

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

NATÁLIA GRANCIERI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, MORFOFISIOLÓGICA E
FITOQUÍMICA DE *Varronia curassavica* DO SUL DO ESPÍRITO
SANTO**

ALEGRE
ESPÍRITO SANTO – BRASIL
2015

NATÁLIA GRANCIERI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, MORFOFISIOLÓGICA E
FITOQUÍMICA DE *Varronia curassavica* DO SUL DO ESPÍRITO
SANTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Orientador: Paulo Cezar Cavatte

ALEGRE
ESPÍRITO SANTO – BRASIL

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Grancieri, Natália, 1991-

G749c Caracterização molecular, morfofisiológica e fitoquímica de *Varronia curassavica* do sul do Espírito Santo / Natália Grancieri. – 2015.

54 f. : il.

Orientador: Paulo Cezar Cavatte.

Coorientadores: Marcia Flores da Silva Ferreira ; Tatiana Tavares Carrijo.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Ecofisiologia. 2. Genética. 3. Erva-baleeira. I. Cavatte, Paulo Cezar. II. Ferreira, Marcia Flores da Silva. III. Carrijo, Tatiana Tavares. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. V. Título.

CDU: 575:631.52

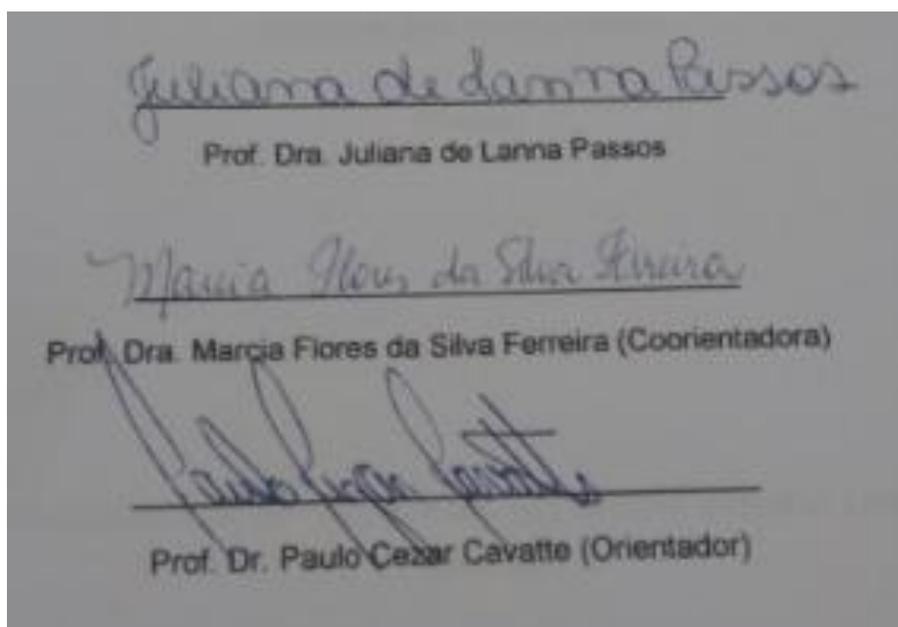
NATÁLIA GRANCIERI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, MORFOFISIOLÓGICA E
FITOQUÍMICA DE *Varronia curassavica* DO SUL DO ESPÍRITO
SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA



***A Deus, pelo dom da vida e por tudo que me proporcionou até aqui, estando
sempre presente em todos os momentos***

Dedico

***Aos meus pais, Paulo César Grancieri e Márcia Garcia Grancieri,
pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões e por me
educarem com amor e carinho***

Ofereço

“O homem para ser completo tem que estudar, trabalhar e lutar.”

Sócrates

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Espírito Santo, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de cursar o mestrado e desenvolver este trabalho.

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

Ao Professor Paulo Cezar Cavatte, pelas orientações, paciência e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas Coorientadoras: Marcia Flores da Silva Ferreira e Tatiana Carrijo Tavares pelas contribuições.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pelos ensinamentos durante este curso.

As professoras Juliana de Lanna Passos e Marcia Flores da Silva Ferreira, por aceitarem participar da minha banca examinadora.

Aos professores, alunos e técnicos do LABOT 1, LABOT 2, Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas, Laboratório de Bioquímica e Laboratório de Fisiologia e Nutrição Mineral de Plantas que contribuíram para a realização do meu trabalho.

Aos colegas do grupo de Ecofisiologia Vegetal, em especial as alunas Amanda Batista, Cecília Valente e Thammyres Alves pela efetiva participação no desenvolvimento desse projeto.

Aos amigos do curso de mestrado pelos momentos de bom convívio, força e respeito.

À Arícia Leone e ao Clemilton Alves pela amizade e pelos momentos de alegria, parceria e boa convivência.

Aos meus ex-professores da faculdade, com quem iniciei minhas primeiras pesquisas científicas, em especial o professor e hoje amigo Hélio Gustavo Santos, pela confiança que sempre a mim concedeu.

A todos os amigos conquistados durante o curso de Graduação em Fisioterapia, em especial aqueles que fizeram parte do meu grupo de estágio (Luíza, Mateus, Rafaela e Taís) pela amizade, brincadeiras, ajudas e apoio.

Ao amigo Mateus Candeia Gianizeli que ainda que distante não deixou de estar presente nessa etapa em minha vida e pelo incentivo e amizade de sempre.

Ao meu irmão, Paulo Henrique Grancieri, pelo carinho e por estar sempre ao meu lado torcendo por mim.

Ao meu namorado, Fernando Careta, pelo companheirismo, amor, paciência e por se orgulhar das minhas conquistas.

A minha sobrinha querida, Júlia, que com seu jeito de criança demonstra por mim todo seu amor e carinho, que junto com sua irmã Rafaela, minha afilhada, me proporciona sempre momentos de alegrias.

Aos demais amigos, familiares, e todos que direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Muito Obrigada.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A</i>	Taxa de assimilação líquida do carbono
<i>g_s</i>	Condutância estomática
<i>C_i</i>	Concentração intercelular de CO ₂
TTE	Taxa de transporte de elétrons
<i>E</i>	Transpiração
<i>A/E</i>	Eficiência instantânea do uso de água
<i>A/g_s</i>	Eficiência intrínseca do uso de água
<i>A/C_i</i>	Eficiência instantânea de carboxilação
ALT	Altura da planta
ERP	Comprimento dos entrenós dos ramos principais
ERL	Comprimento dos entrenós dos ramos laterais
NRL	Número de ramos laterais
MRL	Comprimento médio dos ramos laterais
AFT	Área foliar total
AFU	Área foliar unitária
IAF	Índice de área foliar
DAF	Densidade de área foliar
AFE	Área foliar específica
MST	Massa seca total
FRL	Fração de massa seca de ramos laterais
FRP	Fração de massa seca de ramos principais
FMI	Fração de massa seca de inflorescências
FMR	Fração de massa seca de raízes
FMF	Fração de massa seca de folhas
RAF	Razão de área foliar
CLA	Clorofila a

CLB	Clorofila b
CLT	Clorofila total
CAR	Carotenoides
CAB	Relação de clorofila a/b
CTC	Relação clorofila total e carotenoides
FLA	Flavonoides
FEN	Compostos fenólicos

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1.0. INTRODUÇÃO	1
1.1. Plantas medicinais	1
1.2. Variabilidade genética	2
1.3. Metabólitos secundários	4
1.4. <i>Varronia curassavica</i>	5
2.0. MATERIAIS E MÉTODOS	8
2.1. Material vegetal, instalação e condução do experimento	8
2.2. Marcadores moleculares	12
2.3. Características fisiológicas	13
2.4. Características morfofisiológicas	14
2.5. Características fitoquímicas	16
2.6. Análises estatísticas	17
3.0. RESULTADOS	19
3.1. Marcadores moleculares	19
3.2. Características fisiológicas	20
3.3. Características morfofisiológicas	22
3.4. Características fitoquímicas	25
3.5. Principais variáveis	28
4.0. DISCUSSÃO	30
5.0. CONCLUSÕES	35
6.0. REFERÊNCIAS	36

RESUMO

GRANCIERI, Natália, M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo, fevereiro de 2015. **Caracterização molecular, morfofisiológica e fitoquímica de *Varronia curassavica* do sul do Espírito Santo.** Orientador: Paulo Cezar Cavatte. Coorientadores: Marcia Flores da Silva Ferreira e Tatiana Tavares Carrijo.

A utilização de plantas com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No Brasil, o consumo de plantas para fins medicinais e de medicamentos à base de plantas vem aumentando em todas as classes sociais e tem recebido vários incentivos. Para otimizar o uso das plantas medicinais tornam-se importantes estudos sobre a variabilidade genética, como tem feito os programas de genética e melhoramento buscando selecionar genótipos superiores. Para isso é preciso realizar a sua caracterização utilizando descritores, como os agronômicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares. Um dos interesses é pela produção uniforme de metabólitos secundários e entender os fatores que podem influenciá-la. Dentre as várias espécies de plantas medicinais conhecidas no Brasil, encontra-se a *Varronia curassavica*, que apesar de seu potencial farmacológico e econômico, ainda pouco se sabe sobre sua diversidade genética de populações naturais. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar genótipos de diferentes populações nativas do Sul do Estado do Espírito Santo, com variações de altitude, e assim compará-los com materiais pré-melhorados adquiridos na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foram coletados de cada planta, ramos para ser realizada a propagação vegetativa. As mudas foram cultivadas em casa de vegetação e então realizadas análises moleculares, fisiológicas, morfofisiológicas e fitoquímicas. Verificou-se que no experimento houve baixa precisão experimental. De acordo com a estimativa do índice de variação (IV), há variáveis que podem ser usadas na seleção de genótipo. A herdabilidade da maioria das variáveis foram de média a alta. Nos agrupamentos as variáveis de

maior contribuição relativa foram: AFT, AFE, IAF, FLA, CLT, CAB, A , g_s , A/g_s . Foi realizado um novo agrupamento com base nas nove variáveis de maior contribuição relativa e assim foram formados três grupos, sendo a AFT, AFE e FLA as que tiveram maior contribuição para a divergência genética. Quando comparado esse agrupamento ao agrupamento realizado pelos marcadores moleculares, não houve grupos idênticos ou parecidos. Nos agrupamentos, os genótipos não se agruparam com base em locais de coletas próximos ou com altitudes semelhantes.

Palavras-chave: Ecofisiologia; Genética; Erva baleeira

ABSTRACT

GRANCIERI, Natália, M.Sc., Federal University of Espírito Santo, february, 2015. **Characterization molecular, morphophysiological and phytochemical of accessions of *Varronia curassavica* collected in the southern state of Espírito Santo.** Adviser: Paulo Cezar Cavatte. Co-adviser: Marcia Flores da Silva Ferreira and Tatiana Tavares Carrijo.

The use of plants for medicinal purposes is one of the oldest forms of medical practice of mankind. In Brazil, the consumption of plants for medicinal purposes and in herbal medicines is increasing in all social classes and has received various incentives. To optimize the use of medicinal plants become important studies on genetic variability, as it has done the genetic and breeding programs trying to select superior genotypes. This requires performing their characterization using descriptors such as agronomic, morphological, biochemical and molecular. One of the concerns is the uniform production of secondary metabolites and understand the factors that can influence it. Among the various species of medicinal plants known in Brazil, is the curassavica *Varronia*, which despite its pharmacological and economic potential, yet little is known about their genetic diversity of natural populations. Thus, this study aimed to characterize genotypes of different native peoples of southern Espírito Santo, with variations of altitude, and thus compare them with pre-improved materials purchased from the State University of Campinas (Unicamp). Were collected from each plant, branches to be held vegetative propagation. The seedlings were grown in a greenhouse and then conducted molecular analyzes, physiological, morphological and physiological and phytochemical. It was found that in this experiment was low experimental precision. According to an estimated variation index (VI), there are variables that can be used to genotype selection. The heritability of most variables were medium to high. In clusters the variables of greater relative contribution were: AFT, SLA, LAI, FLA, CLT, CAB, A, gs, A / gs. A new grouping based on nine

variables of relative contribution and so were formed three groups, the AFT being, AFE and the FLA that had the greatest contribution to the genetic divergence was conducted. When compared this group to the grouping performed by molecular markers, there was no identical or similar groups. In clusters, the genotypes are not grouped based on local collections of close or similar altitudes.

Keywords: Ecophysiology; genetics; herb whaling

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas medicinais

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e/ou prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. As plantas medicinais e aromáticas constituem a principal fonte de matéria prima de muitas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica (Goneli *et al.*, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 85% da população dos países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais (Souza *et al.*, 2013). Isso porque várias comunidades não possuem recursos suficientes para o tratamento de diversas doenças e assim, muitas vezes, dependem dos recursos naturais para cumprir ou complementar os recursos terapêuticos (Matias *et al.*, 2013). No início da década de 90, de 65 a 80% dessa população utilizavam as plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (Goneli *et al.*, 2014).

