INSTITUTO AGRONÔMICO

PÓS-GRADUAÇÃO

DISSERTAÇÃO

INTERAÇÃO GENÓTIPO X AMBIENTE NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.

PAULA YURI YAMAMOTO

Campinas, SP
2006

INSTITUTO AGRONÔMICO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

INTERAÇÃO GENÓTIPO X AMBIENTE NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.

PAULA YURI YAMAMOTO

Orientador: Walter José Siqueira
Co-orientador: Carlos Augusto Colombo

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

Campinas, SP
Abril 2006

À Creo que, com todos seus
atributos de uma mãe fantástica e
seu amor infinito, me faz,
sempre, chegar até o final.
DEDICO

À evolução da ciência
e da tecnologia...
à sociedade.
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao meu extraordinário Orientador, pela boa vontade de aplicar sua indiscutível inteligência, experiência e bom senso no trabalho, e por todos os esforços para me profissionalizar. Por ter permitido crescer entre nós uma maravilhosa amizade...

- Ao meu pai, pelo apoio financeiro e à minha mãe, pela minha educação, disciplina e força de vontade. Ao meu sobrinho Gabi, pela compreensão que trabalho e brincadeira são duas coisas distintas.

- À experiência da grandiosa Rauly, pesquisadora disfarçada em técnica de laboratório.

- À toda equipe formada nesse trabalho: Carlos Augusto Colombo, Márcia Ortiz Mayo Marques, Guilherme Domingues da Silva Morais, André Luis Lourenção, Joaquim Adelino Azevedo Filho, Antônio Lúcio Mello Martins e Alisson Fernando Chiorato, pela competência e essencial colaboração que possibilitou a realização do projeto.

- Ao Instituto Agronômico; funcionários, pesquisadores e alunos que incentivam a pesquisa no país.

- À CAPES pelo fomento.

- À minha fantástica família, aos meus valiosos amigos e ao Divino Senhor, que sempre me acompanham nas alegrias e tristezas, mas que, principalmente, me trazem infinitamente o grande prazer de viver.

SUMÁRIO

RESUMO v
ABSTRACT vi
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Aspectos Gerais 3
2.2 A Espécie *Lippia alba* – Características e Aplicações 4
2.3 Interação Genótipo x Ambiente 7
2.4 Estabilidade e Adaptabilidade Fenotípica 8
2.5 Divergência Genética por Análises Multivariadas 10
2.5.1 Análise de agrupamento 10
2.5.2 Análise de componentes principais (ACP) 11
2.6 Marcadores Moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)..... 12
3 MATERIAL E MÉTODOS 14
3.1 Formação da Coleção de Trabalho (Germoplasma) 14
3.2 Seleção dos Genótipos 15
3.3 Instalação dos Experimentos 17
3.4 Características Fenotípicas Avaliadas 22
3.4.1 Massa de folha fresca (MFF) e massa de folha seca (MFS)..... 22
3.4.2 Rendimento (RED) e composição química do óleo (CQO) 22
3.4.3 Virose (VIR) 22
3.4.4 Altura de plantas (ALT) 24
3.5 Análises Estatísticas Univariadas 24
3.6 Análises Estatísticas Multivariadas 25
3.7 Análise Molecular com RAPD..... 26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 28
4.1 Análises Univariadas 28
4.1.1 Massa de folha fresca (MFF) 28
4.1.2 Massa de folha seca (MFS) 31
4.1.3 Rendimento de óleo essencial (RED) 34
4.1.4 Composição química dos óleos (CQO) 38
4.1.4.1 Contaminação genotípica dentro de parcelas..... 44
4.1.5 Altura de plantas (ALT) 45
4.1.6 Virose (VIR) 46
4.1.7 Análise dentro do quimiotipo linalol..... 48
4.1.8 Efeito geral de adubação e irrigação 50
4.2 Análises Multivariadas 51
4.2.1 Análise de agrupamento 51
4.2.2 Análise de componentes principais (ACP) 55
4.2.3 Análise com marcadores RAPD..... 60
5 CONCLUSÕES 63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 65

YAMAMOTO, Paula Yuri. **Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) - Pós-Graduação - IAC.

RESUMO

A *Lippia alba* (Verbenaceae) é um arbusto nativo bastante rústico e vigoroso. Seu potencial econômico gira em torno do óleo essencial produzido principalmente pelas folhas, o qual é formado por terpenos que apresentam importantes atividades biológicas, farmacológicas e aromatizantes. Como a produção do óleo é diretamente influenciada pelo genótipo e pelo ambiente de cultivo, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a magnitude do efeito de genótipo (G), de experimentos (E) (ambientes diferenciados) e da interação GxE na produção e composição do óleo, assim como estabelecer a divergência genética do material estudado. Vinte genótipos pertencentes a cinco diferentes quimiotipos (linalol, mirceno/cânfora, limoneno/carvona, citral e mirceno) foram avaliados em um total de seis experimentos, para seis características fenotípicas: massa de folha fresca (MFF) e seca (MFS), rendimento de óleo essencial (RED), altura de plantas (ALT), composição química do óleo (CQO) e virose (VIR) (*Cucumber Mosaic Vírus,* CMV). Essas características foram também utilizadas para quantificar a divergência genética dos genótipos, bem como por marcadores moleculares do tipo RAPD. O efeito de G e de E, assim como a interação GxE, foram altamente significativas (5%) para MFF e MFS. RED apresentou um forte efeito de G, resultando em uma classificação dos genótipos de acordo com os quimiotipos, sendo que o linalol e limoneno/carvona foram estatisticamente superiores (1,16-1,28%, a partir de folhas secas) aos demais. Não foi observada variação qualitativa para CQO e, mesmo quantitativamente, as magnitudes de variação foram baixas. Isso sugere que os compostos majoritários devem ser determinados geneticamente, e portanto, as variações observadas devem-se preferencialmente ao efeito ambiental (experimento) e à interação GxE. Em consequência do tipo de hábito de crescimento ser bem definido para cada quimiotipo, a avaliação de ALT não foi discriminatória. Na avaliação de VIR (notas 1-5), os genótipos do quimiotipo linalol foram resistentes ao referido patógeno. Em geral, os quimiotipos foram contrastantes para todas as características avaliadas, sendo que dentro de quimiotipos os contrastes foram bem menores. Esses resultados foram conferidos posteriormente pela distância genética estabelecida dentro e entre os quimiotipos, através das análises multivariadas. A análise de componentes principais e de agrupamento foram realizadas a partir da avaliação fenotípica das diversas características, resultando no agrupamento dos indivíduos de acordo com a composição química. Os mesmos agrupamentos foram observados com a análise genotípica (molecular), sugerindo uma alta robustez dos resultados obtidos. O estabelecimento das distâncias genéticas entre os indivíduos pode auxiliar futuros programas de melhoramento dessa espécie. Juntamente com a análise de estabilidade e adaptabilidade para MFS, foi possível elencar os melhores genótipos para produção de óleos essenciais.

Palavras-chave: estabilidade fenotípica, seleção clonal, divergência genética, RAPD.

YAMAMOTO, Paula Yuri. **Genotype-environment interaction on essential oil production and composition of *Lippia alba*. (Mill.) N. E. Br.** 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) - Pós-Graduação - IAC.

ABSTRACT

Lippia alba (Verbenaceae) is a very rustic and vigorous brazilian shrub. The economic importance of this plant is about the essential oil that is produced mostly by the leaves, and is formed by terpens that show important biological, pharmacological and aromatic activities. As the oil production is directly influenced by the genotype and by the environment where the plant is cultivated, the objective of this work was to evaluate the magnitude of the genotype effect (G), experiment effect (E) (different environments), and the magnitude of GxE interaction on the oil production and composition, as well as to estabilish the genetic divergence between the individuals of this study. Twenty genotypes of five different chemotypes (linalool, myrcene/camphor, limonene/carvone, citral and myrcene) were evaluated on six experiments for six phenotypical traits: fresh leaf matter (FM), dry leaf matter (DM), oil yield (OY), plant height (PH), oil chemical composition (CC) and viral symptoms (VS) (*Cucumber Mosaic Virus* or CMV). These results were also employed to assess the genetic divergence of the genotypes, along with RAPD molecular analysis. The G and E effects, as well as the GxE interaction, were clearly significant (5%) for FM and DM. OY has shown a strong genetic effect, resulting in a genotype classification according to the chemotypes, in which linalool and limonene/carvone were statistically superior (1,16-1,28%) than the others. Qualitative variation was not observed for CC and the magnitude of quantitative variation was small. It suggests that the major compounds are probably geneticaly determined, while these quantitative variation could be a response to the environmental (experiment) effect and due to GxE interaction. The evaluation of PH was not very efficient because the plant growth habit is determined for each chemotype. For VS (scale 1-5), linalool chemotype is resistant. In general, the chemotypes were contrasting for all traits evaluated, but inside chemotypes these contrasts were not so strong. These results were confirmed later through the genetic distance estabilished inside and between chemotypes, using the multivariate analysis. The clustering analysis and the principal component analysis were based on the phenotypical evaluation, resulting on clusters according to the chemical composition. The same clusters were obtained with the molecular analysis, suggesting strenght of these results. The genetic divergence estabilished can help future breeding programmes. Considering the stability and adaptability analysis for DM, it was possible to chose the best genotypes for oil production.

Key-words: phenotypic stability, clonal selection, genetic divergence, RAPD.

1 INTRODUÇÃO

A *Lippia alba* é um arbusto da família Verbenaceae bastante utilizado na medicina popular. As atividades farmacológicas (antiespasmódica, estomáquica e calmante) dos seus óleos essenciais despertaram o interesse de pesquisadores para estabelecer cientificamente seus efeitos, o que resultou na detecção de outras propriedades importantes, como as biológicas e aromáticas. Hoje ela é uma planta promissora para as indústrias farmacêutica, de aromas e perfumaria, além de indicar uma possível aplicação em indústrias de defensivos, de acordo com suas atividades fungitóxica, inseticida e repelente que estão sendo comprovadas cientificamente.

Seu interesse deve-se não só às substâncias responsáveis por tais atividades, mas também ao potencial agronômico que a *L. alba* apresenta. Seu desenvolvimento é bastante rápido e agressivo e o hábito decumbente de alguns quimiotipos propicia que os ramos que entram em contato com o solo se enraizem e se desenvolvam em uma nova planta. Ela floresce o ano todo e as inflorescências geram inúmeros frutos esquizocárpicos. É uma planta alógama auto-incompatível e em geral bastante vigorosa. Outra característica que valoriza seu aspecto agronômico é a rusticidade, sendo capaz de se desenvolver em condições de solo pouco fértil e com escassez de água, além da facilidade de propagação vegetativa por estaquia.

O óleo essencial é produzido principalmente pelas folhas a partir do metabolismo secundário das plantas, de acordo com a sua constituição genética e em resposta aos fatores ambientais de onde é cultivada. A produção comercial de óleos depende essencialmente de três fatores: da produção de biomassa, do rendimento de óleo e da sua composição química, os quais são frequentemente relatados na literatura como características bastante variáveis. A ocorrência de instabilidade na produção e na composição dos óleos resulta em dificuldade na implantação de agroindústrias e gera novos desafios aos melhoristas.

A composição (qualitativa e quantitativa) dos óleos é utilizada como forma de agrupamento de genótipos semelhantes dentro da espécie. A(s) substância(s) presente(s) em maior proporção relativa define o nome do grupo, que passa a ser chamado de quimiotipo. Elas são, em sua quase totalidade, terpenos (hidrocarbonetos) e são classificadas de acordo com o número de carbonos presente na molécula. As substâncias mais importantes e mais freqüentemente relatadas nessa espécie são o linalol, citral (neral e geranial), limoneno, carvona, cariofileno, β-mirceno, cânfora, 1,8-cineol e

germacreno.

O mercado internacional de óleos essenciais corresponde atualmente a US$1,8 bilhões, sendo que a participação do Brasil nesse montante é estimada em apenas 0,1%, principalmente em resposta à exportação de óleos de laranja, limão, eucalipto, pau-rosa, pinus, lima e alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*). As comunidades científicas estão cada vez mais organizadas e diversos novos óleos podem contribuir para o quadro de exportação. Conseqüentemente, agricultores e novos investidores estão atentos na busca de informações, pois como é comum para grande parte das espécies nativas, os estudos com a *L. alba* ainda são limitados. A maioria dos estudos é da área farmacológica, e informações sobre aspectos agronômicos, por exemplo, ainda não são encontradas na literatura, dificultando o uso agrícola dessa espécie. Além disso, há uma grande necessidade de promover a auto-sustentabilidade dos produtos que são de interesse nacional e preservar a imensa biodiversidade desse país.

Considerando a variação fenotípica relacionada à produção de óleos e a tendência de mercado da *L. alba*, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a magnitude do efeito de genótipo (G), de ambiente (A) e da interação GxA na produção e composição de óleos essenciais, a partir da avaliação de diversas características em diferentes experimentos, e quantificar a divergência genética do material estudado. Para tanto, as metas estabelecidas foram:

a) formar uma coleção de trabalho com genótipos de diferentes quimiotipos;
b) selecionar os genótipos para o estudo;
c) instalar os experimentos em várias condições de ambiente;
d) avaliar e analisar estatisticamente características fenotípicas relativas à parte aérea e fitoquímica;
e) analisar a estabilidade e adaptabilidade fenotípica dos genótipos em vários experimentos (ou ambientes);
f) analisar o polimorfismo genético com marcador molecular do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*);
g) estabelecer a divergência genética dos genótipos estudados com base nas avaliações fenotípicas e genotípica (RAPD);
h) formar agrupamentos com base na dissimilaridade genética, e;
i) fornecer subsídios ao melhorista para seleção em programas de melhoramento genético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Gerais

Desde as primeiras civilizações, as plantas com propriedades medicinais são utilizadas como fitoterápicos. A simples observação dos recursos naturais com propriedades terapêuticas deu início aos estudos e aplicações mais efetivas para a população, principalmente a partir do século XVIII, com o surgimento de ciências agregadas. Nos últimos anos, vem sendo observado um aumento acentuado do uso dessas plantas pela população em todo o mundo (MARTINS et al., 1995), e segundo GRÜNWALD (1997), a tendência é de contínuo crescimento. A busca atual refere-se ao esclarecimento sobre os diversos efeitos possíveis dessas substâncias, assim como o potencial de outras ainda não catalogadas, visando indústrias de cosméticos, farmacêutica e perfumaria, além de buscar a qualidade e o acesso no uso popular.

A vasta diversidade climática e de solo do Brasil faz com que ele seja o país detentor da maior biodiversidade mundial, com cerca de 55.000 espécies vegetais catalogadas (VIEIRA, 1999). Apesar de grande parte dessas espécies ser plantas com propriedades terapêuticas e/ou aromáticas, apenas uma pequena proporção delas já foi explorada (BARRACA, 1999). Em 1988, a CIPLAN (Comissão Internacional de Planejamento e Coordenação) implantou a fitoterapia nos serviços da saúde como prática oficial da medicina e orientou as Comissões Institucionais da Saúde (CIS) a os incluírem no SUS (Sistema Único de Saúde) (SCHEFFER et al., 1999).

Por outro lado, há uma grande necessidade do auxílio do poder público para o estudo e preservação das espécies nativas, uma vez que o mundo inteiro apresenta essa preocupação e grande parte das patentes pertence a governos estrangeiros (MARTINS et al., 1995). Além disso, as condições sócio-culturais do Brasil são absolutamente favoráveis para o uso dessas plantas como medicamentos, considerando a cultura popular de tratamentos com plantas medicinais e a baixa renda per capta, além da medicina alternativa com fitoterápicos e homeopatia estarem plenamente estabelecidas no país.

O setor fitoterápico movimenta cerca de R$1 bilhão por ano, sendo que no Brasil o comércio de fitomedicamentos corresponde a 6% do faturamento de medicamentos e envolveu R$400 milhões só em 2004 (DE LA CRUZ, 2005). Apesar das estatísticas divulgadas serem pouco descritivas e imprecisas para o comércio referente a plantas medicinais, ainda é possível notar com clareza a importância desses

produtos para o Brasil, principalmente quando com valor agregado.

O preço relativamente elevado dos produtos gerados com base em plantas aromáticas e medicinais desperta o interesse dos agricultores e novos investidores de forma crescente. Entretanto, os mesmos encontram dificuldades para definir a espécie, formas de manejo, épocas de plantio, colheita, etc. Assim, a demanda por pesquisas fitotécnicas e de melhoramento das principais espécies aromáticas torna-se de caráter fundamental para que seja possível a exploração racional e sustentada dessa riqueza natural que o país possui.

Existem diversos bancos brasileiros de germoplasma de espécies nativas e exóticas, sendo que as maiores coleções pertencem à EMBRAPA/CENARGEM, CPQBA/UNICAMP e Universidade do Ceará. Entre as espécies nativas mais importantes pode ser citado o mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.), a carqueja (*Baccharis trimera* DC.), a copaíba (*Copaifera longsdorffi* Desf.), a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss. e *M. aquifolium* Mart.), o ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata* Martius), o jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf.), o pau-rosa (*Aniba roseodora* Ducke) e o alecrim-pimenta (*Lippia* spp.) (VIEIRA, 1999). Para o gênero *Lippia* já foram relatadas 200 espécies (TRONCOSO, 1974) distribuídas em três centros de diversidade, sendo o Brasil o maior deles, com 70-75% das espécies (SALIMENA, 2000).

2.2 A Espécie *Lippia alba* - Características e Aplicações

A *Lippia alba* (Verbenacea) é um arbusto medicinal e aromático muito ramificado de ampla distribuição no Brasil e em outros países da América do Sul, de onde é originária (MARTINS et al., 1995). Hoje, seu cultivo abrange também a América Central, Flórida, (PASCUAL et al., 2001b) e oeste da Índia (TUCKER & MACIARELLO, 1999). Com uma altura máxima registrada de 2m de altura (SALIMENA, 2000), a *L. alba* pode ser encontrada em solos arenosos e nas margens dos rios, açudes, lagos e lagoas, desde regiões com clima tropical até temperado (CORREA et al., 1994; STEFANINI et al., 2002), caracterizando a alta plasticidade fenotípica dessa espécie (BRADSHAW, 1965; VALE, 1999). Sua forma predominante de reprodução é por alogamia, e segundo CORRÊA (1992) pode florescer o ano todo, gerando frutos do tipo esquizocárpico formados por dois mericarpos.

Alguns autores consideram que a especiação da *L. alba* pode explicar a

diferença no número de cromossomos encontrada dentro da espécie (TAVARES et al., 2003), porém BRANDÃO (2003) constatou que esta é uma espécie diplóide 2n=30. A semelhança nos aspectos morfológicos entre plantas de diferentes gêneros da família resulta em dificuldades na classificação taxonômica.

Popularmente, a *L. alba* é conhecida como erva cidreira do campo, alecrim do campo, cidreira brava, falsa melissa, erva cidreira brasileira, entre outros (MARTINS et al., 1995). É comumente confundida com a verdadeira erva cidreira (melissa), a *Melissa officinalis* (JULIÃO et al., 2001). Isso ocorre devido à presença de substâncias como o citral e o citronelal, as quais conferem o odor cítrico característico da melissa e de algumas plantas da falsa melissa. Na comunidade científica, as diversas sinonímias que são conferidas à *L. alba* (Mill.) N. E. Brown também causam confusão, e segundo a revisão de PASCUAL et al. (2001b), ela pode receber o nome de *L. germinata*, *L. microphylla* Griseb, *L. germinata* H.B.K, *L. globiflora* Kuntze, *L. lantanoides* Coult, *Lantana alba* Mill e *Phyla germinata* H.B.K.

As substâncias responsáveis pelas propriedades aromática e terapêutica são secretadas pelos tricomas glandulares e pelas células do parênquima clorofiliano em forma de óleo (CASTRO, 2001). São compostos voláteis extraídos de matéria seca ou fresca através de hidrodestilação, arraste a vapor ou fluidos supercríticos (FRANÇA, 2005). Apresentam um aroma forte, quase sempre agradável, são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos.

O óleo essencial é produzido principalmente pelas folhas, durante o desenvolvimento da planta e em resposta a estresses ambientais. Assim, a produção desses metabólitos secundários depende não só de estímulos externos, mas também da constituição genética da planta. Dessa forma, cada planta apresenta um conjunto de substâncias (*bouquet*), sendo que aquelas em maior proporção relativa no óleo definem seu grupo químico (quimiotipo). Essa forma de classificação conforme a(s) substância(s) majoritária(s) é bastante comum na área fitoquímica.

Os óleos essenciais são compostos principalmente por mono e sesquiterpenos (GOMES et al., 1993; MATTOS, 2000). Em *L. alba*, os terpenos que ocorrem com maior frequência são o linalol, 1,8-cineol, carvona, limoneno, β-mirceno, cariofileno, cânfora, germacreno e citral (MATOS et al., 1996; JULIÃO et al., 2001), apesar de dezenas de outras substâncias já terem sido relatadas na literatura para essa espécie.

A *L. alba* vem se tornando uma das plantas medicinais mais utilizadas de forma efetiva pela fitoterapia, sendo que seu uso popular para fins terapêuticos ainda é uma

das suas maiores aplicações. As folhas são utilizadas pela população na forma de infuso, tintura, banhos, cataplasmas e inalação. Sua aplicação inclui tratamento de desordens gastrointestinais (HEINRICH et al., 1992), doenças respiratórias pela atividade antibacteriana (CÁCERES et al., 1991; ALEA et al., 1997), problemas hepáticos e gastrite (PASCUAL et al., 2001a), e intoxicações em geral (DI STASI et al., 1989). Seus óleos essenciais apresentam também atividade analgésica (COSTA et al., 1989; VIANA et al., 1998), anti-inflamatória (SLOWING BARRILAS, 1992; VIANA et al., 1998; DO VALE et al., 2002), anticonvulsante (VIANA et al., 2000), antiviral (ABAD et al., 1997) e uma forte propriedade calmante (DO VALE et al., 2002; ZETOLA et al., 2002).

Alguns grupos de pesquisa vêm demonstrando a atividade fungitóxica da *L. alba* para o controle de doenças fitopatogênicas, normalmente a partir de extratos foliares. RAO et al. (2000) relataram a superioridade do seu efeito em relação a fungicidas comerciais em cana-de-açúcar e sugeriram a possibilidade da aplicação dessa espécie como defensivo agrícola. Outros estudos revelam sua ação sobre o fungo de solo *Rhizoctonia solani*, que atinge diversas culturas, como feijão e soja (DUBEY et al., 1983; KISHORE & MISHRA, 1991). O efeito fungitóxico da *L. alba* foi promissor para diversas outras culturas, com ação eficiente sobre o causador da podridão seca do colmo, *Macrophomina phaseolina* (DWIVEDI & KISHORE, 1990) e da antracnose foliar, *Colletotrichum gloeosporioides* (SANTOS, 1996). SCHWAN-ESTRADA et al. (2000) citam o potencial de diferentes plantas medicinais, inclusive a *L. alba*, também no controle de fungos fitopatogênicos. Em uma revisão de literatura, IBRAHIM et al. (2001) relatam diversas ações inseticidas, repelentes e a atividades fitotóxicas para alguns óleos ricos em limoneno.

As propriedades aromáticas da *L. alba* vêm despertando o interesse das indústrias de cosméticos e de perfumes (empresa Natura, comunicação pessoal). O linalol, por exemplo, é um monoterpeno alcóolico extensivamente utilizado na fabricação de importantes perfumes, de cosméticos e aromatizantes, e na rota da vitamina E (FRIGUETTO & OLIVEIRA, 1998). Atualmente, a fonte natural dessa substância é a partir da madeira do pau-rosa, árvore considerada em extinção, mas existem outras fontes naturais facilmente agricultáveis, como a *L. alba*, que podem apresentar rendimentos até superiores. A pureza do linalol de *L. alba*, fator que qualifica o óleo, já foi analisada por LORENZO et al. (2001) e SIANI et al. (2002), e está em processo de pesquisa por equipes brasileiras.

