



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS



ANDERSON DE CARVALHO SILVA

CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA, MOLECULAR E
FITOQUÍMICA DE *Eplingiella* HARLEY & J.F.B. PASTORE

Feira de Santana – BA

2015

ANDERSON DE CARVALHO SILVA

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA, MOLECULAR E
FITOQUÍMICA DE *Eplingiella* HARLEY & J.F.B. PASTORE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Ciências no Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

Co-orientadores: Prof. Dr. Cassio van den Berg

Prof^ª. Dr^ª. Angélica Maria Lucchese

Feira de Santana – BA

2015

*À minha família, em especial, a meus avós,
Adrião e Josefina, meus pais, Hermínio e
Neilde, e à meus irmãos Allan e Amanda,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

*“Aos que a felicidade
É sol, virá a noite.
Mas ao que nada espera
Tudo que vem é grato.”*

Fernando Pessôa

Gratidão, substantivo feminino que define a qualidade de quem é grato, reconhecimento de uma pessoa por alguém que lhe prestou um benefício, um auxílio, um favor etc.; agradecimento. (**Aurélio**)

Para mim, um dos sentimentos mais puros e bonitos da vida. Por isso, e por ter certeza de que não alcançaria satisfatório êxito sem aqueles que aqui reconheço, de coração despido, sou grato. Primeiramente, às forças divinas que nunca me abandonam, *Deus*, obrigado por me fazer forte e perseverante, e por colocar em minha vida tantos anjos.

Agradeço a meus pais (*Hermínio Silva e Neilde Silva*), grandes incentivadores, torcedores e financiadores desse sonho, meu porto seguro. A meus irmãos (*Allan e Amanda*), sempre torcendo e vibrando a cada conquista. Minha namorada (*Alynne*), companheira paciente e dedicada, que além de suportar a distância, sempre me apoiou e incentivou a avançar com carinho e ternura. Aos meus primos-amigos-irmãos (*Leu e Alysson*) que dividem comigo as alegrias e tristezas da vida e vibram a cada passo. Aos irmãos que a vida me presenteou (*Diego, Mari, Matheuzão, Bianca, Gabizão, Fabão, Melina, Marinha, Ariana e Marisol*), sem vocês seria, realmente, muito mais difícil concluir esse doutoramento. Aos amigos, na torcida de Aracaju (*Fabício, Rafa, Eduardo, Suzana, entre outros*), que sempre me incentivaram. E a meus tios e primos (*são muitos*), agradeço a todos pela força e torcida à distância.

Agradeço ao Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira, primeiramente pela oportunidade, mas também pelo dedicado acompanhamento e aconselhamento, e pela amizade dispensada. Agradeço também ao Prof. Dr. Cassio van den Berg e a Prof^a. Dr^a Angélica Maria Lucchese, por acreditar no meu potencial e encarar o desafio de me coorientar, indicar o caminho. Ao Prof. Dr. José Floriano Pastore, pelo direcionamento, pela grande ajuda em todo o processo e pela amizade. Aos demais professores do PPGRGV/UEFS pelos ensinamentos, troca de experiências, apoio e incentivo, em especial, aos Profs. Drs. José Raniery e Hugo Brandão, e a Prof^a. Dr^a Claudinéia Pelacani. Aos funcionários do Horto Florestal, em especial à Janilza, à dona Maria, ao Sr. Ramos e a Márcio, e aos trabalhadores do campo, muito obrigado. Aos técnicos do LAMOL, em especial, Ricardo, Jonildson, Danielle e Everton. Aos técnicos do LAPRON, em especial, Edna e Serly. Aos colegas e amigos de ambos Laboratórios, por todo apoio, ajuda e por facilitar um pouco a minha vida, em especial, Juliana Santos, Juliana, Uiara, Myrna, Tiago Ceará, Thiago, Evelyne, Ricardo, Marla, Lizandro, Hibert, Ingrid, Larissa, Maira, Daniel, Luma, entre outros. Aos demais colegas de Doutorado, pela troca de experiência e pela ajuda ao longo, em especial, à Ronaldo, Cíntia, Mayana e Micaele. À Aritana Alves, pela paciência durante seu PIBIC, mas principalmente, pela grande ajuda nos experimentos e pela amizade.

À equipe do Quatro Estações, local de despressurização, em especial ao grande Bartô. Ao Sr. Adilton, pelos agradáveis papos relaxantes e pela amizade. Enfim, peço desculpas, caso tenha esquecido o nome de alguém, mas tenham certeza que sou grato de coração.

Muito obrigado!

RESUMO GERAL

Eplingiella fruticosa (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore é uma espécie aromática, nativa, que ocorre em seis estados do nordeste brasileiro (Bahia, Sergipe, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará). Popularmente conhecida como “alecrim de vaqueiro”, é comumente encontrada em feiras livres da região e utilizada no combate a dores e convulsões. Avaliações em camundongos e *in vitro* comprovam atividades analgésicas, vasodilatadora, cardioprotetiva, antiinflamatória e larvicida do seu óleo essencial e de diferentes tipos de extrato de suas folhas. Estudos recentes apontam grande variabilidade na composição química do óleo essencial de *E. fruticosa*, relacionada às condições edafoclimáticas e aos diferentes órgãos vegetais. Sendo assim, a espécie apresenta grande potencial de exploração tanto agrônômica, quanto por indústrias farmacêuticas. O objetivo geral deste estudo foi avaliar a capacidade de propagação vegetativa e caracterizar, previamente, genótipos de *E. fruticosa*, por meio de dados morfológicos, agrônômicos, fitoquímicos e moleculares. No CAPÍTULO I, foram conduzidos dois experimentos: o primeiro testou o efeito de três substratos e o segundo avaliou cinco concentrações de AIB e três períodos de cultivo. O delineamento foi em blocos casualizado, com quatro repetições. Avaliou-se percentagem de sobrevivência (%S), percentagem de estacas enraizadas (%EE), comprimento da raiz (CRE), número de brotações (NBE), massa seca de folhas (MSF), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST). No CAPÍTULO II, doze genótipos foram coletados, propagados vegetativamente e transplantados. Doze meses após o transplante foram avaliadas 12 características quantitativas, sendo oito morfológicas e quatro agrônômicas. No CAPÍTULO III, o DNA total foi extraído, em seguida 20 iniciadores foram testados, dos quais nove foram selecionados por apresentarem melhores perfis eletroforéticos em gel de agarose (2%). A matriz binária foi computada no GEOCOMPAR II. Estimou-se os parâmetros de diversidade e a estrutura genética os dados foram submetidos à análise Bayesiana, além de dendrograma Neighbor-joining e análise de componentes principais (PCA) com base na matriz de distâncias de Nei. E no CAPÍTULO IV, amostras de 100g de folhas de cada repetição por genótipo foram utilizadas na hidrodestilação do óleo essencial, em aparelho tipo clevenger, durante três horas, quantificando-se o teor. A identificação dos compostos e seus teores foi realizada por CG (DIC) e CG/EM e os dados de 15 compostos majoritários foram utilizados nas análises de diversidade. Foram procedidas análise de agrupamento e de variáveis canônicas, utilizando como medida de dissimilaridade a distância generalizada de Mahalanobis (D^2). No primeiro experimento do CAPÍTULO I, foram verificadas diferenças significativas

para CRE, NBE, MSF, MSR e MST, com melhor desempenho para o substrato comercial. No segundo, foram identificados efeitos positivos tanto da adição de AIB quanto dos tempos de cultivo sobre as variáveis CRE, NBE, MSF e MSR, atingindo incremento máximo com a concentração estimada de $1,5 \text{ g L}^{-1}$, aos 60 dias de cultivo. No CAPÍTULO II, houve variação significativa, pelo teste de F ($p < 0,01$), para as características CF, LF, CBD, CBE, LP, MFF e MSF. Os genótipos formaram dois grupos para quase todas as variáveis, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), exceto para LP, que formou três. Os genótipos EF002 e EF003 apresentaram as maiores médias para quase todas variáveis. Houve a formação de três grupos, tanto para UPGMA quanto para as variáveis canônicas (VC). As características que mais contribuíram para a formação dos grupos foram CBE, MFF e CF. Os genótipos EF002, EF003, EF005 e EF012 se destacaram por apresentarem maiores distâncias genéticas. No CAPÍTULO III, os iniciadores produziram 131 bandas polimórficas. O índice de diversidade de Nei (N_e) variou entre 0,31 e 0,39, enquanto Shannon (I) variou entre 0,33 e 0,48. O percentual do coeficiente de diferenciação genética (G_{st}) foi de 0,29. Na AMOVA a maior parte da variação ficou dentro das populações (69%), enquanto entre populações foi de 27% e entre espécies de 4%, indicando uma boa estruturação genética. O valor médio de F_{st} foi 0,175, demonstrando diferenciação intermediária entre as populações. As análises de estrutura pelo método Bayesiano revelou três possibilidades de formação de grupos ($K=2;=6;=8;$), no entanto, apresentou muitos indivíduos migrantes e elevado nível de miscigenação. O dendograma gerado pelo método de Neighbor-Joining confirmou a formação de dois grupos, com boa sustentação para os principais clados (100%). Na análise de PCA os dois primeiros axis explicaram 21,06% da variação total entre as populações. Por fim, no CAPÍTULO IV, os genótipos foram classificados em quatro *clusters*: 1 - genótipos EF001, EF006, EF007, EF008, EF010, EF011 e EF012, com E-cariofileno e biciclogermacreno como majoritários; 2 - genótipos EF002 e EF003, com os mesmos majoritários que o grupo anterior, no entanto, com percentuais médios cerca de 30% superiores; 3 - genótipos EF004 e EF005, que evidenciaram uma maior produção de E-cariofileno; e 4 - com genótipo EF009, formando um grupo isolado por apresentar α -pineno como majoritário e percentuais equilibrados entre os demais. Esse resultado foi confirmado pelas Variáveis Canônicas, que explicou 76% da variação. Os compostos biciclogermacreno, 1,8-cineol, α -copaeno e espatulenol representaram as variáveis de maior importância para a análise.

Palavras-chave: *Hyptis fruticosa*; alecrim-de-vaqueiro, variabilidade, planta medicinal, coleção de germoplasma.

GENERAL ABSTRACT

Eplingiella fruticosa (Salzm. Ex Benth.) Harley & JFB Pastore is an aromatic species, native, occurring in six states in northeastern Brazil (Bahia, Sergipe, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte and Ceará). Popularly known as "alecrim de vaqueiro", is commonly found in street markets of the region and used to combat pain and seizures. Reviews in mice and in vitro studies show analgesic activity, vasodilating, cardioprotective, anti-inflammatory and larvicidal of its essential oil and of different types of the leaves extract. Recent studies show great variability in essential oil chemical composition of *E. fruticosa*, related to soil and climatic conditions and different plant organs. Thus, the species has great potential for exploration both agronomic, and by pharmaceutical companies. The aim of this study was to evaluate the vegetative propagation capacity and characterize previously *Eplingiella* genotypes, through morphological, agronomic, phytochemicals and molecular data. In Chapter I, two experiments were conducted: the first tested the effect of three substrates and the second evaluated five concentrations of IBA and three periods of cultivation. The design was a randomized block design with four replications. We evaluated survival percentage (% S), percentage of rooted cuttings (% EE), root length (CRE), number of shoots (NBE), dry mass of leaves (MSF), root dry weight (MSR) and total dry matter (MST). In Chapter II, twelve genotypes were collected, propagated vegetatively and transplanted. Twelve months after transplantation were assessed 12 quantitative traits, eight morphological and agronomic four. In Chapter III, the total DNA was extracted, then 20 primers were tested, of which nine were selected because they have better electrophoretic profiles agarose gel (2%). The binary matrix was computed in GEOCOMPAR II. It is estimated the diversity of the genetic structure parameters and the data were subjected to Bayesian analysis, and Neighbor-joining dendrogram and principal component analysis (PCA) based on matrix of Nei distances. And in Chapter IV, samples of 100g of leaves each repetition per genotype were used in the essential oil hydrodistillation in Clevenger type apparatus for three hours, quantifying the content. The identification of the compounds and their contents was performed by GC (FID) and GC / MS data 15 and the major compounds were used in diversity analysis. They have been made to cluster analysis and canonical variables, using as dissimilarity measure the Mahalanobis distance (D^2). In the first experiment of Chapter I, significant differences were found for CRE, NBE, MSF, MSR and MST, with the best performance for the commercial substrate. In the second, positive effects have been identified both the addition of AIB as the cultivation time on the CRE variables, NBE, MSF

and MSR, reaching maximum increment to the estimated concentration of 1.5 g L⁻¹, at 60 days of cultivation. In Chapter II, there was significant variation by F test ($p < 0.01$) for the CF features, LF, CBD, CBE, LP, and MFF MSF. The genotypes formed two groups for almost all variables, by Scott-Knott test ($p < 0.05$), except for LP, which formed three. The EF002 and EF003 genotypes presented the highest levels for almost all variables. There was the formation of three groups for both UPGMA and for the canonical variables (CV). The characteristics that most contributed to the formation of groups were CBE, MFF and CF. The genotypes EF002, EF003, EF005 and EF012 stood out because they have higher genetic distances. In CHAPTER III, primers produced 131 polymorphic bands. The diversity index of Nei (N_e) ranged between 0.31 and 0.39, while Shannon (I) ranged between 0.33 and 0.48. The percentage coefficient of genetic differentiation (G_{st}) was 0.29. In AMOVA most of the variation was within populations (69%), while among populations was 27% and 4% among species, indicating a good genetic structure. The average value of F_{st} was 0.175, demonstrating intermediate differentiation between populations. The structure of the Bayesian analysis method revealed three possibilities for the formation of groups ($K = 2; = 6; 8 =;$), however, it presented many migrants and high level of mixing individuals. The dendrogram generated by the Neighbor-Joining method confirmed the formation of two groups, with good support for major clades (100%). PCA analysis in the first two axis explained 21.06% of the total variation among populations. Finally, in Chapter IV, the genotypes were classified into four clusters: 1 - EF001 genotypes, EF006, EF007, EF008, EF010, EF011 and EF012 with E-caryophyllene and bicyclogermacrene as major; 2 - EF002 and EF003 genotypes, with the majority same as the previous group, however, percentage with average about 30% higher; 3 - EF004 and EF005 genotypes that showed a greater production of E-caryophyllene; and 4 - with EF009 genotype, forming a single group to present α -pinene as balanced majority and percentage among the rest. This result was confirmed by canonical variables, which explained 76% of the variation. The bicyclogermacrene compounds, 1,8-cineol, α -copaene and spathulenol represented the most important variables for analysis.

Key words: *Hyptis fruticosa*; “alecrim de vaqueiro”, genetic diversity, medicinal plant and germplasm collection.

ÍNDICES DE TABELAS E APÊNDICES

- Tabela 01.** Percentual de sobrevivência (%S), percentual de estacas enraizadas (%EE), comprimento de raiz por estaca (CRE), número de brotações por estaca (NBE), massa seca de folhas (MSF), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST) obtidos em estacas de “alecrim-de-vaqueiro”, cultivadas em diferentes composições de substrato: comercial (Biomix®) (C), comercial + vermiculita (C+V) e comercial + vermiculita + húmus (C+V+H)..... **32**
- Tabela 02.** Coordenadas geográficas, altitude e municípios dos locais de coleta dos 12 genótipos da Coleção de Germoplasma de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore..... **44**
- Tabela 03.** Análise química do solo no local onde foi realizada a implantação do experimento na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana..... **46**
- Tabela 04.** Médias dos genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore para as variáveis massa fresca de folhas (MFF), massa seca de folhas (MSF), comprimento de folha (CF), largura de folha (LF), comprimento da base foliar direita (CBD), comprimento da base foliar esquerda (CBE), largura do pecíolo (LP)..... **48**
- Tabela 05.** Matriz de dissimilaridade entre os genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, baseada na distância generalizada de Mahalanobis (D^2)..... **51**
- Tabela 06.** Identificação da população, nome da espécie, município, coordenadas geográficas, número de indivíduos e número de voucher para as 18 populações de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore..... **64**
- Tabela 07.** Nome, sequência, temperatura de anelamento ($^{\circ}\text{C}$) e número de bandas polimórficas dos iniciadores utilizados na análise das populações de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore..... **67**
- Tabela 08.** Número de bandas polimórficas (NBp), percentual de bandas polimórficas ($\%Bp$), heterozigidade esperada (He) e índice de diversidade de Shannon (I) para 18 populações naturais de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore..... **68**
- Tabela 09.** Análise molecular de variância (AMOVA) de dados ISSR utilizados para determinar a estrutura genética para diferentes níveis hierárquicos das 18 populações de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore..... **70**
- Tabela 10.** Coordenadas geográficas, altitude e municípios dos locais de coleta dos 12 genótipos da Coleção de Germoplasma de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore..... **89**
- Tabela 11.** Percentual das classes de terpenos e do total dos compostos identificados no óleo essencial dos 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore..... **93**

Tabela 12. Composição química do óleo essencial de 12 genótipos de <i>Eplingiella fruticosa</i> (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore.....	94
Apêndice A. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA – CAPÍTULO I.....	103
Apêndice B. RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA – CAPÍTULO I.....	104
Apêndice C. GEIS DE ELETROFORESE COM REGISTRO DAS BANDAS DO INICIADOR ISSR “MANNY” NO DNA TOTAL DE <i>Eplingiella</i> Harley & J.F.B. Pastore. A. EF1851 – <i>E. cuniloides</i> ; B. EF1850 – <i>E. fruticosa</i> ; C. EF2326 – <i>E. brightoniae</i>	105
Apêndice D. DISTÂNCIAS DE NEI, UTILIZADAS COMO MEDIDA DE DISSIMILARIDADE ENTRE AS POPULAÇÕES DE <i>Eplingiella</i> Harley & J.F.B. Pastore.....	106
Apêndice E. CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DO GENÓTIPO EF001 DE <i>Eplingiella</i> Harley & J.F.B. Pastore.....	107
Apêndice F. COMPOSIÇÃO INTEGRAL DO ÓLEO ESSENCIAL DOS GENÓTIPOS DE <i>Eplingiella</i> Harley & J.F.B. Pastore ESTUDADOS.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS E EQUAÇÕES

Figuras

- Figura 01.** Detalhes das espécies de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore. A. *E. fruticosa*; B. *E. cuniloides*; C. *E. brightoniae*..... **05**
- Figura 02.** Número de brotações por estaca (A), massa seca de folhas (B), comprimento da raíz (C) e massa seca de raiz (D) de estacas de “alecrim-de-vaqueiro” em função de concentrações de AIB, avaliadas em três tempos de cultivo..... **33**
- Figura 03.** Mapa Bahia-Sergipe indicando localização de origem dos genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore mantidos no Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana..... **44**
- Figura 04.** Processo de coleta, identificação, propagação e implantação da Coleção de Germoplasma de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore na UNEHF/UEFS. Feira de Santana, BA, 2015..... **45**
- Figura 05.** Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, obtido pelo método de UPGMA, com base em 12 caracteres, utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis (D^2)..... **50**
- Figura 06.** Dispersão gráfica dos escores em relação aos eixos representativos das variáveis canônicas (VC1, VC2) relativos a 12 caracteres estudados em 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore..... **52**
- Figura 07.** Contribuição relativa (%) das características avaliadas para a divergência entre os 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore..... **53**
- Figura 08.** Mapa com os pontos georreferenciados mostrando o local de coleta de cada população de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore..... **71**
- Figura 09.** Valores de delta (K) segundo correção de Evanno (2005), mostrando o maior valor de $K = 2$, seguido dos picos $K = 6$ e $K = 8$ **72**
- Figura 10.** Três possibilidades de proporção de mistura Bayesiana entre 18 populações naturais de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore. ($K = 2$; $K = 6$; $K = 8$)..... **72**
- Figura 11.** Dendrograma Neighbor-Joining baseado na matriz de distância genética de Nei para as 18 populações de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore..... **75**
- Figura 12.** Representação gráfica dos escores sobre os dois primeiros componentes principais (PCA) da matriz de distância genética dos 265 indivíduos das 18 populações de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore, baseado em 131 loci ISSR..... **77**

Figura 13. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth) Harley & J.F.B.Pastore, obtido pelo método de UPGMA, com base na composição química dos óleos essenciais, utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis (D^2)..... **95**

Figura 14. Médias dos 15 mais importantes constituintes químicos dos óleos essenciais dos clusters 1 a 4 de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) J.F.B. Pastore..... **96**

Figura 15. Dispersão gráfica dos escores em relação aos eixos representativos das variáveis canônicas (VC1, VC2 e VC3) relativos a 15 compostos majoritários identificados no óleo essencial de 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore..... **97**

Figura 16. Contribuição relativa (%) dos 15 compostos majoritários dos óleos essenciais para a divergência entre os 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B.Pastore..... **98**

Equações

Equação 1. Cálculo do teor de óleos essenciais..... **96**

Equação 2. Cálculo do Índice Kovat's..... **97**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. EPLINGIELLA HARLEY & J.F.B.PASTORE	16
2.2. CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS	18
2.3. CARACTERIZAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS	23
2.3.1. <i>Caracterização morfológica e agronômica</i>	24
2.3.2. <i>Caracterização fitoquímica</i>	25
2.3.3. <i>Caracterização Molecular</i>	27
2.4. REFERÊNCIAS	29
3. CAPÍTULO I	38
COMPOSIÇÃO DE SUBSTRATO E USO DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NA ESTAQUIA DE “ALECRIM-DE-VAQUEIRO”	38
3.1. INTRODUÇÃO	40
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.4. CONCLUSÕES	47
3.5. REFERÊNCIAS	47
4. CAPÍTULO II	51
VARIABILIDADE EM GENÓTIPOS DE <i>EPLINGIELLA FRUTICOSA</i> (SALZM. EX BENTH.) HARLEY & J.F.B. PASTORE BASEADA EM DADOS MORFOLÓGICOS E AGRONÔMICOS	51
4.1. INTRODUÇÃO	53
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.4. CONCLUSÕES	66
4.5. REFERÊNCIAS	66
5. CAPÍTULO III	70
VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>EPLINGIELLA HARLEY</i> & J.F.B. PASTORE BASEADA EM MARCADORES MOLECULARES ISSR	70
5.1. INTRODUÇÃO	73
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	76
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.4. CONCLUSÕES	89
5.5. REFERÊNCIAS	90
6. CAPÍTULO IV	96
DIVERSIDADE QUÍMICA NO ÓLEO ESSENCIAL EM GENÓTIPOS DE <i>EPLINGIELLA FRUTICOSA</i> (SALZM. EX BENTH.) HARLEY & J.F.B. PASTORE	96
6.1. INTRODUÇÃO	98
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS	100
6.3. RESULTADO E DISCUSSÃO	104

6.4. CONCLUSÕES	111
6.5. REFERÊNCIAS	111
CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
APÊNDICES	117

1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Lamiaceae é composta por 236 gêneros e 7.172 espécies, ocorrendo em áreas tropicais e temperadas no mundo, exceto na Antártica (Harley et al., 2004; Harley, 1012). Dessas, existem atualmente 46 gêneros e 524 espécies nativas ou naturalizadas no Brasil (Harley et al., 2015).

De modo geral, essa família se destaca por apresentar muitas espécies com potencial econômico elevado, principalmente em setores como alimentação, ornamentação e na medicina. Em particular, são conhecidas por seus óleos aromáticos, com muitas espécies cuja importância comercial ou cultural está estabelecida, tais como: *Salvia officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha* L. spp., *Thymus vulgaris* L., *Origanum* L. spp., *Satureja hortensis* L., *Monarda* L. spp., *Melissa officinalis* L., *Lavandula* L. spp., *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng., *Ocimum* spp., *Plectranthus* L'Her. spp., *Hyptis* Jacq. spp. (Harley, 2012).

O gênero *Hyptis* possui o maior número de espécies dessa família ocorrentes no Brasil, sendo 69,5% destas consideradas endêmicas. Esse gênero teve modificações taxonômicas após revisão recente da subtribo Hyptidinae, baseada em marcadores moleculares, quando boa parte de suas espécies foram redistribuídas em onze gêneros: *Cantinoa* Harley & J.F.B. Pastore, *Condea* Adanson, *Cyanocephalus* (Pohl ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Gymneia* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Hyptidendron* Harley, *Leptohyptis* Harley & J.F.B. Pastore, *Martianthus* Harley & J.F.B. Pastore, *Medusantha* Harley & J.F.B. Pastore, *Oocephalus* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Physominthe* Harley & J.F.B. Pastore e *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore (Harley e Pastore, 2012).

O gênero *Eplingiella* é formado por três espécies, *E. fruticosa* (Salzm. ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore, *E. cuniloides* (Epling) Harley & J.F.B. Pastore e *E. brightoniae* Harley que ocorrem no semiárido do nordeste brasileiro, em solos arenosos empobrecidos. A primeira surge nos estados nordestinos Bahia, Sergipe, Pernambuco, Paraíba, Ceará e Rio Grande do Norte, em solos arenosos de caatingas, tabuleiros e restingas, principalmente à margem das estradas e em locais antropizados. As outras duas, apesar de apresentarem caracteres morfológicos semelhantes, apresentam origens distintas: enquanto *E. cuniloides* é endêmica do município de Morro do Chapéu, Bahia, e encontrada em áreas arenosas de altitude, *E. brightoniae* ocorre apenas entre os municípios de Umburanas e Sento Sé, também na Bahia, e habita solos rochosos (Harley e Pastore, 2012; Harley, 2014). A ocorrência restrita dessas

espécies as tornam mais susceptíveis a extinção. *E. brightoniae*, por exemplo, com ocorrência limitada a campos rupestres de uma única serra, sujeita à queimadas e mineração, é considerada espécie em risco (Harley, 2014).

Essas espécies são utilizadas popularmente para fins medicinais e terapêuticos. Estudos realizados com extratos e óleo essencial de *E. fruticosa* comprovam atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e vasodilatadora (Silva et al., 2006; Santos et al., 2007; Andrade et al., 2010; Menezes et al., 2007; Moreira et al., 2010; Franco et al., 2011; Lima et al., 2013), destacando o potencial da planta no desenvolvimento de fitoterápicos.

O uso medicinal dessa espécie está sendo investigado, a partir de testes em ratos, em diversos fins. Silva et al. (2006), avaliando a ação do extrato aquoso, concluiu que este apresenta efeito antinociceptivo em camundongos e não apresenta toxicidade aguda pela administração oral. Esta ação também é comprovada pela utilização do óleo essencial. Contudo, neste caso, foi utilizada aplicação subcutânea, que também foi atóxica (Menezes et al., 2007; Franco et al., 2011). A atividade analgésica também se revelou em aplicações do extrato hidroetanólico, restritas a cavidade orofacial, que foi capaz de inibir a transmissão periférica e central da dor orofacial, além de reduzir a propagação dos processos inflamatórios (Lima et al., 2013). Segundo Santos et al. (2007) o óleo essencial foi eficaz como hipotensivo, sendo esta ação derivada da vasodilatação direta e de uma consequente diminuição da resistência vascular periférica na região coronária dos ratos. A mesma atividade foi identificada na adoção do extrato diclorometano, possivelmente devido à inibição do influxo de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} operados por voltagem (Moreira et al., 2010). Além disso, os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes também foram confirmados a partir de doses orais de extratos das folhas, particionados quimicamente (Andrade et al., 2010).

Contudo, a exploração dessa espécie pelas populações locais sempre esteve atrelada a um modelo extrativista, não sustentável, de aproveitamento desse recurso natural. Além disso, por ter um comportamento ruderal, no caso de *E. fruticosa*, e apresentar hábitat restrito, *E. cuniloides* e *E. brightoniae*, estão expostas a ações de degradação, sob risco de perda do habitat por vários motivos, como a especulação imobiliária, construção de novas estradas ou ação de intempéries. Essa exposição tem levado à diminuição do pool gênico da espécie, por meio da perda de variabilidade, podendo colocá-la sob risco de extinção, portanto, sendo urgentes ações que permitam o conhecimento da estrutura genética de suas populações com vista à conservação.

Populações de diferentes ambientes podem ter diferentes características genéticas, e estudos sobre relacionamento genético dessas populações é a base para a conservação dessas espécies (Duffy et al., 2009; Karimi et al., 2009). Sendo assim, é importante estimar a diversidade genética e a estrutura das populações de espécies que apresentam grande potencial de uso. A caracterização de populações é um dos métodos mais aplicados na quantificação da variabilidade; sua função é ampliar os conhecimentos acerca dos aspectos morfológicos, fenológicos, químicos e moleculares, na tomada de decisões na conservação *ex situ* (Guerra et al., 1998).

A caracterização é uma atividade essencial no manejo de coleções de germoplasma *ex situ* que consiste em tomar dados para descrever, identificar e diferenciar acessos de uma mesma espécie. Dentre os vários tipos de caracterização, a morfológica é a primeira realizada no germoplasma, depois que ele é incorporado às coleções. É feita com base em observações (variáveis qualitativas) ou mensurações (quantitativas) de vários caracteres morfológicos, diferenciáveis a olho nu, denominados de descritores morfológicos. Descritores morfológicos são caracteres altamente herdáveis, controlados por poucos genes, que se expressam igualmente em todos os ambientes (Burle e Oliveira, 2010). Esse tipo de caracterização permite a discriminação relativamente fácil entre fenótipos e fornece as primeiras estimativas de variabilidade dentro da coleção de germoplasma. Quando se trata de plantas aromáticas e medicinais, é muito importante também a utilização de marcadores bioquímicos para quantificar a variabilidade em óleos e extratos, identificando composição (qualitativa) e teor (quantitativa) e investigando a ação de princípios ativos e, dessa forma, favorecendo a escolha de materiais promissores na indústria farmacêutica (Pires et al., 1984).

Outra forma utilizada para quantificar variabilidade em populações é a caracterização molecular, que se baseia na utilização de marcadores moleculares ou genéticos, que são fragmentos de DNA associados a partes específicas do genoma. Esses marcadores podem ser de dois tipos, de acordo com as suas características: dominantes ou co-dominantes. Os marcadores mais utilizados em estudos de diversidade genética atualmente são ISSR (Inter-Simple Sequency Repeat) (Djè et al., 2010; Jia et al., 2011). Como todo marcador dominante, ISSR's são bialélicos, pois suas bandas demonstram o estado de presença ou ausência de um caráter. Conseqüentemente, heterozigotos não são distinguíveis de um homozigoto dominante individual, o qual prevê estimativa direta (Kothera et al., 2007). Sendo assim, ISSR é uma ferramenta valiosa no estudo da variabilidade, estrutura e mapeamento genético das populações (Yiping et al., 2011).

Assim, considerando a importância da caracterização de *Eplingiella fruticosa*, a fim de quantificar a variabilidade entre diferentes populações, selecionar genótipos promissores ao melhoramento e promover à valoração desses recursos genéticos, o presente estudo teve por objetivos avaliar a melhor combinação de fatores na propagação por estaquia de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore; caracterizar a variabilidade em diferentes genótipos de *E. fruticosa*, sobre aspectos morfológicos e bioquímicos e analisar a diversidade genética e a estrutura das populações naturais de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Eplingiella* Harley & J.F.B.Pastore

A família Lamiaceae é composta por 240 gêneros e 7.200 espécies, ocorrendo em áreas tropicais e temperadas no mundo, exceto na Antártica (Harley et al., 2004; Harley, 2012). Dessas, existem atualmente 32 gêneros e aproximadamente 500 espécies nativas ou naturalizadas no Brasil, que se encontram distribuídas em cinco subfamílias: Viticoideae Briq., Ajugoideae Kostel, Scutellarioideae (Dumort.) Caruel, Lamioideae Harley, Nepetoideae (Dumort.) Luer (Harley et al., 2010; Harley, 2012; Harley et al., 2015).

Nepetoideae é a maior subfamília de Lamiaceae (*sensu lato*) com 133 gêneros e 3685 espécies, sendo caracterizada pelo pólen hexacolpado, trinuclear, ausência de endosperma e de glicosídeos iridóides, mixocarpia, um alto teor de terpenóides voláteis e óleos insaturados nas sementes (Thorne, 1992). Nepetoideae abrange cerca de 50% das Lamiaceae, e atualmente inclui 19 gêneros nativos do Brasil. Duas tribos abrangem esses gêneros, Mentheae e Ocimeae. Esta última apresenta distribuição essencialmente tropical e é composta por nove dos gêneros. Desses, oito pertencem à subtribo Hyptidinae, subfamília patricamente exclusiva da região neotropical, exceto por algumas ervas pan-tropicais (Harley, 2012).

Essa tribo passou por revisão taxonômica recente, por meio de marcadores moleculares, na qual *Hyptis* foi considerada parafilética junto a *Eriope* Kunth. ex Benth., *Hypenia* (Mart. ex Benth.) Harley e *Hyptidendron* Harley, e todos os outros gêneros parecem ser derivados do mesmo ancestral. Com isso, elevou-se para 17 o número de gêneros incluídos na subtribo (*Asterohyptis* Epling, *Cantinoa* Harley & J.F.B. Pastore, *Condea* Harley & J.F.B. Pastore, *Cyanocephalus* (Pohl ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore, *Gymneia* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Eriope* Bonpl. ex Benth., *Eriopidion* Harley,

Hypenia (Mart. ex Benth.) Harley, *Hyptidendron* Harley, *Hyptis* Jacq., *Marsypianthes* Mart. ex Benth., *Rhaphiodon* Schauer, *Leptohyptis* Harley & J.F.B. Pastore, *Medusantha* Harley & J.F.B. Pastore, *Mesosphaerum* Browne, *Martianthus* Harley & J.F.B. Pastore, *Oocephalus* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Physominthe* Harley & J.F.B. Pastore) (Pastore et al., 2011; Harley e Pastore, 2012).