Para algumas pessoas, o uso das plantas medicinais é uma integrativa histórica à utilização de medicamentos sintéticos, já que esses são relativamente caros e podem desencadear efeitos colaterais ao organismo, enquanto as plantas medicinais são mais facilmente acessíveis e de menor custo. Segundo a OMS, o uso de fitoterápicos se desenvolve cada vez mais, sendo uma forma complementar aos medicamentos sintéticos (Santos *et al.*, 2011). Os fitoterápicos são medicamentos produzidos a partir da extração de princípios ativos de plantas (Ribeiro e Guimarães, 2013). Na medicina popular, o uso de plantas medicinais é comum e apesar de muitas pesquisas buscarem isolar os componentes ativos dessas plantas, o fitoterápico normalmente apresenta efeito devido à ação sinérgica entre os compostos da planta (De Pinho *et al.*, 2012).

No Brasil, o consumo de plantas para fins medicinais e de medicamentos à base de plantas vem aumentando em todas as classes sociais (Pelicer, 2013).

Portanto, o uso é bastante disseminado entre a população brasileira, sendo vários os fatores que colaboram no desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais, dentre elas o baixo custo e as propriedades terapêuticas provenientes dos princípios ativos (Goneli *et al.*, 2014).

O Ministério da Saúde vem incentivando o uso de plantas medicinais e de fitoterápicos pelos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) (Santos *et al.*, 2011). Além disso, outro grande incentivo para o uso das plantas medicinais foi a divulgação da lista de espécies medicinais pela Resolução RCD nº 10 de 2010, em que as drogas vegetais passam a ter seu uso regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contribuindo para o aumento da demanda e a necessidade de produção dessas plantas (Ming *et al.*, 2012).

O Brasil, por possuir uma biodiversidade muito grande (25% da biodiversidade mundial), possui um grande potencial de produção de fitoterápicos (Ribeiro e Guimarães, 2013; Santos *et al.*, 2011). Entretanto, à medida que aumenta a demanda por plantas medicinais, aumenta o risco de extinção e diminuição da variabilidade genética das espécies em suas populações nativas (De Araujo, 2007). Como consequência do extrativismo predatório, algumas espécies nativas já estão sofrendo erosão genética acelerada (Lapa, 2006).

1.2. Variabilidade genética

O conhecimento sobre a variabilidade genética de uma espécie é de grande importância, pois através dele é possível conhecer os recursos genéticos das mesmas e as possíveis variações existentes, facilitando assim, o processo de domesticação da espécie (De Queiroz, 2011). Além disso, a continuidade das espécies depende da existência da variabilidade genética, que por sua vez também contribui com os programas de melhoramento genético para que sejam obtidas novas combinações de interesse para sociedade (Matos *et al.*, 2012), para que possam incentivar o uso racional dos recursos genéticos e obter informações sobre meios para a conservação da espécie (Laviola *et al.*, 2011).

Os programas de melhoramento genético vegetal buscam a seleção de genótipos superiores. Para isso, precisam de um requisito básico que é a caracterização entre diferentes acessos de uma espécie (Oliveira *et al.*, 2013). Assim, analisam a diversidade genética e as estimativas de seus valores

genotípicos, facilitando a obtenção dos genótipos de interesse (De Resende *et al.*, 2014). A diversidade genética tem sido estimada com base em diferentes técnicas multivariadas, utilizando diversos descritores, como os agronômicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares, em que a escolha de um dos tipos depende da informação que deseja-se adquirir e dos recursos disponíveis para realizar a caracterização (Da Silva Filho *et al.*, 2013). Nesta caracterização os pesquisadores tem o interesse de agrupar genótipos similares, de maneira que haja maior divergência entre os grupos formados (Conceição *et al.*, 2014).

O uso dos marcadores moleculares tem sido muito empregado em plantas, fornecendo informações mais completas para o agrupamento de genótipos e o planejamento de cruzamentos de forma rápida e eficiente, pois geram uma grande quantidade de caracteres adicionais que podem ser combinados com características fenotípicas. Eles possibilitam a identificação e discriminação de genótipos e a quantificação da variabilidade genética existente ao nível de sequência de DNA (Rabbani *et al.*, 2012). Um dos tipos de marcadores moleculares são os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), hoje muito usado para estudos ecológicos, sendo eles marcadores codominantes, de boa reprodutibilidade e alta resolução (Figueira *et al.*, 2010).

Os marcadores moleculares são considerados como descritores sofisticados e são utilizados com o objetivo de avaliar relações genéticas entre cultivares, espécies e híbridos intra e interespecíficos, além de serem usados na construção de mapas genéticos. Seu uso pode ser associado aos descritores morfológicos, que são considerados como descritores mais acessíveis e utilizam diferentes caracteres que permitem a caracterização de germoplasma, e assim orientando o trabalho a ser realizado com marcadores moleculares (De Andrade *et al.*, 2011).

Caracteres morfológicos qualitativos e quantitativos podem ser utilizados para o estudo sobre a variabilidade genética (Laviola *et al.*, 2011), pois a diversidade encontrada entre os caracteres morfológicos analisados permitem indicar que há divergência genética entre os materiais estudados (Teixeira *et al.*, 2014). Assim, fornecem uma identidade para os mesmos através do conhecimento de dados sobre cada amostra, considerando então, a caracterização morfológica como de grande importância e como uma análise simples e de baixo custo, que por sua acessibilidade tem sido utilizada por diversos pesquisadores para a caracterização de germoplasmas (De Andrade *et al.*, 2011).

Estudos fisiológicos, tem tido como foco entender as influências do ambiente sobre a aquisição de carbono pela planta (Otto *et al.*, 2013), sendo esse processo não só importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas fundamental para o início da síntese de metabólitos secundários, incluindo os óleos essenciais, flavonoides e outros compostos fenólicos, em que o carbono fixado fotossinteticamente pode ser direcionado para a síntese desses metabólitos (Mendes *et al.*, 2012; Pacheco *et al.*, 2011). Sabe-se também, que diferentes genótipos podem apresentar variabilidade na aquisição de carbono afetando assim o crescimento e as respostas fitoquímicas (Otto *et al.*, 2013).

1.3. Metabólitos secundários

Para que as plantas medicinais sejam usadas como matéria prima para produção de medicamentos, é necessária a obtenção de plantas com qualidade e na quantidade necessária para a fabricação. As plantas precisam estar identificadas corretamente, não estarem contaminadas e terem produção uniforme de metabólitos secundários (Lapa, 2006). A produção de metabólitos secundários é considerada como um fator limitante por ser geralmente baixa e os teores dos compostos com atividade de interesse serem ainda menores (De Araujo, 2007). Isso se deve ao fato da biossíntese de metabólitos secundários ser um processo complexo, determinada pelo controle genético e pela interação entre processos fisiológicos, bioquímicos, ecológicos e evolutivos. Assim, podem apresentar variações temporais e espaciais em diferentes níveis (sazonais, diárias, intraespecífico e interespecífico) (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Probst, 2012).

Dentre os fatores que podem interferir de forma significativa na qualidade e quantidade de metabólitos secundários, destaca-se a altitude que está relacionada com outras variáveis como variação da radiação UV e temperatura. Contudo, existem relativamente poucos estudos que descrevem de forma detalhada a influência da variação de altitude na produção de metabólitos secundários em plantas (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Probst, 2012). Dessa forma, pesquisas buscam entender como fatores ambientais, fisiológicos e genéticos podem interferir no crescimento das plantas causando alterações morfofisiológicas e, assim, influenciarem na produção de metabólitos secundários (Montanari Júnior, 2011).

Em geral, os metabólitos secundários são considerados compostos biologicamente ativos, ou seja, exercem ações específicas sobre um determinado ser vivo (Rozwalka *et al.*, 2008), como nas plantas, em que desempenham funções ecológicas, como proteção contra vírus, bactérias, fungos, doenças e estresses ambientais. Dentre as várias espécies de plantas medicinais conhecidas no Brasil, encontra-se a *Varronia curassavica* que também produz metabólitos associados às suas relações ecológicas (Paulilo *et al.*, 2010).

1.4. *Varronia curassavica*

A *V. curassavica* Jacq., pertencente à família Boraginaceae (Santi *et al.*, 2014); e também nomeada por *Cordia verbenacea* DC., *Cordia salicina* DC., *Cordia curassavica* Jacq., *Cordia cylindristachia* auctt. bras., *Lithocardium fresenii* Kuntze, *Lithocardium salicinum* Kuntze e *Lithocardium verbaceum* Kuntze; é uma planta arbustiva, perene, com folhas vigorosas, sem brilho e superfície crespas, suas flores são pequenas, de corolas brancas e reunidas em inflorescências escorpióides e vistosas, sua parte aérea apresenta forte odor. A mesma é considerada como uma planta comum da Floresta Tropical Atlântica, sendo encontrada ao longo de todo litoral brasileiro, possuindo vários nomes populares como maria-preta, maria-milagrosa e catinga-de-barão, sendo o mais comum erva-baleeira, ou simplesmente baleeira (Pereira, 2013). Sua altura varia entre 1,5 e 2,5 metros (Santi *et al.*, 2014) e seus frutos são vermelhos quando maduros (Pereira *et al.*, 2014). Sua principal forma de propagação é através de sementes. Ela cresce espontaneamente em áreas abertas de pastagens, beira de estradas e terrenos baldios, sendo considerada como planta daninha. É uma planta medicinal nativa do Brasil (Goneli *et al.*, 2014) e muito utilizada na medicina tradicional (Mendes *et al.*, 2014).

O extrato bruto da parte aérea da planta de *V. curassavica* (folhas e galhos) é amplamente utilizado na medicina popular na forma de extratos hidroalcoólicos, de decocção, e infusões, principalmente como antibiótico, anti-inflamatória e analgésicos (Matias *et al.*, 2013). Devido a propriedade cicatrizante, também é usada no tratamento de artrite, reumatismo, tendinite, dores musculares e contusões. A espécie contém substâncias anti-inflamatórias, relatadas como efetivas, além de reduzidos efeitos colaterais. Assim, ela é uma forma alternativa de tratamento tópico para inflamações (Goneli *et al.*, 2014).

Estudos fitoquímicos de *V. curassavica* revelaram a presença de flavonoides, fenóis e óleos essenciais, responsável pela sua atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antialérgica. Alguns dos componentes do seu óleo essencial são α -pineno, trans-cariofileno, allo-aromadendreno e α -humuleno (Feijó *et al.*, 2014), sendo este último um dos principais por estar amplamente presente nas folhas e pela sua atividade anti-inflamatória e analgésica (Ventrella e Marinho, 2008). Já os flavonoides, compreendem vários compostos secundários e também apresentam grande importância para a medicina, pois vários deles, como a artemetina, apigenina, taxifolina, morina, naringerina, genisteína e epicatequina, possuem atividades farmacológicas (Ameira *et al.*, 2009), principalmente ação antifúngica.

Recentemente, no Brasil, uma empresa farmacêutica investiu cerca de 5 milhões de dólares no desenvolvimento de uma droga anti-inflamatória tópica que tem como matéria prima o extrato de *V. curassavica*, sendo o primeiro fitoterápico desenvolvido totalmente no Brasil (Calixto, 2005) pelo laboratório Aché, que contou com a participação de diversas instituições públicas: Universidade Estadual de Campinas, Universidade de São Paulo, Universidade Federal do Rio de Janeiro e Universidade Federal de Santa Catarina (Natércia, 2005). Este fitoterápico tem a aprovação da ANVISA desde 2004 e é feito a partir do óleo essencial, cujo princípio ativo é o α -humuleno (Feijó *et al.*, 2014). Assim, devido as propriedades terapêuticas da *V. curassavica*, o mercado farmacêutico tem despertado interesse na obtenção de matéria prima para a fabricação do respectivo fitoterápico (Marques, 2013).

O mercado de fitoterápicos no Brasil tem sido atendido, na maioria das vezes, por matéria prima sem padronização e de qualidade duvidosa, em função de grande parte das espécies de plantas medicinais encontrar-se em estágio inicial de domesticação e as condições de cultivo não terem sido suficientemente estudadas (De Araujo, 2007). Dessa forma, a produção de fitoterápicos a partir de plantas medicinais e aromáticas requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (Goneli *et al.*, 2014).

