

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**TESE**

**Variabilidade Genética e Produção de Óleo Essencial de  
Clones de *Lippia alba* (Mill) N.E.Brown Oriundos da  
Região Metropolitana do Rio de Janeiro**

**Uirá do Amaral**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA E PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL  
DE CLONES DE *Lippia alba* (Mill) N.E.Brown ORIUNDOS DA REGIÃO  
METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

**UIRÁ DO AMARAL**

*Sob orientação do Professor  
Maurício Ballesteiro Pereira*

*e Co-orientação do Professor  
Marco Andre Alves de Souza*

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Ciências**, no Curso de Pós-Graduação  
em Fitotecnia, Área de concentração  
Produção Vegetal (Melhoramento  
Vegetal)

Seropédica, RJ  
Dezembro de 2015

635.968

A485v

T

Amaral, Uirá do, 1987-

Variabilidade genética e produção de óleo essencial de clones de *Lippia alba* (Mill) N.E.Brown oriundos da região metropolitana do Rio de Janeiro / Uirá do Amaral. - 2015.

55f. : il.

Orientador: Maurício Ballesteiro

Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Inclui bibliografias.

1. Plantas aromáticas - Teses. 2. Plantas aromáticas - Cultivo - Rio de Janeiro (RJ) - Teses. 3. Erva-cidreira - Teses. 4. Erva-cidreira - Genética - Teses. 5. Essências e óleos essenciais - Teses. 6. Interação genótipo-ambiente - Teses. I. Pereira, Maurício Ballesteiro, 1954- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**UIRÁ DO AMARAL**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

TESE APROVADA EM 17/12/2015

---

Maurício Ballesteiro Pereira – Dr. UFRRJ  
(Orientador)

---

Jorge Jacob Neto – Dr. UFRRJ

---

Marilene Hilma dos Santos – Dra. UFRRJ

---

Maria do Carmo de Araújo Fernandes – Dra. Pesagro-RJ

---

Lília Aparecida Salgado de Moraes – Dra. Embrapa

## **DEDICATÓRIA**

A toda minha família, em especial meus pais Rubens do Amaral Filho e Rosilene Antônio Pedroso e ao meu irmão Jauí Amaral e família. Ofereço ainda à minha querida esposa Priscila Vieira Teixeira do Amaral, ao meu sogro Raimundo Nonato Teixeira e à minha sogra Divina Vieira. E todos aqueles que ao longo da minha caminhada me acolheram e despretensiosamente auxiliaram um brasileiro do interior.

**“Sou raiz, e vou caminhando  
sobre as minhas raízes tribais”.**  
*Cora Coralina*

**Todos esses que aí estão  
Atravancando meu caminho,  
Eles passarão...  
Eu passarinho!**  
*Mário Quintana*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sua presença constante e pela condução nas adversidades.

Aos meus pais por oportunizarem mesmo com dificuldade meu ingresso na escola e nunca deixaram de acompanhar meu progresso nos estudos.

Ao meu irmão por compartilhar de momentos únicos na tenra infância e por me ensinar coisas simples como o ‘valor da família’.

A minha esposa Priscila, por estar ao meu lado nos momentos difíceis desta caminhada e principalmente pelo ‘amor verdadeiro’.

Aos amigos e amigas que sempre estimularam e acreditaram no meu potencial, sou eternamente grato por tudo. Desde um prato de comida, uma palavra amiga, uma ida ao shopping, um ombro para chorar, um tênis para caminhar, etc.

Aos professores que colaboram com a minha formação desde a escola básica até o doutorado.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela oportunidade e concessão de bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Maurício Ballesteiro Pereira pela orientação e antes de tudo pela confiança e por mostrar que devemos estudar continuamente e não ter medo de sair da zona de conforto quando se deseja aprender.

Ao professor Dr. Valdir Diola *in memoriam*.

Ao professor Dr. Pedro Côrrea Damasceno Junior por conceder um projeto de Tese e por acreditar que seria possível defendê-lo, mesmo quando parecia impossível.

Ao professor Dr. Marco Andre por abrir as portas do laboratório de Plantas Medicinais e por ceder generosamente este espaço para desenvolvermos o projeto de Tese. E pelas palavras valiosas em momentos difíceis ao longo deste período.

Ao professor Jorge Jacob Neto pelo apoio incondicional na reta final do doutorado, incluindo as palavras de incentivo.

A todos aqueles que estiverem direta e indiretamente envolvidos com este trabalho e com minha passagem nesta Instituição de Ensino Superior.

## **BIOGRAFIA**

Uirá do Amaral nasceu aos 10 dias do mês de fevereiro de 1987, no município de Luziânia, no Estado de Goiás. Filho de Rubens do Amaral Filho e Rosilene Antônio Pedroso, casado com Priscila Vieira Teixeira do Amaral. Em 2004, concluiu o ensino médio concomitante ao curso profissionalizante de Técnico em Agropecuária no Centro Federal de Educação Tecnológica de Urutaí-GO. Em 2005, com bolsa integral pelo PROUNI ingressou no curso de Agronomia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), onde também foi bolsista de iniciação científica durante todo o curso. Em julho de 2011, obteve pela Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), o título de Mestre em Produção Vegetal no Semiárido, com ênfase em Fruticultura. No mês de agosto do mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado da UFRRJ, junto ao Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, conduzindo experimentos no Setor de Plantas Medicinais e Aromáticas do Instituto de Agronomia da UFRRJ, sob a orientação do Dr. Maurício Ballesteiro Pereira.



## RESUMO GERAL

AMARAL, Uirá do. **Variabilidade genética e produção de óleo essencial de clones de *Lippia alba* (Mill) N.E.Brown oriundos da região metropolitana do Rio de Janeiro**. 2015. 55f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

A biodiversidade, uma das propriedades fundamentais da natureza, é fonte de imenso potencial de uso econômico. O Brasil é detentor de uma rica biodiversidade, e é considerado um dos países megadiversos mais importantes do planeta. Dentre os vários elos que compõe esta biodiversidade a flora nativa brasileira merece destaque. Apesar disto, poucos têm sido os estudos que promovem a utilização inteligente e racional destes recursos genéticos. A domesticação e o melhoramento de plantas nativas, incluindo aquelas já conhecidas e utilizadas por populações locais ou regionais, porém sem penetração no mercado nacional ou internacional, é a grande oportunidade que se oferece aos países ricos em recursos genéticos. As plantas medicinais e aromáticas representam uma parte expressiva deste mercado em potencial, sendo que a espécie erva-cidreira-brasileira (*Lippia alba*) é um exemplo importante de planta medicinal e aromática, há muito tempo utilizada pela medicina popular por suas funções como calmante, antiespasmódica, sedativo, além de produzir vários tipos de óleos essenciais podendo ser utilizada pela indústria de perfumes, alimentos e produtos de limpeza, além do controle de pragas e doenças na agricultura. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética e parâmetros genéticos de acessos de *L. alba* e o comportamento agrônômico de diferentes clones oriundos da região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. O experimento foi instalado em novembro de 2011 no Setor de Plantas Mediciniais do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e as colheitas foram obtidas na primavera de 2013 e no verão de 2014. Este estudo foi dividido em três capítulos: Polimorfismo em clones de *L. alba* oriundos da região Metropolitana do Rio de Janeiro (Capítulo I) e Parâmetros genéticos e avaliação agrônômica em clones de *L. alba* (Mill) N.E.Brown em duas estações no ano (Capítulo II). No capítulo I os acessos foram agrupados em dendrograma, sendo formados cinco grupos e o grupo I reuniu os dois acessos similares (UFRRJLA 17 e UFRRJLA 18). No capítulo II foi demonstrado que os caracteres analisadas apresentaram comportamento variável conforme a estação do ano (primavera ou verão) confirmando a forte influência do ambiente sobre as variáveis quantitativas. A matéria seca total e a produtividade foram maiores no clone com quimiotipo citral (UFRRJLA05), com os maiores valores médios nas duas estações do ano em que os dados foram avaliados. Já para o rendimento e produtividade de óleo essencial destacou-se o acesso com quimiotipo limoneno-carvona (UFRRJLA03), tanto na primavera quanto no verão.

**Palavras-chave:** planta medicinal e aromática; citral; limoneno; carvona; óleo essencial.

## ABSTRACT

AMARAL, Uirá do. **Genetic variability and essential oil production of *Lippia alba* clones (Mill) N.E.Brown coming from the metropolitan area of Rio de Janeiro.** 2015. 55f. Thesis (Doctor in Plant Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Biodiversity, one of the fundamental properties of nature, is a source of immense economic potential. Brazil holds a rich biodiversity, and is considered one of the most important mega-diverse countries on the planet. Among the various links that make up this biodiversity Brazilian native flora noteworthy. Despite this, there have been few studies that promote intelligent and rational use of this genetic resource. Domestication and breeding of native plants, including those already known and used by local or regional populations, but without penetration at the national or international market is the great opportunity offered to the countries rich in genetic resources. Medicinal and aromatic plants represent a significant part of this potential market, and the lemongrass-Brazilian species (*Lippia alba*) is an important example of medicinal and aromatic plant, long used in folk medicine for his duties as soothing, antispasmodic, sedative, and produce various kinds of essential oils can be used by the perfume industry, food and cleaning products, beyond the control of pests and diseases in agriculture. Thus, the objective of this study was to evaluate the genetic variability, genetic parameters and the agronomic behavior of different accesses of *L. alba*, coming from the metropolitan region of the State of Rio de Janeiro. The experiment was conducted in November 2011 on Medicinal Plants Sector of Agronomy Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro, and crops were obtained in the spring of 2013 and summer of 2014. This study was divided into three chapters: Polymorphism in clones of *L. alba* coming from the metropolitan area of Rio de Janeiro (Chapter I); Genetic variation for morphological characters in clones of *A. alba* (Chapter II) and seasonality effect in producing chemotypes of *L. alba* (Chapter III). In Chapter I the accessions were grouped into dendrogram, five groups being formed and the group I met two similar access (UFRRJLA 17 and UFRRJLA 18). In Chapter II it was shown that the characters analyzed showed variability according to the season (spring or summer) confirming the strong influence of the environment on quantitative variables. The total dry matter and yield were higher in access UFRRJLA05 with citral chemotype, which showed the highest average values in the two seasons in which the data were evaluated. As for the essential oil yield and productivity stood out access UFRRJLA03 with limonene-carvone chemotype, both in spring and in summer.

**Key words:** medicinal and aromatic plant; citral; limonene; carvone; essential oil

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Distribuição mundial de *L. alba*. Fonte: Discover Life (2015) ..... 3
- Figura 2.** Principais rotas metabólicas para a biossíntese de metabólitos secundários, formados principalmente por dois precursores: o ácido chiquímico e o acetato. Via DOXP recentemente associada a biossíntese de terpenóides em plantas (adaptado de SANTOS, 2001; DI STASI, 1996; SANGWAN *et al.*, 2001; LICHTENTHALER, 1999)..... 8
- Figura 3.** Via da biossíntese dos terpenóides (VERPOOT, 2000)..... 9
- Figura 4.** Tricomas secretores de *Lippia alba*: A) Nervura central, em corte transversal; B) Tricoma (tipo I); C) Tricoma (tipo II) e D) Tricoma (tipo III) (bars =10 µm). ..... 10

### CAPÍTULO I

- Figura 5.** Locais de coleta dos genótipos de erva-cidreira-brasileira na região Metropolitana do Rio de Janeiro. .... 105
- Figura 6.** Dendrograma obtido pelo método de *Neighbor Joining* por meio do coeficiente de similaridade de Jaccard para as amostras dos vinte genótipos de *L. alba*. Quimiotipos: ● citral; □ mirceno-citral; ◆ limoneno-carvona; ▲ β-cariofileno; ○ linalol..... 108

### CAPÍTULO II

- Figura 7.** Análise de componentes principais com vinte acessos de *Lippia alba* com projeção dos vetores dos caracteres: COLF (coloração da folha); CONF (consistência da folha); FCOP (formato da copa); HC (hábito de crescimento) e COLPET (coloração de pétala)..... 42
- Figura 8.** Análise de divergência genética para 20 genótipos de *Lippia alba* a partir de variáveis qualitativas. As distâncias genéticas e quantificadas através da distância Euclidiana padronizada e o agrupamento feita pelo método UPGMA . .... 43

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Tabela 1.** Acessos de *Lippia* ssp. oriundos de diferentes regiões do Brasil, pertencentes a Coleção de trabalho da Universidade de Brasília – UnB. .... 5
- Tabela 2.** Acessos de *L. alba* oriundos de diferentes regiões do Brasil, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Sergipe (UFS). .... 5
- Tabela 3.** Constituintes químicos de *L. alba* em função da parte utilizada. .... 10
- Tabela 4.** Principais fatores que interferem na produção de óleo essencial de *L. alba*..... 11

### CAPÍTULO I

- Tabela 5.** Acessos de *L. alba* e quimiotipos correspondentes ..... 25
- Tabela 6.** Marcadores ISSR utilizados na amplificação do DNA de 20 acessos erva-cidreira-brasileira (*Lippia alba*), com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento (TA), número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas, número de bandas monomórficas e porcentagem de polimorfismo. Seropédica-RJ, 2015. .... 27

### CAPÍTULO II

- Tabela 7.** Identificação dos acessos de acordo com a origem. .... 39
- Tabela 8.** Características qualitativas de acessos de *L. alba* (Mill.) N. E. Br. da coleção de germoplasma da UFRRJ..... 41
- Tabela 9.** Análise de variância das variáveis morfoagronômicas de diferentes genótipos de *L. alba* referente a colheita de primavera, Seropédica-RJ..... 43
- Tabela 10.** Análise de variância das variáveis morfoagronômicas de diferentes genótipos de *L. alba* referente a colheita de verão, Seropédica-RJ..... 44
- Tabela 11.** Análise de variância das variáveis produtivas de diferentes genótipos de *L. alba* referente a colheita de primavera, Seropédica-RJ. .... 45
- Tabela 12.** Análise de variância das variáveis produtivas de diferentes genótipos de *L. alba* referente a colheita de verão, Seropédica-RJ. .... 45
- Tabela 13.** Análise de variância das variáveis teor (%) e rendimento de óleo essencial (ml planta<sup>-1</sup>) de diferentes genótipos de *L. alba* referente a colheita da primavera, Seropédica-RJ. .... 46
- Tabela 14.** Análise de variância das variáveis teor (%) e rendimento de óleo essencial (ml planta<sup>-1</sup>) de diferentes genótipos de *L. alba* referente a colheita de verão, Seropédica-RJ..... 46

- Tabela 15.** Valores médios de AL = altura de plantas (cm), NR = número de ramos, LC = largura copa (cm) e DC = diâmetro do caule (cm), em duas estações do ano (PRI = primavera e VER = verão). Seropédica –RJ. .... 47
- Tabela 16.** Valores médios de NER (número de entre nós por ramo), NF (número de folhas), NF/NR (razão número de folhas por número de ramos), em duas estações do ano (PRI = primavera e VER = verão). Seropédica –RJ..... 48
- Tabela 17.** Valores médios de MFR = massa fresca de ramos ( $\text{kg pl}^{-1}$ ) e MFFO = massa fresca de folhas ( $\text{kg pl}^{-1}$ ) em duas estações do ano (PRI = primavera e VER = verão). Seropédica –RJ. .... 49
- Tabela 18.** Valores médios de MSR = massa seca de ramos ( $\text{kg pl}^{-1}$ ), MSFO = massa seca de folhas ( $\text{kg pl}^{-1}$ ), MSTPA = massa seca total ( $\text{kg pl}^{-1}$ ) e PROD = produtividade ( $\text{kg ha}^{-1}$ ), em duas estações do ano (PRI = primavera e VER = verão). Seropédica –RJ.. .... 50
- Tabela 19.** Valores médios de TE = teor (%) e ROE = rendimento do óleo essencial ( $\text{ml pl}^{-1}$ ), em duas estações do ano (PRI = primavera e VER = verão). Seropédica –RJ. .... 51

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Recursos genéticos e conservação do gênero <i>Lippia</i> .....	3
2.1.1 Centro de origem e características gerais de <i>L. alba</i> .....	3
2.1.2 Conservação da espécie <i>L. alba</i> .....	5
2.2 Melhoramento genético de <i>L. alba</i> .....	6
2.3 Metabólitos secundários.....	8
2.4 Óleos essenciais.....	9
2.5 Fatores que interferem na produção de <i>L. alba</i> .....	11
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	12
3 CAPÍTULO I .....	21
POLIMORFISMO EM CLONES <i>Lippia alba</i> (Mill) N. E. Brown ORIUNDOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO .....	21
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
3.1 INTRODUÇÃO.....	24
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
3.4 CONCLUSÕES.....	30
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
4 CAPÍTULO II .....	34
PARÂMETROS GENÉTICOS E AVALIAÇÃO AGRONÔMICA EM CLONES DE <i>Lippia alba</i> (Mill) N. E. Brown EM DUAS ESTAÇÕES NO ANO.....	34
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
4.1 INTRODUÇÃO.....	37
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	39
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.4 CONCLUSÕES.....	54
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A crescente procura por plantas medicinais, aromáticas e condimentares, é observada em diversos países devido à tendência dos consumidores em utilizarem, preferencialmente, produtos farmacêuticos ou alimentícios de origem natural (SANTOS et al., 2014). O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. No cenário nacional de plantas medicinais e aromáticas o Estado do Paraná lidera a produção com 90% do que é produzido no país (PAULUS et al., 2013; NEGRELLE et al., 2005). Já no Estado do Rio de Janeiro a exploração de plantas aromáticas para produção de óleo essencial é praticamente inexpressiva.

O Brasil possui tradição no cultivo de plantas aromáticas e na produção de óleos essenciais, proporcionando divisas de exportação, sendo crescente a absorção desses produtos por diversos ramos industriais como nos de alimentos, fármacos, perfumes e cosméticos, inseticidas, detergentes e desinfetantes. Dentre as matérias-primas para a produção de óleos essenciais que tem despertado interesse num passado recente estão as piperáceas, lamiáceas, verbenáceas, entre outras (SILVA, 2004; LIMA & CARDOSO, 2007; SOARES & TAVARES-DIAS, 2013).

No entanto, mercado interno de óleo essencial é notadamente determinado por uma conjuntura internacional, estima-se que o Brasil colabore apenas com aproximadamente 0,1% dos US\$ 1,8 bilhões despendidos no mercado internacional de óleos essenciais. O que ainda é muito pouco frente as muitas espécies vegetais com potencial de exploração. Diante desta realidade fica evidente que ainda faltam investimentos internos na indústria de óleos essenciais, tendo em vista que as empresas são predominantemente do tipo integradas e pertencem a outros países (SANTOS, 2011).

A espécie *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown é uma planta com múltiplas propriedades medicinais e aromáticas (MAMUN-OR-RASHID et al., 2013), bastante utilizada no mercado popular e de grande interesse comercial pelas propriedades de seus compostos secundários (BOTTIGNON, 2009). Destacando ação analgésica, anti-inflamatória, sedativa e antiespasmódica (PASCUAL et al., 2001; PINTO et al., 2006; MATTOS et al., 2007). Além disso, possui atividades inseticida, antibacteriana e antifúngica, que podem ser exploradas na agricultura orgânica (TAVARES et al., 2011).

Dentre os componentes do óleo essencial de *L. alba*, o linalol tem se destacado pelo seu expressivo rendimento na planta (JANNUZZI et al., 2006) e por sua ampla utilização nas indústrias de aromatizantes, cosméticos e perfumes (SANTOS, 2011). Podendo citar ainda o limoneno, componente aromático comum nas indústrias farmacêutica e alimentícia. E o citral como fragrância em cosméticos e perfumes (SANTOS, 2011).