Das 484 espécies de Lamiaceae nativas no Brasil, 69% são endêmicas. *Hyptis* Jacq., é o gênero com o maior número de espécies no Brasil, com 69,5% de endemismo (Harley, 2012). Dentre os novos gêneros segregados de *Hyptis*, destacamos *Eplingiella*, que possui apenas três espécies atualmente descritas, *E. fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *E. cuniloides* (Epling.) Harley & J.F.B. Pastore e *E. brightoniae* Harley, provenientes de áreas semiáridas de areias secas do Nordeste do Brasil (Figura 01). A primeira com ampla ocorrência na região, a segunda endêmica das elevadas montanhas de Morro do Chapéu, Bahia, e a terceira com ocorrência restrita a campos rupestres na Serra do curral frio, entre os municípios de Umburanas e Sento Sé, ambas cidades da Bahia (Harley e Pastore, 2012).

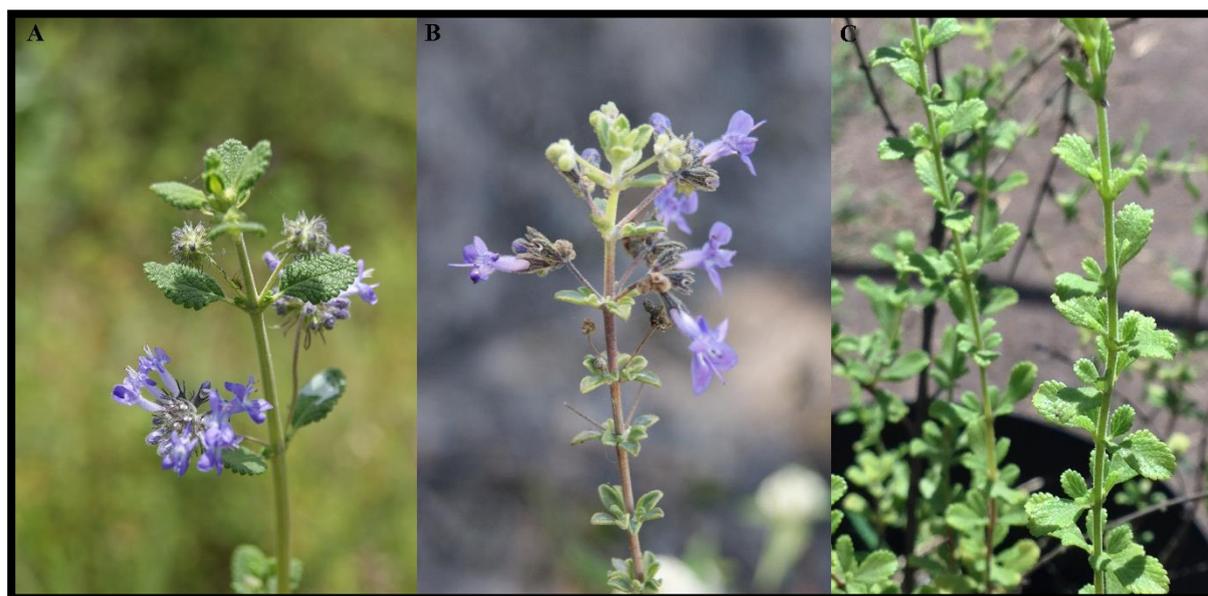


Figura 01. Detalhes das espécies de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore: A - *E. fruticosa*; B - *E. cuniloides*; C - *E. brightoniae*. Feira de Santana, BA, 2015.

O gênero *Eplingiella* é caracterizado por seu hábito arbustivo, com folhas pequenas xeromórficas. As flores (2-18) estão dispostas em inflorescência cimosa pedunculada, subtendido por brácteas semelhantes às folhas, flores com pedicelo curto, com pequenas e imperceptíveis bractéolas pouco lineares. Apresenta corola característica, com lobos

espalhados, de cor azul a azul-violeta. Caracteriza-se por possuir cálice de frutificação variável, sendo os de *E. cuniloides* e *E. brightoniae* actinomórficos, com lobos curtos e com tricomas brancos densos na garganta e *E. fruticosa* zigomórfico, com meio-tubo fortemente curvado e lóbulos subulados, não clavados e túbulo glabro. O gineceu é desprovido de estilopódio, possui estilete capitado ou com lobos estigmáticos muito curtos. Semente estreita elipsóide, castanho-escuro, fortemente mucilaginoso quando molhado (Harley e Pastore, 2012).

As espécies de *Eplingiella*, exceto *E. brightoniae*, foram originalmente incluídas por Epling (1936) em *Hyptis*, secção *Umbellaria*, em conjunto com um grupo de outras espécies, posteriormente transferidas para *Hyptidendron* secção *Umbellaria* (Harley, 1988) e caracteriza-se pela posse de um estilopódio bem desenvolvido. Na falta desta característica, as duas espécies, *E. fruticosa* e *E. cuniloides*, permaneceram sem classificação por muitos anos, pois elas não pareciam se encaixar em nenhuma das secções de *Hyptis* reconhecidas até aquele momento. A análise molecular, apresentada por Pastore et al. (2011), mostrou que eles formam um clado distinto o que justificou o seu reconhecimento a nível genérico. O gênero é nomeado em homenagem a Carl Epling, cuja contribuição no estudo das Lamiaceae do novo mundo é imensa (Harley e Pastore, 2012).

2.2. Conservação de Recursos Genéticos

Existem no mundo cerca de 250 mil espécies vegetais identificadas e catalogadas e, destas, 30 mil são comestíveis, mas apenas sete mil são cultivadas ou coletadas pelo homem para a sua alimentação, vestuário, moradia e saúde. Afirma-se também que apenas 30 espécies constituem hoje a base da alimentação humana (Goedert, 2007).

O Brasil, com 32.831 espécies de Angiospermas, é detentor da maior biodiversidade do planeta (20 a 25%) (Forzza et al., 2015). Ainda assim, o país é dependente da importação de recursos genéticos vegetais (RGV) de uso direto na alimentação, e continuará importando ao longo de décadas, pois essa é uma forma alternativa de ampliar a base genética dessas culturas no país (Goedert, 2007). Porém, mais preocupante que isso é a perda da biodiversidade autóctone, que muitas vezes não chegamos a alcançar. Ecossistemas naturais representam uma fonte de recursos genéticos, fontes potenciais de produtos de valor econômico, no entanto, grande parte desses recursos está sendo destruídos antes do conhecimento de suas potencialidades (Plucknett e Horne, 1992).

Os recursos genéticos são constituídos pela variabilidade genética organizada em um conjunto de propágulos diferentes, denominados germoplasma. Cada unidade de germoplasma está formada pelo material genético dos organismos vivos de interesse atual ou potencial. Consequentemente, o germoplasma é o elemento dos recursos genéticos que é manejado e utilizado na pesquisa em geral, especialmente em programas de melhoramento genético. Assim, os recursos genéticos compreendem a diversidade do material genético contido nas variedades primitivas, obsoletas, tradicionais, modernas, parentes silvestres das espécies alvo, espécies silvestres ou linhas primitivas que podem ser usadas no presente ou no futuro, na alimentação, produção de fibras, de medicamentos e outros fins (Guedes et al., 1998).

O estudo dos recursos genéticos é uma atividade predominantemente interdisciplinar e compreende a coleta ou introdução do germoplasma de interesse; a multiplicação desse material (propagação), permitindo uma avaliação preliminar; a caracterização, que pode ser morfológica, bioquímica ou molecular e, por fim, uma avaliação aprofundada na qual se estudam os caracteres agronômicos de resistência e rusticidade (Queiróz, 2005). Além disso, esse estudo requer documentação, conservação e utilização do germoplasma com finalidade de aplicação em algum setor da sociedade (Nass, 2007).

As discussões acerca da conservação de recursos genéticos vêm sendo travadas desde a década de 60, quando a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) passou a tratar de ações relativas à erosão genética e a conservação de espécies como urgentes e essenciais à manutenção do homem. A partir de 1972, durante a conferência de Estolcomo, medidas para cessar o desmatamento e avanço da perda genética passaram a fazer parte de um plano estratégico mundial. Vinte anos mais tarde, a Conferência das Nações Unidas do Meio Ambiente e Desenvolvimento (Unced) reconheceu a importância dos RGV's, tendo atualmente a adesão de mais de 175 países. Nessa conferência foram estabelecidos três objetivos principais: conservação da diversidade biológica, uso sustentável dos recursos e divisão justa e equitativa advindos deste uso. A partir disso, determinou-se que cada país seria soberano no cuidado de seus RGV's (Unced, 1992).

No Brasil, ações paralelas haviam sido iniciadas na década de 70, com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN; 1974), que assumiu o papel de coordenar e realizar, de forma objetiva e programada, as atividades de intercâmbio, coleta, avaliação, caracterização, conservação, documentação e informação de recursos genéticos, abrangendo espécies vegetais autóctones e exóticas (Goedert, 2007). Contudo, após a Unced (1992), o Cenargen passou a investir em ações efetivas de conservação em longo prazo. O

sistema implantado destaca-se mundialmente, não só pela forma organizada com que faz a conservação *ex situ* mas, principalmente, por estar associado a uma Rede Nacional de Recursos Genéticos (Renargen) (Goedert, 2007; Wetzel e Ferreira, 2007). As ações do Renargen estão contidas atualmente em 11 Projetos Componentes que são desenvolvidos de forma coordenada em 29 unidades descentralizadas da Embrapa, em estreita cooperação com 70 parceiros de outras instituições, reunidos por 517 pesquisadores, 292 deles com doutorado e 177 com mestrado (Wetzel e Ferreira, 2007).

Ainda assim, mesmo com todo o investimento em discussões e planos de ação em prol da conservação dos recursos genéticos no país, estudos apontam a necessidade de ampliação dessas ações, visando conservar ecossistemas renegados pela ciência, como a Caatinga no semiárido nordestino (Siqueira-Filho, 2012). A região do semiárido no nordeste brasileiro foi definida como uma das regiões-alvo na realização de coleta de germoplasma. Essa região sofre fortes pressões causadas pela exploração dos recursos naturais, que vem descaracterizando a vegetação natural sem que as perdas em termos de recursos genéticos tenham sido dimensionadas (Cavalcanti et al., 2006). Tal situação é extremamente preocupante, pois o bioma caatinga é riquíssimo em flora (Barbosa et al., 2006) e fisionomias vegetacionais (IBGE, 2012).

A busca por conservação nessa região é contínua por parte dos pesquisadores e conhecedores da sua vasta biota, sendo emergenciais as medidas para conservar os seus recursos genéticos. Contudo, o investimento, em sua maioria, é delegado á proteção de plantas *in situ*, devido à necessidade urgente de proteger os ecossistemas, em face às mudanças iminentes (Cohen et al., 1991). Coleções e inventários herborizados são elaborados a fim de garantir inicialmente o conhecimento da biodiversidade local e, posteriormente, a tomada de medidas legais que garantam a proteção integral desses ecossistemas. Porém, observa-se certa descontinuidade no ímpeto preservacionista dessas medidas, e logo o que deveria ser mantido livre de ações degradantes passa a sofrer o impacto dissimulado e sorrateiro de quem necessita dos recursos, mas não foi devidamente sensibilizado na sustentabilidade. Esse tipo de impacto, que leva a perdas genéticas consideráveis, pode ser minimizado pelo uso da conservação *ex situ*, que neste sentido visa garantir a existência do germoplasma fora do seu ambiente natural, permitindo a recuperação de ambientes degradados sem alterar sua biodiversidade (Plucknett e Horne, 1992).

Outro papel importante da conservação *ex situ* é a de salvaguardar recursos importantes para o uso atual ou futuro, contribuindo para no preenchimento de lacunas nos

setores de consumo na sociedade, seja ele industrial, alimentício ou medicinal, entre outros. O germoplasma conservado *ex situ* alimenta programas de melhoramento que buscam ampliar suas coleções e multiplicar os ganhos no desenvolvimento de genótipos adaptados às mais diversas condições climáticas desse país com dimensões continentais. Coleções *ex situ* podem fornecer informações preliminares importantes sobre o comportamento das espécies com relação a seu desenvolvimento quando cultivadas, o que traz consequências na definição da estratégia de conservação e cultivo da espécie (Plucknett e Horne, 1992).

De uma maneira geral, a conservação *ex situ* é efetuada nas seguintes modalidades: coleção de base, coleção ativa, coleção de trabalho, coleção a campo, coleção nuclear, coleção *in vitro*, criopreservação e coleção genômica. A forma de conservação deve variar para cada estratégia de conservação utilizada, o que é feito respeitando as estratégias reprodutivas de cada espécie. Banco de sementes tem sido a forma mais comum de conservação “*ex situ*”, caracterizando a unidade de propagação natural na maioria das angiospermas, no entanto, outras espécies vegetais necessitam de procedimentos de conservação alternativos. Este é o caso daquelas que não produzem sementes viáveis, sendo propagadas exclusivamente de forma vegetativa, sendo, portanto, mais apropriado o uso de outra estratégia de conservação, que não a semente, como as coleções *ex situ* e as coleções *in vitro* (Oliveira, 2008).

Com o enorme desenvolvimento da tecnologia, os recursos genéticos vêm adquirindo uma importância cada vez maior. No caso de plantas medicinais, estes recursos assumem importância estratégica, pois as graves deficiências do sistema de saúde oficial e a baixa renda da população, associadas aos conhecimentos acumulados pelas comunidades fazem com que grande parte da população utilize as plantas medicinais como recurso terapêutico (Scheffer et al., 1992)

Segundo Rhaman et al. (2004), as plantas medicinais representam importante componente da biodiversidade na manutenção da saúde e economia de um país, sendo essencial a realização de inventários completos da flora de todo o país na conservação e uso sustentável. Informações sobre o conhecimento tradicional ou de grupos étnicos de plantas medicinais e seus usos representam papel vital na descoberta de novos produtos a partir de plantas como agentes quimioterapêuticos (Barbosa-Filho et al, 2008). As plantas fazem parte integrante da cultura dessas pessoas e as informações sobre as mesmas é passada de geração em geração (Agra et al., 2008).

Segundo Scheffer et al. (2005), levantamentos apontam que, só no Brasil, os gastos com fitoterápicos teve crescimento em torno de 40% nos últimos 10 anos. Mas para atender

essa demanda crescente é necessário um fornecimento contínuo de plantas medicinais. Os autores comentam que embora o número de agricultores que cultiva essas plantas tenha crescido, ainda é insuficiente para atender a demanda, especialmente de plantas nativas. Isso provoca variação na qualidade e no preço da matéria-prima.

A falta de cultivo traz também grandes riscos ao meio ambiente. A diminuição das áreas de ocorrência natural das espécies – resultante da crescente expansão da fronteira agrícola, da malha urbana e rodoviária, de usinas, etc. – associada ao extrativismo predatório, tem colocado em processo de extinção muitas espécies vegetais nativas, entre as quais as medicinais. Mesmo quando as espécies são aparentemente abundantes, seu uso continuado deve basear-se em cultivos ou manejo em áreas de ocorrência natural, para garantir a quantidade e a qualidade das plantas medicinais de maneira sustentável. Para resolver todos esses problemas, a única solução satisfatória é a domesticação de espécies nativas, inserindo-as em processos produtivos (Plucknett e Horne, 1992).

A domesticação deve ser entendida como processo gradual, que tem por fim incorporar a planta silvestre (recurso genético) ao acervo de plantas disponíveis no uso e consumo pelo homem. Esse processo passa por três etapas principais: inicialmente há um consumo baseado no conhecimento popular; a partir daí o uso se expande e, conseqüentemente, a demanda também, tornando-se necessário então preservar e propagar o recurso; por fim segue-se a implantação de plantios sistematizados. A evolução do processo é baseada no acúmulo de informações e no aumento na demanda e/ou valor econômico do produto (Scheffer et al., 2005).

Contudo, um dos principais objetivos nesse processo é assegurar a preservação da base genética, entendida como o total da variação genética presente em uma população. Em princípio, quanto maior for a amplitude da variação genética maior será a capacidade da população fazer frente a flutuações ambientais, em benefício de sua perpetuação, sendo necessária a ampliação do conhecimento sobre a espécie desde a sua morfologia até a composição química e genética de suas populações; a conservação na forma *ex situ* cumpre bem esse papel (Glaszmann et al., 2010).

A conservação das espécies medicinais, “definidas como plantas que possuem substâncias ativas, oriundas do metabolismo secundário, que lhe conferem uma ação terapêutica”, leva em consideração não apenas a conservação do material genético, como também do conhecimento tradicional inerente. Scheffer et al. (1992) citam que embora a metodologia de trabalho na conservação de recursos genéticos de plantas medicinais não seja

diferente daquela utilizada para as demais culturas, há fatores “*sui generis*” que devem ser levados em consideração.

O número de instituições que têm atividades vinculadas à conservação de germoplasma de plantas medicinais é inversamente proporcional à riqueza da biodiversidade do País. Em 1992 foram relacionadas somente seis instituições, sendo apenas duas na região Nordeste, com coleções de germoplasma de plantas medicinais, onde eram mantidos 855 acessos (Scheffer et al., 1992). Um levantamento realizado por Ramos et al. (2008) identificou a existência de 115 coleções de germoplasma no Nordeste do país, abrangendo 233 espécies vegetais, totalizando mais de 28 mil acessos, contudo, as espécies ornamentais e medicinais aromáticas corresponderem, conjuntamente, a menos de 3% do número total de acessos conservados. Estas espécies medicinais constituem alternativas promissoras na pesquisa, inovação e fortalecimento do agronegócio da região Nordeste, desde que sejam desenvolvidas atividades de manejo dos acessos, considerando os vários biomas existentes na região. Esse quadro indica a necessidade de implantação de Bancos Ativos de Germoplasma e/ou Coleções de Plantas Medicinais no Brasil, inclusive no estado da Bahia, aonde iniciativas vêm sendo ampliadas em Universidades e Institutos de Pesquisa (Queiroz, 2005).

2.3. Caracterização de Recursos Genéticos

A caracterização é uma atividade essencial no manejo de coleções de germoplasma *ex situ*, que consiste em tomar dados para descrever, identificar e diferenciar genótipos de uma mesma espécie. Esta se constitui em uma das fases mais importantes de programas de melhoramento genético visto que, a seleção de genótipos com características desejadas e o conhecimento do germoplasma disponível são essenciais na conservação e melhoramento das espécies (Oliveira, 2008)

O *Bioversity International* define o processo de caracterização de germoplasma como o estabelecimento de características consideradas ambientalmente estáveis, altamente herdáveis, qualitativas ou quantitativas, mono ou oligogênicas e facilmente manipuláveis no melhoramento genético, podendo ser morfológicas, fenológicas, reprodutivas, bioquímicas, citogenéticas e moleculares. Diferente da avaliação, que se define como uma caracterização exclusivamente quantitativa com forte influência ambiental, dirigida por poucos ou muitos genes, não facilmente manipulável e útil no processo de melhoramento dos cultivos (Ramos et al., 2007).

Apesar de existir essa diferenciação prática entre os processos de caracterização e avaliação, determinada pelo *Bioversity International*, nota-se nos trabalhos analisados que o termo “caracterização” tem sido usado para definir os dois processos. Do mesmo modo, Ramos et al. (2007), apontam que alguns autores, como Hawkes (1982) e Chapman (1989), não estabelecem uma distinção clara entre caracterização e avaliação. Contudo, nesse estudo, tratamos de caracterização como um meio de ampliar o conhecimento acerca do germoplasma e da variabilidade, dentro da distribuição de ocorrência populacional de uma espécie, por meio do estabelecimento de descritores fidedignamente reproduzíveis.

2.3.1. Caracterização morfológica e agrônômica

O processo de conservação de recursos genéticos, bem como, o de domesticação de plantas requer prévio conhecimento de características relacionadas à espécie envolvida. Não há distinção desse processo em relação às plantas medicinais. O conhecimento das características morfológicas das espécies é importante, notoriamente porque oferece condições no entendimento de adaptações ocorridas pela pressão ambiental, de transformações que se verificaram em termos de estruturas secretoras e produtoras de princípios ativos e de diferentes características das diversas partes das plantas que irão subsidiar posteriormente algumas estratégias de cultivo (Scheffer et al., 2005). Por isso, a caracterização morfológica é a primeira a ser realizada no germoplasma depois que ele é incorporado às coleções. É realizada com base em observações ou mensurações de vários caracteres facilmente diferenciáveis, denominados de descritores morfológicos, sendo estes caracteres altamente herdáveis, normalmente controlados por poucos genes, que se expressam igualmente em todos os ambientes (Burle e Oliveira, 2010).

De acordo com Oliveira (2008) a caracterização morfo-agronômica busca descrever os diversos acessos de uma coleção de germoplasma utilizando como descritores características de interesses, tais como: a cor do caule, folhas, nervuras foliares, sépalas e pétalas das flores, início de floração, altura de planta, largura e formato da copa, comprimento e largura das lâminas foliares, relação comprimento/largura, produção de frutos/planta, produção de plantas/Ha, produção de óleo/Ha, entre outros.

Essa caracterização deve permitir a discriminação facilitada entre fenótipos e fornecer as primeiras estimativas de variabilidade dentro da coleção de germoplasma (Burle e Oliveira, 2010). Por esta razão, o estabelecimento de descritores pode variar entre diferentes espécies,

contudo, há uma forte tendência a existir congruência de descritores entre espécies de um mesmo gênero, ou até mesmo, família. Sendo assim, é comum a consulta às listas de descritores disponibilizadas por meio de publicações em periódicos, ou, principalmente, no portal do *Biodiversity international*. O número de descritores também deve variar, sendo assim há de se estabelecer características que representem alta confiabilidade, de preferência que não se sobreponham e que possam ser facilmente reproduzidas na espécie analisada.

São comuns trabalhos envolvendo caracterização morfológica e agrônômica de espécies medicinais nativas e cultivadas, visando à seleção de genótipos promissores em programas de melhoramento. Boa parte desses estudos foi realizada com espécies da família Lamiaceae, entre estas podemos citar, o manjeriço (*Ocimum* sp.), alfavaca (*Ocimum* sp.), sambacaitá (*Mesosphaerum pectinatum* (L.) Kuntze), Pachouli (*Pogostemon cablin* L.), *Salvia* sp., Oregano (*Origanum* sp.), entre outros. Os descritores utilizados para essas espécies, apesar de bastante variáveis, merecem destaque, sobretudo aqueles que abrangem os diversos aspectos do germoplasma, facilitando a distinção entre genótipos. Sendo assim, a consulta a literatura permitiu elencar os principais descritores morfológicos e agrônômicos adotados na família, que podem ser separados em qualitativos, como: cor de folha, caule, ramos e flores; período de floração; formato de copa, tipo de folha, formato do limbo e da margem foliar, tipo de nervura, tipo de inflorescência; e quantitativos, como: altura de planta, largura, comprimento entrenós, comprimento e largura de folhas, área foliar, número de ramos, número de flores por inflorescência, comprimento e largura da inflorescência, das flores, além de características agrônômicas como massa fresca e seca de folhas e caule, rendimento e teor de óleo essencial (Agarwal et al., 2013; Arrigoni-Blank et al., 2005; Blank et al., 2004; Ibrahim et al., 2012; Mossi et al., 2011; Shirsat et al., 2012; Svecová e Neugebauerová, 2010; Wu et al., 2011).

2.3.2. Caracterização fitoquímica

O Brasil é detentor da maior biodiversidade vegetal do planeta, com cerca de 20% das plantas existentes no mundo. Em contrapartida, apenas 8% destas espécies vegetais foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 foram avaliadas em suas propriedades medicinais (Heinzmann e Barros, 2007).

Dos vegetais são extraídas várias substâncias químicas, e grande parte delas são aplicadas na alimentação e na saúde. Isto tem sido estímulo ao desenvolvimento de estudo de muitas plantas, dentro do âmbito da química orgânica, objetivando a compreensão das

estruturas e ações destes compostos que é extremamente ampla e diversificada. Esse tipo de pesquisa tem por objetivos conhecer as moléculas constituintes dos organismos ou avaliar sua presença nos mesmos. Quando não se dispõe de estudos a este nível, sobre o objeto de estudo, a análise fitoquímica pode identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes (Silva et al., 2010). Essa caracterização pode ser feita a partir da extração e análise de compostos, sejam eles voláteis ou fixos, por meio de diferentes técnicas de extração.

Muitas plantas medicinais são aromáticas, comportando assim, estruturas especializadas na produção e armazenamento de metabólitos secundários em forma de óleo essencial. Óleos essenciais são compostos complexos, voláteis e naturais, caracterizados pelo seu forte cheiro e são formados por metabólitos secundários. Geralmente são extraídos pelo método da destilação a vapor ou hidrodestilação (Bakkali et al., 2008). Segundo Bizzo et al. (2009), também podem ser extraídos através da técnica prensagem, no caso do pericarpo de frutos cítricos, que no Brasil dominam o mercado de exportação. São compostos principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas.

Na natureza, os óleos essenciais desempenham papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo seu apetite por essas plantas. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de sementes e pólenes ou repelir outros (Bakkali et al., 2008). Eles podem ser sintetizados por todos os órgãos vegetais (Bakkali et al., 2008; Bizzo et al., 2009), e são armazenados em células secretoras, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Bakkali et al., 2008).

Os óleos essenciais são matéria-prima de grande importância na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. A demanda por óleos essenciais está em franca ascensão na indústria farmacêutica, visando produzir medicamentos, nas indústrias alimentícias, para conferir sabor aos alimentos, nas indústrias químicas, como aromatizantes e na indústria cosmética, para a composição de perfumes, assim como no setor agrícola no controle alternativo de pragas e doenças (Costa, 2008; Monteiro, 2009). Eles possuem características físico-químicas como: aparência oleosa a temperatura ambiente; volatilidade; aroma agradável; solubilidade em solventes orgânicos apolares; geralmente incolores ou ligeiramente amarelados; não são estáveis em presença de luz, ar, calor, umidade e metais; e algumas destas propriedades são usadas na identificação e controle da qualidade dos óleos essenciais (Simões e Spitzer, 2003).

A produção de óleos essenciais nos vegetais é determinada geneticamente, e outros fatores podem acarretar alterações na produção dos metabolitos secundários, os quais representam interface química entre as plantas e o ambiente. Estímulos decorrentes do ambiente no qual a planta se encontra podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos (Morais, 2009). Por isso, a composição química de espécies medicinais é o foco do interesse econômico por esses vegetais, sendo assim, é com base nessa valoração que se justifica a caracterização bioquímica das populações em um banco de germoplasma. A partir dessa informação é possível identificar o potencial exato das espécies e a variabilidade expressa no perfil de compostos presentes no seu óleo essencial ou extrato.

Além disso, esse tipo de pesquisa também pode fornecer informações acerca de grupos taxonômicos, a depender das classes de metabólitos encontradas quanto da identificação dos compostos. Ou até definir populações como grupos distintos dentro do espectro específico; tais grupos são denominados quimiotipos, e são definidos pela diferença na composição química, tanto a nível qualitativo quanto quantitativo dos compostos (Bizzo et al., 2009). Devido a tal importância, o número de estudos que prospectam a composição de vegetais aromáticos é crescente, sobretudo em espécies nativas, sendo determinante na conservação do seu germoplasma.

2.3.3. Caracterização Molecular

Diversidade genética é o número total de características no conjunto genético de uma espécie ou população. A análise da diversidade genética torna possível selecionar genótipos de interesse na conservação adicional em bancos de germoplasma, com vista a preservar a variabilidade presente em populações naturais e a desaceleração do ritmo de erosão genética (Bertoni et al., 2010).

O desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas tem facilitado a análise dos caracteres genéticos de uma espécie em condições ambientais variadas (Zhang et al., 2010). Nesse tipo de estudo são utilizados marcadores moleculares, que tem a função de detectar polimorfismo genético diretamente no DNA. O princípio da utilização de marcadores moleculares é baseado no dogma da biologia molecular que pressupõe que diferenças impressas no DNA correspondem a diferenças fenotípicas. Entre as principais vantagens dos marcadores moleculares podemos elencar a obtenção do genótipo sem influência do ambiente e a

possibilidade de identificação do polimorfismo em qualquer fase do desenvolvimento (Faleiro, 2007).

As diferentes metodologias da genética molecular têm permitindo estudos de evolução, de diversidade genética inter e intra-específica, de identidade, origem genética e identificação de novas variantes, gerando informações importantes para subsidiar diferentes ações de pesquisa, desde a coleta até o uso dos recursos genéticos em programas de melhoramento. Com os avanços nessa área da biologia, principalmente a tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia de polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA, foram desenvolvidos marcadores moleculares úteis na identificação, caracterização e avaliação de RGV (Faleiro, 2007).

O uso dos diferentes tipos de marcadores moleculares vai depender principalmente do objetivo que se pretende. Existe um grande número de técnicas/marcadores que podem ser utilizados, estes são distinguidos em dois tipos básicos, de acordo com as suas características: dominantes ou co-dominantes. A diferença entre eles é o número de fitas que codifica cada um, sendo que no primeiro apenas uma fita de DNA é utilizada (Bertoni et al., 2010).

Os principais marcadores dominantes utilizados na análise de diversidade genética em bancos de germoplasma são RAPD (Random amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), porém, o uso de ISSR tem se expandido por causa das vantagens que apresentam em relação aos demais, a saber: maior confiabilidade e reprodutibilidade dos padrões de bandas e menor custo das análises (Djè et al., 2010; Jia et al., 2011; Rodrigues et al., 2013). Esses marcadores também são muito utilizados na delimitação de espécies (Hausdorf e Hennig, 2010).

Como todo marcador dominante, ISSR's são bialélicos, pois suas bandas demonstram o estado de presença ou ausência de um caráter. Consequentemente, heterozigotos não são distinguíveis de um homozigoto dominante individual, o qual prevê uma estimativa direta (Kothera et al., 2007). Sendo assim, ISSR é uma ferramenta poderosa no estudo da filogenia, estruturas de genética de população e mapeamento genético (Yiping et al., 2011).

O uso recente de ISSRs tem sido extensivo em estudos de genética de populações, com larga aplicação em análises de diversidade genética de espécies com problemas de conservação (Wang et al., 2012; Svodobová et al., 2013), sobretudo em espécies de Lamiaceae (Liu et al., 2006; Agostini et al., 2010; Ali et al., 2012; Javan et al., 2012; Rodrigues et al., 2013).

As principais contribuições desses estudos são a ampliação do conhecimento da variabilidade ligada à distribuição geográfica de Lamiaceae nativas, como *Cunila menthoides*

Benth. (Agostini et al., 2010) e *Thymus caespititius* Brot. (Trindade et al., 2009), na mensuração da diversidade existente dentro e entre táxons, possibilitando também o reconhecimento da estrutura populacional destes atrelados a informações ambientais do habitat, o que pode gerar melhor posicionamento quanto as formas de conservação daquela espécie ou grupo, como no caso das Lamiaceae *C. menthoides*, *Mentha cervina* L., *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. e *T. capitatus* Hoffm. (Agostini et al., 2010; Ali et al., 2012; Rodrigues et al., 2013).

2.4. Referências

AGARWAL, C.; SHARMA, N. L.; GAURAV, S. S. An analysis of Basil (*Ocimum* sp.) to estudy morphological variability. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 3, p. 521–525, 2013.

AGOSTINI, G.; ECHEVERRIGARAY, S.; SOUZA-CHIES, T. T. Genetic diversity of the endangered Brazilian endemic herb *Cunila menthoides* Benth. (Lamiaceae) and its implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1111–1115, 2010.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

ALI, I. B. E. H.; GUETAT, A.; BOUSSAID, M. Genetic diversity, population structure and relationships of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. and *Thymus capitatus* Hoffm. et Link. assessed by isozymes. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p. 149–163, 2012.

ANDRADE, A. M.; et al. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 962–968, 2010.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; et al. Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 298-303, 2005.

BAKKALI, F.; et al. Biological effects of essential oils. A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 26, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, M. R. V.; et al. (ORG) **Checklist das plantas do nordeste brasileiro: angiospermas e gymnospermas**. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, 2006. 156 p.

BARBOSA-FILHO, J. M.; et al. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 135-154, 2008.

BERTONI, B. W.; et al. Genetic diversity among natural populations of *Mandevilla velutina*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 209-213. 2010.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.

BLANK, A. F.; et al. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjerição e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 113-116, 2004.

BURLE, M. L.; OLIVEIRA, M. S. P. Manual de curadores de germoplasma - vegetal: caracterização morfológica. (Documentos/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 378). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 15 p.

CAVALCANTI, T. B.; et al. **Coleta e conservação *ex situ* de recursos genéticos do semi-árido brasileiro**. In: GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L.P. Recursos genéticos do semi-árido nordestino. Recife: Instituto do Milênio do Semi-árido. v. 5, 2006. p. 111-125.

CHAPMAN, C. **Principles of germplasm evaluation**. In: STALKER, H. T.; CHAPMAN, C. (Ed.) Scientific management of germplasm, characterization, evolution, evaluation and enhancemet. Roma: International Board for Plant Genetic Resource, 1989.

COHEN, J. I.; et al. Ex Situ conservation of Plant Genetic Resources: Global Development and Environmental Concerns. **Science**, v. 253, p. 866 – 872, 1991.

COSTA, L. C. B. **Condições culturais, anatômicas foliar, processamento e armazenamento de *Ocimum selloi* L. em relação ao óleo essencial.** 2008. 161 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

DJÈ, Y.; et al. Use of ISSR markers to assess genetic diversity of African edible seeded *Citrullus lanatus* landraces. **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 159-164, 2010.

DUFFY, K. J.; et al. Ecology and genetic diversity of the dense-flowered orchid, *Neotinia maculata*, at the centre and edge of its range. **Annals of Botany**, v. 104, p. 507 –516, 2009.

EPLING, C.C. Synopsis of the South American Labiatae. Feddes **Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis**, n. 85, p. 1–341, 1936.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FORZZA, R.C. et al. **Angiospermas in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128482>>. Acesso em: 23 Jul. 2015

FRANCO, C. M.; et al. Bioassay-guided Evaluation of Antinociceptive Properties and Chemical Variability of the Essential Oil of *Hyptis fruticosa*. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1693 – 1699, 2011a.

FRANCO, C. M.; et al. Essential oil composition and variability in *Hyptis fruticosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 24 – 32, 2011b.

GLASZMANN, J. C.; KILIAN, B.; UPADHYAYA, H. D.; VARSHNEY, R. K. Accessing genetic diversity for crop improvement. **Current opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 1 – 7, 2010.

