

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, FITOQUÍMICA E MOLECULAR DE  
POPULAÇÕES DE *ELIONURUS* sp. HUMB. & BOMPL ex WILLD (CAPIM-  
LIMÃO).

Thanise Nogueira Füller  
Bióloga / PUCRS

Dissertação apresentada como um dos  
requisitos à obtenção do grau  
de Mestre em Fitotecnia  
Área de Concentração Plantas de Lavoura

Porto Alegre (RS) Brasil  
Maio de 2008



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia pela oportunidade e a CAPES pela bolsa concedida.

Ao prof. José Fernandes Barbosa Neto, meu orientador e grande amigo, pelos ensinamentos e experiências transmitidos, pela dedicação, pelas risadas e por todo o estímulo durante a realização do trabalho.

À minha co-orientadora, profa. Ingrid Bergman Inchausti de Barros, pelos conhecimentos passados e, juntamente com a bióloga Ana Carolina Nunes, pelo material cedido.

Ao prof. Leandro Viera Astarita, meu orientador de iniciação científica, juntamente com a profa. Eliane Romanato Santarém, por me ensinarem a dar os primeiros passos mostrando sempre um exemplo de postura profissional como educadores e pesquisadores e por me auxiliarem sempre que precisei, inclusive durante o mestrado.

Às minhas grandes amigas, profa. Maria Jane Cruz de Melo Sereno, Paula Wiethölter, Tatiana Terra e Josana Rodrigues, pelos cafezinhos que eu nunca tomei, pela amizade, por toda a ajuda profissional, pelas sessões de terapia em grupo, pelas caronas e pelas festas.

Às amigas do mestrado Divanilde Guerra e Ana Paula Navarini Guisso e ao amigo Vanderlei Tonon que foram fundamentais, durante este percurso, pelo apoio, companheirismo e auxílio nos estudos.

Ao pessoal do laboratório de Genética Molecular de Plantas de Lavoura, por toda a ajuda prestada, especialmente aos técnicos Jonatan e Fábio,

companheiros diários que sempre se dispuseram a me auxiliar no que precisei, por toda a amizade, dedicação empenhada e pelos ensinamentos, vocês foram imprescindíveis para a execução do trabalho.

Às bolsistas por todo o auxílio prestado, especialmente a Carol Tessele que me ensinou todas as técnicas moleculares, pela dedicação ao trabalho, pela responsabilidade e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da PUCRS pela amizade, especialmente a Janoca pela ajuda e amizade.

Ao pessoal do Laboratório de Química Analítica, especialmente a Sabrina e ao prof. Adriano Monteiro por ceder o reduzido espaço e os equipamentos, além da paciência para me ensinar a utilizá-los.

A todos os meus amigos, colegas de graduação e de pós-graduação que acompanharam minha trajetória sempre torcendo por mim. Minha amiga Adriana Figueiró pelas discussões técnicas e pelos conselhos. À Francini Silveira, pela amizade, por me dar força, apoio e pelos bons momentos proporcionados.

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim, pela vida maravilhosa que me deram, por todo o amor, apoio e compreensão. Às duas razões do meu viver, meus irmãos e melhores amigos Tyrone e Thaís, por existirem na minha vida.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste sonho, muito obrigada.

# CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, FITOQUÍMICA E MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *ELIONURUS* sp. HUMB. & BOMPL ex WILLD (CAPIM-LIMÃO).<sup>1</sup>

Autora: Thanise Nogueira Füller

Orientador: José Fernandes Barbosa Neto

Co-orientadora: Ingrid Bergman Inchausti de Barros

## RESUMO

O capim-limão é uma planta herbácea, perene, que ocorre naturalmente no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Seu potencial econômico se deve ao fato de apresentar óleo essencial utilizado como aromatizante e flavorizante, além de apresentar atividade bactericida atribuída tanto ao óleo quanto ao conteúdo de compostos fenólicos. Apesar da importância, poucos estudos foram desenvolvidos para esta espécie. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar populações nativas de *Elionurus* sp., estimando a variabilidade existente e contribuindo com novas informações para subsidiar programas de exploração e melhoramento dessa espécie. O trabalho foi realizado com cinco populações de capim-limão coletadas no Rio Grande do Sul, totalizando 50 plantas cultivadas em vasos na Faculdade de Agronomia. Os compostos fenólicos foram quantificados através do método Folin-Ciocalteu, utilizando-se o ácido gálico como padrão. O óleo foi caracterizado quimicamente por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. O marcador molecular utilizado para a análise da variabilidade genética foi o RAPD. As cinco populações de capim-limão apresentaram variabilidade para aos caracteres fenotípicos e para concentração de compostos fenólicos. O óleo essencial apresentou variabilidade de compostos, sendo o Geranial e o Neral os mais importantes. A análise molecular demonstrou uma elevada variabilidade para as populações, permitindo a separação dos indivíduos em cinco grupos, sendo possível, de modo geral, agrupá-los de acordo com a origem geográfica. Observou-se também que a maior variabilidade ocorre dentro de cada população. Os resultados indicaram que a população São Francisco de Paula foi a de pior desempenho para a maioria dos caracteres avaliados. As populações São Borja e Faculdade de Agronomia foram as que apresentaram maior destaque em relação às demais, exibindo elevado conteúdo de Citral e melhor desempenho nos caracteres observados, podendo ser recomendadas para utilização em programa de melhoramento.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (66 p.). Maio, 2008.

# PHENOTYPIC, PHYTOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FIVE NATURAL POPULATIONS OF *ELIONURUS* SP. HUMB. & BOMPL EX WILLD (LEMONGRASS)<sup>1</sup>

Author: Thanise Nogueira Füller  
Adviser: José Fernandes Barbosa Neto  
Co-adviser: Ingrid Bergman Inchausti de Barros

## Abstract

Lemon-grass is a herbaceous, perennial plant, that occurs in Rio Grande do Sul (Brazil). It has economic potential due to the presence of essential oils, which are used in perfume and flavor industry. In addition, this species present recognized bactericidal activity attributed to the essential oils and phenolic compounds. Despite of this, few studies have been developed for this species. The present work aimed to analyze native populations of *Elionurus* sp., contributing with new information to subsidize farm exploration and breeding programs. The analysis was preformed with five populations of lemon grass collected in different location of Rio Grande do Sul, totalizing 50 plants cultivated in pots in the Faculdade de Agronomia/UFRGS. The phenolic compounds were quantified through the Folin-Ciocalteu method, using Gallic acid as a standard. The essential oils were characterized chemically by gas chromatography and mass spectrometry. RAPD was used as molecular marker for the analysis of genetic variability. The five populations of lemon grass presented variability for the phenotypic traits and phenolic compounds concentration. The essential oils also presented variability, being Geranial and Neral the most important. Molecular analysis demonstrated high variability for the populations, allowing the separation in five groups. It was possible to match molecular grouping with geographic origin. On the other hand, the largest variability was observed within populations. The results indicated that São Francisco de Paula population had the worst performance for the majority of the evaluated traits. The populations São Borja and Faculdade de Agronomia presented high production of Citral and they also showed the best performance for the observed traits. As a consequence, it is possible to recommend both populations as starting germplasm for breeding programs of lemon-grass.

---

<sup>1</sup> Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (66 p.) May, 2008.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Compostos Fenólicos.....	8
2.2 Óleo Essencial .....	11
2.3 Variabilidade Genética .....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1 Coleta .....	21
3.2 Caracteres fenotípicos avaliados .....	23
3.3 Avaliação de compostos fenólicos .....	24
3.4 Caracterização química do óleo .....	25
3.5 Análise molecular .....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
5. CONCLUSÕES .....	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Distribuição das espécies do gênero <i>Elionurus</i> .....	5
2. Informações sobre as coletas de populações de <i>Elionurus</i> sp. ....	22
3. Caracteres agronômicos e morfológicos de cinco populações de <i>Elionurus</i> sp. ....	32
4. Média e desvio padrão para compostos fenólicos e rendimento de óleo (%) em cinco populações de <i>Elionurus</i> sp. ....	37
5. Correlação entre compostos fenólicos e caracteres agronômicos em cinco populações de <i>Elionurus</i> sp. ....	41
6. Porcentagem de compostos encontrados no óleo volátil de cinco populações de <i>Elionurus</i> sp. ....	44
7. Correlação entre a concentração de Geranial e caracteres fenotípicos em cinco populações de <i>Elionurus</i> sp. ....	46
8. Correlação entre a concentração de Neral e caracteres fenotípicos em cinco populações de <i>Elionurus</i> sp. ....	46
9. Análise de Variância Molecular (AMOVA) em cinco populações de <i>Elionurus</i> sp. ....	51
10. Soma dos quadrados e porcentagem de variação atribuída a cada população de <i>Elionurus</i> sp. ....	52



## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Indivíduos de <i>Elionurus</i> sp. coletados e mantidos em casa de vegetação do Departamento de Plantas de Lavoura .....	23
2. Inflorescências de indivíduos de <i>Elionurus</i> sp. mantidos em casa de vegetação do Departamento de Plantas de Lavoura .....	24
3. Extração do óleo (Hidrodestilador e óleo extraído) .....	26
4. Folhas de populações naturais de <i>Elionurus</i> sp. ....	31
5. Agrupamento de indivíduos de cinco populações de <i>Elionurus</i> sp. .	42
6. Padrão de bandas reveladas através do <i>primer</i> OPT19, de cinco populações de <i>Elionurus</i> sp. ....	47
7. Porcentagem de polimorfismo de RAPD dentro de cinco populações de <i>Elionurus</i> sp. ....	48
8. Agrupamento de indivíduos de cinco populações de <i>Elionurus</i> sp. através da técnica de RAPD .....	50
9. Agrupamento de cinco populações de <i>Elionurus</i> sp. através da técnica de RAPD .....	54

## 1 INTRODUÇÃO

Há mais de dois mil anos, Hipócrates escreveu: “cada uma das substâncias da dieta de um homem age sobre seu corpo, mudando-o de alguma forma, e toda a sua vida depende dessas mudanças, esteja ele saudável, doente ou convalescendo”. Nas últimas décadas, a procura por produtos naturais tem envolvido naturalistas, pesquisadores e todos aqueles que investigam e divulgam os benefícios desses produtos. Esses produtos, a cada dia, apresentam um maior emprego, sendo utilizados na alimentação, na indústria farmacêutica, na agroquímica, entre outros. Neste sentido, nos últimos anos, o governo do Estado do Rio Grande do Sul tem demonstrado interesse na área de oleoquímica como alternativa de produção, devido a sua ampla e diversificada aplicação.

A 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. Várias espécies nativas têm sido empregadas pela população, algumas com estudos químicos ou farmacológicos que dão suporte à sua utilização, outras empregadas a partir de conhecimento empírico ou tradicional. Por isso, é importante a realização de estudos agrônômicos, químicos e farmacológicos em espécies de ampla distribuição, uma vez que a

intensa produção de metabólitos secundários nessas espécies pode favorecer o estabelecimento de novas cadeias produtivas.

Um gênero que tem despertado o interesse do ramo de fitoquímicos é *Elionurus* sp., o qual é utilizado na indústria de cosméticos. Conhecido popularmente como capim-limão, ocorre naturalmente no Rio Grande do Sul. O óleo essencial do capim-limão é utilizado como aromatizante pela indústria cosmética e de limpeza doméstica. Atividades bactericidas também têm sido atribuídas ao óleo. No entanto, tem sido observada uma variabilidade expressiva na composição química de seu óleo essencial, havendo variação entre populações. Da mesma forma, a produção percentual de óleo é baixa, fator que pode inviabilizar a exploração comercial deste gênero.

Apesar da demanda, ainda é reduzido o conhecimento sobre composição química, atividade biológica e cultivo de *Elionurus* sp. O estabelecimento de programas de melhoramento poderia contribuir para aquisição de maior conhecimento e possibilitar a exploração de recursos existentes, desenvolvendo novas populações com capacidade de produção de óleos essenciais e caracteres agronômicos favoráveis para o seu cultivo.

A variabilidade genética é, sem dúvida, a base para qualquer programa de melhoramento. Portanto, a avaliação de caracteres fenotípicos, bem como a caracterização química e genética é imprescindível para a determinação da variabilidade e sua distribuição entre e dentro de populações. Este conhecimento é fundamental para a definição de estratégias de coleta dos recursos genéticos e de técnicas de melhoramento. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram caracterizar fenotípicamente populações nativas de *Elionurus* sp., quantificar a concentração de compostos fenólicos, caracterizar

quimicamente a constituição do óleo essencial, bem como caracterizar a variabilidade genética das populações, estimando a variabilidade existente e contribuindo com novas informações para subsidiar programas de exploração e melhoramento dessa espécie.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O gênero *Elionurus*, Humb. & Bompl ex Willd, pertence à família Poaceae e compreende cerca de 15 espécies, sendo comum nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, África, Austrália (Hess *et al.*, 2007) e Ásia temperada (Araújo, 1971; Renvoize, 1978; Longhi-Wagner, 2001; Watson & Dallwitz, 2002).

Este gênero possui uma taxonomia complexa com grande variabilidade, porém ainda pouco esclarecida (Kolb *et al.*, 2006). Alguns trabalhos citam o nome genérico com “y” (*Elyonurus*). Uma vez que a maioria das citações são na forma “*Elionurus*”, o Departamento de Botânica do Museu de História de Washington propôs que fosse conservado o nome “*Elionurus*” para o gênero (Czepak, 2000). Outra dificuldade taxonômica diz respeito a sinonímias. Figueiras (1995) citou *Andropogon adustus* Trin., *Elionurus adustus* Trin. e *E. planifolius* Renvoize como sinonímia de *E. muticus* (Spreng.) Kuntze. Já o Instituto Nacional de Investigação Agropecuária do Uruguai (2004) referiram *E. candidus* e *E. rostratus* Nees como sinônimos de *E. muticus*. Da mesma forma, Longui-Wagner (2001) englobou como sinonímia de *E. muticus* as espécies *E. rostratus*, *E. latiflorus* e *E. adustrus*. Renvoize (1978) em uma revisão sobre o gênero encontrou 16 sinonímias para *E. muticus* (Tabela 1).

TABELA 1. Distribuição das espécies do gênero *Elionurus* (Renvoize, 1978).

Espécie	Sinonímias	Distribuição
<i>E. barbiculmis</i>		EUA e México
<i>E. bilinguis</i>	<i>Andropogon bilinguis</i>	Brasil
<i>E. ciliares</i>	<i>E. tenax</i>	México à Bolívia e África
<i>E. citreus</i>	<i>Andropogon citreus</i> , <i>E. popuanus</i>	Nova Guiné e Austrália
<i>E. elegans</i>		África
<i>E. euchateus</i>		Costa do Marfim
<i>E. hensii</i>	<i>E. argenteus</i>	Congo e Angola
<i>E. hirtifolius</i>		Gana, Nigéria e África Central
<i>E. lividus</i>		Paraguai
<i>E. muticus</i>	<i>Lycurus muticus</i> , <i>Anatherum megapotamicum</i> , <i>E. rostratus</i> , <i>A. adustus</i> , <i>A. candidus</i> , <i>E. argenteus</i> , <i>E. thimiodorus</i> , <i>A. caespitosus</i> , <i>A. latifolius</i> , <i>E. candidus</i> , <i>E. latifolius</i> , <i>E. viridulus</i> , <i>E. chevalieri</i> , <i>E. gobariensis</i> , <i>E. glaber</i> , <i>E. pretoriensis</i> .	Brasil à Argentina, Yemen e África
<i>E. planifolius</i>		Brasil
<i>E. platipus</i>	<i>A. platipus</i> , <i>A. donianus</i> , <i>E. brazzae</i> , <i>E. pallidus</i> .	Guiné, Serra Leoa, Libéria e Costa do Marfim
<i>E. royleanus</i>	<i>Ratzeburgia schimperi</i> , <i>Rottboellia elegantissima</i> , <i>E. grisebachii</i> , <i>A. ellegantissimus</i> .	Cabo Verde e Índia
<i>E. tripsacoides</i>	<i>Rottboellia ciliata</i> , <i>A. muttallii</i> , <i>E. mtuttallii</i> , <i>E. welwitschii</i> , <i>E. tellii</i>	EUA à Bolívia e África
<i>E. tristis</i>		Madagascar

No Rio Grande do Sul, as espécies de capim-limão, *Elionurus adustus*, *E. candidus*, *E. rostratus*, *E. tripsacoides* e *E. viridulos* estão entre as principais gramíneas presentes nos campos altos, sendo *E. candidus* a mais abundante (Araújo, 1971; Boldrini & Bossle 1978).