A *V. curassavica*, apesar de seu potencial farmacológico e econômico, ainda pouco se sabe sobre sua diversidade genética de populações naturais, sendo este conhecimento primordial para a conservação e exploração sustentável da espécie. Conseqüentemente, são necessários estudos que caracterizem plantas dessa espécie, contribuindo para a seleção de genótipos de interesse tanto quanto aos

aspectos agronômicos, quanto a sua composição química. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar genótipos de diferentes populações nativas do Sul do Estado do Espírito Santo, com variações de altitude, e assim compará-los com materiais pré-melhorados adquiridos na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

2.0. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal, instalação e condução do experimento

As coletas foram realizadas em 19 indivíduos de diferentes populações nativas de *V. curassavica* localizadas em regiões com diferentes altitudes em municípios do Sul do Estado do Espírito Santo (Tabela 1), durante o mês de abril de 2014. Foi realizada a identificação botânica do material colhido e exsiccatas referentes a cada indivíduo foram confeccionadas e depositadas no Herbário da Universidade Federal do Espírito Santo (VIES). Foram coletados de cada planta, ramos para ser realizada a propagação vegetativa através de miniestacas. Desses ramos, foram coletadas miniestacas de 10 cm de comprimento, receberam um corte em bisel nas extremidades e mantido 50% da área foliar. Antes de serem submetidas ao plantio, sua base foi imersa em solução de 250 mg/l de ácido indolbutírico (AIB), adicionado 100 mg/l de ácido bórico e 20 mg/l de sacarose com o pH da solução ajustado em 5,5, por 24 horas.

Em seguida as miniestacas foram colocadas em bandejas de plástico com 72 células contendo substrato comercial, com uma miniestaca por célula (Figura 1 A e B). De cada genótipo foram colocadas 30 miniestacas. As miniestacas recebiam irrigação por aspersão a cada 10 minutos durante todo o dia. Após o enraizamento das miniestacas, as bandejas foram colocadas em outra casa de vegetação, onde permaneceram por uma semana para aclimação (Figura 2 A) das mudas a serem plantadas em vasos (Figura 2 B). Assim, vasos de 8 litros contendo uma mistura de solo, areia e esterco bovino (3:1:1) foram preparados (Figura 3 A) e no dia 21 de julho de 2014 as mudas foram transferidas para os mesmos (Figura 3 B). Já os genótipos 20, 21 e 22, correspondem à mudas de genótipos pré-melhorados adquiridos na UNICAMP e foram plantadas diretamente nos vasos de 8 litros contendo a mistura de solo, areia e esterco bovino (3:1:1) (Figura 4). As plantas receberam irrigação, procurando manter a umidade do solo próxima à capacidade

de campo. No dia 31 de outubro de 2014, após 3 meses de plantio (Figura 5 A e B), foi realizada adubação com 5 g por vaso com NPK 20-5-20.

Tabela 1. Coordenadas geográficas dos genótipos amostrados em populações nativas de *V. curassavica*.

COORDENADAS GEOGRÁFICAS				
Genótipo	Local	Latitude	Longitude	Altitude (m)
1	Jerônimo Monteiro (Sertão)	20°48'S	41°22'O	118
2	Jerônimo Monteiro (Lusitânia)	20°46'S	41°23'O	104
3	Jerônimo Monteiro (Pedregal)	20°47'S	41°24'O	130
4	Jerônimo Monteiro (Andorinha)	20°46'S	41°22'O	141
5	Castelo	20°29'S	41°10'O	489
6	Iúna	20°25'S	41°34'O	740
7	Iconha (Próximo à divisa com Rio Novo do Sul)	20°49'S	40°51'O	28
8	Jerônimo Monteiro (Oriente)	20°43'S	41°22'O	306
9	Marataízes (Lagoa do Siri)	21°5'S	40°50'O	5
10	Muqui (Aliança)	20°55'S	41°21'O	318
11	Jerônimo Monteiro (Santa Joana)	20°44'S	41°22'O	109
12	Alegre	20°45'S	41°27'O	115
13	Marataízes (Lagoa do Siri)	21°5'S	40°50'O	4
14	Itapemirim (Boa esperança)	21°0'S	40°49'O	8
15	São José dos Calçados	20°53'S	41°37'O	638
16	Itapemirim (Itaipava)	20°53'S	40°45'O	11
17	Muqui (Argelin)	20°53'S	41°21'O	158
18	Itapemirim (Córrego do Ouro)	20°58'S	41°1'O	28
19	Iconha (Próximo ao trevo de acesso a Piúma)	20°46'S	40°45'O	20

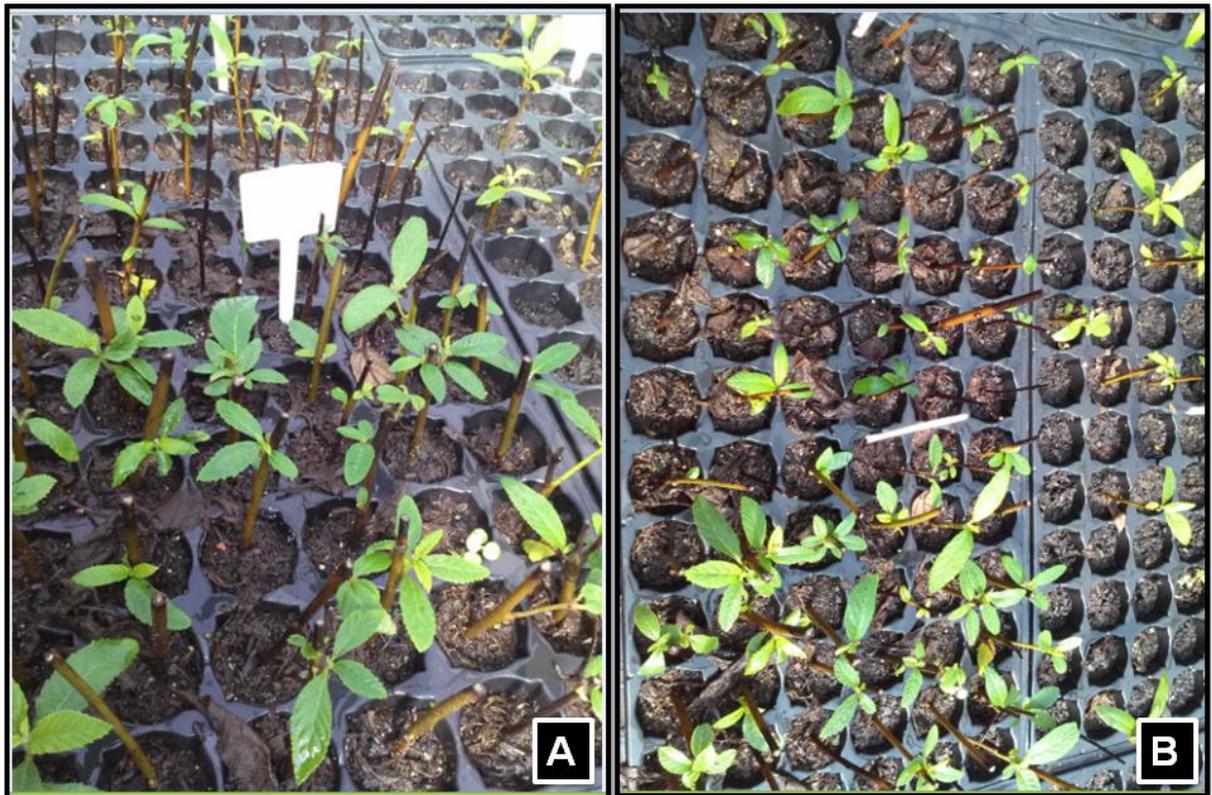


Figura 1. Miniestacas de *V. curassavica* após serem plantadas em bandejas de plástico (A e B).

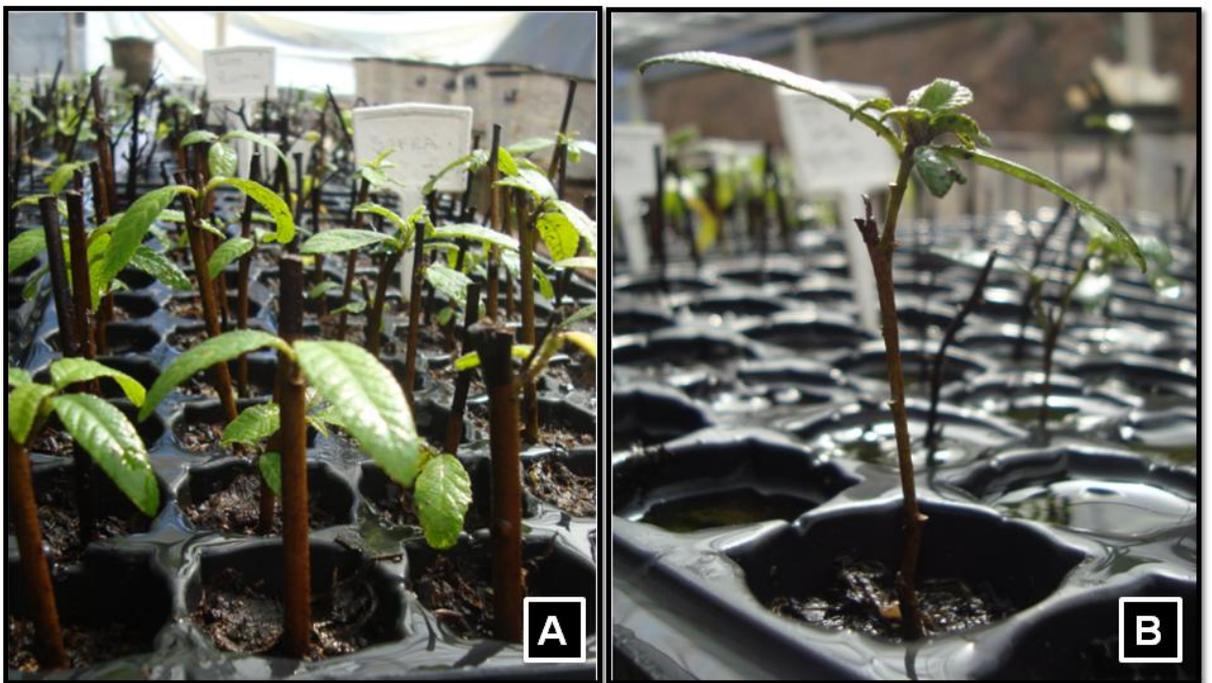


Figura 2. Bandejas com as miniestacas de *V. curassavica* em casa de vegetação para aclimação (A) e muda *V. curassavica* a ser transferida para o vaso (B).



Figura 3. Vasos contendo a mistura de solo, areia e esterco bovino (A) e muda *V. curassavica* logo que foi transferida para o vaso (B).



Figura 4. Muda da Unicamp que foi plantada diretamente em vaso contendo a mistura de solo, areia e esterco bovino.



Figura 5. Plantas de *V. curassavica* após 3 meses de plantio (A e B).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em Alegre (20°45'S, 41°32'O, 268 m de altitude), Espírito Santo. O delineamento era o inteiramente casualizado.

As análises realizadas no experimento estão descritas abaixo:

2.2. Marcadores moleculares

Foram avaliadas amostras de folhas jovens coletadas dos 19 genótipos cultivados na casa de vegetação.

O DNA foi extraído de folhas jovens pelo método CTAB seguindo o protocolo de Doyle e Doyle (1990). Modificações no protocolo foram feitas quanto à necessidade para obtenção de DNA em quantidade e qualidade satisfatórios. A quantificação e verificação da integridade do DNA genômico foram analisadas pelo uso do nanodrop.

Depois de padronizadas as concentrações do DNA, foi feita a avaliação do polimorfismo dos indivíduos. Regiões com microssatélites foram amplificadas através da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando primers desenvolvidos para *V. curassavica* por Figueira *et al.* (2010) (Tabela 2). Nas reações de PCR foram

utilizados 10ng/ μ L de DNA, 1X de tampão, 0,5U de Taq DNA polimerase, 2,4 μ L de primer, 0,2mM de dNTP e 1,5mM de MgCl₂ completando com água para o volume final de 20 μ L. O protocolo de amplificação consistiu de uma temperatura de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 36 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento do primer com temperatura de anelamento de 55°C por 60s (Tabela 1), extensão de 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 8 minutos. Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados e visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corado com brometo de etídeo e fotografados em ultravioleta (UV).

Tabela 2. Informações sobre sete locos de microssatélites de *V. curassavica*: loco, repetição, sequências dos primers (5'-3'), amplitude alélica em pares de base (pb) e temperatura de anelamento (T_A °C).

SSR	MOTIVO	Sequência do primer (5'-3')	Amplitude alélica (pb)
MCvCIRCPQ3	(AC) 10 (AAAATT) 3	F:ATTAGGCGTTTGGTGCTAC R:GCAGCGTATTTTAGCAGAGA	150–186
MCvCIRCPQ6	(CA) 8	F:TACTAGCACCGTTGAATAGG R:TAGGGACCGTAAAAGACAT	196–206
MCvCIRCPQ7	(TG) 9	F:GGCAACAATAAGGTTAGAGC R:TCACACTCTCATGTTTACGC	170–180
MCvCIRCPQ8	(AC) 9	F:CCAAGTGTCCGTAATACACTT R:TCTTCCTGACGTTTTCTCAT	124–150
MCvCIRCPQ14	(TG) 13	F:CTTGTAGCTGCCACTTCCT R:GAATAATGCACAACGAGTCA	90–106
MCvCIRCPQ15	(TG) 8	F:TTTAGGAACATCTCCTTAGTGG R:TGGCTCCCCATTATATTTT	197–205
MCvCIRCPQ16	(CA) 8	F:CTCCTTCAGTGTTTCAAAGG R:GGAAGAAGCTGATCTCTGTG	142–190

Figueira *et al*, 2010.

