e STEWART-COX, 2007).

Dentre os agrupamentos gerados ocorreram grupos contendo majoritariamente acessos diploides, o menor valor de similaridade encontrado entre esses acessos foi 0,12. Apesar disso, observou-se a formação de grupos de genótipos entre os acessos diploides. Este fato explica, pelo menos em parte, o fato de que alguns acessos diploides não pertençam a nenhum grupo como BGEN100 e BGEN14 ou ainda estarem mais próximos de citótipos triploide, tetraploide, hexaploide, aneuploide e mixoploide e contribui para a hipótese de que os poliploides tenham surgido a partir dos acessos diploides. Situação similar foi observada no estudo da espécie poliploide *Dioscorea alata* (NEMORIN et al., 2013).

O agrupamento dos acessos diploides por meio do programa STRUCTURE revelou quatro grupos, observando-se em dois deles a presença de indivíduos com dois tipos de alelos. Este fato sugere a possível ocorrência de fluxo gênico envolvendo diferentes genomas. No entanto, no caso de alguns acessos que não apresentam diferentes cores representadas na barra, como nos acessos que exibem barras vermelhas e verdes, provavelmente o meio de propagação é por reprodução vegetativa ou reprodução sexuada mais restrita em cada grupo. O surgimento de indivíduos diploides por semente em condições de campo explica a maior diversidade neste nível de ploidia e sugere haver mais fluxo gênico entre os diploides, ampliando a variabilidade do genoma neste nível de ploidia.

Por outro lado, os acessos poliploides tendem a apresentar um comportamento meiótico irregular (REIS et al., 2014) e podem se estabelecer no ambiente por meio do aumento da taxa de reprodução assexuada (TATE e

SIMPSON, 2004; KAO, 2007) diminuindo assim a variabilidade dentro dos níveis mais altos de ploidia.

A análise de distância genética reuniu todos os acessos triploides em um mesmo grupo contribuindo para a hipótese de que tenham uma origem comum. Considerando a baixa frequência e viabilidade sexual dos triploides e também a possibilidade de reprodução assexuada, é possível que um ou poucos ancestrais diploides estejam envolvidos na formação dos mesmos. Este fato pode também significar que a formação deste nível de ploidia não é algo recorrente na espécie. Outros estudos também mostram o raro estabelecimento de triploides na população devido a sua infertilidade (JIANG et al., 2013 e MOGHE et al., 2014). Outros aspectos que mostram a uniformidade deste grupo estão relacionados à produção de óleos essenciais e às características morfológicas dos acessos. Recentemente nosso grupo de pesquisa observou que todos os triploides produzem linalol como componente majoritário do óleo essencial e que este composto não é produzido majoritariamente por diploides e tetraploides (VICCINI et al., 2014). Em outro estudo que avaliou comparativamente a morfometria foliar, evidenciou-se um agrupamento dos acessos triploides em relação aos outros acessos (dados não publicados).

No agrupamento que reúne todos os acessos triploides, alguns acessos diploides foram também incluídos, BGEN13, BGEN38, BGEN40, BGEN72 e BGEN89. Este fato evidencia a similaridade genética entre acessos diploides e triploides e indica uma possível relação na origem dos triploides envolvendo acessos diploides. Da mesma forma o acesso diploide BGEN102, que está no mesmo grupo dos acessos tetraploides, pode ter relação com a origem deste nível de ploidia. É importante ressaltar que todos esses acessos diploides recém-citados (BGEN13, BGEN38, BGEN40, BGEN72, BGEN89 e BGEN102) contém pelo menos 20% do genoma representado em amarelo. Sugerindo que o agrupamento de acessos diploides com majoritariamente presença de genoma representado em amarelo pode estar relacionado à origem dos acessos poliploides.

Ao se fazer a análises do agrupamento dos acessos com base na região geográfica de origem não se verifica maior similaridade entre acessos oriundos

da mesma região. Esse agrupamento por nível de ploidia e não por região de origem sugere que *L. alba* seja uma espécie de ampla distribuição, que não está associada aos níveis de ploidia. É possível que a ação humana também tenha contribuído para a difusão da espécie, uma vez que se trata de uma espécie de interesse medicinal e sua propagação ocorre facilmente por meio vegetativo. A ausência da relação entre similaridade genética e região de origem também ocorre na comparação da composição genômica dos acessos diploides, onde não é possível identificar relação entre a região de origem e os diferentes tipos de genomas existentes em acessos diploides.

O agrupamento por região é evidenciado somente para alguns acessos diploides das regiões Nordeste e Centro-oeste, sendo todos os acessos originados dos estados de Sergipe, Bahia e Distrito Federal indicando que esses acessos possam estar reprodutivamente isolados.

