

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

Luiza Maria Carvalho Almeida Nogueira

Estabilidade genética, perfil de óleo essencial e morfologia em poliploides sintéticos de
***Lippia alba* (Mill) N. E. Brown (Verbenaceae)**

Juiz de Fora

2025

Luiza Maria Carvalho Almeida Nogueira

Estabilidade genética, perfil de óleo essencial e morfologia em poliploides sintéticos de
Lippia alba (Mill) N. E. Brown (Verbenaceae)

Dissertação apresentada ao Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Juiz de Fora como
requisito parcial à obtenção de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Coorientador: Me. Juliana Tatiara da Costa Siqueira

Juiz de Fora

2025

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

Carvalho Almeida Nogueira, Luiza Maria.

Estabilidade genética, perfil de óleo essencial e morfologia em
poliploides sintéticos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown (Verbenaceae)
/ Luiza Maria Carvalho Almeida Nogueira. -- 2025.

47 p.

Orientador: Lyderson Facio Viccini

Coorientadora: Juliana Tatiara da Costa Siqueira

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2025.

1. Poliploidia. 2. Evolução. 3. Colchicina. I. Facio Viccini,
Lyderson, orient. II. Tatiara da Costa Siqueira, Juliana, coorient. III.
Título.

Luiza Maria Carvalho Almeida Nogueira

**Estabilidade genética, perfil de óleo essencial e morfologia em poliploides sintéticos de
Lippia alba (Mill) N. E. Brown (Verbenaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de Juiz de Fora como
requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada em 20 de março de 2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **LYDERSON FACIO VICCINI**
Data: 20/03/2025 16:55:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Lyderson Facio Viccini - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Documento assinado digitalmente
 **SAULO MARÇAL DE SOUSA**
Data: 20/03/2025 17:58:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Saulo Marçal de Sousa

Universidade Federal de Juiz de Fora

Documento assinado digitalmente
 **ELYABE MONTEIRO DE MATOS**
Data: 21/03/2025 10:15:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Elyabe Monteiro de Matos

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esse trabalho às duas mulheres que
sempre serviram de exemplo na minha vida.

À Dona Márcia e Carolina, com muito amor.

AGRADECIMENTOS

À minha amada mãe, Márcia de Carvalho Almeida, por ser o maior exemplo de força e resiliência que eu poderia ter. E por todo o amor e carinho com que me criou. Sou quem sou hoje graças a você.

Ao meu querido pai, José Roberto Nogueira, por sempre acreditar em mim e me incentivar. Seu amor e fé inabalável em suas filhas sempre nos deram forças.

À minha querida irmã, Carolina Carvalho Almeida Nogueira, pelo companheirismo de uma vida toda. Sei que sempre posso contar com você, e espero que você saiba o mesmo.

Aos meus demais familiares, que acreditaram e torceram por mim ao longo desses anos— em especial, à Marlene, Marilene e Kátia, por estarem sempre presentes quando precisei.

Ao meu companheiro, Ian Maldonado, por todo o amor e apoio que compartilhamos nesses últimos anos.

A todos os meus amigos de laboratório, por toda a ajuda, e por tornarem os meus dias mais alegres. O tão esperado momento do café sempre deixava tudo mais leve. Em especial, agradeço ao Moisés e ao Elyabe, pela paciência, apoio e carinho que me ofereceram ao longo desses anos.

À minha coorientadora e amiga, Juliana Tatiara da Costa Siqueira, por ter me ensinado tanto, e por todo o companheirismo durante esse processo. Também não teria sido capaz de concluir este trabalho sem você.

Ao meu orientador, professor Lyderson Facio Viccini, por me acompanhar com dedicação ao longo dos anos. Sua paciência, apoio e ensinamentos foram fundamentais para que eu pudesse concluir esta etapa com confiança e amadurecimento.

Aos demais professores e colaboradores do Laboratório de Genética e do Departamento de Genética da UFJF, que auxiliaram durante o desenvolvimento desse projeto.

Também agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora e à Coordenação de Ciências Biológicas pela oportunidade de conclusão desta etapa. E à CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento concedido para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A poliploidia é considerada um dos principais mecanismos relacionados à evolução e especiação em plantas. Sua presença está muitas vezes associada ao sucesso evolutivo desses indivíduos. *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) é uma espécie de interesse medicinal amplamente distribuída por toda a América do Sul. Estudos anteriores revelaram que essa espécie constitui um complexo poliploide com cinco números cromossômicos distintos, sendo assim um interessante modelo tropical poliploide para estudos envolvendo evolução de plantas. A poliploidia sintética possibilita maior entendimento dos processos biológicos relacionados à poliploidização. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi induzir a poliploidia em acessos diploides ($2x=30$) e triploides ($3x=45$) de *L. alba*, avaliar a estabilidade genética dos poliploides obtidos ao longo do tempo e analisar as diferenças morfológicas e na composição do óleo essencial entre os acessos. Primeiro, foi realizado um experimento piloto, testando 5 concentrações e 2 tempos de exposição diferentes para a colchicina – a partir dele, foram selecionados 1 concentração e 2 tempos de exposição para os próximos experimentos. Neles, 100 explantes foram expostos *in vitro* à colchicina na concentração 0,2% por 4 e 6 horas. Para avaliar a taxa de sobrevivência, foram realizadas análises a partir do 20º dia após a exposição, as quais se repetiram a cada 10 dias até completar 60 dias. Ao final desse período, foram estimadas as quantidades de DNA por meio da citometria de fluxo para a verificação do nível de ploidia. Além disso, o nível de ploidia foi avaliado a cada 30 dias para acompanhamento da estabilidade genética dessas plantas. Em todos os acessos, houve diferença significativa na taxa de sobrevivência dos tratamentos em relação ao grupo controle. Ao final do experimento, os acessos diploides foram responsáveis pela maior geração de mixoploides e poliploides. O único hexaploide adquirido passou por quedas na sua quantidade de DNA, ao longo do tempo, apresentando-se como mixoploide após 90 dias, e assim se mantendo até a última análise realizada. Para os acessos tetraploides e mixoploides sintéticos sobreviventes, a exposição à colchicina não gerou resultados significativos, apenas nas medidas de raiz, caule e área foliar. Com relação ao perfil do óleo essencial, os padrões observados nos poliploides sintéticos foram os mesmos já reportados em outros estudos sobre a espécie, com triploides apresentando maior composição de linalol e diploides e tetraploides, maiores quantidades de citral. Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para a melhor compreensão do processo de indução de poliploidia para a espécie *Lippia alba*, assim como para otimizar o protocolo de indução de materiais sintéticos. Além disso, os poliploides e mixoploides gerados serão de grande valia para estudos comparativos entre ploidias e que visam entender a evolução do genoma na espécie.

Palavras-chave: citometria de fluxo, indução de poliploidia, evolução.

ABSTRACT

Polyploidy is considered to be one of the main mechanisms related to evolution and speciation in plants. Its presence is often associated with the evolutionary success of these individuals. *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) is a species of medicinal plant that is widely distributed throughout South America. Previous studies have revealed that this species constitutes a polyploid complex with five distinct chromosome numbers, making it an interesting tropical polyploid model for studies involving plant evolution. Synthetic polyploidy provides a better understanding of the biological processes related to polyploidization. The aim of this study was to induce polyploidy in diploid ($2x=30$) and triploid ($3x=45$) accessions of *L. alba*, to evaluate the genetic stability of the polyploids obtained over time and analyze the morphological differences between these accessions. First, a pilot experiment was carried out, testing 5 concentrations and 2 different exposure times for colchicine - from this, 1 concentration and 2 exposure times were selected for the next experiments. In these experiments, 100 explants were exposed *in vitro* to colchicine at a concentration of 0.2% for 4 and 6 hours. To assess the survival rate, analyses were carried out from the 20th day after exposure and repeated every 10 days until 60 days had elapsed. At the end of this period, the amounts of DNA were estimated via flow cytometry to check the level of ploidy. In addition, the ploidy level was assessed every 30 days to monitor the genetic stability of these plants. In all the accessions, there was a significant difference in the survival rate of the treatments compared to the control group. At the end of the experiment, the diploid accessions were responsible for the largest generation of mixoploids and polyploids. The only acquired hexaploid experienced a drop in its DNA quantity over time, presenting itself as a mixoploid after 90 days and remaining so until the last analysis. For the surviving tetraploid and synthetic mixoploid accessions, exposure to colchicine did not generate significant results for all the morphological parameters evaluated, only in the measurements of root, stem and leaf area. With regard to the essential oil profile, the patterns observed in the synthetic polyploids were the same as those already reported in other studies on the species, with triploids showing a higher composition of linalool and diploids and tetraploids higher amounts of citral. The results obtained in this study contributed to a better understanding of the process of inducing polyploidy in the *Lippia alba* species, as well as to optimizing the protocol for inducing synthetic materials. In addition, the polyploids and mixoploids generated will be of great value for comparative studies between ploidies and for understanding the evolution of the genome in the species.

Keywords: flow cytometry, polyploidy induction, evolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação gráfica do processo de indução de autopoliploides <i>in vitro</i>	17
Figura 2	– Taxa de sobrevivência ao longo de 60 dias de acesso diploide (BGEN-48) de <i>Lippia alba</i>	21
Figura 3A	– Taxa de sobrevivência ao longo de 60 dias do acesso BGEN-29 de <i>Lippia alba</i>	22
	– Taxa de sobrevivência ao longo de 60 dias do acesso BGEN-33 de <i>Lippia alba</i>	22
Figura 4	– Taxa de sobrevivência ao longo de 60 dias de acesso triploide de <i>Lippia alba</i> (BGEN-59).....	23
Figura 5A	– Histogramas representativos da quantidade de DNA da planta mixoploide após 40 dias da indução de duplicação em plantas triploides (BGEN-59)....	24
Figura 5B	– Histogramas representativos da quantidade de DNA planta hexaploide sintética após 40 dias da indução de duplicação em plantas triploides (BGEN-59)	24
Figura 6A	– Histogramas obtidos por citometria de fluxo da planta mixoploide após 90 dias da indução de duplicação em plantas triploides (BGEN-59)	25
Figura 6B	– Histogramas obtidos por citometria de fluxo da planta hexaploide sintética após 90 dias da indução de duplicação em plantas triploides (BGEN-59)	25
Figura 7A	– Processo de aclimatização de plantas sintéticas de <i>Lippia alba</i> : durante a última fase do processo de aclimatização, ainda cobertas pelos sacos plásticos.....	25
Figura 7B	– Processo de aclimatização de plantas sintéticas de <i>Lippia alba</i> : indivíduos já aclimatizados.....	25