2.3. Características fisiológicas

Medidas de trocas gasosas foram realizadas após quatro meses de plantio por meio de um sistema de medição de troca de gás aberto equipado com um modelo IRGA LI-6400XT (LI-COR, Lincoln, Nebraska, EUA), sob luz (1000 μ mol m⁻² s⁻¹) e concentração de CO₂ (400 μ mol m⁻² s⁻¹) artificial. As medições ocorreram entre 9:00 - 11:00 horas e foram realizados com folhas completamente desenvolvidas e saudáveis do terço médio das plantas. Foram analisadas de cada genótipo três plantas. Foram medidas a taxa de assimilação líquida do carbono (A); condutância

estomática (g_s); concentração intercelular de CO_2 (C_i); e transpiração (E), assim foram calculados os seguintes parâmetros: eficiência instantânea do uso de água ($WUE = A/E$); eficiência intrínseca do uso de água ($iWUE = A/g_s$); e eficiência instantânea de carboxilação ($\phi_c = A/C_i$). O rendimento quântico efetivo do fluxo linear de elétrons [$Y_{II} = (F_m' - F_s / F_m')$] foi utilizado para determinar a taxa de transporte de elétrons ($TTE = Y_{II} \times RFA \times 0,5 \times 0,84$), onde Y_{II} representa o rendimento quântico efetivo do fluxo linear de elétrons, RFA corresponde a radiação fotossinteticamente ativa, 0,5 é um fator de distribuição da energia entre os dois fotossistemas, e 0,84 é a porcentagem de luz que é absorvida pela folha.

2.4. Características morfofisiológicas

No dia 27 de novembro de 2014, após quatro meses de plantio nos vasos, foram avaliadas as características (Figura 6 A e B): altura da planta (ALT); comprimento dos entrenós dos ramos principais (ERP); comprimento dos entrenós dos ramos laterais (ERL); número de ramos laterais (NRL); comprimento médio dos ramos laterais (MRL).

Depois de feitas essas medições, nos dias 28 e 29 de novembro de 2014 as plantas (Figura 7) foram retiradas dos vasos e as folhas, ramos principais e laterais (caule), raiz e inflorescências foram separadas. Assim foram calculadas a área foliar total (AFT) e área foliar unitária (AFU), através do integrador de área foliar; índice de área foliar (área foliar total/área de projeção da copa) (IAF); densidade de área foliar (área foliar total/volume da copa (considerando como formato de cone)) (DAF). Logo após a medição da área foliar, as folhas, ramos, raízes e inflorescências foram colocadas em estufa, à $60^\circ C$, para serem secas até atingirem peso constante (Figura 8). Posteriormente, a massa seca de raízes, ramos e folhas foram obtidos em balança de precisão. Baseando-se nos procedimentos acima, foram obtidas as seguintes características: área foliar específica (área foliar de 10 folhas/massa seca de 10 folhas) (AFE); massa seca total (MST); fração de massa seca de ramos laterais (massa seca dos ramos laterais/massa seca total) (FRL); fração de massa seca de ramos principais (massa seca dos ramos principais/massa seca total) (FRP); fração de massa seca de inflorescência (massa seca das inflorescências/massa seca total) (FMI); fração de massa seca de raiz (massa seca das raízes/massa seca

total) (FMR); fração de massa seca de folhas (massa seca das folhas/massa seca total) (FMF); razão de área foliar (área foliar total/massa seca total) (RAF).



Figura 6. Plantas de *V. curassavica* a serem avaliadas (A e B).



Figura 7. *V. curassavica* antes de ser retirada do vaso para separar folhas, ramos principais e laterais (caule), raízes e inflorescências.



Figura 8. Folhas (A), ramos (B), raízes (C) e inflorescências (D) de *V. curassavica* após serem secos em estufa.

2.5. Características fitoquímicas

Foram coletadas 5 folhas de cada genótipo, sendo folhas completamente expandidas e sadias desenvolvidas a partir de 3 meses de plantio nos vasos. As mesmas foram colocadas em envelopes de papel alumínio e levadas ao freezer - 80°C por 24 horas. Logo após foram levadas ao liofilizador para realizar a secagem a frio por 48 horas e assim serem maceradas.

Foram analisados os seguintes pigmentos cloroplastídicos: clorofila a (CLA); clorofila b (CLB); clorofila total (CLT); carotenoides (CAR); e obtida a relação de clorofila a/b (CAB) e relação clorofila total e carotenoides (CTC). Para isso, foram pesados 20 mg das folhas maceradas e acrescentado 2 mL de acetona 80% em tubos Eppendorf para realizar a extração. Assim, foi realizada a extração no aparelho MagNA Lyser (Roche) por 30 segundos a 6000 rpm. Após a extração, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 4000 rpm. Posteriormente, as amostras foram diluídas, sendo 250 µL de amostra e 750 µL de acetona 80%. Em seguida, as amostras (Figura 9) foram analisadas em espectrofotômetro em três valores de absorvância: 480nm, 645nm e 663nm.



Figura 9. Amostras para análises dos pigmentos cloroplastídicos.

Os metabólitos secundários analisados foram: flavonoides (FLA) e compostos fenólicos (FEN); e para essas análises químicas foram utilizados os procedimentos descritos por Poorter e Villar (1997), com algumas modificações. Foram então pesados 50 mg das folhas maceradas e colocadas em tubos Eppendorf, onde foi acrescentado 500 μ L de clorofórmio e 500 μ L de metanol. Foi realizada a extração no aparelho MagNA Lyser (Roche) por 30 segundos a 6000 rpm. Logo após, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi coletado e, após a adição de 500 μ L de água, sob agitação, a mistura foi centrifugada (5000 rpm, 10 minutos) separando-se a fase clorofórmio da fase metanol/água. A concentração de FEN foi determinada colorimetricamente (725 nm) no extrato da fase metanol/água, utilizando-se do reagente de Folin-Ciocalteu (1:1) e ácido tânico como padrão. A concentração de FLA foi determinada na fase metanol/água, com base no padrão de quercetina e cloreto de alumínio.

2.6. Análises estatísticas

Para os dados obtidos através das análises com os marcadores moleculares, foi realizado agrupamento com base no método aglomerativo da média entre pares não ponderados (UPGMA - Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages). Para esses agrupamentos foi utilizado o índice ponderado. As análises foram realizadas com o auxílio do software estatístico R.

Os dados obtidos das análises fisiológicas, morfofisiológicas e fitoquímicas foram submetidos à análise de variância para estudo da variação entre os acessos. Em seguida, as médias foram ordenadas segundo o teste de agrupamento Scott-Knott (SCOTT & KNOTT, 1974) a 1% ou a 5% de probabilidade do erro. Para as

demais análises, foi realizada transformação escalar dos dados (por Logaritmo). Assim, após a transformação dos dados as análises multivariadas foram implementadas por meio de técnicas de agrupamento hierárquico, com base no método UPGMA utilizando a Distância Euclidiana como medida de dissimilaridade. O ponto de corte no dendograma formado pelo método de UPGMA foi definido conforme o proposto por Mojena (1977), seguindo a fórmula em que o $P_c = m + kdp$, sendo m = a média dos valores de distância dos níveis de fusão correspondentes aos estágios; $k = 1,25$; dp = desvio-padrão. Além disso, avaliou-se a importância relativa dos caracteres para divergência genética pelo método de Singh (1981). Os dados foram analisados utilizando-se os recursos computacionais do programa Genes (Cruz, 2006).

3.0. RESULTADOS

3.1. Marcadores moleculares

Pelo método UPGMA, os genótipos se agruparam em quatro grupos diferentes (Figura 10). Os genótipos da Unicamp permaneceram em um mesmo grupo, indicando que eram clones de uma mesma planta, por isso nas análises fisiológicas, morfofisiológicas e fitoquímicas eles passaram a ser considerados como repetições formando o genótipo 20 (Tabela 3).

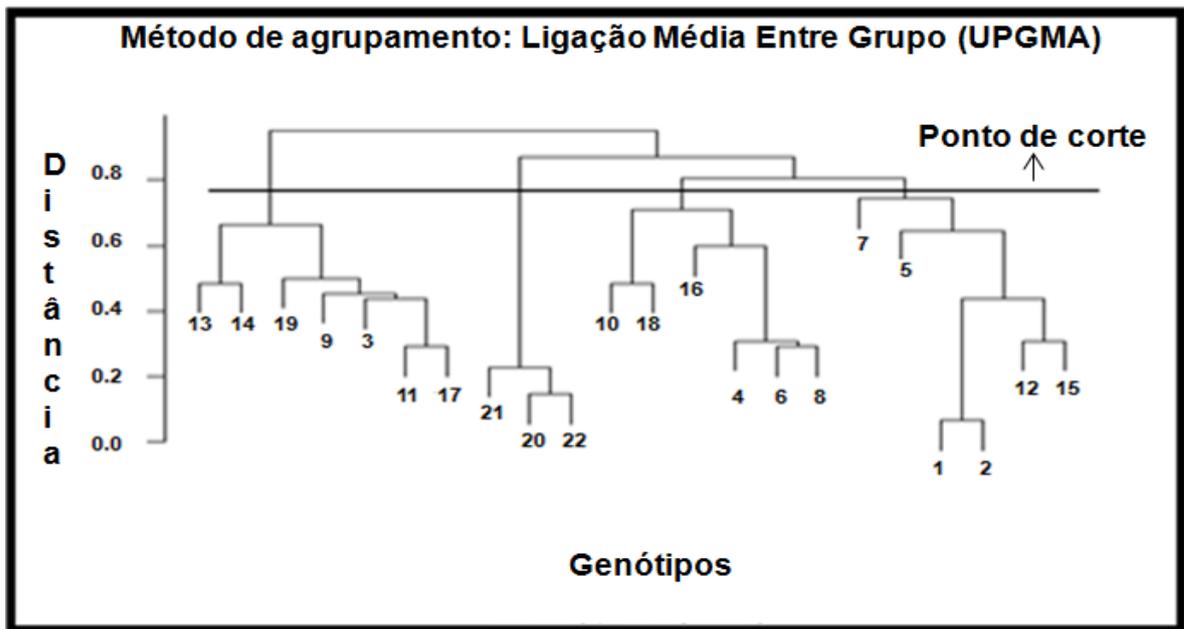


Figura 10. Dendrograma de 22 genótipos de *V. curassavica* gerado pelo método UPGMA, com base em marcadores moleculares (SSR).

Para as análises fisiológicas, morfofisiológicas e fitoquímicas os genótipos 10, 13 e 14 foram desconsiderados por não terem repetições.

3.2. Características fisiológicas

Os caracteres fisiológicos de acordo com o teste de Scott Knott formaram para cada um deles, 2 grupos de média, exceto C_i , A/E e A/g_s que formaram um único grupo. De acordo com o teste F, a única variável que apresentou significância a 1% de probabilidade foi A. A maioria das variáveis obtiveram de médios a altos valores do coeficiente de variação experimental. Todas as variáveis tiveram baixo índice de variação. A herdabilidade para as características C_i , A/E e A/g_s foram baixas (Tabela 4).

Tabela 4. Médias de sete características avaliadas em 17 acessos de *V. curassavica* estabelecidas pelo teste de Scott Knott e resumo da análise de variância relacionadas às características fisiológicas de *V. curassavica* com as respectivas estimativas de parâmetros de média, teste F, coeficiente de variação experimental (Cve%), coeficiente de variação genético (CVg%), índice de variação (IV) e coeficiente de determinação genotípica (h^2).