A constante utilização dessas plantas com fins medicinais e aromáticas se dá na forma de coleta não-sustentável, ou seja, a maioria das plantas medicinais e aromáticas ainda não é cultivada. Grande parte das plantas medicinais e aromáticas cultivadas encontra-se no estágio inicial de domesticação, tornando a situação ainda mais preocupante, porque a disponibilidade do medicamento fitoterápico está estritamente relacionada com a qualidade e quantidade de espécie vegetal que lhe dá origem. Afim, de evitar que essas perdas de recursos genéticos continuem ocorrendo, alguns métodos de conservação desse material genético são sugeridos, a exemplo dos Bancos Ativos de Germoplasma (CÂMELO, 2010).

Uma maneira de conhecer a genética da espécie é por meio da caracterização genotípica via obtenção de marcadores moleculares. No melhoramento de plantas, em especial, destaca-se o uso desses marcadores nos trabalhos de mapeamento genético, na identificação de QTLs

(*Quantitative Trait loci*), nos estudos de diversidade genética em bancos de germoplasma, na seleção assistida por marcadores (SAM) e, recentemente, nos estudos de seleção genômica ampla. Um exemplo de marcador bastante utilizado para as finalidades supracitadas são os ISSR (*Inter simple sequence repeat*), baseado em PCR, consiste na amplificação de segmentos de DNA localizados entre duas regiões microssatélites idênticas (CAIXETA et al., 2013). Alguns estudos de genotipagem em *L. alba* já foram realizados em diferentes genótipos, diante dos resultados ficou evidente que os marcadores moleculares ISSR e RAPD e SSR foram eficientes para avaliar a variabilidade genética em *L. alba* (MANICA-CATTANI et al., 2007; VAL et al., 2009; SANTOS et al., 2012).

O conhecimento das características morfológicas da planta e do ambiente de cultivo contribui para a seleção de genótipos mais adaptados a ambientes específicos, e para verificar a existência de acessos repetidos nos bancos de germoplasma (SANT'ANA, 2009). Neste sentido, a obtenção de descritores morfológicos são essenciais para auxiliar na discriminação da variabilidade genética dos muitos genótipos de *L. alba*.

Para YAMAMOTO (2006) ao avaliar a interação genótipo x ambiente de vinte acessos de *L. alba* quimiotipos (linalol, mirceno/cânfora, limoneno/carvona, citral e mirceno), foi possível concluir entre outras coisas que os quimiotipos testados foram estatisticamente contrastantes para características fenotípicas, enquanto dentro de quimiotipo os contrastes significativos entre genótipos foram em menor número. Finalmente, um ponto crítico no cultivo de plantas medicinais e aromáticas no Brasil é a falta de informações sobre aspectos agrônomicos e sistemas de produção (EHLERT, 2003; JANNUZZI et al., 2011).

Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar acessos de *L. alba* oriundos de diferentes locais da região Metropolitana do Rio de Janeiro, a partir de análises moleculares, descritores morfológicos e obtenção de parâmetros genéticos. Além de avaliar o potencial agrônomico de clones para produção de óleo essencial destes genótipos nas condições edafoclimáticas desta região.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Recursos genéticos e conservação do gênero *Lippia*

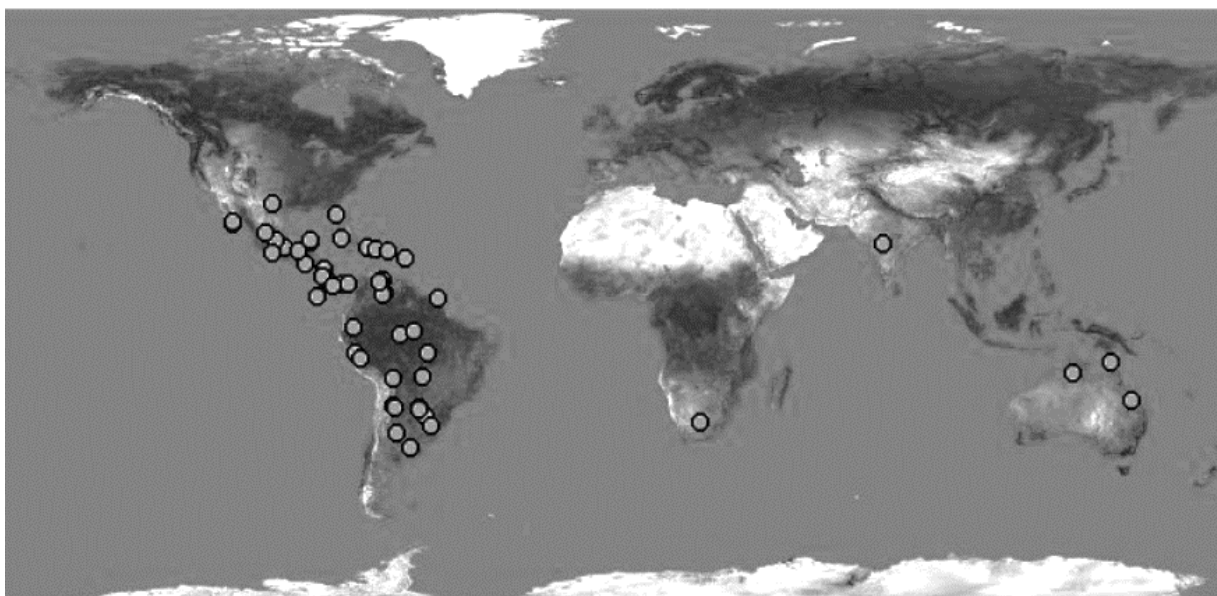
#### 2.1.1 Centro de origem e características gerais de *L. alba*

A espécie *L. alba* (Mill) N. E. Brown pertence à família Verbenaceae que está distribuída em praticamente todos os continentes e apresenta uma grande diversidade de espécies medicinais e aromáticas. Segundo alguns autores, a família Verbenaceae possui aproximadamente 32 gêneros e 840 espécies (CANTINO et al., 1992; ATKINS, 2004). Inferências filogenéticas sugerem que esta família é originária da América do Sul, com alguns eventos de colonização que auxiliaram na dispersão de espécies para o Velho Mundo (MARX et al., 2010). As espécies que compõem a família Verbenaceae tem seu potencial econômico amplamente explorado, tanto como ornamentais (LORENZI & SOUZA 2001), quanto terapêuticas, neste último caso devido a presença de óleos essenciais.

A espécie *L. alba* é nativa da América do Sul e tem o Brasil como possível centro de origem (RUFINO et al. 2012). Segundo SALIMENA (2002) existem diversas sinonímias para *L. alba* (Mill) N. E. Brown na comunidade científica, podendo receber o nome de *L. microphylla* Griseb, *L. geminata* H.B.K., *L. globiflora* Kuntze, *L. lantanoides* Coult, *Lantana alba* Mill e *Phyla germinata* H.B.K.

A *L. alba* é considerada uma planta medicinal e aromática, sendo popularmente denominada de erva cidreira de arbusto, erva cidreira do campo, erva cidreira brasileira, alecrim, alecrim do campo, alecrim selvagem, camará, capitão do mato, cidrão, cidró, cidreira, capim cidreira, cidreira falsa, falsa melissa, salva do Brasil, salva limão, entre outras (MARTINS et al., 2000; SILVA & SALIMENA, 2002).

Atualmente a espécie é cultivada em países, como o México, Paraguai, Costa Rica, Guatemala, Colômbia e Brasil, devido principalmente a sua ampla variedade fenotípica, o que facilita sua adaptação em condições ambientais diversificadas (PALÁCIO-LOPEZ & RODRIGUES-LOPEZ, 2007). Ela também pode ser encontrada no Sul dos Estados Unidos (Flórida) e Norte da Argentina, além de países da África, na Índia e na Austrália (HENNEBELLE et al. 2008; AQUINO et al. 2010) (Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição mundial de *L. alba*. Fonte: Discover Life (2015)

A *L. alba* tolera secas de aproximadamente 4 a 6 meses sem chuva devido a alterações morfológicas, tais como, diminuição da área foliar, número de folhas, etc (ARAMBARRI et al., 2006). Essa espécie cresce em temperatura média de 24°C, com uma umidade relativa de 75% e precipitação média anual de 1.056 mm, em áreas onde as estações chuvosa e seca são bem definidas (RUEDA et al., 2007). Com relação ao desenvolvimento, vegeta em solos arenosos e nas margens dos rios, açudes, lagos e lagoas, em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (CORRÊA JUNIOR, 1994), em altitudes de até 1800 m (GUPTA, 1995).

### 2.1.2 Conservação da espécie *L. alba*

A caracterização dos recursos genéticos armazenados nos bancos de germoplasma permite conhecer e preservar a variabilidade genética das espécies, além de possibilitar a identificação e seleção de acessos de interesse. Esses acessos, por meio de programas de melhoramento genético, poderão dar origem a cultivares superiores, adaptadas a ambientes específicos e com características favoráveis como, no caso das plantas aromáticas e medicinais, alto rendimento de óleos essenciais ricos nos princípios ativos desejados (BLANK, 2013).

Apesar da espécie *L. alba* estar presente em várias regiões brasileiras, ainda são poucos os bancos de germoplasmas e coleções de trabalho frente a grande variabilidade genética da espécie. Neste sentido, a manutenção e caracterização da diversidade genética de *L. alba* é de fundamental importância para conservação e o melhoramento genético da espécie, à exemplo da coleção de *Lippia* ssp. da Universidade de Brasília – UnB (Tabela 1) e do banco ativo de germoplasma da Universidade Federal do Sergipe - UFS (Tabela 2).

**Tabela 1.** Acessos de *Lippia* ssp. oriundos de diferentes regiões do Brasil, pertencentes a Coleção de trabalho da Universidade de Brasília – UnB.

Acesso	Localidade	Estado
LA – 01	Loteamento rural ‘ABC’	DF
LA – 02	Cidade de Araguaína	TO
LA – 04	Cidade de São Gonçalo do Rio Abaixo	MG
LA – 05	Cidade de Botucatu	SP
LA – 17	Cidade de Florianópolis	SC
LA – 22	Cidade de Ilhéus	BA
LA – 27	Cidade de Manaus	MA

**Adaptado:** JANNUZZI et al., 2011

**Tabela 2.** Acessos de *L. alba* oriundos de diferentes regiões do Brasil, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

Acesso	Município/Estado de origem	Procedência	Código no herbário da UFS
LA – 32	Rio de Janeiro – RJ	UnB	13480
LA – 29	Piracicaba – SP	UnB	13443
LA – 22	Lavras – MG	UnB	13476
LA – 45	Viçosa – MG	UnB	13498
LA – 24	Luziânia – GO	UnB	13477
LA – 30	Posse – GO	UnB	13454
LA – 10	Brasília – DF	UnB	13495
LA – 01	ABC – DF	UnB	14784
LA – 41	Curitiba – PR	UnB	13484
LA – 52	Rio Real – BA	UFS	13481
LA – 49	Aracaju – SE	UFS	13471
LA – 63	Santana do São Francisco – SE	UFS	13445
LA – 71	Paripiranga – SE	UFS	13447
LA – 72	Traipú – AL	UFS	13496
LA – 13	Fortaleza – CE	UFC	13488

**Adaptado:** CÂMELO et al., 2010

## 2.2 Melhoramento genético de *L. alba*

A variabilidade genética entre as espécies constitui a fonte primária dos estudos genéticos e sem ela não seria possível ocorrer processos naturais como adaptação e evolução das espécies e o melhoramento genético. Portanto, o sucesso de qualquer programa de melhoramento depende, fundamentalmente, da variabilidade genética dos progenitores envolvidos. Estudos sobre a identificação e caracterização da variabilidade genética em plantas medicinais concentram-se em aspectos fenotípicos, tais como os caracteres morfológicos (PINTO et al., 2011).

MANICA-CATTANI et al. (2007) avaliaram vinte e sete acessos de *L. alba* coletados no Rio Grande do Sul, neste estudo foram utilizados marcadores ISSR e RAPD visando avaliar a variabilidade genética e as relações entre acessos. Seis sequências iniciadoras de ISSR e quatro de RAPD geraram 120 fragmentos amplificados, a maior parte dos quais apresentaram algum grau de polimorfismo. A variabilidade genética geral entre acessos foi muito elevada quando comparada com outras espécies vegetais. A análise hierárquica dos dados moleculares (UPGMA) mostrou baixa relação entre acessos, e não houve formação de agrupamentos entre acessos pertencentes ao mesmo quimiotipo. A análise de funções canônicas permitiu identificar algumas variáveis relacionadas com as características químicas dos óleos essenciais. Tanto os marcadores ISSR como RAPD foram eficientes para avaliar a diversidade genética em *L. alba* e devem contribuir para a conservação e melhoramento desta importante espécie aromática e medicinal.

VAL et al. (2009) avaliaram acessos de *L. alba* do banco de germoplasma da ESALQ-USP formado por genótipos de diferentes Estados brasileiros. Foram usados 9 marcadores ISSR, obtendo-se um total de 52 locos, sendo 41 (78,85%) polimórficos. Com base nestes resultados, é possível afirmar que, com relação à diversidade genética molecular, o Estado de origem não é o melhor critério de classificação dos acessos neste banco de germoplasma.

Mais recentemente, SANTOS et al. (2012) utilizaram 11 marcadores SSR em populações de *L. alba*. Devido ao polimorfismo, dos 11 marcadores (*loci*), oito foram utilizados (*screening*) em 61 acessos de duas populações. Os parâmetros utilizados foram heterozigose esperada (*He*) e número de alelos. Os resultados identificaram 44 alelos com média de 5.5 alelos por loci, com a heterozigose variando entre moderada e alta.

Pelo fato de o metabolismo secundário ser controlado geneticamente (provavelmente poligênico) e estar intimamente associado ao mecanismo de defesa das plantas, ocorre interação com o ambiente (plasticidade fenotípica), provocando alterações significativas no rendimento e composição de seus óleos essenciais (MING, 1992; YAMAMOTO, 2006). Fato também observado por MADUEÑO BOX (1973) e pôr MAGALHÃES (1986) com relação aos tratos culturais utilizados.

Para YAMAMOTO (2006) o óleo essencial da erva-cidreira mantém qualitativamente o perfil químico mesmo variando os ambientes de cultivo, sendo observadas apenas variações quantitativas. De acordo com este estudo não foi detectada nenhuma variação qualitativa, como o surgimento de uma nova substância ou o desaparecimento de outra, conforme os diferentes ambientes estudados e, em relação ao rendimento de óleo, a magnitude da interação genótipos x ambientes foi pouco ampla, indicando alta determinação genotípica para essa característica.

Neste sentido, fica evidente a necessidade de estudos quanto à interação genótipo x ambiente, pois esta representa um desafio para os produtores no estabelecimento de genótipos

produtivos e estáveis, além de manter a uniformidade química exigida pela indústria (YAMAMOTO et al., 2008).

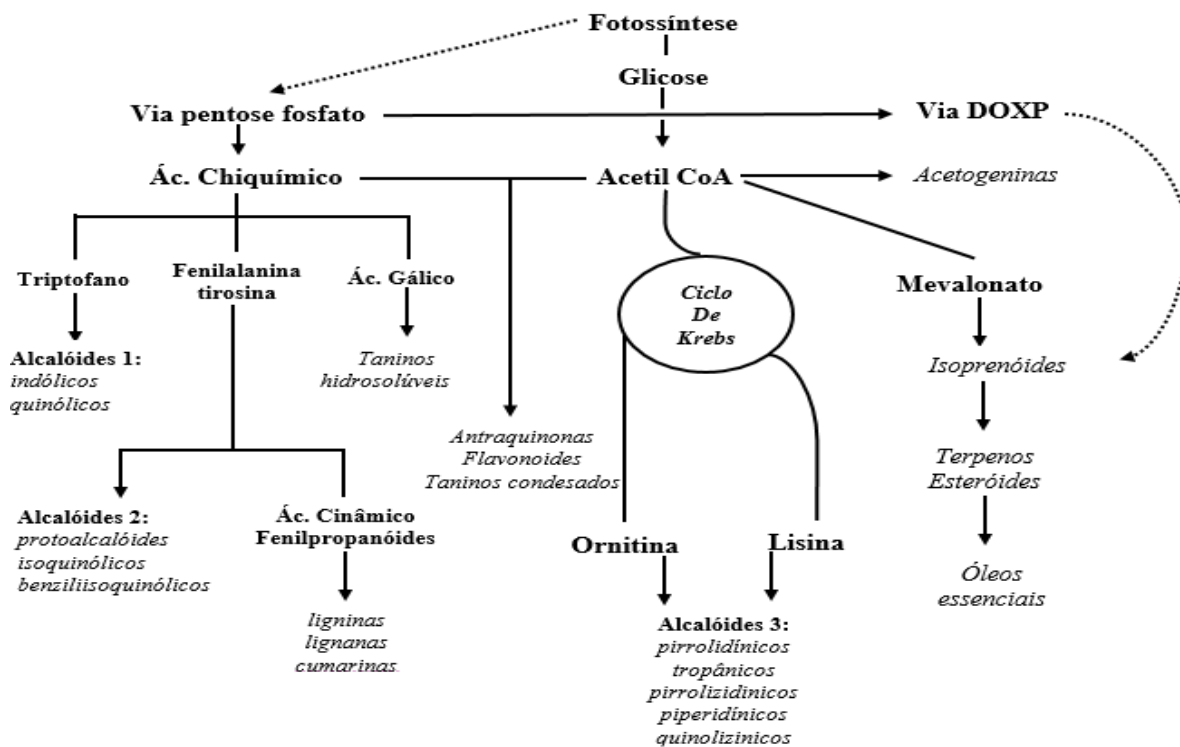
Mesmo assim, poucas são as pesquisas com *L. alba* visando o melhoramento genético da espécie. A exemplo do estudo pioneiro de SCHOCKEN (2007) onde foram obtidos quimiotipos híbridos de *L. alba*. Podendo citar ainda os estudos desenvolvidos por RUFINO (2008), avaliando a variabilidade genética em pequenas populações de *L. alba* por meio da obtenção de parâmetros genéticos. E o estudo de BOTTIGNON (2009) com estimativas de parâmetros genéticos quimiotipo linalol em progênies clonais de meios irmãos.

## 2.3 Metabólitos secundários

A biossíntese dos metabólitos secundários é realizada por rotas metabólicas específicas do organismo, ocorrendo estreita relação entre essas rotas e aquelas responsáveis pela síntese de metabólitos primários. Essas rotas metabólicas são interconectadas de forma que as rotas que sintetizam metabólitos primários fornecem moléculas que são utilizadas como precursoras nas principais rotas da síntese dos metabólitos secundários. O processo primário é a fotossíntese, por meio da qual as plantas utilizam a energia solar para a produção de compostos orgânicos. Estes compostos servem como precursores dos metabólitos secundários (CASTRO et al., 2004).

A glicose é produto da fotossíntese e a partir desta substância são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. Segundo Baser (2012) inicialmente a glicose é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias diferentes. Na primeira via, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para formar os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis) (CSEKE et al., 2006). Na segunda via, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA) (BASER, 2012). Estas podem seguir três vias diferentes: a do ácido cítrico, a do mevalonato e a da condensação do acetato.

A via do mevalonato origina os isoprenóides que são substratos para via de terpenos conforme demonstrado na figura 2 abaixo.

