INSTITUTO AGRONÔMICO
PÓS-GRADUAÇÃO

DISSERTAÇÃO

OBTENÇÃO DE QUIMIOTIPOS HÍBRIDOS DE *Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN

NATALIE REGINA LEOZ SCHOCKEN

Campinas, SP
2007

INSTITUTO AGRONÔMICO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

OBTENÇÃO DE QUIMIOTIPOS HÍBRIDOS DE *Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN

NATALIE REGINA LEÓZ SCHOCKEN

Orientador: Carlos Augusto Colombo

Co-orientador: Walter José Siqueira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia.

Campinas, SP
2007

Aos meus pais Ruben Pablo Schocken Iturrino e Dora Izabel Leóz Guzmán que mesmo nas dificuldades estiveram sempre ao meu lado oferecendo-me muito mais do que incentivo, mostrando-me o que é amor, dedicação e fé. Aos meus irmãos Pablo e Dany que mesmo estando longe sabiam exatamente o que acontecia no meu dia a dia, mostrando-me que a distância não é capaz de afastar.

Em especial a minha prima Mariana e a meus tios de Sorocaba que me deram exemplo vivo do que são os laços de família e o amor.

DEDICO

A Deus e a meus pais que me incentivaram e me ajudaram a alcançar muitos sonhos.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Aos meus queridos pais que me permitiram chegar até aqui me acompanhando, me ensinando, me financiando e me dando forças;

- Aos pesquisadores Carlos Augusto Colombo e Walter José Siqueira, pela paciência, confiança, amizade e ensinamento durante esses dois anos de convivência;

- Ao pesquisador Sérgio Augusto Moraes Carbonell, que me cedeu não só vasos e espaço na casa de vegetação, mas também pela amizade e ensinamentos, além de sempre estar aberto às minhas perguntas;

- Ao Dr. Antônio Augusto do Lago, que me auxiliou muito no departamento de sementes, com disponibilidade, livros e análises;

- À Dra. Cecília A. F. Pinto Maglio, por auxiliar na parte citogenética de minha tese e por ceder seu laboratório para a realização das contagens cromossômicas;

- À pesquisadora Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques, pela leitura cuidadosa do manuscrito.

- À Paula Yuri Yamamoto, que me passou todos os conhecimentos iniciais sobre as plantas, me auxiliando muito no final com sua disponibilidade;

- À Paula Nóbile, por sua amizade e disponibilidade;

- Aos professores do Instituto Agronômico de Campinas, que nos ensinaram, divertiram e mostraram que a genética vai além do fenótipo e genótipo;

- À Paula Lima, que ensina a todos o que é trabalhar com eficiência, autoridade e muita disponibilidade e bom humor!

- À Ana Luiza A. Beraldo, que com sua responsabilidade sempre esteve um passo à frente, transformando-se em nosso manual de instruções diante das dúvidas;

- Ao meu grande amigo e companheiro Thiago Mezette, que mesmo quando cansado aceitou ser arrastado pela minha insistência;

- À Giovana Matos, que parece continuar trabalhar ao nosso lado com seu companheirismo e ainda me permite achar que moramos juntas, não se incomodando com minha presença em seu sofá!

- Aos bons domingos com Du, Marcão (Batora), Gigio, Doug, Ciça, nas conversas animadas acompanhadas de uma gelada TODOS os domingos;

- Às funcionárias da Pós-Graduação do Instituto Agronômico-IAC pela ajuda constante;

- Aos meus queridos companheiros do Laboratório, Regina, Milene, Thiaguinho, Miklos, Fernanda, e Hellen, que por muitas vezes riam do meu estado após voltar do campo (Eca....);

- Em especial à minha prima Mariana, capaz de me injetar uma dose dupla de ânimo, mesmo que pelo telefone;

- E para finalizar, ao agradável aroma de minhas lipias que deixaram por muitas vezes o laboratório empestado, mesmo quando o Mercapto tentava ser exclusivo.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS vi
ÍNDICE DE FIGURAS vii
RESUMO x
ABSTRACT xi
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1 Aspectos Botânicos 3
2.2 Importância Econômica 5
2.3 Óleos Essenciais 7
2.4 Domesticação e Melhoramento Genético em *Lippia alba* 10
2.5 Germinação de sementes 13
2.6 Marcadores Moleculares de DNA 19
3 MATERIAL E MÉTODOS 21
3.1 Material 21
3.2 Caracterização Morfológica 22
3.3 Modo Preferencial de Reprodução 22
3.4 Germinação 22
3.4.1 Germinação em campo 23
3.4.2 Germinação em condições laboratoriais 23
3.4.2.1 Germinação em Câmara 23
3.4.2.2 Verificação de viabilidade das sementes 24
3.4.2.3 Desinfecção de sementes 24
3.4.3 Germinação em casa de vegetação 25
3.5 Realização dos Cruzamentos Dirigidos 27
3.6 Análise Molecular por RAPD 29
3.7 Análise Citogenética 30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 32
4.1 Caracterização Morfológica 32
4.2 Modo Preferencial de Reprodução 37
4.3 Germinação em campo 38
4.4 Germinação em condições laboratoriais 40
4.4.1 Viabilidade das sementes 43

4.4.2 Desinfecção de sementes 45
4.5 Germinação em casa de vegetação.....47
4.6 Realização dos Cruzamentos Dirigidos.....52
4.7 Análise por RAPD.....57
4.8 Análise Citogenética.....66
5 CONCLUSÕES.....70
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....71
ANEXO.....81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Número médio de frutos por infrutescência (num.Fr/Infrut) e peso de frutos por peso de infrutescência (peso Fr/peso Infr.) obtidos de diferentes quimiotipos de *L. alba* a partir de flores protegidas e não protegidas por ensacamento..... 38

Tabela 2 - Número de plantas germinadas e porcentagem de germinação de sementes de diferentes quimiotipos de *Lippia alba* submetidas ou não à escarificação. Letras semelhantes indicam que as médias são semelhantes ao nível de 5% do teste de Duncan..... 39

Tabela 3 - Testes laboratoriais de germinação de sementes de *Lippia alba* combinando fatores como temperatura, presença ou ausência de sais estimuladores em fruto e em substrato (KNO_3 e ácido giberélico) e choque térmico de frio e calor seco..... 41

Tabela 4 - Porcentagem de germinação de sementes de *Lippia alba* submetidas a tratamentos de desinfecção com hipoclorito de sódio (NaCLO) e fungicida (Thiram 700PM)..... 45

Tabela 5 - Porcentagem de germinação de sementes de *Lippia alba* submetidas a tratamentos de desinfecção com hipoclorito de sódio (NaCLO) e fungicida (Thiram 700PM) em diferentes tempos de exposição dos frutos..... 46

Tabela 6 - Avaliação por teste Tukey (5%) do efeito de diferentes concentrações de KNO_3 dentro dos diversos ambientes a que os frutos foram submetidos..... 47

Tabela 7 - Número de plantas germinadas de *Lippia alba* aos 25 dias de semeadura, para verificar a precocidade de cada um dos tratamentos..... 52

Tabela 8 - Produção total de frutos, peso de 50 frutos (gramas) e número de plantas obtidas a partir do plantio total de frutos obtidos de cruzamentos de diferentes clones de *Lippia alba*..... 53

Tabela 9 - Contagem de grãos pólen de sete genótipos de *L. alba,* sob colorimetria com carmim acético 2% (Aumento de 40X e opt 2)..... 67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da distribuição dos tratamentos realizados em casa de vegetação..... 27

Figura 2 - Mapa da área de localização dos cruzamentos biparentais de *L. alba*..... 29

Figura 3 - Caracterização morfológica de flores de *L. alba*: **a**. Inflorescência de *L. alba*. **b.** Flores individualizadas. **c.** Visualização do interior da corola com presença de tricomas e estames. **d.** Flor com abertura lateral, para visualização dos quatro estames presentes, sendo dois superiores e dois inferiores..... 33

Figura 4 - Frutos/sementes de *L. alba*. **a**. frutos do tipo esquizocárpicos separados. **b.** Fruto inteiro. **c**. Fruto individualizado e cortado para visualização do embrião. **d.** Plântula com um dia de germinação, dois cotilédones e um eixo hipocótilo-radícula pouco diferenciado..... 34

Figura 5 - Ramificações apicais dos sete genótipos usados como parentais – folhas grandes, arredondadas e internódios longos para os parentais pertencentes ao quimiotipo linalol (IAC-2, IAC-6 e IAC-8) e mirceno/cânfora (IAC-11). Os genótipos do quimiotipo limoneno/carvona (IAC-13), citral (IAC-17) e mirceno (IAC-20) apresentam folhas pequenas e alongadas em intervalos mais curtos, sendo visivelmente notados os sintomas de infecção virótica (CMV-*Cucumber Mosaic iírus*) do genótipo IAC-13, como o mosaico as distorções foliares..... 35

Figura 6 - Exposição da atividade respiratória endosperma/embrião de sementes de *L. alba* após imersão em TZ (1%). **a.** Sementes com elevada viabilidade. **b.** Coloração rosada dos embriões bastante reduzida a partir do quinto dia de coleta dos frutos. **c.** Sementes sem embriões..... 44

Figura 7 - Regressão polinomial, do número de plantas germinadas em temperatura ambiente..... 49

Figura 8 - Regressão polinomial, do número de plantas germinadas em temperatura fria..... 49

Figura 9 - Regressão polinomial, do número de plantas germinadas após aplicação de calor..... 50

Figura 10 - Regressão polinomial, do número de plantas germinadas após aplicação de frio + calor..... 50

Figura 11 - Gel de agarose 1,2% ilustrando o perfil de amplificação RAPD do quimiotipo linalol (IAC-8) e da progênie derivada da sua autofecundação obtido com o *primer* OPK-14 (*Operon Technologies*)..... 57

Figura 12 - Perfil RAPD (*primer* OPK-2) em gel de agarose 1,2% de dois parentais de *Lippia alba* (p1: IAC-2 e p2: IAC-8, ambos quimiotipo linalol) e respectiva progênie obtida do cruzamento entre ambos, representada por 12 indivíduos..... 58

Figura 13 - Gel de agarose 1,2% ilustrando o perfil de amplificação RAPD obtido com o *primer* OPK-6 (*Operon Technologies*) em *Lippia alba* de dois parentais (p1: IAC-8 e p2: IAC-17) e respectivo híbrido..... 59

Figura 14 - Resultado da RAPD em gel de agarose a 1,2%, referente ao cruzamento 5 (OPK-17), onde: p1: IAC-20 (mirceno), p2: IAC-2 (linalol) e Progênie com 27 indivíduos..... 59

Figura 15 - Gel de agarose 1,2% ilustrando o perfil de amplificação RAPD obtido com o *primer* OPK-14 (*Operon Technologies*) dos quimiotipos citral (p1: IAC-17) e limoneno/carvona (p2: IAC-13) de *Lippia alba* e o respectivo híbrido entre ambos..... 60

Figura 16 - Gel de agarose 1,2% ilustrando o perfil de amplificação RAPD obtido com o *primer* OPK-14 (*Operon Technologies*) do quimiotipo mirceno/cânfora (p⊗: IAC-11) de *Lippia alba* e a respectiva progênie obtida da sua autofecundação..... 61

Figura 17 - Gel de agarose 1,2% apresentando amplificados RAPD (*primer* OPK-14) de dois quimiotipos de *Lippia alba* p1: IAC-6 (linalol) e p2: IAC-13 (limoneno/carvona) e dois indivíduos obtidos de sementes de p1..... 62

Figura 18 - Perfis RAPD gerados a partir de diferentes *primers* evidenciando a ocorrência de contaminação de polens do clone IAC-13 no cruzamento dos clones IAC-2 e IAC-20, onde 17 é o suposto híbrido do cruzamento..... 63

Figura 19 - Dendrograma (UPGMA) realizado em *Lippia alba* com sete *primers* (*Operon Technologies Inc*): OPK-2; OPK-4; OPK-6; OPK-8; OPK-14; OPK-17 e OPF-7 a partir de similaridade genética calculada por Jaccard. **a.** Cruzamento 2 (IAC-2 x IAC-8) e progênie de 12 indivíduos; **b.** Cruzamento 5 (IAC-2 x IAC-20) com progênie de 27 indivíduos..... 65

Figura 20 - Estádios de desenvolvimento floral de *L. alba*, coletados para análise e classificados em ordem crescente de desenvolvimento em S1-S5.... 66

Figura 21 - Grãos de pólen presentes em células do botão floral de *L. alba* em S4. **a.** Variação de tamanho e coloração dos grãos de pólen. (Aumento de 40X e opt 2). **b.** Seta indicando grão de pólen viável (Aumento de 40X e opt. 1,25)..... 66

SCHOCKEN, Natalie Regina Leóz Schocken, **Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração de Melhoramento Genético vegetal) – Pós-Graduação – IAC.

RESUMO

Lippia alba (Mill) N.E. Brown (Verbenaceae) é uma espécie arbustiva há muito tempo utilizada pela medicina popular e, mais recentemente, de grande interesse aromático devido possuir quimiotipos ricos em linalol, um dos seus componentes do seu óleo essencial. Nesse sentido, o presente estudo é inédito e foi conduzido com objetivo de dar início ao seu melhoramento genético por meio da obtenção de híbridos de *L. alba* a partir do cruzamento entre diferentes quimiotipos com intenção futura de se gerar parâmetros genéticos dos componentes do seu óleo essencial, bem como identificar novas combinações de quimiotipos que possam ser de interesse industrial. Para tanto, foi necessário realizar estudos prévios básicos sobre a biologia dessa planta, do seu modo de reprodução, número e qualidade de polens produzidos e germinação de sementes, tendo em vista que essa planta é de grande capacidade de colonização por meio do fácil brotamento dos seus ramos. Os resultados gerados indicam que a espécie é preferencialmente alógama, que o número e qualidade de polens apresentaram-se diferenciados entre os quimiotipos do estudo e que suas sementes apresentam dormência e baixas taxas de germinação nas diversas condições em que foram avaliadas. Os melhores tratamentos para aumento dos níveis de germinação foram obtidos com choque de frio, luminosidade alternada (20 horas de luz e 8 horas de escuro) e presença do estimulador de germinação KNO_3 aplicado ao substrato, sobretudo para as condições de laboratório, pois esse fator não respondeu nas condições de casa de vegetação. Em relação aos cruzamentos biparentais, foram obtidos híbridos entre os quimiotipos linalol x citral, linalol x mirceno, citral x limoneno-carvona e, linalol x limoneno-carvona, sendo que o quimiotipo linalol apresentou melhor comportamento nos cruzamentos realizados, medido pelo número e peso de frutos produzidos e, em contrapartida, os frutos obtidos de autofecundações produziram menor número e menor taxa de germinação de sementes.

Palavras-Chave: ***germinação, óleos essenciais, grãos de pólen, híbridos, RAPD***

SCHOCKEN, Natalie Regina Leóz Schocken, **Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração de Melhoramento Genético vegetal) – Pós-Graduação – IAC.

ABSTRACT

Lippia alba (Mill) N.E. Brown (Verbenaceae) is an arbustive species used for years in popular medicine and that has lately been of great aromatic interest due to the presence of chemotypes rich in linalool, one of the components of its essential oil. The present study is the first one to deal with this subject and it was conducted aiming to initiate the plant breeding program through the production of *L. alba* hybrids from different chemotypes crossing, intending to generate genetic parameters of its essential oil components as well as to identify new chemotypes combinations of industrial interest. To do so, previous studies about the biology of this plant, its reproduction, number and quality of produced pollens and seeds germination were done, remembering that this plant has a great colonization capacity due to the fragmentation of its branches. The results obtained indicate that the species is mostly allogamous; the number and quality of its pollens are different among the study chemotypes and that its seeds present dormancy and low germination rates in the several conditions evaluated. The best treatments for increasing germination levels were obtained with frozen shock, alternate luminosity (20 hours in the light and 8 hours in the dark) and presence of germination stimulator KNO_3 applied to the substrate, specially for laboratory conditions since this factor was not relevant in greenhouse conditions. Regarding the biparental mating, hybrids were obtained between the chemotypes linalool x citral, linalool x mircene, citral x limonene-carvone, being the linalool chemotype the one which presented the best behavior in the crossings done, analyzed by the number and weight of the produced fruits. Nevertheless, the fruits obtained by self-fecundation have produced less seeds and a lower rate of germination.

Keywords: germination, essential oils, pollen grains, hybrids, RAPD

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui rica diversidade de plantas com mais de 55.000 espécies de plantas superiores catalogadas, distribuídas nos seus diversos biomas (Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, etc.). Estima-se que 10 mil delas possuam interesse medicinal ou aromático. Diante da riqueza da sua diversidade vegetal, o Brasil assume extrema responsabilidade na preservação e exploração sustentável do seu patrimônio genético (PRANCE, 1977).

A procura do mercado mundial por produtos de origem natural, em substituição aos sintéticos, aumenta consideravelmente ano após ano. O mercado mundial de fitoterápicos é da ordem de 20-40 bilhões de dólares por ano e o de cosméticos da ordem de US$ 2,6 a 2,8 bilhões ao ano (SIMÕES *et al.,* 2000).

Dentre as plantas de uso popular encontra-se a *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown que é uma planta da família Verbenaceae, originária da América do Sul e de ampla distribuição no Brasil, sobretudo na região Centro Sul onde a Mata Atlântica foi tão abundante. É uma planta rústica de no máximo 2m de altura, de porte arbustivo, ciclo perene e hábito predominantemente prostrado (SALIMENA, 2000). Apresenta alta capacidade de multiplicação por meio do fácil enraizamento dos seus ramos, o que favorece a sua capacidade de colonização. No entanto, é bastante sensível à falta de água. Outra característica da espécie é possuir elevada concentração de tricomas nos ramos e na superfície abaxial das suas folhas (SANTOS-MENDES 2001; EHLERT, 2003).

A espécie encontra-se amplamente difundida em quintais de todo o Brasil e muito utilizada na preparação de chás. Devido possuir, entre seus quimiotipos, o citral como principal componente do seu óleo essencial, é também chamada de erva cidreira, tal como a espécie gramínea que também leva esse nome e que possui semelhante aroma e paladar do seu chá (JULIÃO *et al*., 2001). O uso popular de *Lippia alba* para fins terapêuticos representa o ponto de partida para um futuro uso fitoterápico da espécie, bem como, a síntese de compostos bioativos na área farmacêutica.

Existem diferentes formas de utilização de folhas de *L. alba*, tais como: infuso, tintura, banhos, cataplasmas e inalação sendo que a aplicação inclui tratamento de desordens gastrointestinais (CÁCERES *et al*., 1991; HEINRICH *et al*., 1992), doenças

respiratórias (CÁCERES *et al*., 1991), dores de estômago e de garganta, problemas hepáticos e gastrite, e intoxicações em geral (DI STASI *et al*., 1989).

Através da técnica de destilação por arraste a vapor pode-se obter a partir das folhas de *L. alba* os óleos essenciais, matérias primas amplamente empregadas na formulação de produtos pelas indústrias alimentícia, higiene pessoal, cosmética e farmacêutica.

GOMES (1990), através de análise por cromatografia gasosa do óleo essencial de *L. alba,* obteve como principais componentes terpineno, ρ-cimeno, β-cariofileno, mirceno, geranial e neral; comprovando, ainda, a predominância de compostos aminados, esteroidais, terpênicos e fenólicos.

O óleo essencial de *L. alba* apresenta diversos quimiotipos, sendo que os designados linalol, citral e carvona são os mais consagrados em literatura científica. Estes produtos são secretados pelos tricomas glandulares e pelas células do parênquima clorofiliano (RICCIARDI *et al*., 1999).

Muitas expedições de coleta têm sido realizadas no Brasil nesta última década com a finalidade de gerar bancos de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais com o objetivo de conhecer a variabilidade química e as interações de natureza genético-ambiente na composição química de óleos essenciais (quimiotipos). Apesar da enorme importância sócio-econômica e ao valor agregado que se tem nas espécies de plantas aromáticas e medicinais, estudos de variabilidade genética vinculada às análises de perfil fitoquímico bem como de outros aspectos como morfologia, biologia reprodutiva, pragas e doenças e, principalmente, trabalhos de melhoramento genético, são ainda muito incipientes no Brasil.

Nesse sentido, o presente estudo é pioneiro na espécie e tem como objetivo conhecer aspectos da reprodução da planta, identificar melhores métodos de germinação e obtenção de plântulas originadas a partir de sementes, obter progênies de cruzamentos dirigidos (dentro e entre quimiotipos), confirmar a natureza híbrida das plantas obtidas pelos cruzamentos por meio de marcadores RAPDs.

Estas informações permitirão que se inicie o melhoramento genético da espécie *L. alba*, com vistas à criação de novos materiais genéticos, ou seja, novos quimiotipos híbridos de maior valor industrial, com vistas à uma exploração sustentável.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Botânicos

O gênero *Lippia* foi primeiramente descrito em 1.753 por Linnaeu e pertence à família Verbenaceae (BRANDÃO, 2003), que reúne cerca de 200 espécies em três centros de diversidade, sendo o Brasil o maior deles, com 111 espécies (SALIMENA, 2000; GUPTA *et al*., 2001). A espécie *L. alba* apresenta ampla distribuição em grande parte da América do Sul, de onde é originária. Hoje sua distribuição abrange também a América Central, Flórida, Texas (PASCUAL *et al*., 2001a; MARTINS *et al*., 1995) e oeste da Índia (TUCKER & MACIARELLO, 1999).

L. alba é uma planta rústica de no máximo 2m de altura (SALIMENA, 2000), de porte arbustivo, muito ramificada, de ciclo perene e crescimento rápido com vasta colonização por meio de enraizamento natural dos ramos em contato com o solo (BIASI & COSTA, 2003; EHLERT, 2003). Apresenta hábito predominantemente prostrado ou subarbustivo, decumbente e de elevado potencial colonizador, podendo ser encontrada em solos arenosos, margens de rios, açudes, lagos e lagoas. Pode ser encontrada em regiões de clima temperado e subtropical, porém apresenta preferência por regiões de clima tropical (STEFANINI *et al*., 2001; CORREA *et al*., 1994).

Suas folhas são simples, inteiras, serrilhadas, oblongas agudas, opostas, ocorrendo geralmente em número de duas folhas por nó. São ainda membranáceas, pecioladas, pubescentes, com aroma cítrico (CASTRO, 2001). Suas inflorescências são violáceas, rosas ou brancas, membranáceas, acrescentes na frutificação, formando com o cálice frutífero uma unidade dispersora adaptada à anemocoria (SALIMENA, 2002) e encontram-se reunidas em capítulo axial apresentando eixo curto e disco central de flores liguladas (PIO CORRÊA, 1984). Segundo CORRÊA (1992), a espécie pode florescer o ano todo.

Popularmente, *L. alba* recebe diversas denominações, como alecrim-do-mato, erva-cidreira, falsa-melissa, salva-limão entre outras (MING, 1992; MARTINS *et al*., 1995). Via de regra é confundida com a verdadeira erva-cidreira ou melissa (*Melissa officinalis*), isso ocorre devido à presença de substâncias como o citral e a citronelal, as quais conferem o odor cítrico característico da planta (BIASI & COSTA, 2003; PASCUAl *et al*., 2001a).

O elevado número de táxons descritos para o gênero, incluindo espécies, variedades e formas botânicas sem um posicionamento infragenérico contribuem para muitas dificuldades de classificação botânica do gênero *Lippia,* cuja taxonomia tem se mostrado bastante confusa seguindo princípios distintos. Segundo SALIMENA (2002b), os primeiros trabalhos taxonômicos para o gênero foram propostos por SCHAUER (1847), que reconheceu cinco seções. Posteriormente, MOLDENKE (1965) propôs duas novas subseções, baseado em diferenças na coloração das brácteas, organização das inflorescências e distribuição geográfica. Mais recentemente, TRONCOSO (1974) considerou 8 seções para o gênero, levando em consideração a morfologia das inflorescências e brácteas e subdividiu o gênero *Lippia* em *Acantholippia* Griseb., *Aloysia* Ort. & Palau, *Phyla*Lour. e *Xeroaloysia Troncoso* (*apud* SALIMENA 2002b).

Segundo SALIMENA (2002b) em 2002, SILVA & SALIMENA transferem para o gênero *Lippia* todas as espécies de *Lantana* sect. Sarcolippia, baseado nas características do fruto. Novos sinônimos foram ainda propostos por MÚLGURA DE ROMERO & SALIMENA-PIRES (1997) baseados em distintos estádios fenológicos, o que vem demonstrar a complexidade dos problemas taxonômicos do gênero. Desta forma, a comunidade científica conferiu diversas sinonímias à *L. alba* (Mill.) N. E. Brown, podendo receber o nome de *L. germinata*, *L. microphylla* Griseb, *L. germinata* H.B.K, *L. glabriflora* Kuntze, *L. lantanoides* Coult, *Lantana alba* Mill e *Phyla germinata* H.B.K. (PASCUAL *et al*., 2001a).

Estes problemas e complexidade na taxonomia do gênero decorrem de que além da variação química, os diferentes quimiotipos de *L. alba* também apresentam variações morfológicas (SOUZA, 2006), sobretudo devido à sua grande plasticidade fenotípica, que muitas vezes gera dificuldades na correta identificação da espécie (CORREA *et al.,* 1994).

BRANDÃO (2003), em estudos de citogenética comparativa entre os gêneros *Lippia, Lantana* e *Aloysia*, concluiu que *Lippia alba* é espécie diplóide que apresenta 2n=30. No entanto, segundo TAVARES *et al. (*2003), ocorrem diferenças no número de cromossomos encontrado dentro da espécie. Estes autores realizaram estudo com dois quimiotipos de *L. alba*, constatando por análise de cromossomos mitóticos que uma das formas apresentava 2n=30, enquanto que outra apresentava 2n=60, concluindo que seriam diplóide e tetraplóide, respectivamente.