CARACTERES FISIOLÓGICOS							
GENÓTIPOS	A	g_s	C_i	TTE	A/E	A/g_s	A/C_i
1	19,79a	327,20a	242,10a	141,20a	4,70a	82,31a	0,84a
2	12,78b	103,57b	179,41a	129,90b	5,30a	123,96a	0,71a
3	13,33b	136,35b	205,71a	113,21b	5,26a	108,04a	0,64a
4	16,87a	195,42b	220,79a	142,07a	4,17a	95,46a	0,74a
5	9,26b	121,76b	207,57a	117,18b	4,24a	107,14a	0,41b
6	20,12a	411,82a	254,13a	153,20a	3,71a	73,80a	0,77a
7	8,51b	106,34b	229,64a	100,01b	3,54a	93,08a	0,36b
8	29,05a	515,66a	276,76a	176,93a	4,10a	56,36a	1,06a
9	12,23b	113,44b	205,30a	122,00b	4,91a	107,75a	0,61a
11	23,64a	332,54a	234,35a	172,82a	4,12a	83,92a	1,01a
12	14,45b	149,19b	208,32a	125,07b	4,69a	104,85a	0,69a
15	21,22a	382,47a	251,44a	143,04a	3,85a	74,67a	0,82a
16	7,13b	64,75b	201,40a	93,32b	3,90a	110,85a	0,36b
17	7,94b	67,46b	210,63a	116,22b	3,97a	105,08a	0,43b
18	15,98a	158,14b	216,06a	149,66a	4,43a	98,36a	0,77a
19	7,97b	64,84b	182,82a	108,20b	4,38a	122,90a	0,45b
20	6,40b	57,53b	208,42a	103,17b	3,76a	106,90a	0,33b
Médias	14,51	194,62	219,70	129,83	4,29	97,38	0,65
Teste F	2,5*	2,8**	1,2	3,9**	0,7	1,4	1,9
Cve%	49,2	75,3	18,4	18,6	25,29	27,6	43,4
CVg%	35,0	59,0	4,7	15,5	0	9,6	24,2
IV	0,7	0,78	0,25	0,8	0	0,3	0,5
h^2	60,3	64,8	16,5	67,5	0	26,5	48,2

A: Taxa de assimilação líquida de carbono ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), g_s : Condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), C_i : Concentração intercelular de CO_2 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), TTE: Taxa de transporte de elétrons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), A/E : eficiência instantânea do uso de água, A/g_s : eficiência intrínseca do uso de água ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), A/C_i : eficiência instantânea de carboxilação.

Médias com mesma letra na coluna fazem parte de um mesmo grupo segundo o teste de Scott Knott.

**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Com relação aos caracteres fisiológicos no dendograma gerado observou-se a formação de três grupos (Figura 11). O genótipo da Unicamp (20) ficou no grupo III junto com os genótipos 17, 7, 16, 19 e 5 (Tabela 5).

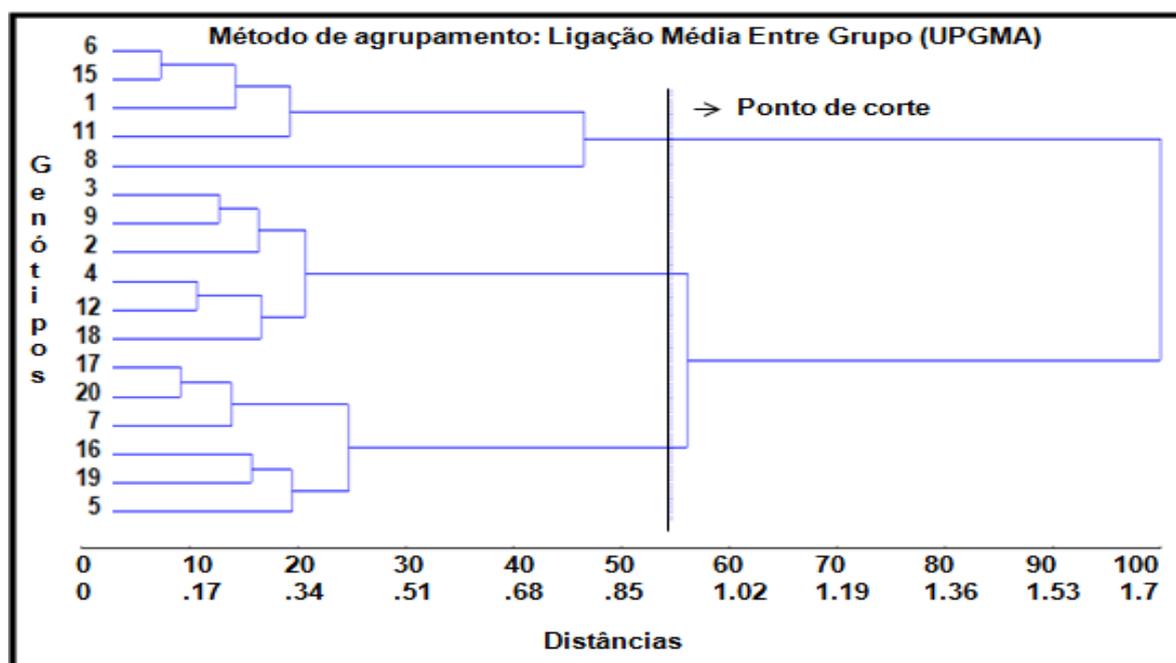


Figura 11. Dendograma de 17 genótipos de *V. curassavica* gerado pelo método UPGMA, tendo como medida de dissimilaridade a distância euclidiana, com base em caracteres fisiológicos.

Tabela 5. Agrupamento dos genótipos de *V. curassavica* a partir de caracteres fisiológicos, pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando a distância euclidiana como medida de distância genética e a média dos grupos para as variáveis de maior contribuição relativa.

CARACTERES FISIOLÓGICOS				
Grupos	Genótipos	A	g_s	A/g_s
I	6, 15, 1, 11, 8	22,76	393,94	74,21
II	3, 9, 2, 4, 12, 18	14,27	142,68	106,40
III	17, 20, 7, 16, 19, 5	7,86	80,44	107,65

Dentre os caracteres fisiológicos, as variáveis que apresentaram maior contribuição relativa para a divergência genética, segundo o método de Singh (1981) foram: A, g_s e A/g_s (Tabela 6).

Tabela 6. Contribuição relativa de caracteres fisiológicos, na divergência entre acessos *V. curassavica*.

CARACTERES FISIOLÓGICOS		
Variável	S.j.	Valor (%)
A	61,092215	26,2145
g_s	137,006458	58,7891
C_i	3,293847	1,4134
TTE	9,732997	4,1764
A/E	2,524935	1,0834
A/ g_s	14,016721	6,0145
A/ C_i	5,380151	2,3086

S.j. = Estimativa da contribuição relativa de cada característica.

3.3. Características morfofisiológicas

O teste de Scott Knott formou um único grupo apenas para a variável DAF, enquanto que para MST e FMI formou quatro grupos. De acordo com o teste F, todas as variáveis apresentaram significância (a 1% ou a 5%). As variáveis obtiveram valores do coeficiente de variação experimental considerados como de médios a altos, exceto AFE (8,2%) e FMF (8,9%). As herdabilidades foram todas de média a alta (Tabela 7).

Tabela 7. Médias das dezessete características avaliadas em 17 acessos de *V. curassavica* estabelecidas pelo teste de Scott Knott e resumo da análise de variância relacionadas às características morfofisiológicas de *V. curassavica* com as respectivas estimativas de parâmetros de média, teste F, coeficiente de variação experimental (Cve%), coeficiente de variação genético (CVg%), índice de variação (IV) e coeficiente de determinação genotípica (h^2).

CARACTERES MORFOFISIOLÓGICOS									
GENÓTIPOS	ALT	ERP	ERL	CRL	NRL	AFT	AFU	AFE	IAF
1	51,8b	4,1b	7,1b	13,5b	15,6c	1013,9b	17,4b	190,0b	1,0b
2	65,8a	6,5a	54,0a	20,1a	17,3c	932,7b	21,8a	134,0c	0,6b
3	47,1b	4,0b	5,4b	13,5b	28,0a	2071,0a	14,7b	220,1 ^a	2,0a
4	61,5a	5,6a	4,9b	14,2b	13,6c	1427,4a	18,5b	181,9b	3,5a
5	57,9a	5,5a	6,4b	12,7b	17,6c	1286,5b	18,9b	175,8b	4,1a
6	65,0a	5,9a	10,3b	18,0a	16,0c	1446,7a	24,9a	204,7a	1,3b
7	47,7b	3,7b	7,7b	17,2a	12,6c	1676,8a	22,5a	185,3b	2,5a
8	61,2a	5,5a	9,3b	18,5a	15,6c	1522,0a	25,3a	190,1b	1,4b
9	52,8b	6,4a	6,9b	12,6b	21,6b	1629,9a	22,6a	158,2c	2,6a
11	56,8a	5,6a	6,3b	18,3a	13,6c	1242,3b	14,2b	167,9c	1,1b
12	49,1b	5,5a	7,1 b	17,6a	13,6c	975,5b	14,5b	196,2b	1,1b
15	56,5a	5,0b	9,4b	14,4b	13,0c	1000,5b	26,0a	185,5b	2,4a
16	61,2a	7,4a	9,1b	19,5a	17,3c	1415,5a	21,5a	190,9b	1,5b
17	47,4b	4,0b	6,9b	19,5a	16,6c	1738,3a	19,2b	180,2b	2,2a
18	51,7b	6,3a	6,7 b	15,3b	13,6c	1321,3b	17,4b	162,6c	2,0a
19	53,6b	4,1b	6,4b	18,5a	16,3c	1595,6a	21,7a	210,9a	1,9b
20	62,6a	4,8b	5,3b	12,7b	19,0c	2006,0a	21,9a	154,8c	2,3a
Médias	55,9	5,3	9,9	16,8	16,4	1429,5	20,2	181,7	1,0
Teste F	2,3*	3,4**	3,4**	4,9**	4,9**	4,0**	2,0*	6,3**	2,8**
Cve%	12,6	18,5	108,1	12,9	17,8	20,5	22,5	8,2	46,7
CVg%	8,5	16,6	96,3	14,8	20,3	20,5	13,1	10,9	36,5
IV	0,6	0,9	0,9	1,1	1,2	1,0	0,6	1,3	0,8
h^2	57,7	70,8	70,4	79,9	79,6	75,2	50,3	83,9	64,7

Continua...

Tabela 7. Continuação...

CARACTERES MORFOFISIOLÓGICOS								
GENÓTIPOS	DAF	MST	FRL	FRP	FMI	FMR	FMF	RAF
1	0,06a	26,61d	0,20a	0,23b	0,05b	0,24a	0,28b	38,8b
2	0,02a	44,16 a	0,19a	0,26b	0,02d	0,19b	0,33a	34,5b
3	0,34a	37,77b	0,16b	0,25b	0,01d	0,24a	0,34a	64,3a
4	0,17a	31,66c	0,18a	0,34a	0,07b	0,15b	0,25c	44,7b
5	0,23 a	40,25a	0,19a	0,25b	0,05b	0,21a	0,28b	33,2b
6	0,05a	24,45 d	0,19 a	0,26b	0,02c	0,22a	0,28b	45,2b
7	0,16a	29,87c	0,15b	0,26b	0,04c	0,23a	0,32a	57,2a
8	0,07a	29,78c	0,20a	0,21b	0,007d	0,26a	0,32a	51,0a
9	0,14a	39,54b	0,14b	0,31a	0,0d	0,23a	0,32a	36,3b
11	0,06a	32,42c	0,18a	0,27b	0,03c	0,21b	0,30a	39,5b
12	0,06a	30,69 c	0,21a	0,26b	0,10a	0,17b	0,22c	36,9b
15	0,12a	21,71d	0,14b	0,31a	0,03c	0,22a	0,29b	45,6b
16	0,08a	36,47b	0,18a	0,29a	0,01d	0,24a	0,29b	39,4b
17	0,14a	38,63b	0,19a	0,24b	0,04c	0,20b	0,33a	45,6b
18	0,12a	35,34b	0,20a	0,26b	0,07b	0,19b	0,27b	35,4b
19	0,12a	31,86c	0,18a	0,23b	0,02d	0,26a	0,31a	53,6a
20	0,12a	46,94a	0,13b	0,33a	0,007d	0,21b	0,31a	43,8b
Médias	0,1	34,0	0,2	0,27	3,5	0,21	0,29	43,8
Teste F	2,3*	8,5**	2,2*	3,5**	9,3**	4,5**	4,0**	3,8**
Cve%	70,2	16,3	14,4	11,9	46,3	11,4	8,9	17,5
CVg%	46,2	18,7	9,4	11,0	76,8	12,4	9,04	16,9
IV	0,6	1,5	0,6	0,9	1,6	1,1	1,0	0,9
h ²	56,5	88,1	55,9	71,9	89,1	77,9	75,3	73,8

ALT: Altura (cm), ERP: comprimento dos entrenós dos ramos principais (cm), ERL: comprimento dos entrenós dos ramos laterais, CRL: comprimento médio dos ramos laterais, NRL: número de ramos laterais, AFT: área foliar total (cm²), AFU: área foliar unitária (cm²), AFE: área foliar específica (cm² g⁻¹), IAF: índice de área foliar (cm² cm²), DAF: densidade de área foliar (cm² cm³). MST: massa seca total (g), FRL: fração de massa seca de ramos laterais (g), FRP: fração de massa seca de ramos principais (g), FMI: fração de massa seca de inflorescência (g), FMR: fração de massa seca de raiz (g), FMF: fração de massa seca de folhas (g), RAF: razão de área foliar (cm² g⁻¹).