Figura 8A	–	Histograma representando o número de nós no acesso natural da BGEN-33 e os acessos 92M, 51, 69 e 97, obtidos através do tratamento com colchicina.....26
Figura 8B	–	Histogramas representando o número de folhas do acesso natural da BGEN-33 e os acessos 92M, 51, 69 e 97, obtidos através do tratamento com colchicina.26
Figura 9	–	Comprimento do caule do acesso natural da BGEN-33 e dos acessos sintéticos 92M, 51, 69 e 97 obtidos através do tratamento com colchicina.27
Figura 10	–	Comparação entre o comprimento da raiz do acesso natural da BGEN-33 e os acessos 92M, 51, 69 e 97 obtidos através do tratamento com colchicina.....27
Figura 11	–	Comparação entre área foliar do acesso natural da BGEN-33 e os acessos 92M, 51, 69 e 97 obtidos através do tratamento com colchicina.....28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil do óleo essencial de acessos diploides naturais e de mixoploides e tetraploides sintéticos de <i>Lippia alba</i>	29
----------	---	----

Tabela 2	Perfil do óleo essencial de acessos triploides naturais e de mixoploides sintéticos de <i>Lippia alba</i>	30
----------	---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Lippia alba	12
1.2 Poliploidia: origens, classificação e efeitos	13
1.3 Poliploidia sintética	15
2 MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1 Material Vegetal e Propagação <i>in vitro</i>	18
2.2 Indução da duplicação genômica	18
2.3 Determinação do nível de ploidia e quantidade de DNA	19
2.4 Aclimatização dos poliploides e mixoploides gerados.....	19
2.5 Avaliação Morfológica	19
2.6 Microextração do óleo essencial	20
2.7 Análise estatística	20
3 RESULTADOS	21
3.1 Taxa de sobrevivência e obtenção de poliploides sintéticos.....	21
3.2 Estabilidade genética dos poliploides sintéticos recém formados	24
3.3 Aclimatização dos poliploides e mixoploides gerados.....	25
3.4 Avaliação Morfológica	26
3.5 Perfil do óleo essencial	28
4 DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÃO	36
6 REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Lippia alba*

Lippia alba (Mill) N. E. Brown, conhecida principalmente como erva-cidreira-brasileira, alecrim-do-campo, melissa ou falsa melissa, é uma espécie arbustiva e aromática pertencente à família Verbenaceae (SALIMENA; MÚLGURA; HARLEY, 2012). O gênero *Lippia* apresenta poucos exemplares no Hemisfério Norte (BARROSO, 1991) e possui o Brasil como um dos países com maior concentração de espécies (SALIMENA, 2002; CAMPOS et al., 2011; O'LEARY et al., 2012). Quanto à sua morfologia, *Lippia alba* pode alcançar até os 2 metros de altura; possui ramos finos, esbranquiçados e quebradiços; folhas pecioladas e opostas, de borda serrada e ápice agudo. Suas flores podem ser azuis-arroxeadas e são reunidas em inflorescências axilares capituliformes de eixo curto (MATOS, 1998) e seus frutos são do tipo drupa.

A importância do estudo de exemplares de *Lippia alba* se deve às diversas atividades fitoterápicas comprovadas em estudos pré-clínicos com a espécie (HEINZMANN e BARROS, 2007). A planta é popularmente conhecida por seus componentes medicinais e farmacológicos. Seus atributos terapêuticos são capazes de desencadear propriedades calmantes e sedativas e estão concentrados principalmente em suas folhas, que são muito utilizadas nas formas de chás, compressas, banhos, inalações, extratos, entre outros (SANTOS FILHO et al., 2023).

Uma de suas principais características diz respeito ao seu aroma, resultante de seus constituintes relacionados aos óleos essenciais. Esses óleos podem variar conforme as estações do ano, época de floração, tempo de vida da planta, quantidade de água circulante resultante da precipitação, fatores geográficos e climáticos (CORRÊA, 1992; MATOS, 1998; TAVARES et al., 2005). Foram encontrados uma série de quimiotipos, que receberam designações de acordo com os componentes encontrados de maneira predominante em sua composição, sendo esses: mirceno-citral (quimiotipo 1), limoneno-citral (quimiotipo 2) e limoneno-carvona (quimiotipo 3) (MATTOS, 1996). De acordo com Viccini et al. (2014), existe uma associação entre essa variação no perfil de seu óleo essencial e a diversidade de números cromossômicos encontrados na espécie. Diploides e tetraploides apresentaram o citral como o componente principal enquanto que os triploides apresentaram maior presença de linalol.

Lippia alba é caracterizada por ser um complexo autopoliploide envolvendo pelo menos quatro níveis de ploidias: diploide ($2n=2x=30$), triploide ($2n=3x=45$), tetraploide ($2n=4x=60$)

e hexaploide ($2n=6x=90$) (VICCINI et al., 2014; REIS et al., 2014; 2022), que são distribuídos por todas as regiões brasileiras (LOPES et al., 2020). Sua grande variação morfológica e metabólica é associada com essa diversidade no número cromossômico. Mudanças fenotípicas observadas em poliploides naturais, como a previamente descrita, despertam o interesse para o estudo de poliploides sintéticos, a fim de buscar uma maior compreensão do comportamento de seus processos biológicos relacionados à poliploidização, além de sua maior aptidão morfológica e fisiológica em relação aos seus diploides naturais (CUI et al., 2017; SALMA et al., 2017; WEI et al., 2018).

1.2 Poliploidia: origens, classificação e efeitos

Poliploidia é definida como sendo a presença de três ou mais conjuntos de cromossomos no núcleo de um organismo (SANDERS, 2014). Na história evolutiva das plantas, a duplicação de todo o genoma é considerada um dos principais mecanismos de especiação (COYNE & ORR, 2004; BARKER, 2016), sendo que estudos já confirmaram que todas as angiospermas são paleopoliploides, tendo passado por um ou mais eventos ancestrais de poliploidização ao longo do tempo (SPOELHOF et al., 2017; JIAO et al., 2011).

Por muito tempo não se sabia da importância desses eventos ancestrais de duplicação para a evolução das plantas. Foi apenas com o avanço da genômica que foi possível obter evidências conclusivas sobre essas ocorrências (WOLFE & SHIELDS, 1997). Através de análises filogenéticas, Jiao et al. (2011) identificaram dois eventos ancestrais de duplicação genômica que teriam acontecido por volta de 319 e 192 milhões de anos atrás, pouco antes da diversificação das plantas com sementes e das plantas com flores, respectivamente. Também foi descoberta a repetitiva associação entre poliploidização e períodos de grande alteração climática ou extinção em massa na história (VAN DE PEER et al., 2017; NOVIKOVA et al., 2018; CAI et al., 2019; KOENEN et al., 2020; WU et al., 2020). Muitas das plantas em floração conseguiram resistir à extinção no Cretáceo – Terciário, por exemplo, em consequência das vantagens adaptativas proporcionadas por seu genoma duplicado (FAWCETT et al., 2009). Condições estressantes, como aumento de temperatura ou restrições hídricas também podem ser as indutoras de eventos meióticos que resultam na produção de gametas não reduzidos – ou seja, são também fatores que estimulam a poliploidização dos indivíduos.

A poliploidização pode ocorrer na natureza através da duplicação de células somáticas ou pela fusão de gametas não reduzidos, sendo essa última a via mais comum para a formação

de poliploides (SOLTIS et al., 2009; SATTLER et al., 2016; FOX et al., 2020). Gametas não reduzidos são gerados a partir de processos meióticos anormais, em que não ocorre a separação dos cromossomos, ou seja, em que são produzidos gametas com o dobro da quantidade de DNA esperada (MASON & PIRES, 2015). Esse gameta não reduzido pode então fecundar um gameta normal (poliploidização unilateral), gerando um indivíduo triploide, ou outro gameta não reduzido (poliploidização bilateral), resultando em um tetraploide (SATTLER et al., 2016; GUERRA, M., 2020).

Os poliploides também podem ser divididos em duas categorias: alopoliploides e autopoliploides (SANDERS, 2014). Plantas derivadas de hibridização entre duas espécies são chamadas de alopoliploides. Já os poliploides resultantes de duplicação dentro de uma mesma espécie são classificados como autopoliploides (SPOELHOF et al., 2017). A aloploidia foi, por muito tempo, considerada a forma mais comum de poliploidização, principalmente por resultar, teoricamente, em maior diferenciação taxonômica quando os poliploides são comparados com seus genitores (SATTLER et al., 2016). Por outro lado, os autopoliploides eram vistos como menos férteis e, conseqüentemente, menos capazes de estabelecer populações viáveis (IANNICELLI et al., 2020). No entanto, à medida que mais estudos são realizados, verifica-se que esse panorama resulta, em grande parte, da escassez de pesquisas focadas em autopoliploides, e que os efeitos gerados diretamente pela duplicação do genoma também podem conferir vantagens adaptativas (VAN DE PEER et al., 2017).

Estudos realizados nas últimas décadas indicam que a duplicação completa do genoma pode resultar em diversos efeitos posteriores que afetam o valor adaptativo dos poliploides, como mudanças na expressão gênica, tamanho celular, remodelamento epigenético, e respostas alteradas para o estresse (FOX et al., 2020). Também existem alterações negativas, como instabilidade genômica e anormalidades na mitose e meiose (MASON & WENDELL, 2020). No entanto, nas plantas, essas limitações reprodutivas podem ser atenuadas através, por exemplo, da transição para a autofecundação ou para a reprodução assexuada (brotamento) (COMAI, 2005), permitindo que os poliploides superem o desafio de serem os citótipos minoritários e consigam, ainda assim, se multiplicar no ambiente (VAN DE PEER et al, 2017).

A maioria das explicações para o sucesso evolutivo dos poliploides está no aumento da diversidade genética, que são modelados por expressão gênica e epigenética. Muitos dos genes duplicados podem ser silenciados ao longo do tempo. Porém, alguns podem ser mantidos, produzindo novas funções (neofuncionalização) ou funções mais específicas

(subfuncionalização) (SPOELHOF et al., 2017). Aumentos na variação gênica podem resultar em diversas alterações morfológicas, fisiológicas e ecológicas nas plantas. Por exemplo, já foram registradas diversas alterações no metabolismo secundário das plantas devido a poliploidização (ZHANG et al., 2010; ZAHEDI et al., VICCINI et al., 2014; SADAT NOORI et al., 2017; SANAEI-HOVEIDA et al., 2024), o que por sua vez podem resultar em consequências nas interações ecológicas dessas espécies, como resistência à herbivoria ou a patógenos (VAN DE PEER et al. 2017). Esses eventos de duplicação também são, por muitas vezes, associados à resistência ao estresse em plantas – o que abre perspectivas de estudo interessantes para o melhoramento vegetal, através da indução da duplicação genômica (Van de Peer et al., 2021).