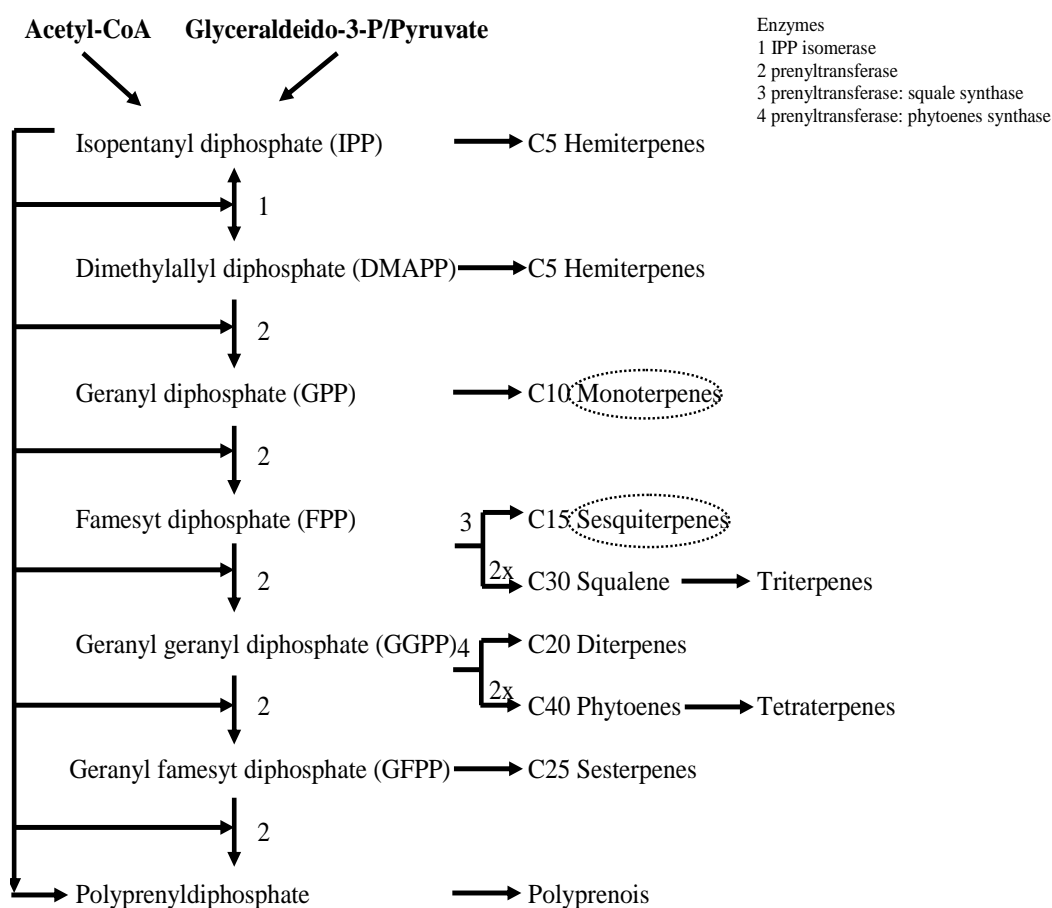


**Figura 2.** Principais rotas metabólicas para a biossíntese de metabólitos secundários, formados principalmente por dois precursores: o ácido chiquímico e o acetato. Via DOXP recentemente associada a biossíntese de terpenóides em plantas (adaptado de SANTOS, 2001; DI STASI, 1996; SANGWAN et al., 2001; LICHTENTHALER, 1999). **Fonte:** SOUZA, 2010.

## 2.4 Óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais (OE) é o resultado da mistura de um número variável de substâncias orgânicas, tais como: hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, podendo atingir centenas de substâncias, em diversas concentrações, que variam de baixíssimas quantidades (traços) a compostos majoritários (LAVABRE, 2001).

Os voláteis são produzidos a partir de intermediários de três vias do metabolismo secundário: chiquimato (compostos aromáticos) nos plastídeos, mevalonato (isoprenóides) no citosol e Mep ou DOXP (isoprenóides) nos plastídeos. Estes são constituídos principalmente de terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993; CASTRO et al., 2004). Os terpenóides são formados pela condensação de unidades de isopreno, que é obtido da pirólise de compostos C10 (Figura 3).



**Figura 3.** Via da biossíntese dos terpenóides (VERPOOT, 2000)

Para espécie *L. alba*, de acordo com a composição química majoritária dos componentes do óleo essencial, resultado da interação genótipo x ambiente, tem-se pelo menos três quimiótipos principais: citral, carvona e linalol (TAVARES et al., 2005). Já HENNEBELLE et al. (2006), sugere a formação de pelo menos sete grupos químicos para *L. alba*. Sendo eles o quimiotipo I (citral e/ou linalol), quimiotipo II (germacreno), quimiotipo III (limoneno), quimiotipo IV (mirceno), quimiotipo V ( $\gamma$ -terpeno), quimiotipo VI (cânfora e 1,8-cineol) e finalmente o quimiotipo VII (estragol).

Dentre os vários componentes do óleo essencial de *L. alba*, o linalol tem se destacado pelo seu expressivo rendimento na planta (JANNUZZI et al. 2010) e por sua ampla utilização nas indústrias de aromatizantes, cosméticos e perfumes (SANTOS, 2011); podendo citar ainda o limoneno, componente aromático comum nas indústrias farmacêutica e alimentícia; o citral como fragrância em cosméticos e perfumes e o quimiotipo carvona com ação antifúngica e bactericida (SANTOS, 2011; SOARES & TAVARES-DIAS, 2013).

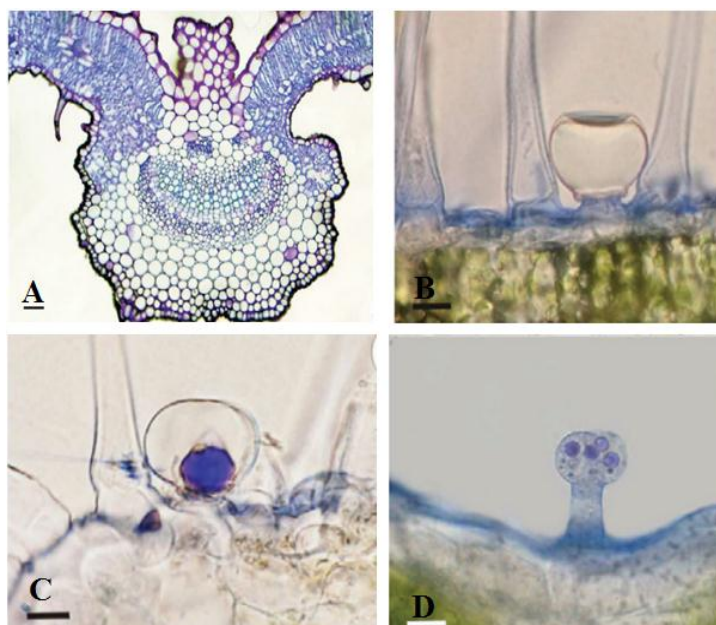
Os constituintes químicos do óleo essencial produzido pela espécie *L. alba* estão em maior quantidade nas folhas e nas inflorescências, sendo possível encontrar nas raízes (terpenóides, fenilpropanóides e açúcares) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Constituintes químicos de *L. alba* em função da parte utilizada.

Partes utilizadas	Constituintes <sup>1</sup>	Referências
Raízes	Terpenóides, Fenilpropanóides e açúcares	Jose et al. (2006)
Folhas	Borneol, cânfora, 1-8-cineol, geranial, linalol, mirceno, neral, piperitona, sabineno, 2-undecanone, $\beta$ -cariofileno, $\beta$ -elemeno, limoneno, carvona, $\alpha$ -muuroleno e outros	Craveiro et al. (1981), Howard (1989), Di Stasi et al. (2002), Tavares et al. (2005), Parra-Garcés et al. (2010)

<sup>1</sup>Monoterpenos e sesquiterpenos

Os diversos terpenos apresentam funções variadas nos vegetais. Os monoterpenos e sesquiterpenos são constituintes dos óleos voláteis, sendo que os primeiros atuam na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal (VERPOOTE, 2000). Os óleos essenciais são biossintetizados em estruturas celulares e anatômicas bem definidas, conforme ilustrado na figura 4 e passíveis de obtenção por hidrodestilação e arraste com vapor de água.



**Figura 4.** Tricomas secretores de *Lippia alba*: A) Nervura central, em corte transversal; B) Tricoma (tipo I); C) Tricoma (tipo II) e D) Tricoma (tipo III) (bars =10  $\mu$ m).

**Fonte:** Jezler et al., 2013.



## 2.5 Fatores que interferem na produção de *L. alba*

A maioria dos estudos com plantas medicinais no Brasil vem sendo realizados com plantas exóticas e, quando se trata de plantas nativas, estes trabalhos, além de escassos, têm sido pouco abrangentes (JANNUZZI et al., 2010). Neste sentido, verifica-se a necessidade do desenvolvimento de pesquisas amplas envolvendo mais de um quimiotipo, visto que a espécie é bastante versátil na produção de metabólitos secundários.

Alguns fatores podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários, dentre eles, vale destacar a sazonalidade, o ritmo circadiano e os estádios de desenvolvimento, a temperatura e outros destacados na tabela 4.

**Tabela 4.** Principais fatores que interferem na produção de óleo essencial de *L. alba*.

Fatores de produção	Referências
Horário de colheita (citrál-limoneno)	Nagao et al. (2004)
Horário de colheita	Bezerra et al. (2011)
Horário de colheita (carvona-limoneno)	Ehlert et al. (2013)
Época de colheita após o plantio	Barros et al. (2009)
Época de colheita ao longo das estações do ano	Silva et al. (2012)
Época de colheita ao longo das estações do ano	Almeida et al. (2012)
Diferentes regiões de cultivo	Fontanel & Tabata (1987)
Diferentes regiões de cultivo	Santos-Mendes (2001)
Diferentes regiões de cultivo	Siani et al. (2002)
Diferentes regiões de cultivo	Teles et al. (2012)
Efeito da luminosidade	Ventrella et al. (2000)
Efeito da luminosidade	Montanari et al. (2004)
Altura de corte (colheita)	Santos-Innecco (2004)
Uso da adubação	Ming (1994)
Uso da adubação	Santos-Innecco (2003)
Uso da adubação	Montanari et al. (2004)
Uso da adubação	Tavares (2009)

Dentre os fatores climáticos citados anteriormente, o horário de colheita e a época do ano podem influenciar mais um quimiotipo do que outro. Quanto ao uso da adubação ainda não existe um consenso sobre melhor dose, no entanto, justifica-se a utilização de adubos orgânicos para estimular a produção de fitomassa. A identificação destas interferências, bem como da relação entre as mesmas, favorecerá a obtenção de matérias-primas vegetais de melhor qualidade, o que possibilitará a obtenção de óleos essenciais com composição química mais constante (MORAIS, 2009).

Lima et al. (2015) propõem o uso da micropropagação de clones de *L. alba* como uma forma de obter óleos essenciais com menores variações. Visto que além dos fatores anteriormente mencionados, tanto os métodos como as condições de extração afetam a composição e o rendimento do óleo essencial (LINDE et al., 2016). Por este motivo, justificam-se estudos agrônômicos em diferentes regiões de cultivo utilizando o máximo de quimiotipos possível. Lembrando que estes estudos fitotécnicos devem acompanhar os resultados obtidos pelo melhoramento genético da espécie, a fim de garantir o aumento da produção de óleo essencial e a estabilidade das plantas no campo.

## 2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F. M.; COLOMBO, C. A.; SIQUEIRA, W. J. Produção e rendimento de óleo essencial de *Lippia alba* quimiótipo linalol em função de duas épocas de colheita. In: 6º CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Jaguariúna, SP. **Anais...** p. 1-8, 2012.
- AQUINO, L. C. L.; SANTOS, G. G.; TRINDADE, R. C.; ALVES, J.; SANTOS, P. O.; ALVES, B. P.; BLANK A. F.; CARVALHO, L. M. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjerição frente a bactérias de carnes bovinas. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 529-535, 2010.
- ARAMBARRI, A.; FREIRE, S.; COLARES, M.; BAYON, N.; NOVOA, M.; MONTI, C.; STENGLLEIN, S. Leaf anatomy of medicinal shrubs and tree from gallery forest of the paranaense province (Argentina) Part 1. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v.41, n.3-4, p.233-268, 2006.
- ATKINS, S. Verbenaceae. In: Kadereit, J. The Families and Genera of Vascular Plants. VII. lowering Plants: Dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae). Berlin, Springer. p. 449-468. 2004.
- BARROS, F. M. C. de; ZAMBARDA, E. de O.; HEINZMANN, B. M. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, 861-867, 2009.
- BLANK, A. F. Transformação de recursos genéticos de plantas aromáticas nativas em riqueza: o potencial do alecrim-de-tabuleiro (*Lippia gracilis*). **Horticultura Brasileira**, v.31, n.3, p. 512-512, 2013.
- BEZERRA, F. N. R.; ROLIM, R. R.; SANTOS, H. R.; MARCO, C. A.; FEITOSA, J. V.; COSTA, A. N. L. Rendimento do óleo essencial de cidreira brava (*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. em diferentes horários de corte. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011.
- BOTTIGNON, M. R. **Estimativas de parâmetros genéticos em *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., quimiótipo linalol, em progênes clonais de meios irmãos.** Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Genética e Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Instituto Agrônomo, curso de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Campinas, São Paulo, 82 p. 2009.
- CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores Moleculares. In: BORÉM & FRITSCHÉ-NETO (editores). Biotecnologia Aplicada ao melhoramento de plantas. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. p. 31-68.
- CANTINO, P.D.; HARLEY, R.M.; WAGSTAFF, S.J. Genera of Labiatae: status and classification. In: Harley, R.M. & Reynolds,T. (ed.). Advances in Labiatae Science. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 511-522. 1992.

CÂMELO, L. C. A. **Caracterização de germoplasma e sazonalidade em erva-cidreira-brasileira** [*Lippia alba* (Mill) N.E.Br]. 2010. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, 2010.

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

CASTRO, D. M.; MING, L.C.; MARQUES, M. O. M. Chemical composition of the essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. at different times of harvest and different parts of branches. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, n.2, p.75-79, 2002.

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural Products from Plants**, CRC Press. 2nd ed. p. 569, 2006.

CORAZZA, S. **Aromacologia**. São Paulo: SENAC, 2002. 414 p.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 151p.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A; ANDRADE, C. H. S.; MACHADO M. I. L. Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, v, 44, n. 5, p. 598-601, 1981.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**, v.16, n.3, p.224-228, 1993.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 69-91, 2002.

DE LA ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability. 1 ed. Wiley-Blackwell. Iowa, USA, v.1, p. 382, 2010.

DUBEY, N. K.; KISHORE, N; SRIVASTAVA, O. P.; DIKSHIT, A.; SINGH, S. K. Fungitoxicity of some higher plants against *Rhizoctonia solani*. **Plant and Soil**, v.72, n. 1, p.91-94, 1983.

EHLERT, P. A. D. **Épocas de plantio, idades e horários de colheita na produção e qualidade do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., quimiotipo limoneno-carvona**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP, Botucatu, 2003. 106f.

EHLERT, P. A. D.; MING, L.C.; MARQUES, M. O. M.; FENANDES, D. M.; ROCHA, W. A.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, R. F. Influência do horário de colheita sobre o rendimento e

composição do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.72-77, 2013.

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

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

GUPTA, M. 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. Santafe de Bogotá: Presencia, 1995. 617p.

IBRAHIM, M. A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J. K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and fitotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests: review. **Agricultural and Food Science**, v.10, n. 3, p.243-259, 2001.

HAWKES, J. G. Crop genetic resources field collection manual. IBPGR/EUCARPIA, Rome, Italy. Hawkes J.G. Genetic conservation of world crop plants. Academic Press, London. 1991.

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

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem I Oswaldo Cruz** 97: 1027-1031. 2002.

HOWARD, R.A. Flora of the Lesser Antilles. Arnold Arboretum, Harvard University, Jamaica Plain, Massachusetts. 1989.

JANNUZZI, H. V. **Caracterização de dezesseis acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown, no Distrito Federal**. Brasília, 2006. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2006.

JANNUZZI, H. V.; MATTOS J. K. A.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; BIZZO, H. R.; GRACINDO, L. A. M. Avaliação agronômica e identificação de quimiotipos de erva-cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 412-417, 2010.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K.A.; SILVA, D. B.; GRACINDO, L.A.M.; VIEIRA, R.F. Avaliação agronômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.3, p. 258-264, 2011.

JEZLER, C. N.; OLIVEIRA, A. R. M. F. de; BATISTA, R. S.; OLIVEIRA, R. A.; SILVA, D. da C.; COSTA, L. C. do B. *Lippia alba* morphotypes cidreira and melissa exhibit significant differences in leaf characteristics and essential oil profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n .2, p. 217-223, 2013.

LIMA, C. B.; BOAVENTURA, A. C.; GOMES, M. N. Cuttings of *Lippia alba* the mith emphasis on time for seedling formation, substrates and plant growth regulators. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 230-235, 2015.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, v. 3, n.3. p. 14-24. 2007.

LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; ALBERTO, E.; GAZIM, Z. C. Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del aceite essencial de *Lippia alba*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, n. 1, p. 191-200, 2016.

LORENZI, H.; SOUZA, H. S. **Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa. p. 1030-1056. 2001.

NAGAO, E. O.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; MEDEIROS FILHO, S.; MARCO, C. A. Efeito do horário de colheita sobre o teor e constituintes majoritários de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., quimiotipo citral-limoneno. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n. 2, p. 355-60, 2004.

SENA FILHO, J. G.; MELO, J. G. S.; SARAIVA, A. M.; GONÇALVES, A. M.; PSIOTTANO, M. N. C.; XAVIER, H. S. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.4, p. 506-509, 2006.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: A cura pelos óleos essenciais**. 5 ed. Rio de Janeiro: Record, 2001.

MADUEÑO BOX, M. **Cultivo de plantas medicinai**s. Madrid: Labor, 1973, 490p.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa de crescimento. In: Ferri, M.G., **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: EDUSP, 1986. v.1, P. 331-50.

MAMUN-OR-RASHID, A. N. M.; SEN, M. K.; JAMAL, M. A. H. M.; NASRIN, S. A comprehensive ethno-pharmacological review on *Lippia alba* M. **International Journal of Biomedical Materials Research**, v. 1, n.1, p. 14-20, 2013.

MANICA-CATTANI, M.F., ZACARIA, J., PAULETTI, G., ATTI-SERAFINI, L. AND ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 375-380, 2009.

MATTOS, S. H.; INNECCO, R.; MARCO, C. A.; ARAÚJO, A. V. **Plantas medicinai**s e **aromáticas cultivadas no Ceará**: tecnologia de produção e óleos essenciais. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. p. 61-63.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. de; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinai**s. Viçosa: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 220p.

MARX, H. E.; O'LEARY, N.; YUAN, Y-W.; LU-IRVING, P.; TANK, D. C.; MÚLGURA, M. E.; OLMSTEAD, R. G. A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 10, p. 1647–1663, 2010.

MING, L. C. **Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. Verbenaceae.** 1992. 206 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1992.

MING, L. C. Influência da adubação orgânica na produção de biomassa e óleo essencial de *Lippia alba*. **Horticultura Brasileira**, v.12, n.1, p. 49-52, 1994.

DISCOVER LIFE. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britton & P. Wilson. Disponível em: <<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Lippia+alba>>. Acessado em: 10 de setembro de 2015.

MONTANARI, R. M.; SOUZA, L. A.; LEITE, M. N.; COELHO, A. D. F.; VICCINI, L. F.; STEFANINI, M. B. Plasticidade fenotípica da morfologia externa de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britton & Wilson (Verbenaceae) em resposta à níveis de luminosidade e adubação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 96-101, 2004.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura brasileira**, v. 27, n. 2 (Suplemento - CD Rom), 2009.