As substâncias químicas responsáveis por tais efeitos são também ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos, mas os sintéticos são muitas vezes inviáveis por apresentarem qualidade inferior aos produtos naturais. Isso faz com que os produtos de fonte natural apresentem um maior interesse no mercado. O potencial industrial dessa espécie está associado às grandes facilidades agronômicas que ela apresenta, como a rusticidade, a rapidez de colonização pela propagação vegetativa, o vigor, a alogamia (fonte de variabilidade), e também por vegetar e florescer o ano todo, além de apresentar ampla adaptação para vários ambientes (plasticidade fenotípica). Assim, o melhoramento genético dessa espécie pode resultar em sustentabilidade na exploração agronômica e industrial e, ainda, se consolidar como mais uma espécie para a agricultura familiar.

2.3 Interação Genótipo x Ambiente

As características relacionadas à produção vegetal estão condicionadas ao controle genético do organismo, ao ambiente em que é cultivado e à interação entre esses dois fatores. As diferentes respostas fenotípicas frente a mudanças nas condições ambientais resultam em comportamentos distintos dos genótipos, caracterizando a interação. Se a expressão de um determinado genótipo depende dos genes e do ambiente em que é avaliado, a interação GxA deve ser mais um fator a considerar na análise. Assim, no melhoramento, o processo de seleção depende também da estimação dessa interação, para que não ocorra a queda inesperada de desempenho de um material testado.

As substâncias químicas presentes no óleo essencial das aromáticas e medicinais são produzidas pelo metabolismo secundário das plantas e apresentam funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie (DENNIS & TURPIN, 1990). Por outro lado, suas funções fisiológicas nas plantas ainda não estão completamente esclarecidas, mas associam-se à defesa contra agentes externos abióticos (insolação, umidade relativa, fotoperíodo, tipo de solo, etc.) e os bióticos (pragas, patógenos e microflora do solo) (FONTANEL & TABATA, 1987).

A reação das plantas às condições em que são submetidas no ambiente de cultivo, juntamente com a integração de um sistema muito bem regulado geneticamente, é responsável pela ativação do metabolismo secundário. Esta forma de atuação, onde são expressos genes (constitutivos e induzidos) modificando a bioquímica e fisiologia

dos vegetais, foram selecionados ao longo de milênios por meio da evolução, resultando em adaptação ao meio ambiente e em economia de energia.

Assim, variações do meio ambiente, principalmente aquelas diferentes do habitat natural, conduzem a modificações nos indivíduos quanto aos perfis de composição dos metabólitos secundários (RETAMAR, 1994; ZOGHBI et al., 1998) de forma muito dinâmica, sendo estes responsáveis pelas relações entre o indivíduo e o ambiente onde ele se encontra. A interferência dessas variações no fenótipo da planta é classicamente representada pela localidade de cultivo, genótipos e anos diferentes, assim como pela interação entre os três fatores (BORÉM & MIRANDA, 2005). Além disso, também é significativa a variação resultante da ontogenia, levando a colheita de folhas em estádios específicos das plantas, em que os princípios ativos alvos encontram-se em maiores quantidades (EHLERT, 2003; TAVARES et al., 2005).

Segundo CORRÊA (1992), os aspectos morfológico, anatômico e fitoquímico de plantas de *L. alba* sofrem variações de acordo com as diferentes adaptações às condições ambientais do local de procedência, exceto a constituição dos óleos essenciais. Porém, GUPTA et al. (2001) e IAREMA et al. (2003) não observaram variações morfológicas ou fitoquímicas em plantas submetidas a diferentes condições de micropropagação *in vitro*.

O rendimento de óleo e a produção de biomassa foram relatados como variáveis com o uso de reguladores vegetais quando empregados no manejo da planta (SHUKLA & FAROOGI, 1990). A variação dessas características primordiais na produtividade de óleo de *L. alba* conforme diferentes condições ambientais é freqüentemente constatada (VENTRELLA, 2000; CASTRO, 2001; SANTOS, 2001; STEFANINI et al., 2002; EHLERT, 2003; SANTOS & INNECCO, 2003; INNECCO et al., 2003).

2.4 Estabilidade e Adaptabilidade Fenotípica

As diferentes respostas dos genótipos frente a mudanças das condições ambientais representam um problema para os agricultores e um grande desafio para os melhoristas. É de interesse para ambos que as plantas cultivadas apresentem, além de alta produtividade, a estabilidade na qualidade e quantidade do produto comercial. Além disso, a planta deve apresentar uma responsividade positiva aos diferentes ambientes, com capacidade de aproveitar as condições favoráveis ou de responder aos fatores ambientais limitantes (desfavoráveis).

Assim, a homeostase de desenvolvimento torna-se um mecanismo extremamente importante para a estabilidade do material genético. Ela refere-se ao mecanismo de auto-regulação fisiológica do organismo de acordo com as flutuações nos fatores ambientais, de modo a permitir que ele responda uniformemente independente da condição em que é submetido. Portanto, se houver estabilidade na interação, os indivíduos podem ser considerados "tamponados". Um segundo tipo de homeostase considerado por BORÉM & MIRANDA (2005) é a genética ou populacional, em que as estruturações genéticas de uma população apresentam variabilidade suficiente para que essa estabilização aconteça, resultando em um efeito de grupo "tamponante" ao ambiente. Esse tipo de homeostase depende, portanto, da heterozigosidade da população em questão (ALLARD & BRADSHAW, 1964).

Plantas com infecção sistêmica de patógenos, principalmente vírus, mantém o sistema de defesa ativo (metabolismo secundário), resultando em perda de produtividade e no estabelecimento da co-evolução patógeno x hospedeiro (quando não ocorrem infecções severas). Plantas infectadas por um determinado patógeno podem ser mais resistentes à entrada de outros, ocorrendo a chamada resistência induzida ou proteção cruzada. Dentro deste contexto, é possível que plantas aromáticas com infecção sistêmica viral, desde que não cause perdas acentuadas de vigor, podem ter uma maior homeostase genética, resultando, portanto, em níveis maiores de estabilidade na produção de óleos, mesmo com variações abióticas de ambiente.

Segundo CRUZ & REGAZZI (1994), quando as interações do genótipo com o ambiente são significativas, é possível avaliar tanto a estabilidade (previsibilidade) quanto à adaptabilidade (responsividade) dos genótipos nos diferentes ambientes testados através de modelos biométricos. Apesar de haver um consenso sobre a importância desse tipo de análise entre os pesquisadores, ainda é pouco empregada e há questionamentos em relação às formas da sua estimação.

Um dos modelos mais utilizados no melhoramento genético é o proposto por EBERHART & RUSSEL (1966), o qual baseia-se em poucos ambientes e apresenta caráter monosegmentado. Ou seja, as informações são representadas em um plano cartesiano bidimensional, no qual a disposição dos ambientes permite o tracejamento de uma única reta. Os eixos são representados pela "performance" de cada genótipo avaliado e pelos índices ambientais. Aqui, considera-se material ideal aquele que possui média elevada, ajuste dos dados observados na reta obtida com desvios da regressão sob a forma de variância, iguais ou próximos de zero ($\sigma^2_{di}=0$), e estabilidade e

adaptabilidade ampla (β_1=1). Os parâmetros utilizados para diferenciar os genótipos quanto à adaptabilidade são, portanto, baseados nos coeficientes de regressão da equação linear e determinam a responsividade do genótipo de acordo com a angulação formada na reta. Assim, os melhores genótipos podem ser recomendados adequadamente aos diferentes ambientes.

2.5 Divergência Genética por Análises Multivariadas

A análise multivariada tem por finalidade utilizar diversos caracteres aleatórios para quantificar a divergência genética de genótipos. A partir desse tipo de análise é possível estabelecer um coeficiente de distância genética entre os indivíduos avaliados que permite agrupá-los, assim como detectar o nível de absorção de variância de cada variável avaliada e a relação entre elas.

A divergência genética é a distância genética entre dois ou mais indivíduos que estabelece as suas relações com base em características fenotípicas (morfológicas e fisiológicas) e/ou moleculares. Os marcadores moleculares de DNA são bastante utilizados para tal finalidade, pois baseiam-se na avaliação de polimorfismos presentes no genoma e, portanto, não são influenciados pelo ambiente como os de natureza fenotípica (TATIENI et al., 1996).

A quantificação dessa divergência de forma preditiva pode orientar a formação de cruzamentos dialélicos para a detecção das melhores combinações parentais e exploração da heterose em programas de melhoramento (CRUZ & REGAZZI, 1994). Para o melhoramento, essa quantificação permite ainda avaliar a diversidade genética em uma população ou em um banco de germoplasma, otimizar a conservação dos recursos genéticos, recomendar cultivares elite para determinada região (mantendo a base genética ampla) e até identificar populações e locais de coleta de germoplasma com elevada diversidade (WARREN, 1994).

2.5.1 Análise de agrupamento

A análise de agrupamento (*cluster analysis*) é realizada através de duas etapas: a primeira é gerar uma matriz de distância (de similaridade ou dissimilaridade) entre os indivíduos e a segunda, aplicar um algoritmo de agrupamento na matriz que identifica e reúne grupos homogêneos, os quais podem ser visualizados em forma de dendrograma.

A Distância Euclidiana é a medida de dissimilaridade mais utilizada para calcular distância genética, pois responde aos princípios geométricos pré-estabelecidos (DIAS, 1998). Como foi desenvolvida para a análise de variáveis quantitativas, ela é sensível às correlações e então restrita a variáveis independentes. Toda variável, além de independente, deve apresentar variância unitária, uma vez que os dados podem ser obtidos em diferentes escalas.

Por outro lado, os coeficientes de similaridade visam representar a relação linear entre dois genótipos avaliados com base em uma matriz binária de presença:ausência, gerada a partir de análises moleculares. Entre os diversos métodos encontrados na literatura, o coeficiente de Jaccard (SNEATH & SOKAL, 1973) é indicado por DIAS (1998) como o mais adequado para comparar populações dentro de uma mesma espécie.

O agrupamento dos indivíduos pode ser realizado por diferentes métodos, e tem o princípio de maximizar a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos. Os métodos hierárquicos aglomerativos são os mais recomendados para estudos biológicos (DIAS, 1998). Entre eles, o método do vizinho mais próximo (SAITOU & NEI, 1987) promove a ligação pelo critério da menor distância utilizando o coeficiente gerado pela matriz de dissimilaridade, e destaca-se por ser bastante estável. O método das Médias das Distâncias (SNEATH & SOKAL, 1973), ou UPGMA (*Unweighted Pair-Grouping Method Using an Arithmatic Average*), é o mais utilizado no melhoramento, e calcula a distância intergrupo pela média das distâncias pareadas dos membros dos dois grupos.

Dessa forma, o agrupamento sumariza a informação contida na matriz de distância para itens similares. Por esse motivo, o estudo da divergência é geralmente realizado juntamente com a análise de componentes principais, a qual retoma as informações que aí foram reduzidas, através da representação gráfica dos dados.

2.5.2 Análise de componentes principais (ACP)

A ACP é uma forma gráfica de analisar os dados de uma matriz, preferencialmente quantitativos, para visualizar a proximidade entre os indivíduos e estabelecer as relações presentes entre as variáveis.

Cada observação pode ser plotada como um vetor de pontos após a multiplicação por uma matriz de transformação ortogonal. As variáveis são combinadas em eixos principais, mas se não apresentarem combinação linear matricial entre si, será

gerada uma matriz de covariância de posto completo, na qual o número de variáveis é igual ao número de componentes principais (DIAS, 1998). Os componentes que apresentam as maiores variâncias apresentam também os maiores autovalores na matriz e são, portanto, os mais importantes. MORRISON (1976) sugere que é melhor obter o complexo multivariado logo nos primeiros componentes, desde que seja absorvido 75% ou mais da variância total.

2.6 Marcadores Moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Os marcadores moleculares são ferramentas biotecnológicas muito utilizadas em estudos de divergência genética, pois excluem os efeitos de ambiente que influenciam as análises baseadas apenas em polimorfismos fenotípicos. Dentre as técnicas atualmente disponíveis, o RAPD (WILLIAMS et al., 1990) é a mais rápida e menos custosa (HUFF et al., 1993), sendo utilizado com sucesso em estudos de divergência (DAHER et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; AREIAS et al., 2006). O RAPD é uma técnica derivada da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), de caráter dominante e herdável que fornece informações importantes sobre a exploração e conservação de germoplasma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA 1998).

Essa técnica baseia-se na amplificação de seqüências aleatórias de DNA genômico com o auxílio de um iniciador (*primer*). O *primer* é uma seqüência formada por cerca de 10 nucleotídeos, o qual anela-se a regiões arbitrárias e aleatórias do genoma quando o DNA está desnaturado, dando início à formação de uma fita complementar. A extensão da fita complementar é realizada através da enzima *Taq Polymerase*, que incorpora nucleotídeos na extremidade 3' livre do *primer* anelado. Esse ciclo de desnaturação do DNA, anelamento do *primer* e extensão da fita complementar se repete dezenas de vezes, amplificando em progressão geométrica aqueles segmentos de DNA reconhecidos pelo iniciador.

A presença desses fragmentos de DNA formados e a determinação do seu tamanho baseiam-se em alterações na molécula de DNA, muitas vezes de uma única base. Essas alterações são decorrentes de mutações de ponto, deleções ou inserções (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998) que alteram os sítios de ligação do *primer*, diminuindo ou aumentando a distância entre eles e caracterizando a presença ou ausência do alelo (polimorfismo).

Para a análise do polimorfismo, o produto de amplificação é depositado em gel

de agarose, o qual é submetido a uma corrente elétrica (eletroforese) que separa por tamanho os fragmentos gerados. A visualização dos fragmentos é possível com a utilização de um sal (brometo de etídeo) que liga-se à molécula de DNA e emite um sinal de luz quando excitado pela luz ultra-violeta. O perfil de bandas revela, portanto, o diferencial de amplificação entre genótipos que pode ser analisado estatisticamente para estabelecer as relações entre as amostras, definindo o nível de distância ou similaridade genética entre o material estudado.

A baixa repetibilidade dessa técnica constantemente encontrada pelos pesquisadores é alvo de crítica, mas o controle das diversas fontes de variação laboratoriais pode reduzir significativamente o erro experimental. Dessa forma, os cuidados notavelmente importantes são: otimizar a quantidade de DNA na reação, assim como de todos os reagentes; utilizar baixa concentração da enzima *Taq Polymerase* e de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) para aumentar a estringência da reação; utilizar sempre o mesmo termociclador e mesmo conjunto de pipetas; otimizar a temperatura de anelamento dos iniciadores, e; padronizar as condições de eletroforese. Para assegurar uma maior reprodutibilidade do estudo, é importante também ter mais de um avaliador para efetuar a genotipagem, sempre estabelecendo critérios bastante rígidos na avaliação e, principalmente, realizar mais de uma repetição para cada reação.

O potencial da técnica de RAPD para *Lippia* foi demostrado por VICCINI et al. (2004) em um estudo de diversidade genética. Eles avaliaram nove espécies através de 489 bandas polimórficas e estabeleceram a eficiência do marcador para compreender a adaptação da planta ao ambiente, conservação e classificações taxonômicas. Juntamente com o auxílio de outras técnicas moleculares, o uso do RAPD também auxiliou a classificação taxonômica de uma espécie da família Verbenaceae com base em polimorfismos do DNA (SCHWARZBACH & RICKLEFS, 2001). Em outros casos, são encontradas aplicações da técnica para caracterização das plantas de *L. alba* (SANTOS, 2001; PIERRE, 2004) ou para o estudo da divergência genética no gênero (COSTA et al., 2002).

SAUERWEIN et al. (1991) provocaram um significativo aumento de produção de um sesquiterpeno em *L. dulcis* com a transformação genética por *Agrobacterium rhizogenes.* A planta transgênica obtida produziu uma quantidade até três vezes maior de hernandulcina a partir de indução de estresse com luz. BAHL et al. (2002) provocaram variabilidade na composição do óleo de *L. alba* através de irradiação gama, sendo que as mutações permaneceram estáveis. Assim, é possível observar que a

biotecnologia e as diversas ferramentas moleculares disponíveis podem contribuir de forma efetiva para o melhoramento das espécies produtoras de óleo, como a *L. alba*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Formação da Coleção de Trabalho (Germoplasma)

O trabalho teve início em outubro de 2003, com a formação de uma coleção de germoplasma em canteiros próximos ao Setor de Entomologia do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade – Fazenda Santa Elisa, IAC/APTA. Os primeiros quatro genótipos que compuseram a coleção eram remanescentes de uma pesquisa de mestrado da UNESP/Botucatu com o IAC (EHLERT, 2003). As plantas foram coletadas em uma casa-de-vegetação do IAC e posteriormente estaqueadas individualmente para multiplicação nos canteiros.

Outras vinte e uma estacas, introduzidas no mesmo mês da coleção do Dr. Lin Chau Ming (UNESP-Botucatu), foram plantadas em vasos com substrato orgânico-mineral apropriado. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação com telado lateral até pegamento e enraizamento das plantas, e após três meses elas foram transplantadas para os mesmos canteiros. Em janeiro de 2004, mais quatro populações de *L. alba* foram introduzidas da mesma universidade. A partir de cada uma delas foram feitas 64 estacas, as quais foram enraizadas em caixas de isopor contendo mistura vegetal e areia. Após enraizamento e brotamento, dez estacas de cada população foram selecionadas e transplantadas para os canteiros da coleção.

Outro acesso que compôs a coleção foi coletado próximo à Fazenda Santa Elisa, e por último, um acesso coletado no bairro Parque Industrial de Campinas-SP. Alguns aspectos da espécie e o processo de formação da coleção estão descritos nas figuras 1 e 2, respectivamente.

Como havia a preocupação inicial de compor parcelas sem variação genotípica e em razão do desconhecimento da exata natureza genética dos genótipos incorporados na coleção, os plantios foram feitos sempre com a identificação de cada estaca em covas individuais nos canteiros.

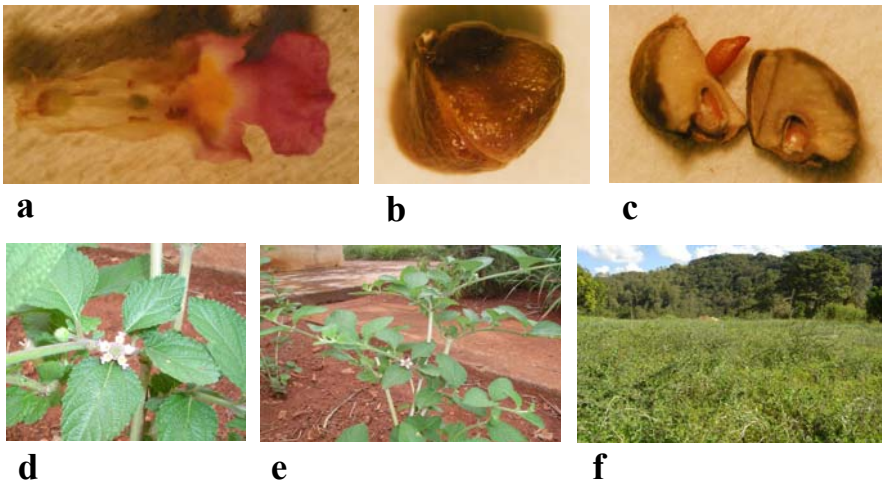

Figura 1 - Aspectos gerais da *Lippia alba*: **a.** Flor aberta; **b.** Fruto esquizocárpico; **c.** Fruto subdividido em dois mericarpos, sendo que cada um contém uma semente; **d.** Inflorescência; **e.** Planta jovem de hábito prostrado; **f.** Terreno com *L. alba*.

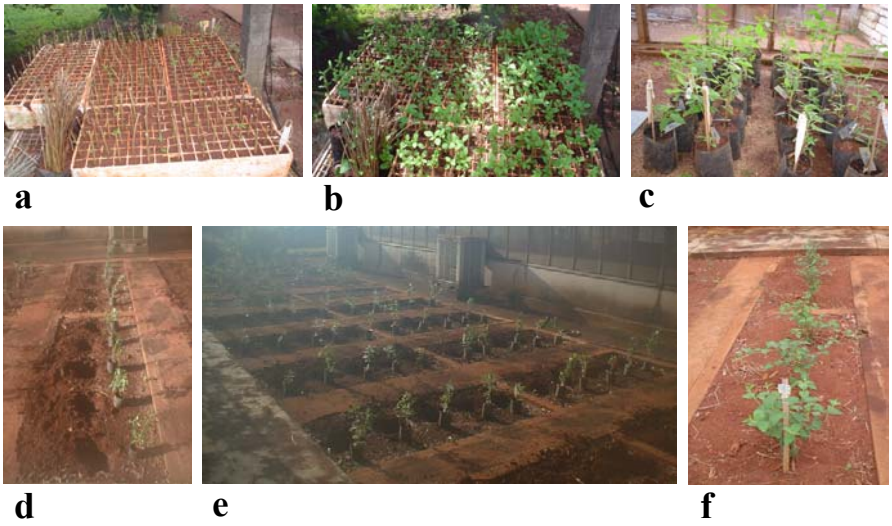

Figura 2 - Processo de formação da coleção de germoplasma de *L. alba* no IAC: **a.** Estaqueamento das populações introduzidas da UNESP-Botucatu; **b.** Brotamento das estacas em telado; **c.** Desenvolvimento das estacas em estufa; **d.** e **e.** Preparo dos canteiros para a plantação das mudas; **f.** Plantas da coleção em desenvolvimento.

3.2 Seleção dos Genótipos

Setenta gramas de folhas de 34 plantas da coleção foram coletadas e desidratadas a temperatura ambiente durante um mês, até peso constante (SANTOS & INNECCO, 2003). O óleo essencial foi extraído a partir das folhas secas durante 1h

30min através de hidrodestilação em aparelho Clevenger (Figura 3). O óleo extraído foi armazenado em frascos de vidro a -20°C até o momento da análise em cromatografia gasosa. O rendimento de óleo foi calculado considerando a massa de óleo extraído em relação à massa de folhas secas, através da fórmula:

Rendimento (%) = massa de óleo (g) x100 / massa de folhas secas (g)

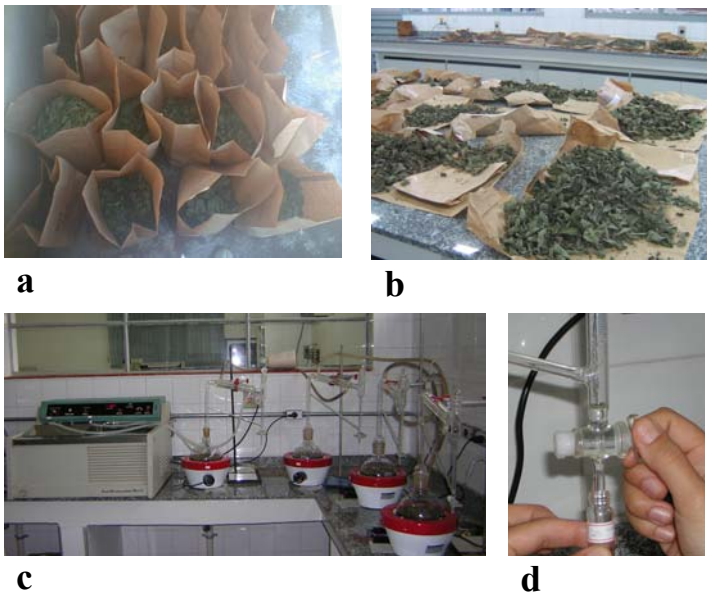

Figura 3 - Processo de extração de óleo essencial: **a.** Colheita de folhas; **b.** Secagem das folhas a temperatura ambiente; **c.** Hidrodestilação em aparelho Clevenger; **d.** Obtenção e armazenamento do óleo essencial extraído.

A análise da composição química e a proporção relativa das substâncias foram realizadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas. A identificação dos constituintes foi efetuada através da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62.lib) e literatura MCLAFFERTY & STAUFFER (1989), utilizando o índice de retenção de ADAMS (1995). Os índices de retenção de Kovats (IR) das substâncias foram obtidos através da co-injeção do óleo essencial com uma mistura padrão de n-alcanos (C9-C40), aplicando-se a equação de VAN DEN DOOL & KRATZ (1963). A programação utilizada foi: 50°C, 5 min; 190°C, 5°C/min; 190-220°C, 10°C/min.