1.3 Poliploidia sintética

Considerando esses fatores, a indução da poliploidia se estabelece como uma ferramenta importante para o melhoramento de plantas. A formação de poliploides pode ser feita através de poliploidização sexual ou duplicação somática (SATTTLER et al., 2016). A poliploidização sexual é baseada na fusão de gametas não reduzidos; podendo ser unilateral, quando apenas uma das células é não reduzida, ou bilateral, se as duas forem (PALUMBO et al., 2024). Já a poliploidização somática (Figura 1), ou mitótica, consiste na indução de duplicação cromossômica nos tecidos somáticos (MADANI et al., 2021). Antes da descoberta da colchicina (BLAKESLEE & AVERY, 1937), esse processo era estimulado através da exposição das plantas a altas temperaturas (SATTTLER et al., 2016; DORSEY, 1936; RANDOLPH, 1932). Porém, foi apenas com a aplicação de antimitóticos que foi possível se avançar nos estudos da autopoliploidia sintética.

O ciclo celular das plantas é dividido nas fases G1 (interfase pós-mitose), S (síntese de DNA), G2 (interfase pré-mitose) e M (mitose) (FRANCIS, 2007). Agentes antimitóticos são compostos que interferem na divisão celular, e possuem grande importância na poliploidização quando são capazes de interferir entre a fase S e o início da citocinese, nos estágios finais da mitose (DHOOGHE et al., 2011). A colchicina, primeiro dos antimitóticos descobertos e que se mantém como um dos mais usados até os dias de hoje (GANTAIT & MUKHERJEE, 2021), atua interrompendo a formação do fuso mitótico durante a divisão celular, o que impede a separação dos cromossomos duplicados e resulta em células com o dobro da sua quantidade de DNA normal (GANTAIT & MUKHERJEE, 2021). Com os avanços da pesquisa de poliploidia sintética, mais antimitóticos têm sido testados em diferentes protocolos, como os herbicidas

orizalina, trifluralina e 8- hidroxiquinolina, porém, na maioria das revisões já feitas, a colchicina se mantém como o mais constante na produção de autopoliploides estáveis e funcionais (SATTLER et al., 2016; SALMA et al., 2017; NIAZIAN & NALOUSI, IANICELLI et al., 2020; GANTAIT & MUKHERJEE, 2021).

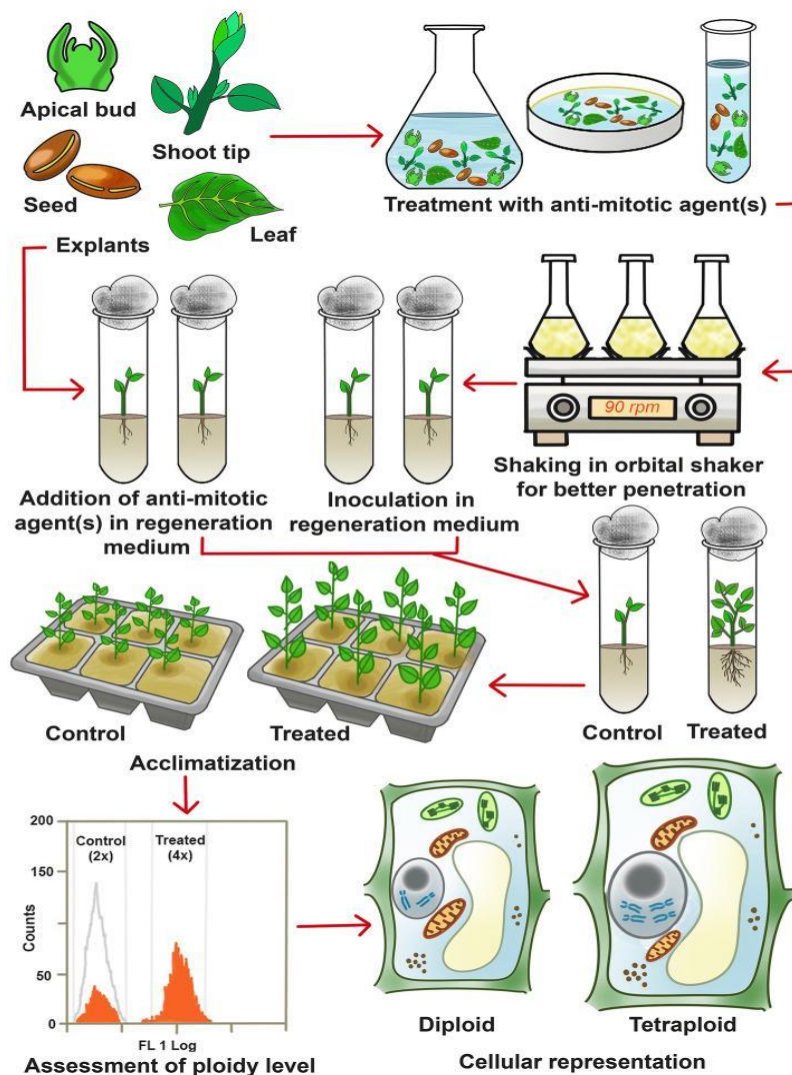
Protocolos de duplicação genômica também costumam produzir uma alta quantidade de mixoploides, ou quimeras, como também podem ser chamados (VANSTELCHEMAN et al., 2010). Mixoploides são organismos que apresentam diferentes números cromossômicos ao longo de células ou tecidos diferentes (DHOOGHE et al., 2011). O esperado é que estes organismos se estabeleçam em uma única ploidia, com o passar do tempo. Porém, alguns indivíduos já foram reportados mantendo seu estado mixoploide, mesmo ao longo de várias gerações (HARBARD et al., 2012; ENG & HO, 2019; JULIÃO et al., 2020). Há um grande foco no desenvolvimento de protocolos de duplicação genômica que minimizem ao máximo a sua formação, priorizando a geração de poliploides “completos” (ZLESACK et al. 2005; DHOOGHE et al., 2011) . No entanto, estudos mais recentes têm ressignificado a importância dessas quimeras, que lentamente tem deixado de serem consideradas apenas um “resíduo” da duplicação para se tornarem material de possível interesse no contexto do melhoramento vegetal, por também apresentarem características interessantes, associadas à sua variação cromossômica (FATEN OMEZZINE et al., 2012; FRANCO, L., 2014).

A indução de autopoliploides também pode ocorrer *in vitro* ou no campo, esse último ocorrendo com as porções radiculares ou apicais das plantas sendo mergulhadas em solução de colchicina (SATTLER et al., 2016). Porém, os baixos índices de poliploides produzidos a partir de induções no campo fomentou o maior direcionamento dessas técnicas para o meio *in vitro* (DHOOGHE et al., 2011).

No contexto da poliploidia sintética, o cultivo *in vitro* surge como uma ferramenta primordial na produção de novas plantas com diferentes tamanhos de genoma, diversidade metabólica e plantas geneticamente uniformes (DEBNARH et al. 2006; ALTPETER et al. 2016; LUCHO et al. 2019). O método de cultivo *in vitro* permite a obtenção de plantas livres de patógenos, propagação massiva, conservação de germoplasma e permite melhoria por mutagenese *in vitro* e engenharia genética (PIZA; PINHO, 2002). Especificamente em *Lippia alba*, o cultivo *in vitro* já foi empregado em diversas áreas como em avaliações de estresses abióticos (CASTRO et al., 2002; LOPES et al., 2024), indução de duplicação genômica (JULIÃO et al., 2020) e produção de óleo essencial (TAVARES et al., 2004).

Diante dessas considerações, o presente estudo tem como objetivo realizar uma série de experimentos a partir do uso de alguns citótipos de um complexo poliploide natural, que foram induzido à duplicação genômica *in vitro* e realizar análises morfológicas e do óleo essencial dessas plantas, permitindo uma análise profunda sobre taxa de sobrevivência, estabilidade genética e a possibilidade de formação de novos poliploides e mixoploides sintéticos, a fim de aprimorar os conhecimentos acerca do comportamento genético de *Lippia alba* e seus fenótipos.

Figura 1: Representação gráfica do processo de indução de autopoliploides *in vitro*.



Fonte: Gantait & Mukherjee, 2021

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal e Propagação *in vitro*

Foram usados três acessos diploides (BGEN-29, BGEN-33 e BGEN-48) e dois acessos triploides (BGEN-27 e BGEN-59), retirados da coleção de *L. alba* da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. As plântulas *in vitro* foram propagadas em tubos de ensaio contendo meio de cultivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) livre de reguladores de crescimento e acrescido de sacarose 30 gL⁻¹, glicina 10mL⁻¹, vitaminas 10mL⁻¹ e ágar 7 gL⁻¹. O pH do meio foi ajustado para 5,7± 0,1 e o meio autoclavado a 120°C e sob 1,2 atm durante 15 minutos.

As plantas foram mantidas em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas, sob 25 ± 2 °C e densidade de fluxo de fótons de 40 μmol m⁻²s⁻¹.

2.2 Indução da duplicação genômica

Para a indução de duplicação genômica, segmentos nodais de *L. alba* foram inoculados em 10mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) livre de hormônios com sacarose 30gL⁻¹, glicina 10mL⁻¹, vitaminas 10mL⁻¹ e ágar 7 gL⁻¹ com pH ajustado para 5,7± 0,1 e acrescido de colchicina a 0,2%. Os tempos de exposição usados foram de 4 h e 6 h. Para o acesso da BGEN-48 (2X), que foi o primeiro a ser tratado, foram testados também os tratamentos de 0,3%/4h; 0,2%/12h; 0,3%/12h; 0,5%/4h e 0,5%/12h, a fim de se definirem quais seriam os melhores tempos e concentrações a serem utilizados. Após o final do tempo de exposição, os explantes foram inoculados em meio MS livre de colchicina. Além disso, foi mantido um grupo controle no qual as plantas foram cultivadas em meio de cultivo MS livre de colchicina.

Para cada tratamento, foram utilizados 100 explantes. A cada 10 dias de cultivo pós exposição, foi realizada uma análise de sobrevivência das plantas. As plantas que sobreviveram por 60 dias foram cultivadas *in vitro* para análises posteriores.

Para o acesso da BGEN-29 (2X), os segmentos nodais utilizados também foram identificados considerando seu nível de desenvolvimento quando foram repicados (se eram mais basais ou apicais), visando obter informações sobre o tipo de explante que melhor responde ao processo de indução, seguindo o recomendado por Salma et al. (2017).