O distanciamento do acesso diploide BGEN100 dos demais acessos também diploides pode ter ocorrido devido este acesso ser o único oriundo do município de Pirapiranga, BA. As coletas mais próximas foram realizadas a 128Km em Rio Real, BA ou 160km em Gararu, SE. Algumas hipóteses podem ser levantadas: (1) o acesso pode estar isolado reprodutivamente dos demais acessos coletados e, pelo isolamento, acumulou mutações que o diferencia dos demais; (2) o acesso possui origem diferente dos demais. Os acessos a ele relacionados constituem o grupo II no dendrograma de distâncias genéticas a partir dos 25 *loci* de microssatélites utilizados. A difusão antrópica que os acessos de *L. alba* sofrem pode também ter contribuído para esse resultado.

Embora essa relação entre nível de ploidia e distribuição geográfica não tenha sido verificada, é curioso o fato de que somente na região centro-oeste tenha sido observado todos os níveis de ploidia. Coincidentemente essa região é considerada como o centro de diversidade do gênero (REIS et al., 2014).

A associação dos acessos por nível de ploidia vem ao encontro a hipótese apresentada por Reis et al. (2014). Segundo os autores, a ocorrência natural de cruzamentos entre acessos com diferentes níveis de ploidia pode explicar a origem do complexo poliploide (Figura 9).

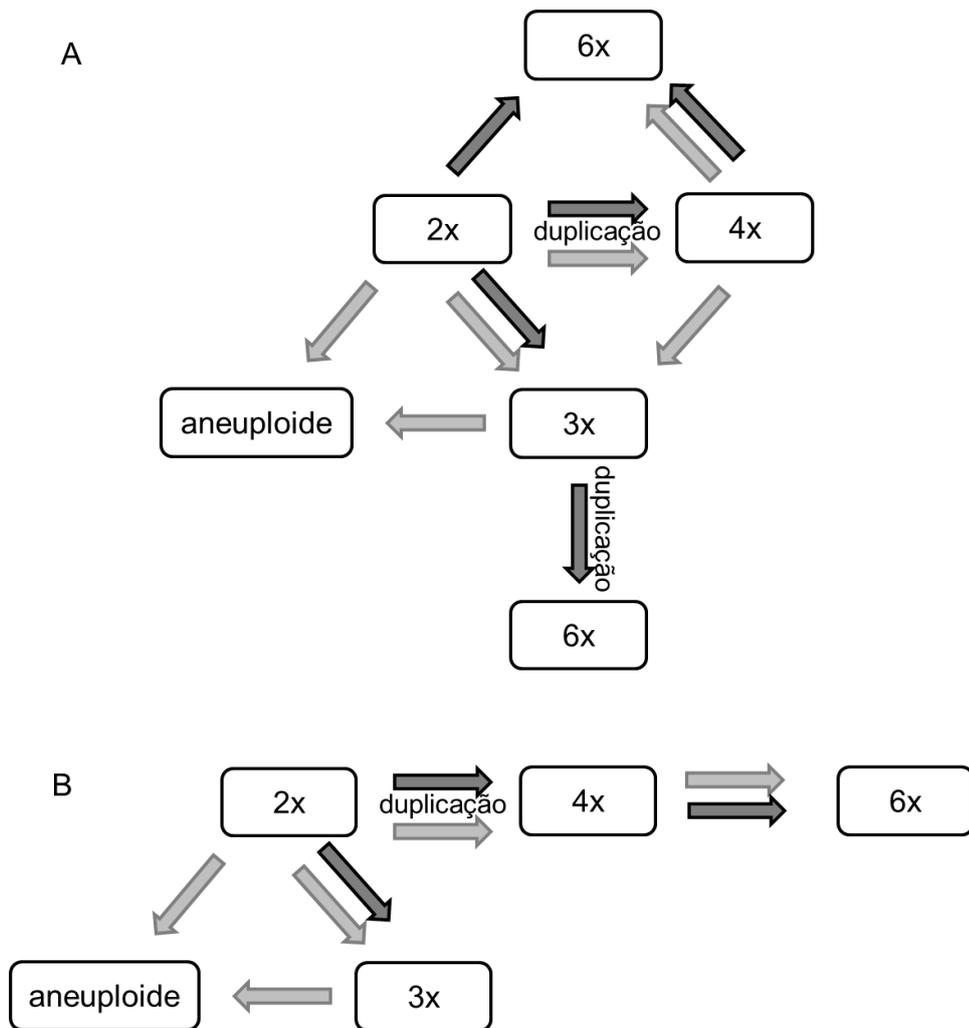


Figura 9 - Possíveis origens dos diferentes níveis de ploidia evidenciado por cruzamentos naturais entre os citótipos. As setas cinza claro representam cruzamentos envolvendo gametas reduzidos e as setas cinza escuro representam cruzamentos envolvendo gametas não reduzidos (Adaptado de REIS et al., 2014). (A) Todas as possibilidades de origem dos citótipos. (B) Origem mais provável de acordo com as distâncias genéticas entre os citótipos.