Por outro lado, PIERRE (2004), ao estudar a cariologia de 3 quimiotipos de *L. alba* (citral, carvona e linalol), observou que estes se apresentam diferentes em relação ao número e morfologia dos cromossomos, havendo constatado que o quimiotipo citral apresenta 2n=30 cromossomos, ao passo que o quimiotipo carvona, tem número cromossômico de 2n=60, inferindo que este poderia ser um autopoliplóide do quimiotipo citral. Com relação ao quimiotipo linalol, observou que ocorre uma grande variação numérica dentro dos próprios indivíduos, 2n=12 a 2n=60, tratando-se, portanto, de um quimiotipo mixoplóide.

PIERRE *et al. (*2004), através da técnica de FISH, também conseguiram demonstrar que a espécie *L. alba* tem origem alopoliplóide, analisando plantas com diferentes números de cromossomos, que puderam ser classificadas nos quimiotipos 1-citral e 2-linalol. O trabalho desses autores permitiu comprovar que boa parte da variação existente na espécie decorre de variações cariotípicas.

Segundo TAVARES *et al. (*2003), as diferenças anatômicas, morfológicas e fisiológicas que causam tantas controvérsias na taxonomia poderiam ser explicadas pelos diferentes graus de ploidia existente na espécie. Além disso, a espécie é considerada de grande plasticidade fenotípica, ou seja, o ambiente em que a planta se encontra pode determinar seu hábito de crescimento, constituição fitoquímica, forma e coloração das folhas, dificultando sua classificação.

2.2 Importância Econômica

A utilização de plantas aromáticas e medicinais pela população mundial é crescente e, segundo MARTINS *et al. (*1995), as substâncias químicas responsáveis pelo efeito terapêutico representam o ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos que movimentam milhões de dólares por ano (SIMÕES *et al.*, 2000).

Em 1988, a CIPLAN (Comissão Internacional de Planejamento e Coordenação) implantou a fitoterapia nos serviços da saúde como prática oficial da medicina e orientou as Comissões Institucionais da Saúde (CIS) a incluírem tais tratamentos no Sistema Único de Saúde (SCHEFFER *et al*., 1992).

Segundo BARRACA (1999), uma planta é classificada como medicinal por possuir substâncias que têm ação farmacológica, denominadas de princípios ativos. A espécie *L.*

alba é bastante utilizada na medicina popular devido possuir atividades farmacológicas que têm despertado o interesse de pesquisadores. Segundo MING (1992), esta espécie é muito promissora para as indústrias farmacêutica, de aromas e perfumaria, além de indicar uma possível aplicação em indústrias de defensivos, de acordo com suas atividades fungitóxica, inseticida e repelente, comprovadas cientificamente (RAO *et al.,* 2000; SANTOS-MENDES, 2001).

O grande potencial sócio-econômico da espécie está ainda nas amplas formas de uso, tais como: infuso, tintura, banhos, cataplasma e inalação, sendo que a aplicação inclui tratamento de desordens gastrointestinais (HEINRICH *et al*., 1992), doenças respiratórias (CÁCERES *et al*., 1991), dores de estômago e de garganta, problemas hepáticos e gastrite, intoxicações em geral (DI STASI *et al*., 1989), anti-inflamatória (SLOWING BARRILAS, 1992), fungitóxica (DWIVEDI & KISHORE, 1990; KISHORE & MISHRA, 1991; SANTOS-MENDES, 1996) e inseticidas (GUPTA *et al*. 2001).

Além disso, a *L. alba* também apresenta grande interesse na farmacologia por apresentar propriedades antimicrobiana, antiviral, citostática e anticonvulsante (ABAD *et al*., 1995; BARROS VIANA *et al*., 2000).

Em *L. alba,* as substâncias responsáveis pelas propriedades aromáticas e terapêuticas são secretadas pelos tricomas glandulares e pelas células do parênquima clorofiliano da planta (CASTRO, 2001). As substâncias mais importantes do seu óleo essencial e que são mais freqüentemente relatadas são: linalol, citral (neral e geranial), limoneno, carvona, cariofileno, β-mirceno, cânfora, 1,8-cineol, germacreno e alfa-fencheno. O linalol, por exemplo, é um monoterpeno extensivamente utilizado na fabricação de perfumes, a exemplo do Chanel n°5 (na forma de óleo essencial bruto), assim como na produção de outros cosméticos e aromatizantes; com participação ainda na rota da vitamina E (FRIGHETTO & OLIVEIRA, 1998).

O mercado internacional de óleos essenciais corresponde atualmente a US$ 1,8 bilhões, sendo que a participação do Brasil nesse montante é estimada em apenas 0,1%, principalmente em razão da exportação de óleos de laranja, limão, eucalipto, pau-rosa, lima e capim-limão (*Lippia sidoides*) (YAMAMOTO, 2006).

O comércio de medicamentos com base em vegetais corresponde a 30% dos US$ 300 bilhões movimentados no mercado geral de medicamentos (BARRACA, 1999).

Segundo o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, durante o período de 01/2006 à 12/2006 o Brasil exportou 29.276.415 (peso líquido em Kg) de óleo essencial por um valor de US$ 78.124.202 (FOB) e importou no mesmo período 2.169.591 (peso líquido em Kg) por US$ 36.827.140 (FOB) (SISTEMA ALICE - SECEX). Estes números têm despertado o interesse da comunidade científica que está cada vez mais organizada para desenvolver estudos de novos óleos com vistas a futuras exportações. Conseqüentemente, agricultores e novos investidores estão atentos na busca de informações, pois assim como na grande parte das espécies nativas, os estudos em *L. alba* são limitados. A busca atual refere-se ao esclarecimento sobre os efeitos dessas substâncias, assim como o potencial de outras ainda não catalogadas, segundo o interesse das indústrias de cosméticos, farmacêutica e perfumaria, além de visar à qualidade em seu uso popular.

2.3 Óleos Essenciais

O conhecimento e o uso dos óleos essenciais reportam à antiguidade, na Índia, cerca de 1000 a.c., quando os anciãos utilizavam diversas essências em rituais religiosos. Nos escritos do grego Theophrastus, cerca de 287 a.c., já se mencionava o uso de plantas para a obtenção de seus óleos essenciais (SILVA, 1996).

Os óleos essenciais são líquidos voláteis dotados de aroma forte, característico e quase sempre agradável (BARRACA, 1999). Podem ser abundantemente encontrados em gimnospermas dicotiledôneas e encontram-se presentes em diversas famílias botânicas (SIMÕES & SPITZER, 1999). São misturas complexas que podem conter até 100 ou mais compostos. Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropanóides são as classes mais comumente encontradas. O estudo destes compostos orgânicos é de fundamental importância no entendimento da aplicação dos mesmos (MACIEL *et al*., 2004).

As substâncias químicas presentes nos óleos essenciais de aromáticas e medicinais são produzidas pelo metabolismo secundário das plantas e os princípios ativos ou compostos orgânicos são produzidos em rotas metabólicas constitutivas e principalmente relacionadas à diferenciação e desenvolvimento dos vegetais (ontogenia) (GARDNER *et a*l., 1991), podendo estar condicionados a diversos fatores estressantes, como aumento de temperatura, seca, doenças, entre outros (SIMÕES & SPITZER, 1999).

CASTRO (2001) e EHLERT (2003) ressaltam que várias são as hipóteses da relação entre os organismos e seus compostos secundários, mostrando que a função destes ainda não está completamente esclarecida, havendo autores que relatam que estes compostos funcionam como precursores de defesa da planta, que freqüentemente podem servir para atrair ou repelir diferentes visitantes e que estão relacionados a respostas fisiológicas e bioquímicas do ambiente, entre outros. Apesar do pouco conhecimento da função biológica destes óleos nas plantas, sabe-se que estes princípios ativos possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie (DENNIS & TURPIN, 1990).

Geralmente, os óleos essenciais não se encontram na planta em estado puro, mas sob a forma de mistura complexa de substâncias, cujos diferentes componentes se completam e reforçam sua ação sobre o organismo. No entanto, mesmo quando a planta medicinal apresenta apenas uma substância ativa, esta tem sobre o organismo humano um efeito mais benéfico do que aquele produzido pela mesma substância obtida por síntese química, ou seja, sintético (BARRACA, 1999). Ainda segundo o autor, é nisso que reside a grande vantagem da medicina natural, pois a substância ativa não é unicamente um composto químico, mas apresenta também um equilíbrio fisiológico, sendo dessa forma mais bem assimilada pelo organismo, não provocando efeitos nocivos.

A produção e o controle destas substâncias químicas nas plantas são feitos pelas proteínas, incluindo-se as enzimáticas, que são catalisadores biológicos específicos e que atuam nas reações químicas vitais da planta (SALISBURY & ROSS, 1992). Tais proteínas são codificadas por genes específicos, cuja expressão diferencial é controlada por diferentes estágios de desenvolvimento e por influência do meio ambiente (GARDNER *et al*., 1991).

Deve-se ressaltar ainda que os óleos essenciais não se distribuem de maneira homogênea na planta e podem estar concentrados nas raízes, rizomas, talos, caules, folhas, sementes ou flores. O teor destes varia de acordo com a idade, época do ano, solo ou clima onde a planta vive (MENTZ, 1996) e podem ser encontrados com maior facilidade nas partes verdes, devido às rotas metabólicas da fotossíntese (BARRACA, 1999).

As estruturas especializadas por secretar os óleos essenciais podem variar de acordo com a família e gênero da planta, além de que a quantidade e qualidade destes podem estar relacionadas ao tipo de estrutura secretora e sua freqüência (CASTRO, 2001). Em *L. alba*

sabe-se que a secreção dos óleos essenciais se dá através dos tricomas secretores capitado, tricomas tectores e ainda em células do parênquima (CASTRO, 2001; SANTOS-MENDES 2001; EHLERT, 2003).

Nesta espécie os óleos essenciais são produzidos principalmente pelas folhas em resposta aos estresses ambientais e são compostos principalmente por mono e sesquiterpenos (hidrocarbonetos), podendo ser extraídos de matéria seca ou fresca através de hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor (SANTOS-MENDES, 2001). Entre esses terpenos o linalol, 1,8-cineol, carvona, limoneno, mirceno, cariofileno, cânfora, germacreno e citral ocorrem com maior freqüência (MATOS *et al*., 1996; JULIÃO *et al*., 2001), apesar de dezenas de outras substâncias já terem sido relatadas na literatura.

O fato de o metabolismo secundário ser regulado geneticamente (provavelmente um caráter poligênico) e estar intimamente associado a mecanismos de defesa das plantas e sofrer grande interação com ambiente onde a planta se desenvolve provoca alterações significativas no rendimento e composição de seus óleos (MING, 1992; SANTOS-MENDES, 2001; BANDONI, 2005). Análises feitas por FONTANEL & TABATA (1987) revelaram variações químicas entre diferentes formas botânicas de *L. alba* de origens distintas e cultivadas em diferentes localidades, sobretudo na composição relativa dos componentes do óleo essencial.

TAVARES *et al. (*2005) não observaram variação química e morfológica em estudo realizado com três diferentes quimiotipos de *L. alba* (citral, carvona e linalol) obtidos de diferentes procedências, mesmo quando submetidos às mesmas condições ambientais de casa de vegetação, assim como YAMAMOTO (2006), em estudo com diversos genótipos de linalol, mirceno/cânfora, limoneno/carvona e citral, não observou variação da composição do óleo essencial dos quimiotipos plantados em três regiões climaticamente distintas.Tal evidência indica que as variações dos componentes presentes no óleo essencial de *L. alba* são majoritariamente de natureza genética e não ambiental, sendo esta última responsável por alterações da quantidade do óleo essencial produzido do que na sua composição química.

2.4 Domesticação e Melhoramento Genético em *Lippia alba*.

Praticamente não há relatos em literatura sobre a sua biologia reprodutiva, germinação de sementes, dormência, cruzamentos naturais em *L. alba*. Porém, quando se pensa no planejamento e desenvolvimento de um programa de melhoramento genético, bem como para compreensão do seu processo de domesticação, estes aspectos da biologia da planta são de fundamental importância, pois auxiliam na definição ou adoção de técnicas ou metodologias mais apropriadas para o seu melhoramento genética (ALLARD, 1971; ALMEIDA *et al.*, 2004, BORÉM, 2005). Segundo SEBBENN *et al. (*2000), tais aspectos também determinam como os genes são recombinados e mantidos pela espécie para a criação e manutenção da sua variabilidade genética natural, base do seu continuo potencial evolutivo.

No Brasil, quase todas as plantas medicinais não são cultivadas e se encontram em estado totalmente selvagem, crescendo espontaneamente, a exemplo da *L. alba,* o que desperta o interesse por estudos de qualquer natureza que possam trazer benefícios à exploração comercial das mesmas . No caso da *L. alba*, o seu potencial agro-industrial está associado às grandes facilidades agronômicas que ela apresenta, ou seja, rusticidade, rapidez de colonização, propagação vegetativa, alogamia, plasticidade fenotípica além de vegetar e florescer o ano todo. O seu melhoramento genético pode resultar em um produto com sustentabilidade na exploração comercial e, ainda, se consolidar como mais uma espécie para agricultura familiar (YAMAMOTO, 2006).

Contudo, para efetivação de qualquer programa de melhoramento genético de uma espécie, é fundamental o conhecimento dos níveis e da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de sua população. Por sua vez, a existência de estruturação genética da espécie é resultado da interação de vários fatores reprodutivos e evolutivos (seleção, deriva genética, fluxo gênico). De fundamental importância é conhecer o sistema de cruzamento da espécie, dado este que determina como os genes são transmitidos de uma geração para outra e como são reorganizados nos indivíduos. Portanto, também determina sua estrutura genética espacial e temporal (SEBBENN *et al.*, 2000).

Nas plantas medicinais, os diferentes quimiotipos são denominados de acordo com a composição química majoritária dos componentes do óleo essencial. No Brasil, com base nestas variações qualitativas e quantitativas, atualmente destacam-se três quimiotipos

principais de *L. alba*, denominados de citral, carvona e linalol (SOUZA, 2006). Segundo SIMÕES & SPTIZER (2000) e ROSSATO *et al. (*2006), as variações que ocorrem nos quimiotipos e que usualmente ocorrem de forma natural em plantas silvestres, podem em parte resultar de polinização cruzada.

Estudos recentes têm demonstrado que a composição majoritária dos componentes que caracterizam os quimiotipos de *L. alba* é resultado sobretudo de natureza genética dos genótipos, com menor influência por parte do ambiente (VENTRELLA, 2000; GUPTA *et al*., 2001; TAVARES *et al.,* 2003; YAMAMOTO, 2006; SOUZA, 2006; VICCINI, *et al*., 2006).

Em se tratando de melhoramento genético de espécies cuja biologia reprodutiva é desconhecida e onde há interesse em se realizar cruzamentos entre genótipos, uma das questões fundamentais que se coloca é relativa à compatibilidade gamética. Nesse sentido, conhecimentos de citogenética têm contribuído para um melhor entendimento dos recursos naturais disponíveis com vistas à conservação ou exploração dos mesmos. Várias metodologias podem ser utilizadas a fim de ajudar a diferenciação ou mesmo a caracterização das espécies ou grupos em estudo, tais como identificação do número cromossômico, análise de cariótipo, estudo da heterocromatina através das técnicas de bandeamento C e fluorocromos e detecção da região organizadora do nucléolo (NOR), através das técnicas de impreganação por planta (Ag-NOR) e hibridação *in situ* fluorescente (FISH), além da detecção de seqüências de DNA repetitivo, como rDNA 5S (BRANDÃO, 2003). A citogenética permite ainda, através de análises em células meióticas, estudar o comportamento cromossômico, verificar o nível de ploidia, identificar híbridos e verificar a regularidade no processo de reprodução sexuada, através da fertilidade.

Estudos citogenéticos recentes com os quimiotipos citral, carvona e linalol de *L. alba* mostram que o número cromossômico é maior do que se esperava e que os quimiotipos apresentam diferentes padrões cromossômicos (TAVARES *et al.,*2003; VICCINI *et al.,* 2006 e SOUZA, 2006). De forma geral, o quimiotipo citral possui 2n=30 cromossomos, ao passo que o quimiotipo carvona apresenta número cromossômico de 2n=60. Por outro lado, com relação ao quimiotipo linalol, nota-se uma grande variação numérica dentro dos próprios indivíduos estudados, 2n=12 a 2n=60. (TAVARES *et al.,* 2003).

Em seus estudos, TAVARES *et al. (*2003) e PIERRE (2004, *apud* SOUZA, 2006), concluem que o quimiotipo citral é diplóide, ao passo que o carvona é um tetraplóide. Quanto ao quimiotipo linalol, ocorrem ainda controvérsias, porém PIERRE (2004) afirma que este seja um mixoplóide e infere ainda que o quimiotipo carvona poderia ser um autopoliplóide derivado do quimiotipo citral.

Segundo VICCINI *et al. (*2006), parte destas variações nas combinações cromossômicas pode ser decorrente de hibridações naturais seguidas de duplicação. Outra possibilidade é que ocorra um segundo ciclo de poliploidia. De qualquer forma o baixo número de espécies estudadas não deixa claro qual o número básico de cromossomos da espécie.

Segundo TAVARES *et al. (*2003), um aumento nível de ploidia também aumenta a atividade metabólica e os padrões de expressão gênica podem ser alterados. Neste contexto, deve-se ressaltar que a taxa de variação do princípio ativo em uma espécie medicinal deve ser muito pequena para que o medicamento ou outro produzido a partir desta matéria prima seja seguro e eficaz (LIMA *et al.,* 2003). Portanto, a identificação e a correta classificação são de grande importância para a manutenção da qualidade, planejamento de cultivo e para a obtenção de fitofármacos para que não prejudiquem a saúde de quem venha a utilizá-los (PASCUAL *et al.,* 2001b).

Uma das causas de sucesso em hibridações controladas é viabilidade do pólen utilizado nos cruzamentos. Não são raras as situações em que o pólen não apresente boa viabilidade pelas mais diversas causas, sendo muitas vezes de natureza genética ou devido à não-coincidência de floração entre os materiais utilizados (EINHARDT *et al.,* 2006). Para ALI *et al.* (1983), pequenas diferenças no tempo de florescimento e características de viabilidade e germinação do grão de pólen provavelmente teriam influência considerável na produção e qualidade final das sementes.

Segundo FLANKLIN *et al.* (1995), a análise da fertilidade do pólen é condição preliminar indispensável ao melhoramento genético clássico, sendo fundamental para os estudos da biologia reprodutiva e desenvolvimento de programas de melhoramento genético.

2.5 Germinação de Sementes

A grande maioria das sementes das plantas germina prontamente quando lhes são oferecidas condições ideais de água, luz e temperatura, principalmente em se tratando de plantas de clima temperado. Porém, quando as sementes não germinam, embora colocadas sob condições favoráveis à sua germinação, elas são denominadas "dormentes" (POPINIGIS, 1977). Plantas nativas de importância medicinal e fitoquímica carecem de estudos científicos sobre métodos de propagação, germinação, sanidade e conservação das sementes. Essa deficiência retarda o emprego de tecnologias adequadas à exploração econômica racional e preservação das espécies (CORREA *et al.,* 1994; FANTINATTI *et al.* 2005).

Nas plantas medicinais e aromáticas não domesticadas, a característica de dormência é encontrada com grande freqüência (BANDONI, 2005). Na maioria dos casos, a dormência destas espécies pode ser quebrada por meio de maior exposição da semente à luz, cuja resposta depende da embebição, que por sua vez, está diretamente ligada à temperatura, pois esta influencia a velocidade de embebição por parte da semente (POPINIGIS, 1977; AOYAMA et al., 1996). E ainda, segundo estes últimos autores, a germinação só ocorrerá quando pelo menos dois destes requisitos forem satisfeitos e ainda quando as condições forem favoráveis não somente para germinação, mas também para o desenvolvimento e crescimento da futura plântula.

A germinação é uma seqüência de eventos fisiológicos influenciada por fatores externos (ambientais) e internos (dormência, inibidores e promotores da germinação) às sementes, cada fator podendo atuar por si ou em interação com os demais (NASSI & VIEIRA, 1998). O embrião de uma semente inicia sua formação no momento da fertilização do óvulo e desenvolve-se durante a maturação, até que seu crescimento cessa e o teor de umidade diminui a um nível tão baixo, que permite apenas reduzida atividade metabólica. Nestas condições, a semente encontra-se no estado de quiescência. A germinação é o reinício do crescimento do embrião paralisado nas fases finais de maturação (POPINIGIS, 1977).

Dentre os principais fatores que afetam a germinação pode-se citar: luz, temperatura, água, oxigênio, práticas de manejo durante e pós-colheita, grau de maturidade e genótipo (NASSI & VIEIRA, 1998). MARCOS-FILHO (2005) ressalta como

imprescindíveis a água, a temperatura e o oxigênio, não incluindo a luz como fator primordial, pois tratando-se de um agente de superação de dormência, a germinação poderá ocorrer tanto na ausência quanto na sua presença, desde que os mecanismos de bloqueio estejam desativados.

Do ponto de vista puramente fisiológico, a germinação compreende a embebição de água, o alongamento das células, a divisão e a diferenciação celular. Para que ocorra a germinação algumas condições devem ser satisfeitas, tais como viabilidade, condições internas (livre de dormência); condições ambientais favoráveis; e sanidade (livre de patógenos) (POPINIGIS, 1977; MARCOS-FILHO, 2005).

O processo germinativo envolve várias etapas e cada uma destas exige determinada temperatura para que se processe de maneira rápida e eficiente. Assim, os efeitos da temperatura sobre a germinação refletem apenas a conseqüência global, não havendo um coeficiente único que caracterize a germinação (NASSI & VIEIRA, 1998). MARCOS-FILHO (2005) destaca que, no processo de germinação ocorre uma série de atividades metabólicas, baseadas em reações químicas e que cada uma delas apresenta determinadas exigências quanto à temperatura, principalmente porque dependem da atividade de sistemas enzimáticos que estão relacionadas à temperatura e ainda à disponibilidade de oxigênio.

Referente à sensibilidade luminosa, existe uma ampla variação nas respostas germinativas. No início do século XX foi descoberto que a germinação de algumas espécies era inibida pela luz, enquanto que em outras a germinação era promovida (NASSI & VIEIRA, 1998).

A grande maioria das plantas cultivadas germina tanto em escuro quanto em presença de luz, porém a exigência de luz para germinar está relacionada a algum tipo de dormência em determinadas espécies (POPINIGINS, 1977; BRASIL, 1992). Esse comportamento é denominado de comportamento fotoblástico e é uma importante característica na determinação da distribuição espacial de uma espécie no ambiente (FERREIRA & RANAL, 1999).

As sementes são classificadas como fotoblásticas positivas ou negativas. O fotoblastismo positivo das sementes pode desaparecer com processos de escarificação, estratificação, por ação da temperatura, armazenamento a seco, com aplicação de nitrato de potássio ou de giberelinas (BEWLEY & BLACK, 1994), desta forma mesmo quando a luz

não é indicada, a iluminação pode ser aplicada durante testes de germinação, pois favorece o desenvolvimento de estruturas essenciais e reduz a possibilidade de ataque por microrganismos (BRASIL, 1992).

Em relação à temperatura, as sementes apresentam capacidade germinativa em limites bem definidos, variável de espécie para espécie. A germinação depende da temperatura e geralmente três pontos críticos podem ser identificados, temperatura mínima, ótima e máxima, estas são denominadas "temperaturas cardinais". A temperatura ótima é aquela em que a maior germinação é alcançada no menor tempo (POPINIGIS, 1977).

Segundo o Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais, há espécies que respondem bem tanto à temperatura constante como alternada. A alternância de temperatura corresponde, provavelmente, a uma adaptação às flutuações naturais do ambiente. Para a maioria das espécies tropicais a temperatura ótima de germinação encontra-se entre 15 e 30ºC. A máxima varia entre 35 e 40ºC, podendo a mínima chegar a ponto de congelamento.

MARCOS-FILHO (2005), ressalta que as espécies que exigem temperaturas alternadas são principalmente aquelas que não foram submetidas a processo intenso de domesticação, como várias gramíneas forrageiras. Esse comportamento geralmente está associado a espécies que apresentam dormência, porém a alternância também pode beneficiar aquelas que não possuem este problema. As razões que determinam os efeitos de alternância de temperatura ainda não são totalmente conhecidas, mas supõe-se que haja uma relação de balanceamento entre promotores/inibidores de germinação.

Quanto ao fator água e sua influencia na germinação, sabe-se que a velocidade de absorção varia de espécie para espécie, sendo influenciado ainda pelo potencial fisiológico da semente, porosidade, temperatura e disponibilidade. Dos fatores ambientais citados, a água é a que mais influencia o processo de germinação, pois com a absorção de água ocorre a reidratação dos tecidos e, conseqüentemente, a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que resultam no fornecimento de energia e nutrientes para retomada de crescimento do eixo embrionário (POPINIGIS, 1977).

O conhecimento de como os fatores ambientais influenciam a germinação das sementes é de extrema importância, assim, eles poderão ser controlados e manipulados de forma a otimizar a porcentagem, velocidade e uniformidade de germinação, pois devido à dormência fisiológica, dureza das sementes e presença de substâncias inibidoras, um

considerável número de sementes duras ou dormentes pode permanecer sem germinar, mesmo quando expostas a estas condições (BRASIL, 1992).

Sementes duras são aquelas que permanecem sem absorver água por um período mais longo que a média de dias necessários para germinação e, conseqüentemente, mantêm o mesmo aspecto de sementes recém colocadas no substrato, isto é, não intumescidas. Este fenômeno é motivado pela impermeabilidade do tegumento à água, sendo portanto um tipo especial de dormência.

Segundo MARCOS-FILHO (2005) as sementes encontram-se em estado de quiescência até que encontrem condições favoráveis à germinação, por outro lado muitas vezes a presença de inibidores químicos ou alterações metabólicas bloqueiam a transcrição da mensagem genética para a ativação do metabolismo, e este é o estado de dormência.

A grande maioria das sementes germina prontamente quando lhes são oferecidas condições ideais (água, luz e temperatura), principalmente em se tratando de plantas de clima temperado, e quando estas não germinam, são denominadas "dormentes" (POPINIGIS, 1977).

