



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CAMPUS II- AREIA –PB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

KARLA NASCIMENTO DE SOUZA

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
MUSSAMBÊ (*Cleome spinosa* Jacq.) E CAMBARÁ (*Lantana camara* L.), POTENCIAIS
ORNAMENTAIS**

**AREIA
2019**

KARLA NASCIMENTO DE SOUZA

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE POPULAÇÕES
NATURAIS DE MUSSAMBÊ (*Cleome spinosa* Jacq.) E CAMBARÁ
(*Lantana camara* L.), POTENCIAIS ORNAMENTAIS**

Trabalho de Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Agronomia da
Universidade Federal da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre
em Agronomia.

Orientador: Prof. Dra. Elizanilda Ramalho do
Rêgo

**AREIA
2019**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S729d Souza, Karla Nascimento de.

Diversidade genética entre e dentro de populações naturais de Mussambê (*Cleome spinosa* Jacq.) e Cambará (*Lantana camara* L.), potenciais ornamentais. / Karla Nascimento de Souza. - Areia:UFPB/CCA, 2019.

64 f. : il.

Orientação: Elizanilda Ramalho do Rêgo.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Mussambê. 2. Cambará. 3. RAPD. 4. Variabilidade genética. 5. Plantas Ornamentais. 6. Plantas medicinais. I. Rêgo, Elizanilda Ramalho do. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 631/635(043.3)

KARLA NASCIMENTO DE SOUZA

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE POPULAÇÕES NATURAIS
DE MUSSAMBÊ (*Cleome spinosa* Jacq.) E CAMBARÁ (*Lantana camara* L.),
POTENCIAIS ORNAMENTAIS

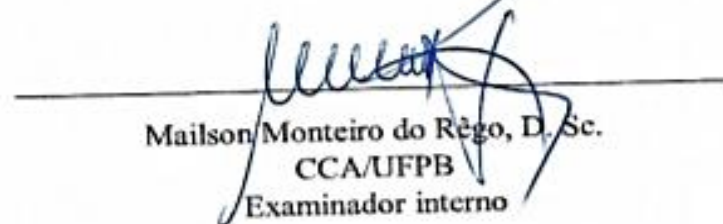
Trabalho de Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia da Universidade Federal da
Paraíba, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Agronomia.

Aprovado em: 18 de fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA



Elizanilda Ramalho do Rêgo, D. Sc.
CCA/UFPB
Presidente



Mailson Monteiro do Rêgo, D. Sc.
CCA/UFPB
Examinador interno



Isaias Vitorino Batista de Almeida, D. Sc.
EMPAER
Examinador externo

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

Ao meu pai (*In memoriam*), que sempre
será o grande amor da minha vida.

A minha mãe e irmã, por serem meu
porto seguro.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal da Paraíba, em especial, ao programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realização do curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A Dra. Elizanilda Ramalho do Rêgo, pelo apoio, orientação, paciência e oportunidade de aprendizagem.

Ao Dr. Maílson Monteiro do Rêgo, por toda ajuda, ensinamentos e incentivo.

Ao Dr. Isaias Vitorino Batista de Almeida, por aceitar participar da banca examinadora e por suas contribuições.

A Dra. Ângela Maria, por toda ajuda na condução deste trabalho.

A Rubens Rangel, por toda ajuda durante as coletas.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal, em especial a Kaline Nascimento, Michelle Carvalho, Kadson Frutuoso, João Felipe Guedes, Bruna Regina, Lindamara, Jardel Sousa e Elisandra Sousa, obrigada pela amizade e companheirismo ao longo desses dois anos.

A Lucas Sombra, pelo companheirismo, amizade e apoio ao longo da graduação e do mestrado.

A todos que, de alguma forma me ajudaram até aqui.

Muito obrigada!

RESUMO

O mercado de plantas ornamentais encontra-se em crescente expansão, ocorrendo com frequência o lançamento de novas plantas, o que ocorre basicamente devido a criação de novas cultivares ou pela identificação de espécies nativas que apresentem características desejáveis ao mercado. Existem na flora nativa diversas espécies que apresentam potencial para uso ornamental ainda pouco explorado, dentre elas estão o Mussambê (*Cleome spinosa* Jacq.) e o Cambará (*Lantana camara* L.), ambas as espécies são conhecidas por suas propriedades medicinais. Para viabilizar o uso adequado destas espécies, seja para uso ornamental ou medicinal, para estabelecer estratégias eficientes de conservação e para inserir as espécies em programas de melhoramento genético, é necessária a identificação da máxima variabilidade genética. Dessa forma, neste trabalho objetivou-se avaliar a diversidade genética presentes em populações de Mussambê e Cambará. O trabalho está dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo é avaliada a diversidade presente entre e dentro de três populações de Mussambê coletadas nas cidades Paraibanas de Remígio, Esperança e Alagoinha. No segundo capítulo, avaliou-se a diversidade presente entre e dentro de duas populações de Cambará coletadas em Areia-PB, ao longo da PB-079 e PB-087. Em ambos os capítulos a diversidade genética foi avaliada com base em marcadores morfológicos e moleculares do tipo RAPD. A diversidade genética foi acessada a partir dos dados morfológicos por meio da análise de componentes principais e por análise de cluster usando os dados moleculares. Observou-se que em ambas as espécies, os marcadores utilizados foram eficientes na detecção de diversidade entre os indivíduos. Com base nos resultados, em ambos os estudos, os indivíduos mais dissimilares podem ser indicados como possíveis genitores em programa de melhoramento genético.

Palavras-chave: Mussambê. Cambará. RAPD. Variabilidade genética. Plantas Ornamentais. Plantas medicinais.

ABSTRACT

The ornamental plant market is growing, with the launch of new plants frequently occurring, which is basically due to the creation of new cultivars or the identification of native species that present desirable characteristics to the market. There are several species in the native flora that have a potential for ornamental use that has not yet been explored, among them are Mussambê (*Cleome spinosa* Jacq.) and Cambará (*Lantana camara* L.), both species are known for their medicinal properties. To enable the adequate use of these species, whether for ornamental or medicinal use, to establish efficient conservation strategies and to insert the species in genetic improvement programs, it is necessary to identify the maximum genetic variability. Thus, this study aimed to evaluate the genetic diversity present in populations of Mussambê and Cambará. The work is divided into two chapters. In the first chapter, the diversity present between and within three populations of Mussambê collected in the cities of Paraíba in Remígio, Esperança and Alagoinha is evaluated. In the second chapter, the diversity present between and within two populations of Cambará collected in Areia-PB, along PB-079 and PB-087, was evaluated. In both chapters, genetic diversity was assessed based on morphological and molecular markers of the RAPD type. Genetic diversity was accessed from the morphological data through principal component analysis and cluster analysis using molecular data. It was observed that in both species, the markers used were efficient in detecting diversity among individuals. Based on the results, in both studies, the most dissimilar individuals can be indicated as possible parents in a genetic improvement program.

Key words: Mussambê. Cambará. RAPD. Genetic variability. Ornamental plants. Medicinal plants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	08
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO I: Diversidade genética entre e dentro de populações naturais de <i>Cleome spinosa</i> Jacq	
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
3. RESULTADOS	21
4. DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÕES	33
6. REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO II: Diversidade genética entre e dentro de populações naturais de <i>Lantana camara</i> L.	
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4. CONCLUSÕES	59
5. REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil o mercado de plantas ornamentais encontra-se em crescente expansão (IBRAFLOR, 2017), sendo esta atividade exercida em grande parte por pequenos produtores rurais (Franca, 2008). O setor da floricultura caracteriza-se pelo frequente lançamento de novas plantas, o que ocorre basicamente pela criação de novas cultivares ou pela identificação de espécies nativas que apresentem características desejáveis ao mercado (Carrion & Brack, 2012; Cavalcante, 2015).

Com isto, é necessário realizar a caracterização das espécies da flora nativa que apresentem potencial de uso ornamental. O uso dessas espécies além de representar um diferencial na cadeia produtiva também é importante para conservação da flora local (Heiden et al., 2006; Hitchmough 2010; Beckmann-Cavalcante et al., 2013). Dentre as espécies nativas com potencial ornamental ainda pouco exploradas comercialmente encontram-se a *Cleome spinosa* Jacq. e a *Lantana camara* L.

Ambas as espécies citadas são bastante utilizadas na medicina popular. A *Cleome spinosa* Jacq. é conhecida popularmente como Mussambê, pertence à família Cleomaceae. Caracteriza-se como um arbusto ereto de caule cilíndrico, ramificados com espinhos. As folhas são alternadas helicoidais, pecioladas, apresentando limbo recortado profundamente em até 8 segmentos. A inflorescência apresenta-se em conjuntos terminais com flores brancas, androceu com estames de filetes róseos longos (Moreira & Bragança, 2011; Aparadh et al., 2012; Cornejo et al., 2015). O mussambê apresenta atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-helmíntica (Mcneil et al., 2010; Albarello et al., 2013; Andrade et al., 2014; Silva, 2016).

Assim como a *Cleome spinosa* Jacq., *Lantana camara* L. também apresenta propriedades medicinais, como por exemplo, propriedades analgésica e anti-inflamatória (Bairagi et al., 2017), citotóxica e anticâncer (Shamsee et al., 2019) e anticonvulsivante (Kazmi et al., 2012). Esta espécie é conhecida como Cambará, Lantana, Sálvia Selvagem, e pertencente à família Verbenaceae (Salimena & Múlgura, 2014). São descritas como arbustos vigorosos de caules ramificados, possuem folhas ovaladas e opostas com coloração verde. Os frutos são bagas globosas, com coloração arroxeada e diâmetro de 3 a 4 mm. As inflorescências são compactas, com formato de cúpula contendo de 20 a 40 flores sésseis com cores que variam entre branco, amarelo, laranja e vermelho (Oliveira, 2007; Sandres, 2012).

No entanto, para viabilizar o uso adequado destas espécies, seja para uso ornamental ou medicinal, e para estabelecer estratégias eficientes para a conservação das mesmas são necessárias diversas informações, como o nível de ocorrência das espécies em condições naturais, manejo adequado, índice de aproveitamento agrícola e industrial das espécies e identificação da máxima variabilidade genética (Morales & Valois, 2000; Silva et al., 2018).

Além de importante para estabelecer estratégias de uso e conservação das espécies, a variabilidade genética também é fundamental no estabelecimento de programas de melhoramento vegetal. A variabilidade genética pode ser estimada através do uso de diversos marcadores, dentre eles os morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, citológicos e moleculares (Amaral Júnior et al., 2010).

Dentre os citados, os marcadores morfológicos são caracterizados como uma técnica acessível, de fácil aplicação e baixo custo, que mostra-se eficiente na obtenção preliminar de dados sobre a variabilidade genética das populações (Singh, 2001). Contudo, existem limitações, como a influência ambiental e o estágio de desenvolvimento da planta no período de análise que podem comprometer a exatidão dos dados. Os marcadores morfológicos auxiliam no uso de técnicas mais sofisticadas, como os marcadores moleculares, aumentando a precisão dos dados sobre variabilidade genética entre e dentro de populações naturais (Andrade et al., 2011; Cruz et al., 2011; Flood et al., 2011).

Afim de aumentar a precisão dos resultados, os marcadores moleculares apresentam-se como opção viável e que produz resultados confiáveis, estes são marcadores genéticos baseados na detecção de isoenzimas ou sequências de DNA (Faleiro, 2011). A técnica é bastante eficiente para determinar variabilidade genética entre indivíduos, analisando diretamente o material genético. Podem ser utilizados para análise em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, e os dados obtidos são isentos da influência ambiental (Yanaka et al., 2005; Faleiro, 2007; Kamada et al., 2009).