De acordo com essa hipótese, a origem dos acessos tetraploides estaria associada à duplicação do genoma diploide ou à junção de gametas não reduzidos (Figura 9A). De acordo com o dendrograma de distâncias genéticas, a origem dos acessos tetraploides a partir de acessos diploides (Figura 9B) é possível uma vez que os mesmos mostram-se similares em ambas análises. No dendrograma construído a partir dos 25 *loci* de microsatélites há um grupo que contém três agrupamentos com os dois citótipos, dois com acessos diploides (grupos II e IV) e um grupo contendo acessos tetraploides (grupo III). Segundo Reis et al. (2014), os acessos triploides podem ter se originado por meio do cruzamento de um acesso diploide com um acesso tetraploide ou por

meio da fusão de um gameta não reduzido e outro reduzido ambos oriundos de acessos diploides (Figura 9A). O último cenário parece ser o caso dos triploides amostrados (Figura 9B), uma vez que os triploides aparecem relacionados com os diploides e não com os tetraploides nas análises de similaridade genética.

A origem do acesso aneuploide pode ser explicada pelo cruzamento de um diploide ($n=15$) com um triploide que pode produzir gametas com $n=22$ ou $n=23$ cromossomos (Figura 9A e B). A junção de um gameta com $n=15$ com um gameta com $n=23$ pode explicar a origem de um aneuploide com $2n=38$ cromossomos (REIS et al., 2014). Heilborn (1932) e Wahl (1940) identificaram indivíduos aneuploides derivados de poliploides com números cromossômicos diferentes. Estudos em *Arabidopsis thaliana* verificaram a aneuploidia derivada de triploides (HENRY et al., 2005) e alguns estudos recentes identificaram gametas aneuploides oriundos de organismos triploides semi-férteis (ALEZA et al., 2012; NEMORIN et al., 2013; PRZYBYLA et al., 2014). Contudo, no dendrograma não foi possível evidenciar o indivíduo aneuploide próximo a acessos triploides. Esse episódio pode ter ocorrido devido a algumas hipóteses: (1) o aneuploide teria surgido por cruzamento de um triploide não amostrado no presente trabalho, (2) os *loci* estudados podem não ter sido suficientes para identificar a similaridade do citótipo triploide, (3) a eliminação de sequências pode ter favorecido a identificação de maior semelhança entre aneuploide e diploides uma vez que a ocorrência de aneuploidia está frequentemente vinculada à eliminação de sequências haploides (MAHESHWARI et al., 2015).

Para a origem do hexaploide há três hipóteses: (1) duplicação de um acesso triploide, (2) cruzamento envolvendo gametas não reduzidos oriundos de acessos diploide e tetraploide ou (3) junção de um gameta não reduzido com um gameta reduzido ambos de um acesso tetraploide (Figura 9A). A similaridade genética do acesso hexaploide com os acessos tetraploides sugere a possibilidade de origem do mesmo envolvendo acessos tetraploides (Figura 9B). Indiretamente os diploides também teriam contribuição para a origem do hexaploide uma vez que os tetraploides teriam sua origem também vinculada a este nível de ploidia.

6. CONCLUSÕES

Embora *Lippia alba* seja uma espécie de grande interesse medicinal e promissora do ponto de vista econômico em função da natureza de seus óleos essenciais, o uso da espécie encontra-se ainda limitado ao cultivo doméstico e poucos são os registros de plantios comerciais da espécie. Ao mesmo tempo, muito pouco se sabe sobre a origem da grande variação fenotípica existente na espécie.

Um passo importante para elucidar essas questões envolve o conhecimento da variação genética existente e da relação existente entre os diversos citótipos recentemente descritos.

No presente trabalho, o uso de marcadores do tipo microssatélites abriu novas perspectivas para a compreensão da evolução biológica e também para o uso comercial da espécie.

A avaliação da distância e da estrutura genética entre os acessos de *L. alba* permitiu verificar a eficiência dos *primers* descritos na literatura para *L. alba* e espécies próximas.

O desenvolvimento de novos *primers* utilizando o sequenciamento paralelo em massa para *Lippia alba* demonstrou ser uma técnica rápida e muito eficiente permitindo a identificação de novos *loci* e a maior discriminação dos acessos estudados.

A associação dos dados de diversidade genética com as quantidades de DNA permitiu evidenciar grupos que estejam possivelmente relacionados com a origem dos acessos.

Os valores relativamente altos de similaridade observados evidenciam a estreita base genética entre os acessos estudados e contribuem para ratificar a hipótese de autopoliploidia.

Os acessos diploides parecem ser a base de origem dos demais citótipos.

7. REFERÊNCIAS

ALBERT, V. A.; BARBAZUK W. B. D.; EPAMPHILIS C. W.; DER J. P.; LEEBENSMACK J.; MA H.; PALMER J. D. 2013. The *Amborella* genome and the evolution of flowering plants. **Science** **342**: 1241089.

ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; HERNÁNDEZ, M.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. 2012. Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on 4x x 2x sexual hybridisations. **Tree Genetics & Genomes**, **8(6)**: 1293-1306.

ANDREAKIS, N.; KOOISTRA, W. H.; PROCACCINI, G. 2009. High genetic diversity and connectivity in the polyploid invasive seaweed *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniales) in the Mediterranean, explored with microsatellite alleles and multilocus genotypes. **Molecular Ecology**, **18(2)**: 212-226.

ASSOUMANE, A.; ZOUBEIROU, A. M.; RODIER-GOUD, M.; FAVREAU, B.; BEZANÇON, G.; VERHAEGEN, D. 2013. Highlighting the occurrence of tetraploidy in *Acacia senegal* (L.) Willd. and genetic variation patterns in its natural range revealed by DNA microsatellite markers. **Tree Genetics & Genomes**, **9(1)**: 93-106.

BENNETT, M.D. 1985. Intraspecific variation in DNA amount and the nucleotypic dimension in plant genetics. In: Freeling M ed. **Plant Genetics. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology**, New York: Alan R Liss Inc.; 283–302.

BERTIOLI, D.J.; OZIAS-AKINS, P.; CHU, Y.; DANTAS, K.M.; SANTOS, S.P.; GOUVEA, E.; MORETZSOHN, M. C. 2014. The Use of SNP Markers for Linkage Mapping in Diploid and Tetraploid Peanuts. G3: **Genes| Genomes| Genetics**, **4(1)**: 89-96.

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

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

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

BRETAGNOLLE, F.; THOMPSON, J.D. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. **New Phytologist** **129**: 1–22.

BROCHMANN, C.; BRYSTING, A. K.; ALSOS, I. G.; BORGEN, L.; GRUNDT, H. H.; SCHEEN, A. C.; ELVEN, R.. 2004. Polyploidy in arctic plants. **Biological Journal of the Linnean Society** **82**: 521 – 536.

BRUVO, R.; MICHIELS, N. K.; D'SOUZA, T. G.; SCHULENBURG, H. 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. **Molecular Ecology**, **13(7)**: 2101-2106.

CELIK, I.; GULTEKIN, V.; ALLMER, J.; DOGANLAR, S.; FRARY, A. 2014. Development of genomic simple sequence repeat markers in opium poppy by next-generation sequencing. **Molecular breeding**, **34(2)**: 323-334.

COMAI, L. 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. **Plant molecular biology**, **43(2-3)**: 387-399.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A.; ANDRADE, C.H.S.; e MACHADO, A.I.L. 1981. Essential Oils from Brazilian Verbenaceae. Genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, **44**: 598–601.

CSENSICS, D.S.; BRODBECK, AND HOLDEREGGER, R. 2010. Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered dwarf bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. **Journal of Heredity** **101**: 789-793.

DE WET, J.M.J. 1980. Origins of Polyploids. In: Lewis, W.H. Polyploidy: Biological Relevance. **New York: Plenum.**: 3 -15.

DELMAS, C.E.L.; AND LHUILLIER, A.; PORNON, AND ESCARAVAGE N. 2011. Isolation and characterization of microsatellite *loci* in *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) using pyrosequencing technology. **American Journal of Botany** **98**: 120-122 .

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

DÍEZ, C.M.; GAUT, B.S.; MECA, E.; SCHEINVAR, E.; MONTES-HERNANDEZ, S.; EGUIARTE, L. E.; TENAILLON, M.I. 2013. Genome size variation in wild and cultivated maize along altitudinal gradients. **New Phytologist**, **199(1)**: 264-276.

EKBLOM, R.; GALINDO, J. 2011. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. **Heredity** **107**: 1-15

FATEMI, M.; GROSS, C.L. 2008. Development and characterization of microsatellite markers for *Lippia* (*Phyla canescens*: Verbenaceae). **Molecular ecology resources**, **8 (6)**: 1338-1339.

FEHLBERG, S.D.; FERGUSON, C.J. 2012. Intraspecific cytotypic variation and complicated genetic structure in the *Phlox amabilis*-*P. woodhousei* (Polemoniaceae) complex. **American Journal of Botany**, **99(5)**: 865–74. doi:10.3732/ajb.1100540

FELBER, F. 1991. Establishment of a tetraploid cytotype in a diploid population: effect of relative fitness of the cytotypes. **Journal of Evolutionary Biology** **4**: 195–207

FOWLER, N.L.; LEVIN, D.L. 1984. Ecological constraints on the establishment of a novel polyploid in competition with its diploid progenitor. **The American Naturalist** **124**: 703–711.

FURUTA, Y.; NISHIKAWA, K.; MAKINO, T. 1975. Intraspecific variation in nuclear DNA content in *Aegilops squarrosa*. **Japanese Journal of Genetics**, **50**: 257–263.

GHAFFARI, S.; HASNAOUI, N. 2013. Microsatellite Amplification in Plants: Optimization Procedure of Major PCR Components. **Microsatellites. Humana Press.**: 139-146.