BRASIL (1992) discute que nem todas as sementes não germinadas são devido às causas de dormência, classificando como não capazes de germinar sementes mortas, não duras, nem dormentes e geralmente apresentam-se amolecidas ou atacadas por microorganismos. Outra categoria para sementes não germinadas é a que ocorre mais comumente em espécies florestais, que são as sementes vazias, semente sem embrião ou ainda aquelas atacadas por insetos.

Contrariamente às mortas, as sementes dormentes podem ser germinadas, pois este processo é um mecanismo de defesa das sementes contra variações do ambiente que dificultam ou impedem sua atividade metabólica normal, independentemente de sua causa ela apresenta profundidade inversamente proporcional à sua idade, isto é, é mais intensa em sementes recém colhidas (MARCOS-FILHO, 2005; BRASIL 1992).

Como são várias as causas que determinam a dormência, são também vários os métodos empregados para provocar a germinação destas sementes, que vão do simples armazenamento, até complexas determinações das combinações mais adequadas entre o agente e o período da ação.

Entre os métodos utilizados, o pré-resfriamento, por exemplo, é aplicado com o intuito de ativar enzimas hidrolíticas, a síntese de giberilinas e/ou a degradação de inibidores; a lavagem das sementes se realiza para retirada de substâncias inibidoras que sejam solúveis a água e estejam presentes no tegumento; a escarificação seja mecânica ou ácida, visa superar a impermeabilidade do tegumento (a gases ou a água) (MARCOS-FILHO, 2005).

Os efeitos positivos da adição de nitrato de potássio ao substrato é freqüentemente relatado em literatura, tanto os nitritos, nitratos como as giberilinas são utilizados para estimular a germinação ou para quebra de dormência, podendo substituir o efeito da luz ou da estratificação, os nitratos podem funcionar como cofator para a ação do fitocromo, facilitando assim a germinação pela síntese endógena de hormônios necessários à retomada do desenvolvimento pelo embrião (FARON *et al.*, 2004; GUTA, 2002; BEWLEY & BLACK, 1994).

Segundo FERREIRA & RANAL (1999) é comum também o uso de solução de hipoclorito de sódio como forma de assepsia das unidades de dispersão em laboratórios, porém a aplicação deste pode afetar a germinação. A escarificação que ocorre pelo hipoclorito de sódio além de aumentar a permeabilidade do tegumento ao oxigênio, água e solutos, também pode facilitar a remoção ou oxidação de inibidores de germinação, o que levou BEWLEY & BLACK (1994) a considerar essa substância como um agente químico oxidante, usado para quebra de dormência em sementes.

As avaliações dos efeitos dos métodos para quebra de dormência devem ser efetuadas com o devido cuidado, para diferenciar com segurança as sementes dormentes (resistem ao tratamento de germinação) das não viáveis (BRASIL, 1992). Dessa forma foram desenvolvidos ao longo do tempo diversos métodos capazes de estimar a viabilidade das sementes.

A avaliação da qualidade de sementes através de testes rápidos que proporcionem resultados reproduzíveis tem sido uma busca constante dos tecnologistas de sementes (PRETE, *et al*., 1993). DELOUCHE (1976), em seus estudos mostra a evolução e aplicabilidade dos testes de viabilidade de sementes, mostrando o surgimento dos métodos de verificação de viabilidade desde seu início em 1901, com o método elétrico onde sementes são submetidas a corrente elétrica, apresentando as chamadas “correntes

marcadas", havendo diferentes respostas entre sementes viáveis e mortas, esta técnica era segura, porém despendia demasiado tempo e habilidade técnica. A partir deste método surgiram outros que levavam em conta a permeabilidade das sementes, velocidade diferencial de difusão de substâncias, liberação de calor, entre outros, porém com sérias limitações.

Dentre os mais diversos métodos de análise da viabilidade de sementes, começam a se destacar aqueles que utilizavam os chamados "corante vitais", metodologia esta que se baseia na avaliação individual da reação da semente, e foi realizada por diversos cientistas com ressalva aos métodos com ácido sulfúrico e aplicação de índigo carmim. Em 1920 McHARQUE realiza o teste de viabilidade baseado na atividade enzimática das sementes, esta metodologia sofreu várias alterações e com esta foi possível alcançar resultados razoáveis. Em 1935 surgem testes com base na redução de sais incolores de selênio e telúrio, das adaptações e evolução destes testes com base na atividade enzimática surge com sucesso, rapidez e simplicidade o teste tetrazólio (TZ).

Segundo, MARCOS-FILHO (2005), o sal tetrazólio é um indicador oxidante-redutor, a reação do produto por ação das enzimas desidrogenases que estão envolvidas na atividade respiratória, desenvolve uma coloração vermelha não difusível nos tecidos. O teste TZ permite detectar danos mecânicos, causas de anormalidade ou baixa germinação. Outra vantagem do teste é que a precisão não é afetada por temperaturas entre 20 e 45°C, portanto muitas vezes para se obter uma coloração mais rápida o material pode ser colocado em estufa, antecipando os resultados (FRANÇA-NETO, 1998).

Várias são as concentrações que podem ser utilizadas, dependendo da espécie, método de preparo, permeabilidade do tegumento (MARCOS-FILHO, 2005). Entretanto em virtude do elevado preço do sal, dá-se preferência às menores concentrações, uma vez que nestas torna-se melhor a visualização dos danos nos tecidos (FRANÇA-NETO, 1998, MARCOS FILHO, 2005). O teste TZ ainda pode ser aplicado quando ao final dos testes ocorrer a presença de sementes dormentes ou inchadas, este ponto pode ser também uma desvantagem do método, pois não se diferenciam sementes dormentes de não dormentes.

Muitos outros métodos, para a determinação rápida da qualidade das sementes, vêm sendo pesquisados, porém vários ainda não mostraram resultados consistentes, outros

apresentam dificuldades na padronização, alguns se mostram promissores, mas devem ser mais avaliados antes de sua recomendação (MENEZES, 2005).

Dada a importância cada vez mais atual de estudos referentes a qualidade fisiológica, física, e germinação de espécies medicinais ainda não domesticadas, e a falta de relatos em literatura sobre a exigência da espécie *L. alba* e ainda não existindo informações nas Regras para Análise de Sementes – RAS, este trabalho buscou apresentar algumas informações referentes à germinação de sementes de *L. alba* em condições de laboratório e de campo, para obtenção de plantas oriundas de sementes recombinantes de genótipos distintos.

2.6 Marcadores Moleculares de DNA

As técnicas de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados "marcadores moleculares". Sendo assim, marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondendo a regiões expressas ou não do genoma). A revolução neste plano se iniciou com o descobrimento e utilização de marcadores isoenzimáticos na década de 60, ampliando vastamente o número de marcadores genéticos e possibilitando a aplicação da técnica à praticamente todas as espécies de plantas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores moleculares podem ser utilizados habitualmente em programas de melhoramento genético para identificação e discriminação de genótipos. Dessa forma eles permitem discriminar genótipos e quantificar a variabilidade genética existente ao nível de seqüência de DNA e correlacioná-la com a expressão fenotípica em procedimentos de mapeamento genético, permitindo a clonagem de genes que podem ser utilizados também para o melhoramento via transgenia (BORÉM & CAIXETA, 2005).

Na década de 80 foi desenvolvida uma tecnologia simples e eficiente baseada numa reação da polimerase em cadeia, comumente chamada de PCR (Polymerase Chain Reaction). Através deste processo é possível multiplicar *in vitro* e em escala exponencial cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de *primers* que

delimitam a seqüência de DNA de fita dupla que é alvo da amplificação. Os *primers* são sintetizados artificialmente e são complementares a região que flanqueiam a região alvo. Cada ciclo de PCR envolve três etapas, desnaturação através da elevação da temperatura (92 a 95°C), anelamento, em que a temperatura é rapidamente reduzida (35 a 60°C) e extensão que ocorre quando a temperatura é elevada para que a enzima polimerase seja ativada (72° C). Este ciclo é repetido por várias vezes e ao final da reação há uma grande quantidade de DNA de uma seqüência específica de interesse. Os produtos da PCR podem ser facilmente visualizados num gel de agarose. Esta visualização é possível com auxílio do brometo de etídeo, que quando presente no gel se intercala entre as duas fitas do DNA e o torna visível com absorção da luz ultravioleta (MULLIS & FALOONA, 1987). O desenvolvimento desta técnica levou o seu criador, Kary Mullis, a ganhar o prêmio Nobel de química em 1993 (NOBELPRIZE, 2006). A técnica de PCR promoveu o surgimento de novos marcadores moleculares tais como RAPD, STS, SCARS, AFLP, SNPs e Microssatélites.

O marcador RAPD – *Randon Amplified Polymorphic DNA* (DNA polimórfico amplificado arbitrariamente) – é basicamente uma variação do protocolo de PCR, diferindo em duas características: utiliza um *primer* único ao invés de um par de *primers* e tem seqüência alvo desconhecida. Os RAPDs são mais baratos que os demais marcadores de DNA, requerem pouco tempo e não necessitam de radioisótopos. Entretanto são marcadores dominantes, ou seja, não discriminam genótipo homozigoto de heterozigoto (WILLIAMS, 1990)**.** Esta técnica é vantajosa em razão da alta freqüência de polimorfismo que detecta, rapidez, simplicidade, exige pouca quantidade de DNA e não há a necessidade do conhecimento da seqüência de DNA, além da facilidade de automatização (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A utilização de marcadores moleculares em plantas aromáticas e medicinais é bastante reduzida se comparada às plantas cultivadas ou a culturas de maior expressão econômica. Na família Verbenaceae, SCHWARZBACH & RICKLEFS (2001) utilizaram a técnica de RAPD, em conjunto com outras técnicas moleculares, para fins de classificação taxonômica baseada em polimorfismo de DNA. SANTOS E CORRÊA (2006) aplicaram com sucesso a técnica RAPD em *Chenopodium ambrosioides*, planta medicinal com grande valor em seu óleo essencial, para estudo da diversidade genética da espécie.

Os marcadores RAPD foram utilizados com sucesso para identificação de híbridos e determinação dos parentais em arroz, conforme se verifica em WANG *et al.* (1994). De forma análoga, BELLAMY *et al.* (1996) também propuseram a utilização desse marcador para identificação varietal, determinação de pureza genética e de híbridos em chicória, em ambos os casos respaldados pela segregação mendeliana dos amplificados gerados pelo marcador. Mais recentemente, ABDEL-MAWGOOD e colaboradores (2006) fizeram uso do marcador RAPD para identificar híbridos em milho e observaram que, muito embora o marcador apresentasse segregação mendeliana, determinados primers não foram capazes de identificar híbridos uma vez que houve a produção de uma banda extra no híbrido e que não estava presente nos parentais.

No caso específico da *L. alba*, a eficiência do marcador RAPD foi demonstrada por VICCINI *et al*. (2004) em um estudo de diversidade genética, no qual foram avaliadas nove espécies por meio de 489 bandas polimórficas, permitindo assim melhor entendimento da espécie em relação à sua adaptação ao ambiente, conservação e classificação taxonômica. Outros exemplos de utilização do marcador RAPD são os trabalhos de SANTOS-MENDES (2001) e YAMAMOTO (2006), que da mesma forma utilizaram com sucesso este marcador para caracterizar quimiotipos da coleção de germoplasma da UNESP-Botucatu e do Instituto Agronômico, respectivamente, e PIERRE (2004) e VICCINI *et al*. (2004), em estudo para caracterização de plantas e de divergência genética de *L. alba*, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

O material utilizado foi composto pelos clones IAC-1, IAC-2, IAC-3, IAC-4, IAC-5, IAC-6, IAC-7, IAC-8, IAC-11, IAC-13, IAC-17 e IAC-20 da coleção de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas (IAC/APTA) – Fazenda Santa Elisa.

O material foi escolhido com base em quimiotipos e características desejáveis, tais como: rendimento de massa foliar seca (MFS), presença ou não de vírus, interesse comercial pelo linalol. Os materiais selecionados compreendem cinco quimiotipos

distintos, sendo eles: linalol (IAC-1 a IAC-8); mirceno/cânfora (IAC-11); limoneno/carvona (IAC-13); citral (IAC-17) e mirceno (IAC-20).

3.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica das plantas utilizadas nos cruzamentos foi realizada no sentido de oferecer dados de divergência entre os quimiotipos que pudessem dar indicações da natureza híbrida das sementes colhidas na plantas utilizadas para realizar os cruzamentos. De maneira geral, foram adotadas características já estudadas por outros autores, tais como aspectos da morfologia floral, dos frutos, das folhas e do hábito de crescimento. Em relação à morfologia floral e dos frutos, as análises foram realizadas sob lupa no departamento de botânica do Instituto Agronômico, verificando-se a flor, inflorescência, posição do ovário e das anteras em relação ao estilo-estigma e caracterização do fruto.

As observações da morfologia foliar foram realizadas com folhas que representassem o quimiotipo analisado, ou seja, foram descartadas aquelas que não apresentavam o padrão geral da planta. Os caracteres avaliados foram: comprimento, largura, borda, coloração e textura.

3.3 Modo Preferencial de Reprodução

Para a análise do modo preferencial de reprodução (alogamia ou autogamia), sete plantas do quimiotipo linalol tomadas ao acaso na coleção de *Lippia alba* do IAC tiveram dois ramos com igual quantidade de inflorescências marcados antes do período de antese, sendo que apenas um dos ramos de cada planta foi protegido por saco de papel. Quarenta dias após o ensacamento, as inflorescências foram coletadas, pesadas e o número de frutos contados.

3.4 Germinação

Para o estudo de germinação foram tomadas sementes somente de clones do quimiotipo linalol.

3.4.1 Germinação em campo

Foi realizado o plantio direto de mil frutos de cada um dos oito diferentes acessos de *Lippia alba* (quimiotipo linalol), em bandejas de isopor preenchidas com solo na proporção de 1/3 para cada um dos componentes (argila, matéria orgânica e areia), sendo as bandejas mantidas em condições ambiente de casa de vegetação. Os frutos utilizados foram divididos em duas partes de 500 frutos cada, sendo que uma delas sofreu procedimento de escarificação com lixa d'água nº 324.

As médias dos resultados dos tratamentos foram comparadas pelo teste Duncan a 5%.

3.4.2 Germinação em condições laboratoriais

3.4.2.1 Germinação em câmara

Para realização dos testes de germinação em condições controladas foi utilizado germinador do tipo câmara, que permite boa acomodação das amostras e dispositivos para o controle de temperatura, luz e distribuição das horas de exposição a estes.

As sementes foram mantidas nos mericarpos tendo previamente sido eliminado o excesso de impurezas (partes de flores, restos de frutos, sementes mal formadas e sementes chochas) por meio de ventilação forçada. Dessa forma, os frutos contendo uma semente no seu interior foram individualizados e submetidos aos tratamentos descritos na tabela 3.

As avaliações de germinação foram realizadas com duas repetições de 50 frutos/sementes dispostos em 5 fileiras de 10 frutos/sementes. Estes foram distribuídos sobre substrato especial de germinação do tipo "blotter" umedecido com um volume de água igual a 2,5 vezes a sua massa (aproximadamente 10 ml), dispostos em caixas plásticas do tipo Gerbox (11 x 11 x 3,5cm) transparentes e mantidos em germinadores com temperatura e tempo de exposição à luz controlados.

Para verificar as melhores condições de germinação, foram combinados fatores como temperatura, luminosidade, presença ou ausência de sais estimuladores de germinação aplicados em fruto/semente e em substrato (KNO_3 e ácido giberélico), choque térmico de frio e calor seco por sete dias. As contagens foram realizadas semanalmente e por até 8 semanas.

As temperaturas estudadas foram de 20, 25 e 30 ºC constantes e a alternada de 20-30 ºC, sendo 20 ºC por 16 horas e 30 ºC por oito horas.

O nitrato de potássio (KNO_3) foi aplicado a 0,2% e o ácido giberélico a 100 ppm. As sementes foram colocadas para germinar sobre substrato inicialmente saturado com solução com ambos os tratamentos. Periodicamente foi adicionada água em quantidade preconizada pelas Regras para Análise de Sementes (RAS).

Para os testes com choque térmico, as sementes foram primeiramente expostas ao frio (5-7^{o}C) por sete dias (LOEFFLER *et al.,* 1985) e em seguida submetidas a calor tendo sido colocadas dentro de recipientes de vidro abertos mantidos em estufa a 40^{o}C por sete dias (LAGO, 1974; BRASIL, 1992). Posteriormente, as caixas foram colocadas em germinador para teste normal de germinação, segundo BRASIL (1992).

3.4.2.2 Verificação de viabilidade das sementes

A análise de viabilidade das sementes foi realizada por meio da embebição do fruto inteiro em solução 1% de tetrazólio (TZ) por 3 dias a 40^{o}C, de acordo com metodologia de KUHN e JERCHEL (1941).

A comprovação da viabilidade das sementes foi realizada por corte longitudinal sob lupa com o auxílio de pinça e bisturi. A interpretação foi baseada na extensão e localização de uma "mancha" vermelho-carmim brilhante desenvolvida nos tecidos vivos (endosperma/embrião), como resultado da redução *in situ* do tetrazólio.

3.4.2.3 Desinfecção de sementes

Como forma de controle de contaminação e visando um melhor índice de germinação foram realizados testes de desinfecção com hipoclorito de sódio 2,5% (água sanitária) e fungicida Thiram 700PM 0,5% (dissulfeto de tetrametil-tiuram) (Tabelas 4 e 5).

Tanto o tratamento com hipoclorito, quanto o de Thiram, foram administrados de duas formas, por embebição dos frutos e por umedecimento do substrato, como segue:

Tratamento 1: Embebição das sementes em água por 20 minutos, seguido de germinação sobre substrato embebido em água.

Tratamento 2: Embebição das sementes por 20 minutos em solução a 0,5% de Thiram 700 PM, seguido de lavagem em água e de germinação sobre substrato embebido em água.

Tratamento 3: Germinação das sementes sobre substrato embebido em solução a 0,5% de Thiram 700 PM.

Tratamento 4: Embebição das sementes em solução a 2,5% de hipoclorito de sódio por 20 minutos, seguido de germinação sobre substrato embebido em água.

Tratamento 5: Embebição das sementes em solução a 2,5% de hipoclorito de sódio por 20 minutos, seguido de germinação sobre substrato embebido em solução a 0,5% de Thiram 700 PM.

Os frutos que receberam o tratamento por embebição permaneceram em ambas as soluções por um período de vinte minutos. Já os demais frutos receberam uma única dose em substrato. Assim como nos demais tratamentos os frutos foram colocados sobre papel germinativo do tipo "blotter", de modo a manter contato constante com o mesmo. O fornecimento de água às plantas, foi realizado por saturação do substrato com água comum. As técnicas foram aplicadas segundo metodologia corriqueiramente utilizada no Departamento de Sementes do Instituto Agronômico.

Após verificação da melhor forma de aplicação dos produtos desinfetantes, ou seja, embebição do fruto ou aplicação em substrato (Tabela 4), e tendo sido constatados melhores resultados de germinação no tratamento de frutos embebidos, foi realizado um teste para verificação do tempo de exposição dos frutos/sementes aos produtos, sem que houvesse toxidez às plântulas (Tabela 5).

O teste para verificar o tempo de exposição tolerado pelo fruto/semente foi realizado com ambas as soluções e a exposição dos mesmos foi de 1 ,5, 10, 15, 20 e 25 minutos. Para a interpretação do teste levou-se em consideração o maior número de plântulas germinadas e o processo de contagem foi encerrado a partir do ponto em que este número começou a decair.

Todos os testes de desinfecção, viabilidade e germinação de sementes foram realizados nas dependências do Departamento de Sementes do Instituto Agronômico sob orientação de profissionais daquele departamento.

3.4.3 Germinação em casa de vegetação

Tendo em vista a dificuldade em aclimatar as plântulas obtidas dos testes de germinação em Gerbox, estes foram realizados em condições de campo. Com base nos

resultados obtidos em laboratório, alguns tratamentos foram repetidos em casa de vegetação buscando viabilizar a germinação e manutenção das plântulas.

O experimento foi realizado com monitoramento da temperatura e sob irrigação por micro-aspersão. A contagem do número de plântulas obtidas foi realizada duas vezes por semana.

Da mesma forma que em laboratório, utilizou-se uma mistura de sementes do quimiotipo linalol, os frutos foram previamente limpos por ventilação. O plantio foi realizado em caixas de isopor contendo células preenchidas por substrato do tipo Plantmax hortaliças-HT.

Cada tratamento foi representado por 20 frutos e repetido três vezes, totalizando 60 frutos (Figura 1). Os seguintes tratamentos foram adotados:

Tratamento S1: Frutos/sementes que receberam tratamento de exposição ao frio (5-7°C por 7 dias), com aplicação de KNO_3 realizada por *embebição* dos frutos em solução 0,2% por 20 minutos.

Tratamento S2: Frutos/sementes que receberam tratamento de exposição ao frio (5-7°C por 7 dias), com aplicação de KNO_3 realizada em *substrato* a cada 3 dias.

Tratamento S3: Frutos/sementes que receberam tratamento de exposição ao frio (5-7°C por 7 dias) e em seguida choque térmico de calor (exposição à calor seco 40°C por 7 dias), a aplicação de KNO_3 foi realizada por *embebição* dos frutos em solução 0,2% por 20 minutos.

Tratamento S4: Frutos que receberam tratamento de exposição ao frio (5-7°C por 7 dias) e em seguida choque térmico de calor (exposição à calor seco 40°C por 7 dias), com aplicação de KNO_3 realizada em *substrato* a cada 3 dias.

Tratamento S5: Frutos que não receberam nenhum tipo de tratamento térmico, com aplicação de KNO_3 realizada por *embebição* dos frutos em solução 0,2% por 20 minutos.

Tratamento S6: Frutos que não receberam nenhum tipo tratamento térmico, com aplicação de KNO_3 realizada em *substrato.*

Tratamento S7: Frutos que receberam tratamento térmico de calor (exposição à calor seco 40°C por 7 dias), com aplicação de KNO_3 realizada por *embebição* dos frutos em solução 0,2% por 20 minutos.

Tratamento S8: Frutos que receberam tratamento térmico de calor (exposição à calor seco 40°C por 7 dias), com aplicação de KNO_3 realizada em *substrato*.

A contagem de frutos/sementes germinados e o controle da temperatura foram realizados diariamente e seguiram-se por até 8 semanas, da mesma forma que em laboratório.

As médias dos resultados dos tratamentos envolvendo germinação em casa de vegetação, foram comparadas por teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

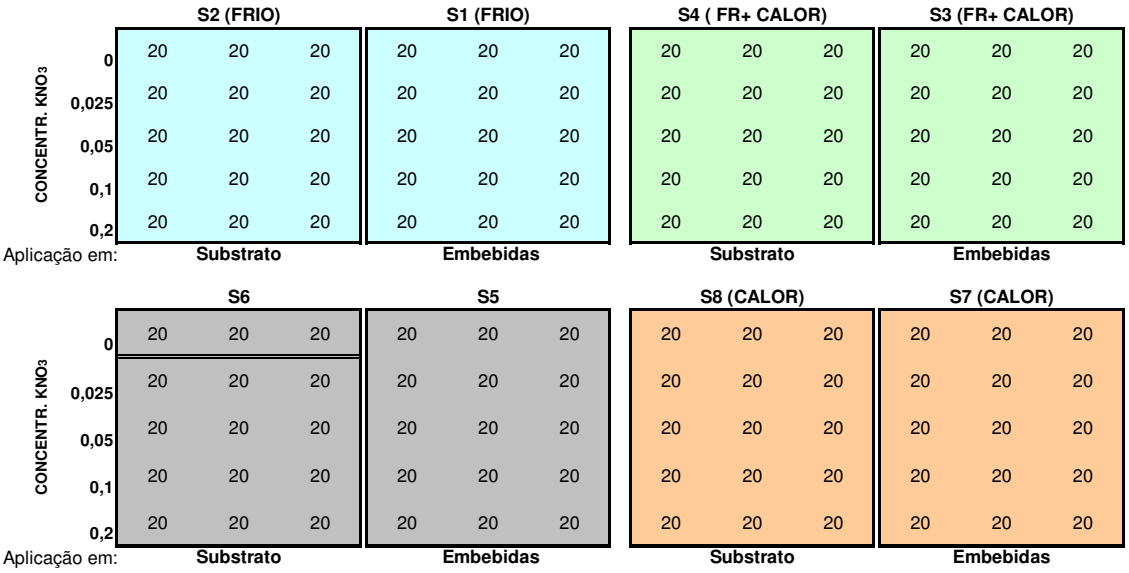


Figura 1: Esquema da distribuição dos tratamentos realizados em casa de vegetação

3.5 Realização dos cruzamentos dirigidos

Foram realizados cruzamentos biparentais para obtenção de progênies de irmãos germanos. Para tanto, partiu-se de clones com características agronômicas e fitoquímicas diversas em relação à morfologia, rendimento de massa foliar, resistência à virose, rendimento e composição de óleos essenciais.

Os clones utilizados foram: IAC-2 (linalol com melhor rendimento de massa foliar seca MFS); IAC-6 (linalol), IAC-8 (linalol isômero puro); IAC-11 (mirceno/cânfora), IAC-13 (limoneno/carvona com vírus), IAC-17 (citral com alto rendimento MFS) e IAC-20 (citral com alto rendimento MFS, porém com vírus).