Entre os vários tipos de marcadores moleculares, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) destaca-se por ser rápido, simples, de baixo custo, demanda quantidades mínimas de DNA para as análises e dispensa conhecimento prévio da sequência de DNA alvo. Tem como principais aplicações os estudos de diversidade genética e mapeamento genético. A técnica, baseia-se na amplificação através da PCR (Reação em cadeia da polimerase) de fragmentos não específicos do DNA, utilizando iniciadores curtos de 10-15 nucleotídeos de sequência aleatória (Lacerda et al., 2002; Faleiro, 2011; Silva et al., 2015).

A partir das informações obtidas através do uso dos marcadores morfológicos e moleculares quanto a diversidade genética existente nas populações das espécies, é possível estabelecer estratégias de uso e conservação e selecionar possíveis genitores em programas de melhoramento da espécie.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade genética entre e dentro das populações de *Cleome spinosa* Jacq e *Lantana camara* L. com o auxílio de marcadores moleculares do tipo RAPD e de marcadores morfológicos. O trabalho está dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo avaliou-se a diversidade genética entre e dentro de três populações naturais de Mussambê (*Cleome spinosa* Jacq.). No segundo capítulo foi avaliada a diversidade genética entre e dentro de duas populações naturais de Cambará (*Lantana camara* L.).

REFERÊNCIAS

- ALBARELLO, N. et al. Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de plantas de crescimento em campo e cultura de tecidos de *Cleome spinosa* (Jacq) em camundongos. **J. Med. Plantas. Res.** V. 7, p. 1043-1049, 2013. doi: 10.5897 / JMPR12.153
- AMARAL JÚNIOR AT, et al. Procedimentos Multivariados em Recursos genéticos vegetais. In: Pereira TNS (ed.). Germoplasma: Conservação, Manejo e Uso no Melhoramento de Plantas. Viçosa, p. 205- 254, 2010.
- ANDRADE, R. A. et al. Diversidade genética de acessos de *Nephelium lappaceu* L. através de caracterização morfológica e molecular. **Comunicata Scientiae.** v.2, p.91-99, 2011.
- ANDRADE, F.D. et al. Ação anti-helmíntica do extrato hidroalcoólico da raiz de *Tarenaya spinosa* (Jacq) Raf. para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos. **Pes. Veterinario. Bras.** v.34, p.942-946, 2014. doi: 10.1590 / S0100-736X2014001000003
- APARADH , V. et al. Taxonomy and physiological studies in spider flower (*Cleome* species): a critical review. **Plant Sciences Feed**, v.3, p. 25-46, 2012. ISSN: 2231 -1.97
- S.M. BAIRAGI, et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of crude leaf and bark extract of *Lantana Camara*. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 21, p.810–817, 2017. doi: 10.12991/mpj.2017.7.
- BECKMANN-CAVALCANTE, M.Z. et al. Ornamental use of *Pfaffia glomerata* (spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, v.1000, p. 59-62, 2013.
- CARRION, NA.A. et al. Eudicotiledôneas ornamentais dos campos do bioma Pampa no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.18, n.1, p.2,2012
- CAVALCANTE, R. M. H. **A Importância do Conhecimento de Plantas Ornamentais Tóxicas para a Formação Profissional dos Alunos de Medicina, Enfermagem e Farmácia de uma Universidade da Paraíba.** 2015. Monografia de conclusão (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.
- CORNEJO, X. et al. 2015. **Capparaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB100861>. Acesso em 26 de julho de 2017.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, v. 1, 2011.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados à conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007, v.1.

FALEIRO, F.G. Princípios científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JUNIOR, F.B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. v.1, p. 31-52, 2011.

FLOOD, P.J. et al. Natural genetic variation in plant photosynthesis. **Trends in Plant Science**, v.16, n.6, p.327-335, 2011. doi: 10.1016/j.tplants.2011.02.005.

FRANCA, C. A. M. Panorama do agronegócio de flores e plantas ornamentais no Brasil, 2008.

HEIDEN, G. et al. Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Rev. Bras. de Horticultura Ornamental**, v.12, p. 1-7, 2006

HITCHMOUGH, J. Applying an ecological approach: the future of urban horticulture. **Acta Horticulturae** v. 881, p.193-200, 2010.

IBRAFLOR. Instituto Brasileiro de Floricultura. **Informativo Ibraflor**. 2017. Disponível em: <https://www.ibraflor.com/numeros-setor>. Acesso em: 18 de janeiro de 2020.

KAMADA T, ET AL. Genetic diversity in natural populations of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimated by RAPD markers. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, p. 403-409, 2009.

KAZMI, I., et al. Anticonvulsant and depressant-like activity of ursolic acid stearyl glucoside isolated from *Lantana camara* L. (Verbanaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.2, p. 453–456, 2012. doi: 10.1016/S2222- 1808(12)60202-3.

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

MCNEIL, M.J. et al. Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Cleome spinosa*. **Nat. Prod. Comum**. v.5, p.1301-1306, 2010.

MORALES, E.A.V., et al. Recursos genéticos autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v.1, p11-42, 2000.

Moreira, H.J.D.C., et al. **Manual de identificação de plantas infestantes**, Campinas- SP, 2011.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 466-476, 2007.

SANDERS, R. W. Taxonomy of Lantana (Verbenaceae): II. Taxonomic Revision. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, v.6, n. 2, p. 403-441, 2012.

SILVA, R.G., et al. Análise da variabilidade genética por RAPD de linhagens isoladas de solo e lodo impactados com efluente industrial. **Revista da Biologia**, v.14, n.1, p. 1-5, 2015.

SILVA, D.C. et al. Arrigoni-Blank, Chemical diversity of essential oils from native populations of *Eplingiella fruticosa*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, p. 205–214, 2018. doi: 10.1590/ 1984-70332018v18n2n29.

SINGH, S. P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. **Crop Science**. v.41, n.6, p.1659- 1675, 2001.

CAPÍTULO I

Diversidade genética entre e dentro de populações naturais de *Cleome spinosa* Jacq.

Diversidade genética entre e dentro de populações naturais de *Cleome spinosa* Jacq.

Resumo: A *Cleome spinosa* Jacq. é uma erva perene bastante utilizada na medicina tradicional e na ornamentação de jardins, porém, existem poucas informações sobre a diversidade genética presente nas populações deste importante recurso genético vegetal. Avaliou-se neste estudo a diversidade genética entre e dentro de populações naturais de *Cleome spinosa* Jacq. através de marcadores morfológicos e moleculares, para obtenção de dados que auxiliem na domesticação e uso da espécie para fins medicinais e ornamentais. Por meio de marcadores morfológicos e moleculares realizou-se a caracterização de três populações de Mussambê nas cidades paraibanas de Remígio, Esperança e Alagoinha. Os valores obtidos através dos caracteres morfológicos foram submetidos à análise de componentes principais, e os dados moleculares a análise de agrupamento de cluster. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R. Observou-se que os caracteres morfológicos e o marcador molecular RAPD foram eficientes para detectar diversidade genética entre os indivíduos. A variabilidade entre populações foi maior que dentro das populações. Entre as populações os indivíduos 11 e 75 são os mais divergentes. Dentro da população de Remígio a maior divergência é entre a planta 11 e 25, na população de Esperança entre 53 e 55 e na população de Alagoinha entre 71 e 75. Em programa de melhoramento genético da espécie, estes indivíduos podem ser indicados como possíveis genitores. Informações sobre a diversidade genética são importantes para viabilizar o uso e a conservação da espécie.

Palavras-chave: Mussambê. RAPD. Marcadores morfológicos. Planta medicinal. Planta ornamental.

Genetic diversity among and within natural populations of *Cleome spinosa* Jacq.

Abstract: The *Cleome spinosa* Jacq. it is a perennial herb widely used in traditional medicine and in garden ornamentation, however, there is little information on the genetic diversity present in the populations of this important plant genetic resource. In this study, genetic diversity between and within natural populations of *Cleome spinosa* Jacq was evaluated. through morphological and molecular markers, to obtain data that assist in domestication and use of the species for medicinal and ornamental purposes. Using morphological and molecular markers, three Mussambê populations were characterized in the Paraíba cities of Remígio, Esperança and Alagoinha. The values obtained through the morphological characters were submitted to the analysis of main components, and the molecular data to the analysis of cluster grouping. All analyzes were performed using the software R. It was observed that the morphological characters and the molecular marker RAPD were efficient to detect genetic diversity among individuals. The variability between populations was greater than within populations. Among populations, individuals 11 and 75 are the most divergent. Within the population of Remígio the biggest divergence is between the plant 11 and 25, in the population of Esperança between 53 and 55 and in the population of Alagoinha between 71 and 75. In a genetic improvement program of the species, these individuals can be indicated as possible parents . Information on genetic diversity is important to enable the use and conservation of the species.

Key words: Mussambê. RAPD. Morphological markers. Medicinal plant. Ornamental plant.

1 INTRODUÇÃO

A *Cleome spinosa* Jacq., conhecida popularmente como Mussambê, Mussambê-branco e Sete-marias, pertence à família Cleomaceae (Soares Neto & Silva, 2020). É uma erva perene típica da América do Sul, África e Sul dos Estados Unidos das Américas, também é amplamente cultivada em várias partes da Ásia tropical (Agra et al., 2007). Uma das características marcantes da espécie está em sua inflorescência, formada por conjuntos de flores brancas, que apresentam androceu com estames de filetes róseos longos (Moreira & Bragança, 2011; Aparadh et al., 2012).

As espécies do gênero *Cleome* são bastante utilizadas na medicina tradicional e como ornamentais (Pereira et al., 2007; Huang et al., 2010; Tsai et al., 2012; Albarello et al. 2013; Onyango et al. 2013; Moustafa et al., 2019). Na medicina tradicional, o mussambê apresenta atividades antimicrobiana, inseticida, anti-inflamatória e anti-helmíntica cientificamente comprovadas (Mcneil et al., 2010; Albarello et al., 2013; Andrade et al., 2014; Silva, 2016). Para Costa & Spehar (2012), todo vegetal que apresente valor econômico atual ou potencial é considerado um recurso genético vegetal. Com isto, devido seu potencial de exploração como planta medicinal e ornamental, pode-se considerar o Mussambê um importante recurso genético vegetal.

No entanto, para viabilizar o uso adequado e a conservação destes recursos são necessárias diversas informações, como nível de ocorrência da espécie em condições naturais, manejo adequado, índice de aproveitamento agrícola e industrial da espécie e identificação da máxima variabilidade genética (Morales & Valois, 2000; Silva et al., 2018).

Portanto, o conhecimento sobre a diversidade genética é fundamental no estabelecimento de estratégias de manejo, conservação e uso das espécies (Oliveira & Silva, 2008; Faleiro et al., 2011). Para estimar a diversidade diversos marcadores podem ser utilizados, dentre eles os morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, citológicos e moleculares (Amaral Júnior et al., 2010).

Neste contexto, no presente estudo objetivou-se avaliar a diversidade genética entre e dentro de populações naturais de *Cleome spinosa* Jacq. através de marcadores morfológicos e moleculares, para obtenção de dados que auxiliem na domesticação e uso da espécie para fins medicinais e ornamentais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se caracterização morfológica e molecular de três populações de *Cleome spinosa* Jacq. (Figura 1) nos municípios Paraibanos de Remígio, Esperança e Alagoinha (Figura 2), contendo cada população, 30, 30 e 27 indivíduos, respectivamente.