GRANT, V. 1981. Plant Speciation. **New York: Columbia University Press.**:435

GREGORY, T.R. 2005. The Evolution of the Genome. **Dana Dreibelbis.**: 4–731

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics *Software* Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica** **4(1)**: 9pp.

HANUŠOVÁ, K.; EKRT, L.; VÍT, P.; KOLÁŘ, F.; URFUS, T. 2014. Continuous morphological variation correlated with genome size indicates frequent introgressive hybridization among *Diphasiastrum* species (Lycopodiaceae) in **Central Europe. PloS one**, **9(6)**: e99552.

HEILBORN, O. 1932. Aneuploidy and polyploidy in *Carer*. **Svensk Botanisk Tidskrift**. **26**: 137-146

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

HENRY, I. M.; DILKES, B. P.; YOUNG, K.; WATSON, B.; WU, H.; COMAI, L. 2005. Aneuploidy and genetic variation in the *Arabidopsis thaliana* triploid response. **Genetics**, **170(4)**: 1979-1988.

HUANG, H.; TONG, Y.; ZHANG, Q.J.; GAO, L.Z. 2013. Genome size variation among and within *Camellia* species by using flow cytometric analysis. **PloS one**, **8(5)**: e64981.

HUSBAND, B. C.; BALDWIN, S. J.; SUDA, J. 2013. The incidence of polyploidy in natural plant populations: Major patterns and evolutionary processes . In LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEŽEL, J.; WENDEL, J. F. [eds.], Plant genome diversity, vol. 2, Physical structure, behavior and evolution of plant genomes.. **Springer**: 255–276.

- JIANG, F.F.; WANG, Z.W.; ZHOU, L.; JIANG, L.; ZHANG, X. J.; APALIKOVA, O. V.; GUI, J. F. 2013. High male incidence and evolutionary implications of triploid form in northeast Asia *Carassius auratus* complex. **Molecular phylogenetics and evolution**, **66(1)**: 350-359.
- JIAO, Y.; WICKETT, N. J.; YYAMPALAYAM, S. A.; CHANDERBALI, A. S.; LANDHERR, L.; RALPH P, E.; TOMSHO, L. P.; et al . 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. **Nature**, **473**: 97 – 100.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, S.C.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. 2002. Plant systematics. A phylogenetic approach. 2. Ed. **Siauer Associates**: 419.
- JUN, T.; MICHEL, A.P.; MIAN, M.A.R. 2011. Development of soybean aphid genomic SSR markers using next generation sequencing. **Genome**, **54**: 360–367. doi:10.1139/G11-002
- JUSTY, F.; MAURICE, S. 2012. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for the invasive *Senecio inaequidens* (Asteraceae). **Conservation Genetics Resources**, **4(3)**: 703-705.
- KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica** **177**: 309–334.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular ecology**, **16(5)**: 1099-1106.
- KAO, R. H. 2007. Asexuality and the coexistence of cytotypes. **New Phytologist**, **175(4)**: 764-772.
- KUROKOCHI, H.; TAN, E.; ASAKAWA, S.; SAITO, Y.; IDE, Y. 2014. Development of 16 microsatellite markers in *Eusideroxylon zwageri* by next-generation sequencing. **Conservation genetics resources**, **6(3)**: 593-595.
- LEITCH, A.R.; LEITCH, I.J. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. **Science**, **320(5875)**: 481-483.
- LEVIN, D.A. 1975. Minority cytotype exclusion in local plant populations. **Taxon** **24**: 35–43.
- LEWIS, W.H. 1980b. Polyploidy: Biological Relevance. **New York: Plenum. P.:** 241-267.
- LO, E. Y.; STEFANOVIĆ, S.; DICKINSON, T. A. 2009. Population genetic structure of diploid sexual and polyploid apomictic hawthorns (*Crataegus*; Rosaceae) in the Pacific Northwest. **Molecular Ecology**, **18(6)**: 1145-1160.
- LÓPEZ-PUJOL, J.O.R.D.I.; ORELLANA, M.R.; BOSCH, M.; SIMON, J.; BLANCHE, C. 2007. Low genetic diversity and allozymic evidence for