Em razão do tamanho reduzido das flores da *L. alba* para efeito de realização dos cruzamentos dirigidos, os parentais escolhidos para serem cruzados foram plantados lado a lado dentro de uma lavoura de café, nas dependências do Centro Experimental de Campinas (IAC), cujas plantas já se encontravam com pelo menos 15 anos (variedade Mundo Novo). Os parentais foram dispostos a uma distância mínima de 30 metros uns dos outros (isolamento), procedimento este adotado para evitar a contaminação por polens não desejados. Desta forma, os cruzamentos realizados foram:

Cruzamento 1 (IAC-8 x IAC-8/ Linalol x Linalol): permite analisar o padrão de segregação de óleo (se ocorrer cruzamento), verificar o modo preferencial de reprodução, e caso contrário, torna-se possível verificar que a distância mínima relativa entre os cruzamentos não foi suficiente;

Cruzamento 2 (IAC-8 x IAC-2/ Linalol x Linalol): permite analisar o padrão de segregação de óleo (se ocorrer cruzamento), verificar o modo preferencial de reprodução entre plantas que são classificadas no mesmo quimiotipo, porém sendo clones distintos;

Cruzamento 3 (IAC-8 x IAC-17/ Linalol x Citral): Este cruzamento permite analisar o padrão de segregação de óleo (se ocorrer cruzamento), tipo de folha, e busca por um aumento no rendimento de massa;

Cruzamento 4 (IAC-8 x IAC-20/ Linalol x Mirceno): Este cruzamento permite analisar o padrão de segregação de óleo (se ocorrer cruzamento), o tipo de folha, e busca por um aumento no rendimento de massa;

Cruzamento 5 (IAC-2 x IAC-20/ Linalol x Mirceno): Cruzamento que permite analisar o padrão de segregação de óleo (se ocorrer cruzamento), tipo de folha, e busca por um aumento no rendimento de massa;

Cruzamento 6 (IAC-17 x IAC-17/ Citral x Citral): permite analisar o padrão de segregação de óleo, verificar o modo preferencial de reprodução, e ainda verificar se a distância mínima relativa entre os cruzamentos foi suficiente;

Cruzamento 7 (IAC-17 x IAC-13/ Citral x Limoneno-carvona): permite analisar o padrão de segregação de óleo e segregação para resistência à virose;

Cruzamento 8 (IAC-17 x IAC-11/ Citral x Mirceno-cânfora): permite verificar o padrão de segregação de óleo e rendimento de massa nos indivíduos segregantes;

Cruzamento 9 (IAC-13 x IAC-13/ Limoneno-carvona x Limoneno-carvona): permite analisar o padrão de segregação de óleo e segregação para resistência à virose;

Cruzamento 10 (IAC-11 x IAC-13/ Mirceno-cânfora x Limoneno-carvona): permite analisar o padrão de segregação de óleo e segregação para resistência à virose;

Cruzamento 11 (IAC-11 x IAC-11/ Mirceno-cânfora x Mirceno-cânfora): permite analisar o padrão de segregação de óleo e modo preferencial de reprodução;

Cruzamento 12 (IAC-6 x IAC-13/ Linalol x Limoneno-carvona): permite analisar o padrão de segregação de óleo e segregação para resistência à virose.

A distribuição dos cruzamentos em campo ocorreu de forma aleatória e o esquema da disposição dos mesmos encontra-se na figura 2.

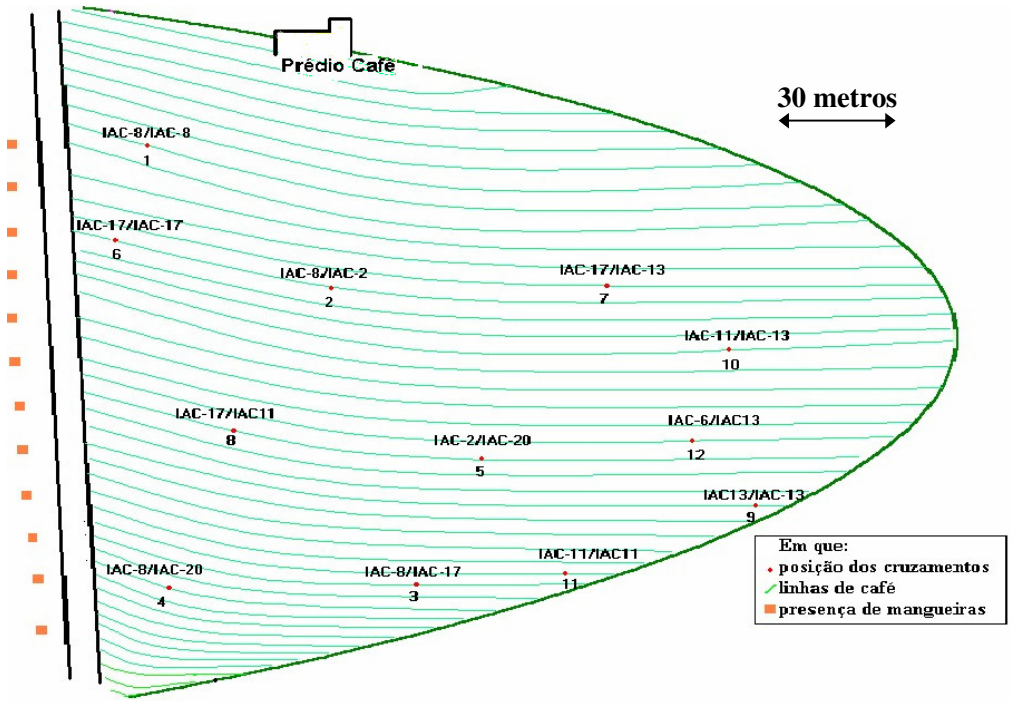


Figura 2: Mapa da área de localização dos cruzamentos biparentais de *L. alba*.

3.6 Análise Molecular por RAPD

Folhas jovens e sadias dos cruzamentos que geraram progênie (57 indivíduos, parentais + descendentes de 7 cruzamentos), foram coletadas e maceradas em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. A extração de DNA foi realizada a partir de 0,3g de tecido

macerado com MATAB 2% e de acordo com o protocolo CIMMYT (*International Maize and Wheat Improvement Center*), com modificações sugeridas por YAMAMOTO (2006). Ao final o DNA foi tratado com RNase (2 ul, Ci=10ng/ul, 37ºC por 30 min);

Para a reação de amplificação por PCR/RAPD foram utilizados 5ng de DNA. Os *primers* selecionados foram definidos com base no trabalho de YAMAMOTO (2006), a qual estabeleceu 25 *primers* (*Operon Technologies Inc*) polimórficos para oito formas de *L. alba*. Dentre estes, sete foram escolhidos em função do polimorfismo gerado e com resolução inequívoca de pelo menos uma banda diferenciadora dos quimiotipos. Os *primers* adotados foram: OPK-2; OPK-4; OPK-6; OPK-8; OPK-14; OPK-17 e OPF-7. A reação de PCR foi realizada em volume final de 15µl (3mM $MgCl_2$; 0,15mM dNTP; 0,3pmol *primer*, e; 0,05U/µl *Taq Polymerase*) e submetida a um ciclo com desnaturação inicial de 96°C por 1min, 44 ciclos de 94°C por 1min (desnaturação), 35°C por 1min (fusão do *primer*), 72°C por 1,30min (extensão), e uma extensão final de 72°C por 7min, em termociclador MJ Research (PTC-100). Após a reação o volume final foi aplicado em gel de agarose 1,2%, e submetido a eletroforese a 90V por 2hs, seguido de tratamento com brometo de etídeo (2,3µg/ml) para sua visualização posterior sob luz UV.

A genotipagem dos indivíduos estudados foi realizada com base na presença:ausência de bandas, e apenas aquelas que os diferenciaram, ou seja, as polimórficas, foram utilizadas para compor a matriz binária. Para quantificar a similaridade entre os indivíduos foi utilizado o coeficiente de JACCARD (1908) e para o agrupamento dos genótipos foi utilizado o método de UPGMA (SNEATH & SOKAL, 1973), ambos realizados através do programa NTSYSpc (ROHLF, 1997).

Como forma de controlar fontes de variações laboratoriais foram utilizados os mesmos termocicladores para as amplificações. Foram realizadas pelo menos duas repetições para cada *primer* analisado e a genotipagem (leitura dos dados) foi baseada apenas nas bandas consistentes e reproduzidas nas duas repetições.

3.7 Análise Citogenética

A viabilidade do grão de pólen foi analisada a partir da coleta de botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento. O material foi fixado em etanol–ácido acético (3:1) e mantido em temperatura ambiente de quatro a seis horas, ou na geladeira durante 24

horas. Em seguida o material foi transferido para o álcool 70% e armazenado na geladeira. A estimativa da viabilidade do pólen foi possível por observação em microscópio ótico da presença de exina intacta e coloração rosa forte dos grãos de pólen após tratamento químico com o corante carmim propiônico 2% sobre lâminas de vidro (EINHARDT *et al.;* 2006). Foram considerados inviáveis ou vazios os grãos sem coloração e viáveis os que apresentavam coloração rosa forte. Foi realizada ainda a contagem de células que apresentassem tamanho visivelmente anormal. Para contagem foram tomadas três lâminas e 20 campos inteiramente casualisados de cada lâmina para cada quimiotipo utilizado nos cruzamentos de *L. alba.*

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Morfológica

Os dados de caracterização morfológica permitiram verificar que as flores de *L. alba* são hermafroditas, levemente pedunculadas, apresentam coloração rósea-violáceas, e tubo da corola de coloração amarela e são do tipo liguladas. Estas avaliações estão de acordo com os estudos realizados por EHLERT, 2003, com *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown para a produção e qualidade de óleos. As flores apresentam 4 estames didínamos, sendo dois destes mais longos que os demais (Figura 3), com papila estigmática em posição lateral, ovário súpero com nectário basal na forma de anel e dois carpelos. Ao microscópio é clara a presença de tricomas em todo o tubo. Todas as flores encontram-se inseridas em inflorescências do tipo glomérulo com até 12 flores por inflorescência (Figura 3). No entanto, EHLERT (2003) diz ter encontrado apenas de 3 a 5 flores por inflorescência em *L. alba.* Segundo CORRÊA (1992) a espécie está sujeita a grandes variações morfológicas, anatômicas e ainda fitoquímicas. VESQUE (1885), afirma que a subfamília Verbenóide, à qual pertence a *L. alba*, apresenta considerável instabilidade na estrutura de órgãos que geralmente são constantes na grande maioria das espécies.

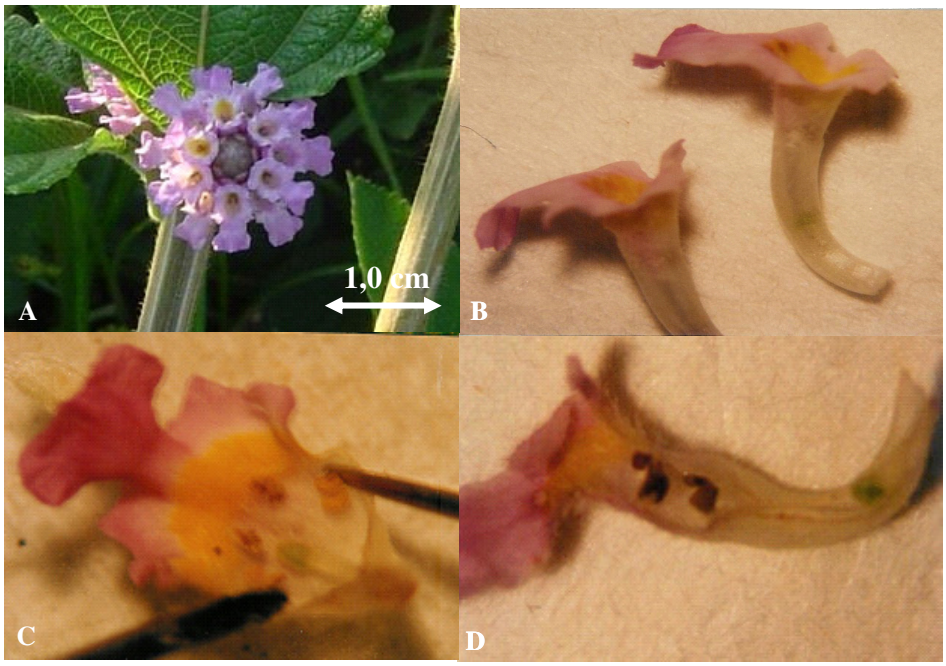


Figura 3 - Caracterização morfológica de flores de *L. alba*: **a**. Inflorescência de *L. alba*. **b.** Flores individualizadas. **c.** Visualização do interior da corola com presença de tricomas e estames. **d.** Flor com abertura lateral, para visualização dos quatro estames presentes, sendo dois superiores e dois inferiores.

O fruto de *L. alba* é um esquisocarpo composto por dois mericarpos (meio-frutos) que se separam facilmente. O mericarpo é do tipo drupa, de forma orbicular-ovóide, arredondado de um lado e achatado do outro, formado por: (a) um epicarpo liso, preto e fosco; (b) um mesocarpo cuja massa farinácea e consistente lembra o endosperma (material de reserva) das monocotiledôneas e (c) um endocarpo levemente rígido, contendo pouco material de reserva e uma semente cilíndrica e diminuta, com um embrião formado por dois cotilédones e um eixo hipocótilo-radícula muito pouco diferenciado (Figura 4). GOMES *et al*. (1993), afirma que o envoltório preto (pericarpo) é apenas um cálice acrescente que evolve o fruto.

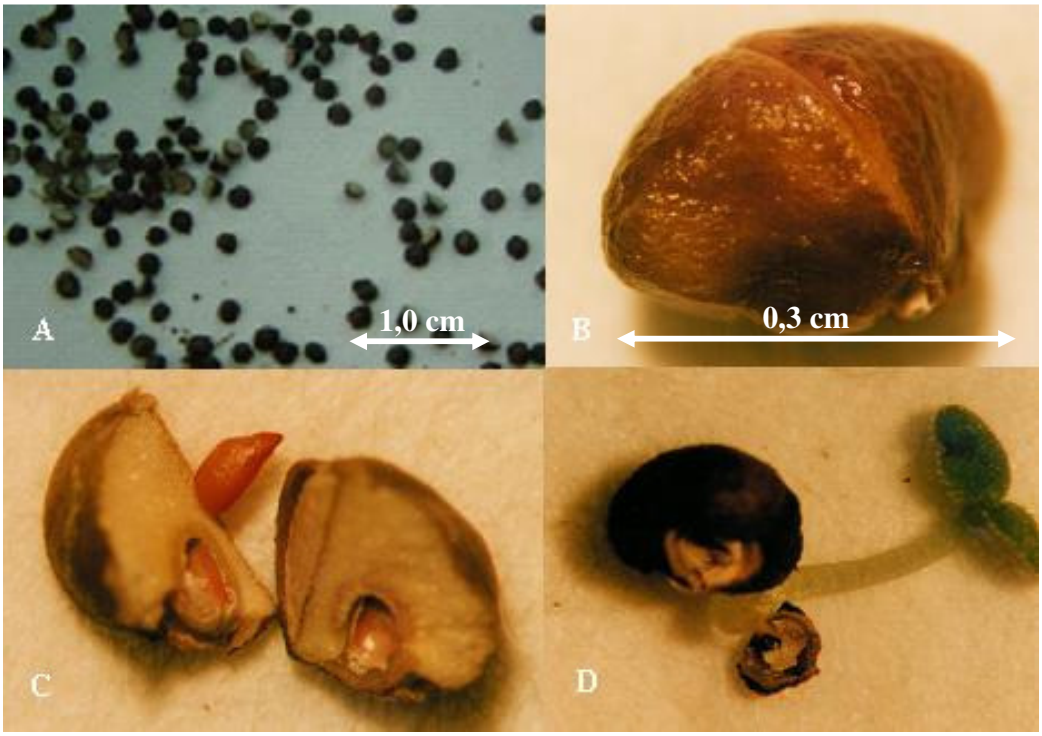


Figura 4 – Frutos/sementes de *L. alba*. **a**. frutos do tipo esquizocárpicos separados. **b.** Fruto inteiro. **c**. Fruto individualizado e cortado para visualização do embrião. **d.** Plântula com um dia de germinação, dois cotilédones e um eixo hipocótilo-radícula pouco diferenciado.

O mericarpo, tecnológica e funcionalmente uma semente, apresenta dimensões entre 1,0 e 1,7 mm, sendo que um grama contém aproximadamente 1.000 sementes.

O embrião é rudimentar, pouco diferenciado, de forma alongada, localizado em uma cavidade no interior da massa do mesocarpo, sendo muito pequeno, medindo aproximadamente 0,60 mm de comprimento e 0,15 mm de largura (Figura 4).

Na germinação, o embrião absorve água, alonga-se, rompe os envoltórios por uma espécie de opérculo e se separa do restante da semente, crescendo independentemente, sem continuar a absorver nutrientes da massa remanescente do mericarpo. A plântula, composta por radícula e parte aérea (hipocótilo e folhas cotiledonares), ao destacar-se da semente apresenta dimensões também diminutas, em torno de 5,0 mm de altura e caulículo com 0,4 mm de largura (Figura 4).

O resultado da caracterização foliar dos quimiotipos utilizados nos cruzamentos encontra-se sumarizado na figura 5. Nenhum dos quimiotipos apresentou diferenças quanto a algumas características foliares, sendo todas: simples, inteiras, pecioladas, pubescentes e serrilhadas, opostas e alternadas.

Figura 5 – Ramificações apicais dos sete genótipos usados como parentais – folhas grandes, arredondadas e internódios longos para os parentais pertencentes ao quimiotipo linalol (IAC-2, IAC-6 e IAC-8) e mirceno/cânfora (IAC-11). Os genótipos do quimiotipo limoneno/carvona (IAC-13), citral (IAC-17) e mirceno (IAC-20) apresentam folhas pequenas e alongadas em intervalos mais curtos, sendo visivelmente notados os sintomas de infecção virótica (CMV-*Cucumber Mosaic iírus*) do genótipo IAC-13, como as distorções foliares.

As diferenças foliares entre os quimiotipos estudados foram mais relevantes para tamanho, forma, coloração e textura.

IAC-2, IAC-6 e IAC-8 (Linalol): apresentam folhas grandes e arredondadas com coloração verde bandeira, ásperas, porém não muito espessas, dentre estas, o genótipo IAC-8 apresenta maior maciez.

IAC-11 (Mirceno/cânfora): apresenta folhas grandes e arredondadas, assimilando-se às do quimiotipo linalol, porém, apresenta coloração verde escura, extremamente ásperas e espessas.

IAC-13 (Limoneno/carvona): apresenta folhas pequenas e alongadas com coloração verde claro, levemente ásperas, sendo visivelmente notados os sintomas de infecção virótica (CMV-*Cucumber Mosaic iírus*) como as distorções foliares.

IAC-17 (Citral): apresenta folhas pequenas e alongadas com coloração verde clara e de textura macia.

IAC-20: apresenta folhas pequenas e alongadas, de coloração verde clara, não áspera, porém levemente mais espessas.

Estudos realizados por TAVARES *et al.* (2003) com plantas do quimiotipo citral e carvona estão de acordo com a caracterização das folhas do presente estudo em relação aos mesmos quimiotipos. Da mesma forma, estudos posteriores dos mesmos autores (2004) ao descreverem plantas do quimiotipo linalol em seus relatos. Porém, SANTOS-MENDES (2001) realizou a caracterização morfológica de diversos quimiotipos de *L. alba* e constatou a presença tanto de bordo serreado quanto de bordos denteados num mesmo quimiotipo.

JANNUZZI (2006), em trabalho com 16 acessos de *L. alba* no Distrito Federal, encontrou maior área foliar para plantas com óleo essencial quimiotipo linalol e em seus estudos de correlação pôde concluir que há uma relação positiva entre área foliar, comprimento de aste, elevada concentração de linalol e menor rendimento de óleo essencial. As características foliares encontradas neste trabalho são bastante similares às do autor.

Outra característica observada foi o número de folhas por nó. Com exceção dos quimiotipos IAC-13 (limoneno/carvona) e IAC-20 (citral), todos os demais possuem duas folhas por nó. Estes dois materiais apresentaram número variado de folhas por nó, podendo chegar a sete. Ambos possuem como característica comum sintomas típicos de infecção por vírus, ou seja, grande número de brotações laterais, folhas pequenas, retorcidas e amarelecidas. Segundo YAMAMOTO (2006), análises de teste ELISA (*Enzyme Linked Immuno sorbent Assay*) e de hospedeiro diferencial realizadas pelo Instituto Biológico – SP, identificaram a presença do vírus CMV (*Cucumber Mosaic Vírus)* infectando plantas desses dois quimiotipos.

Muito embora plantas de alguns dos quimiotipos utilizados nos cruzamentos apresentassem número constante de folhas na inserção dos nós, observações de campo revelam que o caráter número de folhas por nó deve ser influenciado pelo ambiente pois os mesmos quimiotipos presentes na coleção de germoplasma de *Lippia alba* do IAC apresentaram três folhas por nó. Observações semelhantes foram mencionadas por SANTOS-MENDES (2001), em estudo sobre a caracterização botânica de oito formas de *L.*

alba. As formas desse estudo ora apresentaram duas e hora três folhas por nó. A autora cita que um dos fatores que poderia ter influenciado esta característica em seu experimento foi o número de podas que as plantas sofreram.

Em relação ao hábito de crescimento, os quimiotipos IAC-2, IAC-6, IAC-8 (linalol) e IAC-11 (mirceno/cânfora) apresentaram-se decumbentes, podendo seus ramos chegar a cerca de 3 metros após contato com solo. Nos genótipos IAC-13 (limoneno/carvona com vírus); IAC-17 e IAC-20 (citral com e sem vírus respectivamente) o hábito de crescimento observado foi predominantemente ereto, embora com ramos laterais podendo alcançar dois metros de comprimento, concordando com a descrição de CASTRO (2001), SALIMENA (2000) e CORRÊA (1992). Em relação aos quimiotipos citral e carvona, TAVARES *et al*. (2003) afirmam que seus ramos podem alcançar cerca de 1,8 m de comprimento, sendo o quimiotipo citral mais invasor que o carvona.

4.2 Modo preferencial de Reprodução

Os resultados dos testes de ensacamento de inflorescências antes da antese encontram-se resumidos na tabela 1. Os dados médios obtidos para os caracteres peso de fruto/peso de inflorescência (%) e número médio de fruto/inflorescência para ramos protegidos foram de 4,2 e 0,69, respectivamente, enquanto que para ramos não protegidos foram obtidos os valores de 31,3 e 14,9, respectivamente, indicando claramente tratar-se de uma espécie preferencialmente alógama. Porém, houve comportamento diferenciado entre os quimiotipos testados para os parâmetros utilizados para verificar o modo preferencial de reprodução, sendo o quimiotipo Linalol menos incompatível que os demais, conforme se observa pelo elevado número de frutos produzidos ou pela relação peso de frutos e peso de infrutescência obtidos nos ramos ensacados (Tabela 1).

O modo preferencial de reprodução da espécie, ou seja, se é alógama ou autógama, é de fundamental importância diante da perspectiva de se iniciar atividades de melhoramento genético. Os procedimentos de obtenção e condução de populações híbridas são, normalmente, determinados por esta característica. No caso da espécie *L. alba*, não foi encontrado em literatura nenhum estudo abordando este comportamento. Portanto, nossos resultados são originais e indicam que futuros procedimentos visando o melhoramento genético da espécie devem ser conduzidos assumindo a alogamia na espécie. Além disso,

os resultados também permitem observar que a produção de frutos pode variar de um quimiotipo para outro e que essa característica deva ser levada em consideração para escolha das plantas mãe para efeito de coleta de maior número de sementes.

Tabela 1 - Número médio de frutos por infrutescência (num.Fr/Infrut) e peso de frutos por peso de infrutescência (peso Fr/peso Infr.) obtidos de diferentes quimiotipos de *L. alba* a partir de flores protegidas e não protegidas por ensacamento.

TRAT.	Clone	num.Fr/Infrut.	peso Fr/peso Infr.
PROT.	LINALOL	0,9	5,6
	TC/M/C	0,18	0,5
	LIM/CARV	0	0
	CITRAL	0,75	2
Total Proteg.		**0,69**	**4,2**
LIVRES	LINALOL	7,4	37,5
	TC/M/C	32,9	32,1
	LIM/CARV	9	22,2
	CITRAL	13,7	32,1
Total Livre		**14,9**	**31,3**

TC/M/C: transcariofileno/mirceno/cânfora e LIM/CARV: limoneno/carvona.

4.3 Germinação em Campo

O estudo de germinação de *L. alba* foi inicialmente realizado em condições de campo e a partir de frutos inteiros em virtude da dificuldade de se individualizar as sementes, mesmo procedimento adotado por ROSA & FERREIRA (2001), em estudo realizado com *Aloysia gratissima*, planta medicinal de semente extremamente pequena (0,3mg).

Dos 1.000 frutos inteiros destinados ao estudo, metade (500) permaneceram intactos e a outra metade passou pelo processo de escarificação. O procedimento de escarificação foi adotado por ser de um método simples, eficaz e de baixo custo e que poderia revelar pistas em caso do baixo índice de germinação da espécie ser devido ao tegumento ou outros fatores de dormência (MARCOS-FILHO *et al*., 1987).

A análise dos resultados da germinação revelou não haver efeito significativo (Duncan 5%) entre escarificados e não escarificados (Tabela 2). Resultado semelhante foi obtido por ZAYAT & RANAL (1997) entre sementes escarificadas e não escarificadas de *Erechtites valerianaefolia,* demonstrando que muitas vezes o envoltório não constitui barreira para o processo germinativo. Porém, foi observado efeito significativo da germinação de sementes entre dois clones do estudo, IAC-1 e IAC-2, cujas diferenças podem estar relacionadas às diferenças de tamanho das sementes ou por representarem ecótipos diferentes.

Tabela 2 - Número de plantas germinadas e porcentagem de germinação de sementes de diferentes acessos de *Lippia alba* submetidas ou não à escarificação. Letras semelhantes indicam que as médias são semelhantes ao nível de 5% do teste de Duncan.