Vinte plantas contrastantes em relação à composição química, rendimento de óleo e morfologia da planta e folha foram selecionadas para a presente pesquisa, as quais enquadraram-se em cinco quimiotipos distintos: linalol (IAC-1 a IAC-8); mirceno/cânfora (IAC-9 a IAC-12); limoneno/carvona (IAC-13 a IAC-15); citral (IAC-16 a IAC-19), e; mirceno (IAC-20). Tais compostos são freqüentemente relatados como majoritários em estudos com *L. alba*, e o valor de rendimento de óleo obtido variou entre <0,35% e 1,76%.

3.3 Instalação dos Experimentos

Os experimentos foram instalados em três locais do Estado de São Paulo: Campinas, Monte Alegre do Sul e Pindorama, todos em delineamento estatístico de blocos ao acaso, com quatro repetições e duas plantas (clones) por parcela.

Em Campinas, foram formados quatro experimentos (ambientes) distintos dentro de uma área total de 10x20m, em campo próximo ao Setor de Entomologia do Centro de Fitossanidade, localizado no Centro Experimental de Campinas (Fazenda Santa Elisa) – IAC/APTA. Os experimentos foram instalados no dia 27 de julho de 2004 com os primeiros dez genótipos selecionados: IAC-1 a IAC-4 (linalol), IAC-9 a IAC-11 (mirceno/cânfora), IAC-13 e IAC-14 (limoneno/carvona) e IAC-16 (citral). O espaçamento utilizado nos quatro experimentos foi de 1m entre linhas, 0,40m entre plantas dentro de parcelas e 0,65m entre parcelas.

As diferenças de ambiente foram realizadas para intensificar os efeitos de ambiente nos caracteres fitoquímicos e de parte aérea, utilizando combinações de presença e ausência de adubação de cobertura (fórmula 4-14-8) e de irrigação por gotejamento. Dessa forma, os experimentos (considerados nessa pesquisa também como ambientes) ficaram assim constituídos: com irrigação e com adubo (C1), sem irrigação e com adubo (C2), com irrigação e sem adubo (C3), e sem irrigação e sem adubo (C4), como pode ser visualizado na figura 4.

A adubação nos experimentos C1 e C2 foi realizada com 8g de adubo por planta em cada adubação, as quais foram efetuadas aos 65, 109 e 140 dias após o plantio. As falhas foram repostas durante o pegamento das estacas em campo com estacas-reserva mantidas paralelamente enraizando em vasos.

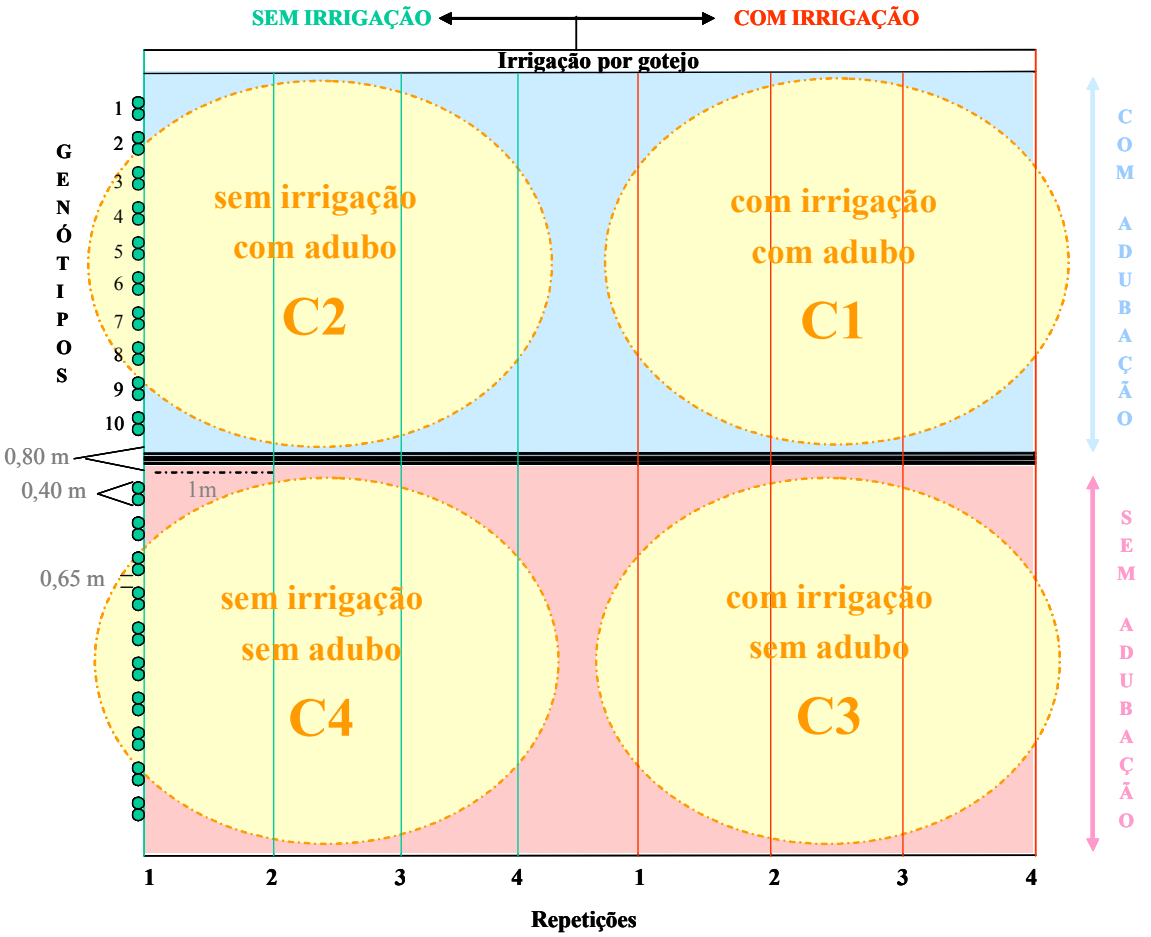

Figura 4 - Esquema dos experimentos de Campinas em delineamento de blocos ao acaso: verticalmente o campo foi dividido em dois tratamentos de irrigação e horizontalmente em dois tratamentos de adubação, totalizando quatro experimentos distintos (C1, C2, C3 e C4). Cada linha comportou 10 genótipos com duas plantas por parcela, os quais se repetiram em quatro blocos para cada ambiente em um espaçamento de 1m entre linhas, 0,4m entre plantas e 0,65m entre parcelas.

Os dez genótipos selecionados (planta matriz) que se dispunha naquele momento para os experimentos de Campinas tiveram seus ramos cortados em estacas para clonagem individual dos mesmos (Figura 5a e b). Com esse procedimento se asseguraria a variância genética nula dentro de um mesmo tratamento (genótipo). Assim, as variações dos caracteres fenotípicos entre repetições e entre experimentos para um mesmo tratamento poderiam ser devidas apenas ao efeito ambiental *per se* e à interação (se houver) para aquele único genótipo. O perfil ou composição de óleos seria também fiel a cada genótipo, e não resultado de mistura genética dentro de parcelas ou de possíveis interações diferenciais de cada genótipo dentro de parcelas.

As estacas continham 15-20cm de comprimento com cerca de 1cm de diâmetro e foram colocadas a cerca de 5cm de profundidade no solo. Foram mantidas fora do solo duas gemas laterais em cada estaca para as brotações (BIASI & COSTA, 2003). Cada experimento totalizou 40 parcelas dispostas ao acaso nos quatro blocos. Como o sistema de irrigação foi por gotejamento, onde se mantinha com rigidez a umidade das parcelas, as estacas foram colocadas diretamente no campo experimental sem enraizamento prévio.

a **b** **c**

Figura 5 - Multiplicação das plantas para a instalação dos ensaios: **a.** Preparação de estacas com 15-20cm e pelo menos duas gemas laterais; **b.** Quatro genótipos clonados por estaquia; **c.** Enraizamento das estacas em estufa.

Os experimentos de Monte Alegre do Sul (MA) e Pindorama (PI) foram instalados no Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Leste Paulista (30/09/2004) e do Centro-Norte (27/01/2005), respectivamente, ambos pertencentes à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA). Nestes casos, devido ao sistema de irrigação por aspersão, com menor controle da umidade, e também à localização mais distante dos experimentos, as estacas foram previamente enraizadas (Figura 5). Para o plantio de MA, as estacas foram imersas em solução 3g l^{-1} de thiofanato metílico + chlorotalonil durante cinco minutos antes do plantio. Para PI, as estacas foram mantidas até o estádio juvenil em canteiro sombreado, igualmente tratadas com o mesmo fungicida antes do plantio, e as covas das parcelas foram regadas com fungicida benomyl (20g l^{-1}).

Como a disponibilidade de área foi maior nestes dois locais e também contribuindo como mais um fator para variação ambiental em relação aos experimentos de Campinas, optou-se por isolar mais as unidades de observação (parcelas) para promover um crescimento pleno das plantas. Assim, o espaçamento foi de 2m entre

linhas, 0,4m entre plantas e 1,6m entre parcelas. Os replantes das parcelas com falhas foram feitos com clones mantidos em canteiro desde o plantio no campo, ou seja, em mesmo estádio de desenvolvimento. Na instalação desses dois experimentos, dispunha-se de mais genótipos selecionados quanto a contrastes fitoquímicos e morfológicos. Dessa forma, foram mantidos os dez genótipos utilizados no campo de Campinas (presentes em seis experimentos) como comuns e foram adicionados mais dez outros, totalizando 20 genótipos (presente apenas nos dois experimentos): IAC-1 a IAC-8 (linalol); IAC-9 a IAC-12 (mirceno/cânfora); IAC-13 a IAC-15 (limoneno/carvona); IAC-16 a IAC-19 (citral), e; IAC-20 (mirceno).

O experimento de Monte Alegre do Sul (MA) e o de Pindorama (PI), assim como os quatro experimentos realizados dentro de uma mesma área em Campinas (C1 a C4), podem ser visualizados na figura 6, os quais foram considerados seis ambientes potencialmente distintos para a realização do trabalho.

a **b** **c**

Figura 6 - Ensaios de *Lippia alba* em campo experimental: **a.** Monte Alegre do Sul (APTA-SP); **b.** Pindorama (APTA-SP); **c.** Campinas (CEC-IAC/APTA), onde foram instalados quatro experimentos.

As amostras de solo foram feitas nos seis experimentos, logo após a colheita de folhas, a uma profundidade de 30cm. Em Campinas, foi feita uma análise antes da aplicação dos tratamentos de adubação e irrigação, mas não apresentou diferenças relevantes em relação à análise realizada após os tratamentos (Tabela 1). Em geral, o campo de Campinas apresentou-se mais fértil que MA e PI, provavelmente devido a anteriores cultivos de tomate e alho na área. Os dados climáticos e de localidade dos três municípios estão descritos na tabela 2.

Tabela 1 - Análise de solo dos seis experimentos logo após a colheita e análise de solo do campo de Campinas antes de promover diferenciais de irrigação e adubação, considerando em todas as amostras 0,3m de profundidade.

	Após colheita						Campinas antes
	PI	**MA**	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**das adubações**
M.O. (g/dm3)	13,0	22,0	30,0	32,0	28,0	32,0	31,0
pH	5,0	5,4	6,3	6,0	6,3	6,0	6,1
P (mg/dm3)	29,0	6,0	318,0	245,0	241,0	184,0	231,0
K (mmolc/dm3)	2,2	0,9	3,4	3,7	1,7	2,6	2,9
Ca (mmolc/dm3)	12,0	22,0	79,0	72,0	82,0	88,0	72,0
Mg (mmolc/dm3)	4,0	10,0	23,0	22,0	24,0	33,0	21,0
A.P. (mmolc/dm3)	20,0	20,0	15,0	18,0	13,0	20,0	18,0
S.B. (mmolc/dm3)	18,2	32,9	105,4	97,7	107,7	123,6	95,9
C.T.C. (mmolc/dm3)	38,4	53,1	120,2	115,9	121,0	143,8	114,1
Sat. B. (%)	47,0	62,0	88,0	84,0	89,0	86,0	84,0
B (mg/dm3)	0,2	0,3	0,8	0,7	0,3	0,4	0,3
Cu (mg/dm3)	0,7	0,9	3,9	3,2	3,7	3,3	4,5
F (mg/dm3)	39,0	31,0	13,0	12,0	9,0	13,0	13,0
Mn (mg/dm3)	17,5	7,1	16,8	18,0	15,8	17,1	18,5
Zn (mg/dm3)	0,9	9,2	34,5	20,2	9,7	11,3	24,7

MO: matéria orgânica; P: fósforo; K: potássio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; AP: acidez potencial; SB: soma das bases; CTC: capacidade de troca de cátions; Sat.B: saturação de bases; B: boro; Cu: cobre; Fe: ferro; Mn: manganês; Zn: zinco; PI: Pindorama; MA: Monte Alegre do Sul; C1: com irrigação e com adubo (Campinas); C2: sem irrigação e com adubo (Campinas); C3: com irrigação e sem adubo (Campinas); C4: sem irrigação e sem adubo (Campinas).

Tabela 2 - Dados climáticos e de localidade dos experimentos.

Locais	**solo**	**clima**	**longitude**	**latitude**	**altitude**	**culturas anteriores**
APTA Regional Leste Paulista Monte Alegre do Sul	latossolo vermelho-amarelo	mesotérmico úmido	46° 37 min W	22° 43 min S	820m	não
APTA Regional Centro Norte Pindorama	argiloso	tropical úmido	48° 55 min W	21° 13 min S	562m	não
Centro Experimental de Campinas IAC/APTA	argiloso	trópico quente	47° 05 min W	22° 54 min S	674m	alho e tomate

3.4 Características Fenotípicas Avaliadas

3.4.1 Massa de folha fresca (MFF) e massa de folha seca (MFS)

As duas plantas da parcela foram podadas até a base e os ramos levados à sombra, onde foram totalmente desfolhados em sacos de papel. Os sacos foram pesados logo após a colheita para a obtenção da massa de folha fresca (MFF) e mantidos em bancada de laboratório para a desidratação das folhas. Durante o processo de secagem, os sacos foram pesados até peso constante, ou seja, até os 30 dias após a colheita, em que foi possível obter o valor de massa de folha seca (MFS).

A colheita de MA foi realizada no dia 09/06/2005 e de PI nos dias 28/06/2005 (1ª repetição) e 30/06/2005 (repetições 2, 3 e 4). Em Campinas, a colheita teve início dia 12/04/2005 e terminou dia 18 do mesmo mês, sendo que cada bloco teve todas as plantas colhidas em um mesmo dia, de forma a minimizar o erro experimental dentro das repetições.

3.4.2 Rendimento (RED) e composição química do óleo (CQO)

O óleo essencial foi extraído a partir de amostras de 40g de folhas secas através de hidrodestilação em aparelho Clevenger, durante 1h 30min. O rendimento (RED) foi calculado considerando a massa de óleo obtido em relação aos 40g de folhas submetidas à extração.

A análise da composição química (CQO) dos óleos e da variação quantitativa dos constituintes foi realizada em cromatografia gasosa (Nist 62.lib), com o auxílio da identificação prévia das substâncias realizada para a seleção dos genótipos (item 3.2) e com a utilização da mesma programação desta etapa.

3.4.3 Virose (VIR)

Os três genótipos do quimiotipo limoneno/carvona (IAC-13 a IAC-15) utilizados nesta pesquisa apresentavam sintomas típicos de viroses antes da instalação dos experimentos: amarelecimento tipo mosaico e engurvinhamento das folhas, internódios curtos, folhas pequenas e retorcidas, e nanismo geral de plantas. Através de análises de hospedeiro diferencial e teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), o patógeno

foi identificado preliminarmente como CMV (*Cucumber Mosaic Virus*) pelo Instituto Biológico de São Paulo (Dr[a]. Addolorata Colariccio, comunicação pessoal).

No processo de preparo das estacas para instalação dos ensaios houve, provavelmente, contaminação mecânica e disseminação dessas para outras plantas, além da presença de insetos vetores nos campos experimentais (KIMATI & GALLI, 1980). Dessa forma, os sintomas puderam ser observados em plantas de alguns quimiotipos já na fase de brotamento das estacas.

Assim, a avaliação de sintomas de virose (VIR) foi realizada para todos os genótipos, com base em uma escala comparativa e subjetiva de notas de 1 a 5, em que a nota 1 representou plantas sem sintomas aparentes, a nota 5 plantas muito atacadas e as notas intermediárias seguiram uma proporção progressiva de sintomas (agressividade), como pode ser visto na figura 7.

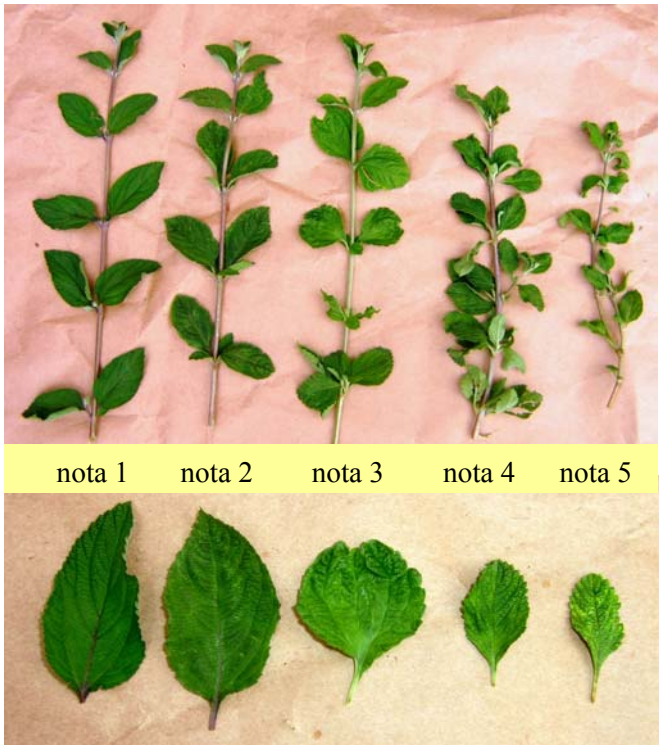

Figura 7 - Escala de notas para a avaliação da agressividade de sintomas de virose: nota 1 - planta assintomática; nota 2 - sintomas leves tipo mosaico; nota 3 - sintomas tipo mosaico com início de deformações foliares; nota 4 - sintomas de redução e deformações foliares em quase toda a planta; nota 5 - sintomas severos, com toda a planta apresentando folhas deformadas, pequenas e ramos com internódios curtos (nanismo).

3.4.4 Altura de plantas (ALT)

A altura de plantas foi avaliada apenas no experimento de Monte Alegre do Sul (MA), considerando a base da planta no solo até a altura máxima da maioria dos ramos. As duas plantas da parcela foram medidas separadamente e os dados analisados como médias de parcela.

3.5 Análises Estatísticas Univariadas

As características MFS, MFF, RED e VIR foram avaliadas para 10 genótipos considerando seis experimentos e para 20 genótipos em dois experimentos. RED foi transformada para arcsen $\sqrt{x}/100$ e VIR para $\sqrt{x}$. Para ATL, as análises foram feitas apenas em MA (20 genótipos).

As análises da CQO foram realizadas para os compostos majoritários com proporções relativas no óleo de no mínimo 5%, apenas entre os indivíduos pertencentes ao mesmo quimiotipo. Dessa forma, para o quimiotipo linalol duas substâncias foram avaliadas (linalol e 1,8-cineol) em duas situações: para os quatro genótipos presentes nos seis experimentos e para os oito genótipos, presentes apenas em MA e PI. Da mesma forma, para o quimiotipo mirceno/cânfora foram avaliadas quatro substâncias (β-mirceno, cânfora, trans-cariofileno e α-fecheno) para três e quatro genótipos separadamente, para limoneno/carvona foram consideradas apenas essas duas substâncias, para dois e três genótipos, e para o citral, três compostos (neral, geranial e β-mirceno) foram avaliados para um e para quatro genótipos. O quimiotipo mirceno (β-mirceno e α-pineno) foi representado por apenas um genótipo, o qual estava presente em MA e PI.

A magnitude do efeito de genótipo (G), de experimento (E), e da interação GxE foi determinada para as características MFS, MFF, RED, VIR e CQO através da análise de variância simples e conjunta, e do teste de médias utilizando Tukey a 5% (Programa SANEST – MACHADO & ZONTA, 1991). Na análise de ALT, foi testado apenas o efeito de genótipos. Para toda análise conjunta, foi verificado o valor da razão entre o menor e maior QM (quadrado médio) do resíduo, para que não fosse superior a quatro vezes (GOMES, 1966). Na análise de variância foi adotado o modelo fixo para blocos ao acaso, onde genótipos e blocos foram considerados fixos. Na análise de variância conjunta empregou-se o mesmo modelo, com o fator de variação ‘experimentos’

também fixo.

Quando detectada significância na interação GxE envolvendo os seis experimentos, foram analisadas a estabilidade e adaptabilidade fenotípica dos genótipos, por meio do modelo monosegmentado de EBERHART & RUSSEL (1966), utilizando o programa estatístico GENES (CRUZ, 2001). Como visto anteriormente, esse modelo baseia-se na análise de regressão linear para poucos ambientes e considera material ideal aquele que apresenta elevada estabilidade fenotípica com desvios de regressão não significativos ($\sigma^2_{di}=0$), traduzindo isso em maior previsibilidade, e adaptabilidade ($\beta_1=1$) ao ambiente, ou seja, responsividade tanto em ambientes desfavoráveis quanto nos favoráveis.

Foi realizada, também, uma análise de variância em separado somente para os oito genótipos pertencentes ao quimiotipo linalol, para comparações genotípicas desse importante óleo. Foram comparados os dados de MFS, RED e porcentagem relativa de linalol no óleo essencial. O mesmo modelo de estabilidade foi aplicado nesse caso para a característica RED, considerando os quatro genótipos que estavam presentes em todos os seis experimentos.

Foram testados, na forma de análise conjunta dos quatro experimentos de Campinas, os fatores de adubação e irrigação. Assim, a análise de variância considerou os dez genótipos desse local e as características MFS, MFF, RED, VIR, e CQO. A CQO também foi avaliada para cada substância em particular entre os indivíduos de mesmo quimiotipo.

3.6 Análises Estatísticas Multivariadas

Foram realizadas duas análises multivariadas, com base em características fenotípicas, para determinar a divergência genética entre os genótipos: análise de componentes principais (ACP) e de agrupamento. Para ambas foi utilizado o programa GENES e a entrada dos dados foi feita com a média geral de ambientes. Assim, foram consideradas 14 variáveis para a análise com 10 genótipos (MFF, MFS, RED, VIR, limoneno, carvona, linalol, 1,8-cineol, β-mirceno, cânfora, trans-cariofileno, α-fecheno, neral e geranial) e 16 variáveis para a análise com 20 genótipos (mesmas características da anterior, acrescentando ALT e α-pineno).

Para a análise de agrupamento, a divergência genética entre os genótipos foi quantificada a partir da distância Euclidiana, como medida de dissimilaridade. Devido

às diferentes escalas de mensuração das características, os dados foram padronizados de acordo com a fórmula: $Z_{ij}=X_{ij}/S_j$, em que a média original X_{ij} obtida na variável j do genótipo i, é dividida pelo desvio padrão (S_j) da correspondente variável j, gerando a média reduzida Z_{ij} de variância unitária.

Com base na distância estabelecida entre os indivíduos, os genótipos foram agrupados utilizando o método do Vizinho mais Próximo (SAITOU & NEI, 1987). Foi possível estabelecer o índice de correlação entre as características analisadas utilizando o método de Pearson (MORRISON, 1976). Assim, na correlação só não foi considerada CQO, para a qual cada variável (substâncias) foi compreendida apenas para alguns genótipos (análise dentro de quimiotipo).

Foi possível estabelecer os agrupamentos de uma forma gráfica tridimensional com a realização da ACP, utilizando o programa Statistica (STATSOFT Inc. 1999). Os gráficos foram obtidos de acordo com a dispersão dos escores dos primeiros componentes principais nos eixos, sendo que o primeiro componente é o de maior variância, seguido pelo segundo de maior variância (segundo componente) e assim sucessivamente. Foi possível também detectar quais foram as características que mais contribuíram para tais agrupamentos (componentes principais) e a correlação existente entre elas.