Esse gênero apresenta espécies perenes, cespitosas e herbáceas. Os colmos com 10-150 cm de altura, apresentam nós glabrosos e internós sólidos. Os brotos podem ser aromáticos (com leve sabor) ou não aromáticos. As folhas não são basalmente agregadas e articuladas. As lâminas foliares são setáceas, por vezes planas, não apresentando venação cruzada, e são persistentes. A lígula é uma membrana franjada curta (Watson & Dallwitz, 1994).

Rosengurtt *et al.* (1970) separaram *Elionurus rostratus* Nees de *E. candidus* de acordo com a presença ou não de odor cítrico nas lâminas foliares. *E. rostratus* apresentaria um odor cítrico muito forte nas folhas, estando ausente em *E. candidus*. No entanto, Renvoize (1978) considerou estas duas espécies como sinônimos de *E. muticus* (Spreng.) Kuntze. Mohr (1995) citou *Elionurus rostratus* para o Morro Santana, mas, de acordo com Rosengurtt *et al.* (1970), o material do Morro Santana deveria ser identificado como *E. candidus*, pois não apresentou odor cítrico intenso nas lâminas foliares. Estes fatos demonstram a necessidade de estudos mais detalhados sobre o gênero (Welker & Longhi-Wagner, 2007).

As plantas de *Elionurus* sp. são monóicas, apresentam espiguetas com flores monoclinas ou hermafroditas. As flores são reunidas num racemo-espigiforme terminal de 10-12 cm, solitário, com um ráquis único. A ráquis de *Elionurus* é frágil e o nó pode muitas vezes cair juntamente com a espiguetas séssil. Paralelamente a articulação dos nós da ráquis, a base do disseminulo

se especializa constituindo o chamado calo. O calo é uma estrutura nodal, geralmente pilosa, agudo ou pontiagudo, muito modificado e relacionado com a dispersão do fruto (Vegetti & Antón, 1998; Castro & Ramos, 2003). O florescimento ocorre entre outubro e dezembro. É uma espécie diplóide  $2n=10$  ou 20 (Watson & Dallwitz, 1994). Os frutos são cariopses oblongas, escuras, contendo sementes com hilo punctiforme. (Vegetti & Antón, 1998; Castro & Ramos, 2003).

*Elionurus* sp. é empregado como planta medicinal e aromática na Argentina, onde é conhecida por espartilho ou aibe, e também na Bolívia, onde é chamada paja carona ou Karunásh, e no Uruguai pasto limón ou colia peluda (Castro & Ramos, 2002; Hess *et al.*, 2007). No Brasil, *Elionurus* é popularmente conhecido por capim-carona ou capim-limão, sendo uma gramínea que atinge um metro de altura e cresce em solos arenosos pobres, com pH levemente ácido, o que a torna apropriada para a recuperação de terras fracas, com reduzido teor de matéria orgânica e de água (Castro & Ramos, 2003; Hess *et al.*, 2007).

O habitat natural corresponde a um clima subtropical, com curta estação fria e pouca geada. O capim-limão pode ser propagado por sementes, mas a propagação mais usual é pela divisão das touceiras. O plantio preferencial pode ser realizado no período de março a novembro, no entanto, em locais mais frios é feito em março-maio e setembro-novembro. As plantas mantêm uma atividade de crescimento ao longo de todo o ano, porém com uma redução nos períodos mais frios. As mudas podem ser plantadas em linhas a 0,5 – 0,6 m e conservadas a 0,3 - 0,5 cm de espaçamento entre as plantas



(Castro & Ramos, 2003; Instituto Nacional de Investigação Agropecuária do Uruguai, 2004).

O capim-limão não é apropriado para a alimentação do gado pois o gosto amargo é transmitido para o leite, embora as plantas jovens possam ser consumidas. Ele é periodicamente queimado por fazendeiros que consideram a planta um problema para o gado (Castro & Ramos, 2003; Hess *et al.*; 2007). O capim-limão é conhecido popularmente por possuir propriedades sudoríferas e febrífora (redução de febre) (Muchoweti *et al.*, 2006). Há relatos que os índios Tarahumares e alguns mexicanos mastigavam as raízes para alívio da dor de dentes, esse procedimento era considerado tão eficaz que as raízes eram comercializadas nos mercados locais (Vasey, 1887). Essa planta não tem sido extensivamente estudada, sendo assim, pouco é conhecido sobre suas propriedades medicinais, embora se saiba que ela contém óleos essenciais (Muchoweti *et al.*, 2006).

## **2.1 Compostos Fenólicos**

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de grande número de fármacos. As oportunidades para a identificação de produtos com possível utilização econômica aumentam com a diversidade das espécies. A magnitude dessa diversidade no Brasil não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos. No entanto, pesquisadores surpreendem-se ao observar que tais produtos encontrados na natureza revelam uma vasta gama, quase que inacreditável, de

diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (Nodari & Guerra, 2000a).

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático, no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (Carvalho *et al.*, 2000). Estes compostos ocorrem mais comumente conjugados com mono e polissacarídeos. Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais são encontradas estruturas tão variadas quanto à dos ácidos fenólicos, dos derivados da cumarina e dos pigmentos hidrossolúveis das flores, frutos e folhas. Além disso, essa classe de compostos abrange as ligninas e os taninos. Eles são amplamente distribuídos no reino vegetal e, devido à sua diversidade química, apresentam uma variedade de funções nos vegetais. Estes compostos vêm atraindo a atenção dos pesquisadores devido ao seu potencial como antioxidantes naturais (Cuppett, 1998; Carvalho *et al.*, 2000; Balasundram *et al.*, 2006; Taiz & Zeiger, 2006).

Os compostos fenólicos podem ser formados através de duas rotas biogénicas: pela via do ácido chiquímico, a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimalato, que inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. A origem biogénica determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Dessa maneira, pela via do ácido chiquímico obtém-se compostos com grupos hidroxilas em posição *orto*, formado a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em *meta* (Carvalho *et al.*, 2000).

Tais compostos contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos destes economicamente importantes para a indústria alimentícia. Alguns compostos fenólicos são constituintes de óleos voláteis, inclusive alguns são aromatizantes tradicionais como o aldeído cinâmico na canela (*Cinnamomum zeyllanicum* Blume.) e a vanilina em Baunilha (*Vanilla paniflora* Jacks ex Andrews). Também são a eles atribuídas funções de proteção vegetal, sendo relatados casos de supressão de apetite em insetos, inibição da germinação de sementes, do crescimento de fungos e bactérias em plantas (Carvalho *et al.*, 2000; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001; Mandalari *et al.*, 2007; Korukluoglu *et al.*, 2008).

Os compostos fenólicos são amplamente conhecidos por apresentarem atividade antioxidante, o que sugere que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos podem ser retardadas pela ingestão de compostos fenólicos encontrados naturalmente na dieta (Simões *et al.*, 2000). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está atribuída a sua habilidade de capturar radicais livres, doar átomos de hidrogênio ou elétrons ou ligar à cátions de metal (Balasundram *et al.*, 2006).

Diversos vegetais empregados na fitoterapia têm ações atribuídas à presença desses compostos. Como, por exemplo, o maracujá (*Passiflora* spp. L.) e o Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), onde aos flavonóides é atribuída uma atividade captadora de radicais livres (Carvalho *et al.*, 2000).

Dzigirai (2007) observou que o extrato metanólico de *Elionurus muticus*, contendo compostos fenólicos, aumentaram a captação de hidroperóxido. Quando nas formas livres, os hidroperóxidos podem causar danos nas células, membranas e proteínas. Este extrato também se mostrou eficiente na inibição

da peroxidação lipídica quando testado em cérebro de ratos. Os resultados obtidos demonstraram que *E. muticus* é uma fonte potencial de drogas antioxidantes.

Muchuweti *et al.* (2006), ao compararem a atividade antioxidante de sete plantas, conhecidas popularmente por apresentarem propriedades medicinais da flora de Zimbabwe, observaram que *E. muticus* apresentava a maior atividade antioxidante  $95.84 \pm 0,50\%$ , seguido de *Warburgia salutaris* Bertol.  $92.57 \pm 1.004\%$  e se aproximando quase 100% do padrão  $\beta$ -caroteno  $98.84 \pm 0,656\%$ .

O mercado mundial de fitoterápicos é da ordem de 20 a 40 bilhões de dólares por ano e o de cosméticos é de 2,6 a 2,8 bilhões (Simões *et al.*, 2000). Infelizmente, a maioria dos fitoterápicos fabricados atualmente pela indústria brasileira estão fundamentados somente no uso popular das plantas sem nenhuma comprovação pré-clínica nem clínica, não podendo, portanto ser competitivo em nível nacional e muito menos internacional (Yunes, 2001). Deste modo, estudos preliminares de caracterização química e molecular de compostos fenólicos são extremamente necessário em espécies bioativas.

## **2.2 Óleo Essencial**

Desde a Antigüidade, os homens utilizam compostos extraídos de plantas com o objetivo de curar doenças e até mesmo como aromatizantes e flavorizantes em especiarias culinárias. Essas misturas aromáticas complexas de substâncias voláteis ficaram conhecidas como óleos essenciais (Gomes, 2003).

Simões *et al.* (2000) definiram óleos essenciais como a mistura de um número variável de substâncias orgânicas voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Os óleos essenciais são princípios de origem vegetal, próprios de vários grupos de espécies, definidos pelo aroma e sabor (Serafini *et al.*, 2002).

Os óleos essenciais foram utilizados na Roma Antiga, Grécia, Oriente Médio e Egito. Há registros pictóricos de seis mil anos atrás, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas à cura de males da realeza e à busca de bem-estar físico, através de aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, folhas, flores, sementes, etc. Os óleos essenciais eram utilizados como perfumes, flavorizantes de alimentos, desodorantes, farmacêuticos e antisépticos. As substâncias aromáticas também já eram populares nas antigas China e Índia, centenas de anos antes da era cristã, quando eram incorporadas em incensos, poções e vários tipos de acessórios, usados diretamente no corpo. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através do processo de destilação, introduzido pelos cientistas muçulmanos, que iniciou a real comercialização de materiais aromáticos (Sinai *et al.*, 2000; Rangahau, 2001).

No processo de extração do óleo essencial, podem ser aplicados diversos métodos, como a hidrodestilação, maceração, extração por solventes, enfleuragem, gases supercríticos e microondas. Dentre estes, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação (Santos *et al.*, 2004). A hidrodestilação é um dos processos mais antigos para obtenção de óleos essenciais, ocorre de forma rápida e simples e é realizada através de um aparelho destilador que recebe a denominação comercial de Clevenger. A importância desse método

reside no fato de que as informações de processo servem de base para o desenvolvimento do processo industrial de destilação por arraste a vapor (Serafini *et al.*, 2002; Gomes, 2003; Santos *et al.*, 2003).

A qualidade e o preço dos óleos essenciais são baseados na porcentagem do conteúdo de, muitas vezes, apenas um componente químico presente. Portanto, o isolamento e quantificação de compostos individuais são de extrema importância. A cromatografia é o método geralmente empregado nesta análise, sendo a cromatografia gasosa a mais eficiente (Rangahau, 2001). A cromatografia gasosa é um método físico de separação dos componentes de uma mistura através de uma fase gasosa móvel sobre um solvente estacionário (Aqui Neto & Nunes, 2003).

Óleos essenciais são encontrados em várias plantas em pêlos ou tricomas glandulares, canais oleíferos, bolsas lisígenas ou ainda em células parenquimáticas diferenciadas. Eles agem como hormônios, reguladores e catalisadores. De maneira geral, sua função é permitir que a planta se adapte ao seu ambiente, por isso, sua produção aumenta em situações de estresse. Os óleos essenciais protegem a planta de doenças e de parasitas e atraem certos insetos polinizadores. Às vezes, chegam a atuar como combatentes naturais de ervas daninhas (Serafini *et al.*, 2002). Os óleos essenciais encontram sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos (Sinai *et al.*, 2000).

Dentre as principais gramíneas produtoras de óleos essenciais economicamente importantes estão o capim-cidró (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), palma-rosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Stapf.), citronela (*Cymbopogon nardus* L.), vetiver (*Vetiveria zizanoides* L.) e capim-limão

(*Elionurus candidus*). Em geral, o óleo essencial do *E. candidus* é utilizado como aromatizante em perfumaria, cosméticos e desinfetantes do lar (Castro *et al.*, 2003).

A composição (qualitativa e quantitativa) dos óleos é utilizada como forma de agrupamento de genótipos semelhantes dentro da espécie. As substâncias presentes em maior proporção relativa definem o nome do grupo, que passa a ser chamado de quimiotipo. Essas substâncias são, em sua quase totalidade, terpenos (hidrocarbonetos), sendo classificadas de acordo com o número de carbonos presente na molécula (Yamamoto, 2006).

*Elionurus* sp. é caracterizado por uma grande variabilidade na composição química de seu óleo essencial. Na Argentina é classificado em cinco quimiotipos de acordo com o composto majoritário presente no óleo essencial, consistindo elas em Neral, Geranial, Acorenona, Iso-acorenona e 1,8-cineole, sendo as duas primeiras de maior importância para propósitos industriais (Kolb *et al.*, 2007; Hess *et al.*, 2007). Neral e Geranial são também compostos majoritários do óleo essencial de *E. muticus* obtido de plantas coletadas no Uruguai e Zimbábue. No Brasil foi registrada a presença de Campheno (11,5%), (E)-cariophileno (17,9%) e Epatulenol (18,6%) como componentes majoritários do óleo (Scramim & Saito, 2000). Silou *et al.* (2006), analisando a composição do óleo essencial das folhas de *Elionurus hensii* nativa do Congo, observaram a predominância dos compostos *cis*- e *trans*-*p*-menta-2,8(9)-dien-1-ol, *cis*- e *trans*-*p*-menta-1(7),8-dien-2-ol, 2-undecanona e 2-tridecanona. Ainda na África, Mevy *et al.* (2002) obtiveram, a partir da parte aérea de *E. elegans*, os seguintes compostos majoritários: Campherenona (43,0%), Óxido de cariophileno (4,9%) e Bisabolona (4,9%).

O Geranial e o Neral são os isômeros geométricos que misturados tornam-se a fonte natural de Citral. Este apresenta um forte odor cítrico (Heydorn *et al.*, 2003). Citral é o composto que desperta o maior interesse no que diz respeito a *Elionurus*, pois é amplamente empregado nas indústrias de perfumarias, alimentos e cosméticos, para aromatização de sorvetes, bebidas, refrigerantes, confeitos, composição de perfumes e outros produtos. Na indústria farmacêutica o Citral é utilizado como matéria-prima para a síntese de uma série de iononas, sendo a Beta-ionona especificamente utilizada como substância de partida para a síntese de vitamina A (Koshgima *et al.*, 2006). A importante demanda de óleo essencial com alto conteúdo de Citral, suprida atualmente pelo capim-cidrô (*Cymbopogon citratus*), abre a possibilidade de utilizar o capim-limão como alternativa para a extração do óleo (Kolb *et al.*, 2007).