CLONES LINALOL		PL. GERMINADAS		GERMINAÇÃO %
IAC-1	C/ ESC	21 **a**	C/ ESC	4,2 **a**
	S/ ESC	17 **a**	S/ ESC	3,4 **a**
		Subtotal 38 **A**		Subtotal 7,6 **A**
IAC-2	C/ ESC	2 **a**	C/ ESC	0,4 **a**
	S/ ESC	1 **a**	S/ ESC	0,2 **a**
		Subtotal 3 **C**		Subtotal 0,6 **C**
IAC-3	C/ ESC	15 **a**	C/ ESC	3 **a**
	S/ ESC	17 **a**	S/ ESC	3,4 **a**
		Subtotal 32 **AB**		Subtotal 6,4 **AB**
IAC-4	C/ ESC	11 **a**	C/ ESC	2,2 **a**
	S/ ESC	2 **a**	S/ ESC	0,4 **a**
		Subtotal 13 **ABC**		Subtotal 2,6 **ABC**
IAC-5	C/ ESC	10 **a**	C/ ESC	2 **a**
	S/ ESC	1 **a**	S/ ESC	0,2 **a**
		Subtotal 11 **ABC**		Subtotal 2,2 **ABC**
IAC-6	C/ ESC	8 **a**	C/ ESC	1,6 **a**
	S/ ESC	5 **a**	S/ ESC	1 **a**
		Subtotal 13 **ABC**		Subtotal 2,6 **ABC**
IAC-7	C/ ESC	9 **a**	C/ ESC	1,8 **a**
	S/ ESC	16 **a**	S/ ESC	3,2 **a**
		Subtotal 25 **ABC**		Subtotal 5 **ABC**
IAC-8	C/ ESC	0 **a**	C/ ESC	0,2 **a**
	S/ ESC	7 **a**	S/ ESC	1,4 **a**
		Subtotal 7 **BC**		
MÉDIA GERAL		**PLS GERMINADAS**		**GERMINAÇÃO %**
C/ ESC		8,2 **A**		1,7 **A**
S/ ESC		6,7 **A**		1,3 **A**

N° de sementes/clone: 1000 = 500 escarificadas e 500 sem escarif.

Porém, em razão da baixa taxa de germinação obtida nas condições de campo, diversos tratamentos foram realizados em laboratório, combinando fatores como temperatura, presença ou ausência de sais estimuladores de germinação e choque térmico de frio e calor. A aplicação destes tratamentos pode superar algumas causas da dormência tais como impermeabilidade do tegumento, alterar a relação entre promotores e inibidores da germinação ou alcançar a maturidade fisiológica.

4.4 Germinação em Condições Laboratoriais

Os resultados do estudo de germinação em condições controladas encontram-se sumarizados na tabela 3. O processo de germinação é definido como a emergência e o desenvolvimento de estruturas essenciais do embrião, manifestando sua capacidade para dar origem a uma plântula normal, sob condições ambientais favoráveis (MARCOS-FILHO, 1987). Desta forma as contagens só incluem plântulas de aspecto normal.

Do ponto de vista fisiológico, a germinação ocorre somente em condições ambientais favoráveis, ou seja, água, temperatura, oxigênio e luz, sendo que a primeira condição para a germinação de uma semente viável e não dormente, é a disponibilidade de água (MARCOS-FILHO, 1987; POPINIGIS, 1977). Sabe-se que dentro de determinados limites, a velocidade de embebição aumenta com o aumento da temperatura, isto porque, o aumento da temperatura causa aumento das atividades metabólicas, o que em muitos casos leva a uma maturidade mais rápida da semente, caso esta esteja relacionada aos baixos índices de germinação.

Com base nestes efeitos foram aplicadas diversas temperaturas nos frutos/sementes de *L.alba* para verificar se temperaturas alternadas, realmente eram as mais favoráveis. Sabe-se ainda que as sementes da maioria das espécies cultivadas geralmente germinam sob limites relativamente amplos de temperatura, enquanto outras, principalmente aquelas que ainda não passaram por processo de domesticação, apresentam exigências mais restritas (MARCOS-FILHO, 1987).

As sementes da maioria das plantas cultivadas germinam tanto em escuro quanto em luz, porém geralmente a exigência de luz para germinar por parte de determinadas espécies está relacionada a algum tipo de dormência (POPINIGIS, 1977). Como nos testes em *L. alba* não ocorreu um índice satisfatório de germinação de suas sementes somente na

presença de luz ou na sua ausência (dados não mostrados), a combinação de presença ou ausência de luz foi um dos fatores avaliados para verificar esta exigência.

As respostas obtidas dos diferentes tratamentos permitem concluir que a melhor condição de germinação de semente de *L. alba* (64%) foi com regime de temperatura de 20ºC por 16 horas seguido de 30ºC por 8 horas, em substrato especial do tipo "blotter", umedecido com solução aquosa de KNO_3 a 0,2% e submetida à choque térmico de calor. Elevado índice também foi obtido apenas utilizando o mesmo regime de temperaturas alternadas, porém sem o estimulador de germinação KNO_3 (60%). Além disso, as sementes foram mantidas na presença constante de luz, confirmando a fotoblastia positiva na espécie já mencionada por ROSA & FERREIRA (2001). Este comportamento revela que pode existir um mecanismo duplo de luz e temperatura envolvido na germinação, comum em várias espécies, sendo que nestas a alternância de temperaturas é mais eficiente do que a luz na germinação. Segundo MAYER & POLJAKOFF (1989), esta é uma característica de plantas invasoras, podendo ocorrer grande variabilidade desse comportamento entre as nativas.

Tabela 3. Testes laboratoriais de germinação de sementes de *Lippia alba* combinando fatores como temperatura, presença ou ausência de sais estimuladores em fruto e em substrato (KNO_3 e ácido giberélico) e choque térmico de frio e calor seco.

EXP	TEMP (°C)				KNO3		ÁC. GIB.		Choque. T.		GERM. (%)
	20	25	30	20-30	Fruto	Substr.	Fruto	Substr.	Frio	Calor	
1	■										0
2	■					■					0
3		■									8
4		■				■					14
5			■								0
6			■			■					0
7				■							60
8				■		■					44
9				■	■						30
10				■						■	16
11				■		■				■	64
12				■					■		20
13				■		■			■		56
14				■				■			44
15				■			■				46

Onde, Temp 20-30 = 20ºC por 16 horas e 30ºC por 8 horas; Choque frio = exposição à 5-7°C por 7 dias; Choque calor = exposição à calor seco 40°C por 7 dias.

As sementes armazenadas em geladeira por sete dias (choque frio) apresentaram elevada taxa de germinação, sobretudo quando este efeito foi combinado com a aplicação do KNO_3 (56% de germinação), indicando que as sementes dessa espécie podem não ser totalmente recalcitrantes como suspeitado inicialmente, podendo suportar o processo de refrigeração. Em contrapartida, sementes mantidas sob bancada e em condições de ambiente perderam a viabilidade em cerca de duas semanas. Os resultados do presente estudo condizem com os obtidos por ROSA & FERREIRA (2001).

Os índices mais baixos de germinação foram obtidos nos experimentos cujas temperaturas foram constantes (20, 25 e 30ºC), mesmo adicionando o estimulador de germinação KNO_3.

No caso do experimento em que frutos ou sementes receberam frio, houve grande diferença no período de emersão de plântulas, sendo que na ausência de nitrato de potássio a germinação iniciou-se somente aos 40 dias de semeadura e o índice obtido foi de 20%. Em contrapartida, quando as sementes ou frutos receberam nitrato de potássio, a germinação iniciou aos 8 dias de semeadura e taxa obtida foi de 56%. Estes resultados mostram que a aplicação de KNO_3 aumenta o potencial de germinação e que somado ao efeito de choque térmico de frio pode antecipar o início da germinação de *L. alba*, muito embora possa ocorrer redução da velocidade de germinação com o passar do tempo.

O pré-aquecimento é um procedimento usualmente recomendado para a superação da dormência de sementes de diversas espécies (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 1985; BRASIL, 1992). Ele pode ser aplicado com o intuito de acelerar a maturação fisiológica das sementes que nem sempre encontram-se nesse estádio de maneira satisfatória e uniforme no momento da colheita (LAGO, 1974; BRASIL, 1992). Em oposição, a aplicação de frio é provavelmente um dos testes mais utilizados para a avaliação do vigor de sementes (POPINIGIS, 1977; MARCOS FILHO *et al*., 1987), tendo sido desenvolvido inicialmente para milho e posteriormente adaptado para outras espécies. Esta técnica sofreu variações propostas por LOEFFLER *et al*., (1985) e é utilizada não só para fins de vigor, como também como forma de estimular a geminação (LAGO & MARTINS, 1997).

Vários são os autores que citam e preconizam a aplicação e o uso de reguladores de crescimento principalmente pertencentes ao grupo das giberelinas e citocininas, bem como

a aplicação de nitrato de potássio (KNO_3), para promoção e uniformização da germinação (ONO *et al.*, 1993). A aplicação KNO_3 e de ácido giberélico foi realizada tanto por saturação do substrato quanto por embebição dos frutos em solução contendo ambos. Em relação à forma aplicação dos estimuladores de germinação KNO_3 e ácido giberélico (experimentos 8-9 e 14-15, respectivamente), foi verificado que a germinação de frutos embebidos em KNO_3 foi menor do que a sua aplicação no substrato, cujos resultados obtidos foram de 30 e 44%, respectivamente. Em contrapartida, a forma de aplicação do ácido giberélico não foi determinante, pois os índices de germinação encontrados para esse fator foram de 44 e 46% para sua aplicação no substrato e no fruto embebido, respectivamente.

As observações das taxas de germinação nos diferentes tratamentos permitem concluir que o regime de temperatura mais adequado à germinação das sementes de *Lippia alba* é o de temperatura alternada de 20-30ºC, em substrato especial do tipo "blotter", umedecido com solução aquosa de KNO_3 a 0,2%, em presença de luz (64%). Foi possível notar ainda que temperaturas constantes de 20ºC, 25ºC e 30ºC foram prejudiciais à germinação.

4.4.1 Viabilidade de sementes

As observações da atividade respiratória foram realizadas sob lupa por corte longitudinal e exposição da face rósea do endosperma/embrião. A coloração pode se iniciar após sete horas e se desenvolve muito lentamente, havendo um grande número de sementes coradas mesmo após 48 horas de exposição. Porém, a partir de 3 dias de exposição foi observada forte atividade de respiração dos embriões (cor rosada ou vermelho carmim) o que revela ser necessário grande período de exposição ao TZ (Figura 6).

A coloração rosada do embrião mostrou-se bastante reduzida a partir do quinto dia de coleta dos frutos, mesmo após 72 horas de exposição ao TZ, sugerindo que o embrião tenha vida curta, típico de espécies recalcitrantes que não suportam desidratação, estando de acordo com resultados de VIEIRA *et. al*, 2001. (Figura 6).

Durante a verificação por corte em lupa, foi observada a presença de um grande número de sementes sem embriões (Figura 6), e em todos os casos, a massa de tecido aparentemente endospermático não se coloriu de vermelho quando exposta ao TZ, mesmo

após 72 horas, demonstrando não possuir metabolismo respiratório, à semelhança do que ocorre em sementes de gramíneas. Talvez este não seja um endosperma verdadeiro, pois o endosperma das dicotiledôneas se colore de vermelho no TZ como, por exemplo, tomate e mamona.

Figura 6 – Exposição da atividade respiratória endosperma/embrião de sementes de *L. alba* após imersão em TZ (1%). **a.** Sementes com elevada viabilidade. **b.** Coloração rosada dos embriões bastante reduzida a partir do quinto dia de coleta dos frutos. **c.** Sementes sem embriões.

Os testes de viabilidade de sementes foram realizados em frutos recém colhidos das plantas utilizadas para a realização dos cruzamentos. A viabilidade média encontrada no total de frutos analisados (30 frutos por planta) foi de 13,9%. Os valores obtidos para cada cruzamento foram: IAC-8 x IAC-8 (6,7%), IAC-8 x IAC-17 (17,3%), IAC-8 x IAC-20 (16,5%), IAC-2 x IAC-20 (19,5%), IAC-17 x IAC-17 (13,3%), IAC-17 x IAC-13 (23,5%), IAC-17 x IAC-11(13,5%), IAC-13 x IAC-13 (6,6%), IAC-11 x IAC-13 (16,5%), IAC-11 x IAC-11 (6,7%) e IAC-6 x IAC-13 (13,5%). O cruzamento IAC-8 x IAC-2 não possuía frutos no período em que eles foram coletados (mês de dezembro de 2006) e, portanto, este cruzamento não foi considerado na análise.

4.4.2 Desinfecção de sementes

Desde o início dos testes de germinação em Gerbox notou-se elevada contaminação das sementes e do substrato por fungos. Em vista disso, foram feitas algumas observações sobre desinfestação das sementes. Os resultados obtidos encontram-se sumarizados na tabela 4.

Tabela 4 - Porcentagem de germinação de sementes de *Lippia alba* submetidas a tratamentos de desinfecção com hipoclorito de sódio (NaCLO) e fungicida (Thiram 700PM).

Tratamento	Aplicação em Fruto	Aplicação em Substrato	Germinação (%)
1	H_2O por 20 minutos		26
2	Thiram 700PM 0,5%		16
3		Thiram 700PM 0,5%	16
4	NaClO 2,5% - 20 minutos		44
5	NaClO 2,5% - 20 minutos	Thiram 700PM 0,5%	16

Os melhores índices de germinação (44%) foram obtidos com a aplicação apenas de hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 minutos. O tratamento 1 alcançou 26% de germinação, apesar de ter apresentado grande crescimento de fungos. Os tratamentos 2 e 3, correspondentes à aplicação de fungicida no fruto e no substrato, respectivamente, embora tenha controlado o aparecimento de fungos, apresentaram os menores resultados de germinação (16%), provavelmente por razões de toxidez à semente. Evidência do efeito repressivo do Thiran na germinação de sementes de *L. alba* foi também observado no tratamento 5 (16%), onde o mesmo produto esteve presente. Portanto, o melhor controle de infecção por fungos durante a germinação de sementes de *L. alba* em condições laboratoriais foi obtido pelo tratamento utilizando apenas hipoclorito de sódio 2,5% no substrato, procedimento simples e de menor custo.

De acordo com estes resultados, foi realizado um teste para verificar se a toxidez ocorrida pode estar relacionada ao tempo de exposição das sementes aos produtos testados (Tabela 5). Este teste foi realizado ainda porque a aplicação de NaClO em associação com Thiram 700PM e a aplicação de Thiram 700PM sem associação foram os tratamentos que melhor controlaram o aparecimento de fungos, porém com baixo índice de germinação.

Tabela 5. Porcentagem de germinação de sementes de *Lippia alba* submetidas a tratamentos de desinfecção com hipoclorito de sódio (NaCLO) e fungicida (Thiram 700PM) em diferentes tempos de exposição dos frutos.

Solução	Tempo de Exposição (minutos)						Germinação (%)
	1	5	10	15	20	25	
NaClO 2,5%	X						10
		X					14
			X				36
				X			48
					X		58
						X	40
Média							34,33
Thiram 700 PM a 0,2%	X						4
		X					20
			X				22
				X			16
					X		16
						X	14
Média							15,33

No caso dos tratamentos utilizando NaClO 2,5%, podemos observar que as taxas de germinação aumentam na medida que os frutos são também expostos a um maior tempo de exposição ao produto, com exceção do último tratamento, ou seja, 25 min de exposição, que apresentou queda da taxa de germinação (Tabela 5). Portanto, o melhor índice obtido foi o de 20 min, concordando com os resultados anteriormente apresentados na tabela 4.

Os tratamentos envolvendo Thiram apresentaram menores valores da taxa de germinação de sementes quando comparados ao tratamento com NaClO. No entanto, utilizando este fungicida, o melhor índice de germinação foi obtido com 10 min de exposição e a pior taxa com apenas 1 minuto. A partir de 15 minutos de exposição a taxa de germinação caiu para 16%, provavelmente devido à toxidez causada pelo produto. Portanto, os dados obtidos permitem concluir que o melhor tratamento testado para desinfecção de sementes de *L. alba* com propósito de germinação foi por imersão dos frutos em solução de NaClO 2,5% por 10-20 minutos e que o fungicida Thiram, normalmente utilizado para esse propósito, provavelmente causou toxidez nas sementes da espécie, muito embora este produto tenha controlado com maior eficiência o aparecimento de fungos.

4.5 Germinação em casa de vegetação

Ao contrário do que foi observado nos testes de germinação realizados em laboratório, não houve efeito de doses de KNO_3 no experimento de casa-de-vegetação com substrato orgânico e sob condições ambientes (Tabela 6).

Tabela 6- Avaliação por teste Tukey (5%) do efeito de diferentes concentrações de KNO_3 dentro dos diversos ambientes a que os frutos/sementes foram submetidos.

Efeito de diferentes concentrações de KNO_3 X Ambiente média nº de pls germinadas - Tukey 5% CV=11,05					
Doses	**Ambiente**	**Frio**	**Calor**	**Frio-Calor**	**Média**
0,000	1,00 a	2,31 a	2,59 a	2,26 a	1,96 a
0,025	1,39 a	1,08 a	1,09 a	1,31 a	1,22 ab
0,050	0,88 a	1,00 a	0,81 a	1,65 a	1,07 ab
0,100	0,64 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	0,90 b
0,200	0,50 a	2,31 a	1,31 a	1,55 a	1,33 ab
Emb. (0,2%)	1,18 a	1,56 a	1,25 a	2,19 a	1,52 ab

Não foram detectadas diferenças estatísticas entre a testemunha (dose zero) com as demais concentrações (0,0025; 0,05, 0,1 e 0,2 %). Esta ausência de resposta para o KNO_3 foi observada dentro de cada um dos tratamentos adicionais realizados no experimento de casa-de-vegetação (frio, calor, frio+calor), bem como entre as médias destes. Salienta-se que, excetuando KNO_3 a 0,025 % sob condições de ambiente e a embebição a 0,2 %, todos os demais valores de número médio de sementes germinadas foram sempre inferiores aos do controle.

Desta forma não se justifica a aplicação do estudo de regressões para as doses. Pode se afirmar também que, apesar de valores inferiores de germinação obtidos com o uso de KNO_3 nas sementes, não foi detectado efeito fitotóxico, pois as médias não diferiram estatisticamente, considerando-se uma adequada precisão experimental de 11,05%. A divergência encontrada quando comparamos resultados de laboratório e de campo pode ser devido ao menor controle de temperatura, umidade relativa e luminosidade no experimento realizado em casa-de-vegetação, além da utilização de substrato orgânico com regas freqüentes de solução de KNO_3, visando tornar-se mais semelhante ao tratamento do

laboratório, o qual utilizou Gerbox contendo papel de filtro embebido em solução de KNO_3. As temperaturas em casa de vegetação foram variáveis, ou seja, apresentou valores de mínima entre 10-11°C e de máxima de 42-43°C no período do experimento. Segundo MARCOS-FILHO (1987), muitos são os fatores que podem influenciar a germinação, principalmente os efeitos da temperatura, pois estes podem influenciar a condição fisiológica das sementes com aceleração ou redução de seu metabolismo.

A ausência do efeito de KNO_3 nos tratamentos de germinação em casa de vegetação permitiu que os dados correspondentes às doses de KNO_3 fossem agrupados dentro de cada um dos demais tratamentos, contribuindo, dessa forma, para aumentar o tamanho efetivo da amostra (300 sementes/tratamento). Com isso foram feitas análises de regressão polinomial para as variáveis: tempo em dias e número de sementes germinadas, para cada um dos tratamentos prévios realizados, o programa estatístico utilizado foi o SANEST (Sistema de Análise Estatística), tanto para as análises de variância como para as regressões.

Em termos gerais, considerando-se as médias de todos os tratamentos prévios realizados nas sementes (frutos), a equação que mais se ajustou aos dados foi a polinomial de segundo grau, com menores desvios de regressão. Vale a pena ressaltar que a significância ou não da variância desses desvios em relação aos pontos observados para os esperados (equação) é testada pela estatística F (Fisher) para rejeição ou aceite da hipótese de nulidade H0 que, nos casos envolvendo regressões polinomiais, preconiza a **não** associação entre os dois tipos de dados (falta de correlação). Então, os valores de F a 1 (significativos) ou 5% (altamente significativos) na análise de variância de regressões polinomiais, significam que a hipótese H0, de não associação entre os dados, é falsa, havendo por conseguinte, ausência de desvios ou desvios mínimos, portanto, ajuste dos pontos observados à equação determinada (LITTLE & HILLS, 1975).

Dentro de cada tratamento prévio realizado, observou-se que os R^2 foram sempre elevados, entre 90,0 a 96,0. Os tratamentos: ambiente e calor, mostraram melhor ajustes (desvios não significativos) para regressão linear dentro do intervalo de avaliação realizado (Figura 7 e 9) enquanto os demais tratamentos, ou seja, frio e frio+calor, apresentaram equação de regressão do segundo grau evidenciando um ponto de máxima resposta biológica dentro das condições deste experimento (Figuras 8 e 10). Na média de todos os tratamentos o maior número de plantas foi obtido aos 50 e 60 dias.

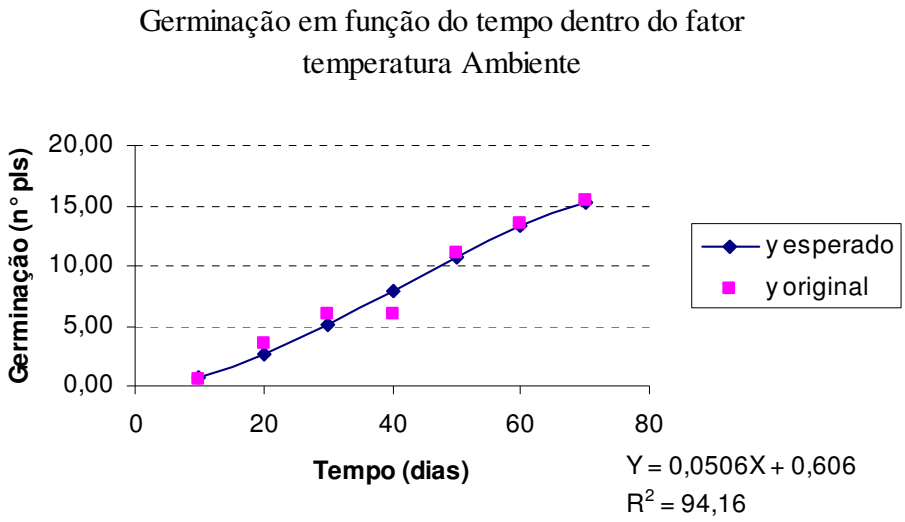


Figura 7 - Regressão polinomial, do número de plantas germinadas em temperatura ambiente.

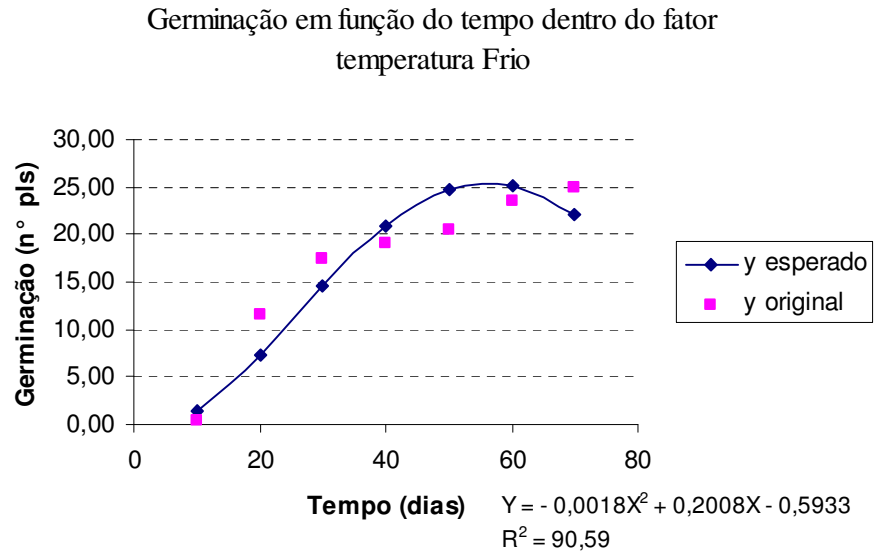


Figura 8 - Regressão polinomial, do número de plantas germinadas após aplicação de temperatura fria.

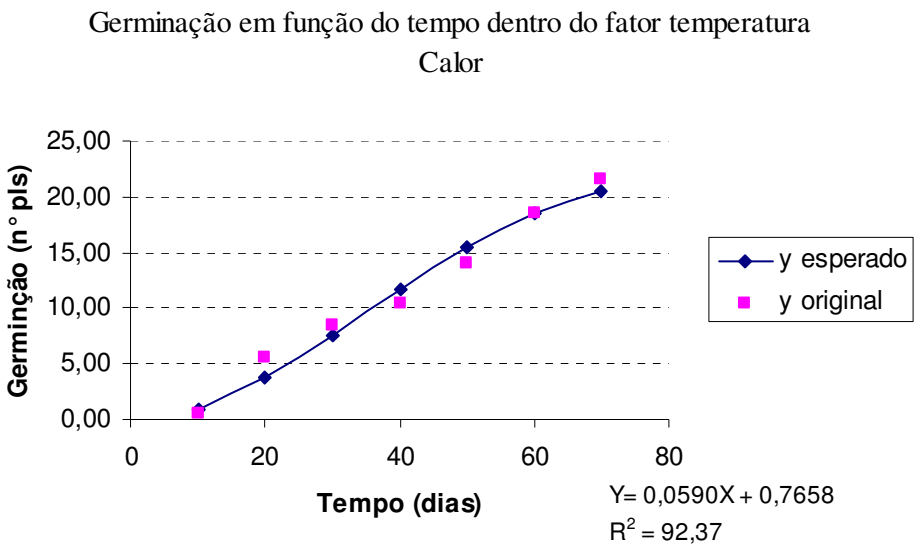


Figura 9 - Regressão polinomial, do número de plantas germinadas após aplicação de calor.