3.7 Análise Molecular com RAPD

Folhas jovens e sadias foram coletadas dos 20 genótipos e maceradas em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo do CIMMYT (*International Maize and Wheat Improvement Center*), com as seguintes modificações: 40mg de tecido macerado; 1,4ml de tampão de extração com carvão ativado (25mg g^{-1} tecido); primeira centrifugação para remoção do tecido; uma etapa a mais de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1); precipitação com isopropanol por apenas 5min, e; centrifugação do DNA precipitado a 6,000rpm por 5min. O DNA obtido foi tratado com RNAse e quantificado em gel de agarose 1% sob luz UV, com o auxilio de DNA comercial padronizado.

Para a reação de amplificação por PCR/RAPD foram utilizados 5ng de DNA. Os *primers* utilizados foram definidos com base no trabalho de SANTOS (2001), a qual estabeleceu 60 *primers* polimórficos para oito formas de *L. alba*. Vinte e cinco dos *primers* (Operon Technologies Inc) que apresentaram maiores números de

polimorfismo foram selecionados para o estudo: OPF (4, 7, 8, 10, 17), OPG (2, 5, 6, 17), OPJ (4, 15, 18) e OPK (1-4, 6, 8-10, 14, 15, 17, 19 e 20).

A PCR foi feita em um volume final de 15µl (3mM $MgCl_2$; 0,15mM dNTP; 0,3pmol *primer*, e; 0,05U μl^{-1} *Taq Polymerase*) e foi conduzida em um termociclador PTC-100 (MJ Research), com uma desnaturação inicial de 96°C por 4min, 44 ciclos de 94°C por 1min (desnaturação), 35°C por 1min (anelamento do *primer*) e 72°C por 1,3min (extensão), e uma extensão final de 72°C por 7min. Todo o volume foi depositado em gel de agarose 1,2%, o qual foi submetido em campo elétrico a 90V por 2h, seguido de banho em solução com brometo de etídeo (2,3µg ml^{-1}) durante 20min e análise sob luz UV.

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

Essa etapa da pesquisa foi realizada no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais-IAC, juntamente com o PqC Carlos Augusto Colombo.

Para assegurar uma maior repetibilidade do estudo, as fontes de variação laboratorial que normalmente influenciam análises que utilizam essa técnica foram controladas com os devidos cuidados. Assim, foram utilizados os mesmos termocicladores para todas as amplificações; foi estabelecida uma concentração padrão de DNA, de cloreto de magnésio ($MgCl_2$ - foi reduzida para aumentar a estringência ou especificidade da reação) e enzima (*Taq Polymerase* - não foi excessiva, também para assegurar a estringência); foi utilizado o mesmo conjunto de pipetas (caso houvesse diferença de regulagem entre elas); foi estabelecida a temperatura ótima de anelamento dos *primers*, de forma a permitir a amplificação de bandas polimórficas e excluir a amplificação daquelas inespecíficas; as condições de eletroforese como tempo, voltagem e concentração de agarose no gel foram padronizadas; foram feitas pelo menos duas repetições para cada *primer* analisado, e; a genotipagem (leitura dos dados) foi baseada apenas nas bandas consistentes e reproduzidas nas duas repetições.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises Univariadas

4.1.1 Massa de folha fresca (MFF)

O grupo de genótipos do quimiotipo linalol (IAC-1, IAC-2, IAC-3 e IAC-4) teve comportamento semelhante, não diferindo estatisticamente entre si e nem entre os seis experimentos em que foram avaliados (Tabela 3). A média geral dos demais genótipos foi semelhante entre si e em relação ao grupo linalol, exceto o IAC-16, único integrante do quimiotipo citral dessa análise. Ele apresentou a maior média geral de MFF, sendo a maior delas (943,6g) no experimento C4 (sem irrigação e sem adubo).

A possível explicação para esta produção significativa pode ser pela fertilidade pré-existente da área experimental, devido ao cultivo por cerca de quatro anos com a cultura do tomateiro e alho (Tabela 2), e nos experimentos com adubação de cobertura (C1 e C3) pode ter havido excesso de nutrientes. Enquanto isso, PI foi o experimento com as maiores médias para todos os outros genótipos.

Tabela 3 - Médias de massa de folha fresca (g), considerando 10 genótipos e 6 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

	Experimentos*						
Genótipos*	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**MA**	**PI**	**Médias**
IAC-1	280,3 AB **a**	308,7 BC **a**	210,4 B **a**	326,1 B **a**	270,6 A **a**	442,1 A **a**	302,5 B
IAC-2	319,7 AB **a**	355,4 AB **a**	214,5 B **a**	376,1 B **a**	247,9 A **a**	458,1 A **a**	323,5 B
IAC-3	225,6 B **a**	275,9 BC **a**	295,9 AB **a**	300,8 B **a**	210,6 A **a**	409,0 A **a**	282,9 B
IAC-4	276,7 AB **a**	337,1 AB **a**	222,0 B **a**	285,4 B **a**	317,6 A **a**	343,9 A **a**	295,6 B
IAC-9	275,7 AB **bc**	109,3 C **c**	319,5 AB **ab**	175,8 B **bc**	309,2 A **ab**	576,6 A **a**	276,6 B
IAC-10	220,8 B **b**	289,8 BC **ab**	270,4 AB **ab**	342,0 B **ab**	453,5 A **ab**	547,3 A **a**	345,4 B
IAC-11	199,9 B **b**	168,7 BC **b**	314,0 AB **b**	386,9 B **ab**	245,5 A **b**	638,6 A **a**	308,9 B
IAC-13	290,8 AB **b**	318,1 BC **b**	254,0 B **b**	267,5 B **bc**	341,1 A **b**	659,7 A **a**	344,3 B
IAC-14	151,5 B **b**	152,6 BC **b**	217,7 B **b**	202,0 B **bc**	190,1 A **b**	665,7 A **a**	241,4 B
IAC-16	547,7 A **bc**	681,0 AB **ab**	575,7 A **abc**	943,6 A **a**	328,5 A **c**	435,6 A **bc**	569,7 A
Médias	271,1 **b**	282,8 **b**	282,2 **b**	340,0 **b**	287,2 **b**	511,8 **a**	324,5

CV=19,1% Interação GXE*

Médias com mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (5%) entre experimentos.
Médias com mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente (5%) entre genótipos.
IAC-1 a IAC-4 linalol; IAC-9 a IAC-11 mirceno/cânfora; IAC-13 e IAC-14 limoneno/carvona; IAC-16 citral.
*significativo a 5% de probabilidade.
C1: com irrigação e com adubo (Campinas); C2: sem irrigação e com adubo (Campinas); C3: com adubação e sem adubo (Campinas); C4: sem irrigação e sem adubo (Campinas); MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).

É importante ressaltar que para MFF não houve diferenças entre os diversos genótipos em MA e PI, apesar de terem climas e solos diferentes. Por outro lado, os experimentos de Campinas, com variações de ambiente provocadas por adubação de cobertura e irrigação por gotejo, apresentaram diferenças de comportamento dos genótipos, mesmo levando-se em consideração as diferenças não muito contrastantes de fertilidade observadas nas análises de solo dos quatro experimentos (Tabela 1).

Na análise com 20 genótipos e considerando-se apenas dois locais, MA e PI, foi mantida a interação GxE significativa (5%) para MFF (Tabela 4).

Tabela 4 - Médias de massa de folha fresca (g), considerando 20 genótipos e 2 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

	Experimentos*				
Genótipos*	**MA**		**PI**		**Médias**
IAC-1	270,6 CD	**a**	442,1 A	**a**	351,1 CD
IAC-2	247,9 CD	**a**	458,1 A	**a**	345,0 CD
IAC-3	210,6 D	**a**	409,0 A	**a**	301,7 D
IAC-4	317,6 CD	**a**	343,9 A	**a**	330,6 D
IAC-5	276,1 CD	**a**	455,1 A	**a**	360,0 CD
IAC-6	238,0 D	**a**	429,2 A	**a**	326,6 D
IAC-7	395,2 ABCD	**a**	414,6 A	**a**	404,9 BCD
IAC-8	206,2 D	**b**	426,3 A	**a**	306,3 D
IAC-9	309,2 CD	**b**	576,6 A	**a**	432,6 BCD
IAC-10	453,5 ABCD	**a**	547,3 A	**a**	499,3 ABCD
IAC-11	245,5 CD	**b**	638,6 A	**a**	419,0 BCD
IAC-12	197,6 D	**b**	569,4 A	**a**	359,5 CD
IAC-13	341,1 BCD	**b**	659,7 A	**a**	487,4 ABCD
IAC-14	190,1 D	**b**	665,7 A	**a**	391,8 CD
IAC-15	368,2 ABCD	**a**	599,8 A	**a**	477,0 ABCD
IAC-16	328,5 BCD	**a**	435,6 A	**a**	380,2 CD
IAC-17	773,1 AB	**a**	559,4 A	**a**	661,9 ABC
IAC-18	822,8 A	**a**	759,0 A	**a**	790,6 A
IAC-19	648,4 ABC	**a**	852,8 A	**a**	747,1 AB
IAC-20	541,3 ABCD	**a**	614,6 A	**a**	577,4 ABCD
Médias	350,1 **b**		535,6 **a**		437,9

CV=19,4% Interação GXE*

Médias com mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (5%) entre experimentos.
Médias com mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente (5%) entre genótipos.
IAC-1 a IAC-8 linalol; IAC-9 a IAC-12 mirceno/cânfora; IAC-13 a IAC-15 limoneno/carvona; IAC-16 a IAC-19 citral; IAC-20 mirceno.
MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).
*significativo a 5% de probabilidade.

Com este maior número de genótipos, verificou-se que o IAC-16 foi significativamente inferior aos de mesmo quimiotipo (IAC-17, IAC-18 e IAC-19). Não foram observadas grandes diferenças da sua média em relação à maioria dos integrantes dos outros quimiotipos, além da sua inferioridade a alguns deles. Vale salientar que as diferenças genotípicas para MFF foram observadas somente em MA, sendo estatisticamente semelhantes entre si em PI.

Dentro de quimiotipos não foram detectadas diferenças significativas em nenhum dos genótipos testados, sendo observadas somente entre os grupos químicos. Dessa forma, os oito genótipos do quimiotipo linalol, quatro do mirceno/cânfora, quatro do citral e três do limoneno/carvona foram semelhantes dentro de seus grupos.

Novamente deve ser destacado o quimiotipo citral, principalmente o IAC-18. Ele apresentou uma média geral de 790,6g, estatisticamente superior à maioria dos genótipos dos outros quimiotipos. Como esse material genético tem maior potencial produtivo que os demais testados neste trabalho, pode ser utilizado como opção de parental em cruzamentos com outros quimiotipos de interesse industrial para aumento de produtividade.

Notou-se uma extrema variação de comportamento dos genótipos para MFF nas duas análises realizadas (10 genótipos em seis experimentos e 20 genótipos em dois experimentos), apesar de não haver médias bem contrastantes nesta última. Por tratar-se de uma característica quantitativa, é esperado que o fenótipo seja bastante influenciado pelo ambiente (BORÉM & MIRANDA, 2005), aumentando o erro experimental.

A variação na produção de biomassa dessa espécie já foi descrita na literatura, principalmente conforme as diferentes estações do ano (CASTRO, 2001). EHLERT (2003) observou diferenças significativas entre épocas e idades de colheita e interação entre as duas fontes de variação. De forma semelhante, VENTRELLA (2000) detectou interação significativa de sombreamento e épocas de colheita para essa característica.

Por outro lado, a colheita realizada em duas épocas distintas no estudo de SANTOS (2001) não permitiu a verificação de diferenças na produção de massa vegetal para os oito materiais trabalhados. STEFANINI et al. (2002) também não obtiveram diferenças de produção de folhas quando utilizadas diferentes combinações de fitoreguladores, porém para época de colheita a variação foi significativa.

4.1.2 Massa de folha seca (MFS)

Os resultados para essa característica foram, de forma geral, semelhantes aos resultados de MFF. Novamente os genótipos do quimiotipo linalol não diferiram estatisticamente tanto dentro quanto entre os seis experimentos realizados (Tabela 5).

No contexto geral, o IAC-3 (linalol) apresentou a menor média (77,0g), diferindo estatisticamente do IAC-13, limoneno/carvona (109,8g) e IAC-16, citral (169,8g). EHLERT (2003) trabalhou com massa fresca e seca em *L. alba* e também obteve resultados praticamente iguais para ambas características.

Tabela 5 - Médias de massa de folha seca (g), considerando 10 genótipos e 6 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

	Experimentos*						
Genótipos*	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**MA**	**PI**	**Médias**
IAC-1	77,0 B **a**	77,5 BC **a**	60,6 B **a**	80,7 B **a**	72,7 AB **a**	131,6 A **a**	82,0 BC
IAC-2	80,1 B **a**	88,2 BC **a**	75,8 B **a**	92,1 B **a**	63,1 B **a**	127,0 A **a**	86,7 BC
IAC-3	62,4 B **a**	70,2 BC **a**	85,2 AB **a**	76,4 B **a**	54,6 B **a**	121,3 A **a**	77,0 C
IAC-4	72,2 B **a**	88,4 BC **a**	86,0 AB **a**	92,0 B **a**	86,1 AB **a**	98,5 A **a**	87,0 BC
IAC-9	82,1 B **bc**	33,2 C **c**	91,6 AB **b**	57,3 B **bc**	92,4 AB **b**	177,2 A **a**	83,7 BC
IAC-10	65,4 B **b**	78,6 BC **b**	81,2 AB **ab**	97,7 B **ab**	133,5 A **ab**	159,6 A **a**	100,1 BC
IAC-11	62,2 B **bc**	44,2 BC **c**	86,8 AB **bc**	119,0 B **ab**	70,4 AB **bc**	202,3 A **a**	91,5 BC
IAC-13	91,1 AB **b**	107,4 AB **ab**	85,7 AB **b**	107,5 B **ab**	95,3 AB **b**	184,4 A **a**	109,8 B
IAC-14	47,2 B **b**	91,4 BC **b**	77,0 B **b**	61,7 B **b**	61,1 B **b**	185,9 A **a**	82,6 BC
IAC-16	160,9 B **abc**	204,8 A **ab**	173,4 A **abc**	265,2 A **a**	106,0 AB **c**	131,1 A **bc**	169,8 A
Médias	77,9 **b**	83,7 **b**	88,5 **b**	99,6 **b**	82,0 **b**	150,1 **a**	95,6

CV=18,6% Interação GXE*

Médias com mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (5%) entre experimentos.
Médias com mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente (5%) entre genótipos.
IAC-1 a IAC-4 linalol; IAC-9 a IAC-11 mirceno/cânfora; IAC-13 e IAC-14 limoneno/carvona; IAC-16 citral.
*significativo a 5% de probabilidade.
C1: com irrigação e com adubo (Campinas); C2: sem irrigação e com adubo (Campinas); C3: com adubação e sem adubo (Campinas); C4: sem irrigação e sem adubo (Campinas); MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).

Analisando todos os 20 genótipos (Tabela 6), também foram constatados resultados semelhantes aos de MFF com dois experimentos. Houve diferenças significativas em PI apenas entre o IAC-4 (linalol) e IAC-19 (citral), sendo observada uma maior diversidade de comportamento no experimento MA. Na média geral, o IAC-18 foi semelhante dentro de seu quimiotipo (citral), porém apresentou um desempenho significativamente superior a todos os outros genótipos (277,7g).

Tabela 6 - Médias de massa de folha seca (g), considerando 20 genótipos e 2 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

	Experimentos*		
Genótipos*	**MA**	**PI**	**Médias**
IAC-1	72,7 DE **b**	131,6 AB **a**	100,0 DE
IAC-2	63,1 DE **b**	127,0 AB **a**	92,3 E
IAC-3	54,6 E **b**	121,3 AB **a**	84,6 E
IAC-4	86,1 CDE **a**	98,5 B **a**	92,2 E
IAC-5	75,1 DE **b**	138,4 AB **a**	104,3 DE
IAC-6	58,9 E **b**	123,9 AB **a**	88,4 E
IAC-7	104,1 CDE **a**	118,4 AB **a**	111,2 CDE
IAC-8	55,6 E **b**	118,5 AB **a**	84,1 E
IAC-9	92,4 CDE **b**	177,2 AB **a**	131,4 CDE
IAC-10	133,5 BCD **a**	159,6 AB **a**	146,3 BCDE
IAC-11	70,4 DE **b**	202,3 AB **a**	127,9 CDE
IAC-12	56,6 E **b**	208,8 AB **a**	120,7 CDE
IAC-13	95,3 CDE **b**	184,4 AB **a**	136,2 CDE
IAC-14	61,1 DE **b**	185,9 AB **a**	115,0 CDE
IAC-15	93,4 CDE **b**	170,0 AB **a**	128,9 CDE
IAC-16	106,0 CDE **a**	131,1 AB **a**	118,2 CDE
IAC-17	207,4 AB **a**	161,4 AB **a**	183,7 ABC
IAC-18	318,7 A **a**	239,5 AB **a**	277,7 A
IAC-19	209,5 AB **a**	244,1 A **a**	226,5 AB
IAC-20	154,0 BC **a**	182,3 AB **a**	167,8 BCD
Médias	100,9 **b**	158,7 **a**	128,2

CV=15,9% Interação GXE*

Médias com mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (5%) entre experimentos.
Médias com mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente (5%) entre genótipos.
IAC-1 a IAC-8 linalol; IAC-9 a IAC-12 mirceno/cânfora; IAC-13 a IAC-15 limoneno/carvona; IAC-16 a IAC-19 citral; IAC-20 mirceno.
MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).
*significativo a 5% de probabilidade.

Devido à significância pelo teste F da ANAVA para a interação GxE, foi possível realizar uma análise de estabilidade e adaptabilidade fenotípica para produção de folhas. Como os resultados de MFF e MFS foram semelhantes, foi considerada apenas esta última. A análise foi realizada para os dez genótipos avaliados nos seis experimentos (ambientes), utilizando o modelo monosegmentado de EBERHART & RUSSEL (1966), o qual baseia-se em regressão linear (Figura 8).

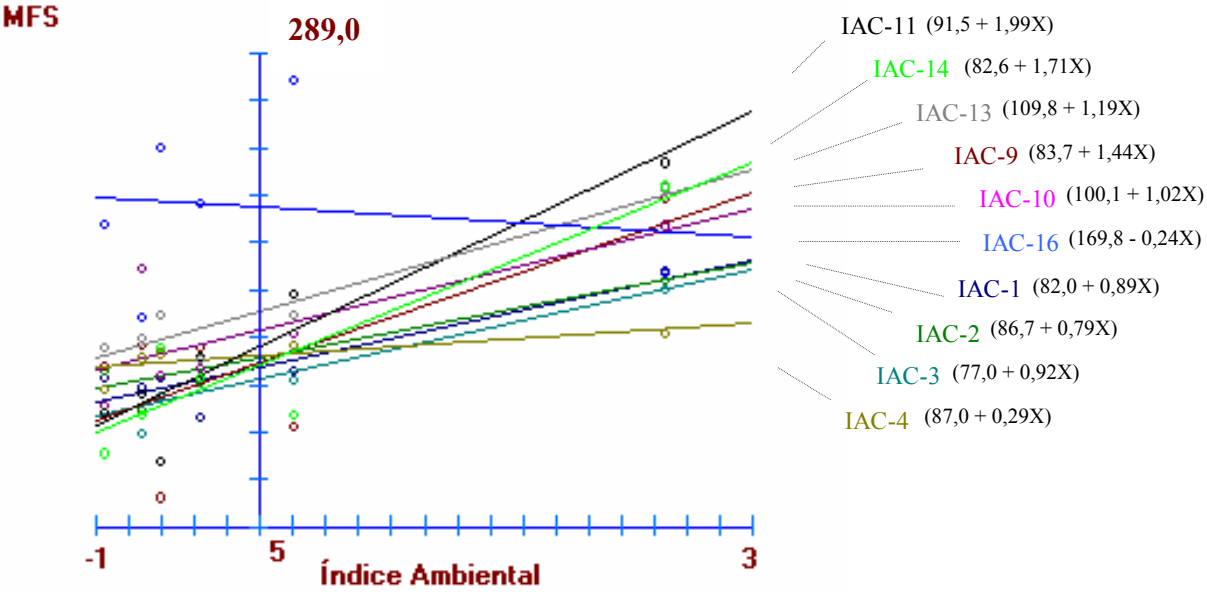

Figura 8 - Análise de estabilidade e adaptabilidade fenotípica para massa de folha seca, considerando a interação estatisticamente significativa (5%) observada para os dez genótipos testados nos seis experimentos (ambientes).

O IAC-9 (mirceno/cânfora) e IAC-16 apresentaram baixa estabilidade, com desvios significativos da regressão (σ^2_{di}) e valores de R^2 iguais a 52,7% e 2,0%, respectivamente. Além disso, o IAC-9 apresentou baixa responsividade (adaptabilidade) a ambientes desfavoráveis ($\beta_1>1$) e o IAC-16 a favoráveis ($\beta_1<1$). O IAC-10 (mirceno/cânfora) e IAC-4 (linalol), apesar de desvios não significativos, apresentaram baixa determinação genotípica (R^2=54,8% e 59,2%, respectivamente), sendo que este último teve $\beta_1<1$.

Segundo CRUZ & REGAZZI (1994), o genótipo ideal deve apresentar alta estabilidade ($\sigma^2_{di}=0$) e adaptabilidade ampla ($\beta_1=1$) além, obviamente, de média elevada para o caráter e R^2 também elevado (>60%). Por exemplo, para $\beta_1>1$, diz-se que o material é adaptado ou recomendado somente para ambientes favoráveis. Isto porque, sendo $\beta_1>1$, o ângulo da reta é maior que 45^0 e o genótipo apresenta níveis de produtividade ou de MFS muito baixos nos ambientes desfavoráveis. Neste caso estão o IAC-11 (mirceno/cânfora) e IAC-14 (limoneno/carvona) com β_1=1,99 e β_1=1,72, respectivamente. Valores estes, portanto, significativamente maiores que um, resultando em produções muito baixas nos ambientes desfavoráveis.

Considerando todos os parâmetros dessa análise, foi possível elencar o IAC-13, do quimiotipo limoneno/carvona, o melhor genótipo avaliado; é um material de comportamento previsível (estável), com R^2=90,51% e σ^2_{di} não significativo (igual a zero), e adaptação (responsividade) ampla, apresentando β_1=1. Este genótipo pode, portanto, ser recomendado para ambientes desfavoráveis e favoráveis, considerando sua produção (MFS) de 109,8g a segunda melhor média entre os dez materiais.

Vale salientar que o IAC-13 está altamente infectado por virose, a qual provoca internódios curtos, aumentando a quantidade de folhas apesar de reduzidas. A maior adaptabilidade pode ser explicada, provavelmente, em função da infecção por vírus induzir defesas não específicas da planta, que asseguram indiretamente menores oscilações às variações abióticas do ambiente (homeostase genética). Esta hipótese deverá ser testada em plantas de mesmo genótipo, com diferentes níveis de infecções viróticas, incluindo plantas sadias como controle.

Dentro do quimiotipo linalol, destacou-se como estável e responsivo o IAC-2, com R^2=80,6%, σ^2_{di}=0 e β_1=1, além de alta produção (86,7g). O genótipo citral, IAC-16, apresentou uma média de produção muito superior aos demais (169,8g), como visto anteriormente no teste de médias. Por outro lado, trata-se de um material não previsível e não responsivo a melhorias de ambiente, como comentado acima. Assim, o IAC-16 pode ser considerado um genótipo rústico e produtivo.

4.1.3 Rendimento de óleo essencial (RED)

Em todos os seis experimentos, verificou-se de forma praticamente invariável a composição de dois grupos estatisticamente distintos para RED entre os diferentes genótipos (Tabela 7). Um grupo superior, com média geral estatisticamente distinta, representado pelos quimiotipos linalol e limoneno/carvona (1,16-1,28%), e um inferior, representado pelo mirceno/cânfora e citral (0,27-0,37%).