Figura1. Indivíduo de *C. spinosa* Jacq. caracterizado morfológicamente em Remígio –PB.

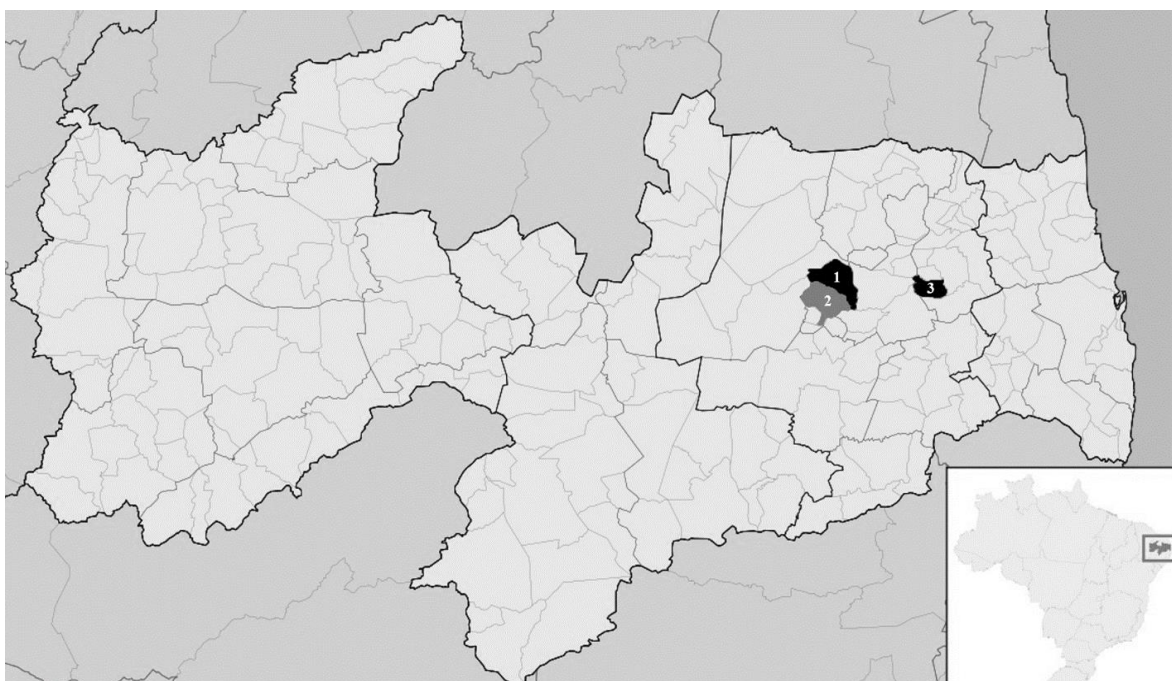


Figura2. Populações de *Cleome spinosa* Jacq. amostradas neste estudo, localizadas em diferentes municípios da Paraíba, Brasil. 1: Remígio 2: Esperança. 3: Alagoinha. Mapa adaptado da Wikipédia (2017).

Caracterização morfológica

Para caracterização morfológica avaliou-se os seguintes caracteres: altura da planta (AP), diâmetro do caule (DC), diâmetro da copa (DDC), comprimento da folha (CF) e largura da folha (LF). Todas as mensurações foram realizadas com auxílio de régua e paquímetro digital (Paquímetro digital Leetools®).

Caracterização molecular

Para caracterização molecular coletou-se folhas jovens de todos os indivíduos selecionados, as folhas foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio identificados e mantidas em caixas térmicas com gelo. Encaminhou-se o material coletado para o Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (LBMV/CCA/UFPB), mantendo o material vegetal conservado em freezer até o início das análises.

Para extração do DNA, utilizou-se aproximadamente 200mg do material vegetal coletado. O procedimento foi realizado utilizando o protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1995), com modificações. A qualidade e quantidade do DNA foi verificada usando eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado em solução de brometo de etídio (0.2mg/L), e fotografado sob luz UV, em um fotodocumentador tipo Gel logic 112.

As reações de amplificação do DNA foram feitas utilizando-se um volume final de 25µl, sendo 23 µl de Master Mix (Tampão 1x + MgCl₂ 3 mM + dNTP 200 mM + primer 1 mM + Taq DNA polimerase 1 U) e 2 µl de DNA genômico (50 ng) da amostra. Na obtenção das marcas de RAPD foram utilizados 15 iniciadores (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) decâmeros, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos 15 iniciadores utilizados nas reações de RAPD com suas respectivas sequências de bases.

Iniciador	Sequência 5'- 3'
OPAT-01	CAGTGGTTCC
OPAT-02	CAGGTCTAGG
OPAT-03	GACTGGGAGG
OPAT-04	TTGCCTCGCC
OPAT-06	CCGTCCCTGA
OPAT-07	ACTGCGACCA
OPAT-08	TCCTCGTGGG
OPAT-09	CCGTTAGCGT
OPAT-10	ACCTCCGGTC
OPAT-11	CCAGATCTCC
OPAT-12	CTGCCTAGCC
OPAT-13	CTGGTGGAAG
OPAT-14	GTGCCGCACT
OPAT-15	TGACGCACGG
OPAT-16	CTCTCCGTAG

As reações de amplificação foram efetuadas em um termociclador (Modelo: TC-PLUS, da Techne©) com a seguinte programação: desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos; 40 ciclos, cada ciclo com a seguinte sequência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 34 °C e 60 segundos a 72 °C; após os 40 ciclos, foi realizada extensão final a 72 °C por sete minutos. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% , corado com brometo de etídio (0.2mg/L).

Análise de dados

Os valores médios dos caracteres morfológicos foram submetidos a análise dos componentes principais (PCA). Foi necessário utilizar dois pacotes estatísticos, Factoextra (Kassambara, 2016) e FactoMineR (Lê et al., 2008). E os gráficos gerados por meio do pacote ggplot2 (Wickham, 2016). Todas as análises foram realizadas utilizando o *software R Studio* versão 3.2.0 (R Core Development Team, 2016).

Na análise de cluster obteve-se o arquivo com base na leitura das bandas em gel, onde (0) indicou ausência e (1) a presença de bandas. Com base nesses dados, estimou-se as distâncias genéticas entre pares de indivíduos, gerando uma matriz de dissimilaridade, por meio da distância binária de Sokal (1963). A partir da matriz de distâncias genética realizou-se análise de agrupamento de Ward D2 (Wilks, 2011), resultando no dendrograma. Para o ponto

de corte adotou-se o critério proposto por Mojema (1977). A matriz de distâncias genéticas também foi usada para calcular o coeficiente de correlação cofenética (r) e a consistência dos agrupamentos submetidas ao teste de Mantel (1967) ($\alpha \leq 0,05$). Utilizou-se o pacote ggplot2 (Wickham, 2016).

3 RESULTADOS

Dados morfológicos

A diversidade genética através da análise de componentes principais (ACP), está expressa em um conjunto de componentes principais. Os componentes principais 1 e 2 e explicam 70,15% da variação, sendo está uma porcentagem aceitável (Tabela 2). Todas as variáveis foram importantes na discriminação dos indivíduos.

Tabela 2. Componentes principais, autovalores, porcentagem da variância retida em cada componente e porcentagem da variância acumulada pelos componentes principais.

Componentes Principais (CP)	Autovalor	% de variância	% de variância acumulada
CP 1	1,85	36,95	36,95
CP 2	1,66	33,20	70,15
CP 3	0,73	14,70	84,85
CP 4	0,44	8,95	93,80
CP 5	0,31	6,20	100,00

Para o componente principal 1, as maiores contribuições foram das variáveis diâmetro do caule (40,54%), diâmetro da copa (38,77%) e altura da planta (20,11%) enquanto para o componente principal 2, as maiores contribuições foram das variáveis largura da folha (48,41%) e comprimento da folha (43,83%).

Na figura 3, encontra-se a dispersão gráfica dos escores das três populações de Mussambê nos dois primeiros componentes principais. Há uma sobreposição das populações analisadas com base nos dados morfológicos. A população de Remígio-PB apresenta maior

variabilidade, sendo seus indivíduos mais dispersos no mapa. A população de Esperança-PB apresenta indivíduos similares aos indivíduos das populações de Remígio-PB e Alagoinha-PB.

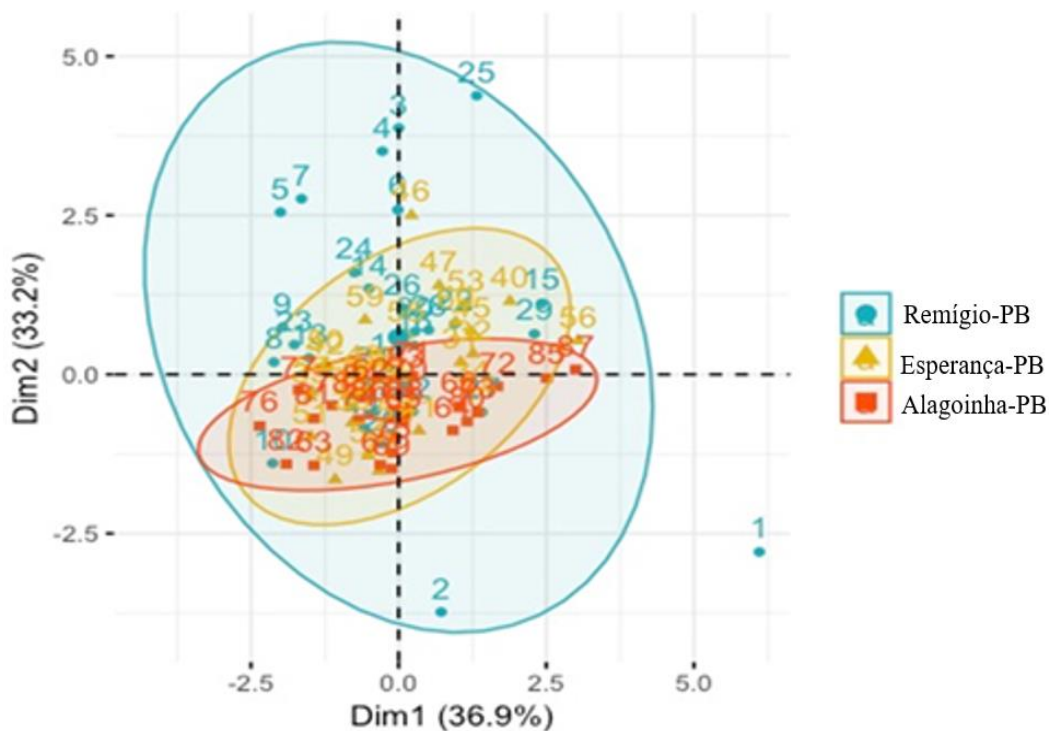


Figura 3. Dispersão gráfica das três populações de *C. spinosa* Jacq. com base nos escores dos caracteres morfológicos, representado pelos componentes principais 1 e 2. População Remígio-PB do indivíduo 1 a 30; população Esperança-PB de 31 a 60 e população de Alagoinha-PB de 61 a 87.

A análise de componentes principais (ACP) realizada com base nos dados morfológicos dentro de cada população, mostrou que os componentes principais 1 e 2 explicam 75,54%, 67,96% e 71,44% da variação contida nas populações de Remígio-PB, Esperança-PB e Alagoinha-PB, respectivamente (Tabela 3).