- autopolyploidy in the tetraploid Pyrenean endemic larkspur *Delphinium montanum* (Ranunculaceae). **Botanical journal of the Linnean Society**, **155(2)**: 211-222.
- LU, F.; LIPKA, A.E.; GLAUBITZ, J.; ELSHIRE, R.; CHERNEY, J.H.; CASLER, M.D.; COSTICH, D.E. 2013. Switchgrass genomic diversity, ploidy, and evolution: novel insights from a network-based SNP discovery protocol. **PLoS genetics**, **9(1)**: e1003215.
- MA, X.F.; GUSTAFSON, J. P. 2005. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. **Cytogenetic and genome research**, **109(1-3)**: 236–49.
- MABLE, B. K. 2004 . Why polyploidy is rarer in animals than in plants: Myths and mechanisms. **Biological Journal of the Linnean Society** **82**: 453 – 466.
- MAHESHWARI, S.; TAN, E. H.; WEST, A.; FRANKLIN, F. C. H.; COMAI, L.; CHAN, S. W. 2015. Naturally Occurring Differences in CENH3 Affect Chromosome Segregation in Zygotic Mitosis of Hybrids. **PLoS genetics**, **11(1)**: e1004970-e1004970.
- MAHY, G.; BRUEDERLE, L.P.; CONNORS, B.; VAN HOFWEGEN, M.; VORSA, N. 2000. Allozyme evidence for genetic autopolyploidy and high genetic diversity in tetraploid cranberry, *Vaccinium oxycoccos* (Ericaceae). **American Journal of Botany** **87**: 1882–1889.
- MARX, H.E.; O'LEARY, N.; YUAN, Y.W.; LU-IRVING, P.; TANK, D.C.; MÚLGURA, M.; OLMSTEAD, R.G. 2010. A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. **American Journal of Botany** **97(10)**: 1647–1663.
- MEYER, A.; VAN DE PEER, Y. 2005. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD) **BioEssays**. **27**: 937–945.
- MOGHE, G.D.; SHIU, S.H. 2014. The causes and molecular consequences of polyploidy in flowering plants. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1320(1)**: 16-34.
- MOGIE, M.; BRITTON, N. F.; STEWART-COX, J. A. 2007. Asexuality, polyploidy and the male function. n. In: HÖRANDL, E.; GROSSNIKLAUS, U.; VAN DIJK, P.J.; SHARBEL, T.F. **Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives**. Ruggell, Liechtenstein: A.R.G. Gantner Verlag, 195-214.
- MORI, K.; KANEKO, S.; ISAGI, Y.; MURAKAMI, N.; KATO, H. 2008. Isolation and characterization of 10 microsatellite *loci* in *Callicarpa subpubescens* (Verbenaceae), an endemic species of the Bonin Islands. **Molecular Ecology Resources**, **8(6)**: 1423-1425.
- MORTON, J.F. 1981. Atlas of medicinal plants of middle America. **Springfield, Mincis. USA**, **1**: 745-750.

MÜNZBERGOVÁ, Z.; SURINOVÁ, M.; CASTRO, S. 2013. Absence of gene flow between diploids and hexaploids of *Aster amellus* at multiple spatial scales. **Heredity**, **110(2)**: 123–30. doi:10.1038/hdy.2012.87

NEMORIN, A.; DAVID, J.; MALEDON, E.; NUDOL, E.; DALON, J.; ARNAU, G. 2013. Microsatellite and flow cytometry analysis to help understand the origin of *Dioscorea alata* polyploids. **Annals of Botany**, **112(5)**: 811-819.

OHTSUKI, T.; SHODA, T.; KANEKO, Y.; SETOGUCHI, H. 2014. Development of Microsatellite Markers for *Vitex rotundifolia* (Verbenaceae), an Endangered Coastal Plant in Lake Biwa, Japan. **Applications in Plant Sciences**, **2(4)**.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G.G.; SANTOS, S.S.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S.; LEITÃO, S.G. 2006. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, **108**: 103 -108.

OTTO, S.P.; WHITTON, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics** **34**: 401-437.

PAIRON, M.; JACQUEMART, A. L.; POTTER, D. 2008. Detection and characterization of genome-specific microsatellite markers in the allotetraploid *Prunus serotina*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, **133(3)**: 390-395.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ, M.D.; VILLAR, A. 2001a. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, **76 (3)**: 201-214.

PFEIFFER, T.; ROSCHANSKI, A.M.; PANNELL, J.R.; KORBECKA, G.; SCHNITTLER, M. 2011. Characterization of microsatellite *loci* and reliable genotyping in a polyploid plant, *Mercurialis perennis* (Euphorbiaceae). **The Journal of heredity**, **102(4)**: 479–88. doi:10.1093/jhered/esr024

PIERRE, P.M.O. 2004. Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) NE Br (Verbenaceae) **Doctoral Tesis, Universidade Federal de Lavras**.

PIERRE, P.M.O.; SOUSA, S.M.; DAVIDE, L.C.; MACHADO, M.A.; VICCINI, L.F. 2011. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Annals of Brazilian Academy of Science**. **83(3)**: 1-13.

PRICE, H.J.; KENTON, L.C.; e BACHMANN, K. 1981. Geographic and Ecological Distribution of Genomic DNA Content Variation in *Microseris douglasii* (Asteraceae). **Botanical Gazette - The University of Chicago Press** **142(3)**: 415–426.

PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. 2000a. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, **155**: 945–959.