NEGRELLE, R. R. B.; ELPO, E. R. S.; RÜCHER, N. G. A. Análise prospectiva do agronegócio gengibre no estado do Paraná. **Horticultura brasileira**, v. 23, n. 4, p. 1002-1028, 2005.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: Simões et al. (Ed.). Farmacognosia: da planta ao medicamento, Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p.11-24.1999.

PALÁCIO-LOPÉZ, K.; RODRÍGUEZ-LOPÉZ, N. Plasticidad fenotípica en *Lippia alba* (Verbenaceae) en respuesta a la disponibilidad hídrica en dos ambientes lumínicos. **Acta Biológica Colombiana**, v.12, n.5, p.187-198, 2007.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SANCHEZ-MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

PARRA-GARCÉS, M. I.; CAROPRESE-ARAQUE, J. F.; ARRIETO-PRIETO, D.; STASHENKO, E. Morfología, anatomía, ontogenia y composición química de metabolitos secundários en inflorescências de *Lippia alba* (Verbenaceae). **Revista Biología Tropical**, v. 58, n. 4, p. 1533-1548, 2010.

PAULUS, D.; VALMORBIDA, R.; TOFFOLI, E.; NAVA, G. A. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 203-209, 2013.

PIERRE, P. M. O.; SOUSA, S. M.; DAVIDE, L. C.; MACHADO, M. A.; VICCINI, L. F. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 993-1005, 2011.

PINTO, E. de P. P.; AMOROZO, M. C. de M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de Mata Atlântica – Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p.751-762, 2006.

PINTO, J. A. O.; BLANK, A. F.; CRUZ, E. M. O.; GÓES, I. B.; FONTES, S. S.; SILVA, S. A. da; MANN, R. S.; BLANK, M. de F. A. Caracterização molecular (RAPD) de acessos de alecrim-detabuleiro (*Lippia gracilis* Schauer). **Scientia Plena**. v. 7, n. 9, p. 1-6, 2011.

ROZWALKA, L.C.; LIMA, M.L.R.Z.C.; MIO, L.L.M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

RUEDA, S.; CARDENAS, C.; MARTÍNEZ, J.; STASHENKO, E. Estudio de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por destilación- solvente simultánea, de hojas de *Lippia alba* (Fam: Verbenaceae). **Scientia et Technica**, v. 13, n. 33, p. 83-85, 2007.

RUFINO, E. R. **Estimativas de parâmetros genéticos e seleção de clones linalol em *Lippia alba***. Dissertação (Mestrado) – Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia, Campinas, São Paulo, 2008.

SALIMENA, F. R. G. **Revisão taxonômica de *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. 2000.

SALIMENA, F. R. G. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v.40, p.121-125, 2002.

SANT'ANA, T. C. P. **Caracterização de germoplasma e enraizamento de patchouli** (*Pogostemon* sp.). São Cristóvão: UFS, 2009. 79 p. (Dissertação Mestrado), Universidade Federal de Sergipe, 2009.

SANTOS, A. S. **Óleos essenciais: uma abordagem econômica e industrial**. Rio de Janeiro: Interciência, 386 p. 2011.

SANTOS, J. S. dos; MELO, J. I. M. de; ABREU, M. C. de; SALES, M. F. de. Verbenaceae *sensu stricto* na região de Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 985-998, 2009.

SANTOS, F. R.; LIMA, P. F.; PRIOLLI, R. H.; SIQUEIRA, W. J.; COLOMBO, C. A. Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci in *Lippia alba* (Verbenaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 8, p. 301-303, 2012.

SANTOS-MENDES, M. M. F. B. **Caracterização morfo-anatômica, fitoquímica e molecular de oito formas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex BRITT. & WILSON (VERBENACEAE)**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, SP. 2001.

SANTOS, M. R. A.; INNECCO, R. Influência de períodos de secagem de folhas no óleo essencial de erva-cidreira (quimiotipo limoneno-carvona). **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 1, p. 5-11, 2003.

SANTOS, R. I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, p.403-434, 2004.

SANTOS, U. V. dos; SANTOS, B. S. dos; SILVA, G. F. da; CONSTANT, P. B. L.; SANTOS, J. A. B. dos. Avaliação de potencial de ervas medicinais: capim-limão (*Cymbopogon citratus* D.C.), chá verde (*Camellia sinensis* L.) e hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) para obtenção de chás solúveis. **Revista GEINTEC - São Cristóvão/SE**. v. 4, n. 4, p.1399-1408, 2014.

SCHOCKEN, N. R. L. **Obtenção de quimiótipos híbridos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown**. Dissertação de mestrado em agricultura tropical e sub-tropical, área de melhoramento genético vegetal, Instituto Agronômico de Campinas, PG IAC, p. 82, 2007.

SIANI, A. C; TAPPIN, M. R. R.; RAMOS, M. F. S.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. C. K. V.; AQUINO-NETO, F. R.; FRIGHETTO, N. Linalool from *Lippia alba*: Study of the Reproducibility of the Essential Oil Profile and the Enantiomeric Purity. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3518-21, 2002.

SILVA, M. H. L. Tecnologias Para o Desenvolvimento Agro-industrial de *Piper aduncum* L. 2004. 78f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

SILVA, L. R.; PEREIRA, R. C. A; BRAGA, T. R.; BEZERRA, F. C.; RODRIGUES, T. H. S. Produção e rendimento de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. no Ceará em função da época de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, (Suplemento – CD Rom), 2012.

SILVA, T. R. dos S.; SALIMENA, F. R. G. Novas combinações e novos sinônimos em *Lippia* e *Lantana* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v. 40, n. 1-4, p. 57-59, 2002.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.



SOUSA, S. M.; TORRES, G. A.; VICCINI, L. F. Karyological studies in Brazilian species of *Lippia* (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 4, p. 1029-1037. 2012.

SOUZA, M. A. de. **Expressão gênica relacionada à produção de óleo essencial e avaliação do metabolismo de *Mentha arvensis* L. sob diferentes condições de cultivo.** Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química. p. 89-106. 2010.

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

TAVARES, I. B. **Propagação vegetativa, adubação orgânica e idades de colheita de quimitipos de erva-cidreira [*Lippia alba* (mill.) N. E. Brown].** 2009. 85 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal do Tocantins. 2009.

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

TELES, S.; PEREIRA, J. A.; SANTOS, C. H. B.; MENEZES, R. V.; MALHEIRO, R.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, F. Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 247– 252, 2012.

VAL, T. M.; CAVALLARI, M. M.; ZUCCHI, M. I.; BLANK, A. F.; MONTEIRO, M.; PINHEIRO, J. B. Diversidade genética em germoplasma de *Lippia alba* utilizando marcadores ISSR. **In: 55º Congresso Brasileiro de Genética**, 30 de agosto a 02 de setembro de 2009. Águas de Lindóia-SP, Brasil. 2009.

VENTRELLA, M. C. **Produção de folhas, óleo essencial e anatomia foliar quantitativa de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (*Verbenaceae*) em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita.** Botucatu: UNESP, 2000. 84 p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2000.

VERPOORTE, R.; van der HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, v. 9, n. 4, p. 323-343, 2000.

YAMAMOTO, P.Y. **Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** Dissertação (Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico - USP, Campinas, 2006. 90f.

YAMAMOTO, P. Y.; COLOMBO, C. A.; AZEVEDO FILHO, J. A.; LOURENÇÃO, A. L.; MARQUES, M. O. M.; MORAIS, G. D. S.; CHIORATO, A. F.; MARTINS, A. L. M.;

SIQUEIRA, W. J. Performance of ginger Grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. **Scientia Agricola**, v.65, n.5, p.481-489, 2008.

### **3 CAPÍTULO I**

#### **POLIMORFISMO EM CLONES *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown ORIUNDOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

## RESUMO

No Brasil, a ocorrência natural da espécie *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown é bastante ampla, o que justifica uma elevada variação fenotípica e a ocorrência de vários quimiotipos. Levando em conta que os métodos moleculares de determinação da variabilidade genética possibilitam uma maior precisão, em relação aos métodos morfológicos, o objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade genética de diferentes genótipos de *L. alba* oriundos da região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, usando marcadores ISSR. No experimento, conduzido no Instituto de Agronomia da UFRRJ, foram avaliados vinte genótipos de *L. alba* propagados assexuadamente. Foram utilizados 13 *primers* ISSR, obtendo-se um total de 97 bandas amplificadas e 74 bandas polimórficas, equivalente a 77,89% das bandas amplificadas. O dendrograma (Neighbor Joining) formou cinco grupos, sendo que apenas os genótipos UFRRJ LA01 e UFRRJ LA02 foram agrupados por mesma região geográfica e quimiotipo. A menor similaridade (52%) foi observada no agrupamento que reuniu os acessos UFRRJ LA01, UFRRJ LA02, UFRRJ LA03, UFRRJ LA04 e UFRRJ LA05. Confirmando variação genética entre os genótipos, mesmo quando oriundos de uma mesma região. Concluiu-se que os genótipos de *L. alba* oriundos da região Metropolitana do Rio de Janeiro apresentam variabilidade genética e fitoquímica.

**Palavras-chave:** Variabilidade genética, Alelos, Polimorfismo, DNA

## ABSTRACT

In Brazil, occurrence of *Lipia alba* (Mill) N.E. Brown is widely spread which configure a high phenotypic variation and the appearance of various chemotypes. Molecular methods used to determine genetic variability makes possible a higher precision when compared to morphological methods. In this regard, the objective of this study was to evaluate genetic variability of different genotypes of *L. alba coming* from metropolitan region of Rio de Janeiro. In the experiment, conducted in the Agronomic Institute of UFRRJ, twenty different genotypes of *L. alba* were accessed propagation assexuade. Thirteen primers ISSR were used, resulting 97 amplified bands, which 74 were polymorphic, equivalent to 77.89% of amplified bands. The dendogram (Neighbor Joining) resulted in five groups, wherein just the genotypes UFRRJ LA01 and UFRRJ LA02 where grouped by geographic region and chemotype. The lowest similarity (52%) was observed in the group containing access UFRRJ LA01, UFRRJ LA02, UFRRJ LA03, UFRRJ LA04 and UFRRJ LA05. Therefore, confirming genetic variation between the genotypes, even when they came from the same region. It was concluded that genotypes of *L. alba* from metropolitan region of Rio de Janeiro show genetic and chemical variability.

**Key words:** Genetic variability, allele, Polymorphism, DNA.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A espécie *L. alba* (Mill) N. E. Brown, conhecida popularmente como erva-cidreira ou erva-cidreira-brasileira é uma espécie nativa de ocorrência em todas as regiões do país, sendo utilizada amplamente como planta medicinal e aromática. Além de seu uso clássico pela medicina popular no tratamento de doenças gástricas, febre, asma e como tranquilizante, tem potencial econômico promissor para indústrias farmacêuticas, de aroma e perfumaria (VAL et al., 2009; JANNUZZI et al., 2011; BOTTIGNON et al., 2011).

Visto que a América do Sul é o maior centro de diversidade genética desta espécie (RUFINO et al., 2012) e que a Mata Atlântica é um dos biomas de ocorrência natural, são urgentes os estudos que visem a identificação botânica, a caracterização fitoquímica e molecular desta planta na natureza (ZUCCHI et al., 2013). O uso de marcadores moleculares auxiliam na identificação de espécies vegetais e na discriminação da variabilidade genética presente, bem como, na conservação da variabilidade genética das espécies em bancos ativos de germoplasma (BLANK et al., 2015)

Os estudos que visam à caracterização e conservação de germoplasma de espécies de plantas medicinais e aromáticas vêm crescendo de forma expressiva frente ao potencial econômico dessas espécies. A caracterização de germoplasma é uma importante atividade para subsidiar a utilização dos recursos naturais, pois possibilita que novos materiais de interesse sejam incluídos em programas de melhoramento genético e serve como base para o delineamento de estratégias de conservação. Diferentes métodos são utilizados na caracterização de recursos genéticos, entre eles estão avaliações de características morfológicas e moleculares (SOUZA, 2015).

Nos últimos anos, o uso de marcadores moleculares na avaliação da variabilidade genética tem se tornado uma ferramenta importante para o estudo de populações de diversas espécies, incluindo a espécie *L. alba* e seus vários quimiotipos (VICCINI et al., 2004; MANICA-CATTANI et al., 2009; PIERRE et al., 2011; SANTOS et al., 2012; VICCINI et al., 2014). Dentre os quimiotipos de *L. alba* mais citados no Brasil estão citral, citral-mirceno, citral-limoneno, carvona-limoneno,  $\beta$ -cariofileno e linalol (MATOS, 1996; SILVA et al. 2006; JANNUZZI et al., 2011).

Dentre os muitos tipos de marcadores moleculares existentes, os ISSR (Inter-simple sequence repeat) apresentam um método baseado nos microssatélites, que não necessita do conhecimento prévio do genoma. São marcadores moleculares dominantes, ou seja, não diferenciam os indivíduos heterozigotos dos homozigotos, no entanto, tem a vantagem de analisar locos múltiplos em uma única reação (GOULÃO & OLIVEIRA, 2001). Considerando a alta reprodutibilidade e a grande quantidade de locos polimórficos por um custo relativamente menor que outros marcadores, a utilização de ISSR tem sido cada vez mais frequente em programas de melhoramento vegetal para seleção de genótipos, bem como, em estudos de diversidade genética, “fingerprinting” e seleção assistida (COSTA, 2010).

Assim sendo, o uso de marcadores moleculares ISSR assume um papel importante na determinação da variabilidade genética em *L. alba* (PIERRE et al., 2011; SANTOS et al., 2014), auxiliando inclusive na determinação de alelos úteis e no mapeamento genômico (SANTOS et al., 2012; ROCHA et al., 2015).

Portanto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a variabilidade genética de genótipos de *L. alba* (Mill) N. E. Brown oriundos da região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, pelo uso da técnica do ISSR.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

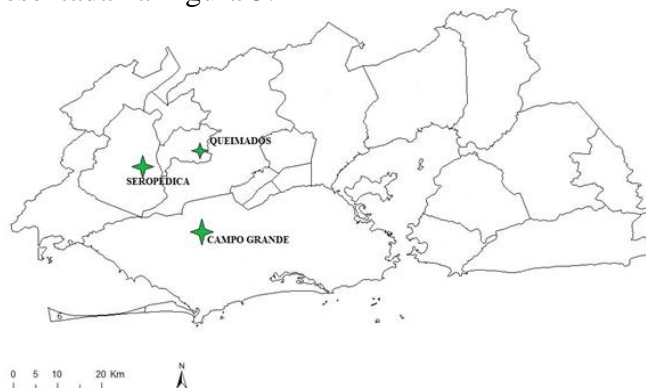
Foi utilizado material genético de 20 genótipos de *L. alba* mantidos na coleção de trabalho do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, sendo as plantas oriundas de três localidades da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. A área experimental está situada nas coordenadas geográficas 22°45' S, 43°41' W e 25 m de altitude. O clima da região é do tipo Aw, da classificação de Köppen. A identificação das plantas pertencentes à coleção de trabalho, assim como o local de origem e o respectivo quimiotipo estão discriminados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Acessos de *L. alba* e quimiotipos correspondentes

Acesso	Origem*	Quimiotipo
UFRRJ LA1	Campo Grande - RJ	Citral (neral-geranial)
UFRRJ LA2	Campo Grande - RJ	Citral (neral-geranial)
UFRRJ LA3	Campo Grande - RJ	Limoneno-carvona
UFRRJ LA4	Campo Grande - RJ	Linalol
UFRRJ LA5	Seropédica – RJ	Citral (neral-geranial)
UFRRJ LA6	Seropédica – RJ	Mirceno-citral
UFRRJ LA7	Queimados – RJ	Limoneno-carvona
UFRRJ LA8	Queimados – RJ	Limoneno-carvona
UFRRJ LA9	Queimados – RJ	Mirceno-citral
UFRRJ LA10	Queimados – RJ	$\beta$ -cariofileno- $\beta$ -Citral
UFRRJ LA11	Queimados – RJ	Citral (neral-geranial)
UFRRJ LA12	Queimados – RJ	Citral (neral-geranial)
UFRRJ LA13	Queimados – RJ	$\beta$ -cariofileno- $\beta$ -Mirceno
UFRRJ LA14	Queimados – RJ	Mirceno-citral
UFRRJ LA15	Queimados – RJ	Citral (neral-geranial)
UFRRJ LA16	Queimados – RJ	Mirceno-citral
UFRRJ LA17	Queimados – RJ	Mirceno-citral
UFRRJ LA18	Queimados – RJ	Citral (neral-geranial)
UFRRJ LA19	Queimados – RJ	Citral (neral-geranial)
UFRRJ LA20	Queimados – RJ	Citral (neral-geranial)

\*Coleta realizada em áreas urbanas e periurbanas em ambas os locais

A localização geográfica de onde foram coletadas as plantas matrizes que originaram esta pesquisa está apresentada na Figura 5.



**Figura 5.** Locais de coleta dos genótipos de erva-cidreira-brasileira na região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Amostras do tecido vegetal de plantas adultas da espécie *L. alba* acondicionadas, previamente em nitrogênio líquido, foram trazidas para o laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ, para extração do DNA genômico. Nesta etapa, foi seguida a metodologia sugerida por Doely & Doely (1990) com algumas adaptações. Para cada genótipo, 200 a 300 mg de tecido vegetal foram triturados em nitrogênio líquido dentro de um gral, até que o material apresentasse aspecto de pó. Em seguida, parte do material foi transferida para um microtubo ao qual foram adicionados 850 µL de solução tampão de extração (CTAB). A mistura foi previamente homogeneizada e incubada em banho-maria a 65°C por tempo mínimo de 30 e máximo de 40 minutos. Durante a incubação os tubos foram agitados a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão.

Foram feitas duas partições com solvente orgânico. Na primeira, foram adicionados 800 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1), sendo a mistura homogeneizada por agitação por 10 minutos. Em seguida, a emulsão foi centrifugada a 16000 rpm durante 5 minutos, e posteriormente, o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Os tubos receberam 650 µL de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (24:24:1), sendo novamente centrifugados. Após a centrifugação, a fase superior do tubo foi transferida para um novo tubo, no qual foi adicionado 400 a 450 µL de isopropanol frio (-20 °C). Esta mistura foi suavemente homogeneizada e em seguida, acondicionada no freezer a -20°C por duas horas e meia para precipitar os ácidos nucleicos.

Após este período foi realizada uma nova centrifugação 1400 rpm por 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante ao final. Os tubos foram lavados duas vezes, uma com álcool 70% e outra com álcool 95%. Em seguida os tubos foram colocados para secar por 15 minutos. Após este período o precipitado (pellet) foi ressuscitado em 200 µL de tampão TE contendo RNase na concentração de 4 µg.mL<sup>-1</sup> e incubado a 37°C por 30 minutos para degradação do RNA.

Após o tratamento com RNase, foram extraídas amostras de 2 µL do DNA de cada um dos genótipos para quantificação e avaliação da pureza em espectrofotômetro tipo nanodrop. Finalmente, uma alíquota foi utilizada conforme concentração determinada para diluição em TE 1x, para obter a solução de trabalho na concentração de 12,5 ng.µL<sup>-1</sup>.

O DNA foi submetido à reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando 13 marcadores de sequência simples repetida interna (ISSR). Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, submetida a uma corrente contínua de 75 V por aproximadamente três horas e meia, corados com brometo de etídio e fotodocumentados no sistema Eagle Eye® II (Stratagene). Foram obtidas 96 bandas, sendo que destas, 84 foram polimórficas. Cada banda polimórfica foi caracterizada como presente (1) ou ausente (0) para todos os genótipos, resultando numa matriz de dados binários.