GOEDERT, C. O. **Histórico e avanços em recursos genéticos no Brasil**. In: NASS, L. L. (ed.). Recursos genéticos vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 23-59. 2007.

GUEDES, A.; GOEDERT, C.O.; BUSTAMANTE, P.G. **Conservação *ex situ***. Relatório do grupo de trabalho temático 3: Artigo 9 sobre a Convenção de Diversidade Biológica. Brasília: Coordenação Nacional de Diversidade Biológica (Cobio) do Ministério do Meio Ambiente. Estratégia Nacional de Diversidade Biológica, 1998.

HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 129-144, 2012.

HARLEY, R. M. *Eplingiella brightoniae*, a new species of Hyptidinae (Lamiaceae: Ocimeae) from Northerbn Bahia, Brazil, **Kew Bulletin**, v. 69, n. 4, 2014.

HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**, v. 58, p. 1-55, 2012.

HARLEY, R.M. Revision of generic limits in *Hyptis* Jacq. (Labiatae) and its allies. **Botanical Journal of Linnean Society**, v. 98, p. 87–95, 1988.

HARLEY, R.M.; et al. **Labiatae**. In: J.W. Kadereit (ed.). The families and genera of vascular plants. Vol. 7. Nova York: Springer Verlag, 2004. p. 167-275.

HARLEY, R.M.; et al. **Lamiaceae**. In R.C. FORZZA et al. (orgs.) Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Vol. 2. Andrea Jakobsson Estúdio, Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 1130-1146.

HAWKES, J. G. **Germplasm collection, preservation, and use**. In: FREY, K. J., (ed.) Plant Breeding II. Ludhiana: Kaliaany Publishers, 1982. p. 57-83.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Saúde**, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2007.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual da Vegetação Brasileira**. 2ª ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. 275 p.

IBRAHIM, R.; et al. Evaluation of agro-morphological characters and oil percentage of *Origanum syriacum* L. and *Origanum majorana* L. at three dates of initial cutting. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 8, n. 1, 2012.

JAVAN, Z. S.; RAHMANI, F.; HEIDARI, R. Assessment of genetic variation of genus *Salvia* by RAPD and ISSR markers. **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 6, p. 1068-1073, 2012.

JIA, X.; WANG, T.; ZHAI, M.; LI, Y.; GUO, Z. Genetic Diversity and Identification of Chinese-Grown Pecan Using ISSR and SSR Markers. **Molecules**, v. 16, p. 10078-10092, 2011.

KARIMI, N.; et al. A. An arsenic-accumulating, hypertolerant brassica, *Isatis cappadocica*. **New phytologist**, v. 184, p. 41 – 47, 2009.

KOTHERA, L.; RICHARDS, C. M.; CARNEY, S. E. Genetic diversity and structure in the rare Colorado endemic plant *Physaria bellii* Mulligan (Brassicaceae). **Conservation Genetics**, v. 8, p. 1043–1050, 2007.

LIMA, A. C. B.; et al. Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* Salmz ex Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 192 – 197, 2013.

LIU, J.; et al. Genetic diversity and population structure of *Lamiophlomis rotata* (Lamiaceae), an endemic species of Qinghai–Tibet Plateau. **Genetica**, v. 128, p. 385–394, 2006.

MENEZES, I. A. C.; et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. **Fitoterapia**, v. 78, p. 192–195, 2007.

MONTEIRO, R. **Desenvolvimento de menta e produção de óleo essencial sob diferentes condições de manejo**. 2009. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), UFPR, Curitiba/PR.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 4050-4063, 2009.

MOREIRA, I. J. A.; et al. Vasorelaxant effect of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae, dichloromethane extract on rat mesenteric artery. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 762 – 766, 2010.

MOSSI, A. J.; et al. Efeito da concentração de alumínio sobre o crescimento e produção de metabolitos secundários em três quimiotipos da planta medicinal *Cunila galioides* Benth. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 4, p. 1003-1009, 2011.

NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858 p.

OLIVEIRA, T. C. **Caracterização e comportamento de acessos de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) mantidos em banco ativo de germoplasma em São Cristóvão – SE**. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). UFS, São Cristóvão/SE.

PASTORE, J. F. B.; et al. Phylogeny of the subtribe Hyptidinae (Lamiaceae tribe Ocimeae) as inferred from nuclear and plastid DNA. **Taxon**, v. 60, n. 5, p. 1317–1329, 2011.

PIRES, M. J. P. Aspectos históricos dos recursos genéticos de plantas medicinais. **Rodriguésia**, v. 36, n. 59, p. 61 – 66, 1984.

PLUCKNETT, D. L.; HORNE, M. E. Conservation of Genetic Resources. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 42, p. 75 – 92, 1992.

QUEIROZ, M. A. **Importância dos Recursos Genéticos para o Estado da Bahia**. In: ROMÃO, R. L.; RAMOS, S. R. R. (Eds.) Recursos Genéticos Vegetais no Estado da Bahia. Feira de Santana: UEFS, 2005. 231 p.

RAHMAN, M. A.; et al. Medicinal plant diversity in the flora of Saudi Arabia 1: a report on seven plant families. **Fitoterapia**, v. 75, p. 149–161, 2004.

RAMOS, S. R. R.; QUEIROZ, M. A. de; PEREIRA, T. N. S. Recursos genéticos vegetais: manejo e uso. **Magistra**, v. 19, n. 4, p. 265-273. 2007.

RAMOS, S. R. R.; QUEIROZ, M. A.; ROMÃO, R. L.; SILVA-JUNIOR, J. F. Germoplasma vegetal conservado no Nordeste Brasileiro: situação atual, prioridades e perspectivas. **Magistra**, v. 20, n. 3, p. 205-217, 2008.

RODRIGUES, L.; VAN DEN BERG, C.; PÓVOA, O.; MONTEIRO, A. Low genetic diversity and significant structuring in the endangered *Mentha cervina* populations and its implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 51–61, 2013.

SANTOS, M. R. V.; et al. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 186 – 191, 2007.

SCHEFFER, M. C. Roteiro para estudo de aspectos agronômicos das plantas medicinais selecionadas pela fitoterapia do SUS-PR/CEMEPAR. **SOB Informa**, v. 11, p. 29-31, 1992.

SCHEFFER, M. C.; CORRÊA, J. R. C.; RADOMSKI, M. I. Domesticação de plantas medicinais: a experiência da "Espinheira-Santa" (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss). **Agrociencia**, v. 9, n. 1, p. 53 – 60, 2005.

SHIRSAT, R.; KOKATE, P.; SURDAKAR, S. Morphological and anatomical characterization of *Salvia plebeia* from Maharashtra (India). **Bioscience Discovery**, v. 3, n. 2, p. 165-168, 2012.

SILVA, A. B. L.; et al. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salzm. Ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 475 – 479, 2006.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO G. M. da. Triagem fitoquímica de Plantas do Cerrado da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos Voláteis**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. cap. 18, p. 467-495.

SIQUEIRA-FILHO, J. A. **A flora das Caatingas do Rio São Francisco: História natural e conservação**. v. 1. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio Editorial, 2012. 542 p.

SVECOVÁ, E.; NEUGEBAUEROVÁ, J. A study of 34 cultivars of basil (*Ocimum* L.) and their morphological, economic and biochemical characteristics, using standardized descriptors. **Acta Universitatis Sapientiae**, v. 3, p. 118–135, 2010.

SVODOBOVÁ, E.; et al. Genetic diversity of yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson) and its wild relatives as revealed by ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 383–389, 2013.

THORNE, R. F. Classification and geography of the flowering plants. **The Botanical Review**, v. 58, n. 3, p. 225 – 327, 1992.

TRINDADE, H.; et al. A combined approach using RAPD, ISSR and volatile analysis for the characterization of *Thymus caespititius* from Flores, Corvo and Graciosa islands (Azores, Portugal). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 670–677, 2009.

UNCED, Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento. **AGENDA 21** - Plano de Ação Global para o Meio Ambiente, Rio de Janeiro: UNCED, 1992.

WANG H.; et al. Genetic diversity and relationship of global faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm revealed by ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 124, p 789–797, 2012.

WETZEL, M. M. V. S.; FERREIRA, F. R. **Sistema de curadorias de germoplasma**. In: NASS, L. L. Recursos Genéticos Vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2007. 858 p.

WU, L.; et al. Comparison of genetic diversity in *Pogostemon cablin* from China revealed by RAPD, morphological and chemical analyses. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 18, p. 4549-4559, 2011.

YIPING, Y.; GAO, T.; MIAO, K. Genetic differentiation of Japanese sardinella (*Sardinella zunasi*) populations in the Northwest Pacific revealed by ISSR analysis. **Journal of Ocean University of China**, v. 10, n. 4, p. 417 – 424, 2011.

ZHANG, J.; XU, B.; LI, M. Genetic diversity of populations of an endangered medicinal plant species (*Glycyrrhiza uralensis*) in different environments of North China. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 830-836, 2010.

3. CAPÍTULO I

**Composição de substrato e uso de ácido indolbutírico na estaquia de
“alecrim-de-vaqueiro”**

Composição de substrato e uso de ácido indolbutírico na estaquia de “alecrim-de-vaqueiro”¹

²Anderson de Carvalho Silva, ³Aritana Alves da Silva e ⁴Lenaldo Muniz de Oliveira

RESUMO - Esse estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes substratos e do ácido indolbutírico (AIB) sobre a estaquia de “alecrim de vaqueiro” (*Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B.Pastore), visando identificar praticas mais eficazes em sua propagação. Estacas apicais foram colhidas de plantas matrizes e padronizadas em 10 cm, com dois pares de folhas. Foram conduzidos dois experimentos: o primeiro testou o efeito de três substratos (comercial, comercial + vermiculita e comercial + vermiculita + húmus) e o segundo avaliou cinco concentrações de AIB (0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g L⁻¹) e três períodos de cultivo (30, 45 e 60 dias). O delineamento foi em blocos casualizado, com quatro repetições. Avaliou-se percentagem de sobrevivência das estacas (%S), percentagem de estacas enraizadas (%EE), comprimento da raiz por estaca (CRE), número de brotações por estaca (NBE), massa seca de folhas (MSF), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST). No primeiro experimento foram verificadas diferenças significativas para CRE, NBE, MSF, MSR e MST, com melhor desempenho no substrato comercial. No segundo, não houve interação entre os fatores avaliados, contudo, foram identificados efeitos positivos tanto da adição de AIB quanto dos tempos de cultivo sobre as variáveis CRE, NBE, MSF e MSR, atingindo incremento máximo com a concentração estimada de 1,5 g L⁻¹, aos 60 dias de cultivo.

Palavras-chave: *Eplingiella fruticosa*, propagação vegetativa, plantas medicinais, *Hyptis*.

¹ Artigo aceito para publicação no periódico Ciência Rural;

² Doutorando do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPGRGV/UEFS);

³ Graduanda de Agronomia da UEFS;

⁴ Professor Titular do Departamento de Ciências Biológicas da UEFS;

Substrate composition and use of indolbutyric acid in cuttings of “alecrim de vaqueiro”

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the influence of substrate and indolbutyric acid (IBA) on rooting of "alecrim de vaqueiro" (*Eplingiella fruticosa* (Salzm. Ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore), to identify the most effective practices for spread. Apical cuttings were collected from mother plants and standardized at 10 cm, with two pairs of leaves. Two experiments were performed: the first tested the effect of three substrates (commercial, commercial vermiculite and commercial vermiculite and humus) and the second evaluated the use of five IBA concentrations (0, 1.0, 2.0, 3, 0 and 4.0 g L⁻¹), evaluating the results in three cultivation periods (30, 45 and 60 days). The design was a randomized block design with four replications. We evaluated survival rate of cuttings (% S), percentage of rooted cuttings (% EE), root length per cutting (CRE), number of shoots per cutting (NBE), leaves dry mass (MSF), roots dry mass (MSR) and total dry matter (MST). In the first experiment significant differences were found for CRE, NBE, MSF, MSR and MST, with better performance for the commercial substrate. In the second, there was no interaction between the evaluated factors, however, positive effects were identified both by the addition of IBA, as the cultivation time on NBE, CRE, MSF and MSR variables, reaching a maximum increase to the estimated concentration of 1.5 g L⁻¹, at 60 days of cultivation.

Key words – *Eplingiella fruticosa*, vegetative propagation, medicinal plant, *Hyptis*.

3.1. Introdução

Eplingiella fruticosa (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B.Pastore (LAMIACEAE), conhecida popularmente como “alecrim-de-vaqueiro”, é uma planta nativa do nordeste brasileiro, aromática e de grande potencial medicinal e terapêutico. Utilizada comumente contra dores, seu potencial medicinal tem sido confirmado por meio de testes em ratos, que já evidenciaram efeitos analgésico, anti-inflamatório, antioxidante e vasodilatador, tanto para o óleo essencial quanto para diferentes tipos de extrato (Andrade et al., 2010; Franco et al., 2011; Lima et al., 2013; Moreira et al., 2010; Santos et al., 2007; Silva et al., 2006). Contudo, não há registro de estudos sobre o cultivo dessa espécie, o que tem aumentado a pressão sobre as populações naturais, na medida em que seu uso atual encontra-se limitado ao extrativismo.

Recentemente passou-se a investir na conservação de espécies nativas, sobretudo das que apresentam potencial de uso farmacológico. Neste sentido, a conservação *ex situ* é uma das formas utilizadas para garantir a preservação de germoplasmas em risco, no entanto, na aplicação desse modelo é necessário seguir alguns passos, iniciando pela domesticação/cultivo da espécie (Scheffer et al., 1999). No desenvolvimento de sistemas de cultivo um dos primeiros desafios é a definição de um método de propagação e, quando se trata de espécies nativas e não domesticadas, com pouco conhecimento agrônomo, essa etapa é prioritária. Para tanto, a propagação assexuada tem sido considerada um dos métodos mais adequados na multiplicação de vegetais, sobretudo quando suas sementes apresentam baixa germinabilidade, como é o caso de *Eplingiella fruticosa*, que apresenta germinação em torno de 4% (Ferraz et al., 2013).

A estaquia tem sido uma das formas mais indicadas na propagação vegetativa, pois além de possuir baixo custo, representa método eficiente na obtenção de plantios uniformes, com caracteres genéticos desejáveis (Silva et al., 2010). Contudo, a capacidade de desenvolver raízes tem sido a maior limitação na produção de mudas por esta técnica, sendo muitas vezes necessário utilizar fatores exógenos, estimulantes do enraizamento (Biasi e Deschamps, 2009). A aplicação de auxinas, como o ácido indolbutírico (AIB), é um recurso muito utilizado neste fim (Oliveira et al., 2011), pois apresenta elevada capacidade estimulante da rizogênese, que decorre da sua menor mobilidade e fotossensibilidade e maior estabilidade química na planta (Bastos et al., 2009). Entretanto, a concentração hormonal necessária em cada espécie é variável em função de diversos fatores, como tipo de estaca, idade e genótipo (Hartmann et al., 2002).

Outro fator importante na produção de mudas via estaquia é o tipo de substrato utilizado, podendo ocasionar prejuízos no desenvolvimento das plântulas devido à composição química e/ou propriedades físicas inadequadas (Wendling et al., 2002).

Apesar da inexistência de estudos sobre a propagação de *Eplingiella fruticosa*, consta na literatura um número significativo de estudos sobre propagação de outras espécies de Lamiaceae, onde foram avaliados aspectos relacionados ao tipo de substratos, como em *Ocimum gratissimum* L. (Blank et al., 2003; Ehlert et al. 2004), *Ocimum basilicum* L. (Silva et al., 2012a), *Mentha arvensis* L. (Amaro et al., 2013) e *Mesosphaerum suaveolens* L. (Silva et al., 2012b) e tipos e doses de auxinas, como em *Melissa officinalis* L. (Sevik e Guney, 2013), *Martianthus leucocephala* Mart. ex Benth. e *Gymneia platanifolia* Mart. ex Benth. (Oliveira et al., 2011).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes substratos e o uso de concentrações de ácido indolbutírico, em diferentes tempos de cultivo, sobre a

sobrevivência e enraizamento das estacas, bem como sobre o crescimento inicial das brotações, visando estabelecer um método eficaz para a propagação vegetativa de “alecrim-de-vaqueiro”.

3.2. Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia, no período de julho/2013 a Março/2014. O município localiza-se entre as coordenadas 12° 15' 24" S e 37° 57' 53" W, com altitude média de 230 m, índice pluviométrico anual em torno dos 900 mm e temperatura média anual de 24 °C (Diniz et al., 2008).

Estacas apicais de “alecrim de vaqueiro” foram retiradas de plantas matrizes mantidas na Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do Horto Florestal/UEFS, cuja exsicata foi herborizada e depositada no herbário da mesma instituição (Voucher HUEFS 178230). As estacas, coletadas no início da manhã, foram padronizadas em 10 cm, mantendo-se apenas dois pares de folhas por estaca, passando por um pré-tratamento químico, onde tiveram suas bases imersas em solução do fungicida Derosal 500 sc diluído na concentração de 5 mg L⁻¹ de água. Em seguida, foram plantadas em bandejas de poliestireno expandido contendo 200 células, as quais foram mantidas em estufa com nebulização intermitente, com intervalo de irrigação de três minutos, a cada duas horas. Quinzenalmente procedeu-se a aplicação do fertilizante Forth Flores® - NPK (6-18-12 + micronutrientes) na dosagem recomendada pelo fabricante, isto é, 5,0 g L⁻¹.

Na produção e desenvolvimento das mudas foram realizados dois experimentos: no primeiro avaliou-se o efeito de diferentes tipos de substratos e, no segundo, optou-se pela utilização do melhor tipo de substrato, definido a partir dos resultados do experimento anterior, avaliando-se a influência de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) sobre a sobrevivência, enraizamento das estacas e crescimento inicial das brotações, em três tempos de cultivo.

No primeiro experimento o delineamento estatístico aplicado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo a unidade experimental composta por 50 estacas, totalizando 200 estacas por tratamento. Cada bandeja de 200 células representou um bloco e os tratamentos foram organizados em parcelas, constituído por diferentes substratos: comercial (Biomix®); comercial + vermiculita (1:1) e comercial + vermiculita + húmus (1:1:1). Para minimizar o efeito do ambiente, a posição das bandejas, sob a nebulização, foi alternada ao

longo do cultivo. Trinta dias após o plantio foram quantificadas as variáveis percentagem de sobrevivência das estacas (%S), percentagem de estacas enraizadas (%EE), comprimento da maior raiz (CRE; cm), número de brotações por estaca (NBE), massa seca de folhas (MSF; mg), massa seca de raiz (MSR; mg) e massa seca total (MST; mg). Para obtenção da massa seca as partes coletadas foram levadas a estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 60°C até peso constante, mensurando-se posteriormente o peso em balança digital de precisão. O comprimento da raiz foi tomado a partir da maior raiz e obtido com auxílio de régua milimétrica.

No segundo experimento o delineamento experimental também foi em blocos casualizados, dispostos em parcelas subdivididas no tempo, com quatro repetições, tendo a unidade experimental composta por dez estacas, totalizando 40 estacas por tratamento (concentração de AIB). Cada bandeja representou um bloco, sendo as parcelas representadas pelos tempos de cultivo (30; 45 e 60 dias) e as subparcelas representadas pelas quatro concentrações de AIB (1,0; 2,0; 3,0 ou 4,0 g L⁻¹), mais o controle (Oliveira et al., 2011). Antes do plantio as estacas tiveram suas bases imersas, por 5 minutos, em solução de AIB, nas concentrações indicadas. Para o tratamento controle as estacas foram imersas apenas no fungicida. As variáveis avaliadas e os procedimentos nas mensurações foram às mesmas descritas no experimento anterior.

Os dados do primeiro experimento foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. No segundo, as variáveis que apresentaram diferenças significativas pelo teste de F (<0,05) foram submetidas à análise de regressão, sendo seus valores e equações representados em gráficos. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico Sisvar, *versão 5.3* (Ferreira, 2011).

3.3. Resultados e Discussão

No primeiro experimento, apesar de não ter sido detectado diferenças significativas no percentual de sobrevivência e de enraizamento das estacas, evidenciou diferenças significativas nas variáveis comprimento da maior raiz (CRE), número de brotações por estaca (NBE), massa seca de folhas (MSF) e massa seca total (MST) (Tabela 01). Excetuando-se apenas o CRE, que foi superior com a utilização do substrato comercial + vermiculita (C+V), obtiveram-se médias superiores com a utilização do substrato comercial (C) sobre os demais parâmetros.

Tabela 01. Percentual de sobrevivência (%S), percentual de estacas enraizadas (%EE), comprimento de raiz por estaca (CRE), número de brotações por estaca (NBE), massa seca de folhas (MSF), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST) obtidos em estacas de “alecrim-de-vaqueiro”, cultivadas em diferentes composições de substrato: comercial (Biomix®) (C), comercial + vermiculita (C+V) e comercial + vermiculita + húmus (C+V+H). Feira de Santana, BA, 2015.

Substrato	%S	%EE	CRE (cm)	NBE	MSF (mg)	MSR (mg)	MST (mg)
C	36,50 a	25,75 a	3,92 b	20,00 a	47,55 a	43,55 a	160,25 a
C+V	39,27 a	25,00 a	4,59 a	16,24 b	41,40 b	47,15 a	141,50 b
C+V+H	41,25 a	20,00 a	4,20 b	16,83 b	39,10 b	47,10 a	138,60 b
CV (%)	40,91	51,72	18,81	19,97	20,95	24,99	14,83

*Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Esses resultados demonstram que, apesar da baixa exigência nutricional da espécie *E. fruticosa*, evidenciada pela sua ocorrência natural, restrita a solos pobres e arenosos do nordeste brasileiro (Harley e Pastore, 2012), há efeitos positivos da utilização de um substrato mais equilibrado, do ponto de vista físico e químico, para a produção de mudas. O substrato Biomix® é um produto comercial utilizado na produção de mudas de hortaliças, constituído por casca de pinus compostada, vermiculita expandida e composto orgânico, apresentando pH 6,2, capacidade de retenção de água de 50% e densidade na base seca de 350 kg.m⁻³, o que favorece a retenção de água, penetração de raízes e fornecimento de nutrientes às brotações. O efeito da adição de vermiculita sobre o CRE pode estar relacionado à maior capacidade de retenção hídrica e aeração desse composto, o que permite melhor penetração de oxigênio e difusão dos nutrientes, proporcionando melhor desenvolvimento das raízes. Esse resultado difere do encontrado em *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), no qual as raízes das estacas da espécie tiveram crescimento limitado quando cultivadas no substrato vermiculita (Sousa et al., 2005).

No segundo experimento, a análise de variância não detectou interação entre os fatores de variação, contudo, demonstrou efeitos significativos do tempo de cultivo sobre o comprimento da maior raiz (CRE) e massa seca de raiz (MSR), e das concentrações de AIB sobre o número de brotações por estaca (NBE) e massa seca de folhas (MSF) (Figura 2).

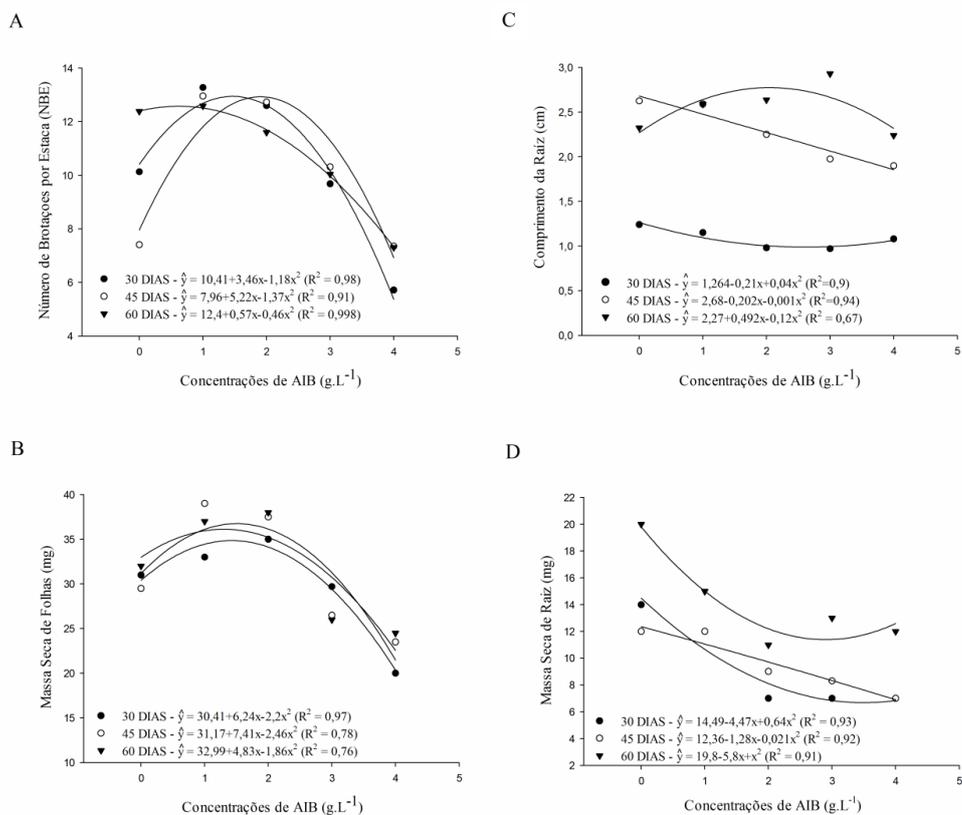


Figura 02. Número de brotações por estaca (A), massa seca de folhas (B), comprimento da raiz (C) e massa seca de raiz (D) de estacas de “alecrim-de-vaqueiro” em função de concentrações de AIB, avaliadas em três tempos de cultivo. Feira de Santana, BA, 2015.

Os resultados demonstram que 30 dias não é tempo suficiente ao desenvolvimento satisfatório das estacas de “alecrim de vaqueiro”, pois suas raízes apresentam crescimento lento, o que torna necessário maior tempo de cultivo para melhorar a condição de rizogênese e aumentar as chances de sobrevivência das mudas após o transplante ao campo.

Percebe-se nos gráficos das variáveis comprimento da raiz (CRE) (Figura 2C) e massa seca de raiz (MSR) (Figura 2D) que o tempo de 60 dias permitiu melhor desenvolvimento da raiz nesta espécie, independente da concentração de AIB aplicada. Contudo, avaliando-se a linha de tendência referente a este tempo de cultivo no gráfico de CRE, nota-se um comportamento quadrático em relação às concentrações testadas, sendo possível estimar um maior comprimento de raiz na concentração de $2,05 \text{ g L}^{-1}$ de AIB. No entanto, para MSR nota-se efeito inibitório desse regulador, sendo o maior incremento registrado no tratamento controle em todos os tempos avaliados (Figura 2D).

Blank et al. (2003), pesquisando sobre a propagação de *Ocimum gratissimum* L., verificaram que o tempo de 60 dias também foi satisfatório para o bom desenvolvimento de mudas da espécie, utilizando diferentes tipos de substratos. Do mesmo modo, Boaventura et al. (2013), avaliando o tempo necessário na formação de mudas de erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown) (Verbenaceae), encontraram resultados similares, onde os tempos de 50 e 60 dias promoveram melhor desenvolvimento de raiz na espécie. Esses resultados diferem dos obtidos por Santos Neto et al. (2007), que avaliando o crescimento inicial de *Mesosphaerum pectinata* L. (Lamiaceae) verificaram o melhor desenvolvimento das mudas aos 22 e 29 dias de cultivo.

A análise de regressão demonstrou ainda comportamento quadrático significativo no efeito das concentrações de AIB sobre o número de brotações por estaca (NBE) (Figura 2A) e massa seca de folhas (MSF) (Figura 2B). Observou-se sensível elevação no número de brotações por estaca, nos três tempos de cultivo, com produção máxima estimada na concentração de 1,5 g L⁻¹ de AIB, aos 30 dias de cultivo, 1,9 g L⁻¹ aos 45 dias e 0,7 g L⁻¹ aos 60 dias, obtendo-se incremento médio de 13 brotações por estaca. Comportamento semelhante ocorreu em MSF, que teve incremento máximo estimado na concentração de 1,4 g L⁻¹ de AIB, aos 30 dias de cultivo, com rendimento de 37 mg de folhas. Os efeitos para os demais tempos de cultivo foram idênticos, estimando-se maior produção de biomassa foliar nas concentrações de 1,48 g L⁻¹ aos 45 dias e 1,3 g L⁻¹ aos 60 dias. Portanto, no presente trabalho, verificou-se decréscimo no número médio de folhas e massa foliar à medida que a concentração da auxina ultrapassou a concentração média de 1,4 g L⁻¹, fato que pode ser atribuído efeito tóxico do AIB sobre as estacas de *E. fruticosa*. Ressalta-se que durante a avaliação do experimento foram verificados efeitos fitotóxicos sobre a espécie, como o surgimento de folhas amareladas e escurecidas, apodrecimento de folhas e ápice caulinar e calogênese na base das estacas, em diferentes níveis, para todas as concentrações de AIB utilizadas.

Oliveira et al. (2011), em estudo sobre o efeito de três concentrações (1000, 2000 e 4000 mg L⁻¹) de AIB no desenvolvimento de estacas de duas espécies de Lamiaceae (*Martianthus leucocephala* (Mart. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore e *Gymneia platanifolia* (Mart. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore) identificaram efeitos positivos da aplicação de elevadas concentrações do regulador. Diferente disso, Sevik e Guney (2013), avaliando o efeito de diferentes hormônios no desenvolvimento de estacas de *Melissa officinalis* L., verificaram que o uso de AIB não foi efetivo no incremento foliar de brotações na espécie, assim como

Carvalho et al. (2014), avaliando diferentes concentrações de AIB sobre o desenvolvimento de estacas de *Mesosphaerum pectinata*.

Diante do exposto, pode-se inferir que as concentrações de AIB utilizadas nesse estudo foram efetivas basicamente sobre o incremento de novas brotações e crescimento das mesmas, mediante o acúmulo de massa seca de folhas. Segundo Silva et al. (2004), muitas plantas possuem alto teor de substâncias inibidoras do enraizamento presentes nos diferentes tecidos vegetais, o que pode limitar sua propagação via estaquia, além disso, altas concentrações de auxina podem levar a uma excessiva proliferação de células, intensa calosidade e consequente inibição do crescimento de raízes e da parte aérea. Sendo assim, ambos os fatores podem ter afetado o desenvolvimento das estacas de “alecrim de vaqueiro”, sobretudo pelas baixas taxas de enraizamento verificadas. Ainda assim, tem-se nesse estudo resultados promissores quanto à domesticação e cultivo dessa importante espécie endêmica e medicinal do Brasil.

3.4. Conclusões

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que é possível a produção de mudas da espécie “alecrim de vaqueiro” via propagação vegetativa, utilizando estacas apicais. O substrato comercial Biomix® possibilita maior crescimento das brotações, via acúmulo de massa seca e o tempo de cultivo de 60 dias possibilita maior crescimento de raízes. Aplicações de AIB estimulam maior taxa de brotação nas estacas mas, em concentrações superiores a 1,5 g L⁻¹, são prejudiciais ao desenvolvimento de raízes e brotações na espécie. Assim, pode-se dizer que o uso de AIB é dispensável na propagação desta espécie, devido a elevação no custo de produção.

3.5. Referências

AMARO, H. T. R. et al., Tipos de estacas e substratos na propagação vegetativa da menta (*Mentha arvensis* L.) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.3, p. 313–318, 2013.

ANDRADE, A. M.; et al. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 962–968, 2010.

BASTOS, D. C. et al. Estiolamento, incisão na base da estaca e uso do ácido indol-butírico na propagação da caramboleira por estacas lenhosas. **Ciências Agrotécnicas**, v. 33, n. 1, p. 313-318, 2009.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda., 2009. 106p.

BLANK, A. F. et al. Efeitos de composições de substratos na produção de mudas de quiôidô (*Ocimum gratissimum* L.) **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 1, p. 5-8, 2003.

BOAVENTURA, A. C. et al. Tempo para formação de mudas de erva cidreira a partir da imersão de estacas em água. **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 2, p. 1-5, 2013.

CARVALHO, J. S. B. et al. Effects of the indolbutiric acid in the apical stakes of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Journal of Global Biosciences**, v.3, n. 2, p. 484-487, 2014.

DINIZ, A. F.; SANTOS, R. L.; SANTOS, S. M. Avaliação dos riscos de seca para o município de Feira de Santana- BA associado à influência do el niño no semi-árido do nordeste brasileiro. **+Geografia's**, v. 1, n. 1, p. 18 – 24, 2008.

EHLERT, P. A. D. et al. Propagação vegetativa da alfavaca-cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 10-13, 2004.

FERRAZ, M.; et al. Teste de germinação de *Hyptis leucocephala* e *Eplingiella fruticosa* (Lamiaceae) para formação do banco de sementes na Unidade Experimental Horto Florestal – Universidade Estadual de Feira de Santana. **Magistra**, v. 25, n. esp., I RGVNE, p. 422-423, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FRANCO, C. M. et al. Bioassay-guided Evaluation of Antinociceptive Properties and Chemical Variability of the Essential Oil of *Hyptis fruticosa*. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1693 – 1699, 2011.

HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**, v. 58, p.1-55, 2012.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880p.

LIMA, A. C. B. et al. Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* Salmz ex Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 192 – 197, 2013.

MOREIRA, I. J. A. et al. Vasorelaxant effect of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae, dichloromethane extract on rat mesenteric artery. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 762 – 766, 2010.

OLIVEIRA, L. M. et al. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. E *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 73-78, 2011.

SANTOS NETO, A. L. et al. Crescimento inicial de Sambacaitá (*Hyptis pectinata* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 3, p. 310 – 316, 2007.

SANTOS, M. R. V. et al. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 186 – 191, 2007.

SEVIK, H.; GUNEY, K. Effects of IAA, IBA, NAA, and GA3 on rooting and morphological features of *Melissa officinalis* L. stem cuttings. **The Scientific World Journal**, Volume 2013, Article ID 909507, 5 pág. 2013.

SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAUJO, A. J. de. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: QUEIRÓZ, M. A. et al. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**, v. 1, p. 1-25, 1999.

SILVA, A. B. L. et al. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salzm. Ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, pp. 475 – 479, 2006.