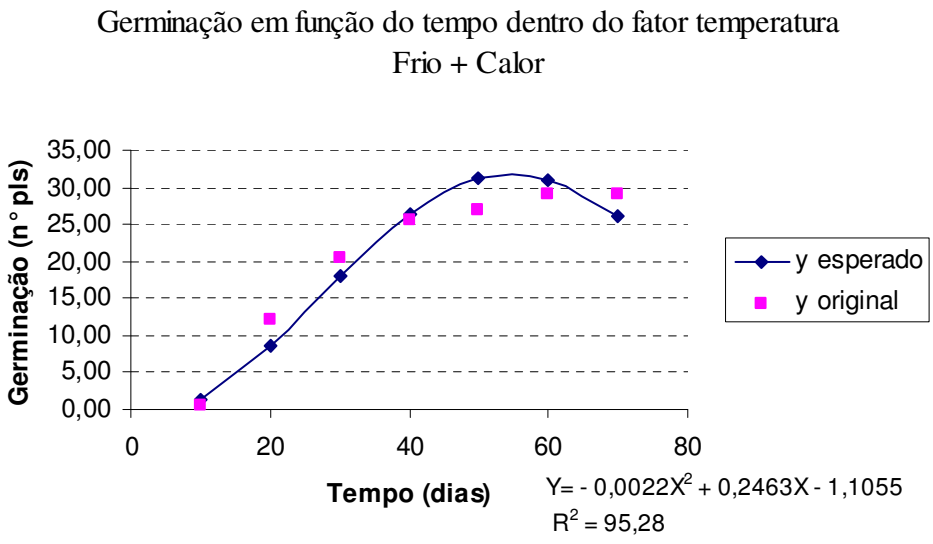


Figura 10 - Regressão polinomial, do número de plantas germinadas após aplicação de frio + calor.

Os menores valores de germinação de sementes foram obtidos no tratamento onde as mesmas foram mantidas em condições ambientes durante o período do experimento. A regressão com desvios não significativos entre os valores observados e calculados (equação) e estatisticamente não significativos foi a linear, onde se obtiveram 15 plântulas aos 70 dias da semeadura num universo amostral fixado de 300 plantas (Figura 7). O coeficiente de determinação foi de 94,2%, evidenciando elevado controle do erro experimental. Quando se aplicou às sementes o tratamento somente de frio (vide material e métodos), a equação que melhor se ajustou à resposta biológica foi a quadrática com valor de R^2 = 90,59 obtendo-se um ponto de máxima, ao aplicar a derivação da equação obtida, de 60 dias onde se estima o valor de 24 sementes germinadas (Figura 8). Este resultado superior em relação ao controle (ambiente), apesar de ainda reduzido, evidencia a necessidade de se realizar um tratamento de temperatura baixa às sementes antes da semeadura. Ao se analisar o resultado de aplicação de tratamento prévio de calor às sementes, verificamos que o valor obtido foi menor do que o do tratamento a frio, porém superior ao controle (Figura 9). A equação dentro do intervalo de avaliação que melhor explicou o efeito do tratamento aplicado foi a de primeiro grau, não permitindo o estabelecimento de um ponto de inflexão (valor máximo) dentro do intervalo considerado. Nesse caso pode-se utilizar o valor máximo como sendo o da última avaliação, mas de forma restrita, pois com maior período de avaliação poder-se-ia atingir a estabilização da curva com estimativa correta do ponto de máxima. Ao se combinar os dois tratamentos aplicados às sementes (choque térmico) ou seja, primeiro exposição ao período de frio depois, seguido um período de calor, foram obtidos os melhores resultados dentre os demais tratamentos realizados (Figura 10). O número de sementes germinadas (n^o de plântulas obtidas) no ponto estimado pela derivação da equação quadrática de regressão foi de 29,0, superior ao tratamento de ambiente (15,0). O coeficiente de determinação foi excelente, com o maior R^2 até então obtido (95,3%). Este fato indica a necessidade de aplicar às sementes, tratamentos de choque térmico, antes da semeadura. Diferentes períodos de tempo de exposição às duas condições de temperatura, bem como variações destas e também inversões (calor + frio) seriam necessários para aumentar os níveis de germinação obtidos, uma vez que o melhoramento genético envolvendo testes de progênies demanda um número elevado de plantas para as avaliações experimentais (vários locais e

anos). Além disso, a obtenção de plântulas diretamente em substrato orgânico-mineral nas condições de ambiente reduz o tempo de aclimatação e a perda nos transplantes, em relação às plântulas de laboratório.

Como salientado no material e métodos, tendo em vista que foram obtidos dois tipos de equações (linear e quadrática) nos tratamentos adotados nesta pesquisa e para tornar os resultados mais comparativos e ainda, indicar o tratamento de maior precocidade, optou-se por estimar, a partir das equações, o valor de germinação no intervalo de 25 dias de avaliação. Desta forma, para o número de sementes germinadas, foram obtidos os valores de 4,0; 11,0; 6,0 e 14,0 (Tabela 7). Este resultado mostra que o tratamento de choque térmico com um período de frio seguido de calor mostrou-se ainda, superior, embora mais próximo do tratamento de somente a frio.

Tabela 7 – Número de plantas germinadas de *Lippia alba* aos 25 dias de semeadura, para verificar a precocidade de cada um dos tratamentos.

Tratamento	N° de plantas germinadas aos 25 dias
Ambiente	4
Frio	11
Calor	6
Frio + Calor	14

4.6 Realização dos Cruzamentos Dirigidos

Considerando o modo de preferencial de reprodução alogâmico sugerido para a espécie e o tamanho reduzido das flores e visando maior praticidade para obtenção de progênies, foi adotada a estratégia de isolar aleatoriamente os parentais escolhidos para cruzamento utilizando como barreira física para evitar a contaminação por pólen externo a distância e plantas adultas de cafeeiro (distância mínima de 30 metros entre dois cruzamentos, como indicado na figura 2).

As infrutescências de cada um dos cruzamentos foram colhidas em diferentes períodos (abril a junho) e mantidas em geladeira. Para comparação do grau de produção de sementes supostamente híbridas, os frutos foram pesados e contados. O número médio do

total de frutos obtidos de cada cruzamento foi de 291, com peso médio de 50 frutos de 0,034. O número médio de plantas obtidas a partir da germinação de todos os frutos obtidos no período de coleta foi de cinco, o que representa 2,87% desse total (Tabela 8).

Tabela 8 - Produção total de frutos, peso de 50 frutos (gramas) e número de plantas obtidas a partir do plantio total de frutos obtidos de cruzamentos de diferentes clones de *Lippia alba.*

	Cruzamento	Pl. mãe	N° frutos/ Desvio	Soma	Peso 50 frutos/ Desvio	Pl. obtidas (%)	Desvios Pl. obtidas
4	**IAC-8 x IAC-20**	IAC-8	252 (-13,48)		0,058 (68,60)	16 (6,35)	121,25
		IAC-20	63 (-78,37)	315	0,027 (-21,51)	12 (19,05)	563,76
3	**IAC-8 x IAC-17**	IAC-8	305 (4,72)		0,05 (45,35)	9 (2,95)	2,79
		IAC-17	855 (193,56)	1160	0,037 (7,56)	4 (0,47)	-83,62
8	**IAC-17 x IAC-11**	IAC-17	490 (68,24)		0,033 (-4,07)		
		IAC-11		490			
5	**IAC-20 x IAC-2**	IAC-20	936 (221,37)		0,049 (42,44)	33 (3,52)	22,65
		IAC-2	310 (6,44)	1246	0,055 (59,88)	4 (1,29)	-55,05
12	**IAC-6 x IAC-13**	IAC-6	302 (3,69)		0,083 (141,28)	2 (0,66)	-77,00
		IAC-13	948 (225,49)	1250	0,024 (-30,23)		
10	**IAC-13 x IAC-11**	IAC-13					
		IAC-11					
2	**IAC-2 x IAC-8**	IAC-2	113 (-61,20)		0,051 (48,26)	5 (4,42)	54,01
		IAC-8	355 (21,89)	468	0,06 (74,42)	11 (3,10)	8,01
7	**IAC-17 x IAC-13**	IAC-17	235 (-19,31)		0,037 (7,56)	1 (0,42)	-85,37
		IAC-13		235			
1	**IAC-8 x IAC-8**	IAC-8	124 (-57,42)	124	0,056 (62,79)	2 (1,61)	-43,90
11	**IAC-11 x IAC-11**	IAC-11	217 (-25,49)	217	0,04 (16,28)	2 (0,92)	-67,94
9	**IAC-13 x IAC-13**	IAC-13					
6	**IAC-17 x IAC-17**	IAC-17	320 (9,87)	320	0,029 (-15,70)		
	MÉDIA		**291,25**		**0,0344**	**5,05 (2,87)**	

Onde: IAC-2, IAC-6 e IAC-8, pertencem ao quimiotipo linalol; IAC-11 ao quimiotipo mirceno/cânfora; IAC-13 quimiotipo limoneno/carvona; IAC-17 quimiotipo citral; e IAC-20 pertence ao quimiotipo mirceno.

Os principais resultados dos quimiotipos envolvidos nos cruzamentos realizados são:

IAC-8 (quimiotipo linalol), participou dos cruzamentos 1, 2, 3 e 4, com diferentes respostas em função do quimiotipo com o qual foi cruzado. O cruzamento 1 foi realizado com ele próprio (autofecundação) tendo sido observada a mais baixa produção de sementes. No entanto, os frutos apresentavam peso acima da média. As sementes oriundas desta autofecundação apresentaram aspecto fosco e baixo índice de germinação tendo sido obtido apenas duas plantas adultas. No caso do cruzamento 4 (com IAC-20, quimiotipo mirceno),

o clone IAC-8 produziu um total de sementes abaixo da média, embora com elevado peso de 50 sementes (252 e 0,058, respectivamente). A resposta de germinação das sementes desse cruzamento foi relativamente rápida, quando comparada às demais progênies, e foram obtidas 16 plantas do total de 252 frutos plantados (6,35%). No cruzamento 3 (com o IAC-17, do quimiotipo citral), o IAC-8 produziu número de frutos e peso de 50 sementes acima da média (305 e 0,050, respectivamente). Finalmente, os resultados do cruzamento 2, clone IAC-8 com o clone IAC-2 (quimiotipo linalol) apresentaram número de frutos e peso de 50 sementes acima da média (355 e 0,060, respectivamente). O índice de germinação obtido foi de 11 plantas (3,1%) neste cruzamento.

IAC-2 (quimiotipo linalol) participou dos cruzamentos 2 e 5, nos quais respondeu da seguinte forma. Ao ser cruzado com o clone IAC-20 (quimiotipo mirceno) produziu número mediano de frutos (310) e de peso acima da média (0,055). Porém, o número de plantas obtidas dessa planta foi relativamente baixo, de apenas quatro do total de frutos plantados, ou seja, 1,29%. No cruzamento desse mesmo clone com outro do quimiotipo linalol (IAC-8), foi obtido 113 frutos de peso médio de 0,051 (50 frutos). Do total de frutos plantados foram obtidas apenas cinco plantas, o que corresponde a 4,42% de germinação.

IAC-6 (quimiotipo linalol). Este clone foi cruzado apenas com o quimiotipo limoneno/carvona (IAC-13) e está representado no cruzamento 12. A produção de frutos desse clone foi mediana (302). Porém, os frutos apresentaram o maior peso de 50 sementes quando comparado aos demais (0,083). No entanto, parece não haver correspondência entre peso de frutos e taxa de germinação ou de obtenção de plantas, pois foram obtidas apenas duas plantas do total de sementes plantadas, cujo índice (0,66%) foi um dos menores encontrados.

IAC-20 (quimiotipo mirceno). Este quimiotipo participou dos cruzamentos 4 e 5. No primeiro caso foi cruzado com o quimiotipo linalol (IAC-8) e produziu número total e peso de 50 sementes bastante abaixo da média (63 e 0,027, respectivamente). Em contrapartida, no segundo cruzamento, realizado com o clone IAC-2 (linalol), este clone produziu o maior número de frutos dentre todos clones (936) de tamanho acima da média (0,049). O número de plantas obtidas foi relativamente baixo (3,53%) correspondendo a 33 plantas.

IAC-17 (quimiotipo citral). Participou dos cruzamentos 3, 6, 7 e 8. No cruzamento 3, com o clone IAC-8, do quimiotipo linalol, este clone produziu elevado número de frutos (855) de peso mediano (0,037). Porém, o número de plantas derivadas desse clone foi baixo, de apenas quatro plantas ou 0,47% de sucesso. A autofecundação desse clone (cruzamento 6) produziu número mediano de frutos (320), porém grande número de chochos e nenhuma planta foi obtida de suas sementes. O cruzamento do IAC-17 com IAC-13 (limoneno/carvona), ou seja, cruzamento 7, produziu 235 frutos de peso semelhante à média (0,037). Do total de 235 frutos colocados para germinar apenas uma planta foi obtida (0,42%). O cruzamento 8 corresponde ao produto do mesmo clone cruzado com o quimiotipo mirceno/cânfora (IAC-11). A produção de frutos foi acima da média (490) e de peso semelhante à média (0,033). No entanto, esse cruzamento não apresentou nenhuma semente germinada. Vale ressaltar que os frutos desse cruzamento apresentavam-se foscos e porosos, observações realizadas nos testes de viabilidade do embrião, quando puderam ser observados sob lupa.

IAC-11 (quimiotipo mirceno/cânfora). O clone citado participou dos cruzamentos 8, 10 e 11. Nos cruzamentos 8 e 10 este clone foi cruzado com os quimiotipos citral e limoneno/carvona, IAC-17 e IAC-13, respectivamente. Em ambos os cruzamentos não houve a formação de frutos. O cruzamento 11 refere-se à sua autofecundação e o peso de 50 frutos observado foi acima da média (0,040), sendo que do total 217 frutos produzidos, apenas 2 plantas foram obtidas (0,92%).

IAC-13 (limoneno/carvona). Este quimiotipo participou de 4 cruzamentos (7, 9, 10 e 12). O cruzamento 9 assim como os cruzamentos 6 e 1 de autofecundação, não gerou indivíduos, porém neste caso não houve se quer a formação de frutos, as infrutescências não se apresentavam cheias. O cruzamento 7, com o clone IAC-17 (citral), produziu 235 frutos de peso mediano (0,037) e apenas uma planta foi obtida a partir do plantio do total de frutos obtidos, ou seja, a taxa de obtenção de plantas apenas de 0,42%. No caso do cruzamento 12, em que foi cruzado com IAC-6 (linalol), a produção de frutos foi a maior de todos os clones (948) embora de peso inferior à média (peso de 50 frutos de 0,024), evidenciando a ocorrência de frutos chochos. Nenhuma planta foi obtida desse cruzamento. Os outros dois cruzamentos do clone IAC-13, com o quimiotipo mirceno/cânfora (IAC-11) e com ele próprio não geraram frutos.

Portanto, observando-se o comportamento de todos os clones em conjunto, podemos inferir que o linalol esteve presente em seis cruzamentos dos quais em 5 resultou em boa produção de sementes, excetuando-se a produção da sua autofecundação.

O quimiotipo mirceno só aparece em dois cruzamentos e ambos realizados com linalol (IAC-2 e IAC-8). Porém, apenas com o IAC-2 houve acentuada produção de frutos de peso elevado, já que os resultados obtidos a partir do cruzamento com IAC-8 foram inferiores.

O quimiotipo citral participou de quatro cruzamentos sendo um com cada quimiotipo. De modo geral as respostas foram boas considerando que mesmo com o quimiotipo mirceno/cânfora ou em autofecundação houve produção de frutos. Porém só foi possível obter plantas desses cruzamentos quando o parental utilizado foi linalol ou limoneno/carvona.

Para o quimiotipo mirceno/cânfora e limoneno/carvona (IAC-11 e IAC-13, respectivamente) a resposta de produção de frutos não foi boa em nenhum dos cruzamentos. Frutos colhidos do IAC-13 não geraram nenhuma planta adulta durante o experimento.

Para a característica número de frutos produzidos, os 3 melhores resultados foram alcançados pelos genótipos IAC-13, IAC-20 e IAC-17, conforme se verifica na Tabela 8, cujos valores foram de 948, 936 e 855, respectivamente. Já quando se analisa a característica peso de 50 frutos, as melhores respostas advêm do quimiotipo linalol (IAC-6 e IAC-8), que apresentaram valores de 0,083 e 0,058g, respectivamente. Para obtenção de plantas adultas, os genótipos que renderam os maiores valores de plantas obtidas (%) foram IAC-20 e IAC-8, com 19,05 e 6,35%, respectivamente, cujo número de plantas obtidas foram de 33 e 16, respectivamente. Porém, os resultados obtidos indicam não haver relação entre número e peso de frutos com o número de plantas obtidas.

O clone IAC-20 (mirceno) apresentou boa capacidade de cruzamento com os demais clones com os quais foi cruzado, estando presente em 6 dos dez melhores índices para produção e peso de frutos, maior índice de plantas germinadas em número e em porcentagem. Em contrapartida, o genótipo IAC-13 (limoneno/carvona), muito embora tenha apresentado elevado número de frutos quando cruzado com IAC-6, não gerou nenhuma planta com os demais cruzamentos e mesmo quando foi autofecundado.

4.7 Análise por RAPD

As figuras 11 a 17 apresentam produtos de amplificações de RAPD e indicam a formação de prováveis híbridos dos cruzamentos 1, 2, 3, 5, 7, 11 e 12. De forma ilustrativa, optou-se apresentar pelo menos um dos *primers* analisados para cada cruzamento.

A Figura 11 ilustra o produto da reação RAPD obtido para o clone IAC-8 e os descendentes da sua autofecundação (cruzamento 1). O perfil do *primer* OPK-14 mostrou que nenhum indivíduo diferenciou do parental. Apesar de poucos indivíduos obtidos na progênie, este resultado permite inferir que os amplificados não segregaram, evidenciando uma possível homozigose para estas marcas.

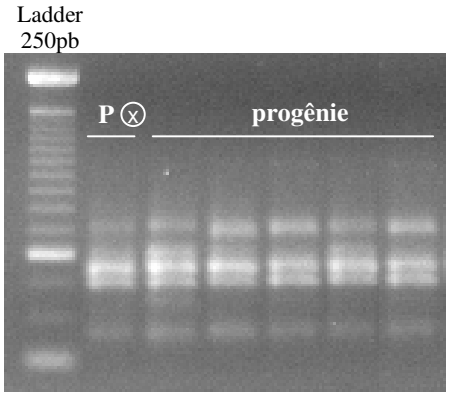


Figura 11 – Gel de agarose 1,2% ilustrando o perfil de amplificação RAPD do quimiotipo linalol (IAC-8) e da progênie derivada da sua autofecundação obtido com o *primer* OPK-14 (*Operon Technologies*).

A figura 12 mostra os amplificados RAPD obtidos com o *primer* OPK-2 para o cruzamento IAC-2 linalol x IAC-8 linalol (cruzamento 2). Este cruzamento gerou 12 indivíduos na progênie. Vale salientar que os clones parentais, embora ambos do quimiotipo linalol, são quimicamente distintos, o IAC-8 formado exclusivamente pelo isômero (+) linalol enquanto que o IAC-2 possui os dois isômeros (+) linalol e (-) linalol. Além disso, diferiram também em massa seca, rendimento de óleo total e no perfil RAPD (YAMAMOTO, 2006), conforme pode ser também observado na figura 13. Pode ainda ser observado que o genótipo IAC-2 (p1) apresenta duas bandas consistentes, com pesos moleculares de aproximadamente 1200 e 750 pb, ao passo que o IAC-8 (p2) apresenta bandas com pesos moleculares de aproximadamente 1000 e 700 pb. Nas progênies desse

cruzamento observou-se segregação de onze indivíduos ocorrendo três bandas e somente um deles (indivíduo 10) com duas bandas de mesmo peso molecular ao p1. Dos indivíduos com três bandas, o individuo 4 apresentou duas delas com peso molecular semelhante ao p2, enquanto que os demais dez indivíduos apresentam duas bandas com peso molecular semelhante ao p1. É importante salientar que em onze indivíduos surgiu uma nova banda de peso molecular distinto dos parentais. Provavelmente houve recombinação gênica entre os dois materiais, o que mostra necessidade de verificar a segregação para óleos essenciais majoritários na progênie. Se houver segregação para quimiotipos diferentes de linalol pode-se concluir que o marcador não é associado ao quimiotipo, segregando independentemente.

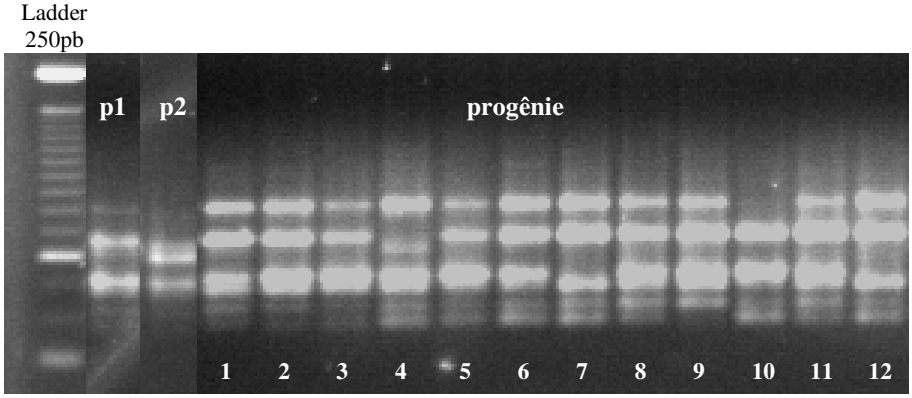


Figura 12 - Perfil RAPD (*primer* OPK-2) em gel de agarose 1,2% de dois parentais de *Lippia alba* (p1: IAC-2 e p2: IAC-8, ambos quimiotipo linalol) e respectiva progênie obtida do cruzamento entre ambos, representada por 12 indivíduos.

A figura 13, por sua vez, apresenta o resultado da reação de RAPD com o *primer* OPK-6 para o cruzamento entre os clones IAC-8 - linalol, IAC-17 - citral (cruzamento 3). Os parentais apresentaram resolução no gel de três bandas bem definidas e na plântula originada desse cruzamento gerou pelo menos quatro bandas. No indivíduo da progênie observa-se somente uma banda em comum aos parentais, com aproximadamente 1200 pb. O fragmento de aproximadamente 750 pb, observada na plântula, é também encontrado no p2. Por outro, a banda mais avançada no gel de aproximadamente 500 pb está presente somente no parental p1 e na plântula segregante. Apesar de termos somente um indivíduo ou plântula germinada, observou-se recombinação das marcas RAPD. Nesse caso do cruzamento 3, linalol com citral, houve presença de bandas comuns aos dois parentais além

de bandas novas. Vale dizer que nos 20 clones de *L. alba* estudados por YAMAMOTO (2006), bem como de outros estudos não incluídos em suas pesquisas (comunicação pessoal) e nos 16 acessos de JANNUZZI (2006), não foram observados nos cromatogramas a presença simultânea dos componentes linalol e citral num único indivíduo. Portanto, o indivíduo obtido do cruzamento em questão pode representar um novo quimiotipo e esta informação deverá ser futuramente confirmada por análise da composição química do óleo essencial.

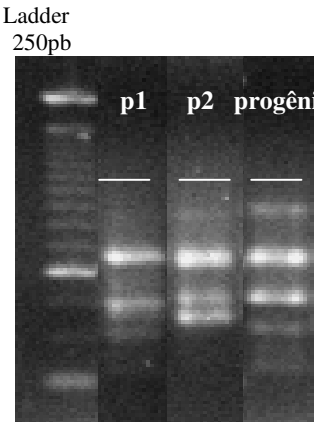


Figura 13 - Gel de agarose 1,2% ilustrando o perfil de amplificação RAPD obtido com o *primer* OPK-6 (*Operon Technologies*) em *Lippia alba* de dois parentais (p1: IAC-8 e p2: IAC-17) e respectivo híbrido.

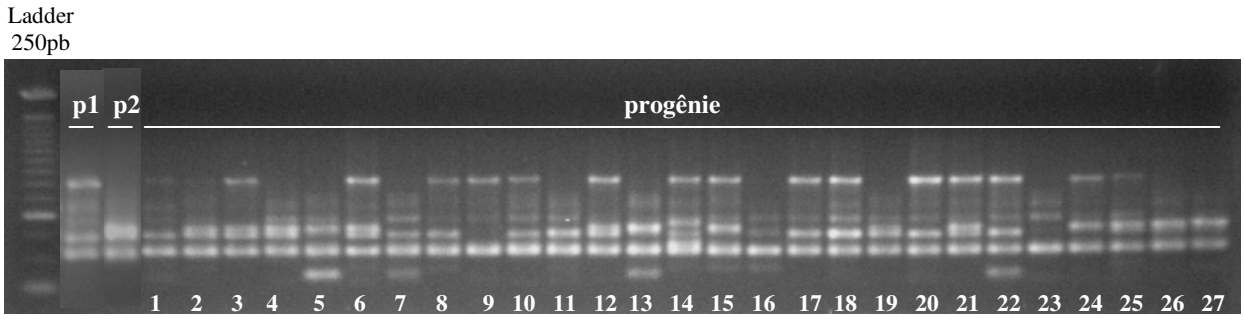


Figura 14 - Resultado da RAPD em gel de agarose a 1,2%, referente ao cruzamento 5 (OPK-17), onde: p1: IAC-20 (mirceno), p2: IAC-2 (linalol) e Progênie com 27 indivíduos.

O resultado RAPD obtido com o *primer* OPK-17 para o cruzamento 5, realizado entre os clones IAC-20 (mirceno) e p2: IAC-2 (linalol), está apresentado na figura 14. Os indivíduos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27 da progênie apresentam claramente bandas de ambos os parentais (ou novas bandas), evidenciando a ocorrência de recombinação entre os parentais. Porém, nos demais indivíduos da progênie foi observado somente o perfil de um dos parentais (indivíduos 2, 10, 17, 18 e 20), que apresentam bandas de mesmo peso molecular daquelas do parental p1, não confirmando a recombinação entre os parentais.

O perfil de amplificação obtido com o *primer* OPK-14 (Figura 15) para os clones parentais IAC-17 – citral e IAC-13 – limoneno/carvona (cruzamento 7) e progênie, representada apenas por uma planta, revela que o híbrido obtido apresenta um perfil de bandas que reúne amplificado de p1 e de p2, sugerindo outro caso de hibridação. Também nesse caso, deveremos ter um novo quimiotipo representado pelos componentes limoneno-carvona e citral, ambos quimiotipos com certa semelhança olfativa.