O dendrograma, representando a similaridade genética entre cada par de genótipos, foi confeccionado usando como medida de distância o coeficiente de Jaccard utilizando-se o aplicativo computacional Darwin versão 6.5 (PERRIER et al., 2006) pelo método de agrupamento Neighbor-Joining (SAITOU et al., 1987).



### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os 13 marcadores utilizados foram observadas 21 bandas monomórficas e 74 bandas polimórficas, totalizando 95 bandas amplificadas. A quantidade de bandas por *primer* variou de 9 ((GA)<sub>8</sub>C) a 3 ((GA)<sub>8</sub>YT), com média de 6,78 bandas por *primer*. Das 95 bandas amplificadas, 77,89% foram bandas polimórficas (Tabela 6). Estes resultados corroboram os de Rocha et al., (2015) que, ao trabalharem com nove marcadores ISSR em 90 acessos de *L. alba*, encontraram seis *primers* polimórficos e o número de alelos por loco variou de 1 a 7 alelos.

**Tabela 6.** Marcadores ISSR utilizados na amplificação do DNA de 20 acessos de erva-cidreira-brasileira (*Lippia alba*), com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento (TA), número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas, número de bandas monomórficas e porcentagem de polimorfismo. Seropédica-RJ, 2015.

Primer	Sequência*	TA (°C)	NTB	Bandas polimórficas	Bandas monomórficas	% de polimorfismo
ISSR 1	(AC) <sub>8</sub> CT	47	6	3	3	50
ISSR 2	(GAA) <sub>6</sub> AA	50	9	9	0	100
ISSR 3	(GA) <sub>8</sub> C	47	9	6	3	66
ISSR 4	C (GA) <sub>7</sub>	50	7	3	4	42
ISSR 5	T (GA) <sub>8</sub>	50	7	5	2	71
ISSR 6	(GA) <sub>8</sub> C	50	7	5	2	71
ISSR 7	(GA) <sub>8</sub> YT	47	3	2	1	66
ISSR 8	(GT) <sub>8</sub> YC	47	9	8	1	88
ISSR 9	TA (CAG) <sub>4</sub>	50	9	8	1	88
ISSR 10	(CA) <sub>6</sub> AC	40	6	6	0	100
ISSR 11	(CA) <sub>6</sub> AG	40	9	7	2	77
ISSR 12	(GAG) <sub>3</sub> GC	40	8	6	2	75
ISSR 13	(GATA) <sub>4</sub>	45	6	6	0	100
Total			95	74	21	71

\* **Y = C ou T; e R = A ou G.**

Os marcadores ISSR utilizados nos vinte acessos de *L. alba* resultaram em uma porcentagem de polimorfismo igual a 71%, sugerindo variabilidade genética entre os acessos. Segundo Kernodle et al. (1993), a variação no número de bandas amplificadas por *primers* é influenciada por vários fatores, tais como, a estrutura do *primer*, a temperatura de anelamento e o menor número de anelamento no genoma.

O número de fragmentos polimórficos utilizados nas análises é bastante variável (ESTOPA et al., 2006). Um estudo desenvolvido com genótipos de *L. alba* na região do Sul do Brasil (MANICA-CATTANI et al., 2009), utilizando seis *primers* ISSR e quatro *primers* RAPD. Foram detectados 120 fragmentos amplificadas e 55 fragmentos polimórficos com os marcadores ISSR representando 82,08% de polimorfismo. Ao selecionar genótipos superiores de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), Souza et al. (2014) usaram dezenove *primers* ISSR e obtiveram 104 marcas e 79,92% bandas polimórficas. Já Shinwari et al. (2010) encontraram valores de bandas polimórficas de 47,2% e 27,4% para as espécies *Mentha spicata* e *Mentha royleana*, respectivamente.

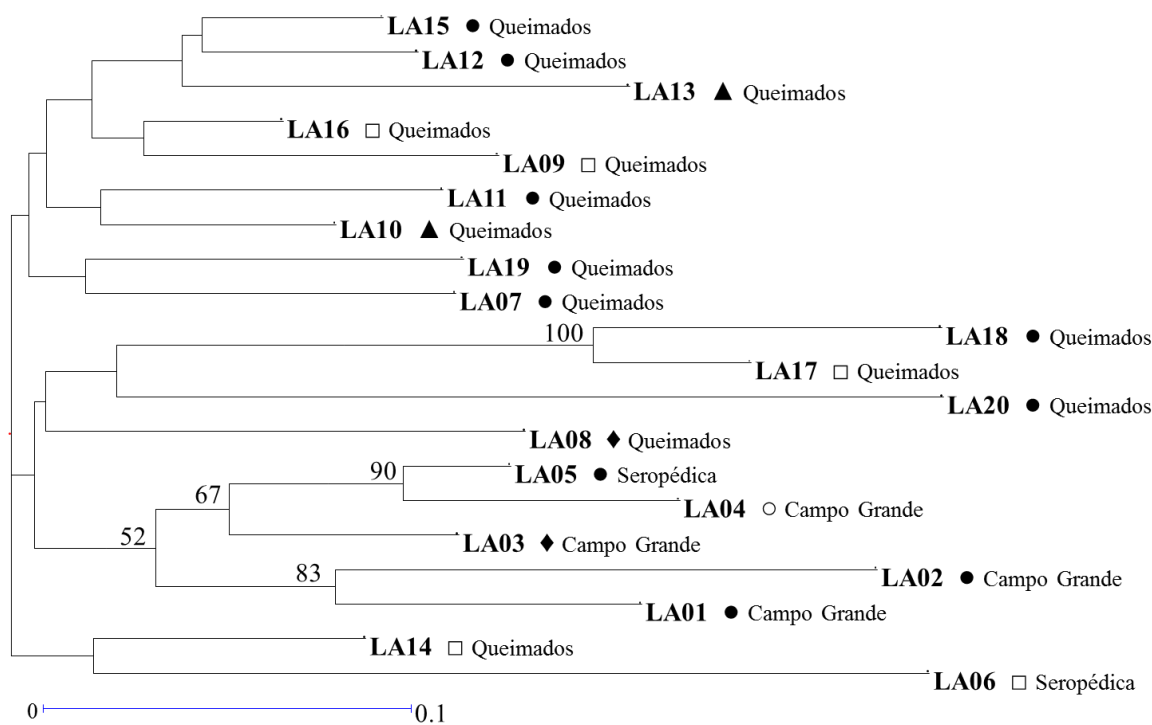
Ao avaliar a variabilidade genética entre populações de carqueja (AULER, 2004), evidenciou que 96,7% da variabilidade existente encontra-se distribuída dentro das

populações, contra apenas 3,3% entre populações. Por outro lado, Santos e Corrêa (2006), avaliando 16 indivíduos de erva-de-santa-maria observaram baixo polimorfismo, permitindo inferir que essa espécie tenha se disseminado na região a partir de poucos exemplares ou pode refletir a natureza pouco polimórfica do grupo.

Do total de primers utilizados nesta pesquisa, 11 *primers* (78,57%) apresentam polimorfismo superior a 50% das bandas amplificadas. O *primer* ISSR 14 (GATA)<sub>4</sub> apresentou 6 bandas polimórficas.

No dendrograma (Figura 6), pode-se observar a formação de cinco grupos. O grupo 1 é composto pelos acessos (UFRRJ LA17 e LA18), o grupo 2 pelos acessos (UFRRJ LA04 e 05), o grupo 3 pelos acessos (UFRRJ LA01 e LA02), o grupo 4 com três acessos (UFRRJ LA03, LA04 e LA05) e o grupo 5 com cinco acessos (UFRRJ LA01, LA02, LA03, LA04 e LA05).

No primeiro grupo, verificou-se que, os acessos UFRRJ LA 17 e LA18 apresentaram máxima similaridade genética, sendo que ambos são da mesma região e possuem quimiotipos semelhantes, citral e mirceno-citral, respectivamente. O grupo 2 (UFRRJ LA04 e 05) reuniu dois acessos de quimiotipos e regiões diferentes. O grupo 3 apresentou (UFRRJ LA01 e LA02) apesar de apresentarem o mesmo quimiotipo do grupo 1, formaram um agrupamento isolado. Os grupos 4 e 5 foram formados pelo predomínio de acessos da mesma região (Campo Grande), e por três quimiotipos distintos (citral, limoneno-carvona e linalol).



**Figura 6.** Dendrograma obtido pelo método de *Neighbor Joining* por meio do coeficiente de similaridade de Jaccard para as amostras dos vinte genótipos de *L. alba*. Quimiotipos: ● citral; □ mirceno-citral; ◆ limoneno-carvona; ▲ β-cariofileno; ○ linalol.

Apesar de alguns acessos terem sido agrupados a partir da mesma região geográfica, percebe-se que foram formados subgrupos variando o quimiotipo do acesso. Por meio destes resultados fica evidente que o uso desses marcadores não foi eficiente em separar plantas

pelos seus quimiotipos havendo a necessidade de aumentar o número de indivíduos analisados e expandir a coleta para outros municípios do estado do Rio de Janeiro e usar um conjunto de primers mais amplo selecionando aqueles associados a quimiotipos específicos.

### 3.4 CONCLUSÕES

Os dados moleculares indicam variação genética entre os acessos da coleção de germoplasma de *L. alba* da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Os marcadores ISSR utilizados não foram eficientes para separar os acessos de *L. alba* avaliados neste estudo pelos seus quimiotipos.

São necessárias coletas de mais material genético, para que se possa concluir com mais certeza a variação genética desta espécie nesta região.

### 3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AULER, N. M. F. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Baccharis trimera* (Less) DC. (carqueja) no sul do Brasil.** 2004. 108f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2004.
- BLANK, A. F.; CÂMELO, L. C. A.; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; PINHEIRO, J. B.; ANDRADE, T. M.; NICULAU, E. dos S.; ALVES, P. B. Chemical Diversity in *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Germplasm. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-11, 2015.
- BOTTIGNON, M. R.; RUFINO, E. R.; MARQUES, M. O. M.; COLOMBO, C. A.; AZEVEDO FILHO, J. A. de; LOURENÇÃO, A. L.; MARTINS, A. L. M.; SIQUEIRA, W. J. Heterogeneity of linalool chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., based on clonal half-sib progenies. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 4, p. 447-453, 2011.
- COSTA, J.L.; OLIVEIRA, E.J.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, G.A.F.; NEVES, C.G. Marcadores moleculares como ferramenta para estruturação da diversidade genética em 12 genótipos de maracujazeiro. Jornada Científica – **Embrapa Mandioca e Fruticultura**. 2010.
- ESTOPA, R.A.; SOUZA, A.M.; MOURA, M.C.O.; BOTREL, M.C.G.; MENDONÇA, E.G.; CARVALHO, D. Diversidade genética de populações naturais de candeia (*Erenanthes erythropappus* (DC.) MacLeish. **Scientia Forestalis**, v. 70, n. 1, p. 97-106, 2006.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, n. 1, p. 81-89. 2001.
- KERNODLE, S. P.; CANNON, R. E.; SCANDALIOS, J. G. Concentration of primer and template qualitatively affects product in RAPD – PCR. **Biotechniques**, v. 1, p. 362-364. 1993.
- JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; SILVA, D. B.; GRACINDO, L. A. M.; VIEIRA, R. F. Avaliação agronômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.3, p. 258-264. 2011.
- MANICA-CATTANI, M. F., ZACARIA, J., PAULETTI, G., ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 375-380, 2009.
- MATOS, F. J. A. As ervas cidreiras do nordeste do Brasil. Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill). N.E.Br. Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.77, n. 4, p. 37-41, 1996.

PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLET, J. P. DARwin software. 2006. **Disponível em :** <<http://darwin.cirad.fr/darwin>>. **Acessado em:** 20 de junho de 2015.

PIERRE, P. M. O; SOUSA, S. M.; DAVIDE, L. C.; MACHADO, M. A.; VICCINI, L. F. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 993-1005. 2011.

ROCHA, D. S.; SANTOS, C. P.; BAJAY, M. M.; CAMPOS, J. B.; BLANK, A. F.; PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I. Development of a novel set of microsatellite markers for *Lippia alba* (Verbenaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 971-974. 2015.

RUFINO, E. R.; SIQUEIA, W. J.; MARQUES, M. O. M.; COLOMBO, C. A.; AZEVEDO FILHO, J. A.; MARTINS, A. L. M. Selection of new clones of linalool chemotype from genetic recombination in *Lippia alba*. **Bragantia**, v. 71, n. 2, p.155-164, 2012.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406- 425. 1987.

SOUZA, D. C. L.; GOMES, L. J.; BLANK, A. F.; GOIS, I. B.; PEREIRA, G. S.; ALVES, P. B.; SILVA-MANN, R. Characterization of wild genotypes of Aroeira: subsidy for plant breeding. **Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development**, v. 6, n. 4, p. 39-49, 2014.

SANTOS, S. G.; CORRÊA, R. X. Diversidade genética de *Chenopodium ambrosioides* da região cacauzeira da Bahia com base em marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.161-164, 2006.

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

SANTOS, F. R.; LIMA, P. F.; PRIOLLI, R. H.; SIQUEIRA, W. J.; COLOMBO, C. A. Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci in *Lippia alba* (Verbenaceae). **American Journal of Botany**, v. 26, n. 8, p. 301–303, 2012.

SILVA, N. A.; OLIVEIRA, F. F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, R. A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Br.] cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.52-55, 2006.

SHINWARI, Z. K.; SULTAN, S.; MAHMOOD, T. Molecular and morphological characterization of selected *Mentha* species. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 3, p. 1433-1436, 2010.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 495-503, 2015.

VAL, T. M.; CAVALLARI, M. M.; ZUCCHI, M. I.; BLANK, A. F.; MONTEIRO, M.; PINHEIRO, J. B. Diversidade genética em germoplasma de *Lippia alba* utilizando marcadores ISSR. **In:** 55º Congresso Brasileiro de Genética, 30 de agosto a 02 de setembro de 2009. Águas de Lindóia-SP, Brasil. 2009.

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

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

ZUCCHI, M. I.; ANTANASIO, C. M.; SUJII, P. S. Conservação de espécies da Mata Atlântica com potencial medicinal. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2013.

## **4 CAPÍTULO II**

### **PARÂMETROS GENÉTICOS E AVALIAÇÃO AGRONÔMICA EM CLONES DE *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown EM DUAS ESTAÇÕES NO ANO**



## RESUMO

A erva-cidreira-brasileira (*Lippia alba*) é uma planta medicinal e aromática nativa da América do Sul, que possui uma ampla plasticidade fenotípica, além de óleos essenciais com perfis químicos diferentes. Em função do potencial produtivo e da variedade de constituintes químicos da espécie, existe interesse no melhoramento, para obtenção de plantas com produção estável em vários ambientes. A fim de atender este objetivo, a avaliação da variabilidade genética é fundamental para auxiliar nos programas de melhoramento e para a domesticação da espécie. Portanto, este estudo teve por objetivo avaliar a variabilidade genética de acessos de erva-cidreira-brasileira a partir de caracteres qualitativos e quantitativos, calculando parâmetros genéticos em duas épocas no ano. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso com 20 tratamentos (clones) e três repetições, no período de agosto de 2011 a maio de 2014. Os dados foram obtidos em duas colheitas, uma na primavera de 2013 e outra no verão de 2014. Foram avaliadas as variáveis qualitativas: coloração das folhas; consistência das folhas; coloração das sépalas e coloração das pétalas; hábito de crescimento e formato da copa. As variáveis quantitativas foram: altura (m); largura da copa (m); diâmetro do caule (cm); número de ramos por planta; número de entrenós por ramo; número de folhas por ramo; razão entre número de folhas por número de ramos. As variáveis produtivas: massa fresca de ramos (g); massa fresca de folhas (g); massa seca de ramos (g); massa seca de folhas (g); massa seca total (g) e produtividade ( $\text{kg ha}^{-1}$ ). E finalmente, as variáveis associadas à produção de óleo essencial: o teor (%) e o rendimento ( $\text{g planta}^{-1}$ ). Os coeficientes de determinação genotípico da maioria das variáveis apresentaram-se em patamares aceitáveis, indicando possibilidade de seleção destas variáveis.

**Palavras-chave:** interação genótipo x ambiente; herdabilidade; seleção; germoplasma

## ABSTRACT

The lemongrass-brazilian (*Lippia alba*) is a native medicinal and aromatic plant from South America that has wide phenotypic plasticity, as well as essential oils with different chemical profiles. Due to productive potential and various chemical constituents of the kind, there is interest in breeding to achieve stable production plants in various environments. In order to meet this goal, the evaluation of genetic variability is fundamental to assist in breeding programs and for the domestication of the species. Therefore, this study aimed to evaluate the genetic variability of lemongrass-brazilian hits from qualitative and quantitative traits, calculating genetic parameters in two seasons in the year. The experiment was conducted in randomized blocks with 20 treatments (clones) and three replications, from August 2011 to May 2014. The data were obtained in two crops, one in spring 2013 and the other in the summer of 2014 were evaluated qualitative variables: color of the leaves; consistency of sheets; staining of the staining of sepals and petals; growth habit and crown shape. Quantitative variables were: height (m); crown width (m); stem diameter (cm); number of branches per plant; number of internodes per branch; number of leaves per branch; ratio of number of sheets per number of branches. Production variables: fresh pasta branches (g); fresh pasta sheets (g); branches dry mass (g); dry weight leaves (g); total dry weight (g) and productivity ( $\text{kg ha}^{-1}$ ). And finally, the variables associated with essential oil production: the content (%) and yield essential oil ( $\text{g plant}^{-1}$ ). The coefficients of genotypic of most variables were at acceptable levels, indicating the possibility of selecting these variables.

**Key words:** genotype x environment interaction; heritability; selection; germplasm

## 4.1 INTRODUÇÃO

A erva-cidreira-brasileira (*Lippia alba* (Mill) N. E. Brown, Verbenaceae) é uma das muitas espécies que compõe o gênero *Lippia*, sendo bastante conhecida da medicina popular nacional e mais recentemente pela indústria de fármacos, cosméticos, perfumaria e produtos agropecuários (AMARAL & SANTOS, 2014).

De acordo com a região no Brasil em que esta espécie ocorre pode ser tratada também por falsa-melissa, erva cidreira, alecrim-do-campo, etc. A planta é encontrada na natureza como um subarbusto de morfologia variável, seus ramos são finos, esbranquiçados, arqueados, longos e quebradiços. As folhas são inteiras, opostas, de bordos serrados e ápice agudo, de 3-6 cm de comprimento. Flores azul-arroxeadas e brancas, reunidas em inflorescências axilares capituliformes de eixo curto e tamanho variável. Os frutos são drupas globosas de cor róseo-arroxeadas (LORENZI & MATOS, 2002).

Alguns estudos já foram realizados com *L. alba* a partir de variáveis qualitativas em plantas mantidas em banco de germoplasma na UnB, UFC e UFS (CÂMELO et al., 2010). Neste sentido, a caracterização de coleções de germoplasma pode auxiliar na domesticação da espécie e fornecer informações importantes sobre os níveis de variabilidade genética disponíveis para o melhoramento. Esta caracterização busca compreender a diversidade genética dos acessos para permitir a sua identificação e fomentar a sua utilização em programas de melhoramento vegetal. Essa etapa é fundamental no manejo e utilização eficiente do material preservado nas coleções (FERREIRA et al., 2007).

A determinação de alguns caracteres morfoagronômicos de *L. alba* foram alvo de estudos em alguns estados brasileiros, com destaque para Sergipe e o Distrito Federal (CÂMELO et al., 2011; JANNUZZI et al., 2011). Além destes trabalhos, Yamamoto (2006) avaliou a interação genótipo x ambiente de diferentes quimiotipos e Rufino (2008) estimou parâmetros genéticos e selecionou clones de linalol de *L. alba*, ambos no estado de São Paulo.