SILVA, I. M. et al. Enraizamento de manjeriço em diferentes substratos e doses de cinzas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. esp., p. 188-191, 2012a.

SILVA, J. M. M. et al. Indução de enraizamento em estacas de João-brandinho (*Piper* sp.) com ácido indolbutírico. **Ciência Agronômica**, v.35, p. 248-252, 2004.

SILVA, P. N. L. et al. Enraizamento de estacas de aceroleira: efeitos de recipientes e substratos. **Agrarian**, v.3, n.8, p.126-132, 2010.

SILVA, R. C. P. et al. Efeito da composição de substratos no enraizamento de estacas de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.7, n.2, p. 219-225, 2012b.

SOUSA, P. B. L.; AYALA-OSUNA, J. T. & GOMES, J. E. Propagação vegetativa de *Ocimum gratissimum* L. em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 1, p. 39-44, 2005.

WENDLING, I. et al. Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas. 1. ed. Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 2002. 165 p.

4. CAPÍTULO II

**Variabilidade em genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.)
Harley & J.F.B. Pastore baseada em dados morfológicos e agronômicos**

**Variabilidade em genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B.
Pastore baseada em dados morfológicos e agronômicos**

Anderson de Carvalho Silva⁵ e Lenaldo Muniz de Oliveira⁶

RESUMO – Doze genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, mantidos na Coleção de Germoplasma da Universidade Estadual de Feira de Santana, foram caracterizados visando a mensuração da variabilidade genética a partir do levantamento de dados morfológicos e agronômicos, analisados por meio de estatísticas uni e multivariadas. Cinco mudas de cada genótipo foram coletadas em diferentes municípios brasileiros entre a Bahia e Sergipe, mantidos em casa de vegetação, na Unidade Experimental Horto Florestal da UEFS, com tratamentos culturais diários até o completo estabelecimento das mudas. Em seguida, foram propagados vegetativamente e levados a campo após 60 dias em bandeja de poliestireno expandido. Doze meses após o transplante foram avaliadas 12 características quantitativas, sendo oito morfológicas: altura (AP), largura da planta (LP), comprimento (CF) e largura foliar (LF), comprimento da base foliar direita (CBD), comprimento da base foliar esquerda (CBE), comprimento (CP) e largura do pecíolo (LP) e quatro agronômicas: massa fresca e seca de folhas (MFF e MSF), teor (mL) e rendimento (%) de óleo essencial. Houve variação significativa, pelo teste de F ($p < 0,01$), para as características CF, LF, CBD, CBE, LP, MFF e MSF. Os genótipos formaram dois grupos para quase todas as variáveis, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), exceto para LP, que formou três. Os genótipos EF002 e EF003 apresentaram as maiores médias para quase todas variáveis, principalmente MFF e MSF. Houve concordância relativa entre os métodos multivariados adotados, sendo possível a formação de três grupos, tanto para UPGMA quanto para as variáveis canônicas (VC). As características que mais contribuíram na formação dos grupos foram CBE, MFF e CF. Os genótipos EF002, EF003, EF005 e EF012 se destacaram por apresentarem maiores distâncias genéticas, indicando bom potencial para uso em programas de melhoramento voltados a produção de biomassa foliar.

Palavras-chave – Coleção de germoplasma (ColG), caracterização, RGV's, *Hyptis*.

⁵ Doutorando no Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UEFS;

⁶ Professor Titular do Departamento de Ciências Biológicas da UEFS;

Variability in genotypes of *Eplingiella fruticosa* (Salzm. Ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore
based on morphologic and agronomical variables

ABSTRACT – Twelve genotypes *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & JFB Pastore kept in the Active Bank Germplasma of State University of Feira de Santana were characterized aimed at measuring the variability among them, based on a survey of morphological and agronomic data, analyzed using univariate and multivariate statistics. Five seedlings of each genotype were collected in different places between Bahia and Sergipe, Brazil, and kept in a greenhouse at the Horto Florestal Experimental Unit of the UEFS with daily until the full establishment of seedlings cultivation. Then we were vegetatively propagated and brought to the field after 60 days in polystyrene tray. Twelve months after transplantation, 15 quantitative traits of genotypes were evaluated, with eighth morphological (length (AP) and width (LP) leaf, length of the right leaf base (CBD), left leaf base length (CBE), length (CP) and width of the petiole (LP)) and four agronomic (fresh (MFF) and dried (MSF) leaf mass, yield (%) and content (mL) of essential oil. There was significant variation by F test ($p < 0.01$) for the CF, LF, CBD, CBE, LP, MFF and MSF features. The genotypes formed two groups for almost all variables, by Scott-Knott test ($p < 0.05$), except for LP, which formed three. The EF002 and EF003 genotypes presented the highest levels for almost all variables, especially MFF and MSF. There was relative agreement among multivariate methods adopted, with the possible formation of three groups for both UPGMA and for the canonical variables (CV). The characteristics that most contributed to the formation of groups were CBE, MFF and CF. The genotypes EF002, EF003, EF005 and EF012 stood out because they have higher genetic distances, indicating good potential for use in breeding programs aimed at production of leaf biomass.

Key words – Germplasm plant collection, characterization, RGV's and *Hyptis*.

4.1. Introdução

O “alecrim de vaqueiro” (*Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore), anteriormente designada *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth. é uma planta aromática, com ocorrência em solos arenosos do nordeste do Brasil, que pertence à família Lamiaceae, subfamília Nepetoideae, tribo Ocimeae e subtribo Hyptidinae (Harley e Pastore, 2012; Harley,

2012). Suas folhas e flores são popularmente utilizadas no combate a dores e convulsões (Franco et al., 2011). Seu óleo essencial e diferentes tipos de extratos tem evidenciado os efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório, vasodilatador e antioxidante, por meio de testes em camundongos (Silva et al., 2006; Santos et al., 2007; Menezes et al., 2007; Andrade et al., 2010; Moreira et al., 2010; Franco et al., 2011; Lima et al., 2013), além do efeito larvicida, efetivo no combate ao mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da dengue (Silva et al., 2008).

Com isso, justifica-se a preservação *ex situ* do pool gênico de *Eplingiella fruticosa*, visando à domesticação e o melhoramento da espécie, a fim de promover a exploração sustentável da mesma. Para tanto, é indispensável ampliar o conhecimento sobre as características de sua morfologia e produtividade.

Os bancos de germoplasma possuem um papel de suma importância nesse processo, uma vez que reúnem e conservam essa variabilidade, colocando-a disponível para pesquisa, o que permite a seleção de genótipos superiores e possibilita o aumento da frequência de alelos favoráveis (Gonçalves et al., 2008). Entretanto, as subamostras conservadas nesses bancos geralmente são pouco utilizadas devido a uma série de dificuldades e deficiências, tais como a falta de documentação e de descrição adequada e, ainda, a insuficiente avaliação dos materiais genéticos dessas coleções. Sendo assim, a análise da diversidade genética em coleções de germoplasma facilita a classificação confiável dos genótipos e a identificação de subconjuntos, o que pode ser usado para a reprodução de características específicas, além de ampliar o conhecimento sobre o nível de divergência existente entre eles. Além disso, melhoristas de plantas podem usar dados sobre a similaridade genética para complementar informações fenotípicas no desenvolvimento de populações melhoradas (Dalkani et al., 2012).

No Brasil, há um número reduzido de coleções e bancos ativos de germoplasma (BAG) de plantas medicinais e um número relativamente baixo de espécies sendo conservadas nesses BAGs. Porém, a conservação de plantas medicinais é uma estratégia fundamental para garantir a manutenção de sua variabilidade genética, possibilitando futuros trabalhos de bioprospecção gênica e de metabólitos secundários, produtos de interesse obtidos destas espécies (Oliveira et al., 2013).

O principal método de identificação da variação genética em espécies vegetais se dá por meio do estabelecimento de descritores, estruturados a partir de marcadores, sejam eles morfológicos, fenológicos, fisiológicos, bioquímicos ou moleculares (Martuscello et al., 2012), pois, essa variação pode estar presente de forma difusa, praticamente imperceptível, nas mais diversas características pelas quais podemos classificar o germoplasma.

Os marcadores morfológicos e fenotípicos têm sido tradicionalmente utilizados para distinguir genótipos e, por mais que marcadores moleculares sejam mais precisos na distinção genética de acessos, populações e espécies, dados morfológicos sempre serão necessários, sobretudo por facilitar a discriminação visual, em campo, dos acessos em um banco ativo de germoplasma (Carvalho et al., 2003). Essa variabilidade tem sido mensurada, avaliada e expressa por meio de técnicas estatísticas multivariadas, que visam delimitar a variação existente entre os genótipos e as características elencadas, por meio de medidas de similaridade ou dissimilaridade.

Estes métodos permitem classificá-los e agrupá-los através de modelos, a fim de delimitar a distância genética existente entre os grupos e a relação destes com as características avaliadas. Os métodos multivariados conjugados a gráficos de dispersão tem sido a alternativa mais adequada em estudos de diversidade genética, auxiliando a escolha de genótipos promissores para utilização em programas de melhoramento (Bertini et al., 2010). A análise de variáveis canônicas permite avaliar o grau de similaridade genética entre genitores considerando-se a matriz de covariância residual e a matriz de covariância fenotípica entre os caracteres avaliados. As variáveis canônicas, quando utilizadas em estudos de divergência genética, permitem a identificação de indivíduos similares em gráficos bi ou tridimensionais (Cruz et al., 2008).

Considerando a importância da espécie do ponto de vista medicinal e a necessidade de potencializar seu uso através do processo de domesticação, que valoriza o seu cultivo racional, o presente estudo objetivou quantificar e caracterizar a variabilidade existente entre 12 genótipos de *E. fruticosa* mantidos na coleção de germoplasma da Universidade Estadual de Feira de Santana, a partir do levantamento de dados morfológicos e agrônômicos, analisados por meio de estatísticas uni e multivariadas.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Material vegetal

Plantas matrizes de 12 genótipos de *E. fruticosa* foram coletadas, entre os anos de 2011 e 2012, em diferentes locais de ocorrência natural da espécie, coletando-se mudas de cinco plantas aleatoriamente escolhidas em cada população, entre os estados de Bahia e Sergipe (Figura 3 e Tabela 2).

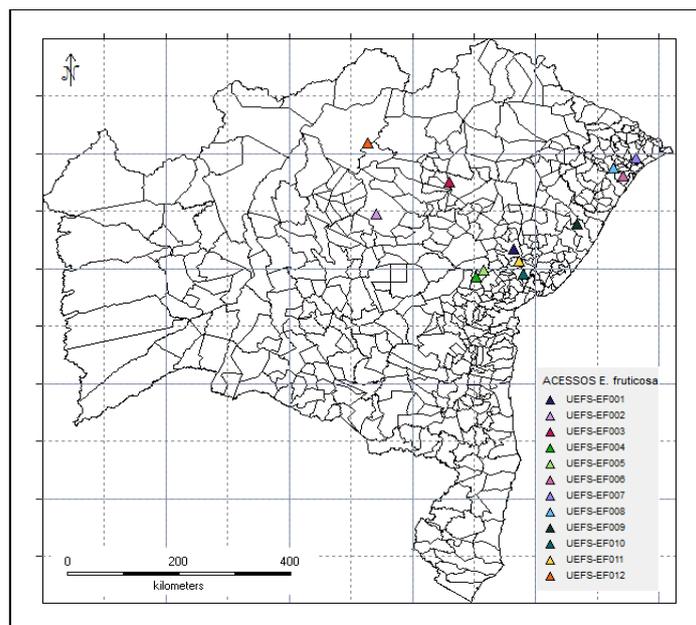


Figura 03. Mapa BA/SE indicando a localização geográfica dos genótipos de *E. fruticosa*, mantidos na Coleção de Germoplasma. Feira de Santana, BA, 2015.

Após as coletas, as mudas foram transplantadas em vasos de 5 L preenchidos com solo argiloso mais composto orgânico (1:1) e mantidas em casa de vegetação da Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UNEHF/UEFS), com regas diárias e aplicações quinzenais de fertilizante mineral misto NPK (13-13-15) + micronutrientes, até o completo estabelecimento das mudas. Exsicatas e duplicatas de cada genótipo foram herborizadas e depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS).

Tabela 02. Coordenadas geográficas, altitude e municípios dos locais de coleta dos 12 genótipos do Coleção de Germoplasma de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

Genótipo	Latitude (S)	Longitude (O)	Altitude (m)	Município/Estado
EF001	12°11'48.8"	38°58'1.66"	300	Feira de Santana/BA
EF002	11°34'14.5"	41°10'32.4"	1096	Morro do Chapéu/BA
EF003	11°35'52.3"	41°12'47.7"	1069	Jacobina/BA
EF004	12°41'02.8"	39°35'03.1"	236	Santa Terezinha/BA
EF005	12°33'06.8"	39°27'18.3"	220	Rafael Jambeiro/BA
EF006	10°55'33.6"	37°11'56.1"	37	São Cristóvão/SE
EF007	10°35'54.8"	36°59'17.0"	112	Japarutuba/SE
EF008	11°45'24.8"	37°56'32.9"	154	Esplanada/BA
EF009	10°46'10.4"	38°21'32.0"	239	Itabaiana/SE
EF010	13°37'28.9"	41°48'31.2"	16	Saubara/BA
EF011	12°23'30.6"	38°53'17.5"	219	São Gonçalo/BA
EF012	10°20'48.6"	41°19'59.4"	916	Umburanas/BA

Após oito meses de cultivo em casa de vegetação, os genótipos foram propagados vegetativamente, via estaquia caulinar, visando a manutenção da carga genética de cada acesso. Estacas apicais foram coletadas das plantas matrizes e tiveram suas bases embebidas em solução do fungicida Desoral 500c (5 mL L^{-1}) e, em seguida, foram dispostas em bandeja de poliestireno expandido de 200 células (Figura 4), utilizando o substrato comercial Biomix®. As mudas foram mantidas em casa de vegetação sob nebulização intermitente, com intervalos de 1,5 horas e duração de 5 minutos. Foram realizadas adubações quinzenais com fertilizante mineral misto NPK (13-13-15) + micronutrientes, ao longo de 60 dias, quando as mudas foram transplantadas para o campo experimental do UNEHF/UEFS, em Abril de 2013.

4.2.2. Instalação da coleção de germoplasma e delineamento experimental

A coleção de germoplasma de *E. fruticosa* foi implantado na UNEHF/UEFS (Figura 4), Feira de Santana, Bahia, Brasil, cidade localizada entre as coordenadas $12^{\circ} 15' 24'' \text{ S}$ e $37^{\circ} 57' 53'' \text{ W}$, com altitude média de 230 m, índice pluviométrico anual em torno dos 900 mm e temperatura média anual de 24° C .



Figura 04. Processo de coleta, identificação, propagação e implantação do Coleção de Germoplasma de *E. fruticosa* na UNEHF/UEFS. Feira de Santana, BA, 2015.

O solo da área experimental é do tipo podzólico vermelho-amarelo, argilo-arenoso e apresenta acidez média, elevados níveis de fósforo, potássio, cálcio e magnésio e boa

porosidade (Tabela 03). Contudo, antes de se proceder ao plantio, as covas foram fertilizadas com esterco bovino, na proporção de 1000 kg ha⁻¹, visando a suplementação orgânica do solo, e assim, o melhor estabelecimento das mudas. Na implantação da ColG utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições e seis plantas por repetição, totalizando 24 plantas por genótipo.

Tabela 03. Análise química do solo no local onde foi realizada a implantação do experimento na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, 2015.

pH	P	K	Ca	Mg	Ca + Mg	Al	Na	H + Al	S	CTC	V
(H ₂ O)	mg d ³										%
6,0	17	0,19	4,7	1,3	6,0	0,0	0,04	3,52	6,23	9,75	64

*Análise realizada no Laboratório de Solos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Ba.

4.2.3. Caracterização dos genótipos

A análise das características morfológicas e agrônômicas ocorreu em período de plena floração dos genótipos, sendo iniciada 12 meses após o transplante. Foram avaliadas doze características quantitativas, sendo oito morfológicas: altura, largura da planta, comprimento (CF) e largura foliar (LF), comprimento da base foliar direita (CDB), comprimento da base foliar esquerda (CBE), comprimento (CP) e largura do pecíolo (LP) e quatro agrônômicas: massa fresca e seca de folhas (MFF e MSF), além de rendimento (%) e teor (mL) de óleo essencial. A escolha dos descritores foi baseada em trabalhos de caracterização realizados com espécies da família Lamiaceae (Blank et al., 2004; Khazarian, 2012; Ibrahim et al., 2012), a fim de padronizar descritores para *E. fruticosa*.

Na aferição das medidas de campo utilizou-se trena milimétrica. Nas medidas foliares, padronizou-se a coleta de uma folha por planta de cada genótipo, totalizando 24 folhas por genótipo, retirada da base do terceiro nó, a partir do ápice caulinar, em seguida, as folhas foram digitalizadas e analisadas com ajuda software ImageJ®, versão 1.48.

Como parcela útil, para mensuração das massas seca e fresca de folhas, foi utilizada três plantas por genótipo, escolhidas ao acaso em cada bloco. Para obtenção da massa seca foram coletadas três amostras de 100 g de folhas, as quais foram depositadas em estufa com circulação forçada de ar, até peso constante, obtendo-se ao final o teor médio de água das

amostras. A partir desse teor calculou-se a massa seca das parcelas, a partir da massa fresca obtida por meio de pesagem em balança analítica.

A extração de óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação, com utilização de aparelho tipo cleveger. Para padronização das medidas de teor e rendimento, quatro amostras de 100g de massa seca por genótipo foram utilizadas para extração. Após a extração, o teor (g) foi medido com o uso de balança de precisão e calculado com base na massa seca utilizada, subtraindo-se o teor de umidade, calculado a partir da média de três amostras da mesma massa seca e mensurada em higrômetro digital no momento antecedente a destilação. O rendimento foi calculado com base no teor de óleo em relação massa seca total de cada planta.

4.2.3. Análise estatística

A existência de variabilidade genética entre as subamostras foi testada por meio da análise de variância utilizando o teste F, a 1% de probabilidade de erro. As médias foram posteriormente agrupadas pelo método de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Apenas as variáveis que apresentaram significância pelo teste de F foram submetidas ao teste de agrupamento. Para tais procedimentos, utilizou-se o software *Sisvar 5.3* (Ferreira, 2011). A divergência genética entre os tratamentos foi determinada pelas técnicas multivariadas, baseadas na análise de agrupamento e de variáveis canônicas. Na análise de agrupamento utilizou-se a distância generalizada de Mahalanobis (D^2) como medida de dissimilaridade e na formação dos grupos, sendo o agrupamento das subamostras realizado pelo método hierárquico Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average (UPGMA), citado por Rao (1952). A contribuição relativa das variáveis para a divergência genética foi determinada utilizando o critério proposto por Singh (1981).

No estabelecimento do ponto de corte no dendograma optou-se pelo método de Mojena (1977), que faz uma definição estatística para o número de grupos formados em métodos hierárquicos como UPGMA. Esse método consiste em selecionar o número de grupos no estágio j que, primeiramente, satisfizer à seguinte inequação: $\alpha_j > \theta_k$, em que α_j é o valor de distâncias dos níveis de fusão correspondentes ao estágio j ($j = 1, 2, \dots, n$) e θ_k é o valor referencial de corte, expresso por: $\theta_k = \bar{\alpha} + k\sigma_{\alpha}$, em que α e σ_{α} são, respectivamente, as estimativas não viesadas da média e do desvio padrão dos valores de α ; k é uma constante. Adotou-se $k = 1,25$ como regra de parada na definição do número de grupos, como sugerem Milligan e Cooper (1985).

Para testar a eficiência de cada método de agrupamento hierárquico foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (CCC), pois, quanto maior este valor, maior é a eficiência do método em questão. As análises de distância Generalizada de Mahalanobis, variáveis canônicas e da importância relativa das características foram efetuadas pelo programa GENES (Cruz, 2013), enquanto as análises de agrupamento e de correlação cofenética foram utilizados os pacotes hcluster e Biodiversity, do Programa R (R Development Core Team, 2006).

4.3. Resultados e Discussão

Através da análise de variância detectou-se diferenças significativas entre os genótipos, pelo teste de F ($p < 0,01$), nas características massa fresca de folhas (MFF), massa seca de folhas (MSF), comprimento de folha (CF), largura de folha (LF), comprimento da base foliar direita (CBD), comprimento da base foliar esquerda (CBE) e largura do pecíolo (LP). Pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, as médias foram classificadas em dois grupos para a maioria das características, exceto LP, onde se formou três grupos (Tabela 04).

Tabela 04. Médias dos genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) J.F.B. Pastore para as variáveis massa fresca de folhas (MFF), massa seca de folhas (MSF), comprimento de folha (CF), largura de folha (LF), comprimento da base foliar direita (CBD), comprimento da base foliar esquerda (CBE), largura do pecíolo (LP). Feira de Santana, BA, 2015.

Genótipos	MFF (g)	MSF (g)	CF (cm)	LF (cm)	CBD (cm)	CBE (cm)	LP (cm)
EF001	717,50 b	276,54 b	1,36 b	1,07 b	0,61 b	0,59 b	0,068 c
EF002	2081,25 a	825,36 a	2,20 a	1,70 a	0,88 a	0,90 a	0,098 b
EF003	1645,00 a	634,88 a	2,20 a	1,53 a	0,93 a	0,94 a	0,093 b
EF004	992,00 b	410,61 b	1,57 b	1,17 b	0,64 b	0,67 b	0,078 c
EF005	781,25 b	302,67 b	1,19 b	1,00 b	0,66 b	0,71 b	0,073 c
EF006	1227,50 b	482,85 b	1,34 b	1,06 b	0,61 b	0,59 b	0,078 c
EF007	1002,50 b	395,24 b	1,30 b	0,92 b	0,60 b	0,59 b	0,088 c
EF008	1226,25 b	494,26 b	1,44 b	0,98 b	0,64 b	0,66 b	0,078 c
EF009	356,25 b	143,28 b	1,12 b	0,89 b	0,56 b	0,57 b	0,073 c
EF010	942,50 b	375,22 b	1,53 b	1,10 b	0,62 b	0,64 b	0,080 c
EF011	1342,50 b	540,22 b	1,34 b	0,99 b	0,63 b	0,61 b	0,080 c
EF012	952,50 b	384,54 b	2,19 a	1,80 a	0,94 a	0,96 a	0,125 a
Média	1105,58**	438,81**	1,56**	1,18**	0,69**	0,70**	0,084**
CV (%)	47,05	47,46	17,01	18,44	14,35	12,20	12,61

*médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Nas características MFF e MSF, o primeiro grupo foi formado apenas por dois genótipos, EF002 e EF003 (Tabela 04). Esses genótipos produziram em média 35% e 40% mais massa fresca e seca de folhas, respectivamente, que os genótipos do segundo grupo. A biomassa foliar é uma característica muito importante quando se tratam de espécies da família Lamiaceae, tendo em vista que cerca de 90% do óleo essencial produzido em plantas da família fica armazenado em tricômas presentes nas folhas (Biasi & Deschamps, 2009), sendo assim, esse resultado demonstra superioridade dos genótipos em relação aos demais, para características desejáveis a um programa de melhoramento.

O agrupamento das médias nas características CF, LF, CBD e CBE também possibilitou a classificação aos genótipos em dois grupos, sendo o primeiro composto pelos genótipos EF002, EF003 e EF012, com valores médios cerca de 38% maiores que os dos integrantes do outro grupo, formado pelos demais genótipos. Provavelmente, esses dados justifiquem o maior acúmulo de massa fresca e seca para os genótipos EF002 e EF003, devido às medidas foliares de valor superior e o maior número de folhas produzidas por eles. O genótipo EF012, apesar de possuir comprimento e largura em valor aproximado, apresenta menor acúmulo de massa foliar, o que denota menor produção de folhas por planta, tendo em vista a obtenção dos valores médios elevados em todas as variáveis listadas acima. Segundo Kharazian (2012), medidas de parâmetros foliares são extremamente importantes na determinação de variabilidade em espécies de *Salvia* spp, resultado que similar aos obtidos nesse estudo.

A variabilidade entre os genótipos de *E. fruticosa* na característica LP foi superior à encontrada nas demais variáveis, possibilitando a formação de três grupos. O genótipo EF012 ficou isolado no primeiro grupo, apresentando o maior valor médio de LP (0,125 cm), com pecíolo mais robusto, necessário para sustentação das suas folhas, em geral, mais suculentas. O segundo grupo foi formado pelos genótipos EF002 e EF003, que apresentaram média para largura de pecíolo de 0,098 e 0,093 cm, respectivamente. O terceiro e maior grupo foi formado pelos demais genótipos e definido pelos valores médios inferiores a 0,08 cm.

A análise de agrupamento dos genótipos pelo método de UPGMA (Figura 05), baseado na distância generalizada de Mahalanobis (D^2) como medida de dissimilaridade, apresentou coeficiente de correlação cofenética (CCC) elevado ($r=0,91$), demonstrando um ótimo ajuste do dendrograma ao método, pois segundo Sokal & Rohlf (1962), valores acima de 0,9 demonstram um bom ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma. Franco et al.

(2011), encontrou valor aproximado ($r=0,93$) para CCC quando avaliou a variabilidade na composição do óleo essencial de *Eplingiella fruticosa*, procedente de seis origens distintas.

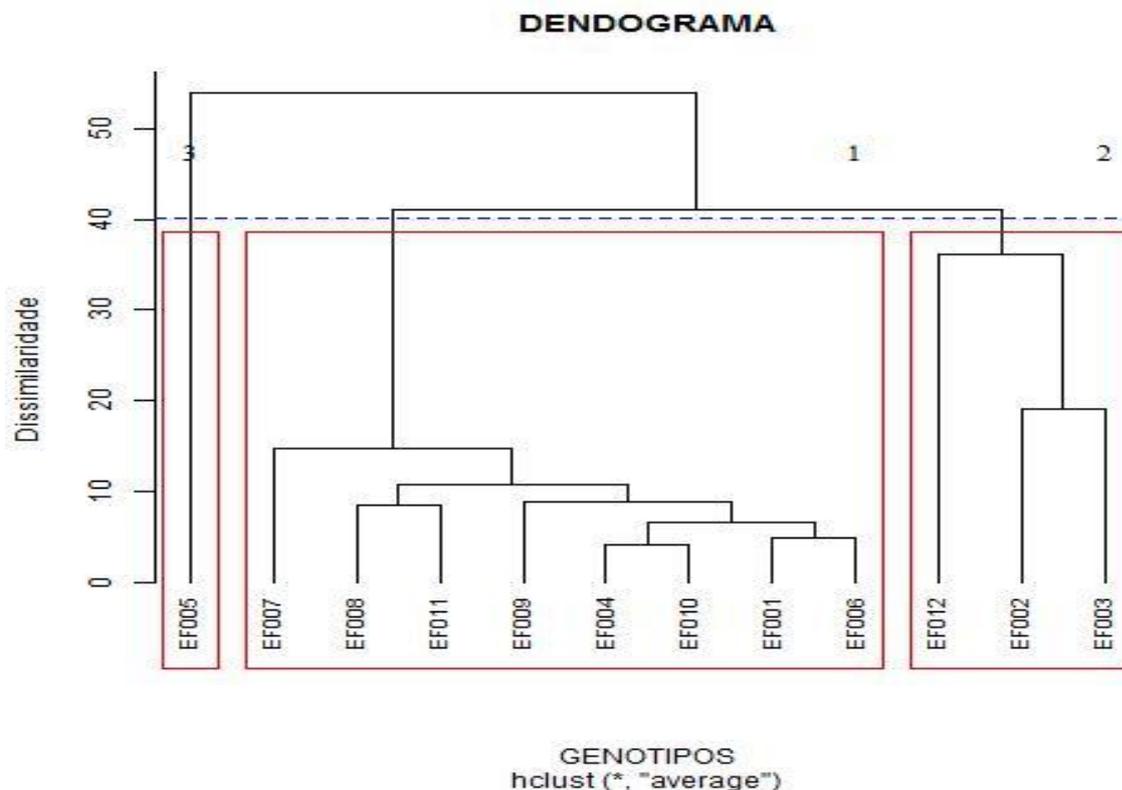


Figura 05. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore, obtido pelo método de UPGMA, com base em 12 caracteres, utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis (D^2). Feira de Santana, BA, 2015.

Dessa forma, realizando o corte a uma distância de 40,14% de dissimilaridade, detectou-se a formação de três grupos. O primeiro foi formado pela maioria dos genótipos (EF001, EF004, EF006, EF007, EF008, EF009, EF010 e EF011) que apresentaram muitas características comuns, com valores médios intermediários para todas as variáveis. A proximidade entre esses genótipos também pode ser confirmada pelas menores dissimilaridades apresentadas (Tabela 05). Houve a formação de dois subgrupos, o primeiro com o isolamento do genótipo EF007, que assim como na formação dos grupos, apresenta médias centrais para os caracteres, em relação à amplitude verificada entre esses oito genótipos. Os demais genótipos se agrupam de modo coeso, formando subgrupo homogêneo quanto às características morfo-agronômicas avaliadas, provavelmente devido às semelhanças das condições climáticas entre os habitats originais, como ambientes de clima quente e úmido, com temperaturas médias

variando entre 24 e 28°C e precipitação anual em torno dos 1100 mm, tenham impulsionado a convergência dos caracteres. Mesmo assim, é possível perceber pequenos intranúcleos arranjados de acordo com singularidades existentes entre os genótipos. Como nos casos de EF008 e EF011, com dissimilaridade de 8,62; EF004 e EF010, com dissimilaridade de 4,12; e EF001 e EF006, com dissimilaridade de 4,94; além do genótipo EF009, que está mais próximo do EF001, com distância de 5,45.

GENÓTIPOS	EF001	EF002	EF003	EF004	EF005	EF006	EF007	EF008	EF009	EF010	EF011
EF002	33,73										
EF003	41,70	19,09									
EF004	7,23	26,29	37,00								
EF005	41,20	76,35	76,10	45,64							
EF006	4,94	35,78	48,40	5,59	37,63						
EF007	19,93	52,68	52,88	16,97	44,06	13,94					
EF008	14,54	32,70	30,50	7,96	52,91	14,76	10,38				
EF009	5,45	49,72	56,02	11,08	36,40	8,35	12,69	13,93			
EF010	9,09	30,24	40,16	4,12	48,96	4,75	9,32	8,49	10,47		
EF011	8,74	34,15	39,26	6,96	63,60	8,95	20,81	8,62	12,31	10,55	
EF012	42,88	26,65	45,79	39,05	69,24	42,53	43,91	46,87	43,25	38,07	46,41

Tabela 05. Matriz de dissimilaridade entre os genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, baseada na distância generalizada de Mahalanobis (D^2). Feira de Santana, BA, 2015.

O segundo grupo foi formado pelos genótipos EF002, EF003 e EF012, sendo que os dois primeiros demonstraram maior produtividade entre todos os genótipos avaliados e reuniram maior número de características em comum. O genótipo EF012 se aproxima deles pelas características métricas das folhas e das plantas como um todo, se destacando em relação ao comprimento e largura das folhas e suas bases e, ainda, em relação à altura e largura da planta. Estas características provavelmente tiveram maior peso na formação dos dois subgrupos, sendo o primeiro reunindo os genótipos EF002 e EF003, isolando o EF012 no segundo subgrupo, provavelmente por este apresentar maior LP e menores médias para as demais características em relação aos outros dois.

No terceiro grupo ocorreu o isolamento do genótipo EF005, pois com características de maior simetria, esse genótipo apresentou padrão de altura e largura de planta mais uniforme e destacando-se em relação aos demais. Provavelmente, isso impulsionou as elevadas distâncias aos demais genótipos.

Na análise baseada nas variáveis canônicas (VC) foi verificado que as duas primeiras variáveis explicaram cerca de 63% da variância total, sendo a primeira responsável por 39% e a segunda por 24%, adequando-se a uma representação gráfica bidimensional, onde foi apresentada a formação dos grupos (Figura 06).

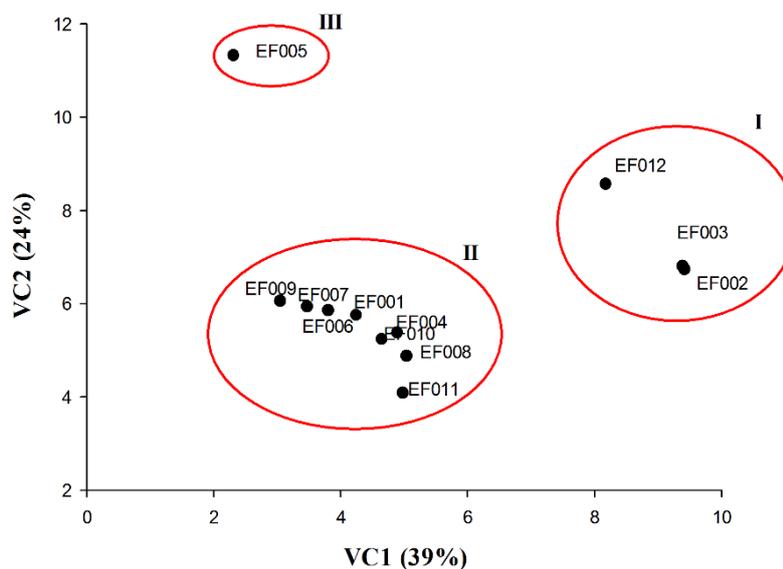


Figura 06. Dispersão gráfica dos escores em relação aos eixos representativos das variáveis canônicas (VC1, VC2) relativos a 12 caracteres estudados em 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

O agrupamento formado pelas variáveis canônicas apresentou resultado idêntico ao método de UPGMA, sendo formado três grupos de genótipos. Esse resultado reforça a escolha do método de variáveis canônicas para representação da importância das variáveis em sincronia com a medida D^2 . O agrupamento resultante da análise de variáveis canônicas reforça a análise de proximidade entre os genótipos realizada com o método de UPGMA. As três variáveis que mais contribuíram na divergência entre os genótipos foram comprimento da base foliar esquerdo (26,71%), massa fresca de folhas (15,27%) e comprimento de folha (12,77%) (Figura 07), que juntas contribuíram com mais de 50% para o agrupamento dos genótipos, contudo, a combinação sinérgica entre as variáveis delimita com mais precisão os grupos formados.