Componente Principal (CP)	População 1 (Remígio)		População 2 (Esperança)		População 3 (Alagoinha)	
	Autovalor	% de V. A.	Autovalor	% de V.A.	Autovalor	% de V.A.
CP1	2,23	44,63	2,29	45,84	2,45	49,02
CP2	1,54	75,54	1,10	67,96	1,12	71,44
CP3	0,68	89,34	0,82	84,48	0,89	89,30
CP4	0,31	95,71	0,63	97,26	0,32	95,76
CP5	0,21	100,00	0,13	100,00	0,21	100,00

Tabela 3. Componentes principais, autovalores e porcentagem da variância acumulada (V.A) pelos componentes principais dentro das populações.

Observa-se a dispersão gráfica dos escores dentro de cada população de Mussambê nos dois primeiros componentes principais. A população de Remígio-PB (Figura 4a) possui maior variabilidade genética dentre as populações avaliadas, com as maiores distâncias entre os acessos. Os indivíduos da população de Esperança-PB (Figura 4b) estão distribuídos próximos a região central do mapa. Parte dos indivíduos mantem distância uniforme em relação ao acesso mais próximo. Os indivíduos de Alagoinha-PB (Figura 4c), destacam-se por apresentar menor dissimilaridade, estando estes próximos ao eixo central do mapa de fatores. Para esta população observa-se que a distância entre os acessos 65, 74 e 84 é praticamente nula. E os indivíduos 69 e 82 são os mais dissimilares, apresentando as maiores distancias em relação aos demais.

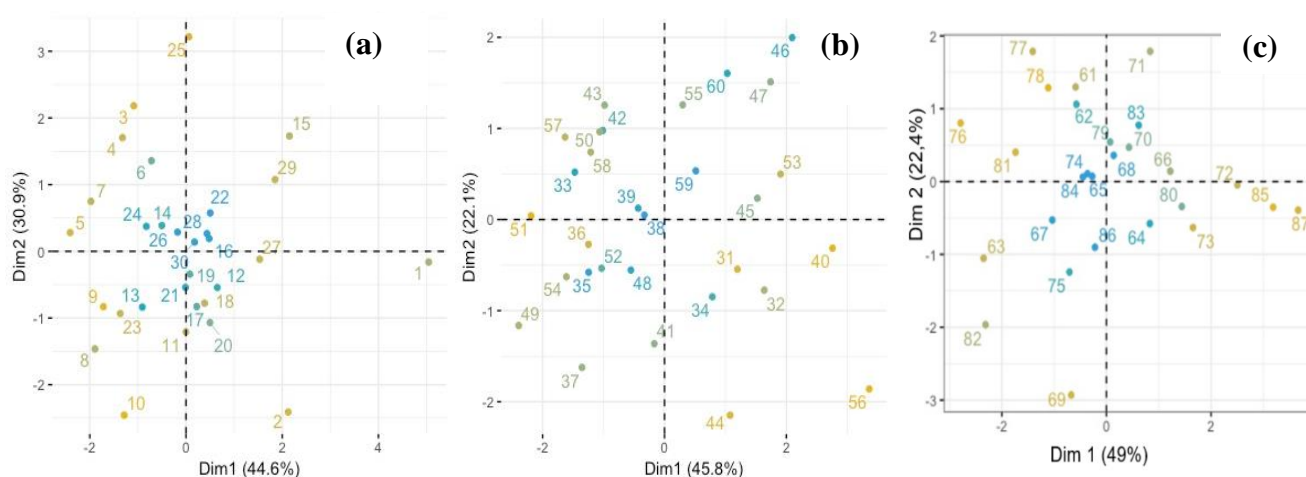


Figura 4. Distribuição dos indivíduos dentro das populações *Cleome spinosa* Jacq., coletadas em (a) Remígio-PB; (b) Esperança-PB; e (c) Alagoinha-PB, agrupados com base nos componentes principais a partir dos dados morfológicos.

Dados moleculares

Dos 15 *primers* utilizados, somente 6 amplificaram bandas, no total de 727 bandas, em 77 locos polimórficos e 11 monomórficos. Os iniciadores OPAT-02, OPAT-03, OPAT-08, OPAT-09, OPAT-10, OPAT-11, OPAT-14, OPAT-15 e OPAT-16 não originaram nenhuma amplificação nos 87 indivíduos. Para as três populações, o iniciador OPAT-01 foi o mais eficiente, produzindo bandas visíveis e amplificando 83,3% (25 plantas), 77% (23 plantas) e 70,4% (19 plantas) dos indivíduos analisados nas plantas das populações 1, 2 e 3, respectivamente (Figuras 5, 6 e 7). Este iniciador também produziu maior número de locos polimórficos nas três populações, ao detectar fragmento polimórfico. O *primer* OPAT-12 foi o menos eficiente, nas três populações. Não houve amplificação de nenhuma banda nos indivíduos 55 e 58 a partir dos 15 iniciadores de RAPD testados. A porcentagem média de locos polimórficos nas populações estudadas foi de 87%.

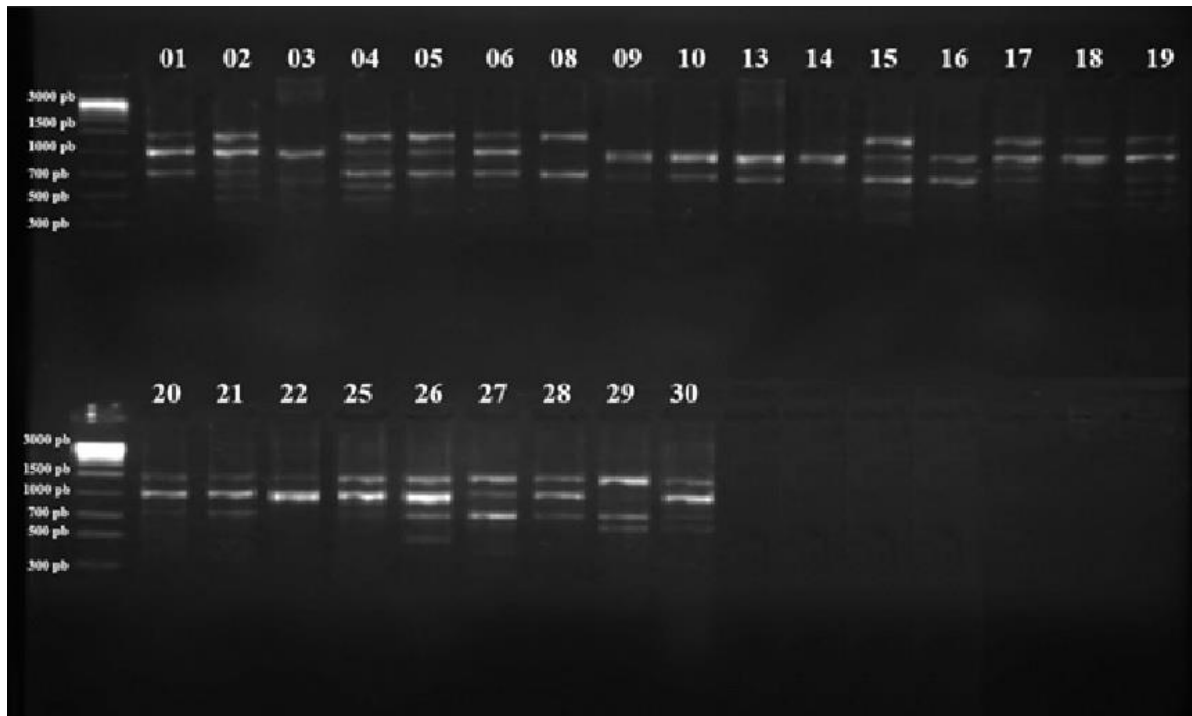


Figura 5. Perfil eletroforético em gel de agarose (0,8%) com marcador RAPD, gerados a partir do primer OPAT-01 em 25 indivíduos da população 1(Remígio-PB) de *C. spinosa* Jacq. MM–marcador de peso molecular Ladder 1 Kb.

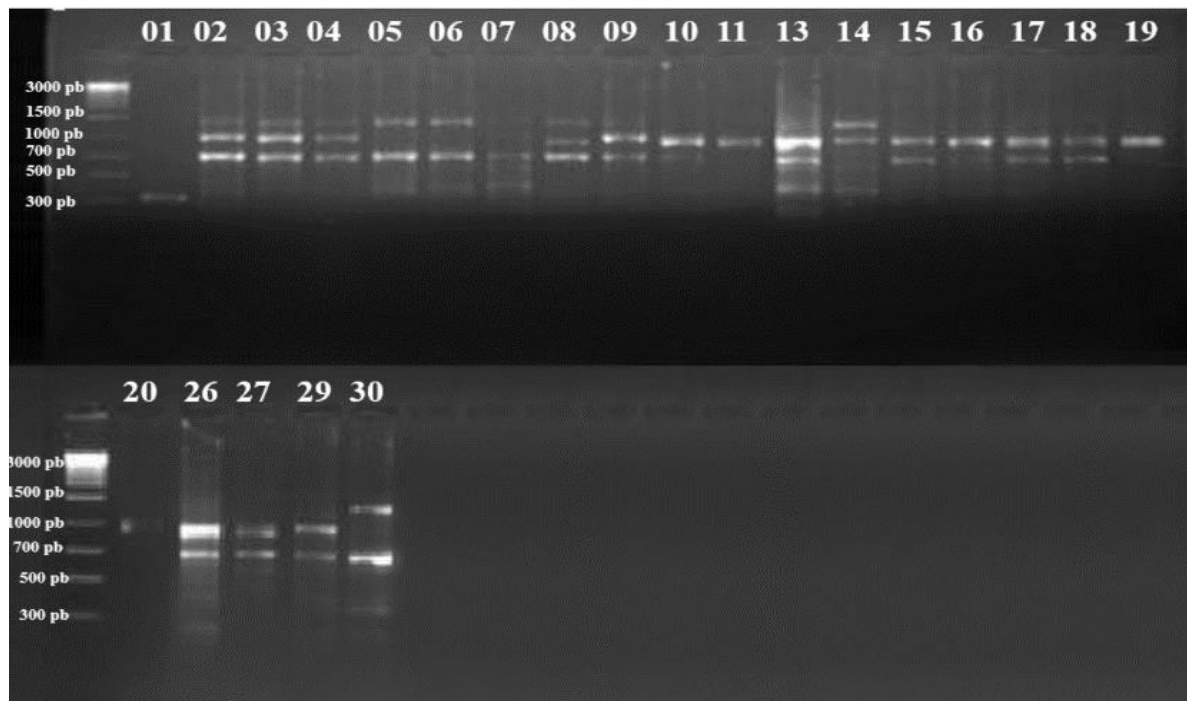


Figura 6. Perfil eletroforético dos produtos de amplificação de RAPD gerados com o iniciador OPAT-01 em 23 indivíduos da população 2 (Esperança-PB) de *Cleome spinosa* Jacq. MM–marcador de peso molecular Ladder 1 Kb.