Além do Citral, outros quimiotipos têm potencial de utilização. Sabini *et al.* (2006) comprovaram o efeito fungicida de três quimiotipos (Acorenona, Citral e Geranial) do óleo essencial de *Elionurus muticus* sobre seis estirpes de *Candida* spp. Os três quimiotipos foram eficientes, sendo o Geranial o mais ativo, requerendo apenas 0,87mg/ml para inibir o desenvolvimento de 33% das estirpes. No entanto, Sabini *et al.* (2006) também observaram a elevada citotoxicidade do óleo, que causa alterações morfológicas no substrato celular, levando a uma desorganização dos tecidos e conseqüente morte dos mesmos. Este estudo sugere o potencial de *Elionurus* sp., já que a capacidade fungicida do seu óleo essencial o transforma em desinfetantes potenciais. Os mesmos três quimiotipos apresentaram atividade bactericida avaliada contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC, *Bacillus cereus* e



*Enterococcus faecalis* e contra as bactérias gram-negativas *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (Cacciabua *et al.*, 2005). Também tem sido observada atividade bactericida do óleo essencial de *Elionurus muticus* contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Entretanto o óleo avaliado apresentava o (E)-Cariophileno e Biciclogermacreno como compostos majoritários. Os mesmos autores comprovaram o efeito bactericida do extrato etanólico obtido das folhas de *E. muticus* contra *Bacillus cereus* MIP 96016, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sendo que o extrato não foi eficiente contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (Hess *et al.*, 2007).

### **2. 3 Variabilidade Genética**

Biodiversidade pode ser definida como a variedade e variabilidade existentes entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem (Allem, 2000). O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando mais de 55.000 espécies catalogadas (Nodari & Guerra, 2000a). Desta forma, o estudo da estrutura genética de populações naturais e a base genética das características de interesse farmacológico são imprescindíveis para o sucesso do melhoramento das espécies (Nodari & Guerra, 2000b).

A estrutura genética de uma espécie pode ser definida como a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações. Esta estrutura resulta da combinação entre mutação, recombinação genética, migração, seleção e deriva genética, as quais definem a distribuição da variabilidade genética nas populações. Em populações naturais, a distribuição

da variabilidade genética é influenciada pelo modo de reprodução, sistema de acasalamento, tamanho da população, distribuição geográfica e fluxo gênico (Cavalli & Winge, 2003), além de ser estruturada no tempo e no espaço.

A variabilidade genética é fonte primária dos estudos genéticos e sem ela não seria possível ocorrer evolução nas espécies (Stebbins, 1970). Da mesma forma, o sucesso de qualquer programa de melhoramento depende, fundamentalmente, da variabilidade genética dos genitores envolvidos (Allard, 1960). Isto permite ao melhorista a seleção de plantas com características específicas desejadas e descarte de outras. Portanto, antes do início do melhoramento em si, é imprescindível a caracterização da variabilidade genética das populações de plantas, relativamente à característica alvo (Nodari & Guerra, 2000b).

O gênero *Elionurus* é caracterizado por uma alta variabilidade genética, morfológica e química (Kolb *et al.*, 2007; Hess *et al.*, 2007). Czepak (2000) investigou a variabilidade de tricomas em acessos de *Elionurus latiflorus* Hack. Segundo o autor, alguns acessos apresentaram tricomas glandulares, outros tectores e alguns acessos não apresentaram tricomas. O mesmo autor relatou a variabilidade para algumas características tais como largura, comprimento, aroma exalado e coloração das folhas. O aroma é predominantemente determinado pelo genótipo e depende principalmente dos compostos majoritários do óleo essencial (metabólitos secundários). Sendo assim, a caracterização genética é de extrema importância (Mais *et al.*, 2006).

Estudos sobre a identificação, caracterização da variabilidade genética e variabilidade populacional em plantas concentram-se em aspectos fenotípicos, tais como os caracteres morfológicos e análise do polimorfismo existente em

diferentes tipos de moléculas como proteínas, isoenzimas e fragmentos de DNA. Os polimorfismos de DNA podem ser estudados através de diferentes técnicas e, conforme o tipo de fragmento de DNA analisado, diferentes níveis de polimorfismos podem ser detectados (Cavali, 2003). Deste modo, caracterizar agronomicamente diferentes populações é necessário na etapa inicial de programas de melhoramento. A grande vantagem dos caracteres morfológicos é o baixo custo e simplicidade, pois geralmente não necessitam de programas sofisticados para a análise. Diversos pesquisadores têm utilizado este tipo de análise como ferramenta para avaliações de germoplasmas de espécies bioativas (Blank *et al.*, 2004; Mais *et al.*, 2006).

A caracterização genética com marcadores moleculares possibilita a estimativa de vários índices genéticos e o conhecimento da organização da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações (Nodari & Guerra, 2000b). Nesse âmbito, diversos trabalhos sobre variação genética em populações vêm utilizando marcadores moleculares (Bered *et al.*, 2002; Amorim *et al.*, 2003; Vieira, 2004a; Oliveira *et al.*, 2007). Dentre as técnicas atualmente disponíveis, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é a mais rápida e menos custosa (Williams *et al.*, 1990; Huff *et al.*, 1993), sendo utilizada com sucesso em estudos de divergência (Daher *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003; Areias *et al.*, 2006; Adetula, 2006). Maluf *et al.* (2005), comparando a confiabilidade de três tipos de marcadores RAPD, AFLP e SSR para a caracterização da variabilidade genética de linhagens comerciais de *Coffea arabica* L., observaram que os marcadores moleculares do tipo RAPD e SSR foram mais eficientes em análises de parentesco e que o agrupamento das linhagens correspondia à sua origem genealógica. Os autores sugeriram ainda

que a utilização conjunta de descritores botânicos, agronômicos e marcadores moleculares poderia ser recomendada para a identificação precisa de linhagens.

Em espécies de plantas bioativas o RAPD tem sido amplamente empregado, já que a maioria dessas espécies possui um limitado número de estudos. Yamamoto (2006) através dessa técnica, obteve, a partir de 20 genótipos da planta aromática *Lippia Alba* (Mill) NE Brown, 183 bandas polimórficas, as quais permitiram a formação quatro grupos distintos, que correspondiam basicamente aos quatro grupos químicos utilizados na classificação dessa espécie. A técnica de RAPD também foi eficiente na avaliação genética entre cultivares de *Salvia officinalis* L., onde Echeverrigaray (2006) obteve 59% de polimorfismo em dez acessos avaliados com bandas obtidas de 18 *primers*. Essa análise distinguiu as cultivares brasileiras das européias e obteve cultivares que se revelaram como novas fontes de variabilidade genética, o que auxilia na escolha de progenitores potenciais em um futuro programa de melhoramento. Jain *et al.* (2003) observaram a variabilidade genética intra e interpopulacional de *Phyllanthus amarus* Schum. através de RAPD, e obtiveram 65% de polimorfismo entre as populações.

Em plantas aromáticas, o estudo da correlação entre caracteres morfológicos e químicos com marcadores moleculares é muito recente. No entanto, os resultados indicam que ferramentas moleculares são essenciais na caracterização da diversidade genética, uma vez que, apesar de caracteres morfológicos e químicos consigam distinguir genótipos, a composição dos óleos essenciais tem influência de fatores ambientais (Suman *et al.*, 2005; Mais *et al.*, 2006; Yamamoto, 2006).

Em um programa de melhoramento de plantas bioativas, a seleção é direcionada para rendimento, qualidade dos compostos secundários, bom desempenho agrônômico e conteúdo químico, pois tais caracteres determinam o custo do produto final (Rangahau, 2001). Com relação à composição e conteúdo de moléculas terapêuticas, existe uma alta herdabilidade para tais substâncias, o que facilita a seleção artificial. Cultivares de *Achillea* L., *Chamomilla* L., *Lavandula* L., *Melissa* L., *Mentha* L. e *Thymus* L. têm sido desenvolvidas e produzidas em larga escala através do melhoramento (Amaral & Silva, 2003). Kulkarni *et al.* (2003) observaram um aumento de 0,66% para 1,67% do conteúdo de óleo essencial em *Cymbopogon flexuosus* (Nees) Wats. após cinco ciclos de seleção fenotípica recorrente, sendo uma média de 31% por ciclo de seleção. Os autores observaram também que esse aumento não afetava o rendimento de biomassa. Barton *et al.* (1991) estudando Eucalipto (*Eucalyptus kochii* Maiden & Blakely) observaram um aumento de 8kg de óleo essencial por tonelada de folha destilada em comparação com populações não selecionadas. Também foram descritos ganhos genéticos através de seleção para o rendimento de óleo essencial em progênies de outra espécie de Eucalipto (*Corymbia citriodora* Hook) (Vieira, 2004b).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Populações naturais de *Elionurus* sp. foram coletadas em diversas regiões do Rio Grande do Sul nos meses de setembro a novembro de 2006 e março de 2007. Excicatas foram montadas com material coletado e catalogadas no Herbário ICN do Departamento de Botânica da UFRGS. Devido à dificuldade encontrada na taxonomia complexa do gênero, no presente trabalho não foi possível identificar a espécie trabalhada, sendo assim, o trabalho concentrou-se no gênero *Elionurus*.

#### 3.1 Coleta

O conjunto de indivíduos coletados em determinada localidade foi considerado como população, sendo que os indivíduos eram constituídos por uma touceira (Tabela 2). Das populações naturais de *Elionurus* sp. coletadas, duas eram provenientes de Porto Alegre, constituindo as populações do Morro da Polícia e Morro Santana, e outras duas eram provenientes das localidades de São Borja e São Francisco de Paula. Para as análises também foi utilizada uma população de *Elionurus* sp. existente na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FA/UFRGS), que se encontrava no Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, as quais eram

utilizadas para as aulas práticas da Faculdade e cuja procedência é desconhecida. As plantas coletadas foram transplantadas para sacos com terra e mantidas na casa de vegetação do Departamento de Horticultura e Silvicultura da FA/FRGS e uma duplicata foi mantida na casa de vegetação do Departamento de Plantas de Lavoura da mesma instituição (Figura 1).

TABELA 2. Informações sobre as coletas de populações de *Elionurus* sp., Porto Alegre, 2007.

Local de Coleta	Número de Indivíduos	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)	Coletor	Catálogo Herbário
Faculdade de Agronomia (FA)	08	30°04'15"	51°08'22"	50	1 e 2	
Morro da Polícia (MP)	08	30°04'22"	51°10'07"	286	3	152281 152280
Morro Santana (MS)	17	30°07'	51°07'	311	3 e 4	152279 152283
São Borja (SB)	11	28°39'44"	56°00'15"	96	1 e 2	152282
São Francisco de Paula (SFP)	06	29°20'00"	50°31'21"	922	3	

\* Ilsi Boldrini (1), Hilda Longhi Wagner (2), Ana Carolina Nunes (3), Thanise Nogueira Füller (4).

### 3. 2 Caracteres fenotípicos avaliados

Os indivíduos avaliados apresentavam o mesmo estágio de desenvolvimento quando os caracteres fenotípicos foram avaliados. As avaliações foram realizadas nos meses de outubro a janeiro, correspondendo aos estágios vegetativos e reprodutivos.



FIGURA 1. Indivíduos de *Elionurus* sp. coletados e mantidos em casa de vegetação do Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia UFRGS, Porto Alegre, 2007.

Os caracteres avaliados em plantas individuais foram:

1. Estatura de planta (cm): medida com o auxílio de uma régua, considerando a base da planta no solo até a altura máxima da maioria das folhas.
2. Largura da folha (mm): obtida através de medição com paquímetro digital, considerando a porção mais larga da folha e com dez repetições por indivíduo.
3. Rebrote (cm): estatura de planta 30 dias após primeiro corte, medida com o auxílio de uma régua, considerando a base da planta no solo até a altura máxima da maioria das folhas.
4. Peso da parte aérea (g): obtido através da pesagem em balança das folhas cortadas. As folhas foram cortadas de toda a touceira, durante o estágio vegetativo das plantas.
5. Enrolamento da folha: para este caráter foram atribuídos os valores 0=aberta e 1= enrolada.



6. Porte da planta: foi avaliado o porte da touceira sendo atribuídos os valores 0=ereta, 1=semi-prostrada e 2=prostrada.

7. Presença de inflorescência: para este caráter foram atribuídos os valores 0=ausente e 1= presente. A análise foi realizada durante o estágio reprodutivo das plantas, nos meses de outubro e novembro (Figura 2).



FIGURA 2. Inflorescências de indivíduos de *Elionurus* sp. mantidos em casa de vegetação do Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia UFRGS, Porto Alegre, 2007.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias separadas pelo Teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). O modelo de ANOVA empregado foi  $X_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$ , onde  $X_{ij}$  = observação da variável para a planta  $i$  na população  $j$ ,  $\mu$ =média geral do experimento,  $\tau_j$  = efeito fixo da população  $j$  e  $\varepsilon_{ij}$  = erro  $\sim N(0, \sigma^2)$ . Para os casos onde o coeficiente de variação foi alto ( $>20$ ) os dados foram transformados para Logaritmo ou Raiz conforme o coeficiente de variação. A divergência fenotípica foi estimada através do coeficiente de Gower (1971), teste recomendado para a análise conjunta de caracteres quantitativos e qualitativos para o agrupamento de genótipos (Crossa & Franco, 2004).

### 3. 3 Avaliação de compostos fenólicos

A análise dos compostos fenólicos foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura. A amostragem consistiu de folhas frescas colhidas de cada indivíduo cultivado na casa-de-vegetação durante o período da manhã. O protocolo utilizado para a avaliação dos compostos foi proposto por Arnaldos *et al.* (2001) e consistiu da maceração de 3g de folhas frescas com 20ml de metanol 80%. Destes extratos obtidos, os níveis de compostos fenólicos foram avaliados através do método de Folin-Ciocalteu. Após 30min de incubação a 25°C no escuro, as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 765nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão para o estabelecimento da curva de calibração. As concentrações de compostos fenólicos foram determinadas através da equação de regressão da curva de calibração ( $y = 0,0054x + 0,0042$ ,  $R^2 = 0,9995$ ) e expressa em equivalência de ácido gálico (mg/g). Para a quantificação dos compostos fenólicos foram realizadas três repetições por indivíduo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias separadas pelo Teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). O modelo de ANOVA empregado foi  $X_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$ , onde  $X_{ij}$  = observação da variável para a planta  $i$  na população  $j$ ,  $\mu$ =média geral do experimento,  $\tau_j$  = efeito fixo da população  $j$  e  $\varepsilon_{ij}$  = erro  $\sim N(0, \sigma^2)$ .