Médias com mesma letra na coluna fazem parte de um mesmo grupo segundo o teste de Scott Knott.

**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

No agrupamento pelo UPGMA, houve a formação de dois grupos (Figura 12), sendo o grupo II apenas com o genótipo 2 (Tabela 8).

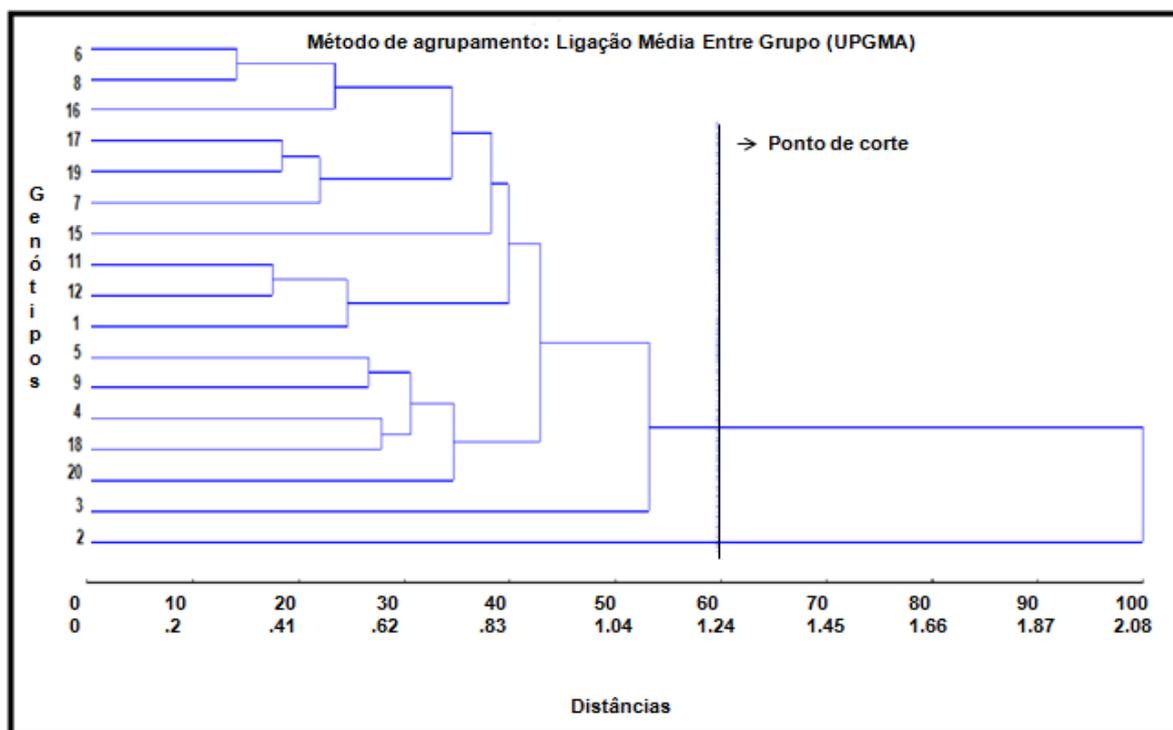


Figura 12. Dendrograma de 17 genótipos de *V. curassavica* gerado pelo método UPGMA, tendo como medida de dissimilaridade a distância euclidiana, com base em caracteres morfofisiológicos.

Tabela 8. Agrupamento dos genótipos de *V. curassavica* a partir de caracteres morfofisiológicos, pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando a distância euclidiana como medida de distância genética e a média dos grupos para as variáveis de maior contribuição relativa.

CARACTERES MORFOFISIOLÓGICOS				
Grupos	Genótipos	AFT	AFE	IAF
I	6, 8, 16, 17, 19, 7, 15, 11, 12, 1, 5, 9, 4, 18, 20, 3	1460,6	184,7	2,1
II	2	932,7	134,0	0,6

De acordo com a importância relativa dos caracteres para divergência genética entre os acessos, segundo o método de Singh (1981), observou-se que as características que mais contribuíram foram AFT (31,2165%), AFE (15,3399%) e IAF (14,4661%) (Tabela 9).

Tabela 9. Contribuição relativa de caracteres fisiológicos, na divergência entre acessos *V. curassavica*.

CARACTERES MORFOFISIOLÓGICOS		
Variável	S.j.	Valor (%)
ALT	3,253037	2,0391
ERP	7,846949	4,9188
ERL	8,173597	5,1235
CRL	7,340233	4,6011
NRL	9,651405	6,0498
AFT	49,80012	31,2165
AFU	4,174688	2,6168
AFE	24,471995	15,3399
IAF	23,077897	14,4661
DAF	1,058332	0,6634
MST	10,695264	6,7042
FRL	0,100773	0,0632
FRP	0,20504	0,1285
FMI	0,203775	0,1277
FMR	0,174814	0,1096
FMF	0,158444	0,0993
RAF	9,144957	5,7324

S.j. = Estimativa da contribuição relativa de cada característica.

3.4. Características fitoquímicas

De acordo com o teste de Scott Knott, as variáveis se agruparam de dois a três grupos. Observou-se diferença significativa entre todos os acessos em nível de 5% de probabilidade. O coeficiente de variação experimental indicou que a maioria das variáveis apresentaram valores médios, sendo que FLA (26,6%) e CLT (25,4%) apresentaram altos valores. Todas as variáveis apresentam alta herdabilidade (Tabela 10).

Tabela 10. Médias de oito características avaliadas em 17 acessos de *V. curassavica* estabelecidas pelo teste de Scott Knott e resumo da análise de variância relacionadas às características morfofisiológicas de *V. curassavica* com as respectivas estimativas de parâmetros de média, teste F, coeficiente de variação experimental (Cve%), coeficiente de variação genético (CVg%), índice de variação (IV) e coeficiente de determinação genotípica (h^2).

GENÓTIPOS	CARACTERES FITOQUÍMICOS							
	FLA	FEN	CLA	CLB	CLT	CAR	CAB	CTC
1	1,07b	9,91b	8,50b	5,37a	13,71a	0,68b	1,55c	20,68a
2	1,53a	13,48a	7,75b	4,52a	12,28b	0,75b	1,71c	16,50b
3	1,31a	11,69a	7,73b	3,77b	13,09b	0,55b	1,58c	25,24a
4	0,99b	8,42c	8,77b	6,38a	15,15a	0,71b	1,42c	22,20a
5	0,93b	10,74b	9,09b	5,27a	14,37a	1,08a	1,74c	13,28b
6	0,67c	7,88c	9,04b	5,36a	13,54a	1,18a	1,67c	12,16b
7	1,32a	12,80a	7,82b	3,60b	11,43b	1,23a	2,16b	9,25b
8	0,85c	5,39d	8,16b	3,32b	11,48b	1,02a	2,64a	11,04b
9	0,52c	7,74c	9,84 ^a	3,60b	13,44a	1,16a	2,76a	11,63b
11	0,70c	6,86c	11,49 ^a	4,65a	16,01a	1,05a	2,51a	15,06b
12	0,46c	8,98b	9,42b	3,62b	12,97b	0,97a	2,57a	12,70b
15	0,56c	4,59d	7,27b	3,42b	10,69b	0,59b	2,12b	18,05a
16	0,83c	6,24d	9,50b	3,82b	12,00b	0,97a	2,29a	15,23b
17	0,96b	9,14b	11,32 ^a	4,40a	15,73a	1,37a	2,56a	11,58b
18	0,67c	8,55c	10,48 ^a	5,04a	15,13a	1,02a	1,82c	14,51b
19	0,46c	4,06d	8,84b	4,97a	13,81a	0,75b	1,75c	18,17a
20	1,35a	10,76b	9,07b	5,19a	14,26a	1,19a	1,79c	12,17b
Médias	0,89	8,66	9,07	4,49	13,47	0,96	2,04	15,28
Teste F	5,9**	7,9**	5,1**	3,9**	2,8**	7,1**	8,3**	3,7**
Cve%	26,6	19,3	10,0	17,3	11,9	16,4	12,9	25,4
CVg%	33,9	29,4	11,8	17,0	9,2	23,4	20,2	24,4
IV	1,2	1,5	1,2	1,0	0,8	1,4	1,5	0,9
h^2	83,0	87,4	80,4	74,3	64,6	85,9	88,0	73,5

FLA: Flavonoides, FEN: Compostos fenólicos, CLA: clorofila a, CLB: clorofila b, CLT: clorofila total, CAR: carotenoides, CAB: relação de clorofila a/b, CTC: relação clorofila total e carotenoides.

Médias com mesma letra na coluna fazem parte de um mesmo grupo segundo o teste de Scott Knott.

**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Quanto aos caracteres fitoquímicos, foram formados dois grupos (Figura 13), sendo que o grupo II foi formado somente pelos acessos 1 e 2 (Tabela 11).

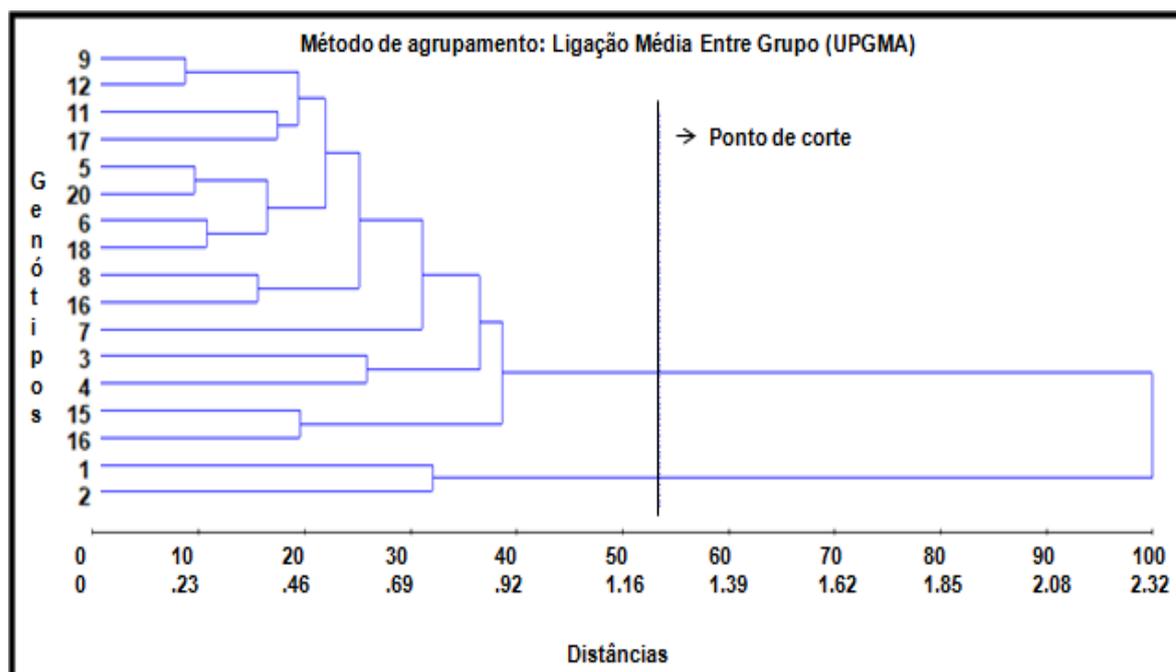


Figura 13. Dendrograma de 17 genótipos de *V. curassavica* gerado pelo método UPGMA, tendo como medida de dissimilaridade a distância euclidiana, com base em caracteres fitoquímicos.

Tabela 11. Agrupamento dos genótipos de *V. curassavica* a partir de caracteres fitoquímicos, pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando a distância euclidiana como medida de distância genética e a média dos grupos para as variáveis de maior contribuição relativa.

CARACTERES FITOQUÍMICOS					
Grupos	Genótipos	FLA	CLT	CAB	
I	9, 12, 11, 17, 5, 20, 6, 18, 8, 16, 7, 3, 4, 15, 16	0,83	13,54	2,09	
II	1, 2	1,30	12,99	1,63	

Para o agrupamento de acordo com os caracteres fitoquímicos, as características que mais contribuíram foram FLA (15,6564%), CLT (15,5582%) e CAB (15,1889%), de acordo com a importância relativa dos caracteres para divergência genética entre os acessos, segundo o método de Singh (1981) (Tabela 12).

Tabela 12. Contribuição relativa de caracteres fitoquímicos, na divergência entre acessos *V. curassavica*.

CARACTERES FITOQUÍMICOS		
Variável	S.j.	Valor (%)
FLA	233,677407	15,6564
FEN	139,214019	9,3274
CLA	149,251391	9,9999
CLB	170,056447	11,3938
CLT	232,212105	15,5582
CAR	172,63708	11,5667
CAB	226,699027	15,1889
CTC	168,787818	11,3088

S.j. = Estimativa da contribuição relativa de cada característica.