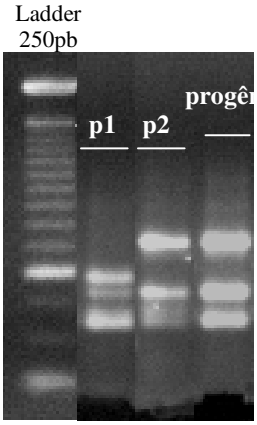


Figura 15 - Gel de agarose 1,2% ilustrando o perfil de amplificação RAPD obtido com o *primer* OPK-14 (*Operon Technologies*) dos quimiotipos citral (p1: IAC-17) e limoneno/carvona (p2: IAC-13) de *Lippia alba* e o respectivo híbrido entre ambos.

A autofecundação do clone IAC-11, mirceno-cânfora (cruzamento 11), produziu apenas uma planta, cujo perfil molecular RAPD (*primer* OPK-14), juntamente com seu parental, encontra-se ilustrado na Figura 16. Ambos possuem os mesmos amplificados sugerindo que este marcador esteja em homozigose e a probabilidade do híbrido ser filho de

pólen contaminado é bastante reduzida, uma vez que não foi observada a presença de alelos diferentes do parental.

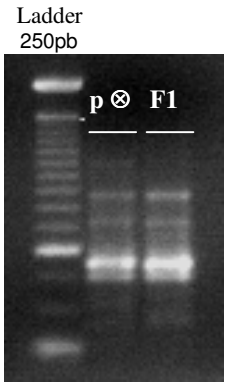


Figura 16 - Gel de agarose 1,2% ilustrando o perfil de amplificação RAPD obtido com o *primer* OPK-14 (*Operon Technologies*) do quimiotipo mirceno/cânfora (p⊗: IAC-11) de *Lippia alba* e a respectiva progênie obtida da sua autofecundação.

Foram obtidos dois indivíduos do cruzamento entre IAC-6 (linalol) e IAC-13 (limoneno/carvona), representado pelo cruzamento 12. O perfil de amplificação RAPD desses genótipos encontra-se na Figura 17. O primeiro indivíduo da progênie apresenta um perfil de bandas idêntico ao p1 enquanto que o segundo indivíduo também apresentou os mesmos amplificados de p1, exceto a banda de 1050 pb. Em ambos os casos não se pode afirmar tratar-se de híbridos.

No caso dos cruzamentos 3 (IAC-8 e IAC-17) e 12 (IAC-6 e IAC-13), nenhum dos 8 *primers* RAPD utilizados para comprovar a existência de híbridos foi capaz de diferenciar os parentais de cada cruzamento. Nesses casos, não é possível fazer inferências sobre a natureza híbrida das progênies obtidas.

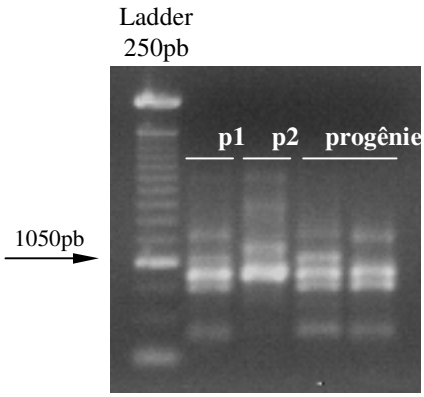


Figura 17 – Gel de agarose 1,2% apresentando amplificados RAPD (*primer* OPK-14) de dois quimiotipos de *Lippia alba* p1: IAC-6 (linalol) e p2: IAC-13 (limoneno/carvona) e dois indivíduos obtidos de sementes de p1.

Ocorrência de contaminações

Conforme relatado, os cruzamentos dirigidos foram realizados plantando-se os parentais a 50 cm um do outro e mantidos isolados em pelo menos 30 metros de distância um cruzamento do outro e as plantas posicionadas na mesma linha de uma plantação de café com cerca de quinze anos de idade. Ou seja, não se imaginou que guardando esses cuidados poderia ocorrer a contaminação por polens indesejáveis. No entanto, o perfil molecular do cruzamento 5 (IAC-20 -mirceno e IAC-2 - linalol) revela que esse cruzamento foi contaminado por polens de outros clones. Para ilustrar essa ocorrência no cruzamento 3, a figura 18 apresenta perfis RAPD gerados a partir de diferentes *primers* evidenciando a ocorrência de contaminação de polens do clone IAC-13 nesse cruzamento, onde os indivíduos 17 e 1 são supostos híbridos do referido cruzamento. Ambos indivíduos apresentam amplificados do clone IAC-13 e que não estão presentes nos supostos parentais. Observando o mapa de campo que apresenta a posição relativa das plantas no cafezal (página 29), observa-se que o clone IAC-13 encontra-se próximo às plantas do cruzamento 3, aumentando a possibilidade de contaminação.

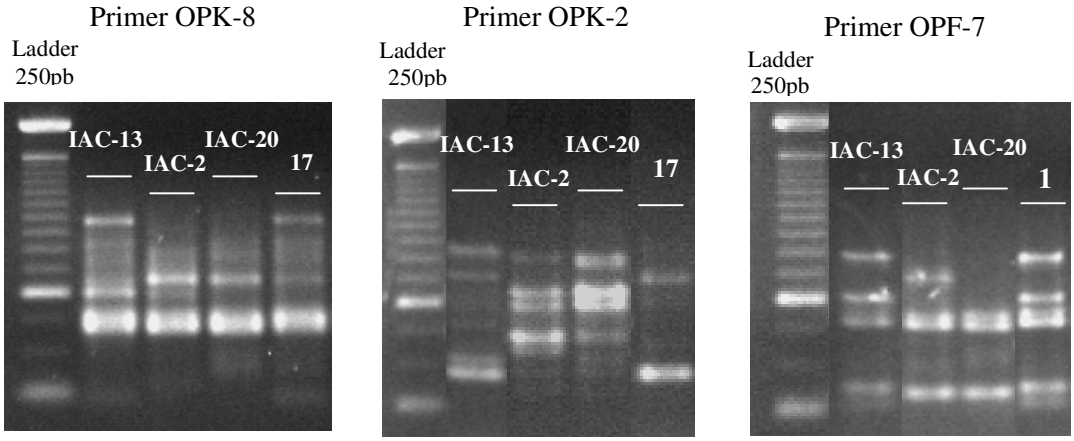


Figura 18 – Perfis RAPD gerados a partir de diferentes *primers* evidenciando a ocorrência de contaminação de polens do clone IAC-13 no cruzamento dos clones IAC-2 e IAC-20, onde 17 é o suposto híbrido do cruzamento.

Ainda no cruzamento 5, foram identificados outros indivíduos (2, 16 e 22) da progênie que sugerem serem filhos de outro genótipo que não o utilizado como parental masculino (dados não mostrados).

Em relação aos cruzamentos 2 (IAC-8 x IAC-2) e 7 (IAC-17 x IAC-13), cujas progênies obtidas produziram 16 e 1 planta, respectivamente, os marcadores RAPD utilizados (8 *primers*) não foram informativos o bastante para diferenciar os parentais desses cruzamentos e, conseqüentemente, não foi possível evidenciar a ocorrência de híbridos. De forma análoga, plantas obtidas de outros cruzamentos não puderam ser confirmadas como resultado da hibridação natural entre os clones parentais escolhidos para realizar os cruzamentos por meio das análises moleculares. Nesses casos, as plantas encontram-se em casa de vegetação e aguardando a produção de massa verde de folhas suficiente para obtenção do perfil fitoquímico. Além disso, outros marcadores (*primers*) deverão ser testados nessas plantas com objetivo de confirmar a sua natureza híbrida.

Diversidade genética de quimiotipos

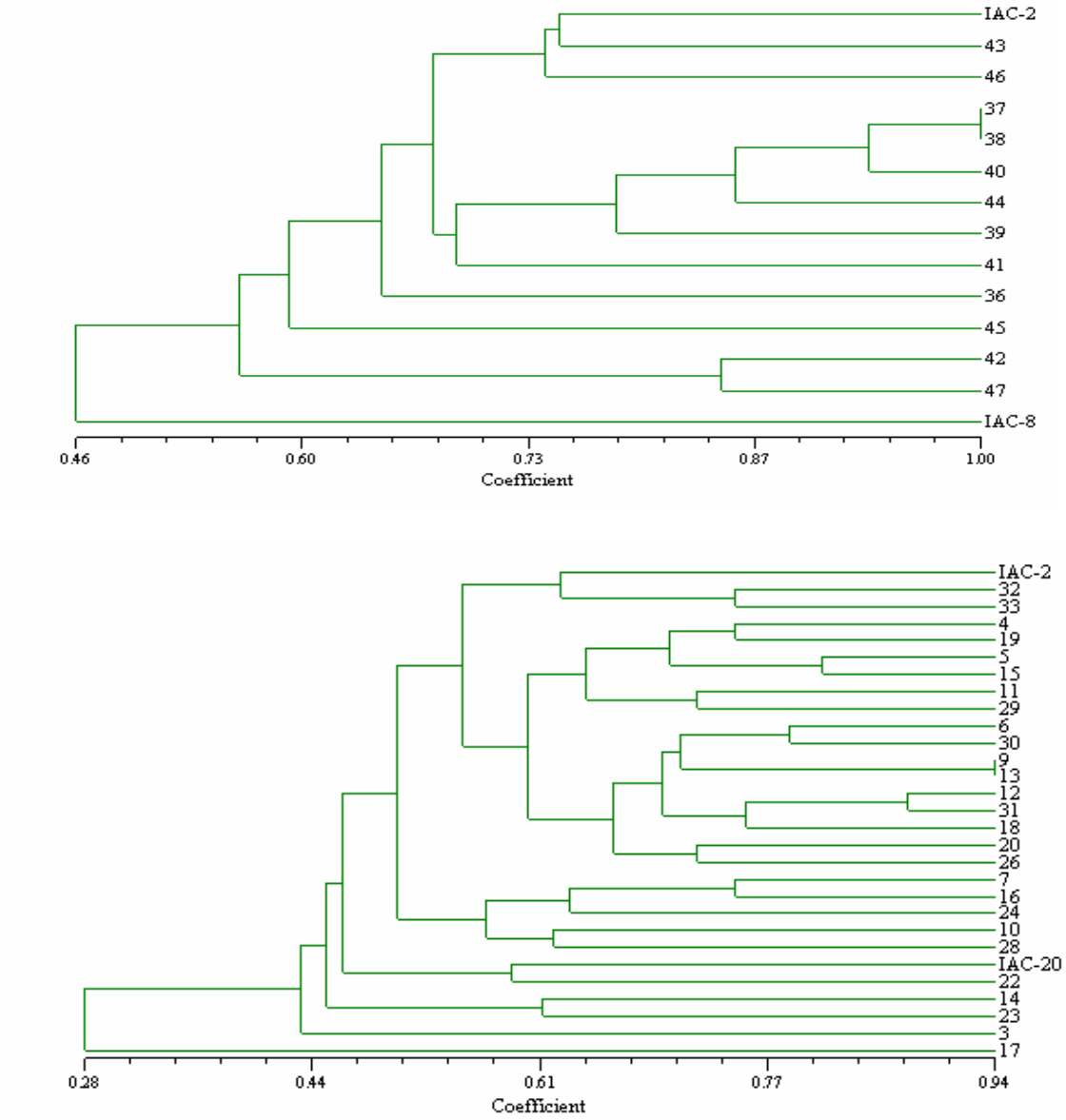
Dois dos cruzamentos realizados e que produziram maior número de descendentes (2 e 5) foram utilizados para uma análise da diversidade gerada a partir da recombinação

dos respectivos parentais. Para tanto, todos os amplificados RAPD obtidos nos parentais e respectivas progênies foram lidos na forma de presença ou ausência, no conjunto de indivíduos do cruzamento 2 e 5, 35 bandas apresentaram-se polimórficas e foram retidas para a análise de classificação hierárquica, respectivamente. A Figura 19 apresenta o resultado dessa análise. Em ambos os casos podemos observar que praticamente todos os indivíduos representando as progênies dos cruzamentos se posicionaram entre os parentais, ilustrando a ocorrência de recombinação alélica entre os parentais.

Ainda em relação à possibilidade de ocorrência de contaminação de pólen no campo de cruzamento, esta evidência também pode ser obtida ao se observar a figura 19b, do cruzamento 5. O indivíduo 17 dessa progênie apresentou bandas inexistentes nos parentais e quando classificado pelo método UPGMA se posicionou em separado, confirmando a sua distância genética dos demais indivíduos da família.

Em se tratando de dar início a um programa de melhoramento genético de *L. alba*, que apresenta diversos quimiotipos já conhecidos e que poderiam ser explorados de imediato, a exemplo dos estudos realizados por YAMAMOTO (2006) que analisou a estabilidade do óleo essencial de diversos genótipos e três ambientes, outra estratégia seria a criação de novos quimiotipos, por meio de recombinação genética. Conforme observado na figura 19, as progênies obtidas sugerem que houve recombinação entre os parentais e que novos quimiotipos devem ter surgido. A confirmação dessa hipótese será obtida muito em breve, quando as plantas apresentarem massa foliar que permita a extração e obtenção do perfil químico do seu óleo essencial.

Figura 19 - Dendrograma (UPGMA) realizado em *Lippia alba* com sete *primers* (*Operon Technologies Inc*): OPK-2; OPK-4; OPK-6; OPK-8; OPK-14; OPK-17 e OPF-7 a partir de similaridade genética calculada por Jaccard. **a.** Cruzamento 2 (IAC-2 x IAC-8) e progênie de 12 indivíduos; **b.** Cruzamento 5 (IAC-2 x IAC-20) com progênie de 27 indivíduos.



4.8 Análise Citogenética

Para análise da viabilidade dos grãos de pólen foram coletados botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 20), pois, segundo (CAUVIN, 1984), o estádio ideal de para coleta de pólen é quando os botões florais se encontram em antese, informação desconhecida para *L. alba.* O melhor estádio para visualização e análise de grãos de pólen nessa espécie foi o S4, que permitiu obter imagens claras do tamanho e intensidade de coloração dos mesmos após tratamento com carmim acético (Figura 21). Os grãos de pólen desses botões florais apresentaram tamanho e coloração bastante variados e em muitos deles apenas caloses, com ausência interna do grão propriamente dito. Em um mesmo campo de visualização foi freqüente a observação de grãos de pólen estéreis ou apenas um ou poucos corados.

Figura 20 – Estádios de desenvolvimento floral de *L. alba*, coletados para análise e classificados em ordem crescente de desenvolvimento em S1-S5.

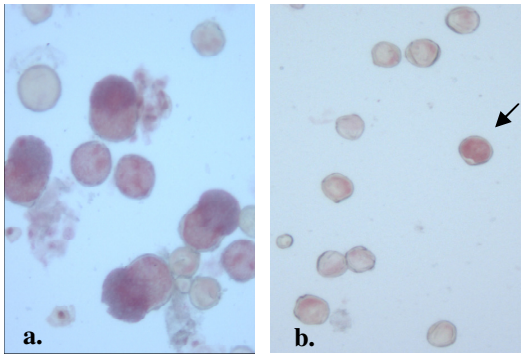


Figura 21 – Grãos de pólen presentes em células do botão floral de *L. alba* em S4. **a.** Variação de tamanho e coloração dos grãos de pólen. (Aumento de 40X e opt 2). **b.** Seta indicando grão de pólen viável (Aumento de 40X e opt. 1,25).

A tabela 9 resume os resultados da contagem do número de grãos de pólen cheios, vazios e de tamanho reduzido obtidos para os sete genótipos de *L. alba* participantes dos cruzamentos biparentais. Os valores desta tabela representam a média de 20 campos visuais de 3 lâminas para cada genótipo analisado. Com base na média de grãos de pólen cheios (viáveis) podemos inferir se a planta é mais ou menos fértil, uma vez que a fertilidade está diretamente relacionada com a porcentagem de células cheias ou coradas. Diversos autores assumem que para uma boa porcentagem de fertilização a planta deve produzir aproximadamente 80% de grãos viáveis (Cecília M. Pinto, comunicação pessoal).

Tabela 9 – Contagem de grãos pólen de sete genótipos de *L. alba,* sob colorimetria com carmim acético 2% (Aumento de 40X e opt 2).

GENÓTIPOS	GRÃOS DE PÓLEN						
	Cheios		Vazios		Pequenos		Total de pólen
	N°/campo	%	N°/campo	%	N°/campo	%	
IAC-2	17,65	54,69	8,30	26,10	5,70	19,21	1059,00
IAC-6	21,20	66,06	7,55	24,17	3,15	9,76	1272,00
IAC-8	25,75	61,79	12,05	28,78	3,55	9,41	1545,00
IAC-11	15,50	49,75	20,85	42,39	2,60	7,84	930,00
IAC-13	7,60	31,67	17,65	66,10	0,55	2,22	456,00
IAC-17	23,95	**76,85**	4,45	15,97	1,90	7,18	1437,00
IAC-20	34,95	69,37	11,90	23,37	3,75	7,25	2097,00
MÉDIA	20,94	58,60	11,82	32,41	3,03	8,98	1256,57

Os dados obtidos mostram grande variabilidade na quantidade e viabilidade dos grãos de pólen entre os clones analisados. O genótipo IAC-20 atingiu a maior produção de pólen (média de 35 grãos por campo) e a segunda maior porcentagem de grãos cheios/viáveis (69,37%), estando muito acima da média, quando comparado aos demais genótipos, fato este que pode explicar a maior produção de frutos e obtenção de um maior número de plantas obtidas, conforme se verifica nos cruzamentos 4 e 5 (Tabela 8).

A produção de pólen do genótipo IAC-17 manteve-se acima da média (24 grãos de pólen por campo), porém o material foi responsável pela terceira maior produção de frutos (Tabela 8, cruzamento 3). Este genótipo atingiu 77% de grãos cheios/viáveis (Tabela 9) durante a visualização em microscopia e número de grãos de pólen vazios ou inviáveis

abaixo da média, ou seja, apenas 15,97% de grãos inviáveis contra 32,41% da média obtida.

Em contrapartida, o genótipo IAC-13 atingiu os menores índices para produção de grão de pólen e porcentagem de grãos viáveis (7,6 e 31,67%, respectivamente). Este material apresentou anteras totalmente estéreis e baixa produção de polens ao ser visualizado em microscopia, atingindo apenas 456 polens totais após toda a contagem (Tabela 9). Este fato pode justificar o insucesso na obtenção de híbridos quando este genótipo foi utilizado como parental masculino (Tabela 8, cruzamentos 7, 10 e 12) ou quando foi autofecundado (Tabela 8, cruzamento 9). No entanto, o clone IAC-13 produziu a maior quantidade de frutos (Tabela 8, cruzamento 12), muito embora de pequeno tamanho ou chochos.

Da mesma forma, o genótipo IAC-11 apresentou baixo número de pólen totais (930) e com elevada porcentagem de grãos de pólen vazios ou inviáveis (42,39%). Além disso, a visualização em microscopia permitiu notar que os grãos de pólen que apresentavam-se rosados (cheios/viáveis) possuíam aspecto deformado da borda dos mesmos. Este clone praticamente não produziu frutos quando utilizado como parental masculino (Tabela 8, cruzamentos 8 e 10) ou quando foi autofecundado (Tabela 8, cruzamento 11).

Dos genótipos que representavam o quimiotipo linalol (IAC-2, IAC-6 e IAC-8), com exceção do IAC-2, os demais mantiveram uma produção e porcentagem de grãos de polens cheios/viáveis acima da média (22 e 66,06% para IAC-6 e 26 e 61.79% para IAC-8, respectivamente). Apesar do genótipo IAC-2 ter atingido uma relativa produção de frutos e de plantas recombinantes (Tabela 8, cruzamentos 2 e 5), o mesmo manteve-se um pouco abaixo da média em relação aos demais clones linalol. Porém, analisando-se a tabela 9, vale ressaltar que este indivíduo foi o único que obteve uma elevada porcentagem de polens pequenos (quase 20%), o que pode sugerir ter ocorrido problemas no balanceamento da carga genética destes polens, apesar deste genótipo haver produzido plantas recombinantes. Muitas vezes o desbalanceamento genético não necessariamente conduz à inviabilidade polínica (SCOTT, 1998). A variação no tamanho nos grãos de pólen já foi observada em diversas plantas com ploidia alterada, como por exemplo trigo, batata e tomate. (RAY, 1992; YERK, 1989; WOLTERS *et al.*; 1994).

Portanto, as análises de viabilidade realizadas até o momento com colorimetria por carmim acético indicaram que, de forma geral, a baixa viabilidade dos genótipos envolvidos nos cruzamentos pode estar relacionada à quantidade e qualidade dos grãos de pólen. Porém, deve-se ainda levar em consideração que o método do corante superestima a viabilidade dos grãos de pólen em relação à viabilidade obtida pela capacidade de germinação dos mesmos (EINHARDT *et al.;* 2006). Nesse caso, sugere-se que testes de germinação *in vitro* sejam realizados com finalidade de obter informações mais precisas sobre a viabilidade dos grãos de pólen de *L. alba*.

5 CONCLUSÕES

Nas condições em que este experimento foi realizado, pode-se chegar às seguintes conclusões:

1. A espécie *Lippia alba* é preferencialmente alógama;
2. As sementes apresentam dormência e baixas taxas de germinação nas diversas condições de avaliação;
3. Os melhores tratamentos para aumento dos níveis de germinação são choque de frio, luminosidade alternada (20 horas de luz e 8 horas de escuro) e presença do estimulador de germinação KNO_3, aplicado ao substrato, sobretudo para as condições de laboratório;
4. Nos cruzamentos biparentais, o quimiotipo linalol apresenta melhor comportamento, na relação número e peso de frutos produzidos;
5. Foram obtidos prováveis híbridos entre quimiotipos diferentes, nos seguintes cruzamentos: IAC-8 (linalol) x IAC-17 (citral), IAC-2 (linalol) x IAC-20 (mirceno), IAC-17 (citral) x IAC-13 (limoneno-carvona) e IAC-6 (linalo) x IAC-13 (limoneno-carvona);
6. Os frutos gerados de autofecundações dos clones produziram menor número e menor taxa de germinação de sementes;
7. A distância mínima de 30 metros entre cruzamentos não foi suficiente para evitar a contaminação por pólen externo;
8. Apesar dos estudos de viabilidade polínica serem ainda parciais, os dados obtidos permitem inferir que a espécie *L. alba* apresenta uma diferença relativa de viabilidade de pólen entre quimiotipos, fato que pode estar relacionado ao número de plantas obtidas.

6 REFERÊNCIAS

ABAD, M.J.; SÁNCHEZ, S.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of some medicinal plants. **Methods and Findings,** v.17 (Suppl. A), p. 108, 1995.

ABDEL-MAWGOOD A. L.; AHMED M. M. M.; ALI B. A. Application of molecular markers for hybrid maize (Zea mays L.) identification. **Journal of food agriculture & environment**, v. 4, n.2, p. 176-178, 2006.

ALI, M.; DOWKER, B.D.; CURRAH, L.;MUNFORD, P.M. Floral biology and pólen variability of parental lines of onion hybrids. **Annais of Applied Biology**, v.104. p. 167-174, 1983.

ALLARD, R.W. Sistemas reprodutivos e métodos de melhoramento de plantas. In: Princípios do melhoramento genético de plantas. Edgard Blucher (ed.). Rio de Janeiro, p. 25-40, 1971.

ALMEIDA, O.S.; SILVA, A.H.B. da; SILVA, A.B.; SILVA, A.B. da; AMARAL, C.L.F. Estudo da biologia floral e mecanismos reprodutivos do alfavacão (*Ocimum officinalis* L.) visando o melhoramento genético. **Acta Scientiarum**, Biological Sciences, Maringá, v.26, n.3, p. 343-348, 2004.

AOYAMA, E.M.; ONO, E.O.; FURLAN, M.R. Estudo da germinação de sementes de *Lavanda angustifolia* Miller. **Science Agriculture**, Piracicaba, v.53, n.2-3, p. 267-272, 1996.

BANDONI, A.L. Especies Aromaticas Argentinas como Fuente de Terpenoides de Interes, In: Plantas Iberoamericanas como Fuente de Terpenoides Útiles en **Química Fina**. BARRERO, A.F. (ed.). p. 7-25, 2005.

BARRACA, S.J. Manejo e produção de plantas aromáticas e medicinais, www.esalq.usp.br/siesalq/pm/p02.pdf , (08 maio 2006).

BARROS VIANA, G.S. de; VALE, T.G. do; Silva, C.M.; ABREU-MATOS, F.J. de. Anticonvulsant activity of essencial oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Biol. Pharm. Bull**, v.23, p. 1314-1317, 2000.

BELLAMY, A.; VEDEL, F.; BANNEROT, H. Varietal Identification in Cichorium intybus L. And determination of genic purity of F1 hibrid seed samples, bared on RAPD markers. **Plant Breeding** v.115, n. 2, p. 128-132, 1996.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination (2.ed.), **Plenum Press**, New York, p. 445, 1994.

BIASI, L.A.; COSTA, G. Vegetative propagation of *Lippia alba*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p. 455-459, 2003.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.. (Org.). Marcadores Moleculares. Viçosa: Editora de Universidade Federal de Viçosa, 2005, v. 1, p. 231-272

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. Melhoramento de plantas. In: Herdabilidade. Universiadade Federal de Viçosa, 4ª ed, p. 26-36, 37-44, 85-111, 265-280, 447. 2005.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília: SNDA/DNDV/CLV. 1992.

BUSO, J.A. Estimativas de parâmetros genéticos de caracteres de plantas e bulbo de cebola (*Allium cepa* L.). 1978. Tese Dissertação (de Mestrado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1978.

CÁCERES, A.; ÁLVAREZ A.V.; OVANDO, A.E.; SAMAYOA, B.E. 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.

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

CAUVIN, B. - Eucalyptus hybridation controlée. **Annales de recherches sylvicoles**, Paris (1983): 85-118, 1984. In : MENCK, A. L. M.; ODA, S.; MARCHI, E. L.; KOVALSKI, M. E. **IPEF**, n.43/44, p.20-23, jan./dez.1990.

CORRÊA, C.B.V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. ex Britt & Wilson – erva cidreira. **Rev. Bras. Farm.,** v.73, p. 57-64, 1992.

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

DELOUCHE, J.C.; STILL, W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. The tetrazolium test for seed viability. Mississippi: State College, Mississippi Agricultural Experiment Station, (**Technical Bulletin**, 51), 1976.