### 3. 4 Caracterização Química do Óleo Essencial

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Horticultura do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da

UFRGS. Para a extração do óleo, as folhas frescas foram coletadas durante o período da manhã, nos meses de dezembro e janeiro de 2008. O óleo foi extraído por hidrodestilação em aparelho Clevenger (Figura 3). A fase aquosa foi extraída com éter etílico e o óleo foi secado com sulfato de magnésio. O óleo extraído foi armazenado em recipientes de vidro protegidos da luz a -20°C. O rendimento foi calculado com a fórmula do rendimento de óleo em base úmida (BU) (Santos *et al.*, 2004):

$$T_o = \frac{V_o}{BM \times 100}, \text{ onde}$$

$T_o$  = Teor de óleo em % (mL de óleo em 100g de biomassa úmida)

$V_o$  = Volume de óleo lido na escala do hidrodestilador

BM = Biomassa vegetal

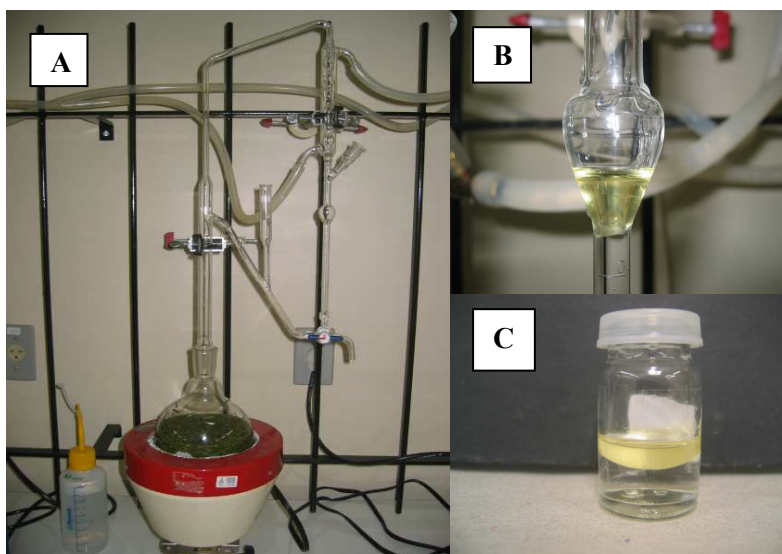


FIGURA 3. Extração do óleo (A) Hidrodestilador; (B) e (C) óleo extraído, Porto Alegre, 2007.

A análise do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Química da UFRGS. Os constituintes do óleo foram analisados através de cromatografia

gasosa em cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 com detector de ionização por chama, utilizando coluna capilar HP17A (30m x 0,25mm X 0,25µm), tendo hidrogênio como gás de arraste (fluxo de 1,0mL/min) e temperaturas programadas: 50°C por 5min. à 250°C por 30min, com uma taxa de 15°C/min. Os óleos também foram analisados e identificados por espectrometria de massas em cromatógrafo acoplado a detector seletivo de massas Shimadzu QP5050, utilizando-se uma coluna capilar HP17A (30m x 0,25mm x 0,25µm), tendo como gás carreador o hidrogênio (1,0mL/min.), sendo as condições as mesmas descritas anteriormente. Os diversos constituintes químicos foram identificados através de estudos dos espectros de massa, complementados por comparação computadorizada da biblioteca do aparelho e literatura (Formáček & Kubeczka, 1982). Para cada população foram analisados cinco indivíduos com três repetições cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias separadas pelo Teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). O modelo de ANOVA empregado foi  $X_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$ , onde  $X_{ij}$  = observação da variável para a planta  $i$  na população  $j$ ,  $\mu$ =média geral do experimento,  $\tau_j$  = efeito fixo da população  $j$  e  $\varepsilon_{ij}$  = erro  $\sim N(0, \sigma^2)$ .

### **3. 5 Análise Molecular**

A análise com marcadores moleculares foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura. O DNA foi extraído das folhas de todos os indivíduos avaliados na casa-de-vegetação, sendo o DNA extraído pelo método descrito por Harberer (1998). O DNA foi quantificado em gel de agarose 1,6% e as soluções de trabalho foram elaboradas na concentração de 2ng/µl.

Os marcadores moleculares avaliados foram do tipo RAPD. As amplificações nas reações de RAPD seguiram a metodologia adaptada de Gratapaglia (1998). O volume final para cada reação de PCR foi de 13µl, contendo 3,02µl de água MiliQ; 1,30µl de tampão 10 X; 0,40 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 1,04 µl de dNTPs (2,5mM); 1,04µl de BSA purificada (10mg/ml); 3,0 µl de *primer* (5ng/µl); 0,2 µl de Taq Polimerase (5U/µl) e 3,0 µl de DNA (2ng/µl). As amplificações foram realizadas em termociclador (modelo: PTC – 100, MJ Research, Inc.). Para a amplificação do DNA foi utilizado um programa que consistia em 40 ciclos de 1'30" a 94°C, 50" a 94°, 1' a 35,5°C, 2' a 72°C, 10' a 72°C 24 horas a 4°C. O marcador DNA Ladder - 100 pb (Invitrogen) foi utilizado como padrão de peso molecular.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose 1,6%, com migração de 3 horas em cuba horizontal. Os fragmentos foram marcados com brometo de etídeo (0,5 µm / ml), visualizados em luz ultravioleta e fotografados pelo programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1. Foram testados 38 *primers*, dos quais 16 foram utilizados (OPA20, OPA18, OPE13, OPH07, OPH20, OPJ06, OPJ14, OPJ16, OPJ18, OPJ19, OPT03, OPT04, OPT11, OPT16, OPT19, OPT20).

A genotipagem dos indivíduos estudados foi realizada com base na presença/ausência de bandas. Para quantificar a similaridade entre os indivíduos foi utilizado o coeficiente de Jaccard e para quantificar a distância entre as populações foi utilizado o coeficiente de Nei (1972). O agrupamento foi realizado pelo método UPGMA para ambos os casos através do programa NTSYSpc (Rohlf, 1997). A partição da variabilidade entre e dentro das populações foi estimada através da análise de variância molecular (AMOVA)

utilizando o programa WINAMOVA (Excoffier *et al.*, 1992). O valor de  $F_{st}$  de Wrigth (1943) também foi calculado para verificar se as populações estão ou não estruturadas. As análises realizadas seguiram o modelo de Lynch & Milligan (1994) para corrigir as frequências alélicas estimadas a partir de dados dominantes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização morfológica dos organismos corresponde à base de todo e qualquer estudo, uma vez que a primeira determinação de um ser começa pelo seu fenótipo (Chies & Longui-Wagner, 2003). *Elionurus* tem sido pouco caracterizado, especialmente no sul do Brasil, onde os trabalhos realizados têm sido mais relacionados a descrições taxonômicas (Araújo, 1971; Renvoize, 1978; Longhi-Wagner, 2001; Watson & Dallwitz, 2002). No presente trabalho, as cinco populações avaliadas demonstraram variabilidade fenotípica, sendo possível diferenciar populações coletadas em diferentes locais com base no fenótipo.

Dentre os caracteres morfológicos e agronômicos avaliados, apenas a estatura de planta não apresentou diferença significativa entre as populações (Tabela 3). No entanto, esse caráter foi variável entre os indivíduos dentro de cada população, o que pode ser observado pelo elevado desvio padrão, que apresentou magnitude de, aproximadamente, 20% em relação às médias. Os demais caracteres foram significativos entre as populações, demonstrando a variabilidade morfológica existente nas populações coletadas em diferentes regiões.

O caráter largura da folha variou de 1,90 a 3,49, sendo que a população da Faculdade de Agronomia (FA) e Morro da Polícia (MP) apresentaram folhas

mais delgadas (Tabela 3, Figura 4). As outras populações não foram diferentes estatisticamente, inclusive não diferiram da Morro da Polícia (MP). O desvio padrão observado também foi elevado em relação às médias das populações, ficando com valores ao redor de 20%, indicando variabilidade entre os indivíduos dentro de cada população. Apenas a população São Francisco de Paula demonstrou uma variabilidade reduzida para esse caráter, com um desvio padrão bastante reduzido. Variabilidade para o caráter largura da folha foi encontrada por diversos autores, como, por exemplo, Rosa *et al.* (2006) em oito populações de *Oryza glumaepatula* Steud. Da mesma forma, Soster *et al.* (2004) reportaram variabilidade para genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) e Steiner (2005) em 41 acessos de *Paspalum notatum* Flüggé.

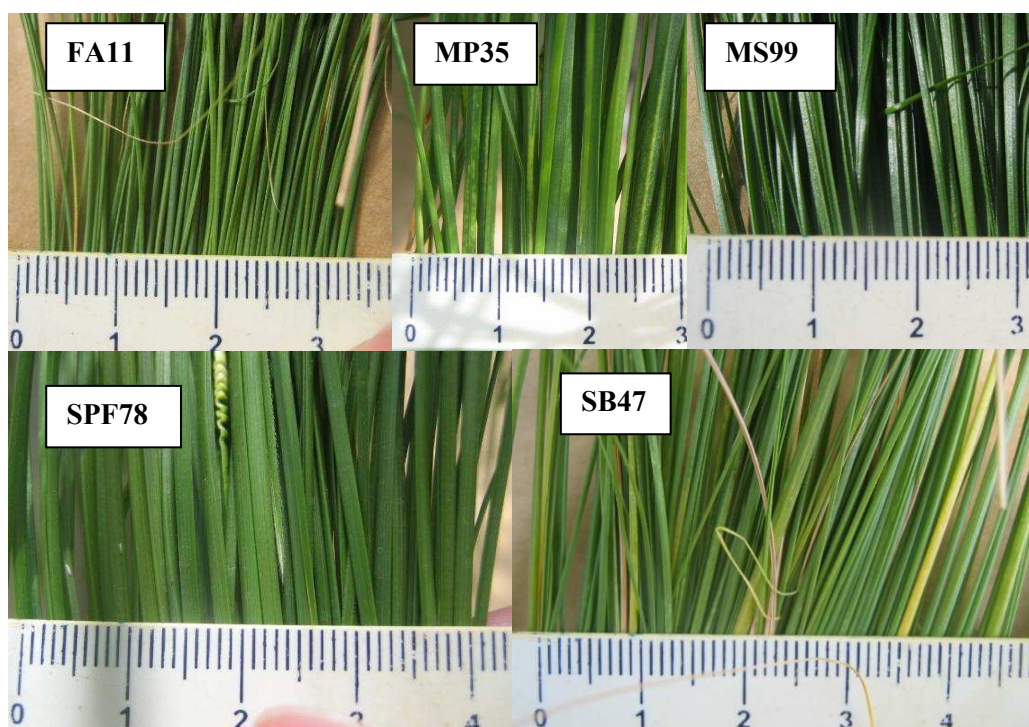


FIGURA 4. Folhas de populações naturais de *Elionurus* sp., Faculdade de Agronomia, indivíduo 11 (FA112), Morro da Polícia, indivíduo 35 (MP35), Morro Santana, indivíduo 99 (MS99), São Borja, indivíduo 47 (SB47) e São Francisco de Paula, indivíduo 71 (SFP71), Porto Alegre, 2007.



TABELA 3. Caracteres agronômicos e morfológicos de cinco populações de *Elionurus* sp. coletadas na Faculdade de Agronomia (FA), no Morro da Polícia (MP), no Morro Santana (MS), em São Borja (SB) e em São Francisco de Paula (SFP), Porto Alegre, 2007.

População	Estatura (cm)		Largura foliar (mm)		Rebrote (cm)		Peso parte aérea (g)		Enrolamento da folha		Porte prostrado		Inflorescência	
	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	%	%	%	%	%	
FA	77,5	19,5	1,90	b	0,36	59,3	bc	20,5	48,8	b	22,2	100	100	57
MP	64,0	20,1	2,63	ab	0,38	55,3	c	16,2	48,2	b	20,0	12	37	25
MS	69,0	15,1	3,21	a	0,84	62,5	abc	10,0	59,8	b	38,2	26	93	27
SB	81,0	19,6	2,16	a	0,41	75,1	a	12,5	66,2	ab	33,7	80	50	82
SFP	70,0	14,7	3,49	a	0,24	71,4	ab	14,6	128,0	a	53,2	33	0	0

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Com relação ao rebrote, a população São Borja foi a que apresentou maior crescimento 30 dias após o corte, não diferindo estatisticamente das populações São Francisco de Paula e Morro Santana. A população do Morro da Polícia foi a que apresentou crescimento mais lento em relação às demais. O desvio padrão foi maior nas populações com rebrote mais lento (Tabela 3), a presença de variabilidade sugere a possibilidade de seleção fenotípica para crescimento mais lento. Diferenças significativas para o caráter rebrote foram descritas para outras espécies, como Leucena (*Leucaena leucocephala* e *L. diversifolia*. Benth) (Simioni *et al.*, 1999); Aveia (*Avena strigosa* L. e *Avena sativa* L.) (Scheffer-Basso *et al.*, 2001) e Azevém (*Lolium multiflorum* L.) (Flores, 2006).

As plantas da população de São Francisco de Paula apresentaram a maior média para o peso total de parte aérea (Tabela 3), porém não diferindo estatisticamente da população São Borja. As demais populações apresentaram peso médio inferior. No entanto, o desvio padrão fenotípico foi muito acentuado para este caráter (Tabela 3), o que demonstra a presença de grande variabilidade entre os indivíduos. O peso total de parte aérea é um caráter relacionado com a arquitetura de planta, sendo importante notar que as populações avaliadas não demonstraram variabilidade para estatura. Portanto, esta diferença em termos de peso pode ser justificada pela maior largura de folha observada na população de São Francisco de Paula e pelo seu maior perfilhamento (dados não apresentados). A relação direta esperada entre estatura de planta e peso da parte aérea também não foi encontrada por outros autores, os quais associaram a diferença em peso da parte aérea a outros caracteres relacionados à expansão lateral das plantas (Blank *et al.*, 2004;

Bortolini *et al.*, 2006). Segundo Nascimento Junior & Adese (2004), em gramíneas forrageiras, o acúmulo de biomassa corresponde ao somatório das produções de perfilhos individuais.

Quanto ao enrolamento da folha (Tabela 3), todos os indivíduos da população Faculdade de Agronomia apresentavam as folhas enroladas. Nas demais populações a porcentagem de indivíduos com folhas enroladas variou, sendo que na população São Borja 80% dos indivíduos também apresentaram esse caráter. Nas demais populações menos da metade dos indivíduos apresentaram folhas enroladas. O enrolamento foliar pode ser uma estratégia para reduzir a área de transpiração na superfície, mantendo os estômatos em microclima com umidade mais alta, evitando a seca (Taiz & Zeiger, 2006). O enrolamento foliar pode também corresponder a um mecanismo de defesa vegetal contra a herbivoria. Muitas plantas desenvolvem mecanismos anatômicos para a defesa contra inimigos naturais (Franceschi *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006). O enrolamento da folha pode ser uma resposta evolutiva a estes ataques, aumentando ou reduzindo a atratividade dos herbívoros.

Com relação ao hábito das populações estudadas, a totalidade dos indivíduos da população Faculdade de Agronomia e 93,3% da população Morro Santana apresentaram o hábito prostrado (Tabela 3). De maneira oposta, a população São Francisco de Paula não apresentou indivíduos com hábito prostrado, sendo constituída por indivíduos com hábito semi-prostrado (70%) e ereto (30%). Nas duas outras populações, São Borja e Morro da Polícia, houve uma divisão equitativa entre plantas prostradas e semi-prostradas. A variabilidade para tal caráter foi descrita por outros autores (Steiner, 2005; Bortolini *et al.*, 2006). Yamamoto (2006) observou que o hábito vegetativo

variava de acordo com o quimiotipo de *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Br. O conhecimento do hábito vegetativo é um aspecto importante para o cultivo de plantas, uma vez que permite planejar adequadamente a área de produção em termos de densidade populacional e espaçamento.

As condições de ambiente oferecidas no presente trabalho não possibilitaram o florescimento de grande parte dos indivíduos avaliados (Tabela 3). Nas plantas provenientes da população São Francisco de Paula, nenhuma planta floresceu durante a condução do trabalho, sendo que o maior número de plantas florescidas foi observado na população de São Borja. São Francisco de Paula é a localidade que apresenta a maior altitude e menor temperatura média quando comparada às demais localidades estudadas no presente trabalho. Algumas plantas requerem a exposição a condições ambientais apropriadas para que ocorra o florescimento. Os principais fatores ambientais que afetam o florescimento são o comprimento do dia e a temperatura (Taiz & Zeiger, 2006). O capim-limão é uma gramínea que floresce na primavera, comportamento compatível com espécies de inverno e que requerem horas de frio para a indução do florescimento. Assim sendo, pelo fato da análise das populações ter sido realizada na Faculdade de Agronomia, ambiente mais quente, a população de São Francisco de Paula pode não ter recebido o número de horas de frio necessárias para a indução do florescimento, permanecendo as plantas no estágio vegetativo.