3.5. Principais variáveis

A partir da contribuição relativa para a divergência genética, segundo o método de Singh (1981), realizada nas análises morfofisiológicas, fitoquímicas e fisiológicas, foram selecionadas as nove variáveis com maior contribuição e realizado então um novo agrupamento, pelo método UPGMA. Nesse agrupamento houve a formação de 3 grupos (Figura 14), sendo que o grupo II foi formado somente pelo genótipo 2 (Tabela 13).

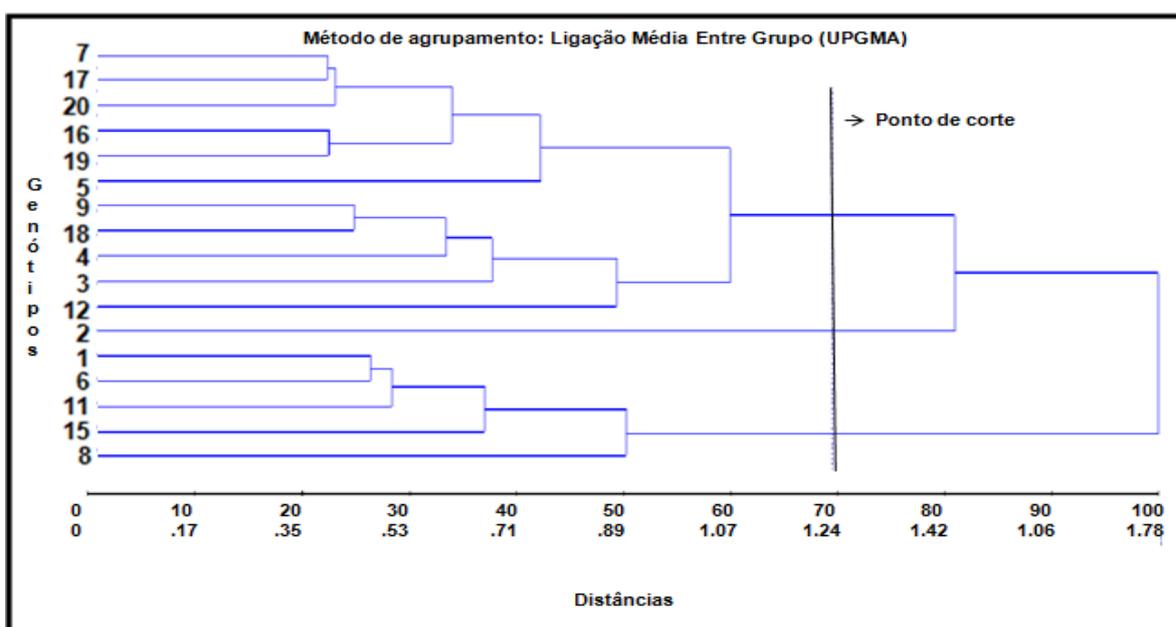


Figura 14. Dendrograma de 17 genótipos de *V. curassavica* gerado pelo método UPGMA, tendo como medida de dissimilaridade a distância euclidiana, com base nas principais variáveis.

Tabela 13. Agrupamento dos genótipos de *V. curassavica* gerado pelo método UGPMA, tendo como medida de dissimilaridade a distância euclidiana, com base nas principais variáveis e a média dos grupos para as variáveis de maior contribuição relativa.

PRINCIPAIS VARIÁVEIS				
Grupos	Genótipos	AFT	AFE	FLA
I	7, 17, 20, 16, 19, 5, 9, 18, 4, 3, 12	1558,5	183,3	0,89
II	2	932,7	134,0	1,53
III	1, 6, 11, 15, 8	1245,1	187,6	0,77

Depois do agrupamento somente com as variáveis de maior contribuição, a AFT (48,7646%), AFE (48,7636%) e FLA (8,7101%) foram as que tiveram maior contribuição para a divergência genética (Tabela 14).

Tabela 14. Contribuição relativa de caracteres fitoquímicos, na divergência entre acessos *V. curassavica*.

PRINCIPAIS VARIÁVEIS		
Variável	S.j.	Valor (%)
AFT	61,092215	21,744
AFE	137,006458	48,7636
IAF	14,016721	4,9889
FLA	24,471995	8,7101
CLT	4,174688	1,4859
CAB	23,077897	8,2139
A	8,362898	2,9765
gs	3,225913	1,1482
A/gs	5,531846	1,9689

S.j. = Estimativa da contribuição relativa de cada característica.

4.0. DISCUSSÃO

Entre os acessos avaliados, evidenciou-se a existência da variabilidade, o que constitui um fator essencial para o estudo da divergência genética em um programa de melhoramento. Este tipo de estudo é importante por fornecer parâmetros para identificar genitores, que quando cruzados possibilitem maior efeito heterótico na progênie e maior probabilidade de recuperar genótipos superiores nas gerações segregantes (Castro *et al.*, 2011).

O uso de marcadores moleculares é uma ferramenta valiosa, por permitir um rápido, preciso e acurado estudo da variabilidade existente, detectando as variações diretamente no DNA (Bellon *et al.*, 2007). A partir dos marcadores microssatélites, a análise de agrupamento, realizada com base nas distâncias genéticas, dividiu os genótipos em quatro grupos de similaridade genética a uma distância genética relativa de 0,7. Pode-se observar entre os genótipos coletados no Sul do Espírito Santo que não houve uma tendência de agrupamento entre aqueles acessos procedentes de uma mesma região geográfica ou de locais de altitudes semelhantes. Da mesma forma, houve uma clara distinção dos acessos pré-melhorados da Unicamp com relação aos demais genótipos de populações nativas, uma vez que os genótipos 20, 21 e 22 não foram agrupados com qualquer outro acesso a uma distância de 0,7. Devido a similaridade genética, esses genótipos passaram a ser considerados como repetições de um genótipo, considerando a partir de então como o genótipo 20.

Nas análises fisiológicas, percebeu-se que o genótipo 20 no teste de Scott-Knott permaneceu no grupo b para as variáveis A , g_s , TTE e A/C_i . O grupo b foi o que apresentou menor valor para todas as variáveis, isso porque o fechamento dos estômatos e a menor TTE inibiram a assimilação de CO_2 nos indivíduos desse grupo levando a reduções em A . Já C_i , A/E e A/g_s não apresentaram diferenças entre suas médias.

Alterações em g_s relacionam-se a assimilação de CO_2 para manutenção da taxa fotossintética, ou seja, a diminuição da g_s pode restringir a taxa de fixação de CO_2 , com a conseqüente diminuição de sua concentração nas cavidades subestomáticas e nos espaços intercelulares e a forma como essa variável se relaciona com A , possui uma importância ecológica. Por isso, quando A e g_s variam proporcionalmente, numa relação linear, é possível dizer que a concentração interna de CO_2 (C_i) e a eficiência intrínseca do uso da água (A/E) se mantêm constantes, no sentido de otimizarem as trocas gasosas. A g_s é entendida como um poderoso mecanismo fisiológico que as plantas possuem para o controle da transpiração (E) (Do Nascimento, 2009).

Análises fisiológicas das plantas em estágio inicial auxiliam a identificação de materiais promissores com elevado potencial de produção (Matos *et al.*, 2012). O êxito das espécies depende de características estruturais dos seus órgãos vegetativos, as quais permitem a manutenção dos processos fisiológicos vitais. Dentre eles, a folha, por ser o órgão primário de síntese, é o que apresenta maior plasticidade e o que mais responde, estruturalmente, às variações impostas pelo meio. A estrutura a ser desenvolvida pela folha está intimamente relacionada com o balanço entre o ganho de carbono via fotossíntese e a perda de água, via transpiração (Boeger; Gluzezak, 2006)

As variações nas características funcionais foliares têm norteado muitos estudos em ecologia funcional por apresentarem correlações ecológicas importantes (Prado Júnior, 2012). As combinações diferentes das características representam estratégias ecológicas alternativas para equilibrar, por exemplo, o custo de construção de uma folha versus os benefícios fornecidos pela folha na fixação de carbono via fotossíntese (Donovan *et al.*, 2011).

A fixação de carbono no processo de fotossíntese, assim como outros fatores, é considerada como básica para a morfologia vegetal, visto que ela está intimamente ligada a fatores ambientais. Assim variáveis como AFT, AFE e IAF estão relacionadas com o processo fotossintético (Gentil, 2010). Dentre as variáveis morfofisiológicas, percebeu-se que essas variáveis, apresentaram 2, 3 e 2 grupos respectivamente. Para AFT total o grupo que apresentou maior valor foi o grupo b (1445,5 a 2071,0), enquanto que para AFE (204,7 a 220,1) e IAF (2 a 4,1) foi o grupo a.

Assim para a determinação de parâmetros genéticos, o conhecimento da área foliar é imprescindível, já que é uma variável que se relaciona diretamente com a capacidade fotossintética (Dos Santos *et al.*, 2011) e representa o aparato de interceptação de luz para a fotossíntese, sendo então a folha o principal órgão do processo transpiratório responsável pelas trocas gasosas entre a planta e o ambiente. Além disso, a área foliar é usada em análises de crescimento vegetal (De Lucena *et al.*, 2011). O IAF é uma das variáveis determinantes na assimilação de carbono pelas plantas, influenciando na fotossíntese (Lara e Pedreira, 2011), pois determina a interface entre a planta e atmosfera sendo importante para as trocas de energia e massa entre o dossel e a atmosfera. Outra característica que indica o custo-benefício entre o ganho e perda de carbono é a AFE que representa a área foliar projetada por unidade de área foliar (Gentil, 2010).

A eficiência fotossintética também está ligada ao conteúdo de clorofilas e carotenoides, sendo então consequentemente ligados ao crescimento e à adaptabilidade a diversos ambientes. O conteúdo de clorofila nas folhas é utilizado para estimar o potencial fotossintético das plantas em função de serem pigmentos responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia, sob a forma de ATP e NADPH. Uma planta com alta concentração de clorofila é capaz de atingir altas taxas fotossintéticas. Os carotenoides são pigmentos que, durante a fotossíntese, podem desempenhar duas funções distintas, realizando a absorção de energia nos complexos de captação de luz atuando como pigmentos acessórios e exercendo ação fotoprotetora do aparato fotoquímico prevenindo danos foto-oxidativo (Calvalcante *et al.*, 2011). Nas plantas de *V. curassavica* deste trabalho, foi possível identificar valores de média de 13,47 para CLT e de 0,96 para CAR. O carbono fixado sinteticamente também está relacionado com a síntese de metabólitos secundários, sendo que os genótipos que apresentaram maiores valores de FLA e FEN, estão entre os que tiveram menor A.

Quanto aos parâmetros genéticos percebeu-se que houve de médio a alto coeficiente de variação. Apenas AFE e FMI apresentaram valores baixos para esse parâmetro. Assim, de uma maneira geral o experimento mostrou baixa precisão experimental, o que pode ser devido ao fato dos acessos estudados não serem de população melhorada e assim apresentaram alta variabilidade e plantas consideradas como não uniformes, contribuindo para a elevação desse coeficiente, que é influenciado pelo erro experimental. Da Silva *et al.* (2011), afirma que

resultados mais precisos são obtidos quando se diminui o efeito do erro experimental, que é causado por vários fatores que levam à heterogeneidade do material utilizado no experimento.

A estimativa do índice de variação (IV) que corresponde a uma razão entre CVg/CVe , não apresentou valor superior a unidade para nenhuma das características fisiológicas avaliadas. Para as morfofisiológicas tiveram oito variáveis e as fitoquímicas tiveram seis que podem ser utilizadas na seleção de acesso, visto o elevado valor apresentado para esse parâmetro genético. As que tiveram baixo IV indicam que essas características são governadas por um grande número de genes são bastante influenciadas por fatores ambientais.

A herdabilidade da maioria das variáveis foi de média a alta, incluindo as variáveis com maior contribuição relativa para a divergência genética, exceto a variável A/g_s que junto com outras duas variáveis fisiológicas tiveram baixa herdabilidade. Quanto maior a herdabilidade mais ganhos genéticos expressivos podem ser conseguidos selecionando-se os melhores genótipos, apesar delas poderem estar subestimadas devido à magnitude do erro experimental. Segundo Da silva *et al.* (2011), a escolha de cultivares com herdabilidades e valores elevados em caracteres de interesse, mostram maior estabilidade fenotípica frente às variações de ambiente.

O acesso 20 da Unicamp, no agrupamento das variáveis fisiológicas permaneceu junto com mais cinco genótipos no grupo III. Considerando as variáveis de maior explicação para a divergência genética, segundo o método de Singh (1981), os genótipos desse grupo foram os que apresentaram valores abaixo da média para a variável A e g_s e acima da média para A/g_s .

Percebeu-se que no agrupamento dos caracteres morfofisiológicos a maioria dos demais genótipos permaneceram agrupados junto ao genótipo 20, enquanto que o genótipo 2 ficou sozinho no grupo II. Como para esse agrupamento as variáveis que mais explicaram a divergência genética foram AFT, AFE e IAF, no grupo I tiveram valores acima da média para essas variáveis.