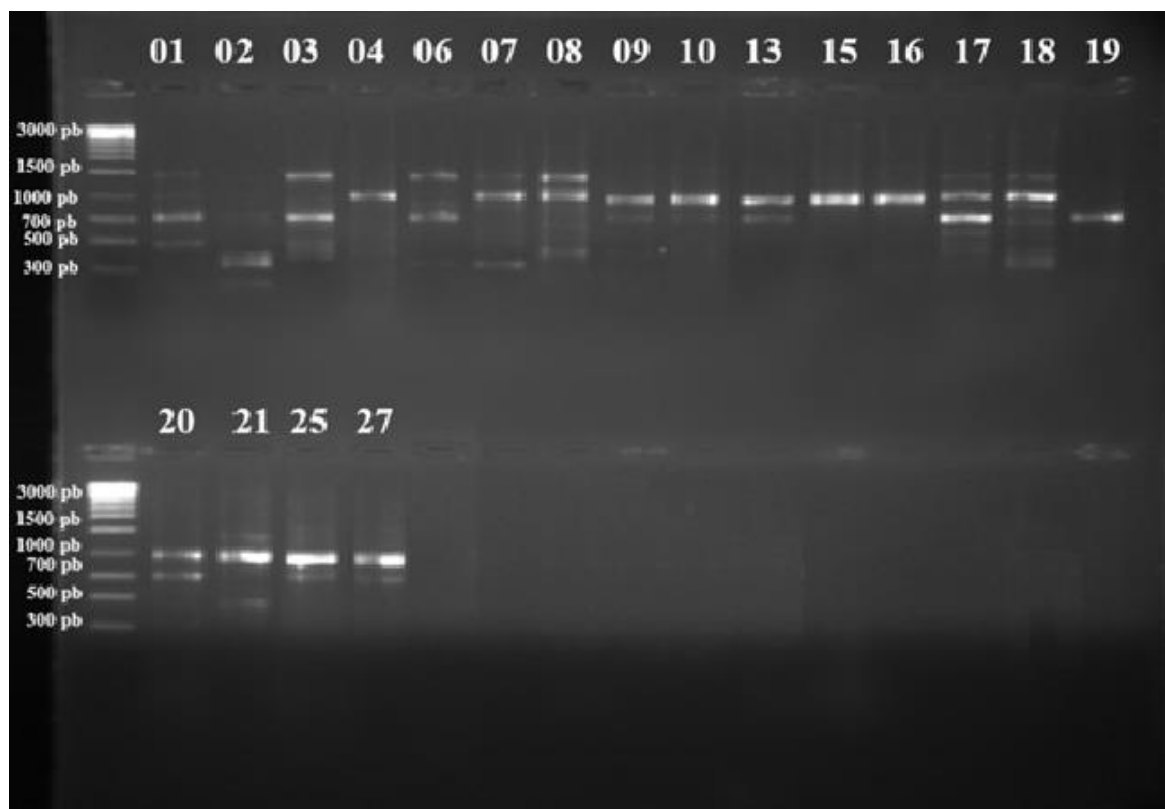


Figura 7. Perfil eletroforético em gel de agarose (0,8%) com marcador RAPD, gerados a partir do primer OPAT-01 em 19 indivíduos da população 1(Alagoinha-PB) de *C. spinosa* Jacq. MM– marcador de peso molecular Ladder 1 Kb.

A análise de agrupamento pelo método hierárquico de Ward com base nas distâncias genéticas, permitiu alocar os 87 indivíduos das três populações de *Cleome spinosa* Jacq. em nove grupos de similaridade genética (Figura 8), sendo o ponto de corte (1,21**) realizado segundo os critérios de Mojema (1977). Os 87 indivíduos não foram alocados em função dos locais de coleta, observa-se que há uma similaridade alta entre as populações de Remígio e Esperança, sendo os três primeiros grupos compostos exclusivamente por indivíduos destas duas populações. Por outro lado, os grupos 7, 8 e 9, são formados exclusivamente pelos indivíduos de Alagoinha (PB). Entre populações os indivíduos mais divergentes são 02 e 75.

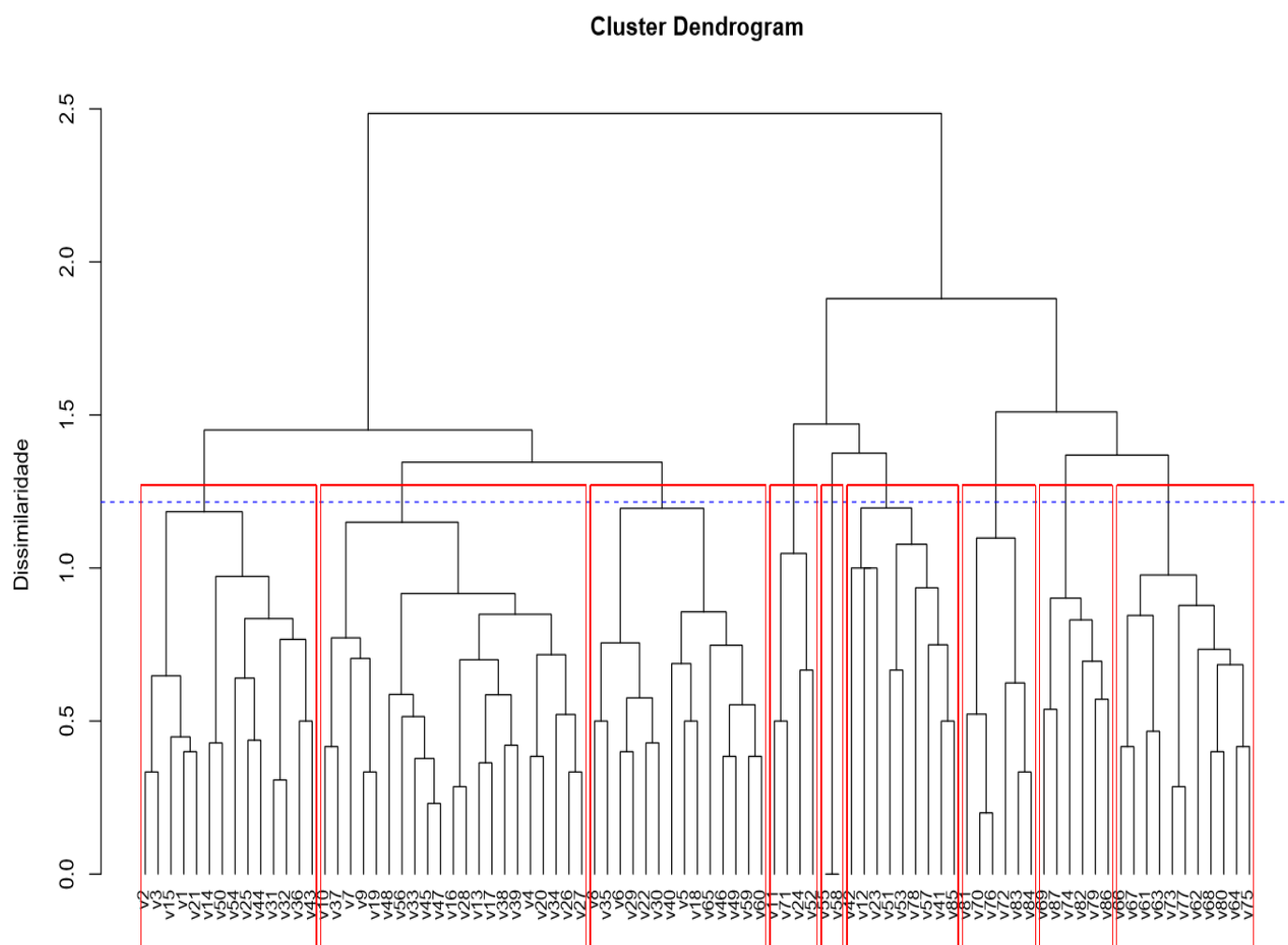


Figura 8. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico de Ward D2, baseado nos padrões de bandas de RAPD, a partir de 3 populações de *Cleome spinosa* Jacq. Ponto de corte (1,21**) realizado segundo os critérios de Mojema (1977). População de Remígio-PB do indivíduo 1 a 30; população de Esperança-PB de 31 a 60 e população de Alagoinha-PB de 61 a 87.

Obteve-se coeficiente de correlação cofenética satisfatório (0,84) e significativo a 5% de probabilidade, confirmando a consistência entre a distância real e a distância gráfica entre os indivíduos das três populações no dendrograma. Além disso, verificou-se que o teste de Mantel (1967), também revelou alta consistência do dendrograma (Figura 9), observa-se a formação de um único pico, utilizando-se da estatística z e a função de densidade, o valor apresentado foi de 5.992,16**.

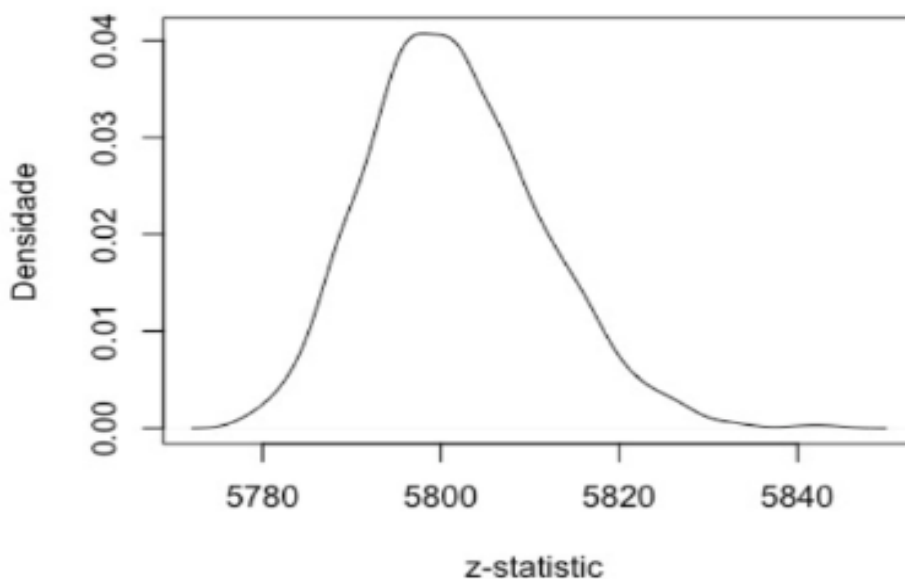


Figura 9. Gráfico de análise da consistência dos agrupamentos entre populações de *C. spinosa* Jacq. baseado na estatística z em função da densidade, a partir do teste de Mantel (5992,16**).

A análise de diversidade dentro das populações, revelou por meio do agrupamento pelo método hierárquico de Ward.D2 com base nas distâncias genéticas, que na população de Remígio-PB os 30 indivíduos foram alocados em cinco grupos de similaridade genética (Figura 9a), sendo o ponto de corte (1,07**) realizado segundo os critérios de Mojema (1977). O quarto grupo é o maior e agrupa 50% dos indivíduos dessa população.

Os indivíduos da população de Esperança-PB foram alocados em quatro grupos, com ponto de corte de 1,15** (Figura 9b). Observa-se que no primeiro e segundo grupo encontram-se 13,34% dos indivíduos. O terceiro e quarto grupos são os maiores, com 13 (43,33%), indivíduos cada. O primeiro grupo é formado apenas pelos acessos 25 e 28, que são altamente similares, indicando que a distância entre eles é zero, pois os iniciadores não geraram nenhuma banda de amplificação.

Os 27 indivíduos da população de Alagoinha-PB foram distribuídos em cinco grupos com base no ponto de corte (1,16**). O primeiro e quarto grupo alocaram 14,81% indivíduos cada, segundo grupo com 22,2%, o terceiro com 18,52%, o quinto grupo concentrou 29,63% dos indivíduos (Figura 9c).