O fenótipo é o resultado da interação entre genótipo e ambiente (Allard, 1960). No presente trabalho, todos os indivíduos foram mantidos e avaliados na casa de vegetação do Departamento de Plantas de Lavoura. Além disto, para maioria dos caracteres estudados, se observou, em outras espécies,

herdabilidade moderada a alta, como, por exemplo, estatura de planta (Carvalho *et al.*, 1981; Amaral *et al.*, 1996; Mittelman *et al.*, 2001), peso da parte aérea (Sturion & Resende, 2001) e rendimento de óleo essencial (Kulkarni *et al.*, 2003). Assim sendo, a influência do ambiente é reduzida e as diferenças observadas para esses caracteres fenotípicos podem ser atribuídas ao efeito do genótipo.

Os compostos fenólicos desempenham inúmeras funções nos vegetais, entre elas, atuam no crescimento e reprodução da planta e em mecanismos de defesa vegetal contra patógenos e herbívoros (Bravo, 1998). As concentrações desses compostos variaram conforme a população avaliada, sendo a amplitude de 4,77 mg/gMF. O germoplasma com menor valor para a concentração de compostos fenólicos foi o de São Francisco de Paula (Tabela 4). As demais populações não diferiram estatisticamente para o caráter, apresentando médias ao redor de 9,4 mg/gMF. O desvio padrão manifestou uma magnitude de, aproximadamente, 20% do valor médio, sugerindo a existência de variabilidade para a concentração de compostos fenólicos dentro das populações (Tabela 4), o que indica a possibilidade de selecionar efetivamente para o caráter.

As concentrações obtidas diferem daquelas encontradas por outros autores. Muchuweti *et al.* (2006) encontraram uma concentração de 46,8 mg/g de compostos fenólicos totais quando analisaram toda a planta de *Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntze. Por outro lado, Dzingirai *et al.* (2007) encontraram 0,68 mg/g quando extraíram de toda a planta e 0,41 mg/g quando extraíram somente da raiz de *E. muticus* (Spreng.) Kuntze. Estes dados demonstram a grande variabilidade existente para a concentração de compostos fenólicos, havendo dependência do ambiente (Kutchan, 2001) e do genótipo das plantas

(Asami *et al.*, 2003). Os metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante. Fatores como idade da planta, parte vegetal empregada (Gobbo-Neto & Lopes, 2007), método de extração (Balasundram *et al.*, 2006) e injúrias mecânicas, como ferimentos ou estímulos causados por fatores abióticos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Dzingirai *et al.*, 2007), são importantes na manifestação do caráter.

TABELA 4. Média e desvio padrão para compostos fenólicos e rendimento de óleo (%) em cinco populações de *Elionurus* sp. coletadas na Faculdade de Agronomia (FA), no Morro da Polícia (MP), no Morro Santana (MS), em São Borja (SB) e em São Francisco de Paula (SFP), Porto Alegre, 2007.

População	Compostos fenólicos (mg/gMF)		Rendimento de óleo (%)	
	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
FA	9,34 a	2,05	0,70 a	0,24
MP	9,81 a	3,25	0,64 a	0,24
MS	9,35 a	2,19	0,74 a	0,33
SB	8,21 a	2,52	0,71 a	0,18
SFP	5,04 b	1,48	0,33 b	0,09

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De maneira geral, há uma correlação positiva entre a altitude e o conteúdo total de flavonóides, que constituem um tipo de composto fenólico. Esta correlação pode ser explicada pela maior susceptibilidade à radiação UV em altitudes maiores, uma vez que os flavonóides são reconhecidos por propiciarem proteção à radiação e seus efeitos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Com base nessa informação, era esperado que a população São Francisco de

Paula apresentasse o maior conteúdo de compostos fenólicos, uma vez que é originária de uma localidade de maior altitude em relação às demais populações. Uma explicação para o efeito contrário ao esperado pode ser o fato da avaliação fenotípica ter sido realizada em ambiente distinto do natural, o que não propiciou a ativação de mecanismos do metabolismo sob condições de exposição UV maiores. Outro fator que também pode ter determinado uma menor concentração de compostos fenólicos na população São Francisco de Paula é a inexistência de variabilidade genética devido à baixa pressão de seleção para incrementar o caráter concentração de compostos fenólicos na população.

O rendimento de óleo foi similar entre as populações estudadas, com exceção da população de São Francisco de Paula, a qual apresentou reduzido rendimento (Tabela 4). As demais populações apresentaram valores médios de cerca de 0,70%. No entanto, mais uma vez pode ser observado um alto desvio padrão, cerca de 30% dos valores das médias obtidas, indicando que a variabilidade existente para este caráter está contida, principalmente, dentro de cada população (Tabela 4). O rendimento de óleo observado em indivíduos variou de 1,32% a 0,20%, o que sugere a possibilidade de selecionar para incrementar a produção de óleos essenciais nas populações estudadas, especialmente, a população Morro Santana. Os valores de rendimento de óleo obtidos levam em consideração a quantidade de óleo extraído em função da massa de tecido utilizado na extração.

Valores similares foram descritos por Silou *et al.* (2006) em partes aéreas de *Elionurus hensii* K. Schum. Os autores também avaliaram o rendimento de óleo das inflorescências e raízes que apresentaram um

rendimento médio de 1,0% e 0,4%, respectivamente. Outros autores relatam valores menores de rendimento de óleo em espécies de *Elionurus*. Mevy *et al.* (2002) obtiveram um rendimento médio de 0,45% para a parte aérea de *Elionurus elegans* Kunth. Hess *et al.* (2007) avaliaram diferenças nos rendimentos de óleo de *Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntze de acordo com a estação do ano e observaram que o maior rendimento médio do óleo foi durante a primavera (0,37%) seguido do inverno (0,29%), verão (0,25%) e outono (0,23%). Esses valores foram semelhantes ao encontrado para a população São Francisco de Paula. Variabilidade nos valores de rendimento de óleo também foi descrita para outras espécies aromáticas como *Cymbopogon* spp. Spreng. (Khanuja *et al.*, 2005) e *Ocimum basilicum* L. (Blank *et al.*, 2004).

A população São Francisco de Paula apresentou um comportamento similar para a concentração de compostos fenólicos e o rendimento de óleo, sendo a população de menor média em ambos os caracteres. Os óleos essenciais também são resultantes do metabolismo secundário, sendo afetados pelos mesmos fatores que os compostos fenólicos, o que explica o resultado obtido também para o rendimento de óleo. Assim sendo, é possível sugerir que a população São Francisco de Paula não é indicada para programas de melhoramento que desejem incrementar a produção de compostos fenólicos e óleos essenciais.

O coeficiente de Gower foi utilizado para estimar a similaridade entre os indivíduos das populações estudadas. Este coeficiente permite a análise simultânea de caracteres quantitativos e qualitativos. Através desta análise, foi possível agrupar os indivíduos em quatro grandes grupos de similaridade (Figura 4). O primeiro e maior grupo foi constituído por indivíduos das



populações Faculdade de Agronomia, Morro Santana e São Borja. Os indivíduos da Faculdade de Agronomia somente estiveram presentes neste agrupamento, assim como a maioria dos indivíduos da população São Borja. Já o segundo agrupamento foi composto por todos os indivíduos da população Morro da Polícia, e alguns indivíduos das populações Morro Santana, São Borja e São Francisco de Paula. Os outros dois grupos apresentaram somente indivíduos da população São Francisco de Paula. Sendo o último grupo formado apenas pelo indivíduo SFP81. O dendograma construído representou adequadamente os índices de similaridade estimados, apresentando um coeficiente de correlação de 81% com a matriz cofenética. De maneira geral, os caracteres fenotípicos avaliados não produziram um índice que refletisse a origem geográfica distinta das populações. Provavelmente, o número reduzido de caracteres avaliados tenha dificultado esta separação por local de coleta. Outro fator importante foi o fato da variabilidade fenotípica observada estar contida dentro das populações, assim, a variabilidade exibe uma distribuição ampla diminuindo a diferença entre populações. Um exemplo típico é a estatura de planta que não diferiu entre as populações, mas que foi bastante variável entre os indivíduos.

A análise de correlação entre os compostos fenólicos e os caracteres fenotípicos avaliados não indicaram associações significativas e elevadas (Tabela 5). Quando todos os indivíduos, independente da população, foram analisados, houve uma correlação média dos compostos fenólicos apenas com os caracteres peso da parte aérea e rendimento de óleo. O acúmulo de biomassa pode acarretar a redução de atividade do metabolismo secundário.

No caso do rendimento de óleo a correlação foi positiva, Segundo Carvalho *et al* (2000), os compostos fenólicos são, algumas vezes, constituintes de óleos voláteis. Sendo assim, uma alta concentração de óleos voláteis pode conter compostos fenólicos que também apareceram em maiores concentrações. Dentro das populações foram detectadas poucas correlações significativas, sendo destacadas a correlação da largura de folha com compostos fenólicos para as populações Faculdade de Agronomia e São Borja e peso da parte aérea para a população São Borja (Tabela 5).

TABELA 5. Correlação entre compostos fenólicos e caracteres agrônômicos em cinco populações de *Elionurus* sp. coletadas na Faculdade de Agronomia (FA), no Morro da Polícia (MP), no Morro Santana (MS), em São Borja (SB) e em São Francisco de Paula (SFP), Porto Alegre, 2007.

População	Estatura (cm)	Largura foliar (mm)	Rebrote (cm)	Peso da parte aérea (g)	Rendimento de Óleo %
FA	-0,11	0,92 *	0,00	-0,43	0,47
MP	0,45	0,80	0,31	-0,69	0,26
MS	0,05	-0,21	0,14	0,19	0,24
SB	-0,01	-0,70 *	-0,30	-0,90 *	0,40
SFP	0,05	-0,52	0,44	-0,27	0,43
Total	0,04	-0,20	-0,13	-0,56 *	0,48 *

\*Significativo a 5% de probabilidade.

A análise química permitiu observar qualitativa e quantitativamente os compostos constituintes do óleo essencial extraído. Diversos compostos foram

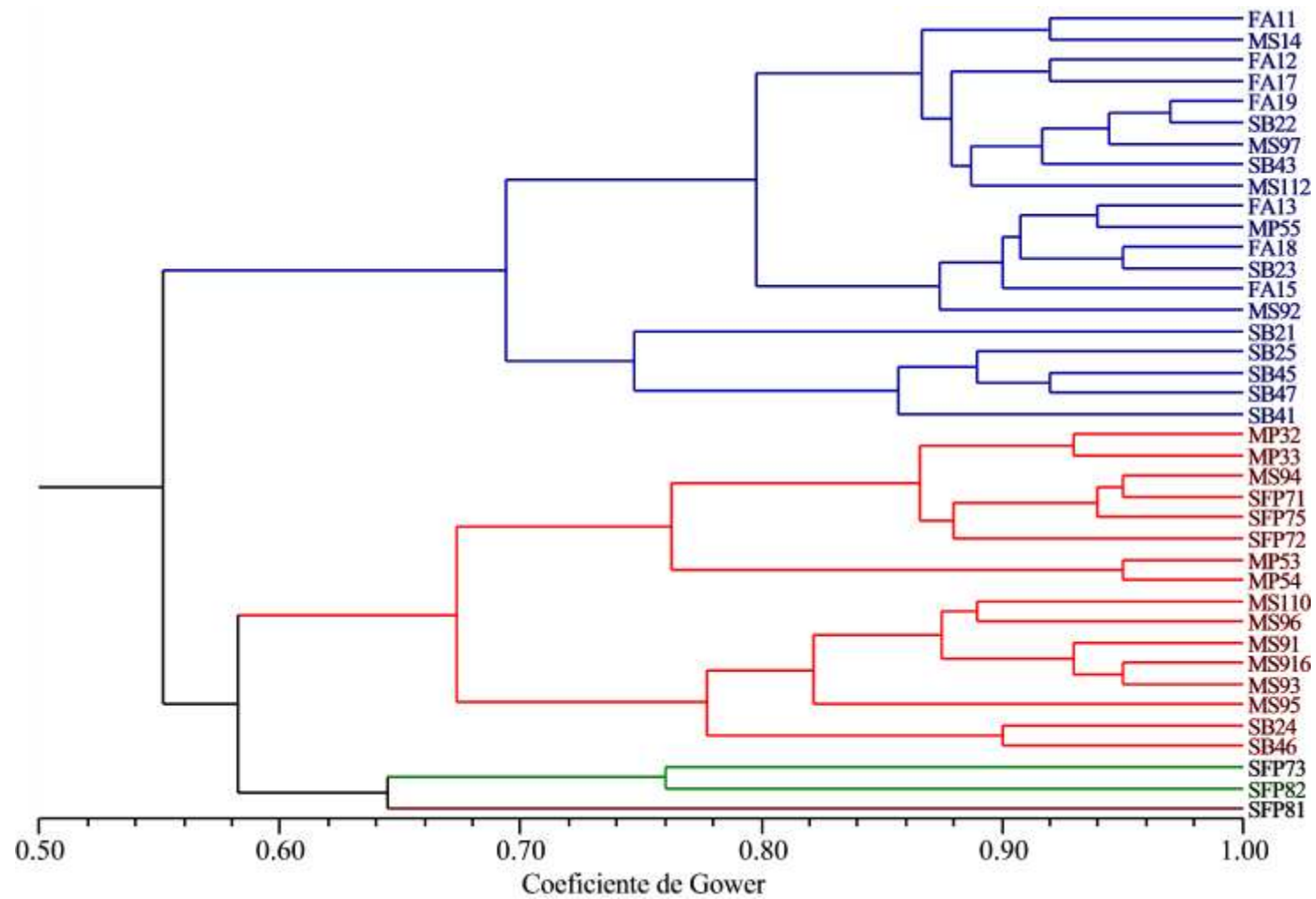


FIGURA 5. Agrupamento de indivíduos de cinco populações de *Elionurus* sp. coletadas na Faculdade de Agronomia (FA), Morro da Polícia (MP), Morro Santana (MS), São Borja (SB) e São Francisco de Paula (SFP) através de análise fenotípica. Porto Alegre, 2007.

encontrados no óleo dos indivíduos analisados, porém nem todos puderam ser identificados e muitos foram encontrados em baixas concentrações. Para tanto, foram analisados os compostos mais freqüentes entre os indivíduos e que apresentavam maiores concentrações. Destes foi possível a identificação de oito compostos dos nove que apareceram em maior freqüência ou concentração (Tabela 6). Os compostos mais freqüentes foram o Geranial, o Neral e um composto não identificado (NI). Estes foram também os que apresentaram maior concentração.

As populações Morro Santana e São Francisco de Paula apresentaram maior variabilidade de compostos; no entanto, ambas as populações apresentaram menor concentração de Geranial e Neral. O comportamento oposto foi observado nas populações Faculdade de Agronomia e São Borja, onde foi identificado menor número de compostos, porém uma maior concentração de Neral e Geranial (Tabela 6). Estas diferenças podem ser atribuídas a diversos fatores. A idade e o desenvolvimento da planta e os diferentes órgãos vegetais são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

O Geranial e o Neral são isômeros geométricos que misturados formam a fonte natural de Citral (Heydorn *et al.*, 2003). As populações Faculdade de Agronomia e São Borja foram as que apresentaram maiores concentrações destes compostos. Durante a extração foi possível observar que essas populações eram as que apresentaram o odor cítrico mais forte, indicando esta alta concentração. Rosengurtt *et al.* (1970) relataram que os indivíduos de

*Elionurus* sp. do Morro Santana não apresentavam este odor cítrico característico, o que pode ser confirmado pelas baixas concentrações de Geranial e Neral encontradas no presente trabalho.