2.3 Determinação do nível de ploidia e quantidade de DNA

Após 60 dias de cultivo, foi realizada a citometria de fluxo das plantas que sobreviveram, visando determinação do nível de ploidia. Para a estimativa do conteúdo de DNA, cerca de 25mg de folhas e raízes foram maceradas em uma placa de Petri contendo 450 µL de tampão WPB (LOUREIRO et al., 2007). Após o isolamento dos núcleos, a suspensão foi filtrada por uma rede de nylon de aproximadamente 30 µm e os núcleos foram corados com 25µL de iodeto de propídio (1 mg/mL) para a leitura no citômetro (CytoFlex, Alemanha). Para cada amostra, 5 mil núcleos foram analisados no citômetro de fluxo CytoFlex (Beckman Coulter, Alemanha). Para a obtenção dos histogramas, foi utilizado o software CytExpert 2.0.1.

Foram realizadas análises a cada 30 dias, aproximadamente, buscando acompanhar a estabilidade genética dos poliploides e mixoploides formados.

2.4 Aclimatização dos poliploides e mixoploides gerados

Alguns dos poliploides e mixoploides gerados foram então selecionados para a aclimatização. Para esse processo, as mudas foram inicialmente retiradas do meio de cultura, e introduzidas dentro de tubos de ensaio, tampados, com água e na sombra, por cerca de 7 dias. Após mais uma semana, os tubos foram destampados. Por fim, depois desse período inicial, elas foram plantadas em vasos com substrato, furados no fundo para o escoamento da água, e vedados por sacolas plásticas. Após cerca de uma semana, as pontas dos sacos eram cortadas, permitindo melhor troca gasosa com o ambiente externo, até completa adaptação das plantas

2.5 Avaliação Morfológica

Foram analisadas as seguintes características morfológicas: massa fresca e seca, comprimento total da parte da área e das raízes, área foliar, números de folhas e frequência de brotação. A determinação da área foliar foi realizada com a ferramenta ImageJ (HOLGUÍN et al., 2019).

2.6 Microextração do óleo essencial

Para a microextração de óleo essencial, aproximadamente 100mg de folhas frescas foram transferidas para tubos de 2mL. Foi adicionado aproximadamente 1mL de solução contendo n-hexano. As amostras foram mantidas por 10 min em banho de ultrassom (Thornton-INPEC, Vinhedo, SP, BR) com frequência de 70KHz. Em seguida, 100mg de sulfato de sódio

anidro foi adicionado e o sobrenadante filtrado por uma mecha de algodão estéril para os vials (Shimadzu, Quioto, JA) (SILVA et al., 2010, adaptado). Os filtrados foram analisados em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas.

2.7 Análise estatística

A taxa de sobrevivência foi calculada com base no percentual de plantas que apresentaram folhas e raízes e foi analisada por meio do teste de Qui-Quadrado com nível de significância de 5%.

Os dados de morfologia foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) one-way e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%

3 RESULTADOS

3.1 Taxa de sobrevivência e obtenção de poliploides sintéticos

Para as plantas diploides, no acesso BGEN-48, observou-se uma taxa de sobrevivência (ao final dos 60 dias) de 45% no grupo controle; 13% no tratamento de 0,2%/4h; 9% no tratamento de 0,3%/4h; 7% nos tratamentos de 0,2%/12h e 0,3%/12h e 1% nos tratamentos de 0,5%/4h e 0,5%/12h (Figura 2). Para o acesso BGEN-29 (2X), foi calculada taxa de sobrevivência de 94% para o grupo controle, 19% para o tratamento de 0,2%/4h e 8,5% para o tratamento de 0,2%/6h (Figura 3a). Foi observada uma maior sobrevivência dos explantes mais basais, especialmente os dois primeiros segmentos nodais de cada planta tratada. Por fim, no acesso da BGEN-33 (2X), a taxa de sobrevivência foi de 96% para o grupo controle, 29% para o tratamento de 0,2%/4h e 21,3% no tratamento de 0,2%/6h (Figura 3b). Em todos os casos, houve diferença significativa dos tratamentos em relação ao grupo controle. Para a BGEN-48 (2X), somente as concentrações de 0,5% tanto em 4h quanto 12h de exposição mostraram uma diminuição significativa dessa taxa em relação aos demais tratamentos. Não houve diferença significativa entre os tempos de exposição de 4h e 12h. Por essa razão, para os experimentos seguintes, foram escolhidos os tempos de 4h e 6h. Houve diferença significativa entre os dois tempos de exposição, no caso do acesso BGEN-29 (2X). Já para o acesso BGEN-33 (2X), não se notou diferença.

Figura 2: Taxa de sobrevivência ao longo de 60 dias de acesso diploide (BGEN-48) de *Lippia alba*. Dados apresentados em porcentagem e analisados pelo teste de Qui-Quadrado. *($p > 0,05$) e ***($p < 0,001$).

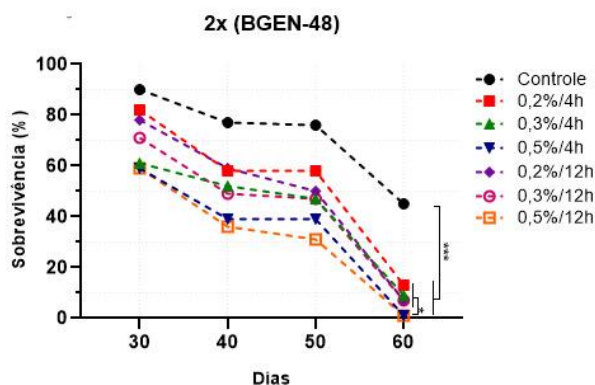
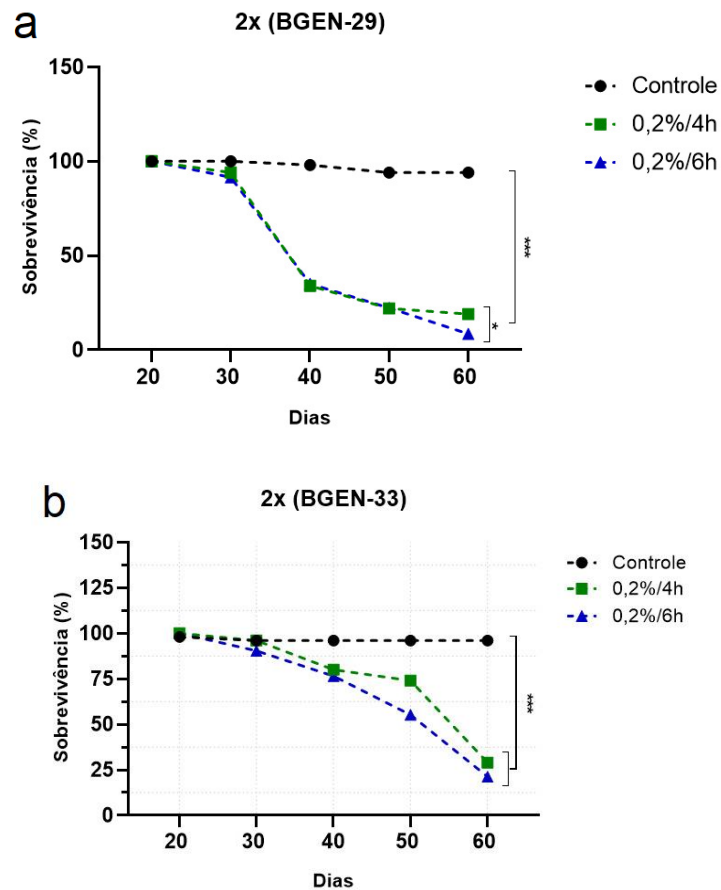
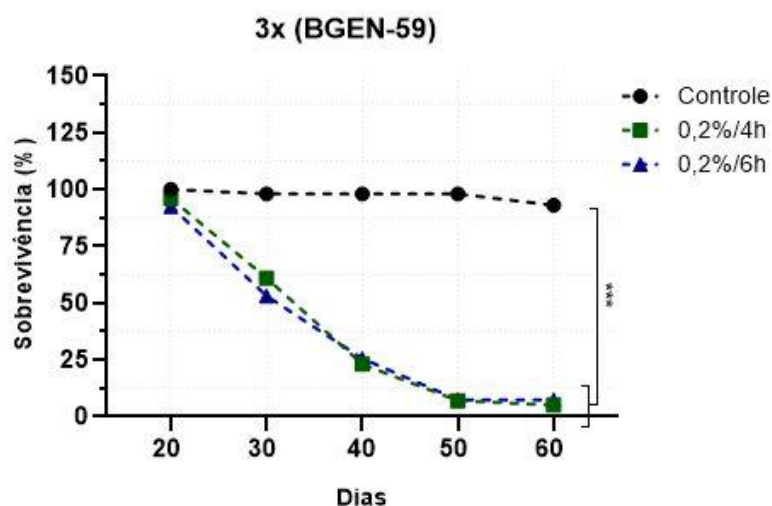


Figura 3: Taxa de sobrevivência ao longo de 60 dias de acessos diploides de *Lippia alba*. a) BGEN-29; b) BGEN-33. Dados apresentados em porcentagem e analisados pelo teste de Qui-Quadrado. *($p>0,05$) e ***($p<0,001$).



O experimento com o acesso BGEN-27 (3X) foi descartado, devido à contaminação dos explantes. Já no outro acesso triploide (BGEN-59), observou-se uma taxa de sobrevivência de 93% para o grupo controle; 5% no tratamento de 0,2%/4h e 7 % no tratamento de 0,2%/6h (Figura 4). Ambos os tratamentos apresentaram uma diminuição significativa da taxa de sobrevivência em relação ao controle ($p<0,001$), sendo que também não houve diferença entre eles.

Figura 4: Taxa de sobrevivência ao longo de 60 dias de acesso triplo ide de *Lippia alba* (BGEN-59). Dados apresentados em porcentagem e analisados pelo teste de Qui-Quadrado. ***($p < 0,001$).

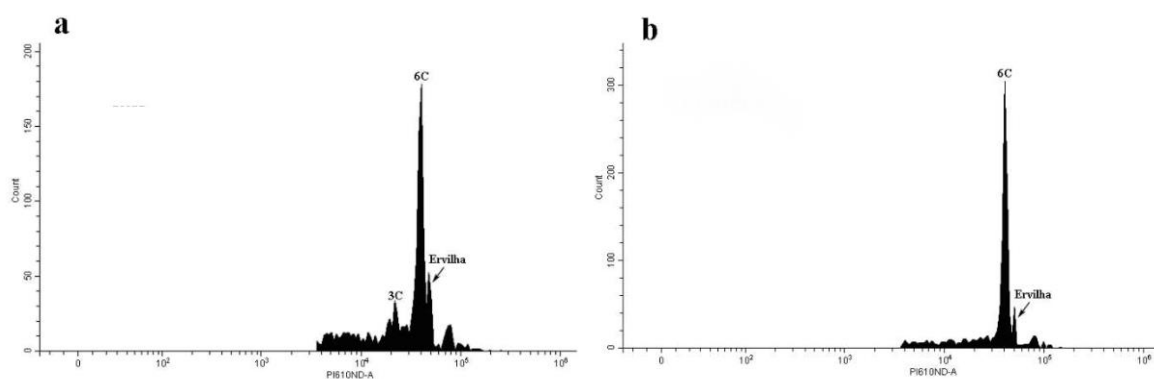


Com relação à obtenção de poliploides sintéticos, a partir do acesso diploide BGEN-48 (2X), foram obtidos uma planta mixoploide e uma tetraploide. Porém, após a primeira micropropagação, realizada com 60 dias, essas duas plantas morreram e foram então descartadas. Já no experimento com a BGEN-33 (2X), foram obtidos 5 tetraploides e 4 mixoploides através do tratamento de 0,2%/4h, e outros 9 tetraploides e 1 mixoploide com o tratamento de 0,2%/6h.