Ao estudar acessos de manjerição (*Ocimum* spp.) Blank et al. (2004), por meio da caracterização morfológica e agrônômica constatou a variabilidade genética em 55 acessos. Já Arrigoni-Blank et al. (2005) por meio da caracterização morfológica, observou diferenças na avaliação de seis acessos de *Hyptis pectinata* (L.) Poit (Lamiaceae), para as características altura da planta, diâmetro da copa, comprimento de folha e massa seca de folhas e galhos. Araújo et al., (2014) realizaram estimativas dos parâmetros genéticos e correlações entre caracteres morfoagronômicos em progênies de *Ageratum conyzoides* L. Os resultados evidenciaram a existência de variabilidade genética na população para algumas das características avaliadas.

Enquanto, Silva (2013) ao realizar a caracterização agrônômica e divergência genética de acessos de cártamo, observou alta variabilidade genética entre os acessos de cártamo para todas as características estudadas possibilitando promover ganhos genéticos futuros.

Além da constituição genética da espécie e seus vários quimiotipos, estímulos ambientais podem redirecionar as rotas de biossíntese mudando a composição química, produção e atividade biológica dos óleos essenciais nas plantas, tais como, interação planta-microrganismo, planta-inseto e planta-planta (LINDE et al., 2016). Bem como, os fatores climáticos (temperatura, intensidade de luz, efeito sazonal, etc.) e edáficos (MORAIS, 2009). Pesquisas avaliando o efeito da sazonalidade associada à época de colheita na produção de fitomassa de *L. alba*, destacaram que os maiores rendimentos foram obtidos nos cortes realizados na primavera e no verão, sendo os menores obtidos no corte realizado no inverno (CASTRO, 2001).

Apesar da sua ampla distribuição no território brasileiro, são poucos os estudos relacionados com a diversidade genética e a interação destes genótipos com o ambiente. Portanto, o estudo do comportamento fenológico de *L. alba* a partir de diferentes genótipos é crucial para auxiliar nos programas de melhoramento desta espécie. Logo, este trabalho teve por objetivo avaliar caracteres qualitativos e quantitativos de *L. alba* por meio da determinação de parâmetros genéticos e o comportamento agrônômico em duas épocas do ano na região Metropolitana do Rio de Janeiro.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na área experimental do Setor de Plantas Medicinais e Aromáticas do Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no município de Seropédica (22° 45' S; 43° 41' W), Estado do Rio de Janeiro (RJ), a partir de plantas pertencentes à coleção de germoplasma de *L. Alba*, deste departamento. A área fica praticamente ao nível do mar (cerca de 30 m de altitude) e o solo do local foi classificado como Planossolo Háplico. Segundo a classificação de Koppen, o clima da região enquadra-se no tipo Aw, sendo caracterizado pela alternância entre a estação chuvosa no verão e seca durante o inverno.

A caracterização físico-química do solo na camada de 0-20 cm de profundidade indicou os seguintes valores: areia 87%; argila 3% e silte 10%; textura arenosa conforme o Sistema Brasileira de Ciência do Solo; pH 5,7; Ca+Mg (cmol<sub>e</sub>/dm<sup>3</sup>) 2,1; K (cmol<sub>e</sub>/dm<sup>3</sup>) 0,09; Na (cmol<sub>e</sub>/dm<sup>3</sup>) 0,040; P (ml/L) 38; Al (cmol<sub>e</sub>/dm<sup>3</sup>) 0,0; CTC (pH 7) 69; CO (%) 1,46.

Foram avaliados 20 clones de *L. alba* (Tabela 7), obtidos por meio de coletas em domicílios e propriedades rurais. O delineamento usado foi de blocos ao acaso com vinte tratamentos e três repetições.

**Tabela 7.** Identificação dos acessos de acordo com a origem.

Origem dos clones				
UFRRJ LA1 <sup>(b)</sup>	UFRRJ LA2 <sup>(b)</sup>	UFRRJ LA3 <sup>(b)</sup>	UFRRJ LA4 <sup>(b)</sup>	UFRRJ LA5 <sup>(a)</sup>
UFRRJ LA6 <sup>(a)</sup>	UFRRJ LA7 <sup>(c)</sup>	UFRRJ LA8 <sup>(c)</sup>	UFRRJ LA9 <sup>(c)</sup>	UFRRJ LA10 <sup>(c)</sup>
UFRRJ LA11 <sup>(c)</sup>	UFRRJ LA12 <sup>(c)</sup>	UFRRJ LA13 <sup>(c)</sup>	UFRRJ LA14 <sup>(c)</sup>	UFRRJ LA15 <sup>(c)</sup>
UFRRJ LA16 <sup>(c)</sup>	UFRRJ LA17 <sup>(c)</sup>	UFRRJ LA18 <sup>(c)</sup>	UFRRJ LA19 <sup>(c)</sup>	UFRRJ LA20 <sup>(c)</sup>

<sup>(a)</sup>Seropédica-RJ; <sup>(b)</sup>Campo Grande (bairro da cidade do Rio de Janeiro); <sup>(c)</sup>Queimados-RJ

As mudas foram obtidas em agosto de 2011 e transplantadas em janeiro de 2012. O espaçamento adotado foi de 1,0 x 1,5 m, correspondendo a 6.666 plantas por hectare. A parcela experimental foi composta de cinco plantas, sendo avaliadas as três plantas centrais. O manejo da adubação iniciou-se no momento do transplante com a adição de 5 g de N-P-K (4-14-8) na cova, juntamente com 500 g de esterco curtido. A irrigação foi feita, exclusivamente, na fase de pegamento das mudas no campo, contando com auxílio de regadores. O controle de plantas daninhas foi realizado por meio de capina manual. A colheita foi executada sempre na parte da manhã e realizada nos ramos a uma altura de 15 cm da base do solo.

As variáveis qualitativas foram avaliadas em todas as colheitas. Foram observadas: coloração das folhas (verde, verde claro e verde escuro); consistência das folhas (nota 1 = maleável; nota 2 = semiquebradiça; nota 3 = quebradiça); coloração das sépalas (verde e verde claro) e coloração das pétalas (lilás, lilás claro e branca); hábito de crescimento [1 = ereta (nenhum galho tocando o solo), 2 = 25% dos galhos tocando o solo, 3 = 50% dos galhos tocando o solo, 4 = 75% dos galhos tocando o solo e 5 = decumbente (100% dos galhos tocando o solo)] e formato da copa (arredondado, irregular, taça). Estas variáveis foram determinadas conforme metodologia proposta na literatura (CÂMELO et al., 2011).

Além das variáveis morfoagronômicas: AL = altura (m); LC = largura da copa (m); DC = diâmetro do caule (cm); NR = número de ramos por planta; NER = número de entrenós por ramo; NF = número de folhas por ramo; NF/NR = razão entre número de folhas por número de ramos. A altura e a largura da copa das plantas foram determinadas com fita métrica e o diâmetro do caule foi determinado com auxílio de paquímetro. Já o comprimento e a largura das folhas foram medidos com régua milimetrada, desconsiderando o pecíolo.

Após a colheita da parte aérea os ramos e as folhas foram imediatamente encaminhados para o Laboratório de Plantas Medicinais e Aromáticas. As folhas foram separadas dos ramos e pesadas separadamente em balança de precisão, em seguida as folhas e os ramos foram acondicionados em caixas plásticas para secagem a sombra. Após a secagem do material à sombra procedeu-se nova pesagem para determinação da massa seca de ramos e folhas. Sendo assim determinados: MFR = massa fresca de ramos (g); MFF = massa fresca de folhas (g); MSR = massa seca de ramos (g); MSF = massa seca de folhas (g); MST = massa seca total (g) e PROD = produtividade ( $\text{kg ha}^{-1}$ ).

A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger modificado (MATOS, 2000) utilizando-se balão, com capacidade de 2 L onde foram colocadas 25 g de folhas secas, acrescidas de 1,0 L de água destilada por 30 minutos, com três repetições. Em seguida, o hidrolato, aproximadamente 20 mL, foi submetido à partição líquido-líquido, em funil de separação, utilizando-se diclorometano. Depois, a fração orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e concentrada no Evaporador Rotativo (FISATOM, BR) até o volume aproximado de 2 mL. Em seguida, o restante foi reduzido no Concentrador TE-019 (TECNAL, BR) até atingir massa estável, com posterior pesagem em balança analítica.

As variáveis associadas ao óleo essencial obtido foram: o teor do óleo essencial (%) após o processo de extração e secagem de cada genótipo; e o rendimento de óleo essencial ( $\text{g pl}^{-1}$ ) estimado a partir da relação entre o teor de óleo (%) e a massa seca de folha por planta.

A partir dos dados gerados pelas variáveis citadas, anteriormente, foram determinadas as estimativas de parâmetros genético-estatísticos baseadas em esperanças matemáticas do quadrado médio das análises de variâncias, num modelo misto com blocos fixos. As análises de variância individuais foram efetuadas para cada época, objetivando avaliar a existência de variabilidade genética e estimar os parâmetros genéticos. Procedeu-se ainda à análise de variância conjunta e, na presença das interações significativas, procederam-se os desdobramentos necessários. As médias foram comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott para avaliar o efeito das estações do ano e dos genótipos de *L. alba*, a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com a utilização do aplicativo computacional estatístico “Programa Genes” (CRUZ, 2006).

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os vinte genótipos avaliados de *L. alba* possuem como características qualitativas predominantes coloração da folha verde e textura da folha semiquebradiça. A coloração da flor para sépala situa-se no verde e a pétala no lilás claro (Tabela 8). Com relação ao hábito de crescimento, as plantas diferiram entre si, sendo a nota 3 = planta com 50% dos galhos tocando no solo, a predominante. O clone UFRRJ 4 foi o único que apresentou nota 5 = 100% dos galhos tocando no solo (decumbente), este comportamento implica em dificuldade de colheita (manual ou mecânica). Com relação ao formato da copa a grande maioria dos clones apresentaram um formato irregular, com exceção para os acessos UFRRJ 1, UFRRJ 6, UFRRJ 11 (arredondado) e UFRRJ 2 (taça) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Características qualitativas de acessos de *L. alba* (Mill.) N. E. Br. da coleção de germoplasma da UFRRJ.

Clone	COLF	CONF	Coloração da Flor		HC	FCOP
			Sépala	Pétala		
UFRRJ LA1	verde	2	verde	lilás claro	2	Arredondado
UFRRJ LA2	verde escuro	2	verde	lilás claro	2	Taça
UFRRJ LA3	verde	2	verde	lilás	3	Irregular
UFRRJ LA4	verde	2	verde	lilás	5	Irregular
UFRRJ LA5	verde escuro	2	verde	lilás	3	Irregular
UFRRJ LA6	verde claro	1	verde	lilás	3	Arredondado
UFRRJ LA7	verde claro	1	verde	lilás claro	3	Irregular
UFRRJ LA8	verde	1	verde	lilás claro	2	Irregular
UFRRJ LA9	verde escuro	3	verde	lilás claro	3	Irregular
UFRRJ LA10	verde claro	2	verde	lilás claro	3	Irregular
UFRRJ LA11	verde claro	1	verde	lilás claro	2	Arredondado
UFRRJ LA12	verde	2	verde	lilás claro	2	Irregular
UFRRJ LA13	verde escuro	2	verde	lilás	2	Irregular
UFRRJ LA14	verde claro	1	verde	lilás claro	3	Irregular
UFRRJ LA15	verde	1	verde	lilás claro	4	Irregular
UFRRJ LA16	verde	2	verde	lilás claro	4	Irregular
UFRRJ LA17	verde	2	verde	lilás claro	4	Irregular
UFRRJ LA18	verde claro	2	verde	lilás claro	4	Irregular
UFRRJ LA19	verde	3	verde	lilás claro	2	Irregular
UFRRJ LA20	verde	1	verde	lilás claro	4	Irregular

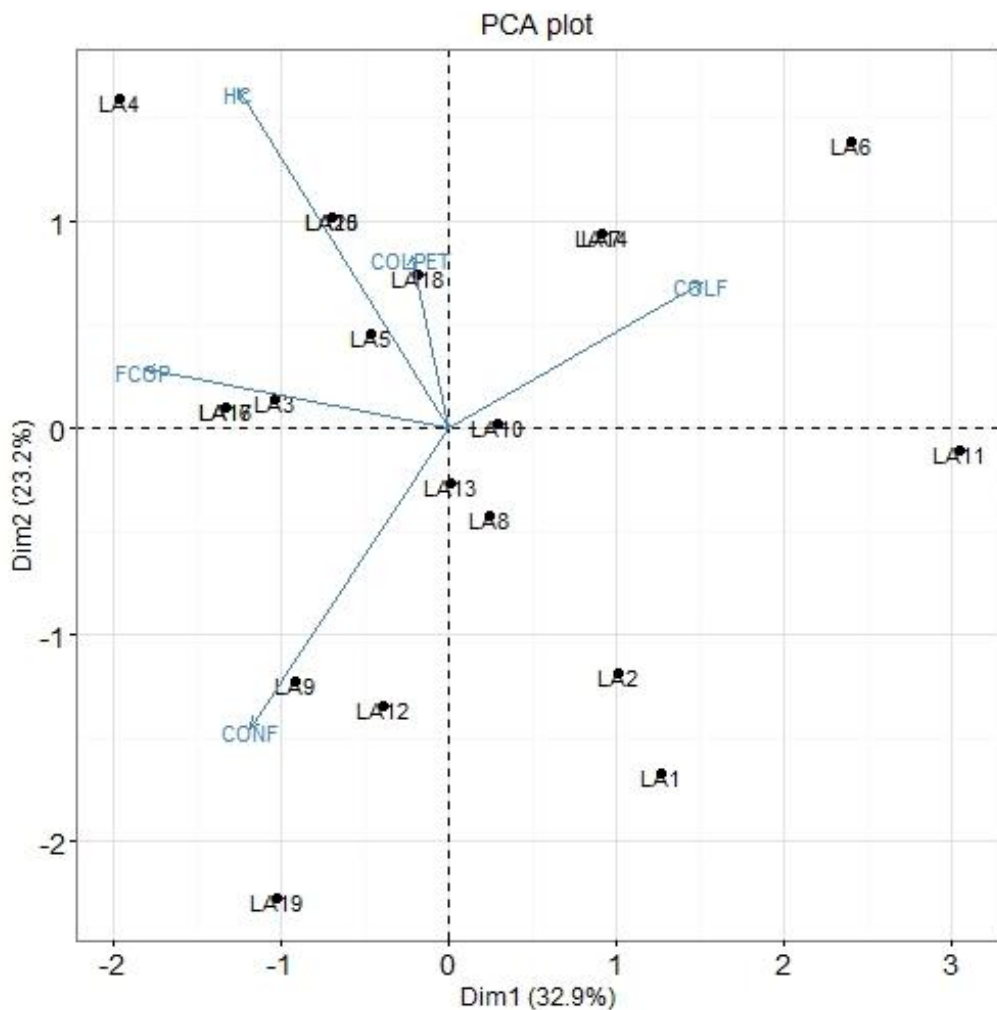
COLF = coloração da folha; CONF = consistência da folha (nota 1 = maleável; nota 2 = semiquebradiça; nota 3 = quebradiça); HC = hábito de crescimento (nota 1 = planta ereta; nenhum ramo toca no solo; nota 2 = 25% dos ramos tocam no solo; nota 3 = 50% dos ramos tocam no solo; 4 = 75% dos ramos tocam no solo; 5 = 100% dos ramos tocam no solo) e FCOP = formato da copa.

Em estudo com diferentes acessos de *L. alba* mantidos em um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) na UFS, São Cristóvão-SE, foi observada semelhanças para as mesmas características, com exceção para cor de flor branca, que ocorreu, embora em menor proporção (CÂMELO, 2011).

A variação do hábito de crescimento pode ter ocorrido por herança genética e por ação do corte e da rebrota sob ação dos ventos, que induziram ao arqueamento e quebra das

hastes finas alterando o padrão de crescimento das plantas (PEREIRA PINTO et al., 2000; LORENZI & MATOS, 2002). Diferenças morfológicas também foram encontradas entre dez acessos de *L. sidoides* para as variáveis cor de caule, formato de copa, altura de planta, comprimento e largura de folha (OLIVEIRA, 2008).

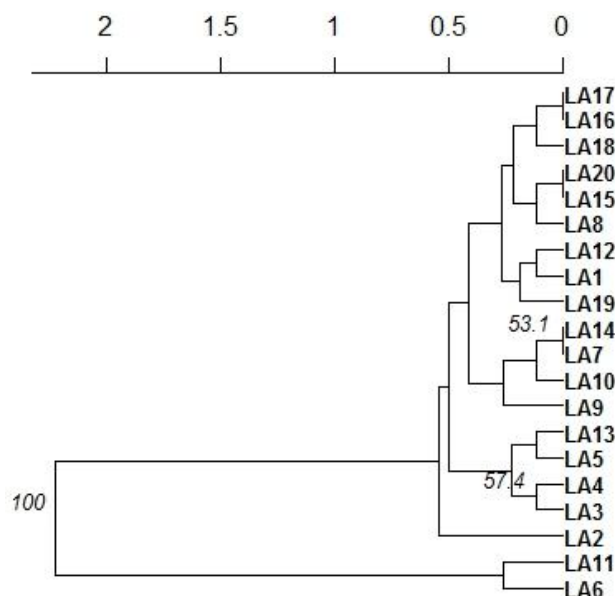
A partir da análise de componentes principais é possível observar quais variáveis qualitativas mais influenciaram na composição dos grupos de indivíduos, sendo que as variáveis coloração da folha (COLF) e consistência da folha (CONF) formaram grupos isolados. As variáveis que mais influenciaram na formação de um grupo maior de genótipos foram formato da copa (FCOP), hábito de crescimento (HC) e coloração da pétala (COLPET) (Figura 7).



**Figura 7.** Análise de componentes principais com vinte acessos de *Lippia alba* com projeção dos vetores dos caracteres: COLF (coloração da folha); CONF (consistência da folha); FCOP (formato da copa); HC (hábito de crescimento) e COLPET (coloração da pétala).

Apesar da separação dos grupos os componentes não atingiram 80% da variância total, no entanto, foi possível observar a discriminação dos seguintes grupos: GRUPO I UFRRJ LA6 e UFRRJ LA11, além do GRUPO II UFRRJ LA3, UFRRJ LA4, UFRRJ LA 5 e UFRRJ LA 13 e o GRUPO III UFRRJ LA9, UFRRJ LA10, UFRRJ LA7 e UFRRJ LA 14 (Figura 8).





**Figura 8.** Análise de divergência genética para 20 genótipos de *Lippia alba* a partir de variáveis qualitativas. As distâncias genéticas foram obtidas com base em 6 variáveis e quantificadas através da distância Euclidiana padronizada e o agrupamento foi feito pelo método UPGMA.

O resumo da análise de variância, as médias gerais, o coeficiente de variação, além dos parâmetros genéticos relativos aos caracteres morfoagronômicos referentes a 20 acessos de *L. alba*, encontram-se nas tabelas 9 e 10. De acordo com o teste F, houve diferença significativa entre os acessos avaliados no nível de 5% para todas as características analisadas, exceto para variável altura, medida na primavera (Tabela 9).

**Tabela 9.** Análise de variância das variáveis morfoagronômicas de diferentes genótipos de *L. alba* referente a colheita de primavera, Seropédica-RJ.