TABELA 6. Porcentagem média de compostos encontrados no óleo volátil de cinco populações de *Elionurus* sp. coletadas na Faculdade de Agronomia (FA), no Morro da Polícia (MP), no Morro Santana (MS), em São Borja (SB) e em São Francisco de Paula (SFP), Porto Alegre, 2007.

Composto	FA	MP	MS	SB	SFP
$\beta$ - Cariophileno	0,20	-	0,83	-	2,53
$\alpha$ - Humuleno	-	-	1,50	-	4,20
Óxido de Cariophileno	-	-	0,76	-	1,96
Geranial	16,40 a	-	1,06 b	12,02 a	0,54 b
Neral	9,00 a	-	0,67 b	8,48 a	0,20 b
Decanol	5,36	-	0,31	3,77	-
$\beta$ - Elemeno	-	-	0,25	-	-
Limoneno	0,05	-	-	-	4,55
NI*	0,05 b	5,70 a	-	0,72 b	0,63 b

\* Não identificado. Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O Citral havia sido encontrado em *Elionurus* por outros autores, no entanto, estes compostos são mais freqüentes na Argentina e Uruguai (Mevy, *et al.*, 2002; Cacciabua, *et al.*, 2005; Kolb *et al.*, 2006; Sabini, *et al.*, 2006). No Brasil os trabalhos realizados estão concentrados na região central, sendo que até o momento não havia registro da presença de Citral nas plantas estudadas (Scramim, *et al.*, 2000; Hess, *et al.*, 2007). No presente trabalho, as plantas

utilizadas foram coletadas no Rio Grande do Sul, cujas condições climáticas são assemelhadas às da Argentina e Uruguai devido à localização geográfica. Provavelmente tais condições (regiões mais frias) favoreçam a produção destes compostos pelas plantas. Os demais compostos também foram encontrados por outros autores que trabalharam com espécies de *Elionurus* (Scramim *et al.*, 2000; Mevy *et al.*, 2002; Silou *et al.*, 2006; Hess *et al.*, 2007). Os compostos descritos como majoritários (Campheno, (E)-cariophileno e Espatuleno) para as espécies do Brasil não foram descritas no presente trabalho. No entanto, elas podem estar presentes entre os compostos que não puderam ser identificados.

A correlação entre caracteres fenotípicos e constituintes do óleo foi estimada considerando apenas o Geranial e o Neral, uma vez que estão presentes em maior concentração e são os compostos de maior interesse. Os caracteres fenotípicos e a concentração de Geranial não apresentaram correlações totais significativas, salvo para o caráter largura foliar, que apresentou uma correlação média e negativa. Por outro lado, foi observado na população Faculdade de Agronomia que a estatura apresentava uma alta correlação também negativa (Tabela 7). A justificativa para este resultado é a mesma para compostos fenólicos. O metabolismo primário, responsável, entre outras coisas pelo crescimento da planta, acarreta uma redução dos metabólitos secundários, devido a alocação de recursos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Os mesmos resultados foram observados na correlação da concentração de Neral e caracteres fenotípicos, apresentando uma correlação total da largura foliar e o conteúdo de Neral mediana e negativa e também,

como no Geranial, uma correlação negativa e significativa para estatura de planta e Neral na população Faculdade de Agronomia (Tabela 8).

TABELA 7. Correlação entre a concentração de Geranial e caracteres fenotípicos em cinco populações de *Elionurus* sp. coletados na Faculdade de Agronomia (FA), no Morro da Polícia (MP), no Morro Santana (MS), em São Borja (SB) e em São Francisco de Paula (SFP), Porto Alegre, 2007.

População	Estatura (cm)	Largura foliar (mm)	Rebrote (cm)	Peso (g)	Rendimento de Óleo %
FA	-0,97 *	-0,30	0,83	-0,56	0,49
MP	-	-	-	-	-
MS	0,20	0,50	-0,01	-0,41	0,16
SB	-0,42	0,35	0,09	-0,20	0,47
SFP	0,00	0,45	-0,82	0,70	-0,82
Total	0,25	-0,54 *	0,25	-0,30	0,17

\*Significativo a 5% de probabilidade.

TABELA 8. Correlação entre concentração de Neral e caracteres fenotípicos em cinco populações de *Elionurus* sp. coletadas na Faculdade de Agronomia (FA), no Morro da Polícia (MP), no Morro (MS), em São Borja (SB) e em São Francisco de Paula (SFP), Porto Alegre, 2007.

População	Estatura (cm)	Largura foliar (mm)	Rebrote (cm)	Peso (g)	Rendimento de Óleo %
FA	-0,99*	-0,12	0,83	-0,70	0,64
MP	-	-	-	-	-
MS	0,20	0,50	-0,01	-0,41	0,16
SB	-0,23	0,70	-0,11	0,12	0,50
SFP	0,00	0,45	-0,82	0,70	-0,83
Total	0,23	-0,51*	0,24	-0,28	0,19

\*Significativo a 5% de probabilidade.

A variação nos perfis de banda de RAPD dos 50 genótipos estudados resultou em 188 marcadores consistentes para análise. Esse número de bandas foi obtido através da amplificação de 16 *primers*. Desses 188 marcadores, 98% foram polimórficos. Os *primers* geraram um número médio  $\approx$  11,75 marcadores (Figura 6).

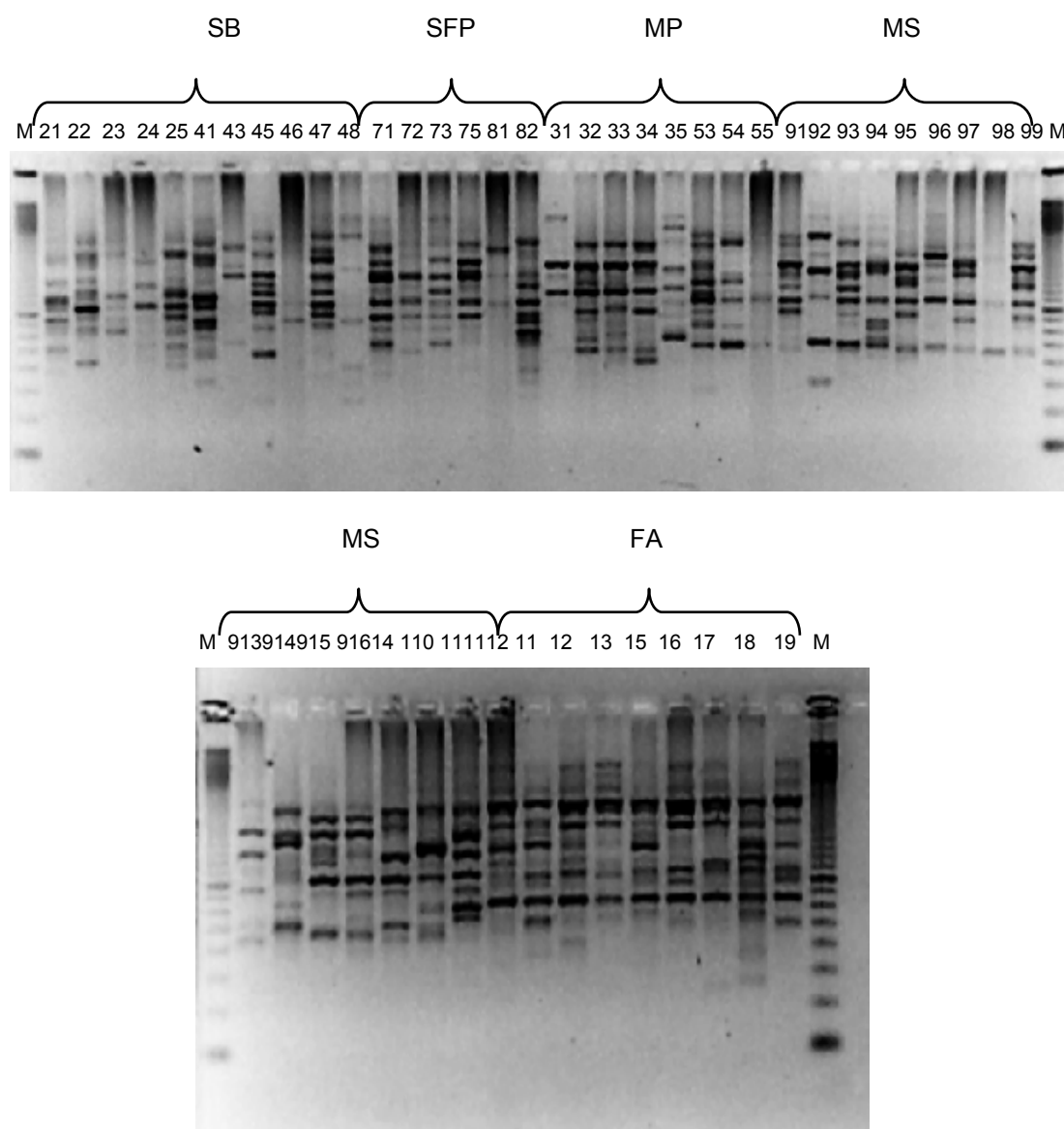


FIGURA 6: Padrão de bandas reveladas através do *primer* OPT19, de cinco populações de *Elionurus* sp. coletadas na Faculdade de Agronomia (FA), no Morro da Polícia (MP), no Morro Santana (MS), em São Borja (SB) e em São Francisco de Paula (SFP), Porto Alegre, 2007.



A porcentagem de bandas polimórficas observadas em cada população variou de 73 a 94%, sendo a população do Morro Santana a que apresentou maior porcentagem de marcadores polimórficos e a do município de São Francisco de Paula e da Faculdade de Agronomia, as menores (Figura 7). Esta é uma forma simplificada de medir a variabilidade genética.

As relações genéticas entre os indivíduos foram estimadas com o coeficiente de similaridade de Jaccard. O dendrograma demonstrou que, de um modo geral, os marcadores agruparam os indivíduos de acordo com a população (Figura 8). O coeficiente da correlação cofenética foi 0,85. Este coeficiente indica o quanto o agrupamento dos genótipos no dendrograma representa o conjunto de estimativas da similaridade genética (Pejic *et al.*, 1998). A análise revelou uma similaridade média de 0,33, variando de 0,17 a 0,83. Os indivíduos mais similares, com um valor de 0,83, foram o MP32 e o MP33 do Morro da Polícia. A comparação que apresentou o menor valor de similaridade genética (0,17) envolveu o indivíduo MS92 do Morro Santana, o qual apresentou um perfil de bandas diferentes dos demais.

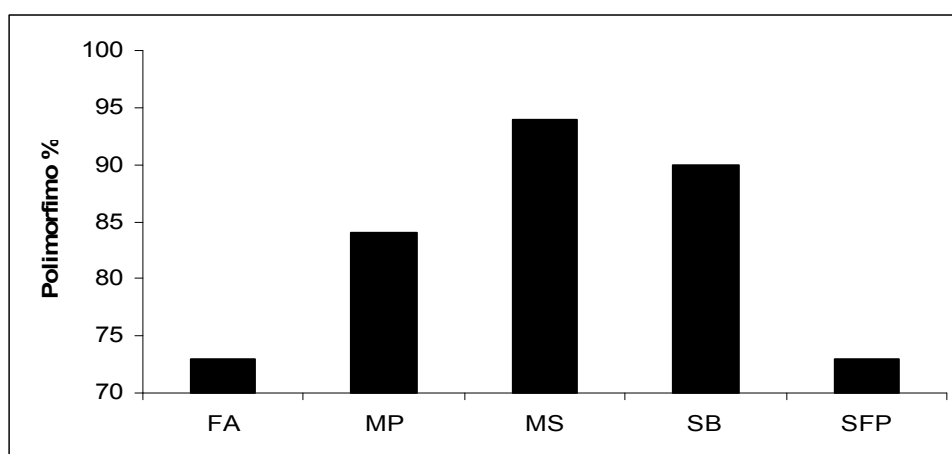


FIGURA 7. Porcentagem de polimorfismo em cinco populações de *Elionurus* sp. coletadas na Faculdade de Agronomia (FA), no Morro da Polícia (MP), no Morro Santana (MS), em São Borja (SB) e em São Francisco de Paula (SFP), Porto Alegre, 2007.

O ponto de corte empregado na análise do dendrograma foi a média de similaridade entre todos os genótipos (0,33) e indicou a formação de cinco grupos. O primeiro grupo foi composto por indivíduos do Morro Santana, com apenas um indivíduo de São Borja. O segundo e maior grupo reuniu alguns indivíduos de São Borja e Morro Santana e todos os indivíduos das populações Morro da Polícia e São Francisco de Paula, sendo estes indivíduos separados em subgrupos por origem geográfica. O terceiro agrupamento apresentou apenas dois indivíduos do Morro Santana. Já o quarto agrupamento englobou indivíduos do Morro Santana e todos os da Faculdade de Agronomia. O último grupo formado constitui-se apenas do indivíduo MS92 (Figura 8).

Steiner (2005) utilizando índices de similaridade média de 0,26, como ponto de corte, para acessos de grama forquilha (*Paspalum notatum* Flüggé) e observou a formação de sete grupos, porém os grupos não apresentaram um padrão por localidade. Para Papoula-de-São-Francisco (*Hibiscus cannabinus* L.), foi encontrada uma similaridade média de 0,35, que separou em três principais grupos as variedades (Cheng *et al.*, 2002). A relação entre variabilidade genética e distribuição geográfica tem sido observada em diversas plantas aromáticas. Fracaro & Echeverrigaray (2006) encontraram forte relação para populações naturais de *Hesperozygis ringens* Benth, onde a similaridade média formou dois grandes grupos de acordo com a localidade. McRoberts *et al.* (2005) também observou uma diferenciação parcial com base na localização geográfica através de análise molecular de populações da gramínea *Phalaris minor* Retz.. Yao *et al.*, (2008) observaram o agrupamento de acordo com a localização geográfica em cultivares de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze.

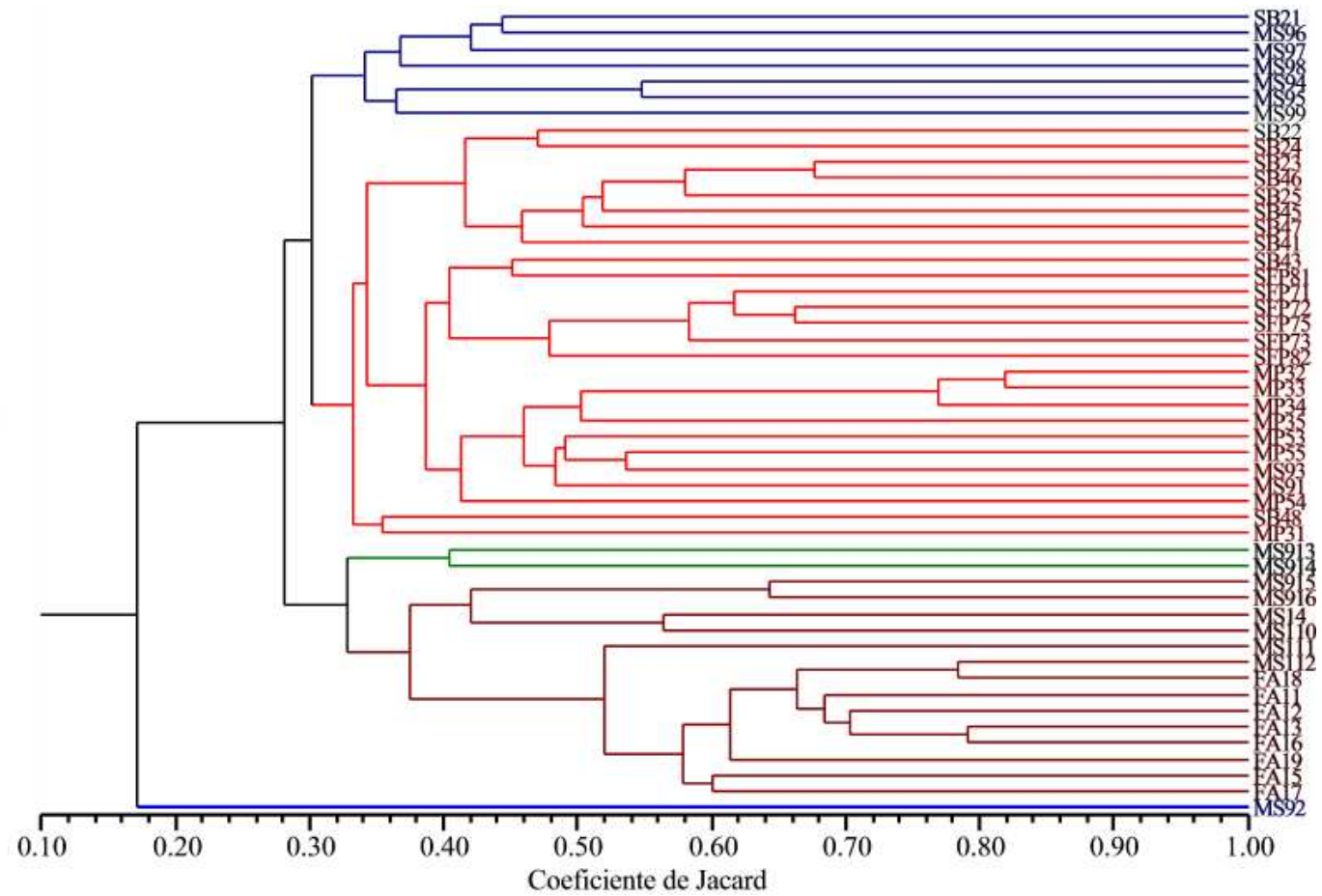


FIGURA 8. Agrupamento de indivíduos de cinco populações de *Elionurus* sp. através da técnica de RAPD coletados na Faculdade de Agronomia (FA), no Morro da Polícia (MP), no Morro Santana (MS), em São Borja (SB) e em São Francisco de Paula (SFP)), Porto Alegre, 2007.