No agrupamento dos caracteres fitoquímicos a formação do grupo II foi somente com os genótipos 1 e 2. Sendo as variáveis com maior contribuição relativa FLA, CLT e CAB, comparando os valores das médias das variáveis com os valores das médias do grupo II, esse grupo tem média de FLA acima da média da variável e CLT e CAB abaixo da média para a variável.

Nos agrupamentos, as variáveis que apresentaram pouca ou nenhuma importância relativa, ou seja, uma contribuição de pequena amplitude é considerada como não consistentes para a quantificação da dissimilaridade genética e significam pouco para o progresso genético no melhoramento (Bolina *et al.*, 2014). De acordo com Alves *et al.* (2003), o interesse na avaliação da importância relativa dos caracteres reside na possibilidade de se descartarem características que pouco contribuem para a discriminação do material avaliado, reduzindo dessa forma, mão-de-obra, tempo e custo despendidos na experimentação. Por isso, foram descartadas as características com pouca contribuição relativa e com base nas nove características de maior contribuição foi realizado um novo agrupamento.

No agrupamento das principais variáveis, foram formados três grupos, sendo que a AFT, AFE e FLA as que tiveram maior contribuição para a divergência genética. Com isso, os grupos foram separados em função dessas variáveis, sendo o grupo I o que apresenta valores em torno da média para as variáveis e nele os genótipos nativos se agruparam junto ao da Unicamp. Quando comparado ao agrupamento realizado pelos marcadores moleculares, não houve grupos idênticos ou parecidos. Também não se agruparam com base em localidades próximas ou de altitudes semelhantes. De acordo com Matos *et al.* (2012), a obtenção de variedades melhoradas é dependente da identificação de estratégias morfológicas e fisiológicas envolvidas com a produção. Com isso, a análises fisiológicas e morfológicas em acessos originados em diferentes ambientes poderão identificar materiais candidatos a programas de melhoramento visando obtenção de variedades superiores, no entanto, em alguns casos, a diversidade geográfica não necessariamente representa diversidade genética. Além disso, Amorim *et al.* (2009) destaca que a não concordância apresentada entre os resultados obtidos por meio da caracterização agrônômica e molecular, sugerem que a baixa associação entre dados morfológicos e moleculares pode ter por base a parcial e insuficiente representação do genoma quando são utilizados dados morfológicos. Essa baixa correlação também pode ser explicada pela ausência de associação entre os locos que controlam os caracteres morfológicos estudados e os alelos identificados por meio de marcadores SSR, uma vez que a correlação será tão maior quanto maior for esta associação.

5.0. CONCLUSÕES

Há variabilidade entre os genótipos. As variáveis de maior importância foram AFT, AFE e FLA. De maneira geral não houve grupos formados em que predominasse genótipos de um mesmo local ou de altitudes semelhantes. Os genótipos 3, 4, 5, 9, 7, 12, 16, 17, 18 e 19 são os que mais se assemelham ao genótipo pré-melhorado da Unicamp. Dessa forma, são genótipos que podem ser melhores estudados para programas de melhoramento genético.

6.0. REFERÊNCIAS

ALVES *et al.* Seleção de descritores botânico-agronômicos para caracterização de germoplasma de cupuaçuzeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.38, n.7, p.807-818, 2003.

AMEIRA *et al.* Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.11, n.1, p.7-11, 2009.

AMORIM *et al.* Caracterização agrônômica e molecular de Genótipos diplóides melhorados de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 31, n. 1, p. 154-161, 2009.

BELLON *et al.* Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007.

BOEGER, M. R. T.; GLUZEZAK, R. M. **Adaptações estruturais de sete espécies de plantas para as condições ambientais da área de dunas de Santa Catarina, Brasil**. Iheringia, Série Botânica. v. 61, n. 1-2, p. 73-82, 2006.

BOLINA *et al.* Dissimilaridade genética em variedades de *Artemisia annua* L. embasada em caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16, n.2, p.356-363, 2014.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, p.131–134, 2005.

CASTRO *et al.* Estudo da divergência genética por características morfológicas entre acessos de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.) coletados no Estado do Tocantins em diferentes épocas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.13, n.1, p.24-29, 2011.

CAVALCANTE *et al.* Clorofila e carotenoides em maracujazeiro-amarelo irrigado com águas salinas no solo com biofertilizante bovino. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. Especial, p. 699-705, 2011.

CONCEIÇÃO *et al.* Variabilidade genética e importância relativa de caracteres em acessos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) tipo broad leaf por meio de marcadores fenotípicos enciclopédia biosfera. **Centro Científico Conhecer**. v.10, n.19, 2014.

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV. 382p. 2006.

DA SILVA *et al.* Avaliação do coeficiente de variação experimental para caracteres de frutos de pimenteiras. **Revista Ceres**. v. 58, n.2, p. 168-171, 2011.

DA SILVA FILHO *et al.* Avaliação morfológica e agrônômica de sementes de acessos de caupi coletados no Rio Grande do Norte. **Agropecuária Científica no Semiárido**. v. 9, n. 4, p. 102-106, 2013.

DE ANDRADE *et al.* Diversidade genética de acessos de *Nephelium lappaceum* L. através de caracterização morfológica e molecular. **Comunicata Scientiae**. v. 2, n. 2, p. 91-99, 2011.

DE ARAUJO, J.S. *Desenvolvimento vegetal, produção e composição química do óleo essencial de Cordia verbenacea DC. (Boraginaceae) em função do fornecimento de N, P, K e B e da aplicação de ácido Jasmônico*. Tese (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP. 2007.

DE LUCENA *et al.* Medição de área foliar de aceroleira. **Revista Caatinga**. v. 24, n. 2, p. 40-45, 2011.

DE PINHO *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**. v.42, n.2, 2012.

DE QUEIROZ, M. A. Recursos Genéticos Vegetais da Caatinga para o Desenvolvimento do Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**. v. 6, p. 1135-1150, 2011.

DE RESENDE *et al.* Divergência genética e índice de seleção via BLUP em acessos de algodoeiro para características tecnológicas da fibra. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 44, n. 3, p. 334-340, 2014.

DO NASCIMENTO, J. L. *Crescimento e assimilação de carbono em plantas jovens de Attalea funifera MART. Submetidas ao sombreamento e ao estresse hídrico*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA. 2009.

DONOVAN, L. A. *et al.* The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 26, n. 2, p. 88-95, 2011.

DOS SANTOS *et al.* Formas e épocas de amostragem em folhas de pinhão manso para quantificação da área foliar. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 2, n. 3, p. 51-57, 2011.

DOYLE, J.J.; J.L. DOYLE. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. **Phytochem bull**. v.19, p.11-15, 1990.

FEIJÓ *et al.* Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v. 24, p. 516-523, 2014.

FIGUEIRA *et al.* Development and characterisation of microsatellite markers for *Cordia verbenacea* (Boraginaceae), an important medicinal species from the Brazilian coast. **Conservation Genetics**. v. 11, p. 1127–1129, 2010.

GENTIL, M. S. *Transpiração e eficiência do uso da água de árvores clonais de Eucalyptus aos 4 anos em áreas com e sem irrigação em Eunápolis - Bahia*. Dissertação (Mestrado em Ciências - Silvicultura e Manejo Florestal), Universidade de São Paulo, São Paulo – SP. 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONELI *et al.* Cinética de secagem de folhas de erva baleeira (*Cordia verbenacea* DC.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16, n.2, p.434-443, 2014.

LAPA, F.S. *Cordia curassavica* (JACQ.) ROEM. & SCHULT.: *Influência de fatores ambientais no crescimento e na produção de metabólitos*. Dissertação (Mestre em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Florianópolis – SC. 2006.

LARA, M. A. S.; PEDREIRA, C. G. S. Estimativa da assimilação potencial de carbono em dosséis de espécies de braquiária. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.46, n.7, p.743-750, 2011.

LAVIOLA *et al.* Caracterização morfo-agronômica do banco de Germoplasma de pinhão manso na fase jovem. **Bioscience Journal**. v. 27, n. 3, p. 371-379, 2011.

MARQUES, M.S. *Pessoas e plantas no entorno de unidade de conservação de proteção integral: o caso do Parque Estadual Acaraí, São Francisco do Sul, litoral Norte de SC*. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos, Algas e Plantas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Ilha de Santa Catarina – SC. 2013.

MATIAS *et al.* Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2013.

MATOS *et al.* Análise de crescimento e trocas gasosas de acessos de *Jatropha curcas* L. **Revista Agrarian**. v.5, n.18, p.330-336, 2012.

MENDES *et al.* Efeitos das condições ambientais sobre o teor e variabilidade dos óleos voláteis de *Dalbergia frutescens* (Vell.) Britton (Fabaceae). **Química Nova**. v. 35, n. 9, p.1787-1793, 2012.

MENDES *et al.* Reguladores vegetais e substratos no enraizamento de estacas de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16, n.2, p.262-270, 2014.

MING *et al.* Pesquisas agronômicas das plantas medicinais da Mata Atlântica regulamentadas pela ANVISA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.14, n.esp., p.131-137, 2012.

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**. v. 20, p. 359-363, 1977.

MONTANARI, I. JR. *Variabilidade genética em uma população de Cordia verbenacea DC. para características agronômicas e fitoquímicas*. Tese (Doutorado em Agronomia – Horticultura) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu-SP. 2011.

NATÉRCIA, F. Parcerias e inovação impulsionam setor farmacêutico. **Inovação Uniemp**. v.1, n.3, 2005.

OLIVEIRA *et al.* Uso de marcadores ISSR para estimar a diversidade genética entre acessos de pimenta coletados no Sul do Estado do Espírito Santo. **Perspectiva online: biológicas e saúde**. v.10, n. 3, p.35-43, 2013.

OTTO *et al.* Fotossíntese, condutância estomática e produtividade de Clones de *eucalyptus* sob diferentes condições Edafoclimáticas. **Revista Árvore**. v.36, n.3, p.431-439, 2013.

PACHECO *et al.* Deficiência hídrica e aplicação de ABA nas trocas gasosas e no acúmulo de flavonoides em calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 33, n. 2, p. 275-281, 2011.

PAULILO *et al.* Effect of light intensity and growth substratum on plant development and production of secondary metabolites in *Cordia curassavica* (jacq.) Roem. & schult. **Revista Árvore**. v.34, n.3, p.417-423, 2010.

PELICER, M. L.S. A importância da atenção farmacêutica no uso do medicamento fitoterápico *tribulus terrestris* no âmbito da farmácia de manipulação. **Revista Especialize On-line IPOG**. v. 01, n. 6, 2013.

PEREIRA, J. A. S. *Cordia verbenacea DC.: perfil morfo-anatômico, histoquímico, farmacognóstico e avaliação da atividade anti-candida do extrato hidroetanólico e suas frações*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo – SP. 2013.

PEREIRA *et al.* *Cordia verbenacea* DC e *Mikania* sp.: interferência no ensaio de controle da qualidade microbiológico. **Infarma Ciências farmacêuticas**. v. 26, p.111-118, 2014.

POORTER, H.; VILLAR, R. The fate of acquired carbon in plants: Chemical composition and construction costs. *In*: Bazzaz, F.A.; Grace, J. (eds). **Resource allocation in plants**. Academic Press, p. 39-72, 1997.

PRADO JÚNIOR, J. A. do. *Traços funcionais como preditores da similaridade funcional entre sub-bosques de florestas estacionais semidecíduais: subsídios para*

a conservação destes ecossistemas. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG. 2012.

PROBST, I.D.S. *Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico*. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu – SP. 2012.

RABBANI *et al.* Diversidade genética entre cajueiros comerciais. **Scientia Plena**. v. 8, n. 6, 2012.

RIBEIRO, K.D.S; GUIMARÃES, A.L.D.A. O uso de medicamentos à base de plantas medicinais por médicos do SUS no município de Teresópolis/RJ. **Revista Agroambiental**. n. 1, p. 61-65, 2013.

ROZWALKA *et al.* Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**. v.38, n.2, 2008.

SANTI *et al.* Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16, n.2, p.256-261, 2014.

SANTOS *et al.* Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.13, n.4, p.486-491, 2011.

SCOTT, A.J; KNOTT, M.A. Clusters analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**. v.30, n.3, p.507-512, 1974.

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

SOUZA *et al.* Utilização de Plantas Mediciniais com Atividade Antimicrobiana por Usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande – Paraíba. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. v.15, n.2, p.188-193, 2013.

TEIXEIRA *et al.* Características morfológicas de quatro variedades de mandioca de mesa cultivadas em Vitória da Conquista – BA. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**. v.10, n. 1, p.1-8, 2014.

VENTRELLA, M.C; MARINHO, C.R. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 31, n.3, p.457-467, 2008.