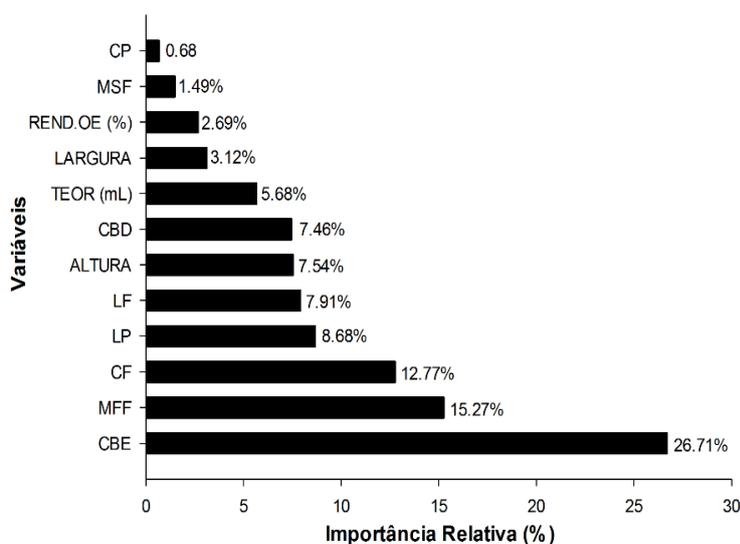


Figura 07. Contribuição relativa (%) das características avaliadas para a divergência entre os 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

As diferentes formas de leitura dos dados e da variabilidade identificada entre os 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa*, em ambas as técnicas empregadas, foi proporcionada pela interação entre essas variáveis, resultando na organização semelhante dos grupos. Esse estudo indica que o comprimento de folha teve grande influência sobre as demais variáveis, sobretudo na massa seca de folhas, sendo essa uma característica de grande importância, ligada diretamente à exploração econômica da espécie. Vale ressaltar o desempenho dos genótipos EF002 e EF003, considerando as condições de desenvolvimento deste experimento. Além disso, a análise multivariada permite a predição da heterose, e alguns cruzamentos podem ser sugeridos, seguindo-se o princípio de se cruzar os genótipos mais distantes e com melhores características de interesse (Aramendiz-Tatis et al., 2011). Sendo assim, os resultados identificados nesse estudo sugerem a possibilidade de ampliação do pool gênico, por meio do cruzamento entre genótipos mais distantes e a conservação desses genótipos, por possuírem características importantes para a exploração sustentável da espécie, baseado em cultivos de pequeno porte e que visem aderir-se a cadeia mercadológica das plantas medicinais. Deste modo, a pressão da erosão genética sobre a espécie pode ser minimizada pela diminuição da exploração extrativista.

Pode-se afirmar, então, que os genótipos mais promissores, com base nas condições climáticas de Feira de Santana/BA e nas variáveis escolhidas no procedimento das avaliações, foram o EF002, EF003, EF005 e EF012, sendo estes representantes das maiores distâncias genéticas e que contemplam características relevantes para um programa de melhoramento da espécie.

4.4. Conclusões

Existe variação genética entre os 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* estudados; as técnicas multivariadas utilizadas detectaram a variabilidade genética existente entre os genótipos; os genótipos EF002, EF003, EF005 e EF012 apresentam potencial para uso em programas de melhoramento, que envolvam hibridação com vistas à exploração da heterose, visando a obtenção de bons materiais para produção de biomassa foliar e, conseqüentemente, maior rendimento de óleo essencial.

4.5. Referências

ANDRADE, A. M.; et al. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 962 – 968, 2010.

ARAMENDIZ-TATIS H; et al. Potencial agronômico e divergência genética entre genótipos de berinjela nas condições do Caribe Colombiano. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 174-180, 2011.

BERTINI, C. H. M.; et al. Desempenho agronômico e divergência genética de genótipos de coentro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 3, p. 409-416, 2010.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda., 2009. 106p.

BLANK, A. F.; et al. Caracterização morfológica e agronômica de acessos de manjerição e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 113-116, 2004.

CARVALHO, L.P.; et al. Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.10, p.1149-1155, 2003.

CRUZ, C. D. Genes – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum – Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CRUZ, C. D. **Programa Genes** – Diversidade genética. 1.ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 278p.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. v.2, Viçosa: Editora UFV, 2006. 585 p.

DALKANI, M.; HASSANI, A.; DARVISHZADEH, R. Determination of the genetic variation in Ajowan (*Carum copticum* L.) populations using multivariate statistical techniques. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 698-705, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FRANCO, C. M.; et al. Bioassay-guided Evaluation of Antinociceptive Properties and Chemical Variability of the Essential Oil of *Hyptis fruticosa*. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1693 – 1699, 2011.

GONÇALVES, L. S. A; et al. Divergência genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparação com descritores multicategóricos. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 364-370, 2008.

HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 129-144, 2012.

HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**, v. 58, p. 1-55, 2012.

IBRAHIM, L.; et al. Characterization and identification of *Origanum* spp. from Lebanon using morphological descriptors. **World Research Journal of Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 04-09, 2012.

KHARAZIAN, N. Morphometric study of some *Salvia* L. (Lamiaceae) species in Iran. **Scientific Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 6, p. 126-137, 2012.

LIMA, A. C. B.; et al. Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* Salmz ex Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 192 – 197, 2013.

MARTUSCELLO, J. A.; et al. Genetic diversity based on morphological data in panicum maximum hybrids. **Revista Brasileira de Zootecologia**, v. 41, n.9, p. 1975-1982, 2012.

MENEZES, I. A. C.; et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. **Fitoterapia**, v. 78, p. 192–195, 2007.

MILLIGAN, G.W.; COOPER, M.C. An Examination of Procedures for Determining the Number of Clusters in a Data Set, **Psychometrika**, v. 50, n. 1, p. 159 – 179, 1985.

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: na evaluation. **Computational Journal**, v. 20, n. 1, p. 359 – 363, 1979.

MOREIRA, I. J. A.; et al. Vasorelaxant effect of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae, dichloromethane extract on rat mesenteric artery. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 762 – 766, 2010.

OLIVEIRA E. M.; et al. Genetic divergence among mentrasto accessions based on RAPD markers at Tocantins State. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 4, p. 290-298, 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2006. **A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Capturado em 7 de maio de 2014. Disponível em <http://www.rproject.org/>

RAO, C. R. **An advanced statistical method in biometric research**. New York: John Wiley & Sons. 390 p. 1952.

SANTOS, M. R. V.; et al. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 186 – 191, 2007.

SILVA, A. B. L.; et al. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salzm. Ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 475 – 479, 2006.

SILVA, W. J.; et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251–3255, 2008.

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

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, p. 33-40, 1962.

5. CAPÍTULO III

Variabilidade genética de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore baseada em marcadores moleculares ISSR

Variabilidade genética de *Eplingiella* Harley & J.F.B.Pastore (LAMIACEAE) baseada em marcadores moleculares ISSR

Anderson de Carvalho Silva⁷; Lenaldo Muniz de Oliveira⁸, José Floriano Barêa Pastore⁹ & Cassio van den Berg⁸

RESUMO – Foram coletadas 18 populações naturais de *Eplingiella* spp. (14 de *E. fruticosa*; 03 de *E. cuniloides* e 01 de *E. brightoniae* Harley.), oriundas de diferentes localidades distribuídas entre Bahia e Sergipe, somando 265 indivíduos. Marcadores moleculares ISSR foram utilizados para acessar a diversidade e a estrutura genética das populações. O DNA total foi extraído por meio do protocolo Doyle-Doyle (1987) (modificado), em seguida 20 iniciadores foram testados, dos quais nove foram selecionados por apresentarem melhores perfis eletroforéticos em gel de agarose (2%). A matriz binária foi computada com auxílio do software GEOCOMPAR II. Estimou-se os parâmetros de diversidade, como o número e percentual de bandas polimórficas (*NBp*; %*Bp*), heterozigosidade esperada (*He*), coeficiente de diferenciação genética (*Gst*), índices de diversidade de Shannon (*I*) e entre populações (*Fst*). Para avaliar a estrutura genética os dados foram submetidos à análise no STRUCTURE (Bayesiano), além da geração de dendrograma pelo método de Neighbor-joining e análise de componentes principais (PCA) com base na matriz de distâncias de Nei. Os nove iniciadores produziram um total de 131 bandas, com pesos moleculares variando entre 300 – 1800 bp, todas polimórficas. A média de bandas polimórficas por iniciador foi de 14,55, enquanto por população foi de 119 bandas, resultando em um percentual médio de 90,8% bandas polimórficas. O índice de diversidade de Nei (*Ne*) variou entre 0,31 e 0,39, enquanto Shannon (*I*) variou entre 0,33 e 0,48. O percentual do coeficiente de diferenciação genética (*Gst*) foi de 0,29. A AMOVA identificou a maior parte da variação molecular dentro das populações (71%), enquanto a variação entre populações foi de 27% e entre espécies de 4%, indicando uma boa estruturação genética. O valor médio de *Fst* foi 0,175, demonstrando boa diferenciação entre as populações. As análises da estrutura pelo método Bayesiano revelou a formação de dois grupos (*K*=2), no entanto, apresentou muitos indivíduos migrantes e elevado nível de miscigenação. O dendrograma gerado pelo método de Neighbor-Joining confirmou a formação de dois grupos,

⁷ Doutorando no Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UEFS;

⁸ Professor Titular do Departamento de Ciências Biológicas da UEFS;

⁹ Professor Adjunto do Departamento de Ciências Biológicas da UFSC, Curitiba-SC.

com boa sustentação para os principais clados (100%). Na análise de componentes principais (PCA) os dois primeiros eixos explicaram 21,06% da variação total entre as populações. Sendo assim, os marcadores moleculares ISSR utilizados foram efetivos na identificação da variabilidade em populações naturais de *Eplingiella* spp. e a estrutura das populações demonstram uma recente diversificação das espécies, não sendo possível inferir sobre os parâmetros evolutivos dessa diversificação.

Palavras-chave – diversidade genética, RGVs, plantas medicinais, alecrim-de-vaqueiro, marcador molecular.

Gentic variability of *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore (LAMIACEAE) based on molecular markers ISSR

ABSTRACT – Eighteen natural populations were collected *Eplingiella* spp. (14 *E. fruticosa*, 03 *E. cuniloides* and 01 *E. brightoniae*) From different localities distributed between Bahia and Sergipe, totaling 265 individuals. ISSR molecular markers were used to assess the genetic diversity and structure of populations. Total DNA was extracted using the Doyle-Doyle (1987) protocol (modified), then 20 primers were tested, of which nine were selected because of their best electrophoretic profiles in agarose gel (2 %). The binary matrix was computed with the aid of GEOCOMPAR II software. We estimated the parameters of diversity, such as the number and percentage of polymorphic bands (*NBP*; % *Bp*), expected heterozygosity (*He*), coefficient of gene differentiation (*Gst*), Shannon diversity index (*I*) and among populations (*Fst*). To assess the genetic structure, the data were subjected to analysis in STRUCTURE (Bayesian) and PCO-MC, besides generating dendrogram by the method of Neighbor-joining and principal coordinates analysis (PCoA) based on the matrix of Nei distances. The nine primers produced a total of 53 bands with molecular weights ranging from 300-1800 bp, all polymorphic. The average number of polymorphic bands per primer was 13.25, while for the population was 49 bands, resulting in an average percentage of 92.5 % polymorphic bands. The diversity index of Nei (*Ne*) ranged between 0.31 and 0.43, while Shannon (*I*) showed a higher amplitude, varying between 0.36 and 0.58. The percentage coefficient of genetic differentiation was 55.92 % (*Gst* = 0.559). The AMOVA identified most of the molecular variation within populations (74 %), whereas the variation between populations was 26%, indicating good genetic structure. The average *Fst* was 0.257, demonstrating good differentiation between populations. The analysis

of the structure by Bayesian methods and PCO-MC revealed the formation of two groups ($K = 2$), however, showed low resolution, with many migrants and individuals high level of miscegenation. The dendrogram generated by the Neighbor -Joining method, confirmed the formation of two groups, with good support for major clades (85.71 %). In principal coordinates analysis (PCoA) the first two axis explained 17.27% of the total variation among populations. Thus, ISSR molecular markers used were effective in identifying variability in natural populations of *Eplingiella* spp. However, increasing the number of bands is necessary to increase the resolution of the genetic structure, providing better delineation of populations

Key words – genetic diversity, PGR's, medicinal plants, “alecrim de vaqueiro”, molecular marker.

5.1. Introdução

A família Lamiaceae reúne 236 gêneros e 7174 espécies (Harley et al., 2004). A subtribo Hyptidinae compreende cerca de 400 espécies que ocorrem em áreas de florestas tropicais sazonalmente secas e savanas abertas, sendo muitas delas encontradas no Brasil (Harley, 2004). Este grupo de plantas apresenta grande importância econômica, devido às propriedades medicinais encontradas em seus representantes, contudo, problemas taxonômicos têm dificultado a identificação das espécies, o que tem motivado recentes revisões filotaxonômicas (Pastore et al., 2011; Harley e Pastore, 2012).

Um estudo amplamente amostrado da sua filogenia envolveu a genotipagem de 180 espécies, incluindo oito não descritas, nesse estudo, onde o gênero *Hyptis* Jacq., juntamente com outros três, apresentaram clado parafilético (Pastore et al., 2011). Sendo assim, em nova publicação, os autores redefiniram a classificação genérica dentro da subtribo, pelo desmembramento de *Hyptis*, que compreendeu 142 novas combinações, 30 lectotipificações novas ou reclassificadas, quatro neótipos, 23 novos sinônimos, oito *stat. nov.*, seis novos nomes genéricos, cinco novos epítetos e quatro novos nomes (Harley e Pastore, 2012).

Dos novos gêneros criados, *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore demonstra substancial importância tanto do ponto de vista do relacionamento taxonômico infragenérico, quanto do seu potencial econômico. Atualmente, três espécies integram o novo gênero: *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *E. cuniloides* (Epling) Harley & J.F.B. Pastore e *E. brightoniae* Harley.

E. fruticosa é um arbusto perene, frequente em zonas de transição entre o litoral e o semiárido, principalmente em áreas antropizadas, de solo arenoso, restritas ao nordeste do Brasil, ocorrendo em caatingas e tabuleiros e ainda em restingas ao longo da costa (Harley e Pastore, 2012; Harley, 2014). Esta planta tem sido amplamente comercializada em feiras livres da região e a infusão de suas folhas é popularmente utilizada como analgésico, anti-inflamatório e anticonvulsivante (Franco et al., 2011). Estudos comprovam os efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório, antioxidante e vasodilatador da espécie (Silva et al., 2006; Santos et al., 2007; Menezes et al., 2007; Andrade et al., 2010; Moreira et al., 2010; Franco et al., 2011; Lima et al., 2013). *E. cuniloides* é um arbusto perene, endêmico de áreas secas e arenosas, em planaltos, no município de Morro do Chapéu, Bahia, também popularmente denominado “alecrim-de-vaqueiro”, porém, seu potencial de uso é ainda desconhecido para a ciência. *E. brightoniae* é oriunda da Serra do Curral Frio, localizada entre os municípios de Umburanas e Sento Sé, na Bahia e tem uma ocorrência tão restrita que está descrita como espécie em risco de extinção, pois seu hábitat natural é constantemente submetido à queimadas e desmatamentos (Harley, 2014).

Atualmente a preocupação com a perda da variabilidade e a extinção de espécies com potencial medicinal tem aumentado a demanda por trabalhos de coleta, preservação e estudo sobre tais plantas. Para conservação e manejo eficiente destas espécies, a composição genética dos acessos coletados em diferentes regiões deve ser avaliada (Carvalho et al., 2009). Nesse sentido, estudos de variabilidade genética representam uma importante ferramenta para o entendimento das relações de distribuição das espécies e para análise de processos evolutivos que podem ser usados em pesquisas de recursos genéticos vegetais (Zhang et al., 2010). Deste modo, a análise da diversidade genética torna possível selecionar genótipos de interesse para a conservação adicional em bancos de germoplasma, com vista a preservar a variabilidade de populações naturais e estimular a desaceleração do ritmo de erosão genética (Bertoni et al., 2010). O desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas tem facilitado a realização dessas análises (Zhang et al., 2010).

Nesse contexto, é comum a utilização de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética de populações, sobretudo os que são baseados no método de reação de polimerase em cadeia (PCR). Eles podem ser encaixados em diferentes classes, a depender da sua ligação, zona de restrição ou forma de ação. Marcadores dominantes, por exemplo, acessam a variabilidade independente da forma de representação do genótipo, conseqüentemente, heterozigotos não são distinguíveis de um homozigoto dominante (Kothera et al., 2007; Djè et

al., 2010; Jia et al., 2011). Também chamados de DNA arbitrariamente amplificado (AAD, sigla em inglês), os principais marcadores dominantes utilizados em estudos de diversidade hoje são: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (Archibald et al., 2006; Nybom, 2004). Esses marcadores também são muito utilizados na delimitação interespecífica (Hausdorf e Hennig, 2010).

A técnica de ISSR combina a maioria dos benefícios do AFLP e da análise em microssatélites (SSR) com a universalidade dos marcadores RAPD. Segundo Archibald et al. (2006), ISSRs possuem alta reprodutibilidade devido ao uso de cadeias mais longas (16 – 25 nucleotídeos) em comparação com os RAPDs (-10 nucleotídeos), permitindo o uso subsequente de uma maior temperatura de anelamento (45 – 60°C), proporcionando um maior rigor na análise. Além disso, eles apresentam menor custo em relação aos AFLP e não são específicos como os microssatélites, sendo possível sua utilização independente da espécie, o que propicia maior versatilidade à técnica (Fang e Roose, 1997). Tem sido comum a utilização desta técnica na identificação da variabilidade entre populações, sobretudo de espécies aromáticas da família Lamiaceae, sejam elas conservadas *ex situ*, como no caso de *Salvia* sp. (Javan et al., 2012), *Satureja* spp. (Kameli et al., 2013; Saidi et al., 2013) e *Ocimum* spp. (Chen et al., 2013), ou acessadas em seu ambiente natural, como no caso de *Mentha cervina* L. (Rodrigues et al., 2013), *Lamiophlomis rotata* (Benth. ex Hook. f.) Kudô (Liu et al., 2006) e *Cunila menthioides* Berg. (Agostini et al., 2010).

O estreito relacionamento das espécies de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore, comprovado na filogenia de Hyptidinae, revelou lacunas sobre a delimitação infragenérica deste grupo, além disso, o potencial medicinal e aromático baseado nas avaliações de *E. fruticosa* e o elevado nível de endemismo das outras duas espécies do gênero, colocando-as em situação de risco, impulsionaram importantes questionamentos a cerca do complexo formado, da delimitação das espécies dentro deste, como também da conservação desses recursos genéticos (Pastore et al., 2011; Harley e Pastore, 2012; Harley, 2014). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar a diversidade genética existente dentro e entre populações naturais de *Eplingiella*, por meio de marcadores ISSR, visando avaliar os níveis de variação inter e intraespecíficas, e identificar o grau de diferenciação genética das populações e das espécies.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Material vegetal

Foram realizadas, entre os anos de 2011 e 2013, viagens para a coleta de amostras das espécies de *Eplingiella* (*E. fruticosa*, *E. cuniloides* e *E. brightoniae*) em diferentes locais de ocorrência natural. Um total de 265 amostras, correspondentes a 18 populações com diferentes origens entre os estados de Bahia e Sergipe, Nordeste, Brasil, foram incluídas nas análises. As distâncias geográficas entre as populações variaram de 21 (entre EF2088 e EF2089) a 634 km (entre EF1850 e EF1893). A amostragem foi feita considerando a distribuição heterogênea dos indivíduos no hábitat, perfazendo uma média de 15 indivíduos por população. Estas foram nomeadas segundo a numeração contínua registrada no formulário de extração. Extrações, quantificações e captura dos dados foram procedidas no Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas (LAMOL) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Vouchers para cada população foram depositados no Herbário da mesma instituição (HUEFS) (Tabela 06). Aliquotas de DNA total de cada amostra foram utilizadas na preparação das análises, enquanto o excedente foi adicionado ao Banco de DNA do LAMOL/UEFS (GenBank), sendo conservada em ultrafreezer à menos 80°C.

Tabela 06. Identificação da população, nome da espécie, município, coordenadas geográficas, número de indivíduos e número de voucher para as 18 populações de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

População	Espécie	Município	Coordenadas Geográficas	Nº de Indivíduos	Voucher
EF1850	<i>Eplingiella fruticosa</i>	Morro do Chapéu/BA	11°35'06,7" S 41°12'22,2" O	15	Pastore, J.F.B. 3260
EF1855	<i>Eplingiella fruticosa</i>	Santa Terezinha/BA	12°42'19,4" S 39°33'58,3" O	17	Pastore, J.F.B. 3270
EF1864	<i>Eplingiella fruticosa</i>	Rafael Jambeiro/BA	13°33'06,8" S 39°27'18,3" O	15	Pastore, J.F.B. 3272
EF1888	<i>Eplingiella fruticosa</i>	São Cristóvão/SE	10°55'33,6" S 37°11'56,1" O	15	Carvalho-Silva, A. 260
EF1893	<i>Eplingiella fruticosa</i>	Japarutuba/SE	10°35'91,4" S 36°59'28,4" O	15	Carvalho-Silva, A. 261
EF1921	<i>Eplingiella fruticosa</i>	Itaporanga D'ajuda/SE	11°09'04,6" S 37°24'10,7" O	13	Carvalho-Silva, A. 262
EF1922	<i>Eplingiella fruticosa</i>	Esplanada/BA	11°45'24,8" S 37°56'32,9" O	10	Carvalho-Silva, A. 263
EF1932	<i>Eplingiella fruticosa</i>	Alagoinhas/BA	12°10'06,7" S 38°27'14,0" O	14	Carvalho-Silva, A. 264
EF1988	<i>Eplingiella fruticosa</i>	Simão Dias/SE	10°43'48,2" S 37°46'46,5" O	15	Carvalho-Silva, A. 266
EF1989	<i>Eplingiella fruticosa</i>	Itabaiana/SE	10°46'10,4" S 38°21'32,0" O	15	Carvalho-Silva, A. 265

EF2088	<i>Eplingiella fruticosa</i>	São Gonçalo/BA	12°23'30,6" S 38°53'17,5" O	15	Carvalho-Silva,A. 268
EF2089	<i>Eplingiella fruticosa</i>	Feira de Santana/BA	12°11'48,8" S 38°58'01,6" O	15	Carvalho-Silva,A. 269
EF2091	<i>Eplingiella fruticosa</i>	Saubara/BA	12°37'28,9" S 39°48'31,2" O	15	Carvalho-Silva,A. 267
EF2347	<i>Eplingiella fruticosa</i>	Umburanas/BA	10°23'27,1" S 41°19'10,7" O	15	Carvalho-Silva,A. 337
EC1842	<i>Eplingiella cuniloides</i>	Morro do Chapéu/BA	11°34'14,5" S 41°10'32,4" O	14	Pastore, J.F.B. 3250
EC1851	<i>Eplingiella cuniloides</i>	Morro do Chapéu/BA	11°37'40,3" S 41°00'01,8" O	15	Pastore, J.F.B. 3264
EC1856	<i>Eplingiella cuniloides</i>	Morro do Chapéu/BA	11°35'53,0" S 41°09'49,5" O	15	Pastore, J.F.B. 3267
EB2326	<i>Eplingiella brightoniae</i>	Umburanas/BA	10°24'10,6" S 41°18'40,3" O	17	Carvalho-Silva,A. 338

5.2.2. Extração e amplificação de DNA

Amostras de folhas (aprox. 500 mg) foram coletadas em gel de CTAB (35% NaCl₂ e 3% CTAB) para a extração de DNA usando o protocolo de CTAB 2X (Doyle e Doyle, 1987). O DNA extraído foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão de borato de sódio 1X (SB) (Brody & Kern 2004), corado com brometo de etídio na presença do marcador *ladder* 100pb (INVITROGEN®) e posteriormente fotografado e quantificado em um transluminador UV (Spectroline), acoplado ao sistema Kodak EDAS 1D 3.6.

Foram testados 16 iniciadores. O DNA genômico total foi amplificado por meio de reação em cadeia de polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) seguindo o protocolo modificado de Wolfe et al. (1998). Cada reação de amplificação dos fragmentos foi feita em um volume total de 10 µL, contendo 4,0µL do Kit Top Taq *Master Mix* (QIAGEN Inc., Hilden, Germany), 2,0 µL de H₂O ultrapura de alta qualidade (parte do Kit de amplificação), 1,6 µL de TBT (Samarakoon et al., 2013), 2,0 µL do DNA da amostra diluído (5U/mL) e 0,4µL do iniciador 0,5M. As amplificações foram realizadas em termociclador modelo Esco Healthcare *Swift® Max Pro*, sendo iniciadas com um ciclo de desnaturação de 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de 40 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 45 – 52°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, acrescido de duas variações, a primeira à 94°C e a segunda à 44°C, ambas por 45 segundos, seguidas de uma extensão final a 72°C por 7 minutos, para os 265 indivíduos.

Os produtos da reação de PCR foram separados e visualizados em géis de agarose 2,0% em tampão SB 1X, na presença do marcador *ladder* de 100 pares de bases, em seguida, corados em solução de brometo de etídio a 10% durante uma hora. As bandas foram

visualizadas em transluminador UV (Spectroline) e documentadas em sistema Kodak 1D 3. Para verificar a reprodutibilidade dos resultados, cada PCR e corrida de amplificação de gel foi repetida duas vezes e apenas os fragmentos de ISSR amplificados, presente em ambas as pistas foram considerados. As fotografias dos géis foram analisadas usando o software GELCOMPARI (Applied Maths), para estabelecer comparações padronizadas entre todos os indivíduos em diferentes géis e marcando as regiões homólogas em relação a presença/ausência de bandas.

5.2.3. Análise de dados

Fragmentos de ISSR amplificados, entre 300 e 1800 pb, foram classificados como presente (1) ou ausente (0), cada um dos quais foi tratado como um carácter independente, desconsiderando sua intensidade. Os fragmentos com o mesmo peso molecular foram considerados como o mesmo locus. A matriz binária (1/0), calculada com GELCOMPARI (Applied Maths), foi utilizada na estimativa de parâmetros com vários algoritmos e metodologias.

Variações genéticas dentro e entre as populações foram examinadas pelos seguintes parâmetros: número de bandas polimórficas (Nb), porcentagem de bandas polimórficas ($\%Bp$), heterozigotidade esperada ou diversidade genética de Nei (1973) (He), coeficiente de diferenciação genética (G_{ST}) (Culley et al., 2002), índice de diversidade de Shannon (I) e a distância genética entre populações (F_{ST}), para fins de análise populacional e sua conservação (Pearse e Crandall, 2004), sendo os dois últimos de grande importância para avaliar a estrutura populacional e o fluxo gênico (Takahata e Nei 1984). As análises foram realizadas utilizando-se os softwares POPGENE v.1.32 (Yeh; Yang e Boyle, 1997) e GENALEX v. 6.5 (Peakall e Smouse, 2011). A Distância genética de Nei (1978) e a estruturação genética (F_{ST}), foram estimadas através do AFLP-Surv v. 1.0 (Vekemans et al., 2002). A partir destas distâncias (rodadas em 1000 repetições) foi realizada uma análise de agrupamento, baseada na matrix de distâncias genéticas de Nei (1973), pelo método Neighbor-Joining, usando software PHYLIP v. 3.695 (Felsenstein, 2007). Foram realizadas mil repetições de análise bootstrapping para avaliar a confiança estatística de cada ramo.

Foram realizadas análises de componentes principais (PCA) e análise molecular de variância (AMOVA) usando GENALEX 6.5 (Peakall e Smouse, 2011). A AMOVA foi aferida

de duas formas, primeiro acessando a variabilidade em um nível, entre populações e dentro das populações e, em seguida, em dois níveis, inferindo a variabilidade também entre espécies.

Para verificar a relação entre as populações, obtendo a representação da estrutura genética delas, foi utilizado o método bayesiano, pelo software STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al., 2000), sendo o resultado confirmado pelo STRUCTURAMA (Huelsenbeck e Andolfatto, 2007; Huelsenbeck et al., 2011). Estes métodos avaliam o número real de populações através da homogeneidade destas (cálculo do Delta K) com a finalidade de identificar os grupos populacionais e as relações entre as populações. Eles permitem diferenciar os grupos de forma independente (Evanno et al., 2005). No caso do STRUCTURE o resultado da análise é fornecido na forma de gráfico representado por cores, onde cada cor marca a estruturação genética da população e define as suas relações com as demais populações.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Diversidade genética

Nesse estudo foram testados 16 iniciadores ISSR, dos quais apenas nove apresentaram desempenho satisfatório sobre as amostras de DNA avaliadas, gerando padrões eletroforéticos aceitáveis para a análise. Eles produziram uma média de 14,55 bandas polimórficas por iniciador, dando indícios de elevado nível de polimorfismo (Tabela 07).

Tabela 07. Nome, sequência, temperatura de anelamento (°C) e número de bandas polimórficas dos iniciadores utilizados na análise das populações de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

Iniciador	Sequência ^a	Anelamento (°C)	Bandas Polimórficas
MAO	(CTC) ₄ -RC	50	16
DAT	(GA) ₇ -RG	49	16
TERRY	(GTG) ₄ -RC	52	12
AW3	(GT) ₆ -RG	47	14
MANNY	(CAC) ₄ -RC	52	16
ISSR 901	(GT) ₆ -YR	52	13
ISSR 4	(CA) ₈ GT	49	15
ISSR 6	(CTG) ₈ G	51	17
ISSR 7	(AG) ₈ -YC	51	12
Total	-	-	131

^aY = C ou T; R = A ou G

A amplificação por PCR dos 265 indivíduos, para os nove iniciadores, gerou um total de 131 (100%) bandas polimórficas (*NBp*), correspondendo a um número médio de 119 (90,8%) bandas polimórficas por população (Tabela 08). Todos os iniciadores produziram elevados índices de polimorfismo para as 18 populações, no entanto, não foi identificada a presença de bandas exclusivas entre elas. O percentual de bandas polimórficas (*%Bp*) variou entre 75,6% (EF1989) a 96,9% (EB2326), com uma média de 90,8% de polimorfismo. Os índices de diversidade de Nei (*He*) e Shannon (*I*) corresponderam ao resultado identificado acima, variando entre 0,30 e 0,39 para *He* e 0,37 e 0,48 para *I*, respectivamente, para as populações EF1989 e EB2326. Sendo assim, a população EF1989 registrou a menor diversidade genética, enquanto a população EF2326 a maior diversidade intrapopulacional (Tabela 08).

Tabela 08. Número de bandas polimórficas (*NBp*), percentual de bandas polimórficas (*%Bp*), heterozigidade esperada (*He*) e índice de diversidade de Shannon (*I*) para 18 populações naturais de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

Ordem	População	<i>NBp</i>	<i>%Bp</i>	<i>He</i>	<i>I</i>
1	EF1850	120	91,6	0,38	0,47
2	EF1855	117	89,3	0,35	0,43
3	EF1864	122	93,1	0,37	0,46
4	EF1888	123	93,9	0,38	0,46
5	EF1893	123	93,9	0,36	0,44
6	EF1921	117	89,3	0,36	0,43
7	EF1922	116	88,5	0,37	0,41
8	EF1932	119	90,8	0,35	0,46
9	EF1988	117	89,3	0,36	0,43
10	EF1989	99	75,6	0,30	0,37
11	EF2088	120	91,6	0,35	0,43
12	EF2089	119	90,8	0,35	0,41
13	EF2091	118	90,1	0,35	0,43
14	EF2347	113	86,3	0,35	0,44
15	EC1842	112	85,5	0,32	0,39
16	EC1851	121	92,4	0,38	0,46
17	EC1856	119	90,8	0,35	0,42
18	EB2326	127	96,9	0,39	0,48
Media	-	119	90,8	0,36	0,43
Total	-	131	100,0	--	--

Os resultados obtidos são congruentes os encontrados em alguns trabalhos realizados com populações naturais de espécies de Lamiaceae no mundo. Lal et al. (2012) identificaram

100% de bandas polimórficas entre populações de *Ocimum* amostrados no Iran, enquanto Liu et al. (2006) estudando a diversidade genética em populações de *Lamiophlomis rotata* havia identificado cerca de 96% de polimorfismo, com índices de diversidade de Shannon (H) variando entre 0,22 e 0,42. Song et al. (2010) encontrou 100% de polimorfismo, além de 0,195 de diversidade genética de Nei (H_e) e 0,33 de índice de Shannon (H) para populações naturais de *Salvia miltiorrhiza* Bunge de diferentes regiões na China. Possivelmente, esses resultados foram análogos aos do presente estudo, pois os táxons estudados apresentam características semelhantes à *E. fruticosa*, como ocorrência regional, grandes populações, alogamia, anemocoria e ordem de sucessão pioneira. Segundo Nybom (2004), essas características proporcionam, em geral, médias em torno de 0,35 para diversidade dentro de populações (H_e).

No entanto, outros trabalhos encontraram baixos níveis de diversidade em suas populações, como no caso do estudo com *Thymus algeiensis* Boiss & Reut. e *T. capitatus* Hoffmanns & Link, no qual registrou-se polimorfismo médio de 80,94 e 62,88% (Ali et al., 2012). Kameli et al. (2013) registrou valores médios entre 73,68 e 52,63% de bandas polimórficas em populações de *Satureja* spp., embora com médias elevadas para os índices de Shannon (0,46) e Nei (0,42). Outro estudo realizado com populações de *Mentha cervina* L., totalizando 192 indivíduos amostrados em diferentes regiões de Portugal registrou valores de polimorfismo e diversidade inferiores aos identificados nesse trabalho, com percentual médio geral de bandas polimórficas de 44,4% e valores médios dos índices de Nei (H_e) e Shannon (H) de 0,32 e 0,23, respectivamente (Rodrigues et al., 2013). Essas espécies, contudo, apresentam uma distribuição restrita e fragmentada, o que pode ter levado ao estreitamento de suas bases genéticas (Nybom, 2004; Rodrigues et al., 2013).