A análise de variância molecular demonstrou que a maior fração de variabilidade observada estava contida dentro de cada população, entre os indivíduos constituintes da mesma, representando 94% da variância total (Tabela 9). A alta variabilidade intrapopulacional sugere a ocorrência de alogamia na espécie estudada. Diversos autores têm relacionado a elevada frequência de variabilidade intrapopulacional com a fecundação cruzada, como Yao *et al.* (2008) estudando populações de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze e Silva *et al.* (2006a) em populações de *Casearia sylvestris* SW.

TABELA 9. Análise de Variância Molecular (AMOVA) em cinco populações de *Elionurus* sp. coletadas na Faculdade de Agronomia (FA), no Morro da Polícia (MP), no Morro Santana (MS), em São Borja (SB) e em São Francisco de Paula (SFP), Porto Alegre, 2007.

Causas da variação	GL	Quadrado Médio	Componente de variância	Variância total (%)
Dentro da População	45	0,53	0,329	94
Entre Populações	4	0,33	0,021	6

A informação a respeito do modo de reprodução de uma espécie é de fundamental importância para o melhoramento, pois possibilita o estabelecimento adequado do método a ser utilizado (Allard, 1960). Para *Elionurus* sp., não foi encontrado registro na literatura consultada sobre o modo de reprodução. No entanto, Zanettini & Cavalli (2003) relataram que a alta variabilidade dentro de populações, geralmente, é um reflexo da fecundação cruzada. Assim sendo, baseados nas características morfológicas,

principalmente da inflorescência e nos dados moleculares obtidos, é possível sugerir que *Elionurus* sp. seja uma espécie com predominância de fecundação cruzada.

Do polimorfismo total encontrado dentro das populações (92%), a maior porcentagem de variabilidade estava contida na população Morro Santana, representando 37,2%, seguida da população São Borja com 32,9% (Tabela 10). Estas duas populações foram as que apresentaram o maior número de indivíduos amostrados em relação às demais, 17 e 11 respectivamente. Esta variabilidade pode estar associada ao número de indivíduos amostrados.

TABELA 10. Soma dos quadrados e porcentagem de variação atribuída a cada população de *Elionurus* sp. coletadas na Faculdade de Agronomia (FA), no Morro da Polícia (MP), no Morro Santana (MS), em São Borja (SB) e em São Francisco de Paula (SFP), Porto Alegre, 2007.

População	Indivíduos (N)	SQ	GL	% Variação
FA	8	1,29	7	8,7
MP	8	1,90	7	12,8
MS	17	5,51	16	37,2
SB	11	4,88	10	32,9
SFP	6	1,23	5	8,3
Total	50	14,81	45	100,0

As populações avaliadas apresentam um valor  $F_{st}$  de Wright de 0,30, o que corresponde a uma alta estruturação segundo Wright (1978), isto é, há um aumento da endogamia nas populações, havendo uma diminuição do fluxo gênico entre elas, o que leva a uma grande diferenciação genética. Valores

elevados de diferenciação genética para populações naturais foram descritos em outras espécies (Ferreyra, *et al.* 2004; Ross-Ibarra, *et al.* 2008).

Ao observar a distância entre as populações, com base nas avaliações moleculares e na distância de Nei (1972), houve a formação de dois grandes grupos, sendo um constituído apenas pela população Faculdade de Agronomia e o outro grupo que reúne as demais populações. A população Faculdade de Agronomia pode estar mais distante das demais populações pois a mesma não é uma população natural como as outras, uma vez que ela se encontra na Faculdade de Agronomia por tempo desconhecido e apresenta origem geográfica também desconhecida. Sendo assim, a distância da população Faculdade de Agronomia pode ser devido a um isolamento geográfico onde não há fluxo gênico com as demais populações, o que pode ser evidenciado pelo alto valor de  $F_{st}$  de Wright (1973). Por outro lado, a maior similaridade entre as populações Morro da Polícia e Morro Santana pode ser explicada pela proximidade geográfica das mesmas (Figura 9).

De maneira geral as populações avaliadas não diferiram em relação aos caracteres fenotípicos. A única população que apresentou diferença em relação às demais foi a São Francisco de Paula, porém ela apresentou um desempenho inferior para a maioria dos caracteres avaliados, como por exemplo, a concentração de compostos fenólicos, baixo rendimento de óleo e baixa variabilidade. Sendo assim, esta população não seria indicada para ser utilizada em um programa de melhoramento. Neste sentido, a população de maior destaque do ponto de vista do melhoramento para incrementar o conteúdo de óleo é a São Borja, pois esta apresentou concentrações elevadas de Geranial e Neral, variabilidade acentuada, além de um bom desempenho

para os caracteres fenotípicos avaliados e para concentração de compostos fenólicos e rendimento de óleo.

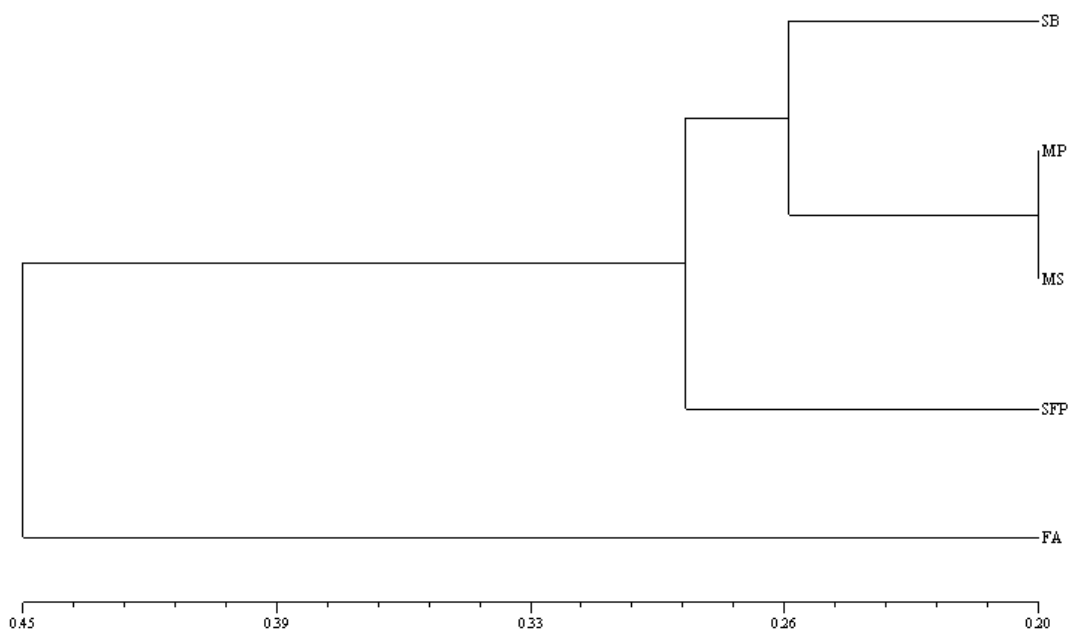


FIGURA 9. Agrupamento de cinco populações de *Elionurus* sp. através da técnica de RAPD coletados na Faculdade de Agronomia (FA), no Morro da Polícia (MP), no Morro Santana (MS), em São Borja (SB) e em São Francisco de Paula (SFP), com base na distancia de Nei (1972), Porto Alegre, 2007.

A população Faculdade de Agronomia também pode ser destacada com base na concentração de Geranial e Neral, no entanto, apresentou uma variabilidade menor devido a amostragem mais reduzida. No caso do estabelecimento de um programa de melhoramento, o melhorista deve concentrar esforços inicialmente nas populações São Borja e Faculdade de Agronomia. Por outro lado, a população Morro Santana apresentou maior variabilidade comparada às demais populações. Nesse caso, a diferença no tamanho das populações deve ser levado em consideração, uma vez que tal diferença pode ter causado um viés nos resultados. Apesar da população São Francisco de Paula ter

apresentado um desempenho inferior para os caracteres avaliados, esta população, foi a mais distinta, representando assim uma fonte de variabilidade, sendo uma população prioritária para conservação em banco de germoplasma.



## 5 CONCLUSÕES

As populações de *Elionurus* sp. estudadas no presente trabalho apresentaram variabilidade para caracteres agronômicos e químicos. A variabilidade genética estimada através dos marcadores moleculares evidenciou uma distribuição predominantemente entre os indivíduos de uma mesma população. A população São Francisco de Paula foi a que apresentou o pior desempenho em termos de produção, composição de óleos e compostos fenólicos e variabilidade para a seleção artificial. Por outro lado, a população São Borja apresentou o melhor desempenho para a maioria das análises realizadas, podendo ser indicada para trabalhos de melhoramento, especialmente com o objetivo de incrementar o conteúdo de Citral no óleo essencial. A população Faculdade de Agronomia também poderia ser indicada para posterior seleção de caracteres relevantes, apesar da análise realizada no presente trabalho ter avaliado um número reduzido de indivíduos desta população.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADETULA, O. A. Genetic Diversity of *Capsicum* Using Random Amplified Polymorphics DNA. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 2, p. 120-122, 2006.
- ALLARD, R. W. **Principles of Plant Breeding**. New York:J. Wiley, 1960. 381 p.
- ALLEM, A. C. The Terms Genetic Resource, Biological Resource, and Biodiversity Examined. **The Environmentalist**, Netherlands, v. 20, p.335-341, 2000.
- AMARAL, A. *et al.* Estimativa da Herdabilidade para os Caracteres Adaptativos Ciclo e Estatura em Aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, p.33-37, 1996.
- AMARAL, C. L. F.; SILVA, A. B. da. Melhoramento Biotecnológico de Plantas Medicinais. **Biociência**, Brasília, v.6, n.30, p. 55-59, 2003.
- AMORIM, E. P. Genetic Variability in Sweet Corn Using Molecular Markers. **Maydica**, Bérghamo, v. 48, n. 3, p. 177-181, 2003.
- AQUINO-NETO, F. R.; NUNES, D. da S. e S. **Cromatografia - Princípios Básicos e Técnicas Afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187p.
- ARAÚJO, A. A. de. **Principais Gramíneas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Sulina, 1971. 255p.
- ARECHAVALETA, J. **Las Gramíneas Uruguayas**. Montevideo: Oriental, 1894. 550 p.
- AREIAS, R.G.B.M. *et al.* Similaridade Genética de Variedades Crioulas de Arroz, em Função da Morfologia, Marcadores RAPD e Acúmulo de Proteínas nos Grãos. **Bragantia**, Campinas, v. 65, p. 19-28, 2006.
- ARNALDOS, T. L. *et al.* A. Changes in Phenol Content During Strawberry (*Fragaria ananassa* x cv. Chandler) Callus Culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 113, n. 3, p 315-322. 2001.
- ASAMI, D. K. *et al.* Comparison of the Total Phenolics and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Using

Convencional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington v. 51, p. 1237-1241, 2003.

BALASUNDRAM, N. *et al.* Phenolic Compounds in Plants and Agri-industrial by-products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. **Food Chemistry**, Washington, v. 99, p. 191-203, 2006.

BARTON, A. F. M. *et al.* Heritability of Cineole Yield in *Eucalyptus kochii*. **Silvae Genetica**, Großhansdorf, v.40, n. 1, p.37-38, 1991.

BEETLE, A. A. **Las Gramíneas de México**. Cotecoca: Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1983. p.37-38.

BERED, F. *et al.* Genetic Variability in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Germplasm Revealed by RAPD Markers. **Crop Breeding And Applied Biotechnology**, Londrina, v. 2, p. 499-506, 2002.

BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SCHUCH, M. W. RAPDs on Genetic-molecular Characterization and Genetic Variability Study of Plums. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP. v. 25, n.2, p. 272-274, 2003.

BLANK, A. F. *et al.* Caracterização Morfológica e Agronômica de Acessos de Manjeriço e Alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 22, n.1, p. 113-116, 2004.

BOLDRINI, I. I; BOSSLE, W. P. Composição Botânica dos Campos Naturais da Estação Experimental Zootécnica de Tupanciretã da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul: relação ilustrada de gramíneas (parte II). **Anuário Técnico do Instituto de Pesquisas Zootécnicas "Francisco Osório"**, Porto Alegre, v.5, t. 2, dez. 1978.

BOLDRINI, I. L. Diversidade Florística nos Campos do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 57., 2006, Gramado. **Os avanços da botânica no início do século XXI**. Gramado, 2006. p. 321-323.

BOLDRINI, I. L.; LONGHI-WAGNER, H. M. ; BOECHAT, S. De C. **Morfologia e Taxonomia de Gramíneas Sul-Rio-Grandenses**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005. p. 81-86.

BORTOLINI, F. *et al.* Caracterizações Morfológica e Agronômica e Divergência Genética em Germoplasma de Trevo-branco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1601-1610, 2006.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, Cambridge, v. 56, p. 317-333, 1998.

BUGLIA, A. G. ; MING, L. C. Development of *Eliourus latiflorus* Nees as affected by numbers of tillers. In: SIMPOSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 3., 2004, Manaus. **Livro de resumos...** [Manaus], 2004. p.258.

CACCIABUE, M. *et al.* *Elinurus muticus* from North of Argentina: Evaluation of the Antibacterial Activity of Three Essential Oil Chemotypes. **Biocell**, Mendoza, v. 29, n. 2, p.223, 2005.

CAIXETA, R. P. *et al.* Genetic Variations in *Eucalyptus* spp. Genotypes Detected by Means of Molecular Markers. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.27, n. 3, p. 357-363, 2003.

CARVALHO, F. I. F. *et al.* Herdabilidade do Caráter Estatura de Planta em Trigo: Estimativa Através do Coeficiente de Regressão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.16, p.55-67, 1981.

CARVALHO, J. C. T. *et al.* Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre : Editora da UFRGS ; Florianópolis : Editora da UFSC, 2000. p. 433-449.