A partir do acesso BGEN-29 (2X), foram obtidos, inicialmente, 5 plantas tetraploides e 5 mixoploides com o tratamento de 0,2%/4h, e outros 7 tetraploides com o tratamento de 0,2%/6h. Além da maior sobrevivência, os explantes mais basais utilizados também apresentaram maior sucesso de duplicação. Dentre os primeiros segmentos nodais repicados para a indução, 8, 93% se tornaram tetraploides e 1,79% mixoploides. Para os segundos segmentos, essas taxas foram de 10,17% e 3,39%, respectivamente. Por outro lado, nenhum dos explantes mais apicais gerou tetraploides.

Por fim, no experimento com o acesso triploide (BGEN-59), foram obtidas uma planta mixoploide e uma planta hexaploide, ambas na concentração de 0,2%/4h (Figura 5).

Figura 5: Histogramas representativos da quantidade de DNA da planta mixoploide (a) e da planta hexaploide sintética (b) após 40 dias da indução de duplicação em plantas triploides (BGEN-59).



3.2 Estabilidade genética dos poliploides sintéticos recém formados

A fim de acompanhar a estabilidade genética dos poliploides e mixoploides formados, foram realizadas análises por citometria de fluxo a cada 30 dias, aproximadamente.

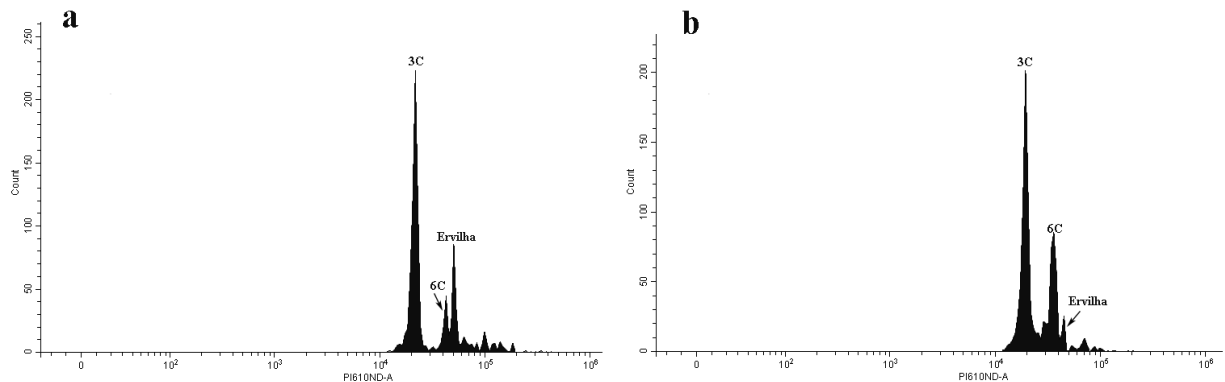
No caso do acesso BGEN-29 (2X), já na segunda análise, realizada após 90 dias de exposição à colchicina, cinco dos acessos tetraploides haviam morrido, enquanto um passou a apresentar picos relativos a quantidades de DNA compatíveis com plantas diploides (2C) e plantas tetraploides (4C), caracterizando-se então como mixoploide. Além disso, dois dos acessos que já eram mixoploides regrediram para níveis compatíveis com diploides (2C). Após 9 meses, apenas 5 dos 7 acessos sobreviventes se mantiveram tetraploides, com os outros ainda apresentando variações entre 2C e 4C.

Já no outro acesso diploide (BGEN-33), 5 tetraploides e 4 mixoploides morreram ao longo dos 6 meses de avaliações, após a exposição inicial. Além disso, duas das plantas sobreviventes, que eram inicialmente tetraploides, passaram a ser mixoploides. Uma delas, nas duas últimas avaliações, voltou a mostrar níveis de DNA compatíveis apenas com tetraploides.

Por fim, foram realizadas também análises de materiais mixoploide e hexaploide gerados a partir da BGEN-59 (3X). Após 90 dias da exposição, o mixoploide havia regredido sua quantidade de DNA para valores compatíveis com plantas triploides (3C) e o hexaploide apresentava picos relativos a quantidades de DNA compatíveis com plantas triploides (3C) e plantas hexaploides (6C), caracterizando-se agora como mixoploide (Figura 6). Essa última

planta se manteve mixoploide até a última análise realizada (quase 2 anos após a exposição). O restante das plantas que não se duplicaram inicialmente, bem como a mixoploide, se mantiveram com as mesmas características até essa última análise.

Figura 6: Histogramas obtidos por citometria de fluxo da a) planta mixoploide e b) planta hexaploide sintética após 90 dias da indução de duplicação em plantas triploides (BGEN-59).



3.3 Aclimatização dos poliploides e mixoploides gerados

Sobre as plantas aclimatizadas, todas as amostras submetidas ao processo sobreviveram (Figura 7). É importante que elas continuem sendo acompanhadas ao longo dos próximos meses para verificar se as quantidades de DNA se mantêm.

Figura 7: Processo de aclimatização de plantas sintéticas de *Lippia alba*. (a) durante a última fase do processo de aclimatização, ainda cobertas por sacos plásticos (b) indivíduos já aclimatizados.



3.4 Avaliação Morfológica

Até o momento, devido a disponibilidade dos acessos *in vitro*, foram realizadas análises morfológicas do acesso da BGEN-33 (2X), juntamente com todos os poliploides gerados a

partir de sua duplicação. Com relação aos dados de peso fresco e peso seco, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre as plantas avaliadas. O mesmo pode ser dito para a contagem do número de folhas e nós (Figura 8). Já nas medidas de comprimento do caule (Figura 9), a planta diploide natural apresentou diferenças com as poliploides 69 e 97 (ambas tetraploides), sendo que a 97 também se mostrou significativamente diferente da 92M (mixoploide). No comprimento da raiz (Figura 10), a planta 51 (mixoploide) se destacou positivamente de todas as outras. A planta 51 também apresentou a maior área foliar, especialmente se comparada com as 69 e 97, que apresentaram uma porcentagem significativamente menor que as demais (Figura 11).

Figura 8: Histogramas representando medidas morfológicas do acesso natural da BGEN-33 e os acessos 92M, 51, 69 e 97, obtidos através do tratamento com colchicina. a) número de nós. b) número de folhas. Dados analisados por ANOVA One-Way.

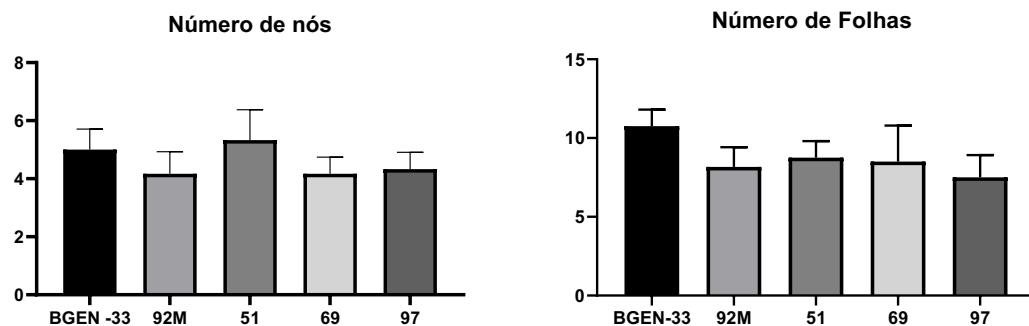


Figura 9: Comprimento do caule do acesso natural da BGEN-33 e dos acessos sintéticos 92M, 51, 69 e 97 obtidos através do tratamento com colchicina. As médias identificadas por letras diferentes (a, b, c) diferem estatisticamente entre si.

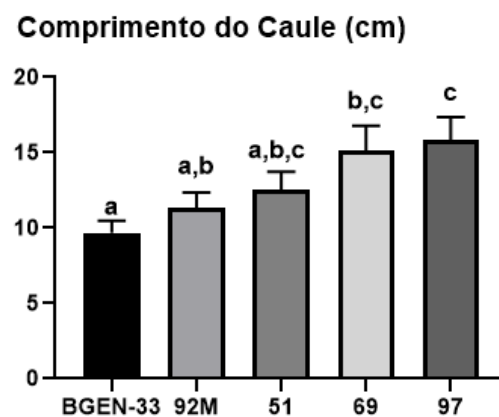


Figura 10: Comparação entre o comprimento da raiz do acesso natural da BGEN-33 e os acessos 92M, 51, 69 e 97 obtidos através do tratamento com colchicina. As médias identificadas por letras diferentes (a, b) diferem estatisticamente entre si. Dados analisados por ANOVA One-Way.

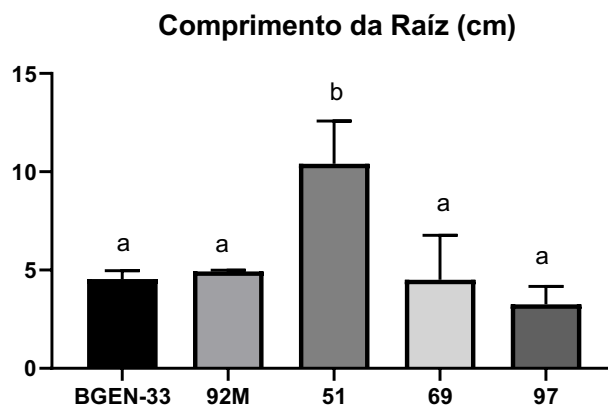
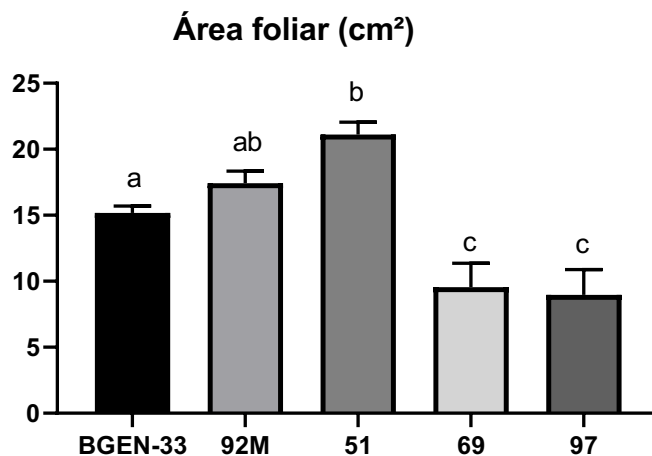


Figura 11: Comparação entre área foliar do acesso natural da BGEN-33 e os acessos 92M, 51, 69 e 97 obtidos através do tratamento com colchicina. As médias identificadas por letras diferentes (a, b, c) diferem estatisticamente entre si. Dados analisados por ANOVA One-Way.