	Quadrados médios							
	GL	AL	LC	DC	NR	NER	NF	NF/NR
Genótipos	19	0,0597 <sup>ns</sup>	0,0201*	0,3077*	17,3276*	1,7922*	1065,597*	5,5024*
Repetição	2	0,4532*	0,0957*	0,7514*	67,9649*	29,7710*	4313,706*	29,7187*
Resíduo	38	0,0387	0,0161	0,3353	10,9123	5,4541	602,310	4,0685
Máximo		1,92	2,03	6,08	32,00	28,0	250,0	19,74
Mínimo		1,03	1,15	1,69	9,67	11,67	55,67	2,28
Média		1,45	1,46	2,91	17,43	19,93	103,51	6,60
CV%		13,45	8,65	19,83	18,94	11,71	23,70	30,51
$\sigma_p^2$		0,0151	0,0319	0,2504	9,9236	22,6549	1437,902	9,9062
$\sigma_e^2$		0,0128	0,0053	0,1117	1,8180	3,6374	200,770	1,3561
$\sigma_g^2$		0,0022	0,0265	0,1387	8,1056	19,0175	1237,132	8,5500
H <sup>2</sup> (%)		14,88	83,09	55,37	81,67	83,94	86,03	86,30
CVg (%)		3,24	11,07	12,75	14,27	25,01	33,97	44,24
CVg/CVe (%)		0,24	1,28	0,64	1,21	1,32	1,43	1,44

\*Significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; GL = graus de liberdade; CV (%) = coeficiente de variação;  $\sigma_p^2$  = variância fenotípica;  $\sigma_e^2$  = variância ambiental;  $\sigma_g^2$  = variância genotípica; H<sup>2</sup> (%) = coeficiente de determinação genotípica; CVg (%) = coeficiente de variação genotípico; CVg/CVe (%) = razão entre coeficiente de variação genético e coeficiente de variação ambiental. AL = altura de plantas (m); LC = largura da copa (m); DC = diâmetro do caule (cm); NR = número de ramos por planta; NER = número de entre nós por ramo; NF = número de folhas por ramo; NF/NR = razão número de folhas por número de ramos.

**Tabela 10.** Análise de variância das variáveis morfoagronômicas de diferentes genótipos de *L. alba* referente a colheita de verão, Seropédica-RJ.

	Quadrados médios							
	GL	AL	LC	DC	NR	NER	NF	NF/NR
Genótipos	19	0,1276*	0,7935*	0,6473*	27,554*	78,877*	86,294*	0,0198*
Repetição	2	0,0794*	0,4590*	0,5887*	144,209*	39,669*	7616,034*	9,730*
Resíduo	38	0,0194	0,0287	0,1511	2,5917	6,6421	13,3869	0,0579
Máximo		2,45	3,0	5,0	40,0	39,56	255,0	8,82
Mínimo		1,56	1,3	1,9	12,75	18,97	19,89	0,85
Média		2,09	2,28	2,85	24,24	31,02	60,68	2,54
CV%		6,64	7,40	13,62	6,63	8,30	6,02	9,44
$\sigma^2_p$		0,2648	48,069	0,1530	0,1962	13,223	2538,678	3,2433
$\sigma^2_e$		0,0064	0,8639	0,0095	0,0503	2,214	4,46233	0,0193
$\sigma^2_g$		0,0199	47,205	0,1434	0,1458	11,009	2534,215	3,2240
H <sup>2</sup> (%)		75,46	98,20	93,73	74,33	83,25	99,82	99,40
CVg (%)		6,73	28,33	16,56	13,38	10,69	82,95	70,45
CVg/CVe (%)		1,01	4,26	2,23	0,98	1,28	13,75	7,46

\*Significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; GL = graus de liberdade; CV (%) = coeficiente de variação;  $\sigma^2_p$  = variância fenotípica;  $\sigma^2_e$  = variância ambiental;  $\sigma^2_g$  = variância genotípica; H<sup>2</sup> (%) = coeficiente de determinação genotípica; CVg (%) = coeficiente de variação genotípico; CVg/CVe (%) = razão entre coeficiente de variação genético e coeficiente de variação ambiental. AL = altura de plantas (m); LC = largura da copa (m); DC = diâmetro do caule (cm); NR = número de ramos por planta; NER = número de entre nós por ramo; NF = número de folhas por ramo; NF/NR = razão número de folhas por número de ramos.

Dentre as variáveis morfoagronômicas avaliadas, houve superioridade nos valores médios obtidos na primavera para diâmetro da copa, número de folhas e relação NF/NR. Enquanto que o coeficiente de variação genotípico foi superior para maioria das variáveis obtidas na estação do verão, com exceção para as variáveis número de ramos (14,27) e número de entre nós por ramo (25,01) na estação da primavera. Este fato pode ser explicado pelas altas temperaturas e irregularidade das chuvas (verão), sendo estas variáveis mais sensíveis a estas condições climáticas. Segundo Freitas et al. (2007), quanto maiores os valores de coeficientes de variação genética melhores são as possibilidades de progressos genéticos com a seleção em programas de melhoramento.

O valor H<sup>2</sup> é o coeficiente de determinação do valor do fenótipo pelo valor do genótipo e é chamado de herdabilidade no sentido amplo. Ele estabelece o grau de correspondência entre o fenótipo e o genótipo e é um indicador da eficiência da seleção. Neste trabalho o valor H<sup>2</sup> calculado é o coeficiente de determinação fenótipo genótipo, mas não é correto designá-lo de herdabilidade, já que os genótipos aqui estudados não são representativos de uma população.

No entanto ele é um bom indicador do grau de importância da variação genotípica em relação à variação total. Assim, pode-se esperar maiores oportunidades de seleção quando esses valores forem altos. As variáveis número de folhas e a relação NF/NR apresentaram os maiores valores de H<sup>2</sup> nas duas épocas avaliadas, podendo auxiliar seguramente na seleção de clones superiores.

Carvalho et al. (2001) argumentam que caracteres com baixa H<sup>2</sup>, tendem a dificultar o processo de seleção, devido à grande influência do ambiente. No entanto, Rufino et al. (2010) obtiveram parâmetros genéticos equivalentes aos obtidos neste estudo, mesmo em progênies derivadas de somente sete clones IAC de quimiotipos linalol.

As tabelas 11 e 12 apresentam o resumo da análise de variância das variáveis produtivas e os principais parâmetros genéticos. Os maiores valores de coeficiente de variação genotípico para as variáveis produtivas ocorreram na estação do verão. Sendo o maior para variável massa fresca das folhas (75,39%) e o menor valor para esta mesma variável na estação da primavera foi de 24,24%.

**Tabela 11.** Análise de variância das variáveis produtivas de diferentes genótipos de *L. alba* referente a colheita de primavera, Seropédica-RJ.

	Quadrados médios						
	GL	MFR	MFF	MSR	MSF	MST	PROD
Genótipos	19	9495,34*	27885,54*	1492,29*	328,160*	2890,91*	22337,18*
Repetição	2	73739,21*	28153,83*	9338,78*	3075,90*	21372,50*	209353,49*
Resíduo	38	20053,18	7119,04	2567,14	10,91	5151,48	45544,37
Máximo		1103,11	648,89	384,83	230,52	615,40	1901,81
Mínimo		193,33	113,67	44,0	31,75	77,60	261,81
Média		550,31	345,40	171,42	91,96	263,39	758,69
CV%		25,73	24,42	29,55	28,12	27,24	28,12
$\sigma^2_p$		24579,73	9384,61	3112,92	1025,30	7124,16	69784,49
$\sigma^2_e$		6684,39	2373,01	855,71	223,06	1717,16	15181,45
$\sigma^2_g$		17895,34	7011,59	2257,21	802,23	5407,00	54603,04
$H^2$ (%)		72,80	74,71	72,51	78,24	75,89	78,24
CVg (%)		24,30	24,24	27,71	30,79	27,91	30,79
CVg/CVe (%)		0,9447	0,9924	0,9377	1,094	1,024	1,094

\*Significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; GL = graus de liberdade; CV (%) = coeficiente de variação;  $\sigma^2_p$  = variância fenotípica;  $\sigma^2_e$  = variância ambiental;  $\sigma^2_g$  = variância genotípica;  $H^2$  (%) = coeficiente de determinação genotípica; CVg (%) = coeficiente de variação genotípico; CVg/CVe (%) = razão entre coeficiente de variação genético e coeficiente de variação ambiental. MFR = massa fresca de ramos (g); MFF = massa fresca de folhas (g); MSR = massa seca de ramos (g); MSF = massa seca de folhas (g); MST = massa seca total (g); PROD = produtividade (kg ha<sup>-1</sup>).

**Tabela 22.** Análise de variância das variáveis produtivas de diferentes genótipos de *L. alba* referente a colheita de verão, Seropédica-RJ.

	Quadrados médios						
	GL	MFR	MFF	MSR	MSF	MST	PROD
Genótipos	19	43552,53*	342172,72*	30622,92*	549,57*	37402,41*	37405,61*
Repetição	2	275057,66*	4206687,29*	83740,82*	3568,23*	113135,49*	242862,32*
Resíduo	38	13975,44	36047,27	4360,47	177,03	5140,31	12049,23
Máximo		1602,0	4051,5	890,61	152,01	1022,33	1254,08
Mínimo		248,0	44,0	97,7	17,67	130,79	145,78
Média		815,75	1563,88	383,85	72,36	456,21	596,98
CV%		14,49	12,14	17,2	18,38	15,71	18,38
$\sigma^2_p$		91685,88	1402229,09	27913,60	1189,41	37711,83	8954,10
$\sigma^2_e$		4658,48	12015,75	1453,49	59,01	1713,43	4016,41
$\sigma^2_g$		87027,40	1390213,34	26460,11	1130,40	35998,39	76937,69
$H^2$ (%)		94,91	99,14	94,79	95,03	95,45	95,03
CVg (%)		36,16	75,39	42,37	46,46	41,58	46,46
CVg/CVe (%)		2,495	6,2102	2,463	2,526	2,64	2,52

\*Significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; GL = graus de liberdade; CV (%) = coeficiente de variação;  $\sigma^2_p$  = variância fenotípica;  $\sigma^2_e$  = variância ambiental;  $\sigma^2_g$  = variância genotípica;  $H^2$  (%) = coeficiente de determinação genotípica; CVg (%) = coeficiente de variação genotípico; CVg/CVe (%) = razão entre coeficiente de variação genético e coeficiente de variação ambiental. MFR = massa fresca de ramos (g); MFF = massa fresca de folhas (g); MSR = massa seca de ramos (g); MSF = massa seca de folhas (g); MST = massa seca total (g); PROD = produtividade (kg ha<sup>-1</sup>).

As características apresentadas mostram elevados valores para  $H^2$ , variando nas duas épocas de 72% a 78% na primavera e 94% a 99% no verão, indicando predominância da variação genotípica sobre a variação ambiental, o que é favorável para a seleção de clones superiores (Tabelas 11 e 12).

Quanto às variáveis associadas ao óleo essencial (Tabela 13 e 14), percebe-se que o peso (g), o rendimento (%) e a produtividade (kg ha<sup>-1</sup>) podem ser utilizadas como critério de seleção de genótipos superiores. Visto que os valores do coeficiente de variação genotípico foram superiores 41,30% e  $H^2$  foi alto nas duas épocas avaliadas.

**Tabela 33.** Análise de variância das variáveis teor (%) e rendimento de óleo essencial (ml planta<sup>-1</sup>) de diferentes genótipos de *L. alba* referente a colheita da primavera, Seropédica-RJ.

	Quadrados médios		
	GL	Teor (%)	Rendimento (ml planta <sup>-1</sup> )
Genótipos	19	0,001266*	0,02011*
Repetição	2	0,008101*	0,1295*
Resíduo	38	0,001055	0,0168
Máximo		0,2677	1,071
Mínimo		0,0298	0,1194
Média		0,92	0,36
CV%		35,26	35,23
$\sigma^2_p$		0,0027	0,04317
$\sigma^2_e$		0,00035	0,00562
$\sigma^2_g$		0,00234	0,03755
$H^2$ (%)		86,97	69,01
CVg (%)		52,61	52,58
CVg/CVe (%)		1,49	1,49

\*Significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; GL = graus de liberdade; CV (%) = coeficiente de variação;  $\sigma^2_p$  = variância fenotípica;  $\sigma^2_e$  = variância ambiental;  $\sigma^2_g$  = variância genotípica;  $H^2$  (%) = coeficiente de determinação genotípica; CVg (%) = coeficiente de variação genotípico; CVg/CVe (%) = razão entre coeficiente de variação genético e coeficiente de variação ambiental.

**Tabela 44.** Análise de variância das variáveis teor (%) e rendimento de óleo essencial (ml planta<sup>-1</sup>) de diferentes genótipos de *L. alba* referente a colheita de verão, Seropédica-RJ.

	Quadrados médios		
	GL	Teor (%)	Rendimento (ml planta <sup>-1</sup> )
Genótipos	19	0,00119*	0,0020*
Repetição	2	0,01151*	0,1839*
Resíduo	38	0,00006	0,0010
Máximo		0,28	1,12
Mínimo		0,059	0,23
Média		0,91	0,45
CV%		6,77	7,11
$\sigma^2_p$		0,00383	0,0613
$\sigma^2_e$		0,00002	0,00035
$\sigma^2_g$		0,003817	0,06094
$H^2$ (%)		99,47	99,42
CVg (%)		53,80	54,08
CVg/CVe (%)		7,94	7,59

\*Significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; GL = graus de liberdade; CV (%) = coeficiente de variação;  $\sigma^2_p$  = variância fenotípica;  $\sigma^2_e$  = variância ambiental;  $\sigma^2_g$  = variância genotípica;  $H^2$  (%) = coeficiente de determinação genotípica; CVg (%) = coeficiente de variação genotípico; CVg/CVe (%) = razão entre coeficiente de variação genético e coeficiente de variação ambiental.

Em geral, a maioria das variáveis analisadas apresentaram maiores valores de coeficiente de variação genotípico na época do verão, demonstrando que as condições climáticas deste período influenciam no comportamento das plantas no campo, proporcionando maior relevância à variação genotípica nessa época.

Segundo Ventrella (2000) os dados de produção de folhas e de óleo essencial indicaram melhor adaptação da planta a condições de alta intensidade luminosa. Já Blank et al., (2010) ao estudarem diferentes populações de manjeriço, afirmam que não foi detectado efeito dos diferentes anos agrícolas para o teor de linalol no óleo essencial, o que pode ser interessante para manter os níveis de produtividade ao longo dos anos. As demais características avaliadas tiveram influência significativa dos anos agrícolas.

Com relação às variáveis morfoagronômicas analisadas nas estações da primavera e verão, observou-se efeito significativo para todas as variáveis (Tabela 15). A variável altura de plantas (AL) foi superior para todos os genótipos na primavera. Apesar das plantas apresentarem maior tamanho na primavera, não foi observada diferença significativa entre as épocas avaliadas para variável diâmetro do caule (Tabela 15).

Dentre as variáveis analisadas a contribuição para aumentar a produção de fitomassa está associada principalmente com número de ramos por plantas (NR), com superioridade para os genótipos UFRRJLA01, UFRRJLA02 e UFRRJLA11 (quimiotipo citral) e UFRRJLA17 (quimiotipo citral-mirceno) (Tabela 15).

**Tabela 15.** Valores médios de AL = altura de plantas (cm), NR = número de ramos, LC = largura copa (cm) e DC = diâmetro do caule (cm), em duas estações do ano (PRI = primavera e VER = verão). Seropédica –RJ.

Genótipos	AL		NR		LC		DC	
	PRI	VER	PRI	VER	PRI	VER	PRI	VER
UFRRJLA1	1,94 aA	1,66 aB	23,88 aA	28,23 bA	1,42 bB	2,39 bA	3,56 bA	3,23 aA
UFRRJLA2	1,86 aA	1,62 aB	24,77 aA	27,20bA	1,46bB	2,60 aA	3,50 bA	3,39 aA
UFRRJLA3	1,83 aA	1,57 aB	17,33 cB	29,12 bA	1,29 bB	2,20 bA	2,96 bA	2,93 bA
UFRRJLA4	1,64 bA	1,58 aA	10,33 cA	13,66 dA	1,20 bB	2,55 aA	2,41 bA	2,39 bA
UFRRJLA5	1,96 aA	1,63 aB	24,66 aB	30,00 bA	1,63 aA	1,67 cA	3,09 bA	3,05 aA
UFRRJLA6	1,77 bA	1,46 aB	23,33 aA	23,97 cA	1,50 aA	1,75 cA	3,16 bA	3,03 aA
UFRRJLA7	1,67 bA	1,33 bB	12,33 cA	15,26 dA	1,23 bB	1,91 cA	2,68 bA	2,60 bA
UFRRJLA8	1,74 bA	1,43 bB	12,89 cB	23,21 cA	1,41 bB	2,59 aA	2,38 bA	2,32 bA
UFRRJLA9	1,76 bA	1,33 bB	13,67 cB	18,40 dA	1,50 aB	2,32 bA	3,10 bA	3,03 aA
UFRRJLA10	1,94 aA	1,57 aB	22,44 aA	23,40 cA	1,76 aB	2,20 bA	2,91 bA	2,90 bA
UFRRJLA11	1,88 aA	1,44 bB	18,66 bA	21,65 cA	1,25 bB	2,73 aA	3,84 aA	3,52 aA
UFRRJLA12	1,74 bA	1,30 bB	13,00 cB	22,21 cA	1,20 bB	2,47 bA	2,44 bA	2,41 bA
UFRRJLA13	1,59 bA	1,16 bB	20,33 bA	22,00 cA	1,76 aB	2,78 aA	2,76 bA	2,75 bA
UFRRJLA14	1,74 bA	1,53 aB	20,77 bA	24,79 cA	1,56 aB	2,41 bA	2,75 bA	2,67 bA
UFRRJLA15	1,82 aA	1,44 bB	19,66 bB	38,22 aB	1,62aB	2,91 aA	2,74 bA	2,70 bA
UFRRJLA16	1,65 bA	1,36 bB	16,55 cB	28,04 bA	1,54 aB	2,29 bA	2,63 bA	2,58 bA
UFRRJLA17	1,66 bA	1,36 bB	13,23 cA	14,60 dA	1,34 bB	2,25 bA	4,04 aA	3,98 aA
UFRRJLA18	1,67 bA	1,47 aB	12,22 cA	14,38 dA	1,40 bA	1,38 dA	2,16 bA	2,13 bA
UFRRJLA19	1,86 aA	1,36 bB	14,55 cB	29,26 bA	1,53 aB	2,30 bA	2,53 bA	2,62 bA
UFRRJLA20	1,68 bA	1,23 bB	14,00 cB	37,00 aA	1,72 aA	1,94 cA	2,66 bA	2,77bA

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, nas colunas, e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Blank et al. (2004) ao caracterizar acessos de *Ocimum* sp., observaram altura de plantas diferentes no anos agrícolas, sendo que no ano de 2005/06 as alturas foram maiores, confirmando que houve influência das variações ambientais. Dentro dos anos, verificou-se diferenças entre as populações, indicando a presença de variabilidade entre elas.

As variáveis número de folhas (NF) e a relação número de folhas por número de ramos (NF/NR) apresentaram os maiores valores médios nas duas épocas avaliadas para os genótipos UFRRJLA03 e UFRRJLA08 (limoneno-carvona) (Tabela 16).

**Tabela 16.** Valores médios de NER (número de entre nós por ramo), NF (número de folhas), NF/NR (razão número de folhas por número de ramos), em duas estações do ano (PRI = primavera e VER = verão). Seropédica –RJ.