- PRITCHARD, J. K., WEN X., FALUSH D. 2010. Documentation for structure software: Version 2.3.
- PRZYBYLA, A.; BEHREND, A.; BORNHAKE, C.; HOHE, A. 2014. Breeding of polyploid heather (*Calluna vulgaris*). **Euphytica**, **199(3)**: 273-282.
- QUANTUM, G. I. S., DEVELOPMENT TEAM. 2012. Quantum GIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. **Free Software Foundation, India**.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** **29**: 467–501.
- RAY, A.; QUADER, S. 2014. Genetic diversity and population structure of *Lantana camara* in India indicates multiple introductions and gene flow. **Plant Biology**.
- RAY, A.; SUMANGALA, R. C.; RAVIKANTH, G.; SHAANKER, R. U.; QUADER, S. 2012. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite *loci* from the invasive plant *Lantana camara* L. **Conservation Genetics Resources**, **4(1)**: 171-173.
- REHMAN, A.U.; MAILER, R.J.; BELAJ, A.; ROSA, R.; RAMAN, H. 2012. Microsatellite marker-based identification of mother plants for the reliable propagation of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in Australia. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, **87(6)**: 647-653.
- REIS, A.C.; SOUSA, S.M.; VALE, A.A.; PIERRE, P.M.O.; FRANCO, A.L.; CAMPOS, J.M.S.; VIEIRA, R.F.; VICCINI, L.F. 2014. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae): a new tropical autoploid complex? **American Journal of Botany**.; <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1400149>.
- ROCHA, D. S.; SANTOS, C. P.; BAJAY, M. M.; CAMPOS, J. B.; PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I. 2014. Development of a Novel Set of Microsatellite Markers for *Lippia alba* (Verbenaceae). **Genetics and Molecular Research****14(1)**: 971–974.
- RODRIGUEZ, D.J. 1996. A model for the establishment of polyploidy in plants. **The American Naturalist** **147**: 33–46.
- ROHLF, F.J.2000. NTSYS-Pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. **Manual Applied Biostatistics**, New York.
- RONSTED, N.; SYMONDS, M. R.; BIRKHOLM, T.; CHRISTENSEN, S. B.; MEEROW, A. W.; MOLANDER, M.; JÄGER, A. K. 2012. Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of Amaryllidaceae. **BMC evolutionary biology**, **12(1)**: 182.

SALIMENA, F. R. G.; MÚLGURA, M. E.; HARLEY, R. 2012. A new combination in Verbenaceae and a new synonym in Lamiaceae from Brazil. **Phytotaxa** **68**: 52–54.

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

SANCHEZ, P.L.; COSTICH, D.E.; FRIEBE, B.; COFFELT, T.A.; JENKS, M.A.; GORE, M.A. 2014. Genome size variation in guayule and mariola: Fundamental descriptors for polyploid plant taxa. **Industrial Crops and Products**, **54**: 1-5.

SANTOS, C. P.; ROCHA, D. S.; BAJAY, M. M.; SANTOS, F. R. C.; CAMPOS, J. B.; PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-MANN, R.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F. 2014. Cross-species transferability of microsatellite markers in the genus *Lippia*. **Genetics and Molecular Research**. **13(4)**: 9846–9850.

SANTOS, F.R.C.; LIMA, P.F.; PRIOLLI, R.H.G.; SIQUEIRA, W.J.; COLOMBO, C. 2012. Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci in *Lippia alba* (Verbenaceae). **American Journal of Botany**, **99(8)**: 301–3. doi:10.3732/ajb.1100578.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T. 2004. Poliploidia e seu Impacto na Origem e Evolução das Plantas. **Revista Brasileira de Agrociência** **10(2)**: 151–157.

SCHOCKEN, N. R. L. 2007. Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. Dissertação de mestrado em agricultura tropical e subtropical, área de melhoramento genético vegetal, Instituto Agrônomo de Campinas, PG IAC, 82f.

SHI, J.; DAI, X.; CHEN, Y.; CHEN, J.; SHI, J.; YIN, T. 2013. Discovery and experimental analysis of microsatellites in an oil woody plant *Camellia chekiangoleosa*. **Plant Systematics and Evolution**, **299(7)**: 1387-1393.

SOLTIS, D.E.; RIESEBERG, L.H. 1986. Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): genetic insights from enzyme electrophoresis. **American Journal of Botany** **73**: 310– 318.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. 1989. Genetic consequences of autopolyploidy in *Tolmiea* (Saxifragaceae). **Evolution** **43**: 586– 594.

SOLTIS, P.S. 2009. Polyploidy and Angiosperm Diversification. **American Journal of Botany**, **96(1)**, 336-348.

SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. 2000. The Role of Genetic and Genomic Attributes in The Success of Polyploids. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, **97(13)**: 7051–7.

STEBBINS, G.L. 1950. Variation and Evolution in Plants. **New York: Columbia University Press**.

STEBBINS, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, London.

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

TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H.R.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. 2005. 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.

TEIXEIRA, H.; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; NABAIS, C. 2014. Genetic Diversity and Differentiation of *Juniperus thurifera* in Spain and Morocco as Determined by SSR. **PloS one**, **9(2)**: e88996.