Os experimentos de Campinas variaram pouco e de forma não significativa entre si, em termos de médias, mas foram maiores e significativos (0,90% a 0,93%), comparativamente com PI e MA (0,74 e 0,76%, respectivamente). De forma oposta verificada anteriormente para MFF e MFS, os genótipos IAC-16 (citral), IAC-9, IAC-10 e IAC-11 (mirceno/cânfora), tiveram os menores rendimentos médios de óleo.

Tabela 7 - Médias de rendimento de óleo (%), considerando 10 genótipos e 6 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

	Experimentos*						
Genótipos*	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**MA**	**PI**	**Médias**
IAC-1	1,16 A **bc**	1,27 A **ab**	1,29 A **ab**	1,45 A **a**	1,02 A **bc**	0,93 B **c**	1,19 A
IAC-2	1,41 A **a**	1,36 A **a**	1,26 A **a**	1,22 A **a**	1,29 A **a**	1,15 AB **a**	1,28 A
IAC-3	1,27 A **ab**	1,26 A **ab**	1,28 A **ab**	1,44 A **a**	1,07 A **b**	1,02 AB **b**	1,22 A
IAC-4	1,38 A **a**	1,30 A **a**	1,13 A **ab**	1,26 A **ab**	1,01 A **b**	1,21 A **ab**	1,22 A
IAC-9	0,41 B **a**	0,41 B **a**	0,40 B **a**	0,42 B **a**	0,26 B **a**	0,32 C **a**	0,37 B
IAC-10	0,36 B **a**	0,37 B **a**	0,43 B **a**	0,36 B **a**	0,31 B **a**	0,37 C **a**	0,37 B
IAC-11	0,37 B **a**	0,33 B **a**	0,37 B **a**	0,35 B **a**	0,31 B **a**	0,27 C **a**	0,33 B
IAC-13	1,21 A **a**	1,19 A **a**	1,30 A **a**	1,24 A **a**	1,07 A **a**	1,03 AB **a**	1,17 A
IAC-14	1,13 A **ab**	1,23 A **a**	1,27 A **a**	1,28 A **a**	1,13 A **ab**	0,91 B **b**	1,16 A
IAC-16	0,35 A **a**	0,28 B **a**	0,32 B **a**	0,29 B **a**	0,16 B **a**	0,23 C **a**	0,27 B
Médias	0,90 **a**	0,90 **a**	0,91 **a**	0,93 **a**	0,76 **b**	0,74 **b**	0,86

CV=15,7% Interação GXE*

Médias com mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (5%) entre experimentos.
Médias com mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente (5%) entre genótipos.
IAC-1 a IAC-4 linalol; IAC-9 a IAC-11 mirceno/cânfora; IAC-13 e IAC-14 limoneno/carvona; IAC-16 citral.
*significativo a 5% de probabilidade.
C1: com irrigação e com adubo (Campinas); C2: sem irrigação e com adubo (Campinas); C3: com adubação e sem adubo (Campinas); C4: sem irrigação e sem adubo (Campinas); MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).

Seria estratégico no melhoramento genético dessa espécie, portanto, transferir a característica de maior RED dos genótipos do quimiotipo linalol e limoneno/carvona para os genótipos de quimiotipo citral e mirceno/cânfora. Também seria interessante transferir a capacidade produtiva (MFF ou MFS) do genótipo citral para os demais quimiotipos (linalol, limoneno/carvona e mirceno/cânfora), como sugerido anteriormente.

É importante ressaltar que a base genética ou herança para produção de óleo não está completamente elucidada (PICHERSKY & GANG, 2000), dificultando as ações do melhorista. De qualquer forma, seleção recorrente baseada em progênies de meios irmãos ou de irmãos germanos para um determinado quimiotipo de interesse industrial (fármaco, perfume ou cosmética), deve provocar estimativas de ganhos genéticos significativo, considerando-se primeiramente as características MFF ou MFS, e posteriormente o RED, quando aquelas estiverem otimizadas.

Os genótipos IAC-2 (linalol), IAC-9 a IAC-11 (mirceno/cânfora), IAC-13 (limoneno/carvona) e IAC-16 (citral) não variaram para esse caráter de acordo com os experimentos em que foram avaliados. Como já mencionado, em muitos casos esses

experimentos foram diferentes estatisticamente para MFF e MFS, mas não refletiram no caráter RED. Este fato contradiz, de certa forma, a literatura na área de plantas aromáticas, onde se observa que variações de ambiente (condições abióticas e bióticas) provocam alterações significativas na produção ou rendimento de óleo.

O efeito do ambiente provocando alterações no RED, já foi relatado de acordo com a época de colheita, em trabalhos que utilizaram apenas um quimiotipo ou espécie (MATTOS, 2000; SANTOS & INNECCO, 2003; INNECCO et al., 2003). Estes autores constataram também que o rendimento aumenta consideravelmente na seca, o que foi explicado pelo estresse de temperatura e pelo aumento da intensidade luminosa.

Considerando as diferentes condições de clima e solo de Monte Alegre do Sul e Pindorama, as condições diferenciais de adubação e irrigação de Campinas, os diferentes espaçamentos utilizados, além da presença de virose em alguns materiais, as datas de plantio e colheita diferentes nos seis experimentos e a boa precisão experimental obtida (CV=15,7%), as variações nesta característica foram muito baixas.

SANTOS (2001) observou diferenças significativas de rendimento em duas épocas de colheita apenas para dois dos oito genótipos de *L. alba* estudados, no qual o rendimento de óleo também foi maior para os quimiotipos linalol e limoneno/carvona, e menor para citral e mirceno/cânfora/cariofileno. Por outro lado, CASTRO (2001) verificou que, na primavera e verão o rendimento da espécie é significativamente maior que nas outras estações. Da mesma maneira, EHLERT (2003) constatou que o rendimento varia significativamente com as épocas e idades de colheita, e observou também a significância na interação dessas duas variáveis.

No trabalho de VENTRELLA (2000), foram testados diferentes níveis de sombreamento além de épocas de colheita, e ambos os fatores apresentaram interação significativa com o rendimento. Ainda para uma mesma estação de colheita, a variação do rendimento já foi relatada como variável em anos diferentes (BAHL et al., 2000).

Apesar da significância da interação GxE, não foi possível realizar uma análise de estabilidade e adaptabilidade para RED. As médias dos genótipos nos diferentes ambientes, como já mencionado, pouco variaram, resultando em um baixo índice de discriminação entre ambientes para maior distanciamento relativo dos pontos onde passaria a reta de cada genótipo no gráfico.

A mesma tendência foi observada quando foram analisados os 20 genótipos, especialmente para o experimento de MA, no qual foram formados, novamente, dois grupos estatisticamente distintos (Tabela 8).

Tabela 8 - Médias de rendimento de óleo (%), considerando 20 genótipos e 2 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

	Experimentos*		
Genótipos*	**MA**	**PI**	**Médias**
IAC-1	1,02 A **a**	0,93 CD **a**	0,97 C
IAC-2	1,29 A **a**	1,15 ABC **a**	1,22 AB
IAC-3	1,07 A **a**	1,02 BCD **a**	1,04 BC
IAC-4	1,01 A **b**	1,21 AB **a**	1,11 ABC
IAC-5	1,29 A **a**	0,81 D **b**	1,05 BC
IAC-6	1,14 A **a**	1,25 AB **a**	1,19 AB
IAC-7	1,13 A **a**	1,01 BCD **a**	1,07 BC
IAC-8	1,27 A **a**	1,31 A **a**	1,29 A
IAC-9	0,26 B **a**	0,32 E **a**	0,29 D
IAC-10	0,31 B **a**	0,37 E **a**	0,34 D
IAC-11	0,31 B **a**	0,27 E **a**	0,29 D
IAC-12	0,28 B **a**	0,25 E **a**	0,27 D
IAC-13	1,07 A **a**	1,04 BCD **a**	1,05 BC
IAC-14	1,13 A **a**	0,91 CD **b**	1,02 BC
IAC-15	1,02 A **a**	0,90 CD **a**	0,96 C
IAC-16	0,16 B **a**	0,23 E **a**	0,20 D
IAC-17	0,37 B **a**	0,29 E **a**	0,33 D
IAC-18	0,26 B **a**	0,22 E **a**	0,24 D
IAC-19	0,27 B **a**	0,19 E **a**	0,23 D
IAC-20	0,40 B **a**	0,34 E **a**	0,37 D
Médias	0,75 **a**	0,70 **b**	0,73

CV=16,1% Interação GXE*

Médias com mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (5%) entre experimentos.
Médias com mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente (5%) entre genótipos.
IAC-1 a IAC-8 linalol; IAC-9 a IAC-12 mirceno/cânfora; IAC-13 a IAC-15 limoneno/carvona; IAC-16 a IAC-19 citral; IAC-20 mirceno.
MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).
*significativo a 5% de probabilidade.

Em PI foi formado um maior número de grupos, variando de 0,20 a 0,37% para os quimiotipos mirceno/cânfora, citral e mirceno, e entre 0,96 a 1,29% para genótipos representados pelo linalol e limoneno/carvona. Assim, Pindorama foi o local com a maior variação para RED dentre os genótipos testados, tratando-se, portanto, de um local importante para seleção de clones experimentais num processo de seleção no melhoramento genético.

4.1.4 Composição química dos óleos (CQO)

Como descrito em material e métodos, a avaliação da CQO foi feita para cada substância presente acima de 5% no óleo, individualmente, entre os genótipos pertencentes ao mesmo quimiotipo. Assim, para cada substância foram realizadas duas análises: uma com os genótipos presentes nos seis experimentos e outra com os testados em dois experimentos.

Em todas as análises foram observadas apenas variações quantitativas das substâncias, ou seja, não foi detectada nenhuma variação qualitativa, como o surgimento de uma nova substância ou o desaparecimento de outra, conforme os diferentes ambientes estudados.

Na análise do quimiotipo linalol, as duas substâncias consideradas (linalol e 1,8-cineol) apresentaram efeito significativo entre experimentos, tanto na análise com quatro quanto na com oito genótipos (Tabela 9).

Enquanto MA e PI foram os experimentos com as maiores médias de linalol, de 77,7% a 79,2%, para 1,8-cineol apresentaram os menores valores (entre 8,3% e 10,6%). Também de forma inversa, na média geral o IAC-8 foi o genótipo com a maior média do composto majoritário (81,3%) e a menor de 1,8-cineol (7,1%).

É importante salientar que não houve diferenças significativas para o composto linalol entre todos os quatro genótipos em nenhum dos seis experimentos. Isto sugere, para esse caráter, certa semelhança genética entre eles. Mesmo para a segunda substância majoritária, o 1,8-cineol, houve apenas variações significativas para C2 e MA. Ao testar mais genótipos, foi observado efeito significativo entre eles para PI nas duas substâncias, mas entre experimentos houve maior nível de variação do que entre genótipos.

Apesar das diferenças observadas nessas análises terem sido detectadas como significativas, podem ser consideradas de baixa magnitude em função do baixo valor do CV% (0,7 a 3,6%), evidenciando excelente precisão experimental.

A variação significativa do linalol e do mirceno já foi observada conforme duas épocas de colheita pos SANTOS (2001) e também no estudo de TAVARES et al. (2004), em que o aumento da proporção dessas substâncias no óleo da *L. alba* foi obtido *in vitro* com a utilização de fitoreguladores de crescimento.

Tabela 9 - Médias de substâncias (%) dentro do quimiotipo linalol, considerando 6 e 2 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

		Experimentos						
Substâncias (%)	**Genótipos**	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**MA**	**PI**	**Médias**
Linalol	IAC-1	75,3 A **abc**	73,9 A **c**	75,0 A **bc**	73,3 A **c**	78,7 A **a**	78,0 A **ab**	75,7 A
	IAC-2	76,5 A **ab**	75,0 A **b**	76,0 A **ab**	75,7 A **ab**	78,8 A **a**	77,7 A **ab**	76,6 A
	IAC-3	77,9 A **ab**	76,3 A **abc**	75,8 A **bc**	74,2 A **c**	79,7 A **a**	77,7 A **abc**	76,9 A
	IAC-4	75,9 A **bc**	74,1 A **c**	74,5 A **c**	74,9 A **c**	79,7 A **a**	78,8 A **ab**	76,3 A
	Médias	76,4 **bc**	74,8 **cd**	75,3 **cd**	74,5 **d**	79,2 **a**	78,0 **ab**	**76,4** CV=1,0%
	IAC-1	-	-	-	-	78,7 A **a**	78,1 AB **a**	78,4 B
	IAC-2	-	-	-	-	78,8 A **a**	77,7 B **a**	78,3 B
	IAC-3	-	-	-	-	79,7 A **a**	77,7 B **b**	78,7 B
	IAC-4	-	-	-	-	79,7 A **a**	78,8 AB **a**	79,2 AB
	IAC-5	-	-	-	-	79,2 A **a**	77,2 B **b**	78,2 B
	IAC-6	-	-	-	-	78,3 A **a**	78,4 AB **a**	78,3 B
	IAC-7	-	-	-	-	78,4 A **a**	77,4 B **a**	77,9 B
	IAC-8	-	-	-	-	81,2 A **a**	81,3 A **b**	81,3 A
	Médias	-	-	-	-	79,2 **a**	77,7 **b**	**78,8** CV=0,7%
1,8-Cineol	IAC-1	11,4 A **a**	12,3 A **a**	11,0 A **a**	11,7 A **a**	11,5 A **a**	9,4 A **b**	11,2 A
	IAC-2	11,1 A **a**	11,5 AB **a**	11,3 A **a**	11,3 A **a**	9,9 B **ab**	8,5 A **b**	10,6 B
	IAC-3	10,5 A **a**	11,8 AB **a**	11,3 A **a**	11,5 A **a**	10,4 AB **ab**	8,8 A **b**	10,7 AB
	IAC-4	10,9 A **a**	10,8 B **a**	10,9 A **a**	11,5 A **a**	10,7 AB **a**	8,5 A **b**	10,6 B
	Médias	11,0 **ab**	11,6 **a**	11,1 **ab**	11,5 **a**	10,6 **b**	8,8 **c**	**10,8** CV=3,2%
	IAC-1	-	-	-	-	11,5 A **a**	9,4 A **b**	10,5 A
	IAC-2	-	-	-	-	9,9 A **a**	8,5 AB **b**	9,2 AB
	IAC-3	-	-	-	-	10,4 A **a**	8,8 A **b**	9,6 AB
	IAC-4	-	-	-	-	10,7 A **a**	8,5 AB **b**	9,6 AB
	IAC-5	-	-	-	-	9,8 A **a**	7,5 AB **b**	8,7 B
	IAC-6	-	-	-	-	10,8 A **a**	8,6 A **b**	9,7 AB
	IAC-7	-	-	-	-	10,9 A **a**	8,7 A **b**	9,8 AB
	IAC-8	-	-	-	-	7,6 B **a**	6,6 B **a**	7,1 C
	Médias	-	-	-	-	10,2 **a**	8,3 **b**	**9,3** CV=3,6%

Médias com mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (5%) entre experimentos.
Médias com mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente (5%) entre genótipos.
C1: com irrigação e com adubo (Campinas); C2: sem irrigação e com adubo (Campinas); C3: com adubação e sem adubo (Campinas); C4: sem irrigação e sem adubo (Campinas); MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).

As quatro substâncias avaliadas para o quimiotipo mirceno/cânfora (β-mirceno, cânfora, trans-cariofileno e α-fecheno) não apresentaram variação entre os genótipos, como mostra a tabela 10. Esse resultado é devido à semelhança genética entre os indivíduos desse grupo químico, assim como para o linalol, confirmada posteriormente através das análises multivariadas. Também não foi observada nenhuma variação dentre os seis experimentos para o IAC-9. Os demais genótipos variaram em relação aos experimentos, mas sempre com diferenças estatísticas para médias muito próximas para as quatro substâncias analisadas.

Tabela 10 - Médias de substâncias (%) dentro do quimiotipo mirceno/cânfora, considerando 6 e 2 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

		Experimentos							
Substâncias (%)	**Genótipos**	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**MA**	**PI**	**Médias**	
β-Mirceno	IAC-9	26,9 A **a**	25,7 A **a**	26,2 A **a**	25,9 A **a**	26,4 A **a**	28,5 A **a**	26,6 A	
	IAC-10	26,0 A **ab**	23,3 A **b**	23,8 A **b**	27,1 A **ab**	26,4 A **ab**	28,9 A **a**	25,9 A	
	IAC-11	25,3 A **a**	26,1 A **a**	25,3 A **a**	26,5 A **a**	27,0 A **a**	28,1 A **a**	26,4 A	
	Médias	26,0 **ab**	25 **b**	25,1 **b**	26,5 **ab**	26,6 **ab**	28,5 **a**	**26,3**	CV=3,5%
	IAC-9	-	-	-	-	26,4 A **a**	28,5 A **a**	27,5 A	
	IAC-10	-	-	-	-	26,4 A **a**	28,9 A **a**	27,7 A	
	IAC-11	-	-	-	-	27,0 A **a**	28,1 A **a**	27,5 A	
	IAC-12	-	-	-	-	28,6 A **a**	29,2 A **a**	28,9 A	
	Médias	-	-	-	-	27,1 **b**	28,7 **a**	**27,9**	CV=2,2%
Cânfora	IAC-9	28,5 A **a**	28,6 A **a**	31,2 A **a**	30,6 A **a**	31,0 A **a**	28,6 A **a**	29,8 A	
	IAC-10	33,5 A **a**	28,0 A **ab**	31,2 A **ab**	30,5 A **ab**	31,3 A **ab**	26,0 A **b**	30,1 A	
	IAC-11	29,4 A **a**	27,7 A **a**	32,8 A **a**	29,5 A **a**	30,8 A **a**	26,9 A **a**	29,5 A	
	Médias	30,5 **ab**	28,1 **ab**	31,8 **a**	30,2 **ab**	31,0 **ab**	27,1 **b**	**29,8**	CV=4,7%
	IAC-9	-	-	-	-	31,0 A **a**	28,6 A **a**	29,8 A	
	IAC-10	-	-	-	-	31,1 A **a**	26,0 A **b**	28,6 A	
	IAC-11	-	-	-	-	30,7 A **a**	26,9 A **b**	28,8 A	
	IAC-12	-	-	-	-	28,3 A **a**	23,5 A **b**	25,9 A	
	Médias	-	-	-	-	30,3 **a**	26,2 **b**	**28,3**	CV=3,0%
T-Cariofileno	IAC-9	7,8 A **a**	8,4 A **a**	6,5 A **a**	6,4 A **a**	7,2 A **a**	9,3 A **a**	7,6 A	
	IAC-10	5,7 A **b**	8,1 A **ab**	7,8 A **ab**	6,1 A **b**	8,4 A **ab**	10,5 A **a**	7,8 A	
	IAC-11	7,6 A **ab**	7,9 A **ab**	6,5 A **b**	7,3 A **ab**	7,1 A **ab**	10,8 A **a**	7,8 A	
	Médias	7,0 **b**	8,1 **ab**	6,9 **b**	6,6 **b**	7,5 **b**	10,2 **a**	**7,7**	CV=10,6%
	IAC-9	-	-	-	-	7,2 A **a**	9,3 A **a**	8,2 A	
	IAC-10	-	-	-	-	8,4 A **a**	10,5 A **a**	9,4 A	
	IAC-11	-	-	-	-	7,1 A **a**	10,8 A **a**	8,9 A	
	IAC-12	-	-	-	-	7,3 A **b**	12,0 A **a**	8,2 A	
	Médias	-	-	-	-	7,5 **b**	10,6 **a**	**9,1**	CV=10,0%
α-Fecheno	IAC-9	7,2 A **a**	6,3 A **a**	6,5 A **a**	6,7 A **a**	8,0 A **a**	6,8 A **a**	6,9 A	
	IAC-10	6,8 A **a**	6,3 A **a**	6,6 A **a**	7,3 A **a**	7,4 A **a**	6,7 A **a**	6,9 A	
	IAC-11	6,8 A **ab**	7,3 A **ab**	6,5 A **ab**	7,1 A **ab**	8,1 A **a**	6,3 A **b**	7,0 A	
	Médias	6,9 **ab**	6,6 **b**	6,5 **b**	7,0 **ab**	7,9 **a**	6,6 **b**	**6,9**	CV=5,2%
	IAC-9	-	-	-	-	8,0 A **a**	6,8 A **a**	7,4 A	
	IAC-10	-	-	-	-	7,4 A **a**	6,7 A **a**	7,1 A	
	IAC-11	-	-	-	-	8,1 A **a**	6,3 A **b**	7,2 A	
	IAC-12	-	-	-	-	7,8 A **a**	6,8 A **a**	7,3 A	
	Médias	-	-	-	-	7,9 **a**	6,7 **b**	**7,3**	CV=4,4%

Médias com mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (5%) ente experimentos.
Médias com mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente (5%) entre genótipos.
C1: com irrigação e com adubo (Campinas); C2: sem irrigação e com adubo (Campinas); C3: com adubação e sem adubo (Campinas); C4: sem irrigação e sem adubo (Campinas); MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).

A magnitude das diferenças entre as médias dos ambientes foi abaixo do esperado, considerando-se as diferenças para as outras características, como para MFS, por exemplo. Essas pequenas diferenças foram detectadas como significativas devido, novamente, ao baixo CV%, e permitiram observar que as proporções relativas do β-mirceno e trans-cariofileno são inversamente proporcionais que cânfora e α-fecheno.

Para o limoneno e a carvona o efeito de ambiente foi bem marcante, o qual pode ser claramente observado a partir da inversão na proporção dos compostos nas duas análises realizadas de acordo com o experimento (Tabela 11). Com seis ambientes, a diferença na produção de limoneno em MA (42,8%) para o segundo melhor experimento em relação a essa substância (PI) foi de uma amplitude maior que 8%. Considerando aquele com a menor produção do limoneno (C3), essa amplitude chega a 13%. Esse mesmo ambiente, o C3, foi responsável pela maior produção de carvona (52,8%), enquanto MA ficou em último lugar, com 44,6%.

Essa inversão na proporção relativa dos dois constituintes também foi observada por EHLERT (2003), quando trabalhou com diferentes estações do ano, e pode ser devida ao fato da carvona ser um derivado do limoneno (CLAUS & EDWARD, 1961).

Tabela 11 - Médias de substâncias (%) dentro do quimiotipo limoneno/carvona, considerando 6 e 2 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

		Experimentos							
Substâncias (%)	**Genótipos**	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**MA**	**PI**	**Médias**	
Limoneno	IAC-13	30,0 B **b**	31,5 A **b**	29,5 A **b**	31,7 A **b**	42,9 A **a**	34,7 A **b**	33,4 A	
	IAC-14	33,8 A **b**	32,0 A **b**	29,7 A **b**	32,8 A **b**	42,6 A **a**	34,5 A **b**	34,2 A	
	Médias	31,9 **bc**	31,8 **bc**	29,7 **c**	31,2 **bc**	42,8 **a**	34,6 **b**	**33,8**	CV=3,2%
	IAC-13	-	-	-	-	42,9 B **a**	34,7 B **b**	38,8 B	
	IAC-14	-	-	-	-	42,6 B **a**	34,5 B **b**	38,5 B	
	IAC-15	-	-	-	-	44,6 A **a**	36,6 A **b**	40,6 A	
	Médias	-	-	-	-	43,4 **a**	35,3 **b**	**39,3**	CV=0,2%
Carvona	IAC-13	49,3 A **b**	50,2 A **ab**	52,7 A **a**	50,1 A **ab**	44,0 A **c**	48,9 B **b**	49,2 B	
	IAC-14	50,7 A **a**	50,4 A **a**	52,8 A **a**	51,3 A **a**	45,1 A **b**	50,6 A **a**	50,2 A	
	Médias	50,0 **b**	50,3 **b**	52,8 **a**	50,7 **b**	44,6 **c**	49,7 **b**	**49,7**	CV=0,9%
	IAC-13	-	-	-	-	44,1 A **b**	48,9 A **a**	46,5 AB	
	IAC-14	-	-	-	-	45,1 A **b**	50,6 A **a**	47,8 A	
	IAC-15	-	-	-	-	41,8 A **b**	47,8 A **a**	44,8 B	
	Médias	-	-	-	-	43,7 **b**	49,1 **a**	**46,4**	CV=1,0%

Médias com mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (5%) entre experimentos.
Médias com mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente (5%) entre genótipos.
C1: com irrigação e com adubo (Campinas); C2: sem irrigação e com adubo (Campinas); C3: com adubação e sem adubo (Campinas); C4: sem irrigação e sem adubo (Campinas); MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).