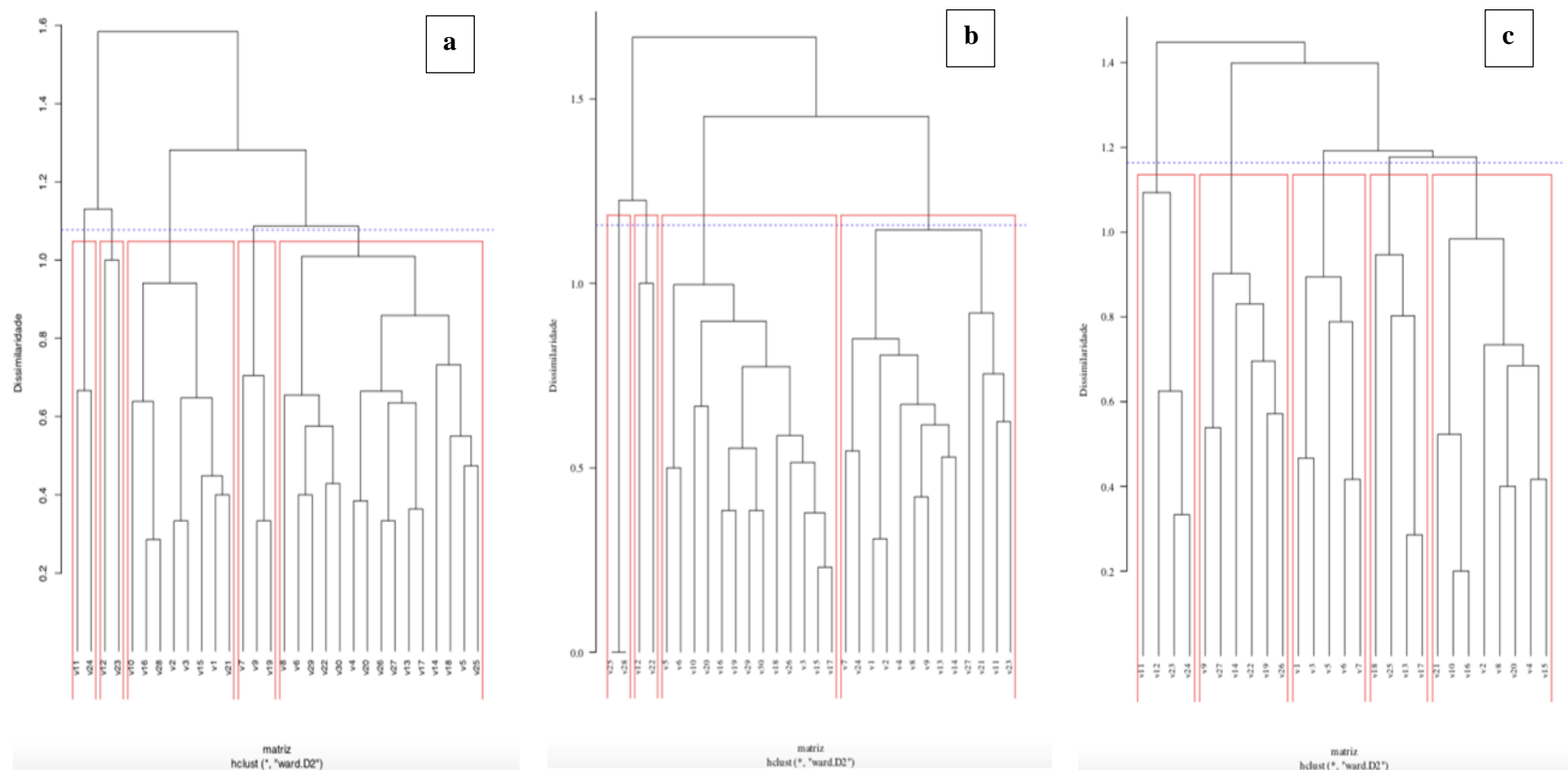


Figura 9. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico de Ward D2, baseado nos padrões de bandas de RAPD, a partir de 3 populações de *Cleome spinosa* Jacq. Ponto de corte conforme Mojema (1977). (a) Remígio-PB (1,07**); (b) Esperança-PB (1,15**); (c) Alagoinha-PB (1,16**)

A partir dos agrupamentos pelo método de Ward.D2 baseado nas distâncias genéticas de cada população foram obtidos os coeficientes de correlação cofenética (CCC), que apresentaram as seguintes estimativas: 0,77**, 0,70** e 0,78**, para as populações de Remígio (PB), Esperança (PB) e Alagoinha (PB), respectivamente.

O teste de Mantel foi aplicado nas três populações para confirmar a consistência dos agrupamentos dentro de cada população estudada de *C. spinosa* Jacq. A população de Remígio (392,42**) embora tenha mostrado dois picos, sua base é estreita e consistente quanto a formação dos grupos (Figura 10a). As populações de Esperança e Alagoinha (Figuras 10b e 10c) apresentam alta consistência nos agrupamentos dentro de cada população, para estas, só ocorreu um pico de elevação. Os valores apresentados no teste de Mantel foram 449,99** e 357,56**, respectivamente.

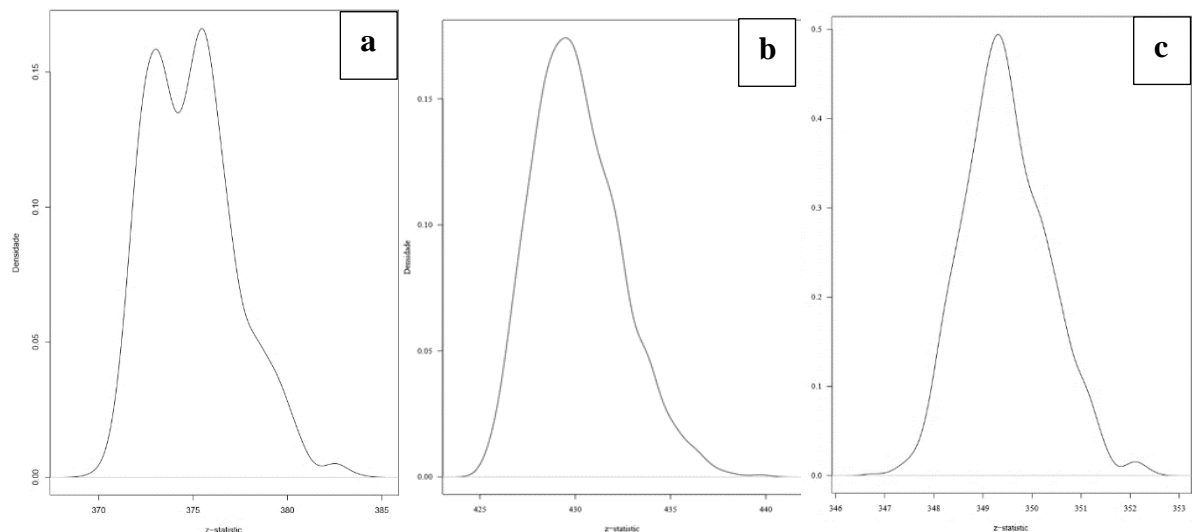


Figura 10. Análise da consistência dos agrupamentos dentro das populações de *C. spinosa* Jacq. com base no teste de Mantel. (a) Remígio (392,42**); (b) Esperança (449,99**); (c) Alagoinha (357,56**).

4 DISCUSSÃO

A análise de componentes principais tem como objetivo resumir o padrão de correlação entre as variáveis analisadas, gerando o agrupamento destas em componentes principais que são combinações lineares das variáveis originais (Cruz et al., 1997). Segundo Rêgo et al. (2003), utilizando-se os escores dos componentes principais para o cálculo da divergência genética, evita-se que variáveis importantes para determinação da diversidade entre indivíduos sejam descartadas.

Para Regazzi (2000), utiliza-se o número de componentes que acumulem 70% ou mais de proporção da variância total. Em estudo similar a este, utilizando acessos de *Cleome gynandra* L. caracterizados com base em onze descritores morfológicos, Wasonga et al. (2015) verificou que o primeiro componente principal foi responsável por explicar 70,92% da variação. No presente estudo todas as cinco variáveis analisadas foram importantes na discriminação dos indivíduos, contudo, recomendamos que em coletas e caracterizações futuras de *Cleome spinosa* Jacq. o número de caracteres avaliados seja maior, afim de aumentar a precisão do grupamento destes indivíduos com base na divergência ou similaridade entre os mesmos.

O padrão de distribuição dos indivíduos da população de Remígio-PB com base nos caracteres morfológicos avaliados sugere que alguns dos indivíduos estão geneticamente mais distantes um dos outros. A distribuição das populações Esperança-PB e Alagoinha-PB se assemelha aos resultados obtidos no estudo realizado por Wasonga et al. (2015), com *Cleome gynandra* L., no qual a maioria dos indivíduos caracterizados foram agrupados de acordo com sua origem geográfica.

É importante salientar que todas as populações foram caracterizadas em seu ambiente natural. As características quantitativas mensuradas pelos descritores morfológicos sofrem elevada influência do ambiente o que reduz a precisão das variáveis quantitativas avaliadas (Castellen, 2000; Streck et al., 2018). Segundo Wu et al. (2017), ao avaliar a diversidade genética entre populações de *Cleome gynandra* L. provenientes de diferentes locais da Ásia e África, os fatores ambientais devem ser considerados já que podem influenciar nos resultados dos marcadores morfológicos.

Com isto, recomenda-se utilizar um maior número de descritores morfológicos para comparar populações da mesma espécie caracterizadas em diferente locais, afim de reduzir a influência do ambiente na formação de grupos (Pires, et al., 2014). Munene et al. (2018), ao caracterizar acessos de *Cleome gynandra* L. provenientes de três locais diferentes utilizou 17

marcadores morfológicos, entre quantitativos e qualitativos, para avaliar a diversidade existente, aumentando a precisão dos grupos de similaridade genética.

Devido a influência do ambiente sobre as características morfológicas avaliadas, o uso do marcador molecular RAPD serve para complementar as informações deste estudo sobre a variabilidade genética entre e dentro das populações de Mussambê. Este marcador é bastante eficiente para determinar variabilidade genética entre indivíduos, analisando diretamente o material genético. Pode ser utilizado para análise em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, e os dados obtidos são isentos da influência ambiental (Faleiro, 2007; Kamada et al., 2009; Kumar & Gurusubramanian, 2011).

A porcentagem média de locos polimórficos nas populações estudadas (87%), sugere ampla variabilidade genética entre os indivíduos, sendo está inferior a variabilidade relatada por Nkhabindze (2012), que verificou polimorfismo de 100%, ao utilizar a técnica de RAPD (primer OPC-15) em amostras de *Cleome gynandra* L. De acordo com Almeida Neto et al. (2019), populações que apresentem alto grau de polimorfismo podem ser indicadoras de áreas geográficas para conservação da diversidade das espécies. Munene et al. (2018) ao utilizar marcadores moleculares RAPD e ISSR em estudo, recomenda o uso dos primers OPA-4 e RAPD-17 do marcador RAPD para identificar polimorfismo em espécies dos gêneros *Cleome*.