THODE, V.A.; BACKES, A.; MADER, G.; KRIEDT, R.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B. 2013. Development of Microsatellites for *Verbenoxylum reitzii* (Verbenaceae), a Tree Endemic to the Brazilian Atlantic Forest. **Applications in Plant Sciences**, **1(8)**.

THOMPSON, J.D.; LUMARET, R.; 1992. The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment, and persistence. **Trends Ecology Evolution (7)**: 302–307.

TRONCOSO, N.S. 1974. Los géneros de Verbenáceas de Sudamérica extratropical (Argentina, Chile, Bolivia, Paraguay, Uruguay y sur de Brasil). **Darwiniana** **18**: 295-407.

VAN DE PEER, Y.; MAERE, S.; MEYER, A. 2009b. The evolutionary significance of ancient genome duplications. **Nature Reviews Genetics** **10**: 725–732.

VAN DER PEER, Y. 2004. Computational Approaches to unveiling ancient genome duplications. **Nature Reviews Genetics**. **5**: 752-763.

VICCINI, L.F.; PIERRE, P.M.O.; PRAÇA, M.M.; DA COSTA, D.S.; DA COSTA, R.L.E.; SOUSA, S.M.; SALIMENA, F.G. 2005. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, **256(1-4)**: 171-178.

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

WAHL, A. 1940. Chromosomie numbers and meiosis in the genus *Carex*. **American Journal of Botany**. **27**.

WAYCOTT, M.; JONES, B.L.; VAN DIJK, J.K.; ROBSON, H.L.A.; CALLADINE, A. 2011. Microsatellite markers in the Australian desert plant, *Solanum centrale*

(Solanaceae). **American Journal of Botany**, **98(4)**: e81–3.
doi:10.3732/ajb.1000356

WOLF, D.E.; STEETS, J.A.; HOULISTON, G.J.; TAKEBAYASHI, N. 2014. Genome size variation and evolution in allotetraploid *Arabidopsis kamchatica* and its parents, *A. lyrata* and *A. halleri*. **AoB plants** **6**: plu025.

XU, Y.; ZHONG, L.; WU, X.; FANG, X.; WANG, J. 2009. Rapid alterations of gene expression and cytosine methylation in newly synthesized *Brassica napus* allopolyploids. **Planta**, **229(3)**: 471-483.

ZALAPA, J. E.; CUEVAS, H.; ZHU, H.; STEFFAN, S.; SENALIK, D.; ZELDIN, E.; SIMON, P. 2012. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) *loci* in the plant sciences. **American Journal of Botany**, **99(2)**: 193–208. doi:10.3732/ajb.1100394

ANEXO 1 - Voucher *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br.

BGEN01:48375; BGEN02:48374; BGEN03:48373; BGEN04:48372;
BGEN05:48371; BGEN06:48370; BGEN07:48386; BGEN08:48392;
BGEN09:48393; BGEN10:48391; BGEN11:48390; BGEN12:48389;
BGEN13:48400; BGEN14:48399; BGEN15:48394; BGEN16:48395;
BGEN18:48397; BGEN19:48398; BGEN20:48456; BGEN21:48458;
BGEN22:48459; BGEN23:48460; BGEN24:48462; BGEN25:48461;
BGEN26:48463; BGEN27:48464; BGEN28:48465; BGEN29:48466;
BGEN30:48467; BGEN31:48468; BGEN32:48472; BGEN33:48376;
BGEN34:48377; BGEN35:48379; BGEN36:48380; BGEN37:48381;
BGEN38:48382; BGEN41:63796; BGEN43:63799; BGEN45:63743;
BGEN46:63744; BGEN47:63745; BGEN48:63746; BGEN49:63747;
BGEN50:63793; BGEN51:63748; BGEN52:63749; BGEN53:63750;
BGEN55:63769; BGEN56:63755; BGEN57:63751; BGEN58:63752;
BGEN59:63753; BGEN60:63798; BGEN61:63754; BGEN62:63756;
BGEN63:63757; BGEN64:63758; BGEN65:63759; BGEN66:63760;
BGEN67:63761; BGEN68:63762; BGEN69:63763; BGEN70:63764;
BGEN71:63765; BGEN72:63766; BGEN73:63767; BGEN74:63768;
BGEN76:63771; BGEN77:63772; BGEN78:63773; BGEN80:63774;
BGEN81:63775; BGEN82:63794; BGEN83:63776; BGEN84:63777;
BGEN85:63778; BGEN86:63779; BGEN87:63780; BGEN88:63781;
BGEN89:63782; BGEN90:63783; BGEN91:63784; BGEN94:63787;
BGEN95:63791; BGEN96:62382; BGEN97:63788; BGEN98:63789;
BGEN99:63790; BGEN100:63792; BGEN101:63800; BGEN102:63801;
BGEN103:63802; BGEN104:63803.