Também foi observado efeito de genótipos para esse quimiotipo. A inclusão do IAC-15 na análise (considerando apenas MA e PI, em que estava presente) permitiu a detecção da sua superioridade para limoneno em relação aos outros dois genótipos, sendo que para carvona ele apresentou a menor média.

SANTOS (2001), considerando como variáveis genótipo, substância química e época de colheita, obteve variações significativas (5%) para a maioria dos casos entre as substâncias majoritárias, mas não para todas. A carvona teve uma média de 1,77% na primeira colheita e 27% na segunda, diferença esta bem mais acentuada que a observada na presente pesquisa. SANTOS & INNECCO (2003) também observaram variações altamente significativas dos dois compostos, de acordo com diferentes períodos de secagem de folhas.

Para o quimiotipo citral analisado em seis experimentos (subdividido nas substâncias neral, geranial e β-mirceno), verificou-se variação significativa para neral e β-mirceno, exceto para geranial (Tabela 12). Essa substância teve um comportamento mais estável, e para ele não foi detectado efeito de experimento em nenhum dos dois casos. Os experimentos de Campinas apresentaram as melhores médias de neral e as mais baixas para β-mirceno.

Tabela 12 - Médias de substâncias dentro do quimiotipo citral (%), considerando 6 e 2 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

		Experimentos							
Substâncias (%)	**Genótipos**	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**MA**	**PI**	**Médias**	
Neral	IAC-16	26,8 **abc**	29,3 **a**	28,3 **ab**	28,0 **ab**	25,8 **bc**	24,3 **c**	**27,0**	CV=5,3%
	IAC-16	-	-	-	-	26,3 **a** A	23,5 **a** A	24,9 A	
	IAC-17	-	-	-	-	22,5 **a** A	19,9 **a** A	21,2 A	
	IAC-18	-	-	-	-	21,0 **a** A	15,6 **a** A	18,3 A	
	IAC-19	-	-	-	-	26,1 **a** A	17,0 **a** A	21,5 A	
	Médias	-	-	-	-	24,0 **a**	19,0 **b**	**21,5**	CV=10,0%
Geranial	IAC-16	36,3 **a**	39,8 **a**	38,8 **a**	38,8 **a**	37,5 **a**	35,3 **a**	**37,7**	CV=6,5%
	IAC-16	-	-	-	-	37,9 **a** A	33,5 **a** A	35,7 A	
	IAC-17	-	-	-	-	30,9 **a** A	28,2 **a** A	29,5 A	
	IAC-18	-	-	-	-	28,3 **a** A	22,2 **a** A	25,3 A	
	IAC-19	-	-	-	-	37,4 **a** A	24,2 **a** A	30,8 A	
	Médias	-	-	-	-	33,6 **a**	27,0 **a**	**30,3**	CV=10,8%
β-Mirceno	IAC-16	16,0 **abc**	14,3 **c**	14,8 **c**	15,0 **bc**	19,3 **a**	18,5 **ab**	**16,3**	CV=9,7%
	IAC-16	-	-	-	-	19,6 **a** A	20,8 **a** A	20,2 AB	
	IAC-17	-	-	-	-	29,5 **a** A	27,6 **a** A	26,8 A	
	IAC-18	-	-	-	-	24,9 **a** A	31,2 **a** A	28,0 A	
	IAC-19	-	-	-	-	14,6 **a** A	20,1 **a** A	17,3 B	
	Médias	-	-	-	-	21,2 **a**	24,9 **a**	**23,1**	CV=8,0%

Médias com mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (5%) entre experimentos.
Médias com mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente (5%) entre genótipos.
C1: com irrigação e com adubo (Campinas); C2: sem irrigação e com adubo (Campinas); C3: com adubação e sem adubo (Campinas); C4: sem irrigação e sem adubo (Campinas); MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).

Na análise com todos os integrantes desse quimiotipo (IAC-16 a IAC-19), foi observado um comportamento similar para as três substâncias, porém para o β-mirceno, foi detectada uma baixa produção do IAC-19 (17,3%).

Tanto o citral (neral e geranial) quanto o β-mirceno foram relatados como pouco variáveis no estudo de CASTRO (2001), avaliados em diferentes épocas de colheita e diferentes temperaturas de secagem de folhas, corroborando com os resultados obtidos. Porém, essa baixa variação dos compostos não era esperada, uma vez que esses genótipos diferiram para outros caracteres analisados (MFF e MFS). Novamente, é estratégico então para o melhoramento genético concentrar o processo de seleção para aquelas características indiretas da produção, como MFF, MFS, RED, resistência a doenças, porte, etc. Depois pode-se direcionar para seleção da substância específica.

O único representante do quimiotipo mirceno, IAC-20, também não apresentou variação significativa dos compostos majoritários nos dois experimentos em que foi avaliado (Tabela 13). A média de produção do β-mirceno foi de 59,6%, com um CV% mais baixo que o calculado para o α-pineno.

Tabela 13 - Médias de substâncias dentro do quimiotipo mirceno (%), considerando 2 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

		Experimentos			
Substâncias (%)	**Genótipo**	**MA**	**PI**	**Média**	
β-Mirceno	IAC-20	60,8 a	58,5 a	**59,6**	CV=2,0%
α-Pineno	IAC-20	15,3 a	14,3 a	**14,8**	CV=6,8%

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente (5%) entre experimentos.
MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).

Os dados mostrados em relação à variação da composição química em *L. alba* sugerem que as diferentes substâncias que compõe majoritariamente os indivíduos devem ser preferencialmente de natureza genética, com o ambiente influenciando em menor magnitude as alterações destas, assim como TAVARES et al. (2005) já haviam indicado. Em 1992, CORRÊA relatou que apesar da *Lippia alba* ser sujeita a grandes variações morfológicas e fitoquímicas, os constituintes dos óleos essenciais não variam. Assim, essa plasticidade fenotípica da proporção das substâncias (variação quantitativa) pode ajudar a compreender a grande diversidade de ambientes em que essa espécie é encontrada.

4.1.4.1 Contaminação genotípica dentro de parcelas

Na análise da variação na composição química do genótipo IAC-10 (mirceno/cânfora) nos diferentes experimentos, foi observada a presença de substâncias do quimiotipo linalol, além daquelas típicas de seu grupo químico. Essa variação qualitativa na composição levou à necessidade de verificação da causa desse resultado. Como foi detectada apenas para esse genótipo, dentre quatro do mesmo quimiotipo, e como não foi observada em todas as repetições ou blocos, foi testada a hipótese de contaminação de material dentro de laboratório (mistura de óleos essenciais) e nas parcelas de campo (mistura de genótipos).

A reinjeção dos óleos em cromatógrafo resultou na verificação do mesmo perfil químico com aparente mistura, e uma nova extração também repetiu os resultados. A partir daí se considerou a hipótese de mistura de estacas dentro das parcelas. As duas plantas da parcela, na repetição onde se suspeitava a ocorrência de contaminação, foram analisadas individualmente. O cromatograma de uma das duas plantas foi tipicamente linalol, da segunda tipicamente mirceno/cânfora, e o da parcela como um todo (as duas plantas) apresentou exatamente a sobreposição dos dois cromatogramas, ou seja, o mesmo perfil observado inicialmente para o IAC-10. As duas parcelas em que foi observado esse perfil químico foram excluídas de todas as análises, e os dados tratados como parcela perdida.

Essa constatação foi relevante para salientar a importância dos cuidados para evitar variação genética dentro de parcelas neste tipo de estudo de interação genótipo x ambiente. Este fato torna-se mais crítico ainda quando se trata de espécie de polinização cruzada, como é o caso da *L. alba*, em que se não for optada por variância genética nula dentro de parcelas ou dentro de tratamentos, como na presente pesquisa, cuidados especiais devem ser tomados por ocasião da amostragem e no tamanho efetivo da parcela. Assim, é possível assegurar a semelhança da composição genotípica entre as parcelas ou repetições (blocos) de mesmo tratamento para todo experimento realizado.

Deve-se ressaltar que a variação genotípica em perfis cromatográficos resulta em erros graves de variações quantitativas e qualitativas das substâncias, pois não pode-se caracterizar um quimiotipo a partir de amostras de plantas geneticamente diferentes. Muito provavelmente, por essa razão, nessa pesquisa foi observado um número reduzido de substância para cada quimiotipo (até quatro, no caso do mirceno/cânfora), enquanto na literatura é comum a descrição de mais de dez constituintes.

4.1.5 Altura de plantas (ALT)

No campo, foi possível observar com facilidade a diferença de hábito de crescimento das plantas pertencentes ao quimiotipo citral (IAC-16 a IAC-19), mirceno (IAC-20) e limoneno/carvona (IAC-13 a IAC-15) com as plantas dos demais quimiotipos. Elas apresentavam hábito tipicamente ereto, enquanto as plantas do linalol e mirceno/cânfora eram decumbentes (ou prostradas). A avaliação da altura de plantas realizada para os 20 genótipos em MA confirmou essas observações (Tabela 14). Trata-se, portanto, de uma característica de alta determinação genotípica. Esse mesmo perfil de hábito diferencial entre os quimiotipos foi observado por SANTOS (2001).

Tabela 14 - Médias de altura de plantas e hábito de crescimento para 20 genótipos avaliados em Monte Alegre do Sul-SP, pertencentes a cinco diferentes quimiotipos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

Genótipo	Quimiotipo	Hábito	Altura de Plantas média MA (cm)
IAC-1	linalol	prostrado	57,5 **de**
IAC-2	linalol	prostrado	54,0 **e**
IAC-3	linalol	prostrado	56,3 **e**
IAC-4	linalol	prostrado	61,0 **cde**
IAC-5	linalol	prostrado	57,3 **de**
IAC-6	linalol	prostrado	54,3 **e**
IAC-7	linalol	prostrado	56,3 **e**
IAC-8	linalol	prostrado	52,5 **e**
IAC-9	mirceno/cânfora	prostrado	54,0 **e**
IAC-10	mirceno/cânfora	prostrado	59,5 **de**
IAC-11	mirceno/cânfora	prostrado	60,0 **de**
IAC-12	mirceno/cânfora	prostrado	56,3 **e**
IAC-13	limoneno/carvona	ereto	78,0 **bcd**
IAC-14	limoneno/carvona	ereto	63,3 **cde**
IAC-15	limoneno/carvona	ereto	65,5 **cde**
IAC-16	citral	ereto	81,8 **bc**
IAC-17	citral	ereto	94,5 **ab**
IAC-18	citral	ereto	95,0 **ab**
IAC-19	citral	ereto	103,8 **a**
IAC-20	mirceno	ereto	77,5 **bcd**
CV=12,0%			Média = **66,9**

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente (5%).
MA: Monte Alegre do Sul (SP).
IAC-1 a IAC-8 linalol; IAC-9 a IAC-12 mirceno/cânfora; IAC-13 a IAC-15 limoneno/carvona; IAC-16 a IAC-19 citral; IAC-20 mirceno.

Os três genótipos limoneno/carvona apresentavam sintomas severos de virose, inclusive nanismo, o que é a provável causa da sua reduzida altura em relação aos outros genótipos de hábito ereto. Os quimiotipos linalol e mirceno/cânfora foram os de menor altura, como o esperado devido ao hábito de crescimento. Por outro lado, o hábito prostrado desses indivíduos permite que os ramos que tocam o chão enraízem e contribuam para a colonização rápida no seu habitat.

Entre os indivíduos do grupo linalol, o IAC-4 destacou-se com uma altura média de 61cm, e o IAC-8, maior produtor dessa substância (% relativa no óleo), apresentou a menor média de todos os genótipos avaliados (52,5cm). A altura máxima mensurada foi de 103,8cm do genótipo IAC-19 (citral), bastante inferior ainda à altura máxima de *L. alba* descrita na literatura, de 170cm (CASTRO, 2001) a 200cm (SALIMENA, 2000).

4.1.6 Virose (VIR)

A avaliação dos dez genótipos nos seis experimentos permitiu a identificação de um grupo suscetível ao CMV, representado pelos genótipos do quimiotipo limoneno/carvona IAC-13 e IAC-14 (Tabela 15).

Tabela 15 - Médias de sintomas de virose, com base em escala de 1 a 5, considerando 10 genótipos e 6 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

	Experimentos						
Genótipos*	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**MA**	**PI**	**Médias**
IAC-1	1,6 BC **a**	1,5 B **a**	1,0 B **a**	1,0 C **a**	1,0 C **a**	1,0 C **a**	1,2 CD
IAC-2	1,0 C **a**	1,2 B **a**	1,2 B **a**	1,3 BC **a**	1,0 C **a**	1,0 C **a**	1,1 D
IAC-3	1,0 C **a**	1,3 B **a**	1,0 B **a**	1,0 C **a**	1,1 BC **a**	1,0 C **a**	1,1 D
IAC-4	1,3 BC **a**	1,4 B **a**	1,5 B **a**	1,4 BC **a**	1,0 C **a**	1,0 C **a**	1,3 CD
IAC-9	1,0 C **a**	1,0 B **a**	1,5 B **a**	2,2 B **a**	1,3 BC **a**	2,1 B **a**	1,5 BC
IAC-10	1,7 BC **a**	1,2 B **a**	1,0 B **a**	1,7 BC **a**	1,5 BC **a**	1,2 C **a**	1,4 BCD
IAC-11	2,2 B **a**	2,1 B **a**	1,0 B **a**	1,6 BC **a**	1,6 BC **a**	2,0 B **a**	1,7 B
IAC-13	5,0 A **a**	4,7 A **a**	5,0 A **a**	5,0 A **a**	4,7 A **a**	4,9 A **a**	4,9 A
IAC-14	4,6 A **a**	5,0 A **a**	5,0 A **a**	5,0 A **a**	5,0 A **a**	5,0 A **a**	4,9 A
IAC-16	1,3 BC **a**	1,0 B **a**	1,0 B **a**	1,0 C **a**	1,7 B **a**	1,1 C **a**	1,2 CD
Médias	1,9 **a**	1,9 **a**	1,7 **a**	1,9 **a**	1,8 **a**	1,8 **a**	1,35

CV=12,1% Interação GXE*

Médias com mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (5%) entre experimentos.
Médias com mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente (5%) entre genótipos.
IAC-1 a IAC-4 linalol; IAC-9 a IAC-11 mirceno/cânfora; IAC-13 e IAC-14 limoneno/carvona; IAC-16 citral.
*significativo a 5% de probabilidade.
C1: com irrigação e com adubo (Campinas); C2: sem irrigação e com adubo (Campinas); C3: com adubação e sem adubo (Campinas); C4: sem irrigação e sem adubo (Campinas); MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).

Os demais genótipos foram considerados resistentes a esta virose, com valores médios variando de 1,1 a 1,7 quanto à agressividade de sintomas. A interação GxE foi significativa e não houve efeito de experimento. Estudos sobre a herança da resistência a essa virose, após a sua identificação, podem ser feitos a partir de cruzamentos controlados entre os quimiotipos resistentes com o quimiotipo suscetível.

Quando foi realizada a análise conjunta para os 20 genótipos, mantiveram-se os genótipos do quimiotipo limoneno/carvona como estatisticamente suscetíveis e os do linalol como resistentes (Tabela 16). Surgiu um grupo intermediário, formado por dois genótipos de quimiotipo citral (IAC-18 e IAC-19) e pelo IAC-20 (mirceno), com notas variando de 2,8 a 3,5.

Tabela 16 - Médias de sintomas de virose, com base em escala de 1 a 5, considerando 20 genótipos e 2 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

	Experimentos*		
Genótipos*	**MA**	**PI**	**Médias**
IAC-1	1,0 D **a**	1,0 C **a**	1,0 F
IAC-2	1,0 D **a**	1,0 C **a**	1,0 F
IAC-3	1,1 CD **a**	1,0 C **a**	1,1 F
IAC-4	1,0 D **a**	1,0 C **a**	1,0 F
IAC-5	1,0 D **a**	1,0 C **a**	1,0 F
IAC-6	1,0 D **a**	1,0 C **a**	1,0 F
IAC-7	1,0 D **a**	1,0 C **a**	1,0 F
IAC-8	1,0 D **a**	1,0 C **a**	1,0 F
IAC-9	1,3 CD **b**	2,1 B **a**	1,7 CDE
IAC-10	1,5 CD **a**	1,2 C **a**	1,3 DEF
IAC-11	1,6 CD **a**	2,0 B **a**	1,8 CD
IAC-12	1,6 CD **b**	2,4 B **a**	2,0 C
IAC-13	4,7 A **a**	4,9 A **a**	4,8 A
IAC-14	5,0 A **a**	5,0 A **a**	5,0 A
IAC-15	4,2 A **a**	4,9 A **a**	4,6 A
IAC-16	1,7 C **a**	1,1 C **b**	1,4 DEF
IAC-17	1,5 CD **a**	1,0 C **b**	1,2 EF
IAC-18	3,0 B **a**	2,6 B **a**	2,8 B
IAC-19	2,9 B **b**	4,0 A **a**	3,4 B
IAC-20	3,0 B **b**	4,1 A **a**	3,5 B
Médias	1,8 **b**	1,9 **a**	1,4

CV=8,7% Interação GXA*

Médias com mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (5%) entre experimentos.
Médias com mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente (5%) entre genótipos.
IAC-1 a IAC-8 linalol; IAC-9 a IAC-12 mirceno/cânfora; IAC-13 a IAC-15 limoneno/carvona; IAC-16 a IAC-19 citral; IAC-20 mirceno.
MA: Monte Alegre do Sul (SP); PI: Pindorama (SP).
*significativo a 5% de probabilidade.

4.1.7 Análise dentro do quimiotipo linalol

Somente para o caso do quimiotipo linalol, devido à sua notável importância (FRIGHETTO & OLIVEIRA, 1998), os genótipos (IAC-1 a IAC-8) foram analisados estatisticamente e comparados entre si para massa de folha seca (MFS), rendimento de óleo (RED) e porcentagem de linalol presente no óleo (% linalol) (Tabela 17).

Tabela 17 – Média de massa de folha seca, rendimento de óleo e proporção relativa de linalol no óleo para genótipos do quimiotipo linalol avaliados em 6 e 2 experimentos (ANAVA e Teste de Tukey a 5%).

	Características					
	Massa Folha Seca (g)		**Rendimento Óleo (%)**		**% Linalol**	
Genótipos	**2 Exp***	**6 Exp***	**2 Exp***	**6 Exp***	**2 Exp***	**6 Exp***
IAC-1	100,0 **a**	82,0 **a**	0,97 **c**	1,19 **a**	78,4 **b**	75,7 **a**
IAC-2	92,3 **a**	86,7 **a**	1,22 **ab**	1,28 **a**	78,3 **b**	76,6 **a**
IAC-3	84,6 **a**	78,6 **a**	1,04 **bc**	1,22 **a**	78,7 **b**	76,9 **a**
IAC-4	92,2 **a**	87,0 **a**	1,11 **abc**	1,22 **a**	79,2 **ab**	76,3 **a**
IAC-5	104,3 **a**		1,05 **bc**		78,2 **b**	
IAC-6	88,4 **a**		1,19 **ab**		78,3 **b**	
IAC-7	111,2 **a**		1,07 **bc**		77,9 **b**	
IAC-8	84,1 **a**		1,29 **a**		81,3 **a**	
Média	94,42	83,54	1,12	1,26	78,78	76,4
CV (%)	15,1	15,2	11,0	11,2	0,7	1,0
GxE	ns	ns	**	**	**	**

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente (5%).
*efeito de experimentos significativo (5%); **interação genótipo x experimento significativa (5%); ns=não significativo (5%).

Os quatro genótipos presentes nos seis experimentos não diferiram entre si para nenhuma das características, provavelmente em conseqüência da similaridade genética detectada entre eles, posteriormente, com as análises multivariadas.

Por outro lado, foi detectado efeito de experimento em todas as análises e interação GxE significativa (5%) para RED e porcentagem de linalol no óleo. O genótipo IAC-8 apresentou as maiores médias de rendimento e porcentagem de linalol, com 1,29% e 81,3% (respectivamente), e apesar de menor média de MFS, não diferiu estatisticamente dos demais.

A significância da interação GxE para a análise de rendimento dos quatro genótipos de linalol em todos os ambientes (seis), permitiu a realização de uma análise de estabilidade e adaptabilidade fenotípica (Figura 9).

Conforme comentado acima, os quatro genótipos foram estatisticamente iguais para as três características principais na produção de óleo (MFS, RED e %linalol). Assim, essa análise teve a finalidade de tentar diferenciar tais materiais em relação à estabilidade de rendimento, os quais pertencem ao principal grupo químico dessa espécie em termos econômicos.

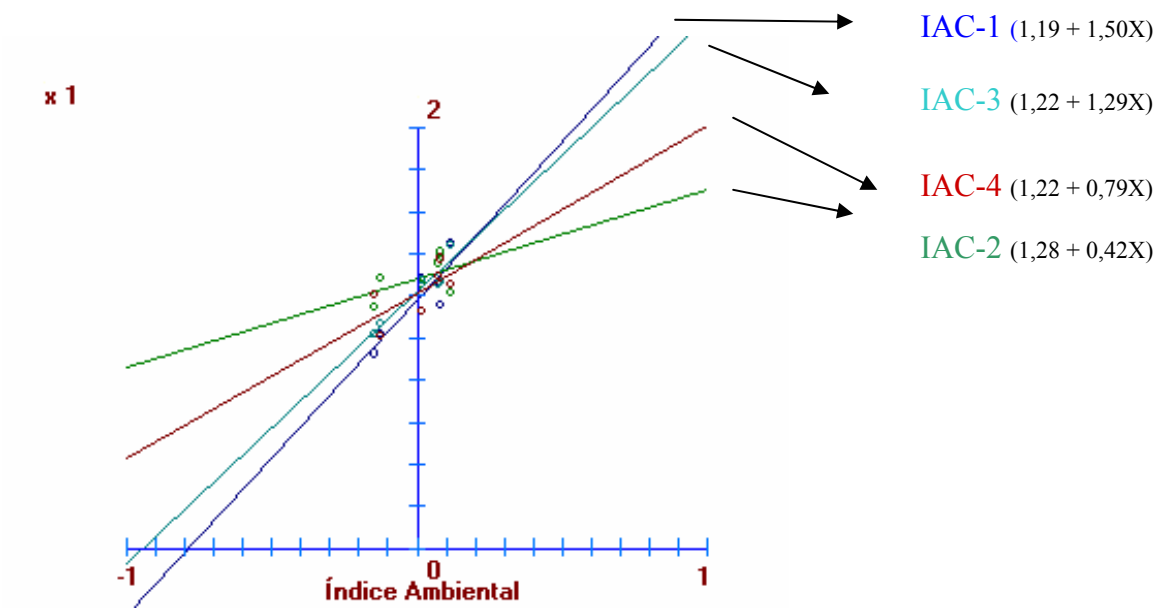

Figura 9 - Análise de estabilidade e adaptabilidade fenotípica de rendimento de óleo essencial para os quatro genótipos do quimiotipo linalol presentes nos seis experimentos.

Todos os quatro foram estáveis ou previsíveis pelos desvios de regressão não significativos. O IAC-1 e IAC-3 foram responsivos para ambientes favoráveis, com a angulação da reta bastante acentuada ($\beta>1$), tornando-os inadequados para ambientes considerados na presente pesquisa e pelo programa utilizado como desfavoráveis. Por outro lado, esses foram os genótipos com os maiores coeficientes de determinação genotípica (R^2=79,0% e 89,6%, respectivamente). O IAC-2 e IAC-4 tiveram um baixo valor de R^2 (25,3% e 46,3%, respectivamente), apesar deste último ser recomendável para os dois tipos de ambientes ($\beta=1$).

4.1.8 Efeito geral de adubação e irrigação

Para avaliar o efeito dos tratamentos de adubação e irrigação provocados no campo de Campinas, foram consideradas: MFF, MFS, RED, VIR, e CQO (porcentagem relativa de: linalol; 1,8-cineol; limoneno; carvona; β-mirceno; cânfora; trans-cariofileno, e; α-fecheno).