Os valores encontrados nos coeficientes de correlação cofenética, indicam que o método de agrupamento utilizado é adequado (Rohlf, 1970). Quanto maior o valor do coeficiente de correlação cofenética menor é o grau de distorção, e melhor o agrupamento (Manly, 2008). A dispersão gráfica observada nos dendrogramas permitiu que os indivíduos fossem alocados em grupos, este método pode ser indicado para selecionar genótipos divergentes para utilização em futuros cruzamentos artificiais da espécie (Neitzke et al., 2010). Contudo, os marcadores RAPD são dominantes, não sendo possível distinguir heterozigotos de homozigotos (Miklas, 2006).

Com base nos dados obtidos com os marcadores moleculares é possível observar que a variabilidade entre populações (houve formação de nove grupos) é maior que dentro das populações (cinco grupos). Este padrão de distribuição está de acordo com o esperado para espécies autógamas (Murawski & Hamrick, 1991).

Esses resultados corroboram com os obtidos a partir de populações de *Cleome gynandra*, no qual a variabilidade dentro das populações estudadas foi menor do que entre populações (K'opondo, 2011; Masuka et al. 2012; Kiebre et al. 2015). Em *Cleome gynandra*,

Omondi (2017), atribui a diversidade entre populações ao fato de que não há muitos agricultores selecionando plantas desta espécie, isto permite que ocorra a manutenção da variabilidade.

A *Cleome spinosa* Jacq. é uma erva polígamodioica anual que apresenta na mesma planta flores pistiladas, estaminadas e hermafroditas, está última em maior frequência. Sendo classificada como autógama, mas potencial alógama (Machado, et al., 2006). O nível de similaridade encontrado dentro das populações é explicado pela autopolinização que ocorre, o mesmo é relatado em estudos com *Cleome gynandra* L., que também possui estes mecanismos reprodutivos (Omondi, 1990; Chweya e Mnzava 1997). De acordo com Bruinsma (1985) plantas do gênero *Cleome* são altamente polimórficas.

As informações disponíveis sobre espécies da família Cleomaceae são limitadas (Masuka et al. 2012). Dentre as espécies do gênero *Cleome*, a *Cleome gynandra* L. é a mais estudada, e apresenta grande semelhança com Mussambê, sendo muitas vezes confundidas. Contudo, na literatura existe um número limitado de estudos sobre a variabilidade genética de *Cleome spinosa* Jacq., fator este que limita o uso adequado da espécie e a conservação deste recurso genético.

No entanto, informações sobre a diversidade genética de uma espécie são fundamentais para elaboração de estratégias e ações de uso, manejo e conservação (Smithson, 2006; Vieira et al., 2012). A diversidade genética é fundamental também para os programas de melhoramento das espécies (Pádua, 2018). A existência de variabilidade genética entre e dentro de populações influencia na escolha de possíveis genitores para programas de melhoramento vegetal.

5 CONCLUSÕES

Ao analisar os dados entre as populações os indivíduos 11 e 75 são os mais divergentes. Dentro da população de Remígio a maior divergência é entre a planta 11 e 25, na população de Esperança entre 53 e 55 e na população de Alagoinha entre 71 e 75. Em programa de melhoramento genético de *Cleome spinosa* jacq., estes indivíduos podem ser indicados como possíveis genitores.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Sinopse das plantas conhecidas como medicinais e venenosas no Nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn**, v.17, p.114-140, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100021>
- ALBARELLO, N.; SIMÕES-GURGEL, C.; CASTRO, T.C.; et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of field-growth plants and tissue culture of *Cleome spinosa* (Jacq.) in mice. **J. Med. Plants. Res.** v.7, p.1043-1049, 2013. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.153>
- ALMEIDA NETO, J.X.; RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; SILVA, A.P.G. Diversidade genética entre e dentro de populações de feijão amarelo (*Capparis flexuosa* L.) avaliadas usando marcadores RAPD. **Rev. Caatinga**, v.32, p.81-91, 2019. <https://dx.doi.org/10.1590/1983>
- AMARAL JÚNIOR, A.T.; VIANA, A.P.; GONÇALVES, L.S.A.; BARBOSA, C.D. Procedimentos Multivariados em Recursos genéticos vegetais. In: Pereira TNS (ed.). **Germoplasma: Conservação, Manejo e Uso no Melhoramento de Plantas**. Viçosa, p. 205-254, 2010.
- ANDRADE, F.D.; RIBEIRO, A.R.C.; MEDEIROS, M.C.; et al. Ação anti-helmíntica do extrato hidroalcoólico da raiz de *Tarenaya spinosa* (Jacq) Raf. para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos. **Pesq. Veterinária Bras.** v.34, p. 942-946, 2014 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014001000003>
- APARADH, V.T.; MAHAMUNI, R.J.; KARADGE, B.A. Taxonomy and physiological studies in spider flower (*Cleome* species): a critical review. **Plant Sciences Feed**, v.3, p. 25-46, 2012. ISSN: 2231 -1.97
- BRUINSMA, J. *Cleome*. In: Halevy AH (ed) **Handbook of Flowering**, 1ª edn. CRC Press, Boca Raton, Florida, p.295-298, 1985.
- CASTELLEN, M.S. Uso de marcadores RAPD e isoenzimáticos na quantificação da diversidade genética em populações naturais de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Dissertação, Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2000.
- CHWEYA, J.A.; MNZAVA, N.A. Cat's whiskers. *Cleome gynandra* L., promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, **Gatersleben and International Plant Genetic Resources Institute**, Rome, 1997.

COSTA, A.M.; SPEHAR, C.R. Base genética da diversidade. In: Costa AM, Spehar CR, Sereno JRB (ed.) **Conservação de recursos genéticos no Brasil**. Embrapa Brasília, pp 28-59, 2012.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético, Viçosa, 1997.

FALEIRO, F.G. Marcadores genético-moleculares aplicados à conservação e uso de recursos genéticos, Embrapa Cerrados, 2007.

FALEIRO, F.G. Princípios científicos e análises genéticas utilizando marcadores moleculares. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.E.M.; REIS JUNIOR, F.B. (ed) **Biotechnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**, p. 31-52, 2011.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética. Embrapa Cenargem, Brasília, 1995.

HUANG, X.; YE, R.; ZHUO, S.; et al. Preliminary study on the effects of a slow release fertilizer tablets special for ornamentals on plants. **Guangdong Agricultural Sci**, v.7, p1-7, 2010.

KAMADA, T. et al. Genetic diversity in natural populations of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimated by RAPD markers. **Acta Scie. Agronomy**, v.31, p. 403-409, 2009.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. Factoextra: Extract and visualize the results of multivariate data analyses, 2016.

K'OPONDO, F.B. Morphological characterization of selected spider plant (*Cleome gynandra* L.) types from western Kenya. **Ann Biol Res**, v.2, p. 54–64, 2011.

KUMAR, N.S.; GURUSUBRAMANIAN, G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. **Science Vision**, v.11, p.116-124, 2011.

KIEBRE, Z.; KANDO, P.B.; SAWADOGO, N. et al. Selection of phenotypic interests for the cultivation of the plant *Cleome gynandra* L. in the vegetable gardens in Burkina Faso. **J Exp Biol Agric Sci**, v.3, p.288–297, 2015.

LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, v.25, p. 1-18, 2008.

MACHADO, I.C.; LOPES, A.V.; LEITE, A.V.; NEVES, C.B. *Cleome spinosa* (Capparaceae): polygamodioecy and pollination by bats in urban and Caatinga areas, northeastern Brazil. *Bot. Jahrb. Syst.* v. 127, p. 69–82, 2006.

MANLY, B.J.F. **Métodos estatísticos multivariados: uma introdução**. Porto Alegre, 2008.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220, 1967.

MIKLAS, P.N. Potential marker-assisted selection for resistance to white mold in pinto and great northern bean. **Agricultural Research Service**, v.1, p. 1-5, 2006.

MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v. 67, p.167-174, 1991.

MASUKA, A.; GOSS, M.; MAZARURA, P. Morphological characterization of four selected spider plant (*Cleome gynandra* L.) morphs from Zimbabwe and Kenya. **Asian Journal of Agriculture and Rural Development**, v.2, p. 646–657, 2012.

MCNEIL, M.J.; PORTER, R.B.; WILLIAMS, L.A.; RAINFORD, L. Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Cleome spinosa*. **Nat. Prod. Comum**, v.5, p.1301-1306, 2010.

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, v. 20, p. 359-363, 1977. <http://dx.doi.org/10.1093/comjnl/20.4.359>

MORALES, E.A.V.; VOLAIS, A.C.C. Recursos genéticos autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v.1, p. 11-42, 2000.

MOREIRA, H.J.D.C.; BRAGANÇA, H.B.N. Manual de identificação de plantas infestantes, Campinas- SP, 2011.

MOUSTAFA, A.R.A.; MANSOUR, S.R.; ALOTAIBI, M.O. *Cleome droserifolia*: An Egyptian Natural Heritage Facing Extinction. **Asian J. of Plant Sci and Research**, v.9, p. 14-21, 2019.

MUNENE, A.K.; NZUVE, F.; AMBUKO, J.; et al. Heritability Analysis and Phenotypic Characterization of Spider Plant (*Cleome gynandra* L.) for Yield. **Advances in Agriculture**, v. 1, p.1-11, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8568424>

NEITZKE, R.S.; BARBIERI, R.L.; RODRIGUES, W.F.; et al. Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. **Hortic. Brasileira**, v. 28, p.47-53, 2010.

NKHABINDZE, B.Z. Adaptive significance of pollination mechanism in Cat's whiskers (*Gynandropsis pentaphylla* L. Syn. *Cleome gynandra*). Dissertação, University of Agricultural Sciences, Raichur, 2012.

OLIVEIRA, M.S.P.; SILVA, K.J.D. Diferenciação genética entre procedências de açaizeiro por marcadores RAPD e SSR. **Rev. Bras. de Fruticultura**, v.30, p.438-443, 2008.

OMONDI, C.O. Variation and yield prediction analyses of some morphological traits in six kenyan landraces population of spiderflower (*Cleome gynandra*) **Indian J. Agric. Sci.** v. 62, p. 160-162, 1990.

OMONDI, E.O.; DEBENER, T.; LINDE, M.; et al. Mating biology, nuclear DNA content and genetic diversity in spider plant (*Cleome gynandra*) germplasm from various African countries, **Plant Breeding**, v.1, p. 1–12, 2017. doi: 10.1111/pbr.12485

ONYANGO, C.M.; KUNYANGA, C.N.; ONTITA, E.G.; et al. Current status on production and utilisation of spider plant (*Cleome gynandra* L.) an underutilized leafy vegetable in Kenya. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.60, p. 2183-2189, 2013.

PADUA, J.G. Recursos genéticos aplicados ao melhoramento genético de plantas. In: AMABILE, R.F.; VILELA, M.S.; PEIXOTO, J.R. (ed.). **Melhoramento de plantas: variabilidade genética, ferramentas e mercado**. Brasília, p. 23-32, 2018;

PEREIRA, D.A.; BRITO, A.C.; AMARAL, A.L.F. Biologia floral e mecanismos reprodutivos do Mussambê (*Cleome spinosa* Jacq) com vistas ao melhoramento genético. **Biotemas**, v. 20, p. 27-34, 2007. ISSN 0103 – 1643

R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienn, 2016.

REGAZZI, A.J. **Análise multivariada- notas de aula INF 766**, Viçosa, 2000.