5.3.2. Diferenciação genética

A AMOVA, considerando um único nível hierárquico, mostrou que a maior parte da variação está contida dentro das populações (71%), restando 29% da variação contida entre as populações, o que indica uma forte estruturação genética (Tabela 09). Considerando dois níveis, quando as populações são agrupadas por espécie, a proporção da variância dentro das populações diminuiu (69%), assim como na variância dentro das populações (27%), sendo atribuído 4% da variação para a diferenciação entre as espécies. Isso pode indicar que existe pouca diferenciação em nível de espécie, ou ainda que o método utilizado não foi sensível às diferenciações genéticas entre elas, embora o resultado tenha sido estatisticamente

significativo. Além disso, essas taxas revelam a grande diversidade existente entre as populações amostradas, confirmando os valores de *He* e *I*.

É comum encontrar resultados similares em estudos correlatos, como no caso do estudo de diversidade genética em espécies do gênero *Satureja*, na qual a variação dentro das populações foi significativamente superior (79 – 72%) que a variação entre populações (21 – 28%) (Kameli et al., 2013; Saidi et al., 2013). Contudo, valores de variabilidade entre populações acima de 25% indicam a boa estruturação destas, como observado também nas populações de *Dicerandra* sp., onde a variação entre os táxons chegou a atingir o valor de 48,2% (Martins, 2007). O mesmo ocorreu com as populações de *Mentha cervina*, onde a variação entre populações deteve 49%, nesse caso o valor se aproxima do máximo de variação identificada entre diferentes populações (50%) (Rodrigues et al., 2013).

Tabela 09. Análise molecular de variância (AMOVA) de dados ISSR utilizados para determinar a estrutura genética para diferentes níveis hierárquicos das 18 populações de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

Fonte de Variação	*g.l.	SQ	QMD	Variância	(%)	Φ_{st}	<i>P</i>
<i>Eplingiella</i> ssp.							
Entre populações	17	2269,085	133,476	7,778	29%	0,290	< 0,01
Dentro de populações	247	4699,503	19,026	19,026	71%		< 0,01
Táxons: <i>E. fruticosa</i>; <i>E. cuniloides</i> e <i>E. brightoniae</i>.							
Entre espécies	2	377,938	188,969	1,086	4%	0,040	< 0,01
Entre populações	15	1891,147	126,076	7,346	27%	0,279	< 0,01
Dentro de populações	247	4699,503	19,026	19,026	69%	0,307	< 0,01

*g.l., graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; QMD, quadrado médio do desvio; Variância; Porcentagem de variância; Φ_{st} , diferenciação genética, *P*, valor de significância de *p*.

O valor médio do coeficiente de diferenciação genética (*Gst*) entre as populações de *Eplingiella* spp. foi 0,29, indicando um elevado grau de diferenciação genética entre as populações, assim como Φ_{st} apresentado na tabela 10, que representa o valor de indivíduos tomados ao acaso dentro de cada população, em relação a indivíduos tomados ao acaso em toda a amostra (Meirmans, 2006). Por outro lado, o valor médio de *Fst* (0,175) demonstrou uma moderada diferenciação entre as populações. Segundo Wright (1978), variações na taxa de *Fst* podem indicar o nível de diferenciação entre os grupos, sendo baixa (0,05 – 0,15), moderada (0,15 – 0,25) ou grande (> 0,25). Esse resultado corrobora com o registrado para as espécies de *Satureja*, que apresentaram valor de *Fst* médio de 0,205 (Saidi et al., 2013). Contudo, resultados

com espécies de *Dicerandra* diferem do identificado aqui, apresentado média de 0,129 para tal estimativa, demonstrando baixa diferenciação entre as populações estudadas (Martins, 2007).

5.3.3. Relacionamento genético

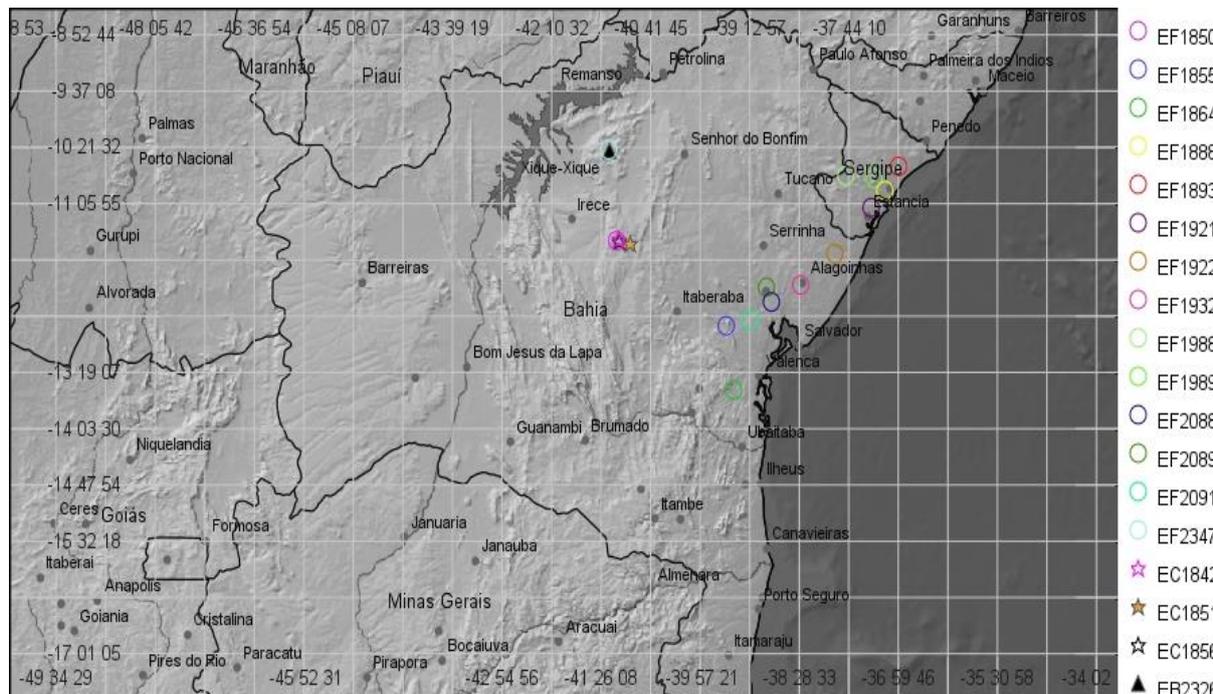


Figura 08. Mapa com os pontos georreferenciados mostrando o local de coleta de cada população de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore, Feira de Santana, BA, 2015.

A análise sobre o relacionamento e a estrutura genética das populações, pelo método bayesiano do STRUCTURE, resultou na formação três picos, indicando três possibilidades de atribuição dos indivíduos às populações reais (Figura 09 e 10). Aplicações deste método incluem demonstração da estrutura populacional presente, identificando as populações distintas geneticamente, atribuindo indivíduos às populações e identificando populações e indivíduos migrantes ou miscigenadas (Pritchard et al., 2010). O pico $K=2$, indicando a formação de dois grupos para as 18 populações de *Eplingiella* sp., foi o mais expressivo, ainda assim, com muitos indivíduos migrantes, demonstrando elevado nível de miscigenação entre eles. Esse resultado foi ainda confirmado pela análise do STRUCTURAMA (Huelsenbeck et al., 2011), fortalecendo a possibilidade do melhor ajuste ser feito em dois grandes grupos genéticos entre as populações amostradas.

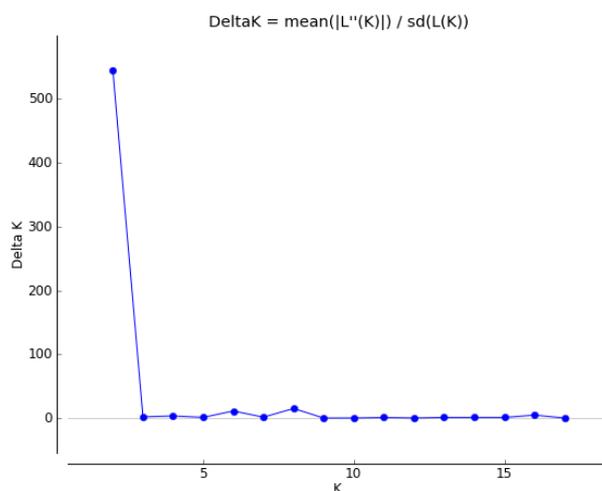


Figura 09. Valores de delta (K) segundo correção de Evanno (2005), mostrando o maior valor de K = 2, seguido dos picos K = 6 e K = 8, Feira de Santana, BA, 2015.

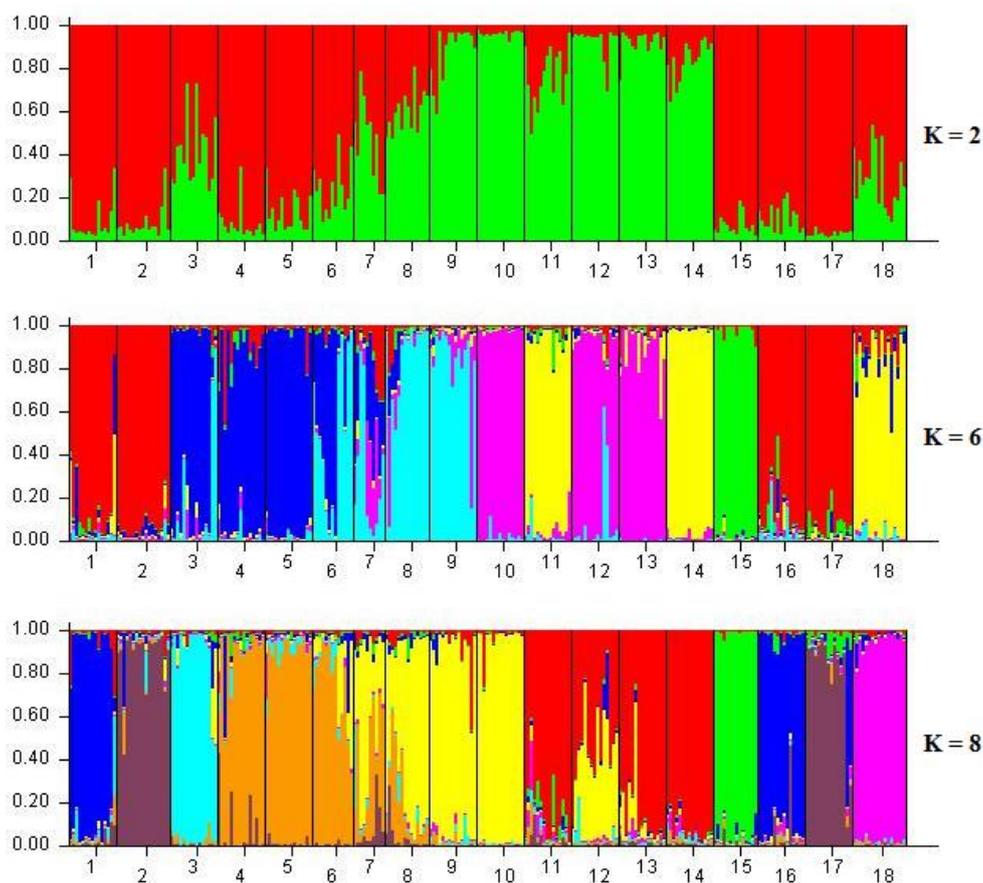


Figura 10. Três possibilidades de proporção de mistura Bayesiana entre 18 populações naturais de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore. (K = 2; K = 6; K = 8) Feira de Santana, BA, 2015.
 *Populações: 1 = EF1850; 2 = EF1855; 3 = EF1864; 4 = EF1888; 5 = EF1893; 6 = EF1921; 7 = EF1922; 8 = EF1932; 9 = EF1988; 10 = EF1989; 11 = EF2088; 12 = EF2089; 13 = EF2091; 14 = EF2347; 15 = EC1842; 16 = EC1851; 17 = EC1856; 18 = EB2326.

Apesar do elevado nível de miscigenação, as populações 1 (EF1850), 2 (EF1855), 3 (EF1864), 4 (EF1888), 5 (EF1893), 6 (EF1921), 15 (EC1842), 16 (EC1851), 17 (EC1856) e 18 (EB2326) possuem predominantemente o mesmo pool genético, sendo então alocadas no mesmo grupo, mesmo compreendendo forte mistura genética interespecífica, pois além das populações de *E. fruticosa* (EF1850 – EF1921), foram agrupadas populações de *E. cuniloides* (EC1842 – EC1856) e *E. brightoniae* (EB2326). Isso pode ocorrer devido ao acesso de homologies por co-migração de bandas, padrão em marcadores dominantes, no qual é possível que bandas co-migrantes representem diferentes locus, que parecem homólogos por possuírem aproximadamente o mesmo tamanho, ou locus que são idênticos devido a convergências (Archibald et al., 2006). Além disso, espécies alógamas, com recente diversificação, tendem a apresentar maior variação alélica dentro das populações, podendo conservar boa parte da carga genética ancestral (Maia et al., 2010).

As populações 9 (EF1988), 10 (EF1989), 11 (EF2088), 12 (EF2089), 13 (EF2091) e 14 (EF2347) compartilham predominantemente o mesmo pool gênico, sendo reunidos no grupo oposto. Por outro lado, nas populações 7 (EF1922) e 8 (EF1932), o pool genético é compartilhado entre características dos dois grupos formados, impossibilitando a análise da relação destes dentro de cada grupo individualmente. Isso ocorre porque neste método os indivíduos da amostra são atribuídos (probabilisticamente) às populações, ou em conjunto para duas ou mais populações, se seus genótipos indicam que eles são misturados (Pritchard et al., 2010). É importante também salientar que as espécies estudadas aqui, possuem características morfológicas muito próximas, além disso, *E. cuniloides* e *E. brightoniae* apresentam ocorrências muito restritas e compartilham essa ocorrência com *E. fruticosa*, nesse sentido, pode ser que hajam trocas genéticas entre elas em algum nível. Além disso, o padrão apresentado revela traços pleiomórficos em características próximas às três espécies.

O segundo pico (Figura 09), mostrou a possibilidade de formação de seis populações. Ainda que também se perceba forte miscigenação, nesse caso, os grupos ficaram arrançados da seguinte forma: primeiro os indivíduos das populações 1 (EF1850), 2 (EF1855), 16 (EC1851) e 17 (EC1856) formando o grupo representado majoritariamente em vermelho; depois 3 (EF1864), 4 (EF1888) e 5 (EF1893) representado em azul; 6 (EF1921), 7 (EF1922), 8 (EF1932) e 9 (EF1988) formando o grupo predominantemente ciano, porém com os dois primeiros revelando maior nível de mistura genética; as populações 10 (EF1989), 12 (EF2089) e 13 (EF2091), com representação em lilás; 11 (EF2088), 14 (EF2347) e 18 (EB2326) representada em amarelo e isolando a população 15 (EC1842) de cor verde. Nessa situação, a forte mistura

identificada pode estar relacionada à baixa intensidade do pico junto à distribuição em um número maior de grupos, o que pode forçar o agrupamento de indivíduos pouco relacionados em uma mesma população. Contudo, há casos onde o agrupamento se justifica pela facilidade de explicação biológica, sendo, em certo nível, desconsiderados os percentuais de miscigenação. O mesmo pode ocorrer para os indivíduos agrupados na terceira possibilidade, onde o pico $K = 8$ também foi de baixa intensidade e formou um número maior de grupos. Os indivíduos amostrados foram atribuídos a oito populações, também com forte mixtura genética, onde se agrupou os indivíduos da população 1 (EF1850) e 16 (EC1851), marcados com cor azul predominante; 2 (EF1855) e 17 (EC1856), em roxo; 3 (EF1864) isolada em ciano; 4 (EF1888), 5 (EF1893) e 6 (EF1921) em laranja; 7 (EF1922), 8 (EF1932), 9 (EF1988) e 10 (EF1989) predominantemente amarelo.

No dendrograma gerado pelo método de Neighbor-Joining, os dois principais clados formados apresentam boa sustentação (100%) e formam dois clados, análogos ao identificado pelo STRUCTURE (Figura 11). Contudo, assim como nos métodos anteriores, pouco se pode relacionar da formação dos grupos com a distribuição geográfica das populações.

No CLADO I, tem-se o agrupamento das populações EF1855, EF1850, EC1842, EC1851 e EC1856, deste modo, nota-se uma formação mista, com populações prioritariamente pertencentes a espécies diferentes, sendo *E. fruticosa* e *E. cuniloides*. No entanto, as populações de *E. cuniloides* estão diretamente relacionadas à população EF1850, pois compartilham a mesma origem geográfica. Ainda assim, é possível que tenha havido mistura entre as amostras destinadas a cada população quando da extração de seus DNA's nucleares, pois a presença da população EF1855 (Santa Terezinha), não pode ser explicada, senão por uma grande pressão convergente.

Dentro desse clado é possível também visualizar a formação de subgrupos. Deste modo, o subgrupo formado pelas populações EF1850 e EC1851, apesar de pertencerem a espécies atualmente distintas, aparentemente conservam composição genética muito próxima e, provavelmente, ainda exista troca genética entre elas (ambas de Morro do Chapéu), o que pode mudar a configuração das espécies. O mesmo pode ocorrer com o subgrupo formado pelas populações EC1842, EC1856 e EF1855, porém, como relatado, essa última população aparentemente não estaria diretamente arranjada neste grupo e, ainda assim, há possibilidade de terem sido levadas via dispersão anemocórica, tendo em vista que as sementes *E. fruticosa* apresentam forte dormência (Figura 11).

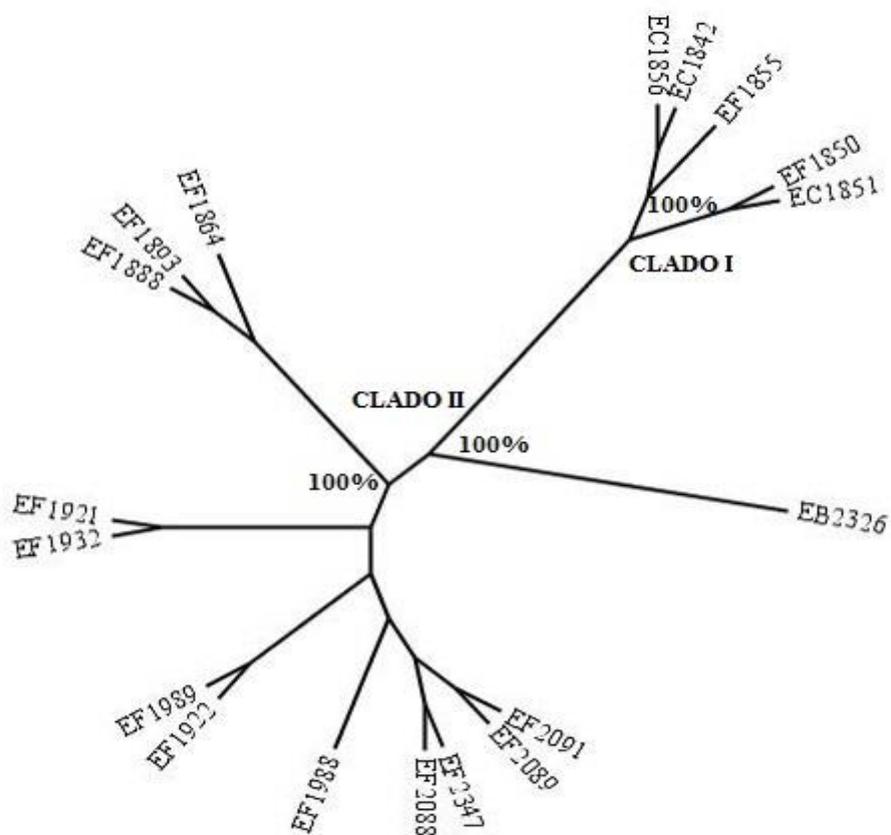


Figura 11. Dendrograma Neighbor-Joining baseado na matriz de distância genética de Nei para as 18 populações de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

O isolamento da população EB2326 (100%) no CLADO II pode ser explicado por pertencer à espécie *Eplingiella brightoniae* Harley, recentemente descrita para a ciência, endêmica e de ocorrência restrita aos campos rupestres da Serra do Curral Frio, localizada entre os municípios de Sento Sé e Umburanas (Harley, 2014). No entanto, esta população também está intimamente relacionada às demais populações deste clado. Ainda no CLADO II, o subgrupo formado por EF1864, EF1888 e EF1893, pode estar relacionado aos locais de origem, pois apesar da distância entre tais populações, e da existência de barreira física entre elas, as características edafoclimáticas das três origens apresentam similaridades. Neste grupo, é possível inferir forte influência desses fatores sobre a determinação genética das populações. Além disso, a inclusão das populações EF1864 e EF1888 neste grupo podem estar relacionadas ao fator de resiliência das populações do clado, pois coexistem em locais alvos de frequentes queimadas. Nos subgrupos formados por EF1921 e EF1932, e EF1922 e EF1989, a relação existente entre as populações também tende à convergência por pressões ambientais, visto que essas foram coletadas sobre composições edafoclimáticas correlacionadas, de solo areno-

pedregoso, a pleno sol, com boa disponibilidade hídrica ao longo do ano (800 à 1300 mm). Por fim, o último subagrupamento analisado, com as populações EF1988, EF2088, EF2089, EF2091 e EF2347, parecem ter convergido pela aridez característica dos ambientes nos quais foram coletadas.

De modo geral, a estratificação das populações e subpopulações das três espécies do gênero *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore reforçam a ideia de um ancestral comum, de recente diversificação, em curto espaço evolutivo, pois o aspecto do relacionamento entre as espécies e populações e, ainda, a ampla diversidade genética presente, revelam a possibilidade de que estas espécies ainda estejam em processo de diferenciação gênica.

Os resultados discutidos acima, principalmente em relação à mistura das populações nos agrupamentos, podem ser melhores compreendidos pela análise de componentes principais (PCA), que representam o relacionamento entre as populações segundo o estabelecimento de autovalores e autovetores ligados a matriz de similaridade (Figura 12). As duas primeiras coordenadas principais explicaram apenas 21,06% da variação total, demonstrando o relacionamento genético confuso, porém integrado das populações estudadas. Neste caso, não foi possível observar por meio do gráfico de dispersão (Figura 12), a separação das populações em grupos. O padrão demonstrado nesta análise comporta inferência de um único grupo (espécie), amplamente diverso. Confirmando mais uma vez a grande miscigenação genética e também dando indícios de uma muito recente diversificação das espécies, mesmo que não seja possível aqui, confirmar a delimitação taxonômica e evolutiva das mesmas. Sendo assim, é possível relacionar a dispersão das populações com o comportamento observado no modelo Bayesiano (Figura 10) e sua distribuição representando a miscigenação anteriormente registrada.

Pode-se afirmar, então, que o número de bandas polimórficas identificadas (131 bandas) foi suficiente para delimitar a estrutura genética dos grupos formados, contudo, não foi possível tirar conclusões mais acuradas sobre a delimitação das espécies. Além disso, a recente diversificação desse grupo pode ser a explicação para o nível de homologia identificado aqui. O fator alogamia relacionado à recente irradiância dos táxons pode gerar uma série de problemas na delimitação da estrutura genética de suas populações, sendo esta uma situação comumente relatada em estudos com espécies nativas e endêmicas de recente evolução taxonômica (Archibald et al., 2006a; 2006b).

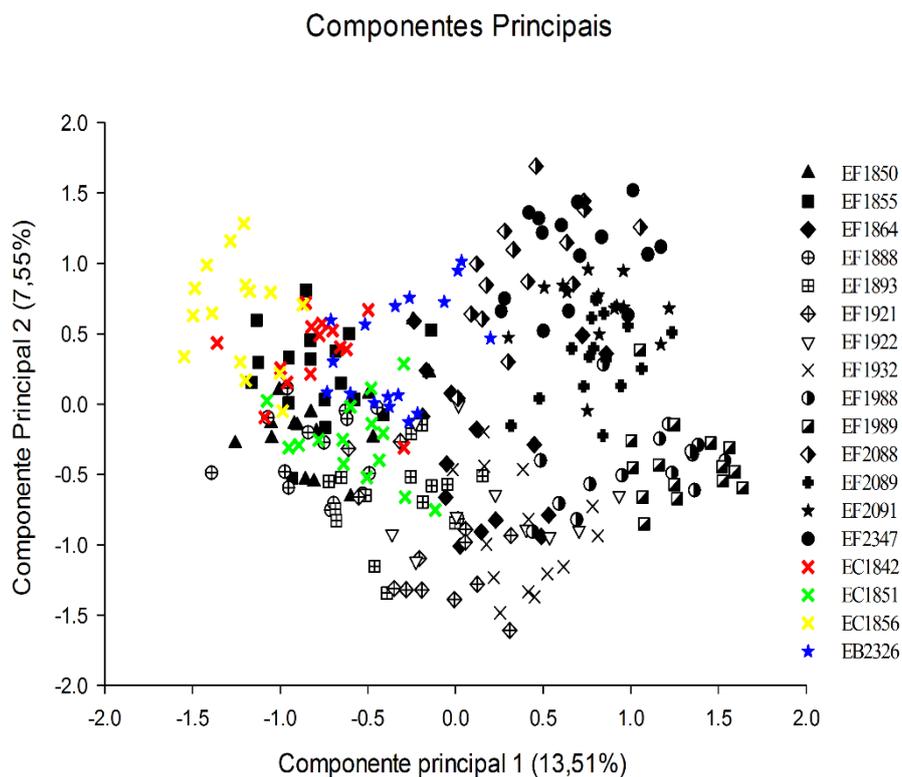


Figura 12. Representação gráfica dos escores sobre os dois primeiros componentes principais (PCA) da matriz de distância genética dos 265 indivíduos das 18 populações de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore, baseado em 131 loci ISSR. Feira de Santana, BA, 2015. Porcentagem de variância acumulada nas duas primeiras coordenadas principais = 21,06% (CP1 = 13,51; CP2 = 7,55).

5.4. Conclusões

A utilização de marcadores dominantes tipo ISSR demonstrou ser um método eficiente na identificação da variabilidade existente entre populações naturais de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore. Foi possível identificar traços importantes do relacionamento genético entre as populações estudadas, possibilitando direcionar medidas para conservação e uso racional desses recursos genéticos. As populações EB2326, EF1888 e EF1893 registraram maior diversidade, indicando que medidas protetivas e maiores esforços de coleta podem ser direcionadas as áreas de ocorrência natural destas, visando salvaguardar o maior percentual do pool gênico das espécies. Além disso, foi possível questionar a estrutura das populações nas três espécies do gênero, e ainda do íntimo relacionamento de suas cargas genéticas, endossando a suspeita de uma recente diversificação e da persistente ligação genética entre elas.

5.5. Referências

ANDRADE, A. M.; et al. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 962 – 968, 2010.

ANDRADE, I. M.; et al. Preliminary Study of Genetic Variation in Populations of *Monstera adansonii* var. *klotzschiana* (Araceae) from North-East Brazil, Estimated with AFLP Molecular Markers. **Annals of Botany**, s/v, p. 1–12, 2007.

ARCHIBALD, J. K., et al. The utility of automated analysis of intersimple sequence repeat (ISSR) loci for resolving relationships in the Canary Island species of *Tolpis* (Asteraceae). **American Journal Botany**, v. 93, p. 1154–1162, 2006b.

ARCHIBALD, J. K.; et al. Evolutionary Relationships within Recently Radiated Taxa: Comments on Methodology and Analysis of Inter-Simple Sequence Repeat Data and Other Hypervariable, Dominant Markers. **Taxon**, v. 55, n. 3, pp. 747-756, 2006a.

BERTONI, B.W.; et al. Genetic diversity among natural populations of *Mandevilla velutina*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 209-213. 2010.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: atris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **Biotechniques**, v. 36, p. 2-4. 2004.

CARVALHO, M. F. et al. Aplicação da análise multivariada em avaliações de divergência genética através de marcadores moleculares dominantes em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p.339-46, 2009.

CULLEY, T. M.; et al. The evolution of wind pollination in angiosperms. **Trends in Ecology & Evolution**, v.17, n.8, p.361-369, 2002.

DJÈ, Y.; et al. Use of ISSR markers to assess genetic diversity of African edible seeded *Citrullus lanatus* landraces. **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 159-164, 2010.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620, 2005.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP Phylogeny Inference Package (Version 3.2). **Cladistics**, v. 5, p. 164–166, 1989.

FRANCO, C. M.; et al. Bioassay-guided Evaluation of Antinociceptive Properties and Chemical Variability of the Essential Oil of *Hyptis fruticosa*. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1693 – 1699, 2011.

ALI, I. B. E. H.; GUETAT, A.; BOUSSAID, M. Genetic diversity, population structure and relationships of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. and *Thymus capitatus* Hoffm. et Link. assessed by isozymes. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p. 149–163, 2012.

HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 129-144, 2012.

HARLEY, R. M. *Eplingiella brightoniae*, a new species of Hyptidinae (Lamiaceae: Ocimeae) from Northerbn Bahia, Brazil, **Kew Bulletin**, v. 69, n. 4, 2014.

HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**, v. 58, p. 1-55, 2012.

HARLEY, R.M.; et al. **Labiatae**. In: J.W. Kadereit (ed.). The families and genera of vascular plants. v. 7, Nova York: Springer Verlag, 2004. p. 167-275.

HAUSDORF, B.; HENNIG, B. Species delimitation using dominant and codominant multilocus markers. **Systematic Biology**, v. 59, p. 491–503, 2010.

JIA, X.; et al. Genetic Diversity and Identification of Chinese-Grown Pecan Using ISSR and SSR Markers. **Molecules**, v. 16, p. 10078-10092, 2011.

KAMELI, M.; HESAMZADEH HEJAZI, S. M.; EBADI, M. Assessment of genetic diversity on populations of three *Satureja* species in Iran using ISSR markers. **Annals of Biological Research**, v. 4, n. 3, p. 64-72, 2013.

KOTHERA, L.; RICHARDS, C. M.; CARNEY, S. E. Genetic diversity and structure in the rare Colorado endemic plant *Physaria bellii* Mulligan (Brassicaceae). **Conservation Genetics**, v. 8, p. 1043–1050, 2007.

LAL, S.; et al. Genetic diversity assessment in six medicinally important species of *Ocimum* from central Gurajat (India) utilizing RAPD, ISSR e SSR markers. **International Journal of Advanced Biological Research**, v. 2, n. 2, p. 279-288, 2012.

LIMA, A. C. B.; et al. Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* Salmz ex Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 192 – 197, 2013.

LIU, J.; et al. Genetic diversity and population structure of *Lamiophlomis rotata*(Lamiaceae), an endemic species of Qinghai–Tibet Plateau. **Genetica**, v. 128, p. 385–394, 2006.

MAIA, M. C. C. Sistema reprodutivo de populações alogamas e autógamias: modelo básico e equilíbrio. **Revista Agro@mbinetal On-line**, v. 4, n. 1, p. 53 – 54, 2010.

MARTINS, F. L. C.; Análise molecular de espécies perenes e anuais do gênero *Dicerandra* (Lamiaceae) baseada em marcadores ISSR. 2007. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.

MENEZES, I. A. C.; et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. **Fitoterapia**, v. 78, p. 192–195, 2007.

MOREIRA, I. J. A.; et al. Vasorelaxant effect of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae, dichloromethane extract on rat mesenteric artery. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 762 – 766, 2010.

NEI, M. Analysis of genetic diversity in subdivided populations (population structure/genetic variability/heterozygosity/gene differentiation). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, p. 3321–3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 3583-590, 1978.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143–1155, 2004.

PASTORE, J. F. B.; et al. Phylogeny of the subtribe Hyptidinae (Lamiaceae tribe Ocimeae) as inferred from nuclear and plastid DNA. **Taxon**, v. 60, n. 5, p. 1317–1329, 2011.

PEAKALL, R.; SMOUSE P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537-2539, 2012.

PEARSE, D. E.; CRANDALL, K. A. Beyond F-ST: Analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**, v. 5, p. 585–602, 2004.

PRITCHARD, J.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959, 2000.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9–17, 2002.

REEVES, P. A.; RICHARDS, C. M. Accurate inference of subtle population structure (and other genetic discontinuities) using principal coordinates. **Plos on**, v. 4, n. 1, r. e4269, 2009.

RODRIGUES, L.; et al. Low genetic diversity and significant structuring in the endangered *Mentha cervina* populations and its implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 51–61, 2013.

SAIDI, M.; MOVAHEDI, K.; MEHRABI, A. A. Characterization of genetic diversity in Satureja bachtiarica germplasm in *Ilam proviance* (Iran) using ISSR and RAPD markers. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 5, n. 17, p. 1934-1940, 2013.

SAMARAKOON, T.; WANG, S. Y.; ALFORD, M. H. Enhancing PCR Amplification of DNA from Recalcitrant Plant Specimens Using a Trehalose-Based Additive. **Applications in Plant Sciences**, v. 1, n. 1, r. 1200236, 2013.

SANTOS, M. R. V.; et al. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 186 – 191, 2007.

SILVA, A. B. L.; et al. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salzm. Ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 475 – 479, 2006.

SILVA, A. C.; OLIVEIRA, L. M. (*Ined.*) Variabilidade em genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (LAMIACEAE) baseada em dados morfo-agronômicos. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais), UEFS: Feira de Santana, 2015.

SONG, Z.; et al. Genetic diversity and population structure of *Salvia miltiorrhiza* Bge in China revealed by ISSR and SRAP. **Genetica**, v. 138, p. 241–249, 2010.

TAKAHATA, N.; NEI, M. F_{st} and G_{st} statistics in the finite island model. **Genetics**, v. 107, p. 501-504, 1984.

VEKEMANS, X.; et al. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 139-151, 2002.

WOLFE, A.D.; XIANG, Q.Y.; KEPHART, S.R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1107-1125, 1998.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Vol. IV. Variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE 1.32**: Population Genetic Analysis. Programa para computador livre distribuído pelos autores. 1999. Disponível em: <<ftp://ftp.microsoft.com/Softlib/MSLFILES/HPGL.EXE>>. Acessado em: 25/05/2014.