3.5 Perfil do óleo essencial

Nos resultados obtidos a partir da análise do perfil de óleo essencial dos acessos, é possível observar um padrão entre ploidias, e também entre plantas mantidas *in vitro* e no campo. No caso dos mixoploides e poliploides obtidos a partir da BGEN-33, todas apresentaram uma maior concentração de citral (geranial e neral) em sua composição. Porém,

as plantas mantidas no campo também apresentaram alta concentração de amyl vinyl carbinol, (Tabela 1).

Tabela 1 - Perfil do óleo essencial de acessos diploides naturais e de mixoploides e tetraploides sintéticos de *Lippia alba*

Planta	Ploidia	%	Componentes do óleo
BGEN 33 (<i>in vitro</i>)	Diploide	59,96	α citral (geranial)
		20,78	α citral (neral)
		11,9	
		7,36	Amyl vinyl carbinol
BGEN 35 (campo)	Diploide		β Pineno
		38,76	Amyl vinyl carbinol
		33,76	β mirceno
		13,2	Trans α bergamoteno
51 (campo)	Mixoploide	7,87	α citral (geranial)
		6,41	α -humuleno
		42,37	Amyl vinyl carbinol
		23,32	α citral (geranial)
		20	Brometo de geranial
		8	Álcool perílico
51 (<i>in vitro</i>)	Mixoploide	7	β mirceno
		52	α citral (geranial)
		14,83	β citral (neral)
		13,83	Amyl vinyl carbinol
92 M (campo)	Mixoploide	13,37	Argônio
		5,53	β mirceno
		30,35	α citral (geranial)
		30,97	Amyl vinyl carbinol
		25,68	Brometo de geranial
		8,36	α -humuleno
		4,64	β mirceno

92 M (<i>in vitro</i>)	Tetraploide (raiz mixoploide)	65,35	α citral (geranial)
		18,22	Amyl vinyl carbinol
		16,43	β citral (neral)
69 (<i>in vitro</i>)	Tetraploide	64,51	α citral (geranial)
		18,31	β citral (neral)
		13,31	Amyl vinyl carbinol
97 (campo)	Tetraploide	3,87	β mirceno
		56,87	Amyl vinyl carbinol
97 (<i>in vitro</i>)	Tetraploide	43,13	-
		71,19	α citral (geranial)
		19,48	β citral (neral)
		9,33	Amyl vinyl carbinol

Para o mixoploide produzido a partir da triploide BGEN-59, o perfil de linalol se manteve para todas as plantas analisadas, como é possível observar na tabela 2. A planta triploide natural utilizada como referência foi a BGEN-27, devido a ausência de espécimes da BGEN-59 disponíveis *in vitro*. Os mixoploides que regrediram para triploides também foram analisados, e apresentaram o mesmo perfil de óleo essencial. A maior presença de amyl vinyl carbinol nas plantas do campo também foi observada nesse caso.

Tabela 2 - Perfil do óleo essencial de acessos triploides naturais e de mixoploides sintéticos de *Lippia alba*

Planta	Ploidia	%	Componentes do óleo
BGEN-27 (<i>in vitro</i>)	Triploide natural	90,2	β Linalol
		7,45	Eucaliptol
		2,35	Hotrienol
4B2 (campo)	Triploide regredido	87	β Linalol
		4,55	Eucaliptol
		3,45	Hidrocarboneto
4F2 (campo)	Triploide regredido	2,82	Hotrienol
		81,85	Linalol
		7,15	Amyl vinyl carbinol

4F2 (<i>in vitro</i>)	Mixoploide	6,38	Eucaliptol
		4,62	Hotrienol
		86,46	Linalol
		8,77	Eucaliptol
		2,58	α citral (geranial)
4F4 (campo)	Triploide regredido	2,19	Benzilamina
		83,02	β Linalol
		6,41	Amyl vinyl carbinol
		4,32	Eucaliptol
		3,84	Cosmeno
		2,41	β mirceno

4 DISCUSSÃO

A indução de poliploidia representa uma importante estratégia no que diz respeito ao estudo do processo evolutivo e de especiação das plantas, além de ser aplicável como técnica para o melhoramento vegetal, inclusive no estudo de plantas medicinais (SALMA et al., 2017). Na última década, estudos com foco nos efeitos da duplicação genômica nas plantas tem recebido cada vez mais enfoque (RÊGO; DHOOGHE, 2011; GOMES et al., 2014; GAO et al., 2016; YAN et al., 2016; SADAT NOORIET et al., 2017; SALMA;MANDAL, 2017;IANNICELLI et al., 2020). Apesar da sua indiscutível importância agrônômica, os protocolos para a indução de poliploidia ainda são associados a uma baixa eficiência, apresentando taxas altas de mortalidade e poucos poliploides produzidos (PEI, 1985; DHOOGHE et al., 2011).

Dois dos principais fatores que influenciam no sucesso da poliploidização sintética são a concentração e tempo de exposição do agente antimitótico utilizado (SALMA et al., 2017). Doses muito altas ou muito baixas podem gerar alta mortalidade (WIDORETNO, 2016). Segundo a revisão realizada por Salma et al. (2017), em geral, doses mais altas por tempos mais curtos resultam em maior geração de poliploides, com a concentração de 0,5% de colchicina sendo a base para muitos dos estudos analisados. No experimento piloto feito com o acesso diploide BGEN-48, a concentração mais baixa testada (0,2%) produziu a melhor taxa de sobrevivência, sendo por isso escolhida como o tratamento usado nos experimentos seguintes. O mesmo efeito já foi relatado anteriormente para *L. alba* e foi atribuído à menor exposição e redução do efeito tóxico da colchicina (JULIÃO et al., 2020).

No acesso da BGEN-29, as plantas tratadas com exposição por apenas 4 horas apresentaram maior sobrevivência. Porém, o maior tempo de exposição aparenta ter sido o melhor para a obtenção de poliploides. O tratamento de 0,2% de colchicina combinado com 6 horas de exposição apresentou maior número de tetraploides produzidos, e menor quantidade de mixoploidia. O estudo conduzido por Julião et al. (2020) apresentou dados similares. Outro fator que pode ter atuado no sucesso do experimento foi o tipo dos explantes escolhidos, sendo que os explantes mais basais foram os responsáveis pelas melhores taxas de sucesso na sobrevivência e duplicação para os dois tratamentos realizados. Esse resultado se diferencia do que é apresentado na revisão feita por Gantait e Mukherjee (2021), em que os autores concluem

que o uso de explantes mais jovens e apicais é o mais recomendado, por estes apresentarem melhor permeabilidade em suas células.

Indução de duplicação genômica pode resultar também na formação de mixoploides, que são caracterizados como indivíduos que apresentam duas ou mais ploidias em um mesmo tecido. Isso indica que nem todas as células expostas à colchicina tiveram mudanças no seu número de cromossomos (SINTA & WIDORETNO, 2020). A quantidade de mixoploides formados também já foi associada antes à escolha do agente antimitótico, sua concentração e o tipo do explante (PETERSEN et al., 2002). No caso do presente trabalho, o tempo de exposição de 4 horas apresentou maior produção de mixoploides nos experimentos de dois dos acessos diploides utilizados.

Ademais, os acessos diploides foram responsáveis pela maior geração de mixoploides e poliploides, ao final do experimento. Segundo a revisão realizada por Salma et al. (2017), parece existir uma tendência maior para a formação de tetraploides sintéticos. Para além disso, outros fatores previamente citados, como escolha dos explantes podem ter atuado para contribuir com esses resultados (DHOOGHE et al, 2011).

Após experimentos de duplicação, as plantas apresentam instabilidade genética, podendo retornar aos níveis de DNA originais, mesmo com resultados inicialmente positivos (VÄINÖLÄ, 2000). As quedas nos níveis de DNA apresentadas em todos os acessos tratados, ao longo do tempo, são prova desse fenômeno. Segundo Marques & Monteiro (2014), uma das prováveis explicações seria a maior velocidade de divisão das células diploides, quando comparadas com outras de níveis maiores de ploidia, o que resultaria no aumento de mixoploides ao longo do tempo, como foi observado no presente trabalho.

Considerando esse contexto, análises periódicas de estimativa da quantidade de DNA foram realizadas. Vanstechelman et al. (2010) sugerem que plantas poliploides sintéticas devem ser reanalisadas após o procedimento de micropropagação *in vitro*, visando a melhor detecção de quimeras setoriais. Os autores também indicam a realização de análises de citometria com raízes e folhas, buscando abranger mais tecidos. Por isso, essa técnica foi adotada nas análises dos acessos de *Lippia alba* estudados.

Ademais, visando o aumento da estabilidade dessas plantas, parte dos poliploides e mixoploides gerados também foram aclimatizados, ou seja, retirados do ambiente *in vitro*. Considerando o estresse que essa forma de cultivo pode gerar nas plantas, como a contaminação

previamente citada, ou a limitação de trocas gasosas e na exposição à luz (DESJARDINS,2009), espera-se que a retirada delas desse ambiente e sua introdução em condições de campo permitam que ocorra uma melhora no seu desenvolvimento, e assim, melhora da estabilidade genética desses neo-poliploides sintéticos.

A perda de um dos acessos usados (BGEN-27), reforça a relação já observada entre contaminação e os acessos triploides da espécie *L. alba*, quando esta é cultivada por micropropagação. Uma das suposições levantadas é de que esta seria uma bactéria endofítica, ou seja, que habita no interior da planta, e que em condições normais, não geraria grandes alterações para o bem-estar de seus hospedeiros. Porém, este microrganismo possivelmente encontra no ambiente *in vitro* condições favoráveis para o seu desenvolvimento, se espalhando pelo meio de cultura e interrompendo o crescimento da planta ali cultivada (DESJARDINS,2009).

Para os acessos mixoploides e poliploides sobreviventes, a exposição à colchicina não gerou resultados significativos para todos os parâmetros morfológicos avaliados. Nas análises de peso seco, peso fresco, contagem no número de folhas e nós, não houve diferença significativa entre os acessos avaliados. Isso pode indicar uma menor sensibilidade desses parâmetros para alterações de tamanho do genoma, quando se trata de *L. alba*. Porém, mais repetições precisam ser realizadas, para uma compreensão mais precisa desse panorama.