Conforme mostra a tabela 18, o efeito de adubação foi significativo (5%) apenas para MFF e MFS, e o efeito de irrigação significativo para MFF e proporção de linalol no óleo (%).

Tabela 18 - Efeitos de adubação e irrigação testados para 10 genótipos, considerando diferentes características fenotípicas (ANAVA e teste de Tukey a 5%).

Característica Avaliada	Tratamentos				C.V. (%)
	Adubação		Irrigação		
	com	sem	com	sem	
Massa de Folha Fresca (g/parcela)	276,9 **b**	309,7 **a**	276,6 **b**	310,0 **a**	6,0
Massa de Folha Seca (g/parcela)	81,0 **b**	94,0 **a**	83,1 a	91,7 a	9,2
Rendimento de Óleo Essencial (%)	0,90 a	0,92 a	0,90 a	0,92 a	5,3
Sintomas de Virose (escala 1-5)	1,87 a	1,80 a	1,79 a	1,89 a	7,9
Proporção de Linalol no Óleo (%)	75,6 a	74,9 a	75,9 **a**	74,7 **b**	0,6
Proporção de 1,8-Cineol no Óleo (%)	11,3 a	11,3 a	11,6 a	11,1 a	1,7
Proporção de Limoneno no Óleo (%)	32,8 a	30,9 a	30,7 a	32,0 a	2,7
Proporção de Carvona no Óleo (%)	50,2 a	51,7 a	51,4 a	50,5 a	1,0
Proporção de β-Mirceno no Óleo (%)	25,5 a	25,8 a	25,6 a	25,8 a	3,4
Proporção de Cânfora no Óleo (%)	29,3 a	30,1 a	31,1 a	29,1 a	3,2
Proporção de Trans-Cariofileno no Óleo (%)	7,6 a	6,8 a	6,0 a	7,3 a	8,8
Proporção de α-Fecheno no Óleo (%)	6,8 a	6,8 a	6,7 a	6,8 a	2,3

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente (5%).

Essas diferenças estatísticas mostram a heterogeneidade provocada no campo com os tratamentos de adubação e irrigação, os quais tiveram a exata finalidade de promover ambientes diferentes para avaliar a magnitude da interação GxE, efeitos de G e de E, como objetivo inicial do presente estudo. A maior produção de folhas observada para o tratamento sem adubação pode ser em decorrência do excesso de nutrientes citado anteriormente.

Nota-se que para características relativas ao crescimento das plantas (MFS e MFF), houve significância entre os experimentos, e que para aquelas que refletem variações fitoquímicas, ou seja, em nível de produção de óleos totais e composição, a detecção de variação de forma acentuada foi praticamente inexistente. Novamente, e pelo menos para esses genótipos de *L. alba*, as variações do meio ambiente que provocaram alterações nas características de parte aérea (MFF, MFS, ALT e VIR) não refletiram, proporcionalmente, nas características relativas aos óleos essenciais.

A significância de tratamentos de adubação na produção de folhas e de óleo já foi observada para outras espécies medicinais, como para *Achillea millefolium* L. (SCHEFFER & RONZELLI JÚNIOR, 1990) e *Mentha* spp. (MATTOS, 2000; INNECCO et al., 2003). UEDA & MING (1998) verificaram uma correlação positiva de adubação química e produção de biomassa em *Cymbopogon winterianus*, porém não observaram efeito da adubação na produção de óleo.

Em *L. alba*, MING (1994) observou uma correlação inversa na produção de biomassa e rendimento de óleo essencial quando trabalhou com diferentes doses de adubação orgânica. Por outro lado, no estudo de SANTOS & INNECCO (2004) não foram observadas variações de produção de massa foliar seca nem de rendimento de óleo com diferenciais de adubação nessa espécie.

A utilização de parcelas com ausência de variabilidade genética talvez tenha contribuído para evitar interações dentro das mesmas e, com isso, causar diferenças até qualitativas em cromatogramas, conforme salientado no item “Contaminação genotípica dentro de parcelas”.

4.2 Análises Multivariadas

4.2.1 Análise de agrupamento

A análise dos dez genótipos gerou a formação de quatro grupos distintos, os quais correspondem aos quatro quimiotipos presentes nos seis experimentos (Figura 10). O linalol e o mirceno/cânfora foram os grupos químicos mais próximos geneticamente, com 26% de similaridade. Em seguida, agrupou-se o limoneno/carvona, com 17% de semelhança com os dois primeiros. O citral apresentou 100% de dissimilaridade aos demais, e como foi representado por apenas um indivíduo, compôs sozinho o quarto grupo do dendrograma.

Dessa forma, a avaliação da variação fenotípica foi eficiente para distinguir grupos geneticamente distantes entre si, anteriormente caracterizados praticamente por apenas uma característica; a composição química dos óleos. Isso demonstra a determinação genotípica para a expressão dos óleos essenciais.

Dentro dos grupos químicos a similaridade genética foi alta, principalmente entre os indivíduos do quimiotipo linalol, os quais apresentaram mais de 90% de similaridade. O IAC-1 e IAC-3 formaram um mesmo grupo, com 93% de similaridade, o qual diferiu em menos de 1% do IAC-4, e o IAC-2 distanciou-se desse agrupamento em menos de 2%. Dentro do mirceno/cânfora os genótipos também pouco se diferenciaram, com cerca de 10% de dissimilaridade. Os dois representantes do quimiotipo limoneno/carvona nessa análise (IAC-13 e IAC-14) apresentaram a maior distância entre indivíduos dentro de grupo químico (27%).

Da mesma forma, na análise dos 20 genótipos os agrupamentos formados corresponderam aos diferentes quimiotipos (Figura 11). A distância observada entre os quimiotipos foi pouco superior que na análise com 10 genótipos, e respondeu a um intervalo de 87 a 90%, sendo que o único grupo 100% distante foi o mirceno (representado nesse trabalho apenas pelo IAC-20).

Dentro do quimiotipo linalol, a distância máxima detectada foi de 18%, onde se conecta o genótipo mais divergente do grupo, o IAC-8. O IAC-13 e IAC-14 (limoneno/carvona) mantiveram a mesma distância entre si, sendo que o IAC-15 entrou neste dendrograma agrupando-se ao IAC-13. Assim, os dois primeiros genótipos são os mais divergentes dentro desse grupo.

Os três genótipos do quimiotipo mirceno/cânfora apresentaram uma maior divergência genética intergrupo aqui (23%, contra 11% detectado anteriormente). O IAC-12, ausente na análise anterior, agrupou-se ao IAC-11 com 13% de distância. A menor similaridade intergrupo foi verificada para os integrantes do citral, os quais foram até quase 50% divergentes entre si. Este fato foi inesperado uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas entre eles para os sub-componentes do óleo (neral, geranial e β-mirceno) e nem para RED.

Uma análise de agrupamento com base na composição química também foi realizada por SANTOS (2001) em *L. alba*. Ela obteve os agrupamentos com base na composição, porém os três genótipos do quimiotipo citral apresentaram apenas 15% de distância entre eles.

A similaridade genética observada dentro dos quimiotipos pode ser explicada pela origem de coleta do material na formação da coleção de germoplasma. Os genótipos do grupo linalol (IAC-1 a IAC-7), assim como todos os pertencentes ao mirceno-cânfora, foram coletados em uma mesma casa-de-vegetação no Setor de Entomologia do CEC/IAC, Campinas. Considerando que a coleta do IAC-8 foi realizada em um bairro distante de Campinas, é aceitável que ele apresente uma maior divergência em relação aos demais do grupo linalol. Porém, a hipótese que esses indivíduos possam ser clones, ou seja, geneticamente idênticos, está descartada. Essa informação baseia-se na detecção de polimorfismo fenotípico realizada nesse estudo, tendo em vista os diferentes experimentos em que o material foi testado.

Por outro lado, seria mais informativo selecionar genótipos mais divergentes para as pesquisas. Isso indica que a seleção realizada com base nas diferenças morfológicas dos genótipos possa ter sido prejudicada pela alta plasticidade fenotípica que essa espécie apresenta (CORRÊA, 1992), apesar de IAREMA (2003) e GUPTA et al. (2001) não terem observado variações morfológicas com a mudança de ambiente de cultivo nessa espécie.

Através do método de Pearson, foi possível estabelecer os índices de correlação entre as variáveis MFF, MFS, RED, ALT, e VIR (Tabela 19). Como esperado, MFF foi altamente correlacionado com MFS, apresentando 98% de correlação positiva. A proporcionalidade entre essas duas características também foi observada por EHLERT (2003) em *L. alba*.

Tabela 19 - Matriz de correlação entre cinco características avaliadas, obtida através do método de Pearson.

Características	MFF	MFS	RED	VIR
Massa de Folha Seca (MFS)	**0,98**			
Rendimento de Óleo (RED)	-0,64	**-0,71**		
Virose (VIR)	0,45	0,42	-0,12	
Altura de Plantas (ALT)	0,52	0,59	-0,56	-0,12

MFF=massa de folha fresca.

Por outro lado, MFS apresentou uma correlação inversa de 71% com RED. Ou seja, quanto mais massa de folhas a planta produz, menos óleo é formado. Isso faz

sentido uma vez que, se a planta está sendo cultivada em um ambiente favorável, portanto sem estresse, provavelmente reduz-se a necessidade de uma alta produção de óleo, como agente de defesa ou para plasticidade fenotípica.

Esses resultados explicam a correlação inversa entre MFS e RED observada nas análises univariadas, em que a primeira apresentou médias mais elevadas para o local onde a segunda apresentou médias mais baixas, e vice-versa. Essa correlação negativa pode dificultar a seleção do melhorista para maior produtividade de óleo, mas provavelmente, o ganho de seleção para MFS possa superar o ganho para RED.

Como a infecção por virose reduz o vigor da planta, conforme verificado anteriormente na avaliação da altura (ALT), era esperado observar considerável correlação entre VIR e ALT e/ou VIR e MFS, mas esse caráter não se correlacionou de forma significativa com nenhum outro. Provavelmente a formação de internódios curtos (nanismo) e a elevada indução de brotações laterais nos ramos das plantas infectadas contribuíram para essa falta de correlação significativa com produção de folhas.

4.2.2 Análise de componentes principais (ACP)

A visualização da distância entre os genótipos em um plano tridimensional, gerada a partir da ACP, resultou novamente em agrupamentos de acordo com a composição química pré-estabelecida (quimiotipos). A observação desse tipo de agrupamento tanto na análise com 10 quanto na com 20 genótipos indica a robutez dos resultados obtidos.

O gráfico da primeira ACP (10 genótipos) está apresentado na Figura 12. Os dois primeiros componentes principais absorveram 71,9% de toda variação, sendo que com o terceiro componente houve uma absorção de 98,8% (Tabela 20). Assim, os três componentes do gráfico exprimem praticamente toda a variação observada na avaliação fenotípica analisada.

De acordo com os índices dos autovetores associados, foi possível detectar quais das 14 variáveis consideradas mais contribuíram para cada componente. Assim, a maior influência do primeiro componente foi pelo trans-cariofileno, do segundo pelo α-fecheno e o terceiro foi mais relacionado com a carvona.

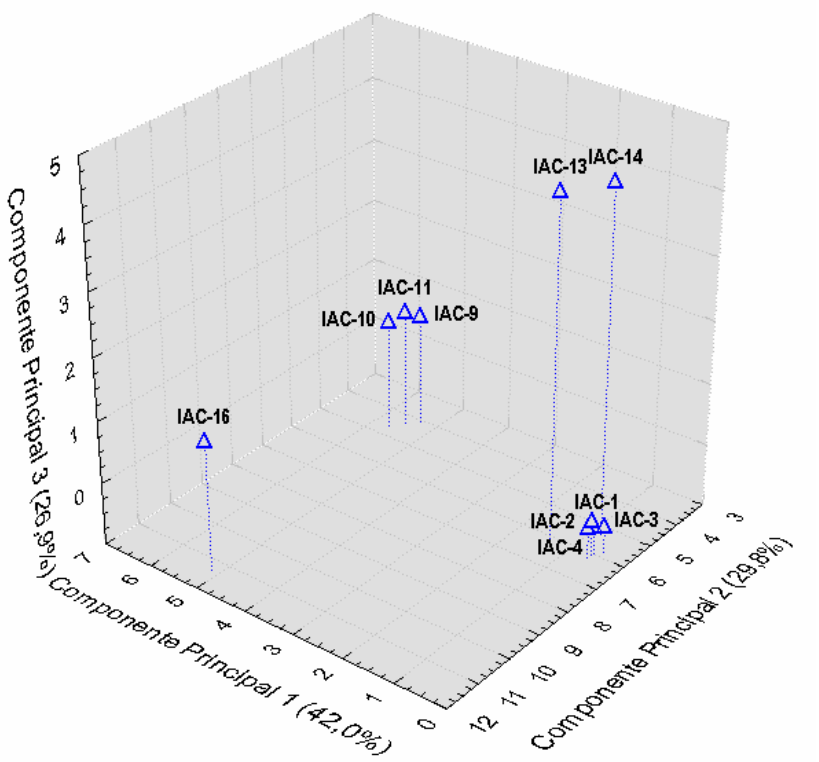

Figura 12 - Análise de componentes principais para dez genótipos de *L. alba*, pertencentes aos quimiotipos linalol (IAC-1 a IAC-4), mirceno/cânfora (IAC-9 a IAC-11), limoneno/carvona (IAC-13 e IAC-14), e citral (IAC-16), baseada em 14 variáveis.

Tabela 20 - Estimativas dos autovalores associados aos componentes principais, juntamente com sua importância relativa (raiz %) e acumulada, referentes às 14 variáveis avaliadas em 10 genótipos de *Lippia alba*.

Componentes	Raiz	Raiz (%)	Acumulada (%)
1	5,8804	42,0030	42,0030
2	4,1797	29,8547	71,8517
3	3,7682	26,9155	98,7732
4	0,1594	1,1386	99,9118
5	0,0057	0,0409	99,9528
6	0,0036	0,0258	99,9785
7	0,0020	0,0145	99,9931
8	0,0008	0,0058	99,9988
9	0,0002	0,0012	100,0000
10	0,0000	0,0000	100,0000
11	0,0000	0,0000	100,0000
12	0,0000	0,0000	100,0000
13	0,0000	0,0000	100,0000
14	0,0000	0,0000	100,0000

Algumas variáveis apresentam um alto valor de correlação, como pode ser visto na tabela 21. Segundo o estudo de CHIORATO (2004), o alto valor de correlação das características permite que algumas delas sejam descartadas da análise, porém o melhorista deve estudar cada caso e considerar a importância agronômica que elas apresentam.

Tabela 21 - Coeficientes de correlação fenotípica entre 14 variáveis avaliadas em 10 genótipos de *Lippia alba*.

Variáveis	MFF	MFS	RED	VIR	Limoneno	Carvona	Linalol	1,8-Cineol	β-Mirceno	Cânfora	T-Cariofileno	α-Fecheno	Neral
MFS	**0,96**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RED	-0,47	-0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VIR	-0,25	-0,01	0,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Limoneno	-0,26	-0,02	0,26	**1,00**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvona	-0,23	0,00	0,36	**0,99**	**0,99**	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol	-0,26	-0,45	0,70	-0,49	-0,50	-0,41	-	-	-	-	-	-	-
1,8-Cineol	-0,26	-0,46	0,70	-0,49	-0,50	-0,41	**0,99**	-	-	-	-	-	-
β-Mirceno	0,24	0,25	-0,95	-0,29	-0,28	-0,40	-0,65	-0,65	-	-	-	-	-
Cânfora	-0,13	-0,11	-0,77	-0,22	-0,19	-0,33	-0,53	-0,53	**0,92**	-	-	-	-
T-Cariofileno	-0,12	-0,11	-0,77	-0,22	-0,19	-0,33	-0,53	-0,53	**0,92**	**1,00**	-	-	-
α-Fecheno	-0,13	-0,12	-0,77	-0,22	-0,19	-0,33	-0,53	-0,53	**0,92**	**1,00**	**1,00**	-	-
Neral	0,91	**0,92**	-0,46	-0,19	-0,21	-0,17	-0,27	-0,27	0,18	-0,22	-0,22	-0,22	-
Geranial	0,91	**0,92**	-0,46	-0,19	-0,21	-0,17	-0,27	-0,27	0,18	-0,22	-0,22	-0,22	**1,00**

MFS: massa de folha seca; MFF: massa de folha fresca; RED: rendimento de óleo; VIR: virose.
Os valores em negrito indicam as correlações consideradas redundantes nessa análise.

Assim, MFF ou MFS poderia ser futuramente descartada da análise, pois elas estão 96% correlacionadas, significância essa vista na análise anterior de correlação. Somado a isso, ambas apresentam o mesmo valor informativo, porém, MFS não contém a fonte de variação provocada pela quantidade de água nas folhas.

As substâncias do quimiotipo citral (neral e geranial), maior produtor de folhas, apresentaram alta correlação à MFS e poderiam ser desconsiderados. O limoneno e a carvona foram redundantes em relação a VIR, uma vez que todos os genótipos desse quimiotipo apresentavam sintomas severos de virose. Em geral, as substâncias químicas do óleo correlacionaram-se significativamente às demais dentro do mesmo quimiotipo,

como trans-cariofileno e α-fecheno, linalol e 1,8-cineol, entre outras, permitindo que a representação seja feita por apenas uma das substâncias de cada grupo.

A ACP com os 20 genótipos e 16 variáveis resultou na formação de cinco grupos, novamente correspondentes aos respectivos quimiotipos (Figura 13). Os genótipos do citral ficaram mais dispersos no gráfico devido à divergência entre eles, detectada também com a análise de agrupamento. O IAC-20 formou um grupo isolado, lembrando que ele é o único pertencente do quimiotipo mirceno.

Os quatro integrantes do linalol agruparam-se de forma muito próxima aos que já haviam sido plotados no outro gráfico, confirmando a proximidade genética entre eles. Devido à sobreposição dos pontos, não foi possível visualizar um maior distanciamento do IAC-8, o qual foi avaliado como o mais divergente do grupo com o dendrograma.

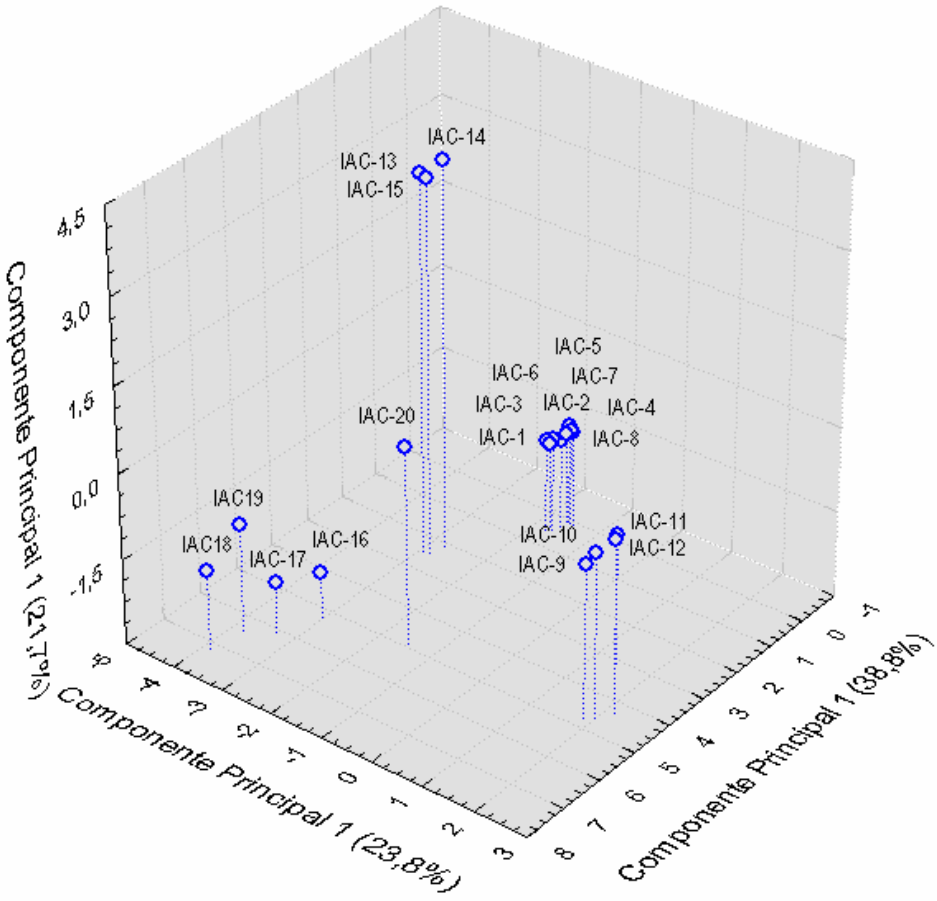

Figura 13 - Análise de componentes principais para 20 genótipos de *L. alba*, pertencentes aos quimiotipos linalol (IAC-1 a IAC-8), mirceno/cânfora (IAC-9 a IAC-12), limoneno/carvona (IAC-13 a IAC-15), citral (IAC-16 a IAC-19) e mirceno (IAC-20), baseada em 16 variáveis.

Os três primeiros componentes principais somaram 84,3% de toda variância obtida (Tabela 22), mesmo valor relatado no trabalho de SANTOS (2001) para a ACP de substâncias químicas de *L. alba*. As variáveis que mais influenciam o primeiro, segundo e terceiro componente principal foram limoneno, α-pineno, e MFF, respectivamente.

Tabela 22 - Estimativas dos autovalores associados aos componentes principais, juntamente com sua importância relativa (raiz %) e acumulada, referentes às 16 variáveis avaliadas em 20 genótipos de *Lippia alba*.

Componentes	Raiz	Raiz (%)	Acumulada (%)
1	6,2047	38,7794	38,7794
2	3,8079	23,7999	62,5794
3	3,4690	21,6817	84,2611
4	1,6485	10,3031	94,5642
5	0,5274	3,2967	97,8609
6	0,2244	1,4030	99,2638
7	0,0576	0,3599	99,6238
8	0,0317	0,1980	99,8218
9	0,1472	0,0920	99,9138
10	0,0055	0,0341	99,9478
11	0,0042	0,0264	99,9743
12	0,0028	0,0175	99,9917
13	0,0011	0,0068	99,9985
14	0,0002	0,0013	99,9998
15	0,0000	0,0002	99,9999
16	0,0000	0,0000	100,0000

Na tabela de correlação entre as 16 variáveis analisadas para 20 genótipos (Tabela 23) podem ser observadas as mesmas correlações entre as características vistas para 10 genótipos. MFF e MFS apresentam um alto valor de correlação positiva, assim como VIR com limoneno e carvona e entre as substâncias de mesmo quimiotipo. A ALT, incluída apenas nesta ACP, apresentou uma alta correlação com os genótipos do citral, os quais são muito vigorosos e apresentam hábito ereto.

Apesar da detecção de significância na correlação de substâncias de mesmo quimiotipo não representar um ponto prático, ela indica que algumas dessas variáveis podem ser desconsideradas da análise.

Tabela 23 - Coeficientes de correlação fenotípica entre 16 variáveis avaliadas em 20 genótipos de *Lippia alba*.