Genótipos	NER		NF		NF/NR	
	PRI	VER	PRI	VER	PRI	VER
UFRRJLA1	19,11 bB	31,10 aA	69,22 dA	81,20 bA	2,95 cA	2,89 cA
UFRRJLA2	18,66 bB	29,82 bA	75,77 dA	58,20 bA	3,07 cA	2,15 cA
UFRRJLA3	25,11 aB	34,40 aA	212,89 aB	249,00 aA	12,28 aA	8,56 aB
UFRRJLA4	13,06 bB	22,66 cA	73,44 dA	26,66 cB	7,12 bA	1,94 cB
UFRRJLA5	24,11 aB	33,47 aA	113,33 cA	74,33 bB	4,59 cA	2,47 cA
UFRRJLA6	21,22 bB	26,66 bA	73,22 dA	32,80 bB	3,33 cA	1,37 cA
UFRRJLA7	19,89 bB	32,93 aA	153,77 bA	72,33 bB	12,35 aA	4,75 bB
UFRRJLA8	25,77 aB	32,66 aA	172,77 bA	126,81 bB	13,56 aA	5,47 bB
UFRRJLA9	20,66 bB	30,90 aA	109,11 cA	47,77 bB	8,17 bA	2,60 cB
UFRRJLA10	19,22 bB	30,44 aA	89,22 dA	41,18 bB	4,22 cA	1,80 cB
UFRRJLA11	16,66 bB	28,29 bA	82,67 dA	43,66 bB	4,51 cA	2,01 cB
UFRRJLA12	16,66 bB	37,00 aA	85,44 dA	43,81 bB	6,96 bA	1,99 cB
UFRRJLA13	24,89 aB	32,89 aA	122,55 bA	54,59 bB	6,18 bA	2,45 cB
UFRRJLA14	21,00 bB	32,89 aA	71,66 dA	54,80 bB	3,49 cA	2,21 cA
UFRRJLA15	18,33 bB	37,89 aA	87,44 dA	40,83 bB	4,53 cA	1,07 cB
UFRRJLA16	19,11 bB	29,29 bA	95,44 dA	37,25 bB	5,93 bA	1,33 cB
UFRRJLA17	17,66 bB	25,41 cA	71,11 dA	22,66 cB	5,39 cA	1,56 cB
UFRRJLA18	19,55 bB	27,45 bA	87,22 dA	26,36 cB	7,22 bA	1,83 cB
UFRRJLA19	19,00 bB	33,00 aA	114,77 cA	45,66 bB	8,17 bA	1,57 cB
UFRRJLA20	19,11 bB	33,93 aA	109,11 cA	33,66 bB	8,02 bA	0,91 cB

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, nas colunas, e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Para variável número de folhas (NF) apenas o genótipo UFRRJLA03 foi inferior na primavera com 213 folhas, quando comparado ao verão com 249 folhas. Cabe ainda destacar que este genótipo superior aos demais, independente da estação do ano.

No verão, apesar do menor número de folhas totais as plantas emitiram maior número de folhas jovens independente do quimiotipo. Castro (2001), estudando a produção de biomassa, rendimento e composição química dos óleos essenciais de *L. alba* em diferentes épocas do ano, concluiu que folhas em estágio inicial de desenvolvimento produzem mais óleo quando comparadas com folhas mais velhas.

Na tabela 17, é possível observar a produção média de vinte genótipos de *L. alba* a partir das variáveis massa fresca de ramos (kg pl<sup>-1</sup>) e massa fresca de folhas (kg pl<sup>-1</sup>) na primavera e no verão. As produções de massa fresca foliar foram superiores para maiores dos genótipos cultivados no verão, com exceção para UFRRJLA04 (quimiotipo linalol), UFRRJ06 (Mirceno-citral) e UFRRJLA07 (Limoneno-carvona).

**Tabela 17.** Valores médios de MFR = massa fresca de ramos (kg pl<sup>-1</sup>) e MFFO = massa fresca de folhas (kg pl<sup>-1</sup>) em duas estações do ano (PRI = primavera e VER = verão). Seropédica –RJ.

Genótipos	MFR		MFFO	
	PRI	VER	PRI	VER
UFRRJLA1	0,607 bB	0,906 cA	0,350 aB	2,904 cA
UFRRJLA2	0,723 aB	1,189 aA	0,457 aB	3,212 bA
UFRRJLA3	0,606 bA	0,890 cA	0,376 aB	2,096 eA
UFRRJLA4	0,206 cA	0,357 eA	0,151 aA	0,070 hB
UFRRJLA5	0,925 aB	1,234 aA	0,554 aB	2,511 dA
UFRRJLA6	0,742 aA	0,798 cA	0,300 aA	0,090 hB
UFRRJLA7	0,421 cA	0,308 eA	0,227 aA	0,047 hB
UFRRJLA8	0,444 cB	0,794 cA	0,376 aB	1,970 eA
UFRRJLA9	0,420 cA	0,549 dA	0,264 aB	1,051 gA
UFRRJLA10	0,737 aA	0,815 cA	0,405 aB	1,430 eA
UFRRJLA11	0,563 bB	1,044 bA	0,366 aB	2,636 cA
UFRRJLA12	0,406 cB	0,653 dA	0,193 aB	1,151 gA
UFRRJLA13	0,570 bB	1,292 aA	0,449 aB	3,728 aA
UFRRJLA14	0,518 bB	0,926 cA	0,338 aB	1,894 eA
UFRRJLA15	0,579 bB	1,039 bA	0,350 aB	2,433 dA
UFRRJLA16	0,536 bA	0,748 cA	0,338 aB	0,099 hA
UFRRJLA17	0,487 bA	0,494 dA	0,269 aA	0,066 hA
UFRRJLA18	0,387 cA	0,252 eA	0,317 aA	0,052 hA
UFRRJLA19	0,534 bB	0,953 cA	0,469 aB	1,965 eA
UFRRJLA20	0,588 bB	1,065 bA	0,349 aB	1,430 fA

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, nas colunas, e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

A massa fresca de ramos no verão foi superior para todos os genótipos, quando comparado com os valores médios obtidos na primavera para esta variável. No verão, os genótipos que apresentaram maior peso de ramos foram UFRRJLA02 e UFRRJLA05 (quimiotipo citral) e UFRRJLA13 (quimiotipo  $\beta$ -cariofileno- $\beta$ -mirceno).

Por outro lado, a variável massa fresca de folhas revelou o genótipo UFRRJLA13 superior aos demais (3,728 kg pl<sup>-1</sup>) quando efetuada a colheita no verão e superior à média geral dos genótipos 1,541 (kg pl<sup>-1</sup>). Sendo a média geral obtida neste estudo inferior à média de dezesseis acessos de *L. alba* cultivados no Distrito Federal (2,045 kg pl<sup>-1</sup>) (JANNUZZI et al., 2010).

Yamamoto (2006) ao avaliar a matéria fresca de folhas de dez genótipos de *L. alba* cultivados em Monte Alegre do Sul – SP e Pindorama – SP, observou que não houve diferença significativa entre estes genótipos pela análise de variância, apesar de as locais possuírem climas e tipos de solos diferentes.

Já segundo Ehlert (2003) as maiores produções de matéria fresca foliar de *L. alba* foi de 3,5 e 4,2 t ha<sup>-1</sup>, nos plantios de primavera e verão, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. Castro (2001) trabalhando com a mesma espécie em colheitas nas diferentes épocas do ano, em São Manoel – SP, encontrou as maiores produções de folhas no verão (193,6 g planta<sup>-1</sup>) e na primavera (158,1 g planta<sup>-1</sup>), e menores no outono (136,2 g planta<sup>-1</sup>) e inverno (100,1 g planta<sup>-1</sup>).

Na tabela 18 é possível observar efeito significativo para todas as variáveis produtivas nas estações da primavera e do verão, com destaque para a produtividade de 1.427,91 kg ha<sup>-1</sup> do genótipo UFRRJLA05 (quimiotipo citral) na primavera. Sendo que no verão foram superiores aos demais os genótipos UFRRJLA01, UFRRJLA02, UFRRJLA05, UFRRJLA11 e UFRRJLA15 (quimiotipo citral), e UFRRJLA13 (quimiotipo β-cariofileno-β-mirceno).

**Tabela 18.** Valores médios de MSR = massa seca de ramos (kg pl<sup>-1</sup>), MSFO = massa seca de folhas (kg pl<sup>-1</sup>), MSTPA = massa seca total (kg pl<sup>-1</sup>) e PROD = produtividade (kg ha<sup>-1</sup>), em duas estações do ano (PRI = primavera e VER = verão). Seropédica –RJ.

Genótipos	MSR		MSFO		MST		PROD	
	PRI	VER	PRI	VER	PRI	VER	PRI	VER
UFRRJLA1	0,226 aB	0,451cA	0,091 cB	0,125 aA	0,317 bB	0,577 cA	754,12 cB	1.037,02 aA
UFRRJLA2	0,231 aB	0,550 bA	0,124 bA	0,199 aA	0,355 bB	0,606 bA	1.022,99 bA	963,62 aA
UFRRJLA3	0,155 bB	0,451 cA	0,082 cA	0,091 bA	0,241 cB	0,543 cA	712,43 cA	757,32 bA
UFRRJLA4	0,049 bB	0,123 eA	0,038 dA	0,032 cA	0,088 cB	0,155 eA	317,19 dA	265,79 cA
UFRRJLA5	0,311 aB	0,798 aA	0,173 aA	0,114 aB	0,484 aB	0,912 aA	1.427,91 aA	948,64 aB
UFRRJLA6	0,249 aB	0,413 cA	0,132 bA	0,039 cB	0,381 aA	0,453 cA	1.090,51 bA	328,24 cB
UFRRJLA7	0,148 bA	0,141 eA	0,054 dA	0,021 cA	0,202 cA	0,163 eA	451,87 dA	179,88 cA
UFRRJLA8	0,154 bB	0,353 cA	0,090 cA	0,072 bA	0,245 cB	0,426 cA	745,34 cA	600,87 bA
UFRRJLA9	0,144 bA	0,246 dA	0,055 dA	0,044 cA	0,200 cA	0,291 dA	458,78 dA	368,33 cA
UFRRJLA10	0,200 aB	0,332 dA	0,090 cA	0,084 bA	0,291 bA	0,417 cA	745,22 cA	700,01 bA
UFRRJLA11	0,155 bB	0,384 cA	0,072 cA	0,106 aA	0,228 cB	0,490 cA	599,98 cA	874,66 aA
UFRRJLA12	0,119 bB	0,253 dA	0,050 dA	0,049 cA	0,169 cB	0,302 dA	412,34 dA	407,47 cA
UFRRJLA13	0,182 bB	0,548 bA	0,120 bA	0,120 aA	0,303 bB	0,481 cA	996,55 bA	995,52 aA
UFRRJLA14	0,159 bB	0,406 cA	0,082 cA	0,074 bA	0,242 cB	0,699 bA	681,56 cA	618,45 bA
UFRRJLA15	0,178 bB	0,435 cA	0,097 cA	0,103 aA	0,275 bB	0,538 cA	803,43 cA	850,46 aA
UFRRJLA16	0,175 bB	0,480 cA	0,102 cA	0,043 cB	0,277 bB	0,524 cA	845,55 cA	361,76 cB
UFRRJLA17	0,138 bB	0,233 dA	0,076 cA	0,033 cB	0,214 cA	0,266 dA	630,77 cA	276,26 cB
UFRRJLA18	0,111 bA	0,166 eA	0,077 cA	0,027 cB	0,189 cA	0,143 eA	642,11 cA	225,88 cB
UFRRJLA19	0,142 bB	0,436 cA	0,124 bA	0,079 bB	0,267 bB	0,516 cA	1.025,72 bA	657,99 bB
UFRRJLA20	0,193 aB	0,518 bA	0,097 cA	0,063 cB	0,290 bB	0,582 cA	802,23 cA	521,51 cB

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, nas colunas, e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).



Com relação ao teor e o rendimento de óleo essencial (Tabela 19) as médias gerais indicam similaridade entre as estações do ano, com exceção para alguns genótipos. Os genótipos UFRRJLA03 (limoneno-carvona) e UFRRJLA04 (linalol) apresentaram os maiores teores nas duas estações do ano avaliadas. No entanto, apenas o genótipo UFRRJLA03 manteve rendimento superior aos demais, isto ocorreu pelo fato deste genótipo manter um excelente padrão de produção de massa seca de folhas.

**Tabela 19.** Valores médios de TE = teor (%) e ROE = rendimento do óleo essencial (ml p<sup>l</sup><sup>-1</sup>), em duas estações do ano (PRI = primavera e VER = verão). Seropédica –RJ.

Genótipos	TE		ROE	
	PRI	VER	PRI	VER
UFRRJLA1	0,26 dA	0,29 cA	0,24 dA	0,37 cA
UFRRJLA2	0,27 dA	0,29 cA	0,34 cA	0,34 cA
UFRRJLA3	0,85 aB	1,05 aA	0,74 aB	0,96 aA
UFRRJLA4	0,88 aA	0,91 aA	0,34 cA	0,29 cA
UFRRJLA5	0,26 dA	0,37 bA	0,46 bA	0,43 cA
UFRRJLA6	0,25 dA	0,38 bA	0,36 cA	0,15 dB
UFRRJLA7	0,50 cA	0,31 cB	0,28 cA	0,07 dB
UFRRJLA8	0,65 bB	1,05 aA	0,58 aA	0,77 bA
UFRRJLA9	0,23 dA	0,28 cA	0,12 dA	0,12 dA
UFRRJLA10	0,44 cA	0,44 bA	0,40 bA	0,37 cA
UFRRJLA11	0,31 dA	0,47 bA	0,23 dB	0,50 cA
UFRRJLA12	0,19 dA	0,23 cA	0,10 dA	0,14 dA
UFRRJLA13	0,12 dA	0,24 cA	0,15 dA	0,29 cA
UFRRJLA14	0,22 dA	0,29 cA	0,18 dA	0,23 dA
UFRRJLA15	0,33 dA	0,41 bA	0,34 cA	0,43 cA
UFRRJLA16	0,22 dA	0,36 bA	0,23 dA	0,16 dA
UFRRJLA17	0,23 dA	0,37 bA	0,17 dA	0,12 dA
UFRRJLA18	0,40 cA	0,47 bA	0,31 cA	0,13 dA
UFRRJLA19	0,30 dA	0,42 bA	0,37 cA	0,34 cA
UFRRJLA20	0,40 cA	0,39 bA	0,42 bA	0,24 dA

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, nas colunas, e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Os genótipos UFRRJLA03 (limoneno-carvona) e UFRRJLA11 (cital) apresentaram menores médias de rendimento de óleo essencial na primavera e maiores no verão. Enquanto os genótipos UFRRJLA06 (micerno-cital) e UFRRJLA07 (limoneno-carvona) o rendimento médio de óleo essencial ocorreu na primavera e o contrário no verão.

#### 4.4 CONCLUSÕES

Há uma grande variabilidade genética entre os acessos para as características qualitativas, evidenciada pela diversidade de formas observada e entre os caracteres morfoagronômicos e produtivos, evidenciada pelos valores elevados do coeficiente de determinação ( $H^2$ ), e da relação  $CVg/CVe$ . Indicando haver oportunidade de seleção de plantas com boas condições de cultivo entre os clones estudados.

#### 4.7 REFERÊNCIAS

- AMARAL, U. do; SANTOS, M. G. dos. Melhoramento genético e aspectos fitotécnicos de erva-cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill) N.E.Br.]. **Agrarian Academy**, v.1, n. 2, p. 92-108. 2014.
- ARAÚJO, G. da S.; OSUNA, J. T. A.; PASSOS, A. R.; NASCIMENTO, M. N. do; SANTOS, K. S. dos. Estimativas dos parâmetros genéticos e correlações entre caracteres morfoagronômicos em progênies de *Ageratum conyzoides* L. **Magistra**, v. 26, n.4, p. 518 - 526, 2014.
- ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R.; CAMPOS, D. A.; SILVA, P. A.; ANTONIOLLI, A. R.; CAETANO, L. C.; SANT'ANA, A. E. G.; BLANK, A. F. Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 298-303, 2005.
- BLANK, A. F.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; SANTOS NETO, A. L.; ALVES, P. B.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjerição e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 113-116, 2004.
- BLANK, A.F.; SOUZA, E. M. de; PAULA, J. W. A. de; ALVES, P. B. Comportamento fenotípico e genotípico de populações de manjerição. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 305-310, 2010.
- CAMÊLO, L. C. A, BLANK, A. F.; EHLERT, P. A. D.; CARVALHO, C. R. D.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MATTOS, J. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de erva-cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1-8, 2011.
- CARVALHO, F. I. F.; SILVA, S. A.; KUREK, A. J.; MARCHIORO, V. S. Estimativas e implicações da herdabilidade como estratégia de seleção. Pelotas: Ed. Universitária UFPel, 2001.
- CASTRO, D. M. **Efeitos da variação sazonal, colheita selecionada e diferentes temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex. Britt e Wilson (Verbenaceae).** 2001. 132 f. Tese (Doutorado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES: estatística experimental e matrizes.** Viçosa, MG: UFV, 285 p. 2006.
- EHLERT, P. A. D. **Épocas de plantio, idades e horários de colheita na produção e qualidade do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., quimiotipo limoneno-carvona.** 2003. 108p. Tese (Doutorado - Área de Concentração em Horticultura) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu. 2003.

FERREIRA, M.E.; MORETZSOHN, M.C.; BUSO, G.S.C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (Ed.). Recursos genéticos vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. cap.11. p.375-430.

FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M.; ZANATTO, A. C. S.; MORAES, E. Pomar de sementes por mudas a partir da seleção dentro em teste de progênies de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Revista do Instituto Florestal**, v.19, n. 2, p. 65-72, 2007.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; SILVA, D. B.; GRACINDO, L. A. M.; VIEIRA, R. F. Avaliação agrônômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.3, p. 258-264, 2011.

LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; ALBERTO, E.; GAZIM, Z. C. Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del aceite essencial de *Lippia alba*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 191-200, 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Campinas: Instituto Plantarum, 2002. 511p.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2.ed. Fortaleza: UFC, 2000. 346p.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura brasileira**, v. 27, n. 2 (Suplemento - CD Rom), 2009.

OLIVEIRA, G. L. FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R.; COSTA, C. A. Enraizamento de estacas de *Lippia sidoides* Cham. utilizando diferentes tipos de estacas, substratos e concentrações do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.4, p.12-17, 2008.

PEREIRA PINTO, J. E. B.; SANTIAGO, E. J. A; LAMEIRA, O. **Compêndio de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE. 208 p. 2000.

RUFINO, E. R. **Estimativas de parâmetros genéticos e seleção de clones linalol em *Lippia alba***. Dissertação (Mestrado) – Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia, Campinas, São Paulo, 2008.

RUFINO, E. R. SIQUEIRA, W. J.; MARQUES, M. O. M.; COLOMBO, C. A.; CHIORATO, A. F.; AZEVEDO FILHO, J. A.; LOURENÇÃO, A. L.; YAMAMOTO, P. Y.; MARTINS, A. L. M. Estimativas de parâmetros genéticos de caracteres relacionados ao vigor de estacas em *Lippia alba*. **Bragantia**, v.69, n.4, p. 779-786, 2010.

SALIMENA-PIRES, F.R. *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae) do Brasil. In: Congresso latino-americano de Botânica, 7., México. Resumos... México: Sociedade Latino Americana de Botânica, 299 p. 1998.

SILVA, C. J. da. **Caracterização agronômica e divergência genética de acessos de cártamo**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, p. 51, 2013.

VENTRELLA, M. C. **Produção de folhas, óleo essencial e anatomia foliar quantitativa de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita**. Botucatu: UNESP, 2000. 84 p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2000.

YAMAMOTO, P. V. **Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Genética e Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Instituto Agrônomico, curso de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Campinas, São Paulo, 2006.