ZHANG, J.; XU, B.; LI, M. Genetic diversity of populations of an endangered medicinal plant species (*Glycyrrhiza uralensis*) in different environments of North China. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 830-836, 2010.

6. Capítulo IV

**Diversidade química no óleo essencial em genótipos de *Eplingiella fruticosa*
(Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore**

Diversidade química no óleo essencial de genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore

Anderson de Carvalho Silva¹⁰, Lenaldo Muniz de Oliveria¹¹, Angélica Maria Lucchese¹²

RESUMO- *Eplingiella fruticosa* é uma Lamiaceae nativa do Brasil que apresenta amplo uso na medicina popular como analgésico e anticonvulsivante. Estudos recentes apontam grande variabilidade na composição química do óleo essencial de *E. fruticosa*, relacionada às condições edafoclimáticas e aos diferentes órgãos vegetais. O objetivo desse estudo foi caracterizar a composição e a diversidade química do óleo essencial de 12 genótipos de *E. fruticosa* mantidos na coleção de germoplasma (ColG) implantado na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Amostras de 100g de folhas de cada repetição por genótipo foram utilizadas na hidrodestilação do óleo essencial, em aparelho tipo clewenger, durante três horas, quantificando-se o teor. A identificação dos compostos e seus teores foi realizada por CG (DIC) e CG/EM e os dados de 15 compostos majoritários foram utilizados nas análises de diversidade. Foram procedidas análise de agrupamento e de variáveis canônicas, utilizando como medida de dissimilaridade a distância generalizada de Mahalanobis (D^2). Os resultados permitiram classificar os genótipos em quatro *clusters*: 1 - formado pelos genótipos EF001, EF006, EF007, EF008, EF010, EF011 e EF012, com E-cariofileno e biciclogermacreno como majoritários; 2 - genótipos EF002 e EF003, que apresentaram os mesmos majoritários que o grupo anterior, no entanto, com percentuais médios cerca de 30% superiores; 3 - genótipos EF004 e EF005, que evidenciaram uma maior produção de E-cariofileno; e 4 - com genótipo EF009, formando um grupo isolado por apresentar α -pineno como majoritário e percentuais equilibrados entre os demais. Esse resultado foi confirmado pelas Variáveis Canônicas, que explicou 76% da variação. Os compostos biciclogermacreno, 1,8-cineol, α -copaeno e espatulenol representaram as variáveis de maior importância para a análise.

Palavras-chave: “alecrim de vaqueiro”, planta medicinal, *Hyptis*, variabilidade química.

Chemical diversity in essential oil of *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore genotypes

¹⁰ Doutorando no Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UEFS;

¹¹ Professor Titular do Departamento de Ciências Biológicas da UEFS;

¹² Professora Titular do Departamento de Ciências Exatas da UEFS;

ABSTRACT- *Eplingiella fruticosa* is a native Lamiaceae plant from Brazil who has wide use in folk medicine as an analgesic and anticonvulsant. Recent studies show great variability in the chemical composition of essential oil *E. fruticosa*, related to soil and climatic conditions and different plant organs. The aim of this study was to characterize the composition and the essential oil chemical diversity of 12 *E. fruticosa* genotypes kept in germplasm collection (ColG) deployed in the State University of Feira de Santana (UEFS). Samples of 100g leaves per replicate of each genotype were used for hydrodistillation of essential oil, utilizing Clevenger type apparatus for three hours, quantifying the content. The identification of the compounds and their contents was performed by GC (FID) and confirmed by GC / MS and used data 15 major compounds were in diversity analysis. They have been made to cluster analysis and canonical variables, using as dissimilarity measure the Mahalanobis distance (D^2). The results classify the genotypes in four clusters: 1 - formed by genotypes EF001, EF006, EF007, EF008, EF010, EF011 and EF012 with E-caryophyllene and bicyclogermacrene as major; 2 - EF002 and EF003 genotypes showed that the majority same as the previous group, however, percentage with average about 30% higher; 3 - EF004 and EF005 genotypes that showed a greater production of E-caryophyllene; and 4 - with EF009 genotype, forming a single group to present α -pinene as balanced majority and percentage among the rest. This result was confirmed by canonical variables, which explained 76% of the variation. The bicyclogermacrene, 1,8-cineol, α -copaene and spathulenol compounds representarm the most important variables for analysis.

Key words: “alecrim de vaqueiro”, medicinal and aromatic plant, *Hyptis*, chemical variability.

6.1. Introdução

Eplingiella Harley & J.F.B. Pastore (Lamiaceae), é um gênero composto por apenas três espécies recentemente separadas de *Hyptis* Jacq., com base em evidências morfológicas e moleculares (Pastore et al. 2011; Harley e Pastore, 2012). O gênero é formado por arbustos de comprimento variável (0,5 -2,5m), ocorrentes em solos arenosos do Nordeste brasileiro, e se destacam por apresentar folhas pequenas e flores, com corola azul a roxo-azulada, dispostas em capítulo denso e cimoso, sobre um curto pedúnculo originado nas axilas de brácteas filiformes (Harley e Pastore, 2012). *E. fruticosa* é uma planta aromática e nativa do Brasil. Apresenta-se

nos mais diferentes biomas do Nordeste, sendo registrada em caatingas, tabuleiros e restingas, comumente vista como ruderal, em seis estados nordestinos (Bahia, Sergipe, Pernambuco, Paraíba, Ceará e Rio Grande do Norte) (Harley, 2014). É popularmente conhecida como “alecrim de vaqueiro” e utilizada na medicina natural como analgésico e anticonvulsivante. Seu óleo essencial apresenta atividades antinocipeptiva, vasodilatadora, cardioprotetiva, antiinflamatória e larvicida (*Aedes aegypti*) (Santos et al., 2007; Menezes et al., 2007; Silva et al., 2008; Franco et al., 2011a).

Na natureza os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas, atuando como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo o apetite por tais plantas. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis. São líquidos, voláteis, límpidos e raramente coloridos, solúveis em lípidos. Podem ser sintetizados por todas as partes da planta, ou seja, botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutas, raízes, ou casca de madeira, e são armazenadas em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Bakkali et al., 2008). Contudo, óleos essenciais podem variar em qualidade e quantidade, e na composição, de acordo com o clima, com a composição do solo, órgão da planta, idade e estágio de desenvolvimento (Franco et al., 2011b; Turek e Stintzing, 2013).

Este recurso singular às espécies vegetais tem sido empregado em diversos setores da indústria e do comércio. Atualmente, cerca de 3000 óleos essenciais são conhecidos no mundo, e aproximadamente 10% destes são utilizados nas indústrias farmacêutica, agrônômica, alimentícia, sanitária, cosmética e de perfumaria. Óleos essenciais podem ser constituídos por uma gama de substâncias químicas, oriundas de diferentes rotas metabólicas, que podem apresentar ações sinérgicas ou isoladas, com aplicação nas mais diversas atividades industriais. No entanto, há um longo caminho a ser percorrido até que se estabeleça o uso industrial desses compostos. Nesse processo, o ponto de partida é a identificação do balanço químico contido no óleo essencial em potencial (Bakkali et al., 2008).

As espécies da família Lamiaceae possuem grande potencial para exploração industrial, advinda, principalmente, das características singulares dos seus óleos essenciais. A composição terpênica variável (mono, sesqui e diterpenos), lhes confere certa versatilidade na aplicação, que vai desde um simples inseticida agropecuário, como no caso de *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha piperita* L. e *Lavandula* sp. (Lorenzetti et al., 2011), à composição de

cosméticos, perfumes e medicamentos, como no caso do *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. e *Plectranthus barbartus* Andrews (Stork et al., 2013; Rodrigues et al., 2013;)

Apesar de poucos estudos evidenciarem a composição química do óleo essencial de *E. fruticosa*, é possível identificar uma grande diversidade de compostos para a espécie na literatura existente. Franco et al. (2011a;b;), por exemplo, analisaram óleos essenciais de diferentes origens (locais de ocorrência natural) e partes da planta (órgão), e verificaram amplas variações nos teores de compostos majoritários, como: α - e β -pineno, 1,8-cineol, germacreno-D e biciclogermacreno. Além disso, eles também identificaram que a ação antinociceptiva parece ser influenciada pela variação na composição majoritária do óleo essencial de *E. fruticosa*, principalmente 1,8-cineol, α - e β -pineno (Franco et al., 2011a;b).

Considerando o potencial medicinal de *E. fruticosa*, sobretudo no combate a dores, é importante identificar e estudar melhor a variação na composição do seu óleo essencial, visando ampliar o domínio sobre sua forma de ação, e buscando o melhor balanço entre os teores majoritários, a fim de se chegar à formulações seguras e conclusivas, voltadas para a valorização econômica da espécie.

Neste sentido, investigar a diversidade química em genótipos de uma coleção de germoplasma, com diferentes origens, pode fortalecer o ímpeto na criação de um programa de melhoramento, visando a obtenção de composições de efetiva aplicação analgésica. Para tanto, com o intuito de ampliar o conhecimento à cerca da composição do óleo essencial e de fomentar o interesse econômico pela espécie, esse estudo teve como objetivo caracterizar a composição e a diversidade química do óleo essencial de 12 genótipos de *E. fruticosa*, mantidos na coleção de germoplasma da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

6.2. *Materiais e Métodos*

6.2.1. Material vegetal

A coleção de germoplasma de *E. fruticosa* foi implantado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UNEHF/UEFS), Feira de Santana, Bahia, Brasil, cidade localizada entre as coordenadas 12° 15' 24" S e 37° 57' 53" W, com altitude média de 230 m, índice pluviométrico anual em torno dos 900 mm e temperatura média anual de 24 °C. Doze genótipos, de diferentes origens, são mantidos na ColG, com

delineamento em blocos casualizados, quatro repetições e seis plantas por repetição, totalizando 24 plantas por genótipo (Tabela 10).

Doze meses após a implantação foram coletadas partes aéreas de três plantas por genótipo, em cada bloco. As coletas foram realizadas ao longo da primeira semana do mês de Abril de 2014. As folhas foram separadas, secas em temperatura ambiente e à sombra, até peso constante, mensurando-se, posteriormente, a massa em balança computadorada, modelo Elgin DP15 plus. Amostras de 100 g foram separadas, formando quatro repetições por genótipo, uma de cada bloco, das quais se procedeu as extrações.

Tabela 10. Coordenadas geográficas, altitude e municípios dos locais de coleta dos 12 genótipos do Coleção de Germoplasma de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

Genótipo	Latitude (S)	Longitude (O)	Altitude (m)	Município/Estado
EF001	12°11'48.8"	38°58'1.66"	300	Feira de Santana/BA
EF002	11°34'14.5"	41°10'32.4"	1096	Morro do Chapéu/BA
EF003	11°35'52.3"	41°12'47.7"	1069	Jacobina/BA
EF004	12°41'02.8"	39°35'03.1"	236	Santa Terezinha/BA
EF005	12°33'06.8"	39°27'18.3"	220	Rafael Jambeiro/BA
EF006	10°55'33.6"	37°11'56.1"	37	São Cristóvão/SE
EF007	10°35'54.8"	36°59'17.0"	112	Japarutuba/SE
EF008	11°45'24.8"	37°56'32.9"	154	Esplanada/BA
EF009	10°46'10.4"	38°21'32.0"	239	Itabaiana/SE
EF010	13°37'28.9"	41°48'31.2"	16	Saubara/BA
EF011	12°23'30.6"	38°53'17.5"	219	São Gonçalo/BA
EF012	10°20'48.6"	41°19'59.4"	916	Umburanas/BA

6.2.2. Extrações e análises de óleos essenciais

A extração e identificação da composição química dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais (LAPRON) do Departamento de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS. As amostras foram submetidas à extração por hidrodestilação utilizando-se o aparelho de Clevenger, acoplados em balões de vidro, que foram aquecidos por mantas termo-elétricas. O processo de extração foi conduzido durante 3 horas, contadas a partir da condensação da primeira gota de óleo, sendo verificado o volume extraído na coluna graduada do aparelho de Clevenger. Após a extração, adicionou-se sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) ao óleo, a fim de reter qualquer resquício de água presente. Posteriormente, com o uso da pipeta do tipo Pasteur, o óleo foi coletado e depositado em frascos

de vidro ambar com capacidade para 4 mL, etiquetado e armazenado em congelador a aproximadamente -5 °C até a realização da análise química.

Três repetições de 1 g da mesma amostra de folhas foram utilizadas na determinação do teor de umidade, por meio higrômetro digital (Série ID Versão 1.8 Marte®.); as amostras foram secas a temperatura de 105° C, por 10 min. O teor do óleo essencial foi calculado a partir da base livre de umidade (BLU), que corresponde ao volume (mL) de óleo essencial em relação à massa seca de folhas utilizada na extração:

Equação 01: Cálculo do teor de óleos essenciais (Santos et al., 2004)

$$T_o = \frac{V_o}{B_m - (B_m \times U)} \times 100$$

Onde:

To = Teor de óleo (%);

Vo= Volume de óleo extraído;

Bm= Biomassa aérea vegetal;

(BmxU)= Quantidade de umidade presente na biomassa;

Bm-(BmxU)=Quantidade de biomassa seca.

A análise da composição química dos óleos essenciais foi realizada por Cromatografia Gasosa, empregando-se cromatógrafos a gás com Detector de Ionização em Chama (CG/DIC) e acoplado a Espectrômetro de Massas (CG/EM). Na análise por CG/DIC foi utilizado Cromatógrafo Varian® CP-3380, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar Chrompack CP-SIL 5 (30 m x 0,5 mm, com espessura do filme de 0.25 µm), temperatura do injetor de 220°C e do detector de 240°C, hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹), com programa de temperatura do forno de: 60°C a 240°C (3°C min⁻¹), 240°C (20 min). As análises por CG/EM foram realizadas em Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas GC/MS-QP 2010 Shimadzu®, coluna capilar DB-5ms (30 m x 0,25 mm, com espessura de filme 0.25 µm), temperatura do injetor 220°C, gás de arraste hélio (1 mL/min), temperatura da interface de 240°C, temperatura da fonte de ionização de 240°C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização: 0,7kV e programa de temperatura do forno: 60°C a 240°C (3°C/min), 240°C (20 min).

Antes da injeção, aproximadamente 0,05 g de cada amostra de óleo essencial foi pesada em balança analítica e diluída em 1000 µL do solvente acetato de etila. O volume de 0,2 µL desta solução foi injetado, sob as mesmas condições supracitadas, no CG/DIC e no CG/EM

com razão de split de 1:100. A determinação do índice de Kovat's foi efetuada empregando-se uma solução a 5% de n-alcenos (C8 a C24). A identificação dos constituintes foi realizada por espectrometria de massas e por meio do índice de Kovat's de cada pico (Equação 02):

Equação 02: Cálculo do Índice Kovat's (Adams, 2007).

$$I_k = \frac{100 N + 100 \cdot (\text{Log } t'R(A) - \text{log } t' R(N))}{(\text{Log } t'R(N+1) - \text{log } t' R(N))}$$

Onde:

IK=Índice de retenção de Kovat's

N = Número de átomos de carbono do padrão do alcano (C8 a C24)

t'R(A) = tempo de retenção do pico calculado

t'R(N) = tempo de retenção do alcano correspondente ao pico calculado

t'R(N + 1) = tempo de retenção do alcano que elui posteriormente ao pico calculado

Cada pico do cromatograma foi identificado pelo seu espectro de massas, por comparação com a biblioteca do equipamento (Nist 21 e Nist 72), através de fontes da literatura (Joulain e Konig, 1998; Adams, 2007;) e injeções de padrões autênticos. Foram realizadas quatro injeções do óleo essencial, referentes às quatro repetições de cada genótipo, obtendo-se a concentração média para cada constituinte, sendo a quantificação do percentual relativo obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes pelo método da normalização da área (%).

6.2.3. Análises estatísticas

Os dados de composição química foram analisados pelas técnicas multivariadas, baseadas na análise de agrupamento e de variáveis canônicas. Na análise de agrupamento utilizou-se a distância generalizada de Mahalanobis (D^2) como medida de dissimilaridade e na formação dos grupos, sendo o agrupamento das subamostras realizado pelo método hierárquico Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average (UPGMA), citado por Rao (1952). A contribuição relativa das variáveis para a divergência genética foi determinada utilizando o critério proposto por Singh (1981).

Para testar a eficiência de cada método de agrupamento hierárquico foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (CCC), pois, quanto maior este valor, maior é a eficiência

do método em questão. As análises de distância Generalizada de Mahalanobis, variáveis canônicas e da importância relativa das características foram efetuadas pelo programa GENES (Cruz, 2013), enquanto que para as análises de agrupamento e de correlação cofenética foram utilizadas os pacotes hcluster e Biodiversity, do Programa R (R Development Core Team, 2006).

Para o estabelecimento do ponto de corte no dendograma optou-se pelo método de Mojena (1977), que faz uma definição estatística para o número de grupos formados em métodos hierárquicos como UPGMA. Consiste em selecionar o número de grupos no estágio j que, primeiramente, satisfizer à seguinte inequação: $\alpha_j > \theta_k$, em que α_j é o valor de distâncias dos níveis de fusão correspondentes ao estágio j ($j = 1, 2, \dots, n$) e θ_k é o valor referencial de corte, expresso por: $\theta_k = \bar{\alpha} + k\sigma_\alpha$, em que α e σ_α são, respectivamente, as estimativas não viesadas da média e do desvio padrão dos valores de α ; k é uma constante. Adotou-se $k= 1,25$ como regra de parada na definição do número de grupos, como sugerem Milligan e Cooper (1985).

6.3. Resultado e Discussão

O percentual de identificação total dos constituintes químicos do óleo essencial de *E. fruticosa* variou entre 85,70% e 93,78%, o que indica uma boa acurácia na análise da composição (Tabela 11). De modo geral, os compostos identificados nas amostras analisadas estão enquadrados em duas grandes classes de terpenos, mono e sesquiterpenos, com percentual mais elevado para este último, variando entre 49,80% a 68,73%, enquanto os monoterpenos apresentaram um percentual variando entre 24,03% e 38,75% (Tabela com os percentuais de todos os compostos encontra-se no Apêndice F).

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram diferenças significativas na proporção de mono e sesquiterpenos presentes no óleo essencial de *Eplingiella fruticosa*, em relação aos valores obtidos por Franco et al. (2011a), onde identificaram, na maioria das suas amostras, percentuais de monoterpenos (43,80% a 66,10%) maiores que sesquiterpenos (32,42% a 49,09%). Essa variação pode ser explicada por diferenças genético-ambientais, pois no estudo de Franco et al. (2011a), as amostras analisadas foram coletadas em ambientes de ocorrência natural da espécie. Além disso, nesse estudo, a análise do óleo refere-se a amostras únicas, o que não contempla a variação interpopulacional, implícita no cerne experimental aqui apresentado.

Tabela 11. Percentual das classes de terpenos e do total dos compostos identificados no óleo essencial dos 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

Genótipos	% Monoterpenos	% Sesquiterpenos	% Total
EF001	38,18	49,80	87,98
EF002	24,03	68,73	92,75
EF003	27,28	66,50	93,78
EF004	30,30	57,68	87,98
EF005	29,60	61,48	91,08
EF006	24,40	61,30	85,70
EF007	29,83	57,08	86,90
EF008	36,40	51,20	87,60
EF009	38,75	52,75	91,50
EF010	38,60	53,95	92,55
EF011	28,63	59,23	87,85
EF012	35,93	57,18	93,10
Média	31,83	58,07	89,90

Os quinze principais compostos identificados no óleo essencial dos 12 genótipos de *E. fruticosa* estão listados de acordo com a ordem de eluição na Tabela 13. Nota-se que os três compostos majoritários, ou mais expressivos, foram E-cariofileno, Biciclogermacreno e o α -pineno. A majoritariedade foi revesada entre esses três compostos no óleo essencial dos genótipos estudados. Para EF001, EF002, EF003 e EF007, o composto de maior teor foi o Biciclogermacreno. Para EF004, EF005, EF006, EF008, EF010, EF011 e EF012 o maior percentual foi do constituinte E-cariofileno e apenas no EF009 o majoritário foi o composto α -pineno. Franco et al. (2011a;b) relataram a ocorrência de ampla variação entre a majoritariedade dos compostos e, de modo semelhante, encontraram os mesmos compostos figurando entre os principais constituintes encontrados.

Tabela 12. Percentual dos quinze compostos encontrados em maior proporção no óleo essencial de 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

Genótipos	Compostos químicos (%)														
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15
	IRR														
	936	974	978	1030	1032	1144	1377	1421	1456	1482	1497	1524	1579	1584	1641
	%														
EF001	7,09	0,71	5,33	8,07	6,09	5,81	2,74	8,61	1,69	3,22	10,41	3,24	4,28	2,87	1,34
EF002	4,81	0,54	3,30	4,20	4,84	2,54	2,86	14,42	2,66	7,95	16,96	2,26	5,71	3,32	2,49
EF003	7,48	0,78	4,82	2,32	8,98	0,43	2,41	16,36	2,97	7,04	19,82	1,50	6,59	3,90	1,26
EF004	6,97	1,12	6,33	5,24	3,83	1,95	3,91	13,86	2,40	7,64	3,69	2,95	2,59	3,77	2,41
EF005	4,53	0,94	3,13	4,09	4,69	5,30	4,41	14,93	2,36	5,06	5,03	3,12	1,50	3,80	1,86
EF006	4,69	0,68	3,44	4,02	4,81	2,13	2,47	13,15	2,37	6,28	11,31	3,28	4,68	2,55	2,30
EF007	5,20	0,84	5,84	5,27	5,50	3,14	3,21	9,74	1,79	4,66	13,25	3,26	5,17	2,34	0,87
EF008	6,22	1,08	5,92	7,69	4,12	4,90	3,11	9,52	1,89	5,50	9,15	2,93	3,72	2,12	1,15
EF009	12,00	0,88	5,85	4,17	8,94	3,31	4,69	9,40	1,68	4,06	7,15	3,86	4,77	2,64	0,59
EF010	5,79	1,80	6,26	9,64	3,64	5,57	3,27	11,09	1,96	6,38	8,76	2,19	3,25	2,40	4,05
EF011	4,55	0,78	4,16	6,84	3,48	3,74	3,37	11,89	2,05	7,88	8,54	3,14	3,49	2,67	3,48
EF012	10,39	0,89	6,76	6,20	5,75	0,96	2,65	12,37	2,17	6,45	10,67	2,47	4,86	3,07	2,02
Média	6,64	0,92	5,09	5,65	5,39	3,31	3,26	12,11	2,16	6,01	10,39	2,85	4,22	2,95	1,98

IRR: Índice de Retenção Relativo. Identificação dos compostos químicos: C1 = α -pineno; C2 = Sabineno; C3 = β -pineno; C4 = Limoneno; C5 = 1,8-cineol; C6 = Cânfora; C7 = α -Copaeno; C8 = E-cariofileno; C9 = α -humuleno; C10 = Germacreno-D; C11 = Bicyclgermacreno; C12 = Cis-calameneno; C13 = Espatuleno; C14 = Óxido de cariofileno; e C15 = Epi- α -candinol.

De acordo com a análise química, os 15 principais compostos majoritários nos genótipos e condições estudados foram α -pineno, sabineno, β -pineno, limoneno, 1,8-cineol, cânfora, α -copaeno, E-cariofileno, α -humuleno, germacreno-D, bicyclgermacreno, cis-calameneno, espatuleno, óxido de cariofileno e epi- α -candinol, os quais definiram a formação de quatro grupos, com base na análise de agrupamento pelo método de UPGMA (Figura 13).

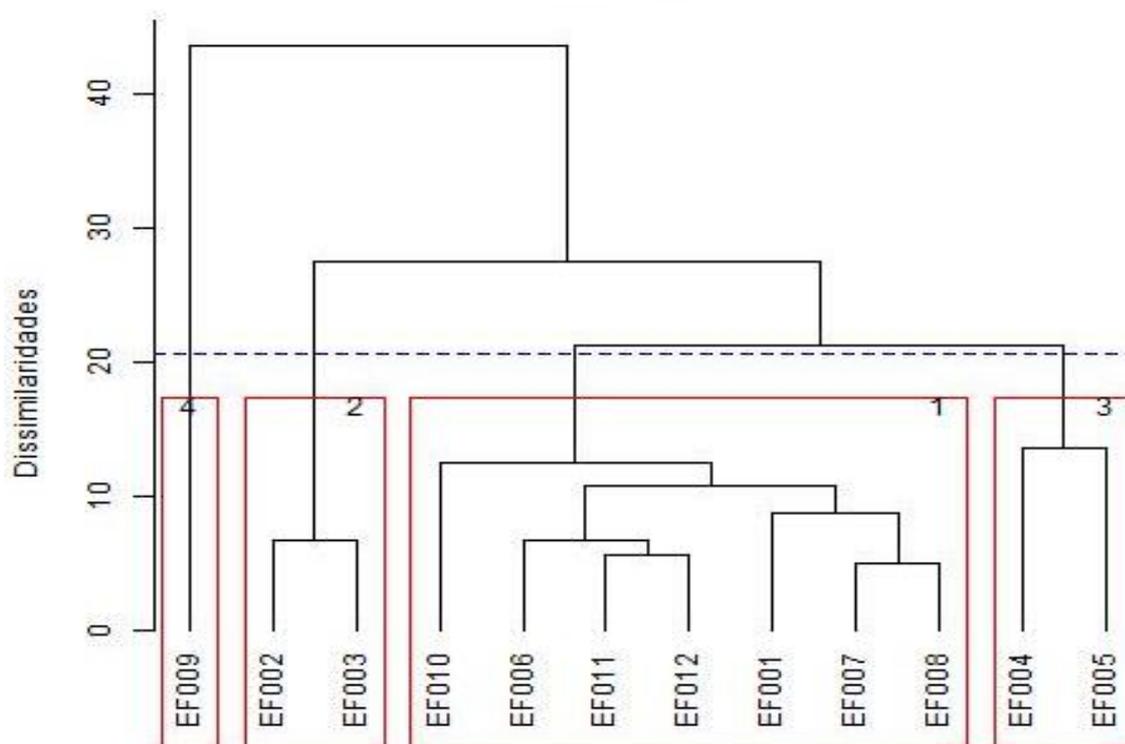


Figura 13. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore, obtido pelo método de UPGMA, com base na composição química dos óleos essenciais, utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis (D^2). Feira de Santana, BA, 2015.

Considerando as similaridades entre os constituintes químicos do óleo essencial dos 12 genótipos de *E. fruticosa*, os grupos tiveram a seguinte formação: Cluster 1- formado pelos genótipos EF001, EF006, EF007, EF008, EF010, EF011 e EF012, com os compostos E-cariofileno e Biclogermacreno como majoritários, porém com uma menor distância para os teores dos outros compostos; Cluster 2 – formado pelos genótipos EF002 e EF003, que apresentaram os mesmos majoritários que o grupo anterior, no entanto, esses compostos revelaram percentuais médios cerca de 30% superiores aos do grupo anterior; Cluster 3 - formado pelos genótipos EF004 e EF005, que evidenciaram uma maior produção de E-cariofileno, além de formarem um grupo irmão ao do Cluster 1, pela variação similar nos demais compostos; e Cluster 4 – formado pelo genótipo EF009, um grupo isolado por apresentar α -pineno como majoritário e percentuais equilibrados entre os demais (Figura 14). É possível perceber também que há grande variação nos dois primeiros clusters, em relação aos compostos α -pineno, limoneno, β -pineno, 1,8-cineol, germacreno-D e espatulenol. O elevado coeficiente de correlação cofenética ($r=0,81$) demonstrou um ótimo ajuste do método utilizado à matriz de

dados originais, indicando que o dendograma não mostrou distorção capaz de interferir na interpretação dos resultados.

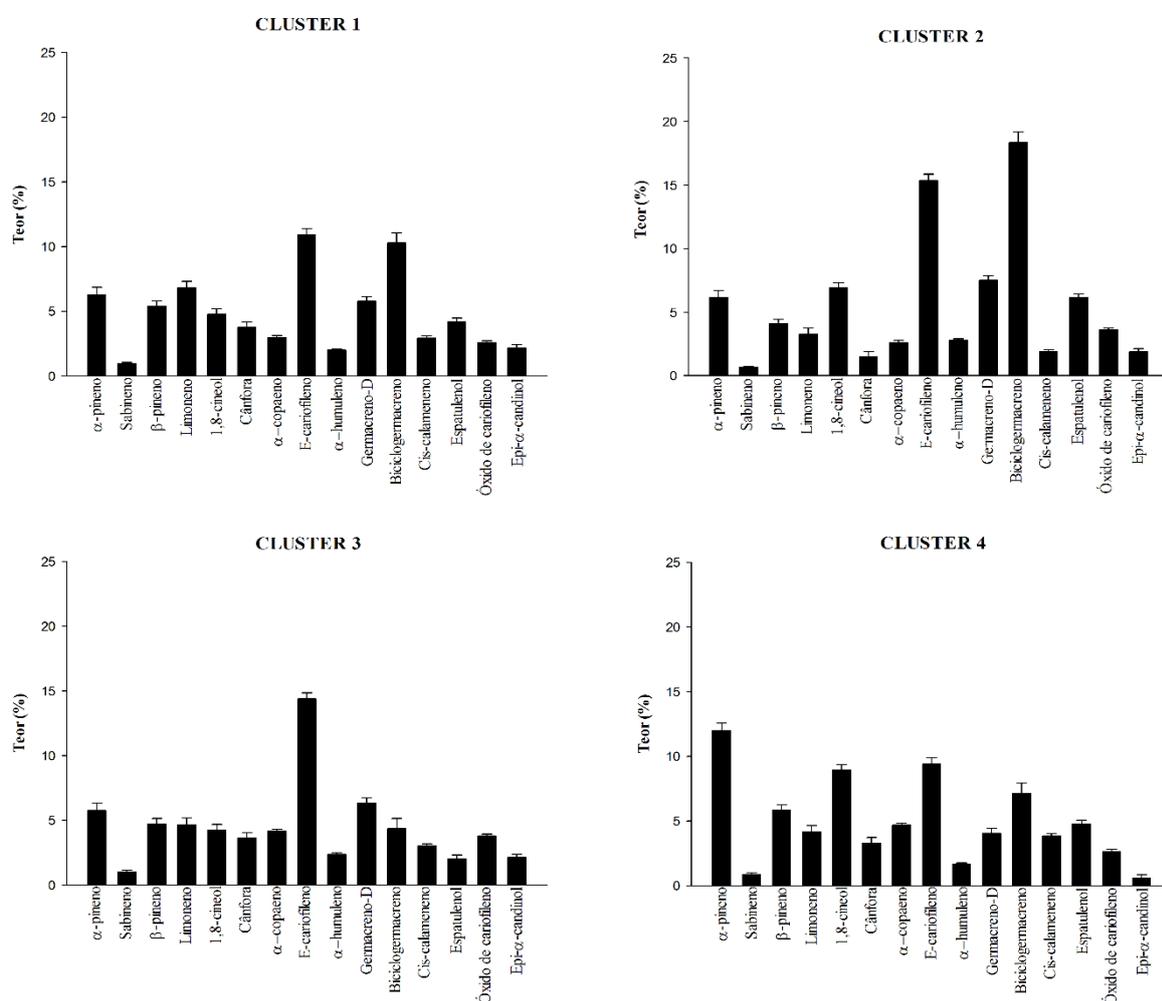


Figura 14. Médias dos 15 constituintes químicos majoritários dos óleos essenciais de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) J.F.B. Pastore, agrupados nos clusters de 1 a 4. (linhas verticais mostram o erro padrão da média). Feira de Santana, BA, 2015.

Franco et al. (2011b) também puderam perceber grandes variações nos teores dos mesmos compostos, principalmente α -pineno, β -pineno e 1,8-cineol. Segundo esses autores, essas diferenças podem surgir devido a parâmetros edafo-climáticos, assim como estratégias reprodutivas e interações ambientais diversas. Contudo, neste trabalho os genótipos foram cultivados no mesmo local e distribuídos aleatoriamente na área, sendo dados os mesmos tratamentos culturais a todos os genótipos, podendo-se inferir que as variações observadas refletem variações genéticas entre os genótipos de *E. fruticosa* associadas à produção de óleo essencial. Investigações sobre polimorfismo químico em óleos essenciais de espécies de Lamiaceae são

comuns, sobretudo para caracterizar grupos intraespecíficos quimicamente distintos (Arrigoni-Blank et al., 2005; Muñoz-Bertomeu et al., 2007 e Herraiz-Peñalver et al., 2013).

Na análise de variáveis canônicas (VC), as três primeiras variáveis conseguiram explicar 76% da variação existente entre os óleos essenciais analisados. Neste método também foi possível a formação de quatro grupos, idênticos ao dendograma de agrupamento (Figura 15). Os compostos que mais contribuíram para essa formação foram o Bicyclogermacreno, 1,8-cineol, α -copaeno e espatulenol (Figura 16), respondendo por 56,17% da variação observada.