Nas medidas de tamanho de caule, os poliploides estabelecidos apresentaram valores significativamente maiores do que o acesso do diploide natural. Além disso, um desses acessos (97) também se apresentou significativamente maior do que um dos mixoploides (92M). Esses dados corroboram com diversos estudos anteriores, como de Sadat Noori et al. (2017), em que as plantas duplicadas também apresentaram maior crescimento caulinar.

Por outro lado, nas medidas de comprimento das raízes e de área foliar, os acessos que se destacaram foram os mixoploides. Na avaliação da área foliar, os dois tetraploides apresentaram valores menores até mesmo em relação ao acesso diploide natural. Esses dois acessos, em geral, apresentaram o mesmo número de folhas dos outros, porém, com tamanho bem menor. O que, por sua vez, vai contra o efeito “gigas”, que é uma das consequências esperadas para o aumento do volume nuclear em poliploides (VAN DE PEER et al., 2017). Resultados similares já foram encontrados em outros estudos, em que os diploides naturais apresentaram maior comprimento de folhas do que os tetraploides sintéticos produzidos (ROY et al., 2001; VIEHMANNOVÁ et al, 2012; ZAHEDI et al., 2014). Além disso, grande variação morfológica, especialmente para as folhas, já foi associada antes com *L. alba*, no trabalho de Jezler et al. (2013).

Com relação à composição do óleo essencial, diversos estudos já reportaram o citral (neral e geranial) e o linalol como os principais constituintes presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Henebelle et al., 2008; Shukla et al., 2009; Stashenko et al., 2004; Vale et al., 2000). Os dados obtidos no presente trabalho corroboram com essa informação, sendo que esses dois quimiotipos principais também foram obtidos nos poliploides e mixoploides sintéticos produzidos. Os resultados também são similares aos adquiridos anteriormente por Julião et al. (2020), em que se mantém a associação entre os diploides e tetraploides com o citral e entre os triploides com o linalol, mesmo nos poliploides sintéticos.

O principal efeito esperado na poliploidização de plantas medicinais é o aumento na produção de metabólitos secundários. Além disso, alterações no perfil do óleo essencial também já foram reportadas, devido a mudanças na regulação da síntese desses metabólitos (IANNICELLI et al., 2020). Lopes et al. (2014) associaram a formação de dois quimiotipos diferentes em *L. alba* com variações em uma mesma cadeia de biossíntese, a via MEP, como consequência das variações no nível de ploidia. O linalol, neral e geranial são monoterpenos, que possuem o geranilpírofosfato (GPP) como precursor comum (CROTEAU, 1987). A diferença entre eles está na variação das enzimas envolvidas em sua produção: a linalol sintase catalisa a conversão direta de GPP em linalol, enquanto diversas enzimas atuam na formação do geranial, e subsequentemente, na do neral. (CROTEAU et al., 1994; GERSHENZON & CROTEAU, 1993; MCGARVEY & CROTEAU, 1995; WISE & CROTEAU, 1999).

A presença do amyl vinyl carbinol (1-octen-3-ol) em altas concentrações foi observada apenas nas plantas presentes no campo, tanto nos acessos naturais quanto nas plantas sintéticas que passaram pelo processo de aclimatização. O 1-octen-3-ol é descrito por Adibe et al. (2019) como um composto de relevância no controle de insetos, atuando como um eficiente repelente e estando associado a propriedades inseticidas nas plantas. Essa informação sustenta o padrão encontrado nos acessos analisados neste trabalho, uma vez que essa substância só esteve presente em altas quantidades nas plantas do campo, condição em que estas se encontram sob risco de herbivoria. Além disso, esse composto volátil também é associado a propriedades antimicrobianas e antioxidantes apresentadas por diversos fungos e plantas (AL-FATIMI et al., 2016). Vale notar que essas mesmas características também são descritas para o óleo essencial de *Lippia alba* (SANTOS FILHO et al., 2023).

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos contribuíram para compreender o processo de indução de poliploidia para a espécie *Lippia alba*, assim como para otimizar o protocolo de indução de materiais sintéticos. Podemos concluir, por exemplo, que a aplicação do tempo de indução mais baixo testado e o uso de explantes mais basais foram os parâmetros que geraram melhores resultados na sobrevivência e duplicação dos indivíduos. Porém, mais experimentos mantendo controle sobre o tipo de explantes escolhidos precisam ser realizados, uma vez que só conseguimos realizar esse acompanhamento para um dos acessos testados.

O experimento revelou-se promissor, resultando na produção de novos indivíduos que poderão ser utilizados para delinear estratégias que permitam investigar os efeitos de alterações no nível de ploidia para a evolução da espécie. A partir dos resultados já obtidos, foi possível reforçar mais uma vez a associação já estabelecida entre quantidade de DNA e o perfil de constituintes do óleo essencial em *Lippia alba*. Sendo que, também foi possível inferir sobre a influência do ambiente de cultivo na síntese desses metabólitos.

Paralelamente, a obtenção de neo-poliploides sintéticos constitui material valioso para estudos futuros que busquem adicionar aos conhecimentos sobre a dinâmica de poliploidização nas plantas. Sendo que mais estudos se fazem necessários, principalmente envolvendo a duplicação dos acessos triploides da espécie. Além disso, o acompanhamento do material já produzido também será essencial, de forma a gerar dados sobre os poliploides e mixoploides sintéticos a longo prazo.

6 REFERÊNCIAS

- AL-FATIMI, M.; WURSTER, M.; LINDEQUIST, U. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the volatile oil of *Ganoderma pfeifferi* Bres. Medicines (Basel, Switzerland), v. 3, n. 2, p. 10, 2016.
- ALTPETER, F.; SPRINGER, N.M.; BARTLEY, L.E.; BLECHL, A.; BRUTNELL, T.P.; CITOVSKY, V.; CONRAD, L.; GELVIN, S.B.; JACKSON, D.; KAUSCH, A.P.; Advancing crop transformation in the era of genome editing. Plant Cell, tpc., 00196 (2016), p. 02016
- BARKER, M. S.; HUSBAND, B. C.; PIRES, J. C. Spreading Winge and flying high: The evolutionary importance of polyploidy after a century of study. American Journal of Botany, v. 103, n. 7, p. 1139–1145, jul. 2016.
- BARROS, V.G.S. et al. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v.23, n.11, p.1314-17, 2000.
- BARROSO, G.M. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: UFV, 1991. v.3, 255p.
- CACERES, A. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. Journal of Ethnopharmacology, v.31, p.193-208, 1991.
- BLAKESLEE, A. F.; AVERY, A. G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. Journal of Heredity, v. 28, n. 12, p. 393–411, dez. 1937.
- CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. Elsevier. Journal of Ethnofarmacology. v.100, p.131-134. USA. 2005. ISSN 0378-8741.
- CASTRO, D.M. Efeito da variação sazonal, colheita selecionada e diferentes temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais das folhas *Lippia alba*. 2001. 134p. Dissertação (Doutorado em Agronomia – Horticultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

CASTRO, D.M. et al. Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britt & Wilson in leaves on different plant parts in different seasons. *Acta Horticulturae*, v.1, n.51, p.569, 2002.COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, n. 11, p. 836–846, 11 out. 2005.

CORREA, C.B.V. Anatomical and histochemical study of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britt & Wilson, known as erva-cidreira. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v.73, n.3, p.57-64, 1992.

CORRÊA CBV 1992. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt & Wilson - erva-cidreira. *Rev Bras Farm* 73: 57-64.

CROTEAU, RODNEY. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chemical Reviews*, v. 87, n. 5, p. 929–954, 1 out. 1987.

CUI Y., HOU L., Li X., HUANG F., PANG X., Li Y. (2017). Indução *in vitro* de plantas tetraploides *Ziziphus jujuba* Mill. var. spinosa a partir de explantes foliares. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 131 175–182.

DESJARDINS, Y., DUBUC, J.-F. and BADR, A. (2009). *In vitro* culture of plants: a stressful activity!. *Acta Hort.* 812, 29-50DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.812.1

DEBNATH, M.; MALIK, C.; BISEN, P.S.; Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 7 (2006), pp. 33-49

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA C.A. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. UNESP, São Paulo, 2002, 604 pp. DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JÚNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian tropical Atlantic forest. *Fitoterapia*, v.73, p. 69–91, 2002.

DHOOGHE, E. et al. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 104, n. 3, p. 359–373, mar. 2011.

FATEN OMEZZINE et al. Induction and flow cytometry identification of mixoploidy through colchicine treatment of *Trigonella foenum-graecum* L. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 98, p. 16434–16442, 2016.

FAWCETT, J. A.; MAERE, S.; VAN DE PEER, Y. Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 14, p. 5737–5742, 26 mar. 2009.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa- SPI: Embrapa- CNPH, 1998. p. 21- 44.

FOX, D. T. et al. Polyploidy: A Biological Force From Cells to Ecosystems. *Trends in Cell Biology*, v. 30, n. 9, p. 688–694, set. 2020.

FRANCIS, D. The plant cell cycle – 15 years on. **New Phytologist**, v. 174, n. 2, p. 261–278, 7 mar. 2007.

FRANCO, Luís. A Produção de Quimeras no Reino das Plantas | Portal Agronegócios.eu. Disponível em: <https://www.agronegocios.eu/noticias/a-producao-de-quimeras-no-reino-das-plantas/?utm_source=chatgpt.com>.

GANTAIT, S. et al. Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 106, n. 3, p. 485–493, set. 2011.

GUERRA, M. Poliploidia: a mutação que mudou a história dos seres vivos. *Genética na Escola*, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 128–141, 2020. DOI: 10.55838/1980-3540.ge.2020.350.

GOMES, S. S. L. et al. Karyotype, genome size, and *in vitro* chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 118, n. 1, p. 45–56, 2014.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (mill.) N. E. Brown

(verbenaceae). UFSM, Saúde Santa Maria, v. 33, n.1, p. 43-48. Santa Maria. 2007. ISSN 0103-4499.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. Journal of Ethnopharmacology, v. 116, n. 2, p. 211-222, 2008.

IANNICELLI, J. et al. The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species. Scientia Horticulturae, v. 260, p. 108854, jan. 2020.

JEZLER, C. N. et al. *Lippia alba* morphotypes cidreira and melissa exhibit significant differences in leaf characteristics and essential oil profile. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 23, n. 2, p. 217–223, 1 mar. 2013

JIAO, Y. et al. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. Nature, v. 473, n. 7345, p. 97–100, maio 2011.