DENNIS, D.T. & TURPIN, D.H. Plant physiology, biochemistry and molecular biology. 529 p, 1990.

DI STASI, L.C.; SANTOS, E.M.G.; SANTOS, C.M. dos; HIRUMA, C.A. Plantas medicinais da Amazônia. São Paulo, UNESP, (Suplemento) 193p e 365p, 1989.

DWIVEDI, S.K.; KISHORE, N. Fungitoxicity of some essencial oils against *Macrophomina phaseolina*. **Indian perfume**, v.34, p. 20-21, 1990.

EHLERT, P.A.D. Épocas de plantio, idades e horários de colheita na produção e qualidade do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., quimiotipo limoneno-carvona. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2003.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Comparação entre Métodos para Testar a Viabilidade de Pólen de Pessegueiro, **Rev. Bras. Frutic**., Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

EMBRAPA. Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genéticos Vegetais - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. DF. Out. 2005.

FANTINATTI, J.B.; VECHIATO, M.H.; MAGALHÃES, P.M.; FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B. Incidence of fungi in seeds of *Cordia verbenacea* DC. (hybrid CPQBA). UNICAMP, CPQBA e Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, São Paulo, SP, Brasil, 2005.

FARON, M. L. B.; PERECIN, M. B.; LAGO, A. A.; BOVI, O. A.; MAIA, N. B. Temperatura, Nitrato de Potasio e Fotoperíodo na Germiação de Sementes de Hypericum perforatum L. E. H. Brasiliense Choisy. **Bragantia**, Campinas, v.63, n.2, p. 193-199, 2004.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética (3. ed). Brasília, EMBRAPA –CENARGEN, 1998.

FERREIRA W.R.; RANAL M. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de *Brassica chinensis* l. var. *parachinensis* (Baley) sinskaja (couve-da-malásia). **Pesq. Agropec. Brás**., Brasília, v.34, n.3, p. 353-361, 1999.

FLANKLIN, F.H.C.; LAWRENCE, M.J.; FLANKLIN-TONG, V.E. Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. **International Review of Cytology**, v.158, p.1-62, 1995.

FRIGHETTO, N.; OLIVEIRA J.G. *Lippia alba* Mill N.E.Br. (*Verbenaceae*) as a source of linalool. **J. Essent. Oil Res**., v.10, p. 578-580, 1998.

FRANÇA-NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. O teste de tetrazólio em sementes de soja. Londrina, EMBRAPA – CNPSo, 1998.

FONTANEL, A. & TABATA, M. Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. Present aspects and prospects. In: Horisberger, M. (ed.), **Nestlé Research News**, Vevey, Switzerland, p. 93-102, 1987.

GARDNER, E.J.; SIMMONS, M.J.; SNUSTAD, D.P. Principles of Genetics. John Willey and Sons (eds.). Inc. N. York, 649p, 1991.

GOMES, E.C. Ensaios preliminares marcha sistemática e fitoquímica para *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. *Verbenaceae*. Curitiba, UFPR, 6p, 1990.

GONSALVES, C.H.R.P. Genética na produção de sustâncias do metabolismo secundário das plantas, 1999.

GRIFFIN, A.R. et al. - Processing Eucalyptus pollen for use in controlled pollination. **Silvae genetica**, Frankfurt, v.31 p.198-203, 1982.

GUPTA, S.K.; KHANUJA, S.P.S.; KUMAR, S. In vitro micropropagation of *Lippia alba*. **Current Science**, v.81, n.2, p. 206-210, 2001.

HARBONE, J.B. The plant and its biochemical adaptation to the environment, introduction to ecological biochemistry. **Academic Press**, London , p. 1-27, 1977.

HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; BARRERA, N.A. Indigenous phytotherapy of gostrointestinal disorders in a lowland mix community (Oaxaca, Mexico): ethnopharmacology evaluation. **Journal of Ethnopharmacology,** v.36, p. 63-80, 1992.

JANNUZZI, H. Caracterização de dezesseis acessos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown, no Distrito Federal. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Distrito Federal (DF), 2006.

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). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 36-38, 2001.

KISHORE, N.; MISHRA, A.K. Effect of essencial oils on sclerential germination of *Rhizoctonia solani*. **Nat. Acad. Sci. Lett.**, v.14, p. 239-241, 1991.

LAGO, A.A. do. Observações sobre germinação de *Brachiaria brizantha* Stapf. **Semente**, Brasília, n.0, p. 34-37, 1974.

LAGO, A.A. do; MARTINS, L. Qualidade fisiológica de sementes de *Brachiaria brizantha* 'Marandu'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 9., 1995, Florianópolis, **Informativo ABRATES**, Brasília, v.5*,* n.2, p. 123.

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

LITTLE, T.M.; HILLS, F.J. Statical Methods in Agricultural Research. University of California, Riverside. 2 ed., p. 242, 1975.

LOEFFLER, N.L.; MEIER, J.L.; BURRIS, J.S. Comparison of two cold test procedures for use in maize drying studies. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.13, n.3, p. 653-658, 1985.

MACIEL, M.A.M.; PINTO A.C; VEIGA, V.F.; GRYNBERG N.F.; ECHEVARRIA A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 429-438, 2004.

MARCOS-FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. Avaliação da qualidade das sementes**.** Piracicaba- FEALQ, 230p, 1987.

MARCOS-FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. cap. 7-10. p. 230- 367. 2005.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas medicinais. UFV-Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 220 p, 1995.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W. Essencial oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, v.8, p. 695-698, 1996.

MENDES, M.F.B.S. Caracterização Morfo-Anatômica, Fitoquímica e Molecular de 8 formas de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br ex Britt & Wilson (*Verbenacae*). 2001. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2001.

MENTEZ, L.A. Coleta e identificação de plantas medicinais. In: Anais de Minicurso do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, 1996.

MENEZES, N.L. de. Testes rápido para determinação da qualidade das sementes. http://www.ufsm.br/sementes/trapidos.htm (20 janeiro, 2007).

MING, L.C. Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill*.)* N.E.Br. -*Verbenaceae*. 1992. Tese (Mestrado)- UFPR, Curitiba, 1992.

MIRANDA, J.B.F.; Hallauer A.R. Quantitative Genetics in Maize Breeding, 1982.
MIRANDA J.E.C.; COSTA C.P.; CRUZ, C.D. Correlações genotípica, fenotípica e de ambiente entre caracteres de fruto e planta de pimentão (*Capsicum annunn* L.). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.11, n.2, p. 457-468, 1988.

MONTANARI, I.J. Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/producao.htm (27 janeiro, 2007).

MOLDENKE, H.N. Materials toward a monograph of the genus *Lippia I*. **Phytologia**, v.12, n.1, p. 6-67, 1965.

MÚLGURA DE ROMERO, M.E.; SALIMENA-PIRES, F.R. Nuevos sinónimos de *Lippia lasiocalycina* (*Verbenaceae*). **Hickenia**, v.2, p. 249-250, 1997. In: SALIMENA, F.R.G. New synonyms and typifications in *Lippia* sect Rhodolippia (*Verbenaceae*). **Darwiniana,** v.40, n.1-4, p. 121-125, 2002b.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155 p 330-350 1987.

NASSI, S.M. L.; VIEIRA, I.G. Fatores Externos (ambientais) que Influenciam na Germinação de Sementes. Informativo Sementes, IPEF (Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais), 1998. http://www.ipef.br/publicacoes/scientia (20 janeiro 2007).

ONO, E.O.; LEONEL, S.; RODRIGUES, J.D. Effects of growth regulators and potassium nitrate on 'VOLKAMERIANA' lemon seed germination, Departamento de Botânica, IB/UNESP, **Sci. Agric.**, Piracicaba, v.50, n.3, p. 338-342, 1993.

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

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D.S.; VILLAR, A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (*Verbenaceae*). **Farmaco**., v.56, p. 501-504, 2001b.

POPINIGIS, F. Fisiologia da Semente. Banco Internacional de desenvolvimento Brasília Ministério da Agricultura, AGIPLAN. Empréstimo 327/SF-BR. p. 39-95, 1977.

PRANCE, G.T. Floristic inventory of the tropics: where do we stand. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v.64, p. 559-684, 1977.

PIERRE, P.M.O.; DAVID, L.C.; VICCINI, L.F.; VANZELA, A.L.L. Variabilidade de sítios DNAr 45S em dois quimiotipos de *Lippia alba* Mill, NE BR. (*Verbenaeae*), com diferentes números cromossômicos. In: 52° Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz de Iguaçu. Resumos. CD-Rom.

PIERRE, P.M.O. Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br (Verbenaceae)**.** Tese (Mestrado) - UFLA, Lavras, 2004. In: SOUZA, S.M de. Bandeamento cromossômico em *Lippia alba*. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Lavras-UFLA, Lavras, 2006.

PRETE, C.E.C., CÍCERO, S.M.; FOLEGATTI, P.R. Emergência de plantas de soja no campo e sua relação com a embebição e condutividade elétrica das sementes. **Semina ciência agrícola**, v.15, n.1, p. 32-37, 1993.

RAO, G.P.; SINGH, M.; SINGH, P.; SINGH, SP.; CATALAN, C.; KAPOOR, I.P.S.; SINGH, O.P.; SINGH, G. Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf essential oil of *Lippia alba* (Mill.). **Indian Journal of Chemical Technology**, v.7, p. 332-335, 2000.

RAY, I. M. & TOKACH, M. K. Cytologi and Pollen Formation in Diploid Creasted Wheat grass, *Agropyron cristatum*. **Crop Science** v.32 p.1361-1365, 1995.

RICCIARDI, G.; VEGLIA, J.; RICCIARDI, A.; BANDONI, A. Examen de los aceites esenciales de especies de *Aloysia* (*Verbenaceae*) del Nordeste. **Corrientes**, v.8, p. 100-102, 1999.

ROBERTS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Williams & Wilkins (eds.). Baltimore, 1996.
ROSA, S.T.; FERREIRA, A.G. Germinação de sementes de plantas lenhosas, **Acta bot. Bras.**, v.15, n.2, p. 147-154, 2001.

ROSSATO, M.; SANTOS, A.C.A.; STEFANINI, L.A. AGOSTINI, F.; PANSERA, M. R.; WASUN, R.; BARBIERI, R.L. Avaliação do óleo essencial de *Aloysia sellowii* (BRIQUET) MOLDENKE (*Verbenaceae*) do sul do Brasil. **Quim. Nova**, v.29, n.2, p. 200-202, 2006.

SALIMENA, F.R.G. Revisão taxonômica de *Lippia* L., sect. Rhodolipia Schauer (*Verbenaceae*). Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, S.P., 2000.

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

SALIMENA, F.R.G. New synonyms and typifications in *Lippia* sect Rhodolippia (*Verbenaceae*). **Darwiniana**, v.40, n.1-4, p. 121-125, 2002b.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. Plant Physiology. **Wadsworth Publ. Co**. Belmont CA. (eds). 682p, 1992.

SANTOS-MENDES, M.F.B. dos, Caracterização morfo-anatômica, fitoquímica e molecular de oito formas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Br. & Wilson (*Verbenaceae*). 2001. Tese (Doutorado)- Universidade Paulista, Botucatu, 2001.

SCHAUER, J.C. *Verbenaceae*. In : Candolle, A.P. de (ed.). Prodr. v.11, p. 522-700, 1847. In : SALIMENA, F.R.G. New synonyms and typifications in *Lippia* sect Rhodolippia (*Verbenaceae*). **Darwiniana**, v.40, n.1-4, p. 121-125, 2002b

SCHEFFER, M.C. Roteiro para estudo de aspectos agronômicos das plantas medicinais selecionadas pela fitoterapia do SUS-PR/CEMEPAR. SOB Informa, v.10, p. 29-31, 1992.

SCHWARZBACHI, A.E. & RICKLEFS, R.E. The use of molecular date in mangrove plant research. **Wetlands Ecology and Management**, v. 9, p. 195-201, 2001.

SEBBENN A.M.; KAGEYAMA P.Y.; SIQUEIRA A.C.M.F.; ZANATTO; A.C.S. Sistema de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze.: implicações para a conservação e melhoramento genético. **Scientia Florestalis**, v.58, p. 25-40, 2000.

SHUKLA, A.; FAROOQI, A.H.A.E. Review article: Utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. **Current Research Medicinal & Aromatic Plants,** v.12, p. 152-157. 1990.

SILVA, F. Da, CASALI, V.W.D. Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais. Viçosa, 2000. 135p.

SISTEMA ALICE (SECEX). Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior ALICE-WEB. http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br (abril, 2007).

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

SIQUEIRA, W.J.; ILLG, R.D.; FORNASIER, J.B.; GRANJA, N.P.; LISBÃO, R.S.; SANTOS, R.R. dos. Genetic Parameter estimates and efficiency of three selection procedures in carrot breeding, variety Campinas. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.4, p. 417-424, 1994.

SIQUEIRA, W.J.; ILLG, R.D.; FORNASIER, J.B.; GRANJA, N.P.; LISBÃO, R.S.; SANTOS, R.R. Correlações fenotípica, genética aditiva e ambiental em cenoura. **Bragantia**, Campinas, v.52, n.1, p. 17-26, 1993.

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. SIMÕES, C.M.O et al. (eds.). Editoras da UFRGS / UFSC , Porto Alegre, 500p, 2000.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. SIMÕES, C.M.O et al. (eds.). Editoras da UFRGS / UFSC, Porto Alegre, p. 387-415, 2000.

SLOWING-BARRILAS, K.V. Estudio de la actividad antiinflamatoria de diversas especies de la flora de Guatemala Facultad de farmacia. Memorial (doctoral)- Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 1992.

SOUZA, S.M de. Bandeamento cromossômico em *Lippia alba*. Dissertação (de Mestrado)-Universidade de Lavras (UFLA), Lavras, 2006.

STEFANINI, M.B.; RODRIGUES, S.D.; MING, L.C. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. **Horti. Bras.**, v.20, p. 18-23, 2001.

TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; LEITÃO, S.G.; LAGE, C.L.S.; VICCINI, L. Diferenças morfológicas, anatômicas e fisiológicas de dois quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. relacionadas à ploidia. In: VI Congresso de ecologia do Brasil, p. 99, Fortaleza, 2003.

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

TRONCOSO, N.S. Los géneros de Verbenáceas de Sudamérica extratropical (Argentina, Chile, Bolivia, Paraguay, Uruguay y sur de Brasil). **Darwiniana**, v.18, p. 295-412, 1974.

TUCKER, A.O.; MACIARELLO, M.J. Volatile leaf oil of the "Licorice Verbena" [*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown ex Britton and P. Wils. var. carterae Moldenke] from the north american herb trade. **Journal of Essential Oil Research**, v.11, p. 314-316, 1999.

VESQUE, M. J. Caracteres des principales familes Gramopetales tires de la anatomie de la feuile**.** ***Ann. Sci. Natur***., v.1, p. 183-187, 1885.

VENTRELLA, M.C. Produção de folhas, óleo essencial e anatomia foliar quantitativa de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (*Vernenaceae*) em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. 2000. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

VICCINI, L. F.; COSTA, D.C.S. da; MACHADO, M.A.; CAMPOS, A. L. Genetic diversity among nine species of Lippia (Verbenaceae) based on RAPD markers. **Plant Systematics And Evolution.** v. 246, p. 1-8, 2004.

VICCINI, L.F.; PIERRE, P.M.O. ; PRAÇA, M.M. ; SOUZA DA COSTA, D.C.; ROMANEL-COSTA, E.; SOUZA, S.M.; PEREIRA-PEIXOTO, P.H.; SALIMENA, F.R. Chromossome number in the genus *Lippia* (*Verbenaceae*). **Plant Systematics and evolution**. v.256, p. 171-178, 2006.

VIEIRA, A.H.; MARTINS, E.P.; PEQUENO, P.L.L.;LOCATELLI, M.; SOUZA, M.G., Técnicas de produção de sementes florestais. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Edital Nº 205, ago./01, p. 1-4.

WANG, G.; CASTIGLIONE, S.; ZHANG, J.; FU, R.; MA, J.; LI, W.; SUN. Y.; SALA, F. Hibrid rice (*Oriza sativa* L.): Identification and parentage determination by RAPD finger print. **Journal Plant Cell Report**. V.14 n. 2-3, p. 112-115, 1994.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research, 18**. 1990.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. IN: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. (eds.). Secondary products from plant tissue culture. Oxford, Clarendon, 1990.

WOLTERS, A.M. A.; SCHOENMAKERS, H. C. H.; KAMSTRA, S. Mitotic and Meiotic irregularities in somatic hybrids of *Lycopersicum esculentum* and *Solanum tuberosum*. **Genome** v.37 p. 726-735 1994.

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

YERK, G. L. & PELOQUIN, S. J. Comparison of 2n and non-2n pollen-producing haploid X Wild species hybrids in potato. **J: Hered**, v.80 p486-471, 1989.

http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2006.

ANEXO

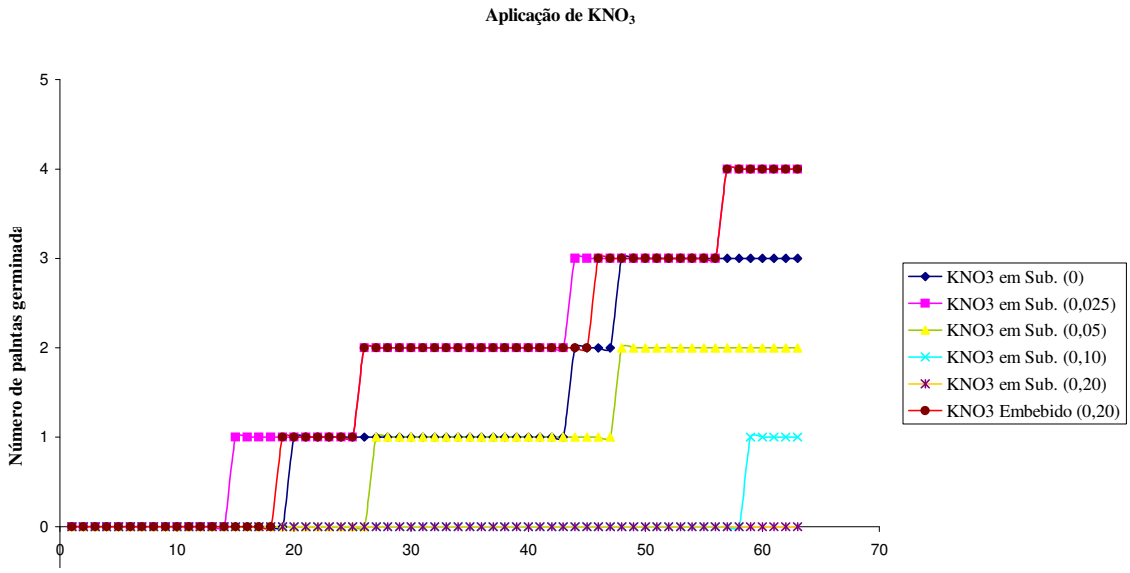


Figura 1 – Número de plantas germinadas, em aplicação de KNO_3 sem choque térmico

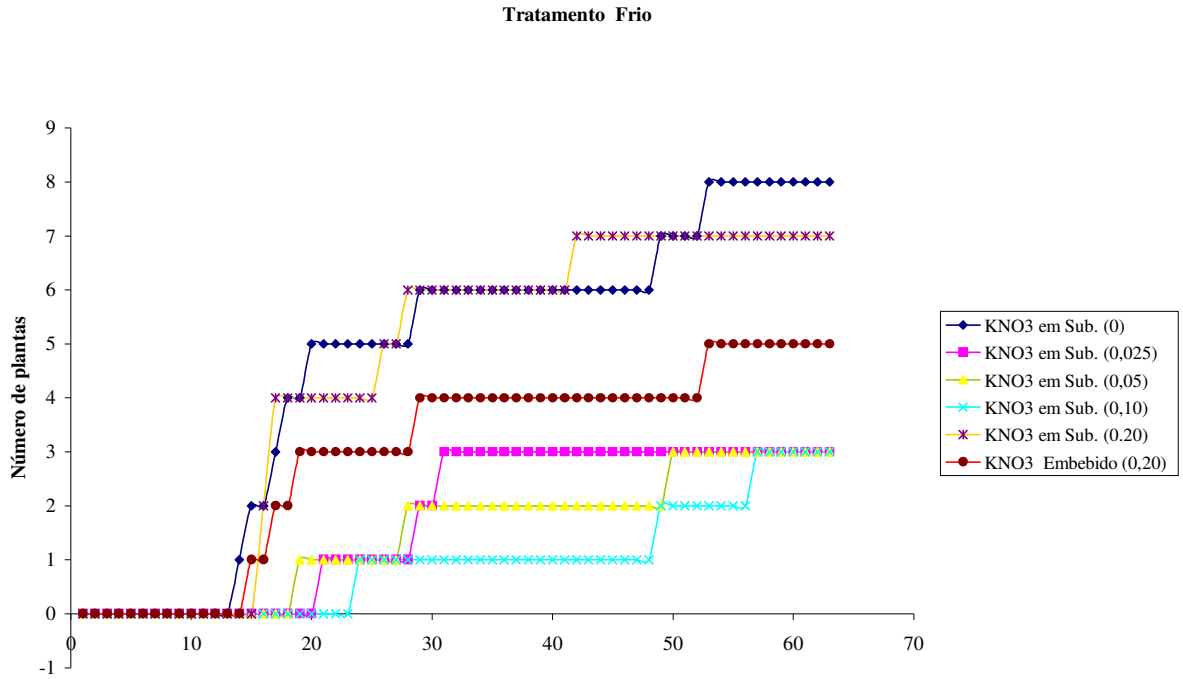


Figura 2 - Número de plantas germinadas em aplicação de KNO_3 com choque térmico de Frio.

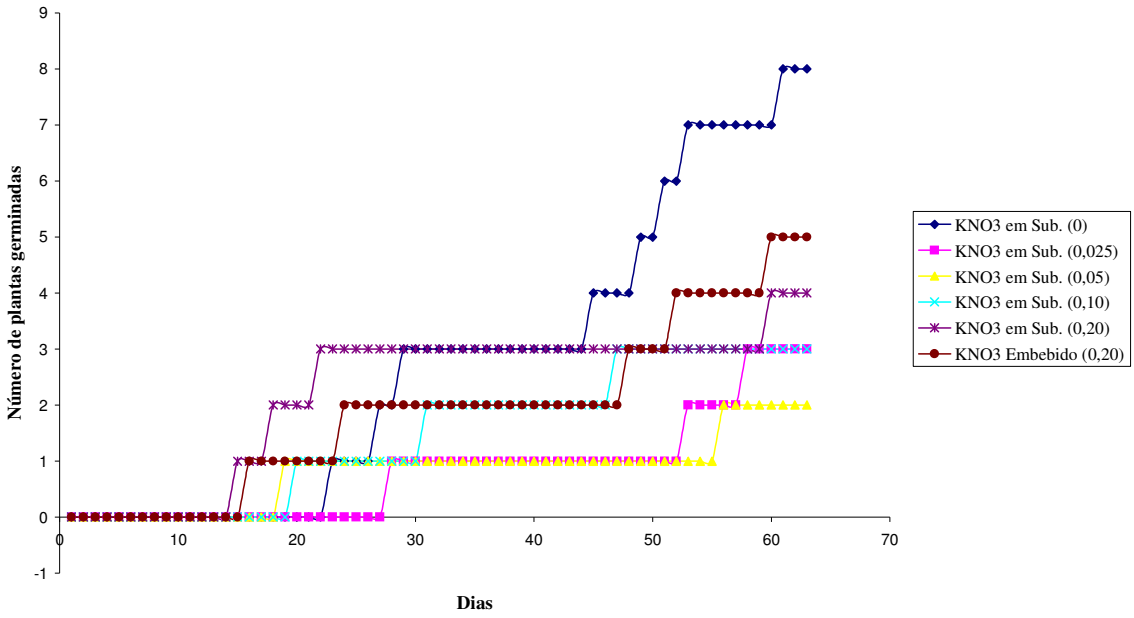


Figura 3 - Número de plantas germinadas, em aplicação de KNO_3, com choque térmico de Calor

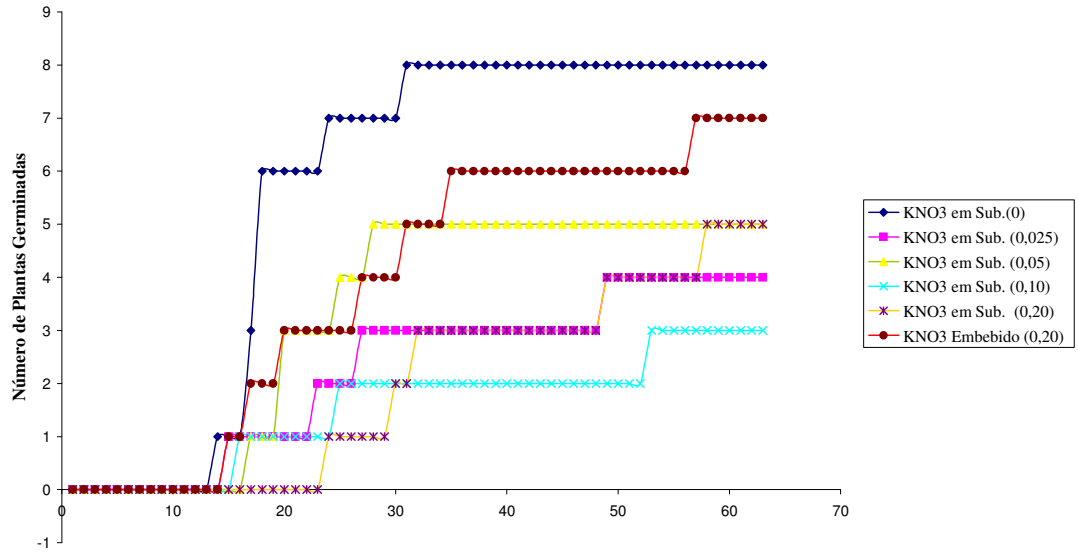


Figura 4 - Número de plantas germinadas, em aplicação de KNO_3, com choque térmico de Frio + Calor.