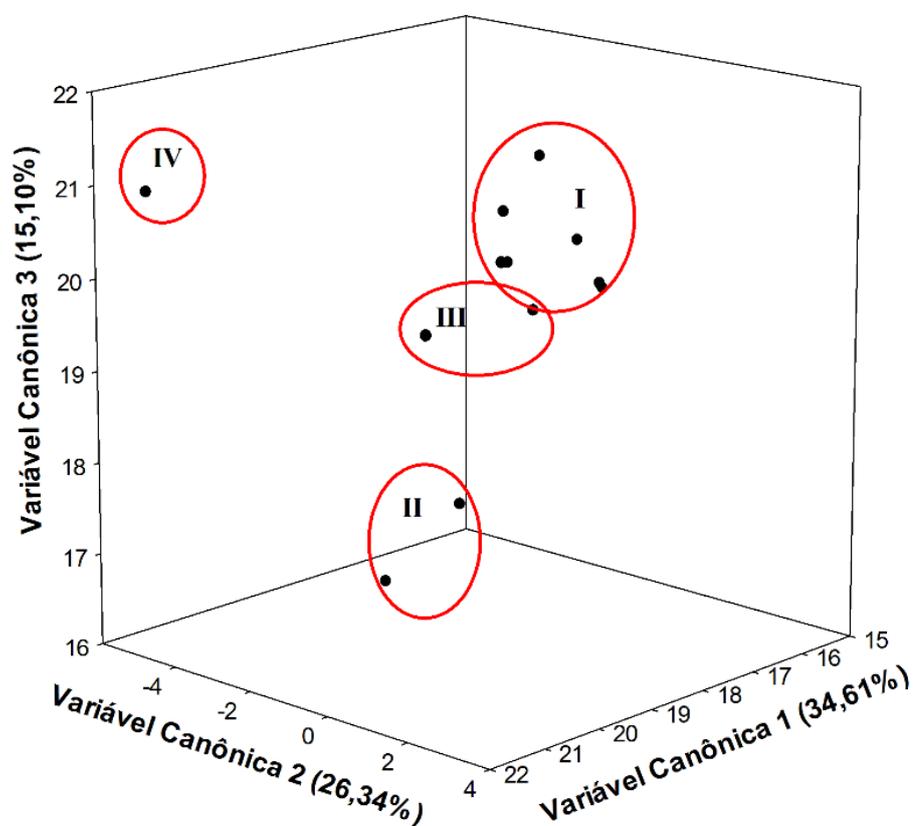


Figura 15. Dispersão gráfica dos escores em relação aos eixos representativos das variáveis canônicas (VC1, VC2 e VC3 = 76%) relativos a 15 compostos majoritários identificados no óleo essencial de 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

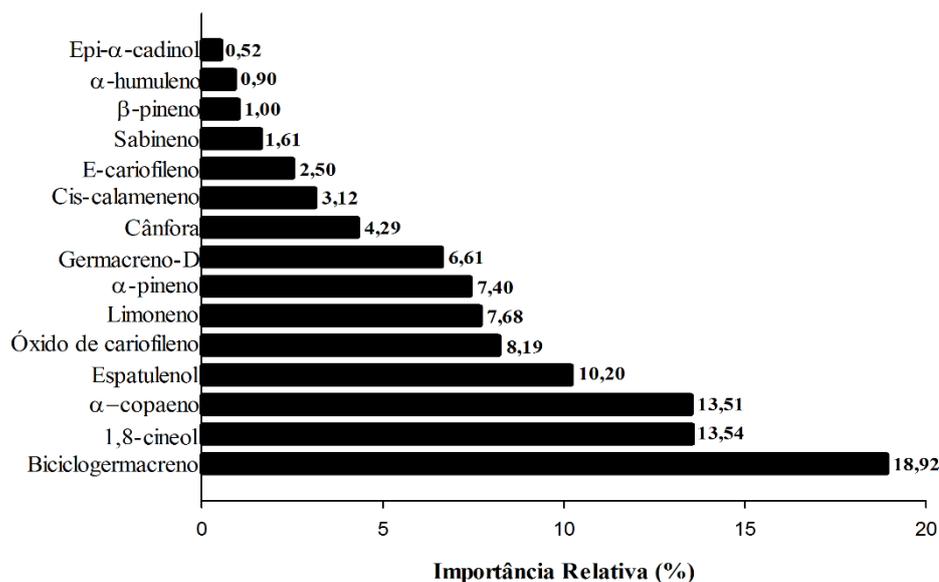


Figura 16. Contribuição relativa (%) dos 15 compostos majoritários dos óleos essenciais para a divergência entre os 12 genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.

Todos os compostos majoritários encontrados nesse trabalho foram identificados em outros estudos com a mesma espécie, como também, com outras espécies de Lamiaceae, sendo relatada em muitos a bioatividade relacionada a essa composição. Santos et al. (2007) sugere que a presença de compostos como E-cariofileno, α -pineno e 1,8-sineol, sejam responsáveis pelas atividades vasorelaxantes e hipotensivas do óleo essencial de *E. fruticosa*. Franco et al. (2011a) correlacionam a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória aos teores majoritários de 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno. Herraiz-peñalver et al. (2013) relacionam o alto valor de mercado do óleo essencial de *Lavandula latifolia* Medik e sua aplicação anti-inflamatória a elevados teores de 1,8-cineol e Cânfora. Além disso, Costa et al. (2015) em estudo sobre a diversidade química em *Ocimum basilicum* L. destacam 1,8-cineol e germacreno-D como majoritários de grande importância no balanço químico e nas ações medicinais destacadas para esta espécie. Entretanto, Franco et al. (2011b) destacam que ações isoladas ou sinérgicas dos compostos mencionados acima, ainda não foram sistematicamente testadas.

Estudos de diversidade química, em sua maioria, apresentam as diferenças na composição das espécies como resultado de variações ambientais. Contudo, aqui é possível perceber forte influência genética nessas variações, primeiro, pelo fato do experimento ter sido conduzido sob o mesmo solo, no mesmo período e sob as mesmas condições e, segundo, por que nos grupos formados percebe-se forte influência morfogenética das mínimas variações

identificadas nos compostos estudados. Conhecer a variabilidade química de plantas nativas, quiçá domesticadas, é de grande importância, por evidenciar, além da variação nos teores, um aspecto agrônomo, uma série de analogias em relação à diversidade genética existente entre essas populações. Neste trabalho ficou evidente a importância do conhecimento químico dos diferentes genótipos para um futuro programa de melhoramento genético da espécie, bem como para ações de conservação do pool gênico da espécie.

6.4. Conclusões

O estudo do óleo essencial de genótipos de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore revelou diferenças significativas quanto às microvariações genéticas entre as populações estudadas, permitindo a distinção de quatro clusters baseados no conjunto dessas variações. Obteve-se um elevado percentual de identificação dos compostos (85,70% e 93,78%), sendo o método escolhido eficaz. Os compostos mais representativos foram E-cariofileno, Biciclogermacreno e o α -pineno, contudo, os que mais contribuíram para a formação dos grupos foram Biciclogermacreno, 1,8 – cineol, α -copaeno e Epatulenol. Os quatro grupos formados na análise de agrupamento foram confirmados com os resultados das variáveis canônicas e representam as microvariações genético-ambientais dos locais de ocorrência natural dos quais são oriundas. Assim, o presente estudo permite um melhor direcionamento de futuras pesquisas de coleta, conservação e melhoramento da espécie.

6.5. Referências

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4^{ed}. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 804 p, 2007.

ANDRADE, A. M.; et al. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 962 – 968, 2010.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; et al. Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 298-303, 2005.

BAKKALI, F.; et al. Biological effects of essential oils. A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 26, p. 446-475, 2008.

COSTA, A. S.; et al. Chemical diversity in Basil (*Ocimum* sp.) germplasm. **The Scientific World Journal**, v. 2015, Article ID 352638, 9 p., 2015.

CRUZ, C. D. Genes – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum – Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. v.2, Viçosa: Editora UFV, 2006. 585 p.

FRANCO, C. M.; et al. Bioassay-guided Evaluation of Antinociceptive Properties and Chemical Variability of the Essential Oil of *Hyptis fruticosa*. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1693 – 1699, 2011a.

FRANCO, C. M.; et al. Essential oil composition and variability in *Hyptis fruticosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 24 – 32, 2011b.

HARLEY, R. M. *Eplingiella brightoniae*, a new species of Hyptidinae (Lamiaceae: Ocimeae) from Northeastern Bahia, Brazil, **Kew Bulletin**, v. 69, n. 4, 2014.

HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**, v. 58, p. 1-55, 2012.

HERRAIZ-PEÑALVER, D.; et al. Chemical characterization of *Lavandula latifolia* Medik. Essential oil from Spain wild populations. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, n. 1, p. 59 – 68, 2013.

JOULAIN, D.; KOENIG, W. A. **The Atlas of spectra data of sesquiterpene hydrocarbons**. Hamburg, Germany: EB-Verlag. 661 p. 1998.

LORENZETTI, E. R.; et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinera* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. especial, p. 619 – 627, 2011.

MENEZES, I. A. C.; et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. **Fitoterapia**, v. 78, p. 192–195, 2007.

MILLIGAN, G.W.; COOPER, M.C. An Examination of Procedures for Determining the Number of Clusters in a Data Set, **Psychometrika**, v. 50, n. 1, p. 159 – 179, 1985.

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: na evaluation. **Computational Journal**, v. 20, n. 1, p. 359 – 363, 1979.

MUÑOZ-BERTOMEU, J.; et al. Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological áreas. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 1, p. 479 – 488, 2007.

PASTORE, J. F. B.; et al. Phylogeny of the subtribe Hyptidinae (Lamiaceae tribe Ocimeae) as inferred from nuclear and plastid DNA. **Taxon**, v. 60, n. 5, p. 1317–1329, 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2006. **A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Capturado em 7 de maio de 2014. Disponível em <http://www.rproject.org/>

RAO, C. R. **An advanced statistical method in biometric research**. New York: John Wiley & Sons. 390 p. 1952.

RODRIGUES, F. F. G.; et al. Study of the inference between *Plectranthus* species essential oils from Brasil and Aminoglycosides. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, Article ID 724161, 7 pp. 2013.

SANTOS, A. S.; et al. **Descrição do sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório.** Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – Comunicado Técnico, n. 99, 2004.

SANTOS, M. R. V.; et al. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 186 – 191, 2007.

SILVA, W. J.; et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251–3255, 2008.

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

STORCK, R. C.; et al. Desenvolvimento vegetativo e produção de óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) após a aplicação de ácido giberélico e extrato de alga marinha. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 391 – 396, 2013.

TUREK, C. E STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40 – 53, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta Tese buscou, com base nas escassas publicações pretéritas, caracterizar os recursos genéticos de *E. fruticosa*, avaliando-os experimentalmente sobre perspectiva multidisciplinar, considerando assim, os aspectos agrônomo, fitoquímico e molecular do germoplasma amostrado, entretanto com uma abordagem voltada para a conservação e o uso sustentável da espécie.

O desenvolvimento experimental sobre a propagação vegetativa de “alecrim de vaqueiro” (Cap. 1) surgiu ao longo do processo de doutoramento, e veio sobre demanda, pois diagnosticou-se a baixa germinabilidade de suas sementes, quando já havia certa dificuldade na propagação das matrizes para o estabelecimento da coleção de germoplasma (ColG/UEFS). Este fato reforça a importância de executar-se pesquisas de base.

Neste sentido, foi possível destacar pontos positivos na elaboração do estudo, primeiramente pelo pioneirismo, pois não existia forma de cultivo estabelecida para a espécie, sendo assim, o uso popular baseava-se no extrativismo, causando impactos e impossibilitando a ampla comercialização (ressalta-se que é possível encontrar ramos de “alecrim de vaqueiro” em feiras livres do nordeste brasileiro). Outro ponto relevante foi a confirmação da baixa exigência nutricional do solo para sua propagação, e além disso, confirmou-se também que é possível fazer estaquia da espécie sem o uso de auxina, o que pode diminuir os custos de uma futura produção comercial.

A avaliação de características morfológicas e agrônomicas (Cap. 2) converge com a abordagem do capítulo anterior, quando faz uma interpretação conjunta da morfologia e dos fatores de produção vegetal da espécie, identificando diferentes nuances entre os genótipos e apontando variações interessantes do ponto de vista do melhoramento e do preparo para inclusão em um mercado futuro. Os resultados confirmam o íntimo relacionamento entre os fenótipos e o ambiente de cultivo, mas também a definição de genótipos quanto a persistência de características singulares aos grupos formados nos métodos estatísticos utilizados. Outro ponto interessante está na conclusão deste capítulo, onde surge a possibilidade de avanço nos trabalhos com a espécie, mantendo o material coletado, juntamente com a possibilidade de ampliação da coleção. Neste ponto, destaca-se também a importância em direcionar investimentos na montagem de um banco de germoplasma, com o foco no melhoramento e na definição de genótipos superiores para produção sustentável.

A mensuração da variabilidade genética em populações naturais de *Eplingiella* (*E. fruticosa*, *E. cuniloides* e *E. brightoniae*) (Cap. 3), com o objetivo principal de quantificar a variação inter e intrapopulacional, identificou elevados índices de diversidade entre as populações como um todo, contudo o percentual de dissimilaridade entre as espécies não foi tão alto. Esse resultado, em especial, suscitou uma ampla discussão a cerca da origem e irradiação do gênero, com forte tendência para uma recente diversificação apoiada em plesiomorfias entre as espécies. As populações EB2326, EF1888 e EF1893 registraram maior diversidade, indicando que medidas protetivas e maiores esforços de coleta podem ser direcionadas as áreas de ocorrência natural destas, visando salvaguardar o maior percentual do pool gênico das espécies. A estruturação intermediária das populações pode ser um resquício de um relacionamento ainda não totalmente resolvido, com isso, é possível que exista fluxo gênico entre elas, com uma ligação mais forte entre *E. fruticosa* e *E. cuniloides*.

Os genótipos mantidos na coleção, na avaliação quanto à composição química do seu óleo essencial (Cap. 4), apresentaram relacionamento similar ao visto no Cap. 2. A análise conjunta dos constituintes deu origem a formação de quatro grupos, com base estritamente na variação numérica dos teores, pois não houveram diferenças entre os compostos identificados para cada genótipo. Isso significa dizer que o óleo essencial da espécie (segundo a amostragem avaliada) mantém certa uniformidade, no entanto, a sensível alteração observada foi suficiente para destacar genótipos de possível interesse farmacológico apoiado nos efeitos isolados de cada constituinte. Os resultados confirmaram uma forte influência ambiental nas microvariações observadas, mas não descarta a possível influência de outros fatores, como o período de maturação das matrizes e o componente genético, amplamente discutido anteriormente.

Por fim, é relevante enaltecer o caráter pioneiro desta Tese, na medida que se propôs à uma abordagem multifacetada, no intuito de buscar a noção da diversidade desse grupo de espécies vegetais mais próxima do real. Contudo, o trabalho não encerra aqui, outros aspectos continuam sendo investigados pelo Grupo de Pesquisa em Plantas Mediciniais e Aromáticas do Semiárido da Universidade Estadual de Feira de Santana, como o comportamento fenológico, atividades inseticidas, fisiologia de adaptação, germinação, entre outros.

APÊNDICES

Apêndice A. RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA - CAPÍTULO I

Quadro 01 - Resumo da análise de variância das características percentual de sobrevivência (%S), percentual de estacas enraizadas (%EE), comprimento de raiz por estaca (CRE), número de brotações por estaca (NBE), massa seca de folhas (MSF), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST) obtidos em estacas de “alecrim-de-vaqueiro”, cultivadas em diferentes composições de substrato: comercial (Biomix®) (C), comercial + vermiculita (C+V) e comercial + vermiculita + húmus (C+V+H). Feira de Santana, BA, 2015.

FV	GL	Quadrados Médios						
		%S	%EE	CRE	NBE	MSF (mg)	MSR (mg)	MST (mg)
Bloco	3	2149,78	843,75	6,25	126,29	20,15	0,206	6,693
Substrato	2	113,88 ^{ns}	195,42 ^{ns}	2,26*	81,68**	3,830*	0,085 ^{ns}	2,762**
Resíduo	54	254,61	148,75	0,63	12,48	0,80	0,132	0,474
Média	-	39,01	23,58	4,24	17,69	42,68	45,93	146,68
CV (%)	-	40,91	51,72	18,81	19,97	20,95	24,99	14,83

** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F;

^{ns} não-significativo, pelo teste F;

Quadro 02 – Resumo das análises de variância das características número de brotações por estaca (NBE), massa seca de folhas (MSF), comprimento da raiz (CRE) e massa seca de raiz (MSR) de estacas de “alecrim-de-vaqueiro” em função de concentrações de AIB, avaliadas em três tempos de cultivo. Feira de Santana, BA, 2015.

FV	GL	Quadrados Médios			
		CRE	NBE	MSF (mg)	MSR(mg)
Bloco	3	0,09	9,33	0.000148	0.000239
Tempo de cultivo	2	12,07*	7,68 ^{ns}	0.000115 ^{ns}	0.000266 ^{ns}
Resíduo “a”	6	1,87	9,83	0.000055	0.000109
Concentração AIB	4	0,24 ^{ns}	75,16**	0.000209 *	0.000084 *
AIB x Tempo	8	0,28 ^{ns}	7,85 ^{ns}	0.000093 ^{ns}	0.000036 ^{ns}
Resíduo “b”	36	0,21	9,07	0.000066	0.000028
Média	-	1,97	10,21	30,38	12,13
CV “a” (%)	-	69,57	30,73	24,38	86,20
CV “b” (%)	-	23,50	29,51	26,74	43,59

** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F;

^{ns} não-significativo, pelo teste F;

Apêndice B. RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA – CAPÍTULO II

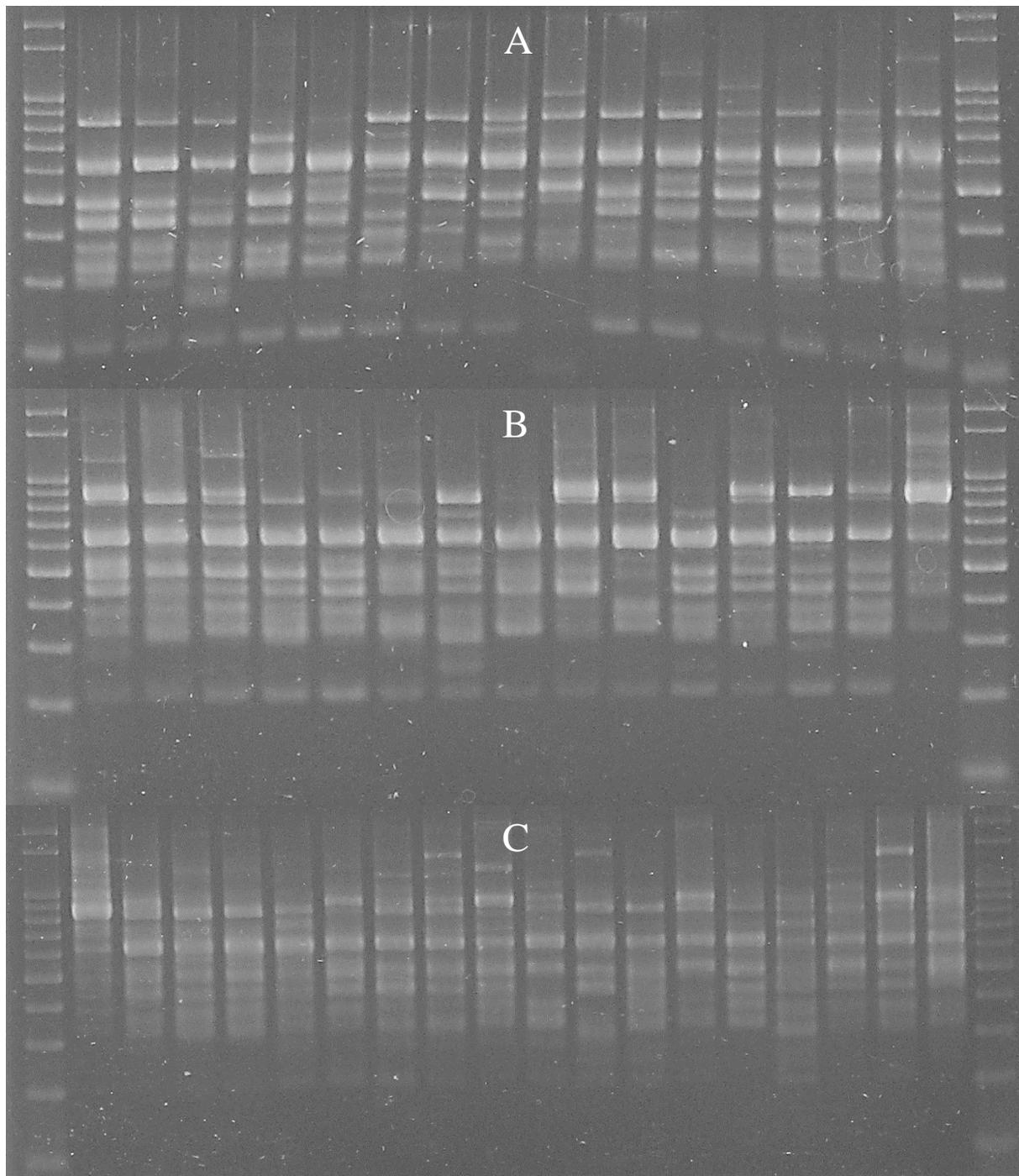
Quadro 03 - Resumo da análise de variância das características massa fresca de folhas (MFF), massa seca de folhas (MSF), comprimento de folha (CF), largura de folha (LF), comprimento da base foliar direita (CBD), comprimento da base foliar esquerda (CBE), largura do pecíolo (LP). Feira de Santana, BA, 2015.

FV	GL	Quadrados Médios						
		MFF (g)	MSF (g)	CF (cm)	LF (cm)	CBD (cm)	CBE (cm)	LP (cm)
Bloco	3	616035,22	105145,93	0,0144	0,021	0,0036	0,00024	0,00027
Genótipo	11	807021,33**	125472,67**	0,644**	0,39**	0,0763**	0,085**	0,00096**
Resíduo	33	270624,16	43370,97	0,0708	0,048	0,0099	0,0073	0,00011
Média	-	1105,58	438,81	1,56	1,18	0,69	0,70	0,084
CV (%)	-	47,05	47,46	17,01	18,44	14,35	12,20	12,61

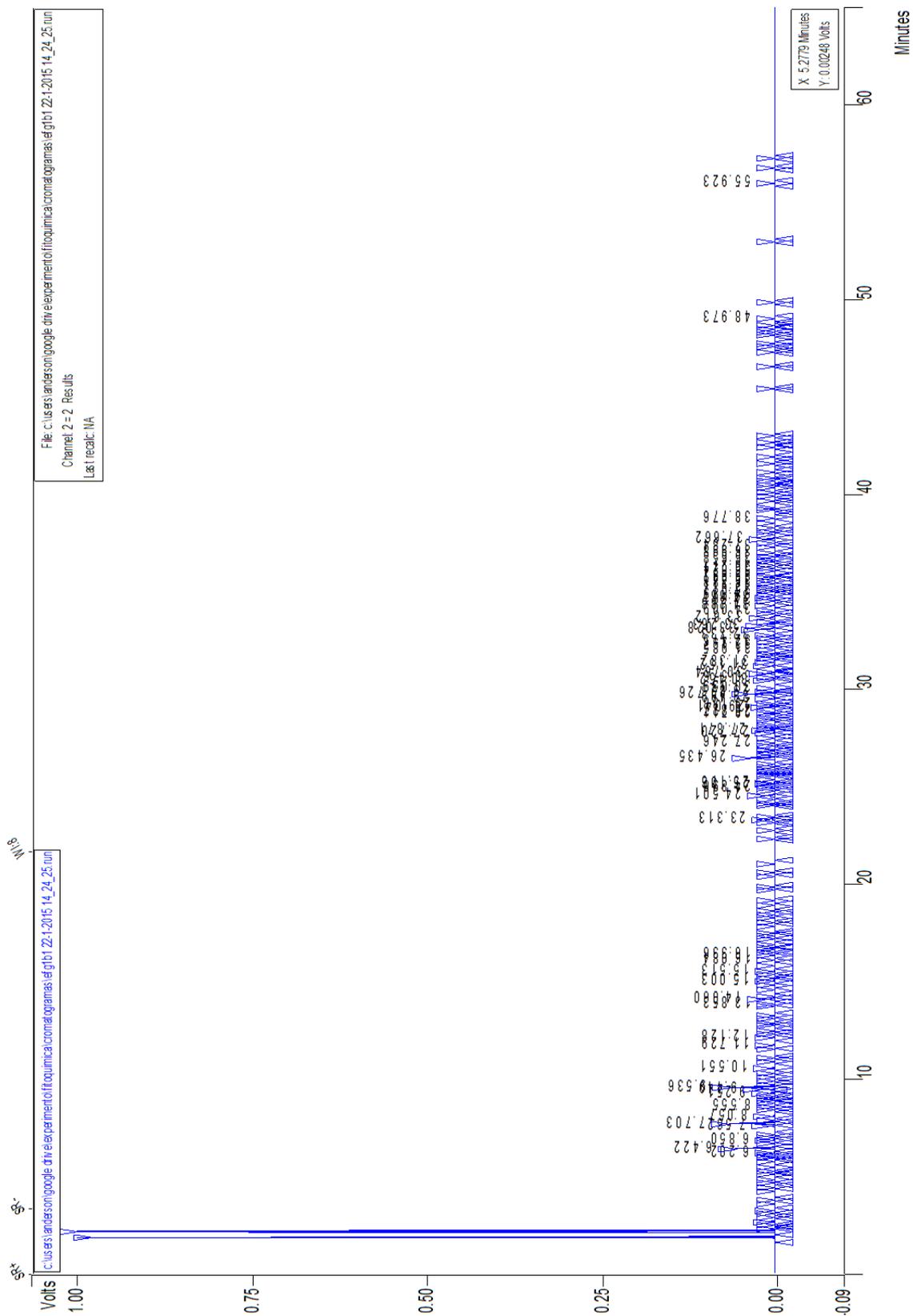
** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F;

^{ns} não-significativo, pelo teste F;

Apêndice C. GEIS DE ELETROFORESE COM REGISTRO DAS BANDAS DO INICIADOR ISSR “MANNY” NO DNA TOTAL DE *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore. **A.** EF1851 – *E. cuniloides*; **B.** EF1850 – *E. fruticosa*; **C.** EF2326 – *E. brightoniae*. Feira de Santana, BA, 2015.



Apêndice E. CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DO GENÓTIPO EF001 DE *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore. Feira de Santana, BA, 2015.



Apêndice F. COMPOSIÇÃO INTEGRAL DO ÓLEO ESSENCIAL DOS GENÓTIPOS DE *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore ESTUDADOS. Feira de Santana, BA, 2015.

IKlit	IKcalc	Composto	EF001	EF002	EF003	EF004	EF005	EF006
930	927	α -tujeno	0.08	0.00	0.05	0.05	0.23	0.05
939	936	α -pineno	7.05	4.80	7.35	6.95	4.43	4.55
954	951	canfeno	0.95	1.20	0.38	1.35	1.98	1.13
975	974	sabineno	0.70	0.53	0.78	0.60	0.90	0.68
977	978	β -pineno	5.30	3.28	4.73	6.33	3.03	3.35
990	989	β -mirceno	0.63	0.53	0.60	0.50	0.50	0.45
1004	1003	p-mentha-1(7),8-dieno	0.55	0.20	0.13	0.23	0.18	0.15
1026	1024	p-cimeno	0.38	0.00	0.00	0.28	0.60	0.13
1029	1030	limoneno	8.03	4.20	2.25	5.25	3.98	3.85
1031	1032	1,8-cineol	6.10	4.85	8.95	3.00	4.53	4.70
1059	1059	γ -terpineno	0.33	0.05	0.15	0.28	0.63	0.13
1086	1087	fenchona	0.35	0.33	0.38	0.40	0.53	0.13
1096	1096	linalol	0.38	0.45	0.45	0.38	0.40	0.38
1139	1139	trans-pinocarveol	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1146	1144	cânfora	5.78	2.55	0.38	1.93	5.20	2.15
1169	1166	borneol	1.15	0.78	0.63	2.35	2.23	2.33
1177	1177	terpinen-4-ol	0.20	0.25	0.23	0.28	0.30	0.28
1188	1189	α -terpineol	0.10	0.05	0.05	0.13	0.00	0.00
1195	1194	mirtenol	0.08	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
Monoterpenos			38.18	24.03	27.28	30.30	29.60	24.40
1338	1340	δ -elemeno	0.00	0.05	0.10	0.00	0.00	0.00
1348	1351	α -cubebeno	1.73	1.10	0.23	2.03	2.43	1.80
1377	1377	α -copaeno	2.75	2.85	2.40	3.88	4.28	2.40
1388	1386	β -bourboneno	0.23	0.30	0.28	0.38	0.30	0.23
1388	1390	β -cubebeno	0.88	0.28	0.25	1.50	2.05	1.45
1388	1392	β -elemeno	0.30	1.00	0.33	0.48	0.53	0.50
1409	1412	α -gurjuneno	0.00	0.13	0.13	0.05	0.08	0.13
1419	1421	E-cariofileno	8.60	14.40	16.08	13.80	14.68	12.80
1441	1441	aromadendreno	0.25	0.43	0.45	0.08	0.08	0.13
1453	1452	trans-muurolo-3,5-dieno	0.85	0.98	0.23	0.98	1.08	1.90
1454	1456	α -humuleno	1.73	2.68	2.93	2.38	2.33	2.18
1479	1477	γ -muurolo	0.33	0.23	0.20	0.43	0.48	0.33
1485	1482	germacreno D	3.23	7.93	6.90	7.63	4.95	6.08
1496	1497	biciclogermacreno	10.40	16.95	19.43	3.10	6.55	11.05
1513	1513	γ -cadineno	1.30	0.95	0.70	1.50	1.43	1.40
1529	1524	trans-calameneno	3.25	2.80	1.48	2.45	3.08	3.20
1534	1533	trans-cadina-1,4-dieno	1.25	0.83	0.10	1.00	1.45	1.48
1583	1579	espatulenol	4.25	5.70	6.48	2.50	1.20	4.58
1583	1584	óxido de cariofileno	2.85	3.35	3.83	3.73	3.73	2.48
1592	1593	viridiflorol	2.03	1.28	1.13	2.35	4.28	1.10
1620	1619	1,10-di-epi-cubenol	0.20	0.65	0.55	0.83	0.53	0.65
1640	1643	epi- α -cadinol	0.75	2.48	1.18	2.40	1.83	2.20
1654	1655	α -cadinol	1.80	0.75	1.05	1.28	0.95	1.68
1696	1696	eudesm-7(11)-en-4-ol	0.88	0.68	0.13	2.98	3.25	1.60
Sesquiterpenos			49.80	68.73	66.50	57.68	61.48	61.30
Total			87.98	92.75	93.95	87.98	91.08	85.70

Apêndice F. COMPOSIÇÃO INTEGRAL... (Continuação...)

IKlit	IKcalc	Composto	EF007	EF008	EF009	EF010	EF011	EF012
930	927	α -tujeno	0.00	0.05	0.13	0.25	0.05	0.13
939	936	α -pineno	4.83	6.23	11.93	5.65	4.48	10.53
954	951	canfeno	1.13	1.53	0.75	1.75	1.25	0.65
975	974	sabineno	0.75	1.08	0.88	1.75	0.78	0.90
977	978	β -pineno	5.83	5.90	5.80	6.08	4.10	6.68
990	989	β -mirceno	0.50	0.65	0.60	0.65	0.53	0.68
1004	1003	p-mentha-1(7),8-dieno	0.35	0.45	0.25	0.63	0.40	0.38
1026	1024	p-cimeno	0.18	0.28	0.33	0.35	0.08	0.25
1029	1030	limoneno	5.98	7.70	4.15	9.43	6.75	6.15
1031	1032	1,8-cineol	3.65	4.10	8.93	3.60	3.45	5.70
1059	1059	γ -terpineno	0.13	0.28	0.35	0.45	0.23	0.45
1086	1087	fenchona	0.28	0.38	0.30	0.43	0.33	0.38
1096	1096	linalol	0.40	0.38	0.43	0.38	0.30	0.50
1139	1139	trans-pinocarveol	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
1146	1144	cânfora	3.25	4.93	3.30	5.45	3.73	0.98
1169	1166	borneol	2.25	2.13	0.38	1.05	1.70	1.05
1177	1177	terpinen-4-ol	0.20	0.30	0.23	0.43	0.28	0.30
1188	1189	α -terpineol	0.10	0.08	0.05	0.20	0.23	0.25
1195	1194	mirtenol	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
Monoterpenos			29.83	36.40	38.75	38.60	28.63	35.93
1338	1340	δ -elemeno	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1348	1351	α -cubebeno	1.68	1.60	2.18	1.30	2.00	1.35
1377	1377	α -copaeno	3.18	3.08	4.68	3.23	3.30	2.63
1388	1386	β -bourboneno	0.28	0.23	0.28	0.18	0.33	0.33
1388	1390	β -cubebeno	1.13	1.15	1.10	0.75	1.30	0.80
1388	1392	β -elemeno	0.43	0.30	0.23	0.43	0.48	0.45
1409	1412	α -gurjuneno	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20
1419	1421	E-cariofileno	9.80	9.60	9.33	10.88	11.70	12.28
1441	1441	aromadendreno	0.23	0.13	0.13	0.13	0.15	0.28
1453	1452	trans-muurolo-3,5-dieno	1.30	1.23	1.28	0.88	1.43	1.08
1454	1456	α -humuleno	1.85	1.80	1.75	1.93	2.03	2.15
1479	1477	γ -muurolo	0.28	0.25	0.28	0.18	0.38	0.35
1485	1482	germacreno D	6.43	5.53	4.05	6.28	7.73	6.40
1496	1497	biciclogermacreno	10.88	9.18	7.10	8.60	8.40	10.55
1513	1513	γ -cadineno	1.20	1.40	1.13	1.33	1.68	1.23
1529	1524	trans-calameneno	3.55	2.95	3.83	2.18	3.10	2.43
1534	1533	trans-cadina-1,4-dieno	1.13	1.13	1.55	0.78	1.28	1.53
1583	1579	espatulenol	4.85	3.73	4.75	3.23	3.43	4.80
1583	1584	óxido de cariofileno	2.28	2.13	2.63	2.38	2.63	3.05
1592	1593	viridiflorol	1.73	1.20	3.18	1.93	1.10	0.98
1620	1619	1,10-di-epi-cubenol	0.53	0.38	0.48	1.45	1.03	0.43
1640	1643	epi- α -cadinol	1.58	1.15	0.65	3.95	3.45	2.03
1654	1655	α -cadinol	2.03	2.23	0.38	0.93	1.50	1.03
1696	1696	eudesm-7(11)-en-4-ol	0.70	0.88	1.85	1.10	0.85	0.88
Sesquiterpenos			57.08	51.20	52.75	53.95	59.23	57.18
Total			86.90	87.60	91.50	92.55	87.85	93.10