CASTRO, L. O. de; RAMOS, R. L. D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., capim-cidró, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack. , capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver.** Porto Alegre: FEPAGRO, 2002. 31p. (Boletim FEPAGRO, 11)

CAVALLI, S. S. Polimorfismos Moleculares. In: GENÉTICA e Evolução Vegetal. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2003. p 311-332.

CAVALLI, S. S.; WINGE, H. Variabilidade Genética em Populações Naturais. In: GENÉTICA e evolução vegetal. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2003. p 311-332.

CHEN, X. N. *et al.* Radical Scavenging Activity and Phenolic Compounds in Persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Mopan). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, nº 1, p. 24 -28, 2008.

CHENG, Z. *et al.* Comparative Study of Genetic Diversity in Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Varieties Based on Analysis of Agronomic and RAPD Data. **Hereditas**, Sewden, v. 136, p. 231-239, 2002.

CHIES, T. T. DE S. ; LONGHI-WAGNER, H. M. Polimorfismos Morfológicos. In: **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2003. p 291-310.

CUPPETT, S. L. Antioxidant activity of Lamiaceae. **Advances in Food and Nutrition Research**, Lincoln, v. 42, p.245-271,1998.

CZEPAK, M. P. **Produção de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e *Elyonurus latiflorus* Nees em diferentes arranjos espaciais.** Botucatu: UNESP, 2006. 97f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2000.

DAHER, R.F. *et al.* Genetic divergence among elephantgrass cultivars assessed by RAPD markers in composit simples. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, p. 623-627, 2002.

DZINGIRAI, B. *et al.* Phenolic Content and Phospholipids Peroxidation Inhibition by Methanolic Extracts of Two Medicinal Plants: *Elionurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*. **African Journal of Biochemistry Research**. Nairobi, v. 1, n. 7, p. 137-141, 2007.

ECHEVERRIGARAY, S.; AGOSTINI, G. Genetic Relationship Between Commercial Cultivars and Brazilian Acessions of *Salvia officinalis* L. Based on RAPD Markers. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, p. 13-17, 2006.

EXCOFFIER, N.C. *et al.* Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among DNA Haplotypes: application to human metochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Bethesda, v.131, p.479-491, 1992.

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

FERREYRA, L. I. *et al.* First Reporto n RAPDs Patterns Able to Differentiate Some Argentinean Species of Section Algarobia (Prosopis, Leguminosae). **Genetica**, [The Netherlands], v. 121, n.1, p. 33-42, 2004.

FIGUEIRAS, T. S. Gramineae (Poaceae). In: FLORA dos Estados de Goiás e Tocantins. Goiânia: Ed. da UFG, 1995. p. 48-49.

FISCHER, A.; da SILVA, S.C.. O Ecossistema de Pastagens e a Produção Animal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., Piracicaba, 2001. **Anais...** Piracicaba, 2001. p.733-754, 2001

FLORES, R. A. **Avaliação e Seleção de Azevém Anual (*Lolium multiflorum* L.)**. 2006. 94f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

FORMÁČEK, V.; KUBECZKA, K. H. **Essencial Oils Analysis by Capillary Gás Chromatography and Carbon -13NMR Spectroscopy**. New York : Wiley Heyden, 1982. 373p.

FRACARO, F. ; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic Variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), an Endangered Aromatic and Medicinal Plant of Southern Brazil. **Biochemical Genetics**, New York, v. 44, n. 11/12, p.479-489, 2006.

FRANCESCHI, V. R. *et al.* Anatomical and Chemical Defenses of Conifer Bark Against Bark Beetles and Other Pests. **New Phytologist**, Lancaster, v. 167, p. 353-376, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Mediciniais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, F. **Estudo dos Compostos Voláteis do Alecrim Utilizando as Técnicas de Microextração em fase Sólida (SPME), Hidrodestilação e Extração com Fluido Supercrítico**. 2003. 69f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GOWER, J. C. A General Coefficient of Similarity and Some of its Properties. **Biometrics**, Washington, v.27, p.857-871, 1971.

HABERER G. *et al.* Mapping of the Nucleolus Organizer Region on Chromosome 4 in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 250, p.123–128, 1996.

HESS, S. C. *et al.* Evaluation of Seasonal Changes In Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Elyonurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze (Gramineae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 370-373, 2007.

HEYDORN, S. *et al.* Citral, a Fragrance Allergen and Irritant. **Contact Dermatitis**, [S. N.], v. 49, p. 32-36, 2003.

HUFF, D.R. *et al.* RAPD Variation Within and Among a Natural Populations of Outcrossing Buffalograss [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v.86, p.927-934, 1993.

JAIN, N. *et al.* Molecular Diversity in *Phyllanthus amarus* Assessed Through RAPD Analysis. **Current Science**, Bangalore, v. 85, n. 10, p. 1454-1458, 2003.

KHANUJA, S. P. S. *et al.* Essential Oil Constituents and RAPD Markers to Establish Species Relationship in *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Surrey, v. 33, p. 171-189, 2005.

KOLB, N. *et al.* **Estúdio de las condiciones para la producción de aceite esencial de “espartillo”**. Universidad Nacional de Misiones, 2006. Disponível em: [http://www.unam.edu.ar/index.php?option=com\\_content&task=view&id=241&Itemid=123](http://www.unam.edu.ar/index.php?option=com_content&task=view&id=241&Itemid=123) >. Acesso em: 05 de abr. 2007.

KOLB, N. *et al.* **Evaluación de la aptitud del espartillo para su explotación comercial**. Universidad Nacional de Misiones, 2007. Disponível em: [http://www.unam.edu.ar/index.php?option=com\\_content&task=view&id=243&Itemid=123](http://www.unam.edu.ar/index.php?option=com_content&task=view&id=243&Itemid=123) >. Acesso em: 05 de abr. 2007.

KORUKLUOGLU, M. *et al.* Antifungal Properties of Olive Leaf Extracts and Their Phenolic Compounds. **Journal of Food Safety**, New Brunswick, v. 28, p. 76-87, 2008.

KOSHIMA, F. A. T. *et al.* Produção de Biomassa, Rendimento de Óleo Essencial e de Citral em Capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, com

Cobertura Morta nas Estações do Ano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n. 4, p. 112-116, 2006.

KULKARNI, R. N. *et al.* Five Cycles of Recurrent Selection for Increased Essential Oil Content in East Indian Lemongrass: Response to Selection, and Effects on Heritabilities of Traits and Intertrait Correlations. **Plant Breeding**, Berlin, v. 122, p. 131-135, 2003.

KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiology**, Urbana, IL, v. 125, p. 58-60, 2001.

LACERDA, D. R. *et al.* A Técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2002.

LYNCH, M. & MILLIGAN, B.G. Analysis of Population Genetic Structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, Columbia, v.3, p.91-99, 1994.

LONGHI-WAGNER, H. M. *et al.* **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo (Poaceae)**. São Paulo: Hucitec, 2001. p.88.

MAIS, *et al.* Assessment of Agronomic, Chemical and Genetic Variability in Common Basil (*Ocimum basilicum* L.). **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 223, p. 273-281, 2006.

MALUF, M. P. *et al.* Genetic Diversity of Cultivated *Coffea arabica* Inbred Lines Assessed by RAPD, AFLP and SSR Markers Systems. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 366-373, 2005.

MANDALARI, G. *et al.* Antimicrobial Activity of Flavonoids Extracted from Bergamot (*Citrus bergamia* Risso) Peel, a Byproduct of the Essential Oil Industry. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 103, p. 2056-2064, 2007.

McROBERTS, N. *et al.* An Assessment of Genetic Diversity Within and Between Populations of *Phalaris minor* Using ISSR Markers. **Weed Research**, Oxford, v. 45, p. 431-439, 2005.

MEVY, J. P. *et al.* Composition and Some Biological Activities of the Essential Oils from an African Pasture Grass: *Elionurus elegans* Kunth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbia, v. 50, n. 15, p. 4240-4243, 2002.

MITTELMAN, A. *et al.* Herdabilidade para os Caracteres Ciclo Vegetativo e Estatura de Planta em Aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 999-1002, 2001.

MOHR, F. V.; PORTO, M. L. Morro Santana: o verde luxuriante nas encostas íngremes. In: MENEGAT, R.; PORTO, M. L.; CARRARO, C. C.; FERNANDES, L. A. D. (Coords.). **Atlas Ambiental de Porto Alegre**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998. 228p.

MUCHUWETI, D. B. *et al.* Phenolic Content and Phospholipids Peroxidation Inhibition by Methanolic Extracts of Two Medicinal Plants: *Elionurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*. **African Journal of Biochemistry Research**, Durban, v. 1, n. 7, p. 137-141, 2007.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, Chicago, v. 106. p. 283-292, 1972.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Aspectos Genéticos e Moleculares da Produção Vegetal. In: FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre : Editora da UFRGS ; Florianópolis : Editora da UFSC, 2000b. p. 25-38.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre : Ed. da UFRGS ; Florianópolis : Ed. da UFSC, 2000a. p. 11-24.

OLIVEIRA, D. C. de *et al.* Reações de Defesas Químicas e Estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à Ação do Galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 657-667, 2006.

OLIVEIRA, M. do S. P. de *et al.* Diversidade Genética entre Acessos de Açaizero Baseada em Marcadores RAPD. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 31, n.6, p.1645-1653, 2007.

OLIVEIRA, R. P. *et al.* Genetic Divergence Among Hybrids of 'Cravo' Mandarin with 'Pêra' Sweet Orange. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 60, p. 115-118, 2003.

PEJIC, I. *et al.* Comparative Analysis of Genetic Similarity Among Maize Inbred Lines Detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 1248-1255, 1998.

PUUPPONEN-PIMIÄ, *et al.* Antimicrobial Properties of Phenolics Compounds from Berries. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 90, p. 494-507, 2001.

RANGAHAU, M. K. Essential Oils and Their Production. **Crop and Food Research**, New Zealand, n. 39, p.1-4, 2001.

RENVOIZE, S. A. Studies in *Elionurus* (Gramineae). **Kew Bulletin**, Richmond, v. 32, n. 3, p.666-672, 1978.

ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Stony Brook, 1997. 29 p.

ROIG, F. Notas Agrostológicas I. **Multequina**, Mendoza, v.5, p. 77-82, 1996.

ROSA, M. S. *et al.* Caracterização Agromorfológica Interpopulacional em *Oryza glumaepatula*. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p 1-10, 2006.



ROSENGURTT, B. *et al.* **Gramíneas uruguayas**. Montevideo: Departamento de Publicaciones de la Universidad de la Republica, 1970. 489p.

ROSS-IBARRA, J. *et al.* Patterns of Polymorphism and Demographic History in Natural Populations of *Arabidopsis lyrata*. **Plos One**, São Francisco, v. 3, n.6, 2008.

SABINI, L. I. *et al.* Study of the Citotoxic and Antifungal Activity of the Essencial Oil of *Elyonurus muticus* Against *Candida* spp. **Molecular Medicinal Chemistry**, Indiana, v. 11, p. 31-33, 2006.

SANTOS, A. S. *et al.* Descrição de Sistemas e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **Comunicado Técnico** [do] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Belém, v. 99, p. 1-7, 2004.

SAWAZAKI, H. E.; BARBOSA, W.; COLOMBO, C. A. Genetic Characterization of Selections and Pear Cultivars by RAPD Markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n.2, p. 447-452, 2002.

SCHEFFER-BASSO, S. M. *et al.* Potencial de Genótipos de Aveia para Duplo Propósito. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n.1, p. 22-28, 2001.

SCRAMIM, S.; SAITO, M. L. Essencial Oil of *Elyonurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze (Gramineae). **Journal of Essencial Oil Research**, New York, v. 12, p. 298-300, 2000.

SERAFINI, L. A. *et al.* **Óleos Essenciais** – Extrações e Aplicações de Óleos Essenciais de Plantas Aromáticas e Medicinais. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 55p.

SILOU, T. *et al.* Study of Essencial Oil Composition of *Elionurus hensii* Schum from Congo. **Journal of Essencial Oil Research**, New York, v. 18, p. 518-520, 2006.

SILVA, M. A. *et al.* Phytochemical and Genetic Variability of *Casearia sylvestris* Sw. From São Paulo State Atlantiuc Forest and Cerrado Populations. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, p. 159-166, 2006a.

SILVA, N. A. *et al.* Caracterização Química do Óleo Essencial da Erva-cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 52-55, 2006b.

SILVA, S. H. B. da. **Avaliação de Clones de *Pennisetum purpureum* Schum. de Porte Baixo, na Zona da Mata Seca de Pernambuco**. Recife : UFRPE, 2007. 70f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

SIMIONI, C. *et al.* Tolerância ao Frio e Caracterização de Híbridos entre *Leucaena leucocephala* e *L. diversifolia*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 453-458, 1999.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre : Editora da UFRGS ; Florianópolis : Editora da UFSC, 2000.

SINAI, A. C. *et al.* Óleos Essenciais, Potencial Anti-inflamatório. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 16, p. 38-43, 2000.

SOSTER, M. T. B. *et al.* Caracterização Morfofisiológica de Genótipos de Cornichão (*Lotus corniculatus* L.) **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1654-1661, 2004.

STEBBINS, G. L. **Processos de Evolução Orgânica**. São Paulo: Polígono, 1970. 252p.

STEINER, M. G. **Caracterização Agronômica, Molecular e Morfológica de Acessos de *Paspalum notatum* Flugge e *Paspalum guenoarum* Arech.** 2005. 129f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. de. Repetibilidade da Produção de Massa Foliar em Erva-mate em Dois Tipos de Solos na Região de Ponta Grossa, PR. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 155-158, 2001.

TAIZ, L.; ZAIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.95-105.

VASEY, Geo. Special Uses and Properties of Some Mexican Grasses. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, Lawrence, v. 14, n. 5, p. 98-100, 1887.

VEGETTI, A. C. ; ANTÓN, A. M. Estructura del Disemínulo en Especies de Andropogoneae (Poaceae). **Anales Jardín Botánico de Madrid**, Madrid, v. 56, n. 1, p. 95-106, 1998.

VIEIRA, E. A. *et al.* Genetic Estruture of Annual Ryegrass (*Lolium multiflorum*) Populations Estimaded by RAPD. **Scientia Agrícola**, Piracicaba. v.61, n. 4, p. 407-413, 2004a.

VIEIRA, Israel Gomes. **Estudos de Caracteres Silviculturais e de Produção de Óleo Essencial de Progênes de *Corymbia citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. S. Johnson Procedente de Anhembi SP – Brasil, Ex Atherton QLD – Austrália**. Piracicaba : ESALQ, 2004. 100f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004b.

WATSON, L. ;DALLWITZ, M. J. **The Grass for the World**. Cambridge: CAB International, 1994. p.366-367.

WELKER, C. A. D.; LONGHI-WAGNER, H. M. A Família Poaceae no Morro Santana, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, n.4, p.53-92, 2007.

WILLIAMS, J.G.K. *et al.* DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary *primers* are Useful as Genetic Markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535. 1990.

WRIGHT, S. Isolation by Distance. **Genetics**, Bethesda, MD, n. 28, p. 114-138, 1943.

YAMAMOTO, P. Y. **Interação Genótipo X Ambiente na Produção e Composição de Óleos Essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** Campinas : IAC, 2006. 78f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônômico, Campinas, 2006.

YAO, M. Z. *et al.* Genetic Diversity Among Tea Cultivars from China, Japan and Kenya Revealed by ISSR Markers and its Implication for Prental Selection in Tea Breeding Programmes. **Plant Breeding**, Berlin, v. 127, p. 166-172, 2008.

YUNES, R.A. *et al.* Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p 147-152, 2001.

ZANETTINI, M. H. B.; CAVALI, S. S. Variabilidade Genética em Função do Modo de Reprodução . In: **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p 177-188.