Variáveis	MFF	MFS	RED	VIR	Limoneno	Carvona	Linalol	1,8-Cineol	β-Mirceno	Cânfora	T-Cariofileno	α-Fecheno	Neral	Geranial	α-Pineno
MFS	**0,98**														
RED	-0,62	-0,68													
VIR	0,42	0,39	-0,12												
Limoneno	0,47	-0,05	0,24	**0,82**											
Carvona	0,01	-0,05	0,29	**0,83**	**0,99**										
Linalol	-0,62	-0,63	0,78	-0,64	-0,39	-0,35									
1,8-Cineol	-0,61	-0,62	0,76	-0,63	-0,39	-0,34	**0,99**								
β-Mirceno	0,54	0,56	-0,83	0,12	-0,29	-0,33	-0,65	-0,64							
Cânfora	-0,07	0,00	-0,52	-0,14	-0,11	-0,21	-0,41	-0,40	0,44						
T-Cariofileno	-0,07	0,00	-0,52	-0,14	-0,10	-0,21	-0,41	-0,40	0,44	**0,99**					
α-Fecheno	-0,07	0,00	-0,52	-0,14	-0,11	-0,21	-0,41	-0,40	0,44	**1,00**	**1,00**				
Neral	0,64	0,65	-0,58	0,03	-0,24	-0,21	-0,40	-0,40	0,29	-0,25	-0,25	-0,25			
Geranial	0,64	0,64	-0,58	0,03	-0,24	-0,21	-0,40	-0,40	0,29	-0,25	-0,25	-0,25	**1,00**		
α-Pineno	0,21	0,17	-0,20	0,24	-0,11	-0,10	-0,19	-0,19	0,65	-0,11	-0,11	-0,11	-0,11	-0,11	
ALT	0,55	0,61	-0,56	-0,12	-0,31	-0,30	-0,36	-0,40	0,32	0,00	-0,02	0,00	**0,82**	**0,81**	-0,21

MFS = massa de folha seca; MFF = massa de folha fresca; RED = rendimento de óleo; VIR = virose; ALT = altura.
Os valores em negrito indicam as correlações consideradas redundantes nessa análise.

4.2.3 Análise com marcadores RAPD

A variação nos perfis de bandas dos 20 genótipos estudados geradas a partir de RAPD resultou na obtenção de 183 bandas polimórficas. As relações genéticas entre os indivíduos foram estimadas utilizando os coeficientes de similaridade de ligação simples (*Simple Linkage*) e Jaccard. Como ambos os métodos resultaram nos mesmos agrupamentos, apenas o dendrograma deste segundo está apresentado na figura 14.

Os resultados dessa análise foram bastante semelhantes aos da análise de divergência com base em características fenotípicas. Somando esses resultados com a estabilidade dos agrupamentos desta, utilizando duas diferentes metodologias, pode-se concluir que houve uma elevada consistência dos agrupamentos formados.

Assim, os quatro grupos formados respondem basicamente aos grupos químicos que classificam o presente material desde a caracterização prévia realizada no início do estudo. Exceto o IAC-20 (mirceno), que agrupou-se ao quimiotipo citral com quase 40% de similaridade.

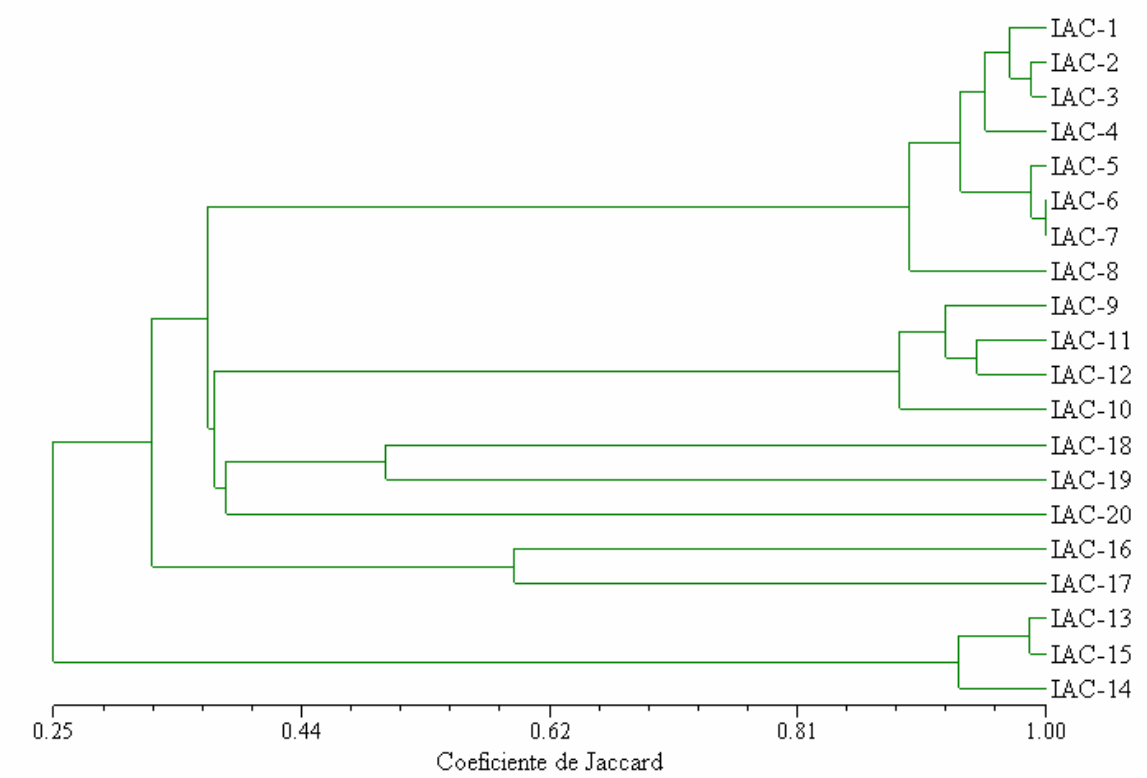

Figura 14 - Dendrograma dos 20 genótipos de *L. alba*, pertencentes aos quimiotipos linalol (IAC-1 a IAC-8), mirceno/cânfora (IAC-9 a IAC-12), limoneno/carvona (IAC-13 e IAC-15), citral (IAC-16 a IAC-19) e mirceno (IAC-20). As distâncias genéticas foram obtidas pela análise de 183 bandas polimórficas. Os coeficientes de similaridade foram gerados de acordo com Jaccard e o agrupamento foi feito segundo o método de UPGMA.

O grupo do linalol foi 40% similar ao mirceno/cânfora, 10% mais que a detecção realizada pela análise de agrupamento, e o limoneno/carvona foi 25% similar a todos os outros quimiotipos. O citral foi dividido em dois grupos distintos, um compreendendo o IAC-16 e IAC-17 (60% similares) e o segundo formado pelo IAC-18 e IAC-19 (50% similares), sendo que este foi mais próximo ao linalol, mirceno/cânfora e ao mirceno que aos demais integrantes do seu próprio grupo químico. Esses resultados diferiram daqueles obtidos através da avaliação fenotípica, na qual o mirceno (IAC-20) foi 100% divergente de todos os outros quimiotipos.

Dentro do linalol, ainda foi observada uma similaridade de 90% entre os genótipos, sendo que para o IAC-6 e o IAC-7 não foi detectado polimorfismo genotípico. Independentemente disso, o polimorfismo fenotípico foi capaz de mostrar diferença entre eles, e pode ser considerado confiável uma vez que o trabalho considerou diversos ambientes e quatro repetições na avaliação. Novamente o IAC-8

mostrou a menor similaridade intergrupo, o que confirma a sua divergência em relação aos demais genótipos do quimiotipo linalol.

O agrupamento de diferentes genótipos em grupos quimicamente similares, utilizando a multivariada com base em uma matriz binária, foi relatado também em *L. alba* por SANTOS (2001). Isso indica, além da elevada determinação genética no perfil químico qualitativo dos óleos, a adequação desse marcador para caracterizar genótipos dessa espécie.

As informações de divergência genética (tanto fenotípica quanto genotípica) entre os genótipos podem ser bastante úteis também para futuros programas de melhoramento dessa espécie. Os parentais envolvidos em cruzamentos podem ser determinados de acordo com a distância genética entre eles para buscar a máxima exploração da heterose em indivíduos superiores na progênie (CRUZ & REGAZZI, 1994). Isso torna-se ainda mais vantajoso uma vez que, identificada a melhor capacidade específica de combinação, o genótipo selecionado pode ser facilmente clonado e multiplicado para distribuição comercial como um novo cultivar.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

a) Os quimiotipos testados foram estatisticamente contrastantes para características fenotípicas, enquanto dentro de quimiotipo os contrastes significativos entre genótipos foram em menor número.

b) A magnitude da interação genótipo x ambiente para rendimento de óleo essencial foi pouco ampla, indicando alta determinação genotípica para essa característica.

c) Os quimiotipos linalol e limoneno/carvona foram superiores para rendimento de óleo em relação aos quimiotipos mirceno/cânfora, citral e mirceno.

d) As variações significativas entre os experimentos para a composição química do óleo refletiram em variações muito inferiores em relação àquelas relacionadas à produção de óleo e aos caracteres de parte aérea.

e) A variação na composição química do óleo essencial não foi em nenhum caso de natureza qualitativa, e a variação quantitativa foi de baixa magnitude.

f) Tanto a análise fenotípica quanto os marcadores de DNA do tipo RAPD foram ferramentas eficientes para a formação de agrupamentos robustos e quantificação de divergência genética.

g) A avaliação das características fenotípicas desse estudo foram suficientes para avaliar e caracterizar os genótipos estudados.

h) Os genótipos do quimiotipo mirceno/cânfora foram mais adequados a ambientes favoráveis.

i) A divergência genética detectada para os genótipos do quimiotipo citral não refletiram na expressão dos compostos majoritários.

j) Os genótipos do quimiotipo linalol foram resistentes ao *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) e os pertencentes ao limoneno/carvona foram suscetíveis. Os genótipos IAC-18 e IAC-19 do quimiotipo citral, assim como o IAC-20 do mirceno, foram moderadamente resistentes.

k) Os melhores genótipos em relação às características fenotípicas avaliadas foram o IAC-8 (linalol), IAC-13 (limoneno/carvona) e IAC-17 (citral).

l) Os resultados de divergência genética e de estabilidade podem contribuir de forma efetiva para a exploração da máxima heterose em futuros programas de melhoramento de *Lippia alba*.

m) As características que mais exprimiram a variância dos genótipos estudados (Análise de Componentes Principais) foram as substâncias químicas.

n) As diferentes substâncias que compõe um mesmo óleo apresentaram redundância para estabelecer a classificação dos genótipos, sendo que apenas uma por quimiotipo é suficiente, na maioria dos casos.

o) A avaliação de altura de plantas não contribuiu de forma significativa para caracterizar os genótipos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; SÁNCHEZ-PALOMINO, S.; CARRASCO, L. Antiviral activity of medicinal plants extracts. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 3, p.198-202, 1997.

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Ilinois, Carol Stream, USA, 469 p, 1995.

ALEA, J.A.P.; LUIS, A.G.O.; PÉREZ, A.R.; JORGE, M.R.; BALUJA, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Rev Cubana Farm**, v. 30, p. 1-5, 1997.

ALLARD, R.W. & BRADSHAW, R.I. Implications of genotype-environmental interactions in applied plant breeding. **Crop Sci**, v. 4, p. 503-507, 1964.

AREIAS, R.G.B.M.; PAIVA, D.M.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Similaridade genética de variedades crioulas de arroz, em função da morfologia, marcadores RAPD e acúmulo de proteínas nos grãos. **Bragantia**, v. 65, p. 19-28, 2006.

BAHL, J.R.; GARG, S.N.; SINGH, S.C.; BANSAL, R.P.; NAQVI, A.A.; KUMAR, S. Composition of linalool from *Lippia alba* grown in Indian plains. **Flavour Fragr J**, v. 15, n. 3, p. 199-200, 2000.

BAHL, J.R.; SINHA, S.; NAQVI, A.A.; BANSAL, R.P.; GUPTA, A.K.; KUMAR, S. Linalool-rich essential oil quality variants obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*. **Flavour Fragr J**, v. 17, n. 2, p. 127-132, 2002.

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

BIASI, L.A. & COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Cienc Rural**, v. 33, n. 3, p. 455-459, 2003.

BORÉM, A. & MIRANDA, G.V. Melhoramento de plantas (eds). Universiadade Federal de Viçosa, 4ª ed, p. 85-111, 2005.

BRADSHAW, A.D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. **Advances in Genetics**, v. 13, p. 115-155, 1965.

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

CACERES, A.; ALVAREZ, A.V.; OVANDO, A.E.; SAMAYOA, B.E. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases: screening of 68 plants against gram-positive bacteria. **J Ethnopharmacol**, v. 31, p. 193-208, 1991.

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

CHIORATO, A.F. Divergência genética em acessos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) do banco de germoplasma do Instituto Agronômico-IAC. 2004. Tese Dissertação (de Mestrado) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas. 2004.

CLAUS, P.H. & EDWARD, P. Pharmacognosy. Lea & Febiger 4ªed, Philadelphia, 565 p, 1961.

CORRÊA, C.B.V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt & Wilson - erva cidreira. **Rev Bras Farm**, v. 73, n. 3, p. 57-64, 1992.

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

COSTA, D.C.S.; MACHADO, M.A.; CAMPOS, A.N.; VICCINI, L.F.; PEIXOTO, P.H.P.; SALIMENA, F.R.G. Diversidade genética em *Lippia* spp. (Verbenaceae) da cadeia do espinhaço-MG por meio de marcadores moleculares RAPD. In: Congresso Nacional de Genética, 48., 2002, Águas de Lindóia. Anais. CD-Rom.

COSTA, M.; DI STASI, L.C.; KIRIZAWA, M.; MENDACOLLI, S.L.; GOMES, C.; TROLIN, G. Screening in mouse some medicinal plants used for anagelsic purposes in the state of São Paulo. **J Ethnopharmacol**, v. 27, p. 25-33, 1989.

CRUZ, C.D. Programa Genes – Versão Windows. Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, 642 p, 2001.

CRUZ, C.D. & REGAZZI, J.A. Divergência genética. In: Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético (eds). Viçosa: UFV, Minas Gerais: Brasil, p. 287-313, 1994.

DAHER, R.F.; PEREIRA, M.G.; PEREIRA, A.V.; JUNIOR, A.T.A. Genetic divergence among elephantgrass cultivars assessed by RAPD markers in composit simples. **Scientia Agrícola**, v. 59, p. 623-627, 2002.

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

DE LA CRUZ, M.G. O acesso aos fitoterápicos e plantas medicinais e a inclusão social – diagnóstico situacional da cadeia produtiva farmacêutica no estado de Mato Grosso. http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/diagnostico_situacional.pdf (31 março 2006).

DIAS, L.A.S. Análises multidimencionais. In: Alfenas, A.C. (ed). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, Minas Gerais, p. 405-475, 1998.

DI STASI, L.C.; SANTOS, E.M.G.; SANTOS, C.M. dos; HIRUMA, C.A. Erva cidreira. In: Plantas Medicinais da Amazônia (eds). São Paulo:UNESP, p. 65-66, 1989.

DO VALE, T.G.; FURTADO E.C.; SANTOS, J.G.; VIANA, G.S.B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 8, p. 709-714, 2002.

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, p. 91-94, 1983.

DWIVEDI, S.K. & KISHORE, N. Fungitoxicity of some essential oils against *Macrophomina phaseolina*. **Indian Perfumer**, v.34, p. 20-21, 1990.

EBERHART, S.A. & RUSSEL, W.A. Stability parameters for comparing varieties. **Crop Sci**, v. 6, p. 36-44, 1966.

EHLERT, P.A.D. Épocas de plantio, idades e horários de colheita na produção e qualidade do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., quimiotipo

limoneno/carvona. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2003.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA-CENARGEM, Brasília, 220 p, 1998.

FONTANEL, A. & TABATA, M. Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures - present aspects and prospects. In: Horisberger, M. (ed). Nestlé Research News, Vevey: Switzerland, p. 92-103, 1987.

FRANÇA, L.F. Uso de fluidos supercríticos no processamento de óleos essenciais. In: Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 3., 2005, Campinas.

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

GOMES, E.C.; MING, L.C.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; CONTI, A.; FILHO, A.W. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenacea). **Rev Bras Farm**, v. 74, n. 2, p. 29-32, 1993.

GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 3ed. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiros, Piracicaba, 1966.

GRÜNWALD, J. The market situationand marketing of herbal medicinal products (HMP) in Europe. In: World Congress on Medicinal and Aromatics Plants for Human Welfare, 2., 1997, Mendonza, Argentina. Abstract.

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

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

HUFF, D.R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm]. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, p. 927-934, 1993.

IAREMA, L.; AZEVEDO, A.A.; MEIRA, R.M.S.A.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C.; VENTRELLA, M.C. Morfo-anatomia foliar e caulinar de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivada *in vitro*. In: Congresso Nacional de Botânica, 54., 2003, Belém. Resumos. CD-Rom.

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. **Agric Food Sci Finl**, v. 10, p. 243-259, 2001.

INNECCO, R.; CRUZ, G.F.; VIEIRA, A.V.; MATTOS, S.H.; CHAVES, F.C.M. Espaçamento, época e número de colheitas em hortelã-rasteira (*Mentha x villosa* Huds). **Rev Cien Agron**, v. 34, n. 2, p. 247-251, 2003.

JULIÃO, L.S.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (erva-cidreira). **Rev Bras Farmacogn**, v. 13, p. 36-38, 2001.

KIMATI, H. & GALLI, F. Doenças da bananeira. In: Galli F.; Carvalho P.C.T.; Tokeshi H.; Balmer E.; Kimati H.; Cardoso C.O.N.; Salgado C.L.; Krügner T.L.; Cardoso

E.J.B.N.; Filho A.B. (eds). Manual de fitopatologia – doenças das plantas cultivadas. Editora Agronômica Ceres LTDA, São Paulo, p. 87-101, 1980.

KISHORE, N. & MISHRA, A.K. Effect of essential oils on sclerential germination of *Rhizoctonia solani*. **Nat Acad Sci Lett**, v. 14, p. 239-240, 1991.

LORENZO, D.; PAZ, D.; DAVIES, P.; VILAR, R.; CANIGUERAL, S.; DELACASSA, E. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown from Uruguay. **Flavour Fragr J**, v. 16, n. 5, p. 356-359, 2001.

MACHADO, A.A. & ZONTA, E.P. Manual do Sanest: Sistema de análises estatísticas para microcomputadores. Pelotas, UFPel, 102 p, 1991.

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

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

MATTOS, S.H. Estudos fitotécnicos da *Mentha arvensis* L. var. piperacens Holmes como produtora de mentol no Ceará. 2000. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2000.

MCLAFFERTY, F.W. & STAUFFER, D. The wiley/NBS registry of mass spectral data. Hardback Publisher, New York, Wiley, v. 7, 7872 p, 1989.

MING, L.C. Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba*. **Hortic bras**, v. 12, p. 49-52, 1994.

MORRISON, D.F. Multivariate statistical methods. New York: McGraw-Hill, 222 p, 1976.

OLIVEIRA, R.P.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MACHADO, M.A. Genetic divergence among hybrids of 'cravo' mandarim with 'pêra' sweet orange. **Scientia Agrícola**, v. 60, p. 115-118, 2003.

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

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

PIERRE, P.M.O. Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* Mill. N.E.Br (Verbenaceae). 2004. Tese Dissertação (de Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2004.

PICHERSKY, E & GANG, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 439-445, 2000.

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

RETAMAR, J.A. Variaciones fitoquimicas de la especie *Lippia alba* (salvia morada) y sus aplicaciones en la química fina. **Essenze Derivati Agrumari**, v. 16, p. 55-60, 1994.

ROHLF, F.J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: State University of New York Stony Brook, USA, 29 p, 1997.

SAITOU, N. & NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, p. 406-425, 1987.

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

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

SANTOS, M.M.F.B. dos. Efeito de extratos de duas formas de *Lippia alba* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) isolado de *Citrus* sp. 1996. Tese Dissertação (de Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1996.

SANTOS, M.R.A. dos & INNECCO, R. Adubação orgânica e altura de corte da erva-cidreira-brasileira. **Hortic Bras**, v. 22, n. 2, p. 182-185, 2004.

SANTOS, M.R.A. dos & INNECCO, R. Influência de períodos de secagem de folhas no óleo essencial de erva-cidreira (quimiotipo limoneno/carvona). **Rev Cienc Agron**, v. 34, p. 5-11, 2003.

SAUERWEIN, M.; YAMAZAKI, T.; SHIMOMURA, K. Hernandulcin in hairy root cultures of *Lippia dulcis*. **Plant Cell Rep**, v. 9, p. 579-581, 1991.

SCHEFFER, M.C.; MING, L.C.; ARAUJO, A.J. de. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: Queiróz, M.A. de; Goedert, C.O.; Ramos, S.R.R. (eds). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro. Petrolina, p. 405-415, 1999.

SCHEFFER, M.C. & RONZELLI JÚNIOR, P. Influência de diferentes níveis de adubação orgânica sobre a biomassa e teor de óleos essenciais da *Achillea millefolium* L. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 11., 1990, João Pessoa. Resumos. CD-Rom.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.R. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, p. 129-137, 2000.

SCHWARZBACH, A.E. & RICKLEFS, R.E. The use of molecular date in mangrove plant research. **Wetl Ecol Manag**, v. 9, p. 195-201, 2001.

SHUKLA, A. & FAROOGI, A.H.A.E. Utilization of plant growth regulators in aromatic plant production: a review. **Cur Res Medic Arom Plants**, v. 12, p. 152-157, 1990.

SIANI, A.C.; TAPPIN, M.R.R; RAMOS, M.F.S.; MAZZEI, J.L.; CANCEIÇÃO, M.; RAMOS, K.V.; NETO, F.R.D.; FRIGHETTO, N. Linalool from *Lippia alba*: Study of reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. **J Agric Food Chem**, v. 50, p. 3518-3521, 2002.

SLOWING-BARRILAS, K.V. Estudio de la actividad antiinflamatoria de diversas especies de la flora de Guatemala. 1992. Tese (Doutorado) - Universidad Complutense de Madrid, 1992.

SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. Numerical Taxonomy. San Francisco. Freeman, W.H. and Company, p. 230-234, 1973.

STATSOFT Inc. Statistica 6 for Windows. 1999. http://www.statsoft.com.

STEFANINI, M.B.; RODRIGUES, S.D.; MING, L.C. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. **Hortic Bras**, v. 20, p. 18-23, 2002.

TATIENI, V.; CANTRELL, R.G.; DAVIS, D.D. Genetic diversity in elite cotton germplasms determined by morphological characteristics and RAPD. **Crop Sci**, v. 36, p. 186-192, 1996.

TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; LEITÃO, S.G.; LAGE, C.L.S.; VICCINI, L.; PIERRE, P.M.O.; DAVIDE, L.C. Diferentas morfológicas, anatômicas e fisiológicas de dois quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. relacionadas à poliploidia. In: Congresso de Ecologia do Brasil, 6., 2003, Fortaleza.

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. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, p. 1-5, 2005.

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

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

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

UEDA, E.T. & MING, L.C. Influência de N, P, K na produção de biomassa foliar e teor de óleo esencial em citronela-de-java (*Cymbopogon winterianus*) – Poaceae. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 38., 1998, Petrolina. Resumos. CD-Rom.

VALE, T.G. Estudo farmacológico comparativo de óleos essenciais de quimiotipos de *Lippia alba* (Moll.) N.E. Brown. 1999. Tese Dissertação (de Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Fortaleza. 1999.

VAN DEN DOOL, H. & KRATZ, D.J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. Chromatogr A**, v. 11, p. 463-467, 1963.

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

VIANA, G.S.B.; VALE, T.G. do; RAO, V.S.N.; MATOS, F.J.A. Analgesic and antiinflamatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. **Pharm Biol**, v. 36, p. 347-351, 1998.

VIANA, G.S.B.; VALE, T.G. do; SILVA, C.M.M.; MATOS, F.D.J. Anticonvulsant activity of essential oil and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Biol Pharm Bull**, v. 23, p. 1314-1317, 2000.

VICCINI, L.F.; SOUZA DA COSTA, V.C.; MACHADO, M.A.; CAMPOS, A.L. Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD markers. **Plant Syst Evol**, v. 246, p. 1-9, 2004.

VIEIRA, R.F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. In: Janick, J. (ed). Perspectives on new crops and new uses. Alexandria, VA, p. 152-159, 1999.

ZETOLA, M.; LIMA, T.M.C. de; SONAGLIO, D.; GONZALES-ORTEGA, G.; LIMBERGER, R.P.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (brazilian false melissa). **J Ethnopharmacol**, v. 82, p. 207-215, 2002.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.; MAIA, J.G.S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill) N. E. Br growing wild in the Brazilian Amazon. **J Flavour Fragr**, v. 13, p. 47-48, 1998.

WARREN, J.M. Isozyme variation in a number of population of *Theobroma cacao* L. obtained through various sampling regime. **Euphytica**, v. 72, p. 121-126, 1994.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.