JULIÃO, L.S.; TAVARES, E. S.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. (erva cidreira). SciELO, Revista Brasileira de Farmacognosia, v.13, supl.1, p.36-38. Maringá, 2003. ISSN 0102-695X.

JULIÃO, S. A. et al. Induction of Synthetic Polyploids and Assessment of Genomic Stability in *Lippia alba*. Frontiers in Plant Science, v. 11, 26 mar. 2020.

LEHRER, J. M.; BRAND, M. H.; LUBELL, J. D. Induction of tetraploidy in meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thunbergii* var. *atropurpurea*) through exposure to colchicine and oryzalin. Scientia Horticulturae, v. 119, n. 1, p. 67–71, 10 dez. 2008.

LOPES, J. M. L. et al. Genetic relationships and polyploid origins in the *Lippia alba* complex. American Journal of Botany, v. 107, n. 3, p. 466–476, 1 mar. 2020.

Lopes, J. M. L., Nascimento, L. S. de Q., Souza, V. C., de Matos, E. M., Fortini, E. A., Grazul, R. M., Santos, M. O., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Otoni, W. C., & Viccini, L. F. (2024). Water stress modulates terpene biosynthesis and morphophysiology at different ploidal levels in *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). Protoplasma, 261(2), 227–243.

LUCHO, S.R.; DO AMARAL, M.N.; MILECH, C.; FERRER, M.Á.; CALDERÓN, A.A; BIANCHI, V.J.; BRAGA, E.J.B. Elicitor-induced transcriptional changes of genes of the steviol glycoside biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. J. Plant Growth Regul. (2018), pp. 1-15

LUCHO, S. R. et al. Salt Stress-Induced Changes in *In vitro* Cultured *Stevia rebaudiana* Bertoni: Effect on Metabolite Contents, Antioxidant Capacity and Expression of Steviol Glycosides-Related Biosynthetic Genes. Journal of Plant Growth Regulation, v. 38, n. 4, p. 1341–1353, 1 dez. 2019.

MADANI, H. et al. Effect of Polyploidy Induction on Natural Metabolite Production in Medicinal Plants. Biomolecules, v. 11, n. 6, p. 899, 17 jun. 2021.

MARQUES, J. R. B.; MONTEIRO, W. R. Poliploidia em seringueira: iii - estudo comparativo entre clones diploides e novos poliploides putativos em condições de jardim clonal. 2000.

MASON, A. S.; PIRES, J. C. Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism? **Trends in Genetics**, v. 31, n. 1, p. 5–10, jan. 2015.

MASON, A. S.; WENDEL, J. F. Homoeologous Exchanges, Segmental Allopolyploidy, and Polyploid Genome Evolution. v. 11, 28 ago. 2020.

MATOS, F.J.A. As ervas-cidreira do Nordeste do Brasil – Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae).- Parte II – Farmacoquímica. Revista Brasileira de Farmacologia, v.77, n.4, p.137-41,1996b.

MATOS, F.J.A. et al. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brasil. Journal Essential Oil Research, v.8, n.6, p.695-8, 1996.

MATOS, F.J.A. Farmácias Vivas. Fortaleza: EUFC, 1998. 220p

MBACHU, K. A. et al. Chemical compositions and antioxidant activity of leaf and stem essential oils of *Bryophyllum pinnatum* (lam.) Kurz. GSC biological and pharmaceutical sciences, v. 9, n. 2, p. 057–064, 2019.

MCGARVEY, D.J., CROTEAU, R., 1995. Review terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1015–1026.

NIEL, E.; SCHERRMANN, J. M. Colchicine today. *Joint Bone Spine*, dez. 2006.

O'LEARY, N. et al. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept: *Lippia* Section *Goniostachyum*. *Botanical journal of the Linnean Society. Linnean Society of London*, v. 170, n. 2, p. 197–219, 2012.

OMBITO, J. O., et al. (2014). A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3, 460- 466.

PALUMBO, F. et al. RNA-seq analyses on gametogenic tissues of alfalfa (*Medicago sativa*) revealed plant reproduction- and ploidy-related genes. *BMC Plant Biology*, v. 24, n. 1, 3 set. 2024.

PINO, J.A.; ORTEGA, A. Chemical composition of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Cuba. *Journal, Essential Oil Research*, v.8, n.4, p.445-6, 1996.

PIZA, I. M. de T. PINHO, R. S. Protocolo de micropropagação da mandioca. In: CAGNON, J. R.; CEREDA, M. P.; PANTAROTTO, S. In *CULTURA de tuberosas amiláceas latino-americanas*. Campinas: Fundação Cargill, 2002. (Série cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas, 2).

REIS, A. C. Mapeamento cromossômico de DNA satélite e comportamento meiótico no complexo poliploide *Lippia alba* (Mill) N. E Br. 2017. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

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. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae): a new tropical autopolyploid complex? *American Journal of Botany*, v. 101, n. 6, p. 1002-1012, 2014.

REGINA SALIMENA, F. G.; EMA MÚLGURA, M.; HARLEY, R. Correspondence A new combination in Verbenaceae and a new synonym in Lamiaceae from Brazil. p. 1, 2012.

RÊGO, M. M. et al. *In vitro* induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 107, n. 3, p. 451–459, dez. 2011.

ROY, A. T.; LEGGETT, G.; A. KOUTOULIS. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Reports, v. 20, n. 6, p. 489–495, 4 jul. 2001.

SADAT NOORI, S. A. et al. Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), v. 130, n. 3, p. 543–551, set. 2017.

SANAEI-HOVEIDA, Z., Mortazavian, S. M. M., Norouzi, M., & Sadat-Noori, S. A. (2024). Elevating morphology and essential oil in cumin genotypes through polyploidy induction. Scientia Horticulturae, 329(113031), 113031. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113031>

SAJJAD, Y. et al. Effect of colchicine on *in vitro* polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*) Pak. J. Bot. 2013.

SANDERS, Theo. Hybrids of different diploid narcissus species can be fertile by generating unreduced pollen (2014).

SALMA, U.; KUNDU, S.; MANDAL, N. Artificial polyploidy in medicinal plants: Advancement in the last two decades and impending prospects. Journal of Crop Science and Biotechnology, v. 20, n. 1, p. 9–19, mar. 2017.

SANTOS, E. K. dos. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. Genética e evolução vegetal. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 415-444.

SANTOS, M.M.F.B; 1996. *Efeito de extratos de duas formas de Lippia alba sobre o fungo Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) isolado de Citrus sp.* São Paulo, 105p. Dissertação de

Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de plantas - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo.

SANTOS FILHO, Luiz Gonzaga Alves; REIS, Renata Brito; SOUZA, Ana Sheila Q.; CANUTO, Kirley Marques; BRITO, Edy Sousa; CASTRO-ARCE, Karina; PEREIRA, Alitienne Moura Lemos; DINIZ, Fábio Mendonça. Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Lippia alba* and *Lippia origanoides*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 95, n. 1, p. e20220359, 2023.

SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. Planta, v. 243, n. 2, p. 281–296, fev. 2016.

SINTA, A. F.; WIDORETNO, W. Effect of Colchicine on *In vitro* Growth and Ploidicity of Crown Vetiver Plant (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). The Journal of Experimental Life Sciences, v. 10, n. 1, p. 6–11, 30 jun. 2020.

SOARES, L. Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Br. Ex Britt. & Wills (falsa-melissa) Verbenaceae. 2001. 122p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SPOELHOF, J. P.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Pure polyploidy: Closing the gaps in autopolyploid research: Pure polyploidy. Journal of systematics and evolution, v. 55, n. 4, p. 340–352, 2017.

SALMA, U.; KUNDU, S.; MANDAL, N. Artificial polyploidy in medicinal plants: Advancement in the last two decades and impending prospects. Journal of Crop Science and Biotechnology, v. 20, n. 1, p. 9-19, 2017.

SILVA, C.J.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; PINHEIRO, A.L.; DIAS, I.; ANDRADE, N.J. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil. Química Nova, v.33, p.104-108, 2010.

TAVARES, E. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L.; LEITÃO, S. G. Kinetin enhanced linalool production by *in vitro* plantlets of *Lippia alba*. Journal of Essential Oil Research, v. 16, n. 5, p. 405-408, 2004.

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.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. *Rev Bras Farmacogn* 15: 1-5.

TAVARES, I.B.; MOMENTÉ, V.G.; NASCIMENTO, I.R. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias, v. 4, n.1, p.204–220, 2011.

VÄINÖLÄ, A. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica*.2000.

VAN DE PEER, Y.; MIZRACHI, E.; MARCHAL, K. The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics*, v. 18, n. 7, p. 411–424, jul. 2017.

VAN DE PEER, Y. et al. Polyploidy: an evolutionary and ecological force in stressful times. *The Plant Cell*, v. 33, n. 1, p. 11–26, 22 mar. 2021.

VANSTECHELMAN, I. et al. Histogenic analysis of chemically induced mixoploids in *Spathiphyllum wallisii*. *Euphytica*, v. 174, n. 1, p. 61–72, 2010

VIEHMANNOVÁ, I. et al. Induced polyploidization and its influence on yield, morphological, and qualitative characteristics of microtubers in *Ullucus tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 109, n. 1, p. 83–90, 5 nov. 2011.

VICINI, L. F.; SILVEIRA, R. S.; VALE, A. A.; CAMPOS, J. M. S.; REIS, A. C.; SANTOS, M. O.; CAMPOS, V. R.; CARPANEZ, A. G.; GRAZUL, R. M. Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). *Industrial Crops and Products*, v. 59, p. 14-19, 2014.

WEI, K.H.; XU, J.P.; LI, L.X.; CAI, J.Y.; MIAO, J.H.; LI, M.H. (2018). Indução e geração *in vitro* de plantas tetraploides de *Sophora tonkinensis* Gapnep. *Pharmacogn. Mag.* 14 149–154. 10.4103/pm.pm_170_17

WIDORETNO, W. *In vitro* induction and characterization of tetraploid Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) plant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), v. 125, n. 2, p. 261–267, 14 jan. 2016.

WISE, M.L., CROTEAU, R., 1999. Monoterpene biosynthesis. In: Cane, D.E. (Ed.), Isoprenoids Including Steroids and Carotenoids. Comprehensive Natural Products Chemistry. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 97–153.

Wolfe, K., Shields, D. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708–713 (1997).

WU, T. et al. Plant cell cultures as heterologous bio-factories for secondary metabolite production. *Plant Communications*, v. 2, n. 5, p. 100235, set. 2021.

ZAHEDI, A. A. et al. Overproduction of valuable methoxylated flavones in induced tetraploid plants of *Dracocephalum kotschy* Boiss. *Botanical Studies*, v. 55, n. 1, 4 fev. 2014.

ZHANG, X.-Y., Hu, C.-G., & Yao, J.-L. (2010). Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 167(2), 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.006>