- RÊGO, E.R.; RÊGO, M.M.; CRUZ, C.D.; et al. Genetic diversity analysis of peppers: a comparison of discarding variable methods. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.3, p.19-26, 2003.
- ROHLF, F.J. Adaptative hierarquical clustering schemes. **Systematic Zoology**, v.19, p. 58-82, 1970.
- SILVA, A.P.S. Atividade antinociceptiva, antipirética, antiinflamatória, antimicrobiana e antioxidante de extratos e substâncias isoladas de *Cleome Spinosa* Jacq. Tese, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- SILVA, L.F.L.; SOUZA, D.G.; RESENDE, L.V.; et al. Manejo de recursos genéticos vegetais. **Anais da Acad. Pernambucana de ciênc. Agro.** v.15, p.109-126, 2018.
- SMITHSON, A. Pollinator limitation and inbreeding depression in orchid species with and without nectar rewards. **New phytologist**, v.169, p. 419-430, 2006.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11,p. 30-40, 1962.
- SOARES NETO, R.L.; SILVA, M.B.C. *Cleome*. Publicado em Flora do Brasil, 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB601411>. Acessado em 15 de fevereiro de 2020
- STRECK, E.A.; FACCHINELLO, P.H.K.; AGUIAR, G.A.; et al. Distância genética entre cultivares de arroz irrigado em experimentos conduzidos a campo e em casa de vegetação. **Journal of Agroveterinaru Sciences**. v. 17, p. 1-11, 2018. doi: 10.5965/223811711732018505
- TSAI, Y.T.; CHEN, P.Y.; TO, K.Y. Plant regeneration and stable transformation in the floricultural plant *Cleome spinosa*, a C3 plant closely related to the C4 plant *C. gynandra*. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 1189-1198, 2012. doi: 10.1007 / s00299-012-1240-1
- VIEIRA, F.A.; FAJARDO, C.G.; CARVALHO, D.; et al. Fine-scale genetic dynamics of a dominant neotropical tree in the threatened Brazilian Atlantic Rainforest. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8. p. 1191-1201, 2012.
- WASONGA, D.O.; AMBUKO, J.L.; CHEMINING'WA, G.N.; et al. Morphological characterization and selection of spider plant (*Cleome gynandra*) accessions from Kenya and South Africa. **Asian Journal of Agricultural Sciences**, v.7, p.36–44, 2015.

WICKHAM, H. ggplot2: Gráficos elegantes para análise de dados. Springer-Verlag. Nova Iorque, 2016.

WIKIPÉDIA (2017) Lista de Municípios da Paraíba. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Lista_de_munic%C3%ADpios_da_Para%C3%ADba>.

Acessado em 15 de janeiro de 2019

WILKS, D.S. **Statistical Methods in the Atmospheric Sciences**, 2011. ISBN 9780123850232

WU, T.; SOLBERG, S.O.; YNDGAARD, F.; CHOU Y-Y. Morphological patterns in a world collection of *Cleome gynandra*. **Genet Resour Crop Evol**, v. 65, p. 271-283, 2017. Doi: 10.1007/s10722-017-0529-x

CAPITULO II

Diversidade genética entre e dentro de populações naturais de *Lantana camara* L.

Diversidade genética entre e dentro de populações naturais de *Lantana camara* L.

Resumo: A *Lantana camara* L., conhecida popularmente como Cambará, pertence a à família Verbenaceae, e é tradicionalmente utilizada na medicina popular e na ornamentação de jardins, contudo, existem poucas informações sobre a diversidade genética presente nas populações deste recurso genético vegetal. Com isto, este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética entre e dentro de populações naturais de *Lantana camara* L., através de marcadores morfológicos e moleculares, para obtenção de dados que auxiliem na domesticação e uso da espécie para fins medicinais e ornamentais. Com auxílio de marcadores morfológicos e do marcador molecular RAPD, realizou-se a caracterização de duas populações de Cambará na cidade paraibana de Areia. A população 1 foi coletada ao longo da PB-079 no sentido Areia-Remígio, a segunda população na PB-087, no sentido Areia-Pilões. Os valores obtidos através dos caracteres morfológicos foram submetidos à análise de componentes principais, e os dados moleculares a análise de agrupamento de cluster. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R. Observou-se que os caracteres morfológicos e o marcador molecular RAPD foram eficientes para detectar diversidade genética entre os indivíduos. A variabilidade entre populações foi menor que dentro das populações. Entre as populações os indivíduos 18 e 48 são os mais divergentes. Dentro da população 1 os mais divergentes são 14 e 19, e na população 2 o 41 e 48. Estes indivíduos podem ser indicados como possíveis genitores me programa de melhoramento genético da espécie.

Palavras-chave: Cambará. RAPD. Marcadores morfológicos. Planta Ornamental.

Genetic diversity among and within natural populations of *Lantana camara* L.

Abstract: *Lantana camara* L., popularly known as Cambará, belongs to the Verbenaceae family, and is traditionally used in folk medicine and in garden ornamentation, however, there is little information on the genetic diversity present in the populations of this plant genetic resource. With this, this study aimed to evaluate the genetic diversity between and within natural populations of *Lantana camara* L., through morphological and molecular markers, to obtain data that assist in the domestication and use of the species for medicinal and ornamental purposes. With the aid of morphological markers and the molecular marker RAPD, two Cambará populations were characterized in the Paraíba city of Areia. Population 1 was collected along PB-079 in the direction Areia-Remígio, the second population in PB-087, in the direction Areia-Pilões. The values obtained through the morphological characters were submitted to the analysis of main components, and the molecular data to the analysis of cluster grouping. All analyzes were performed using the software R. It was observed that the morphological characters and the molecular marker RAPD were efficient to detect genetic diversity among individuals. The variability between populations was less than within populations. Among populations, individuals 18 and 48 are the most divergent. Within population 1 the most divergent are 14 and 19, and in population 2 the 41 and 48. These individuals can be indicated as possible parents in the genetic improvement program of the species.

Key words: Cambará. RAPD. Morphological markers. Ornamental plant.

1 INTRODUÇÃO

A *Lantana camara* L., conhecida popularmente como Cambará, Lantana, Sálvia Selvagem ou cipó-de-cheiro, pertencente à família Verbenaceae e são plantas nativas do centro e norte da América do Sul (Howard, 1969; Swarbrick et al., 1995). Na literatura são caracterizadas como arbustos vigorosos de caules ramificados que podem conter espinhos ou não, e possuem folhas ovaladas e opostas com coloração verde. Os frutos são bagas globosas, com coloração arroxeada e diâmetro de 3 a 4 mm. As inflorescências são compactas, com formato de cúpula contendo de 20 a 40 flores sésseis com cores que variam entre branco, amarelo, laranja e vermelho (Sastri, 1962; Oliveira, 2007; Sandres, 2012; Flora do Brasil, 2018).

Assim como outras espécies da família Verbenaceae, o cambará é um importante recurso genético vegetal devido suas diversas aplicações na medicina popular (Ayub et al., 2017; Bairagi et al., 2017; Jagtap et al., 2018; Ved et al., 2018; Bora & Singh, 2019; Shamsee et al., 2019) e no seu potencial uso como ornamental (Lorenzi & Souza, 2008; Passos et al., 2009; Andrade Júnior et al., 2019).

Diante das possibilidades de uso, surge a necessidade de se obter informações sobre condições de manejo adequado, nível de ocorrência da espécie em condições naturais, índice de aproveitamento agrícola e industrial e identificação da máxima variabilidade genética presente na espécie (Morales & Valois, 2000; Silva et al., 2018).

Segundo Rao & Hodgkin (2002), o entendimento sobre a variabilidade genética e sua distribuição na natureza é essencial para implementação de estratégias eficientes de uso e conservação dos recursos genéticos vegetais. Essa variabilidade genética pode ser estimada através da utilização de diversos marcadores, como os bioquímicos, morfológicos, moleculares, fisiológicos e citológicos (Amaral Júnior et al., 2010).

Neste estudo, o objetivou-se avaliar a diversidade genética entre e dentro de populações naturais de *Lantana camara* L., através de marcadores morfológicos e moleculares, para obtenção de dados que auxiliem na domesticação e uso da espécie para fins medicinais e ornamentais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo, realizou-se caracterização morfológica e molecular de duas populações de *Lantana camara* L. (Figura 1) no município Paraibano de Areia. A população 1 foi coletada ao longo da PB-079 no sentido Areia- Remígio, a segunda população na PB-087, no sentido Areia- Pilões (Figura 2). As plantas foram coletadas respeitando a distância mínima de 20 metros entre um indivíduo e outro.



Figura 1. Planta de *Lantana camara* L. usada em ornamentação em Areia–PB.

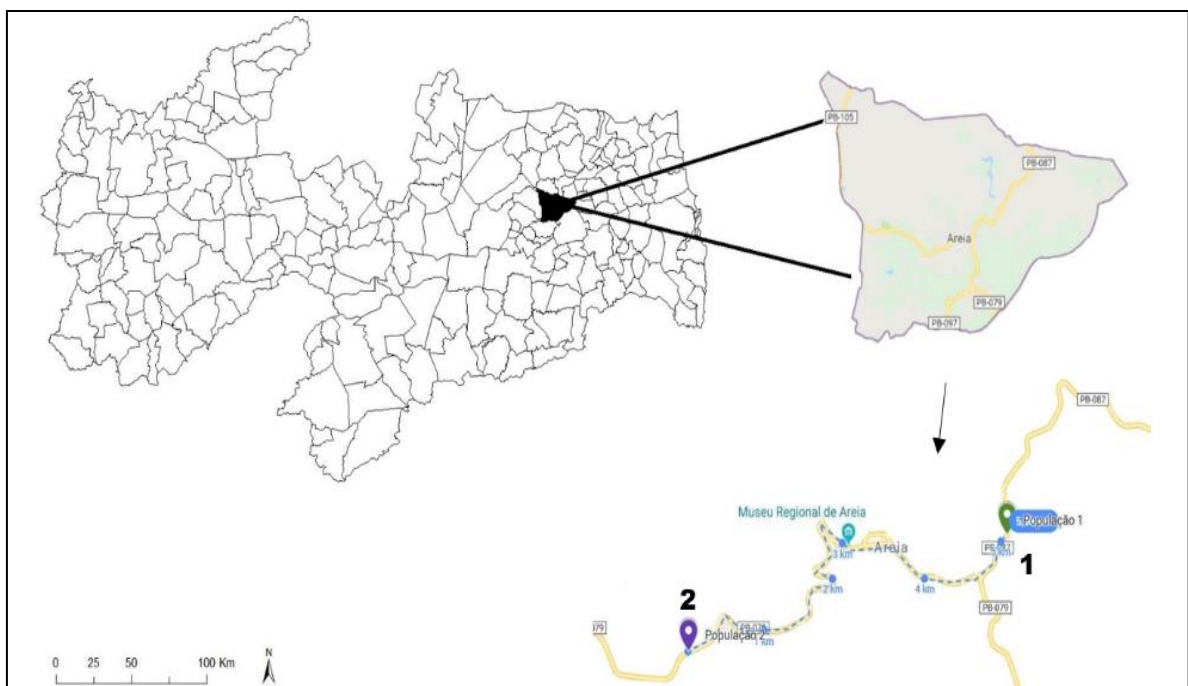


Figura 2. Populações de *Lantana camara* L. amostradas neste estudo, localizadas em município de Areia, Paraíba, Brasil. Mapa adaptado da Wikipédia (2017).

Caracterização morfológica

Com auxílio de régua e paquímetro digital (Paquímetro digital Leetools®), os caracteres avaliados foram: altura da planta (AP), diâmetro do caule (DC), diâmetro da copa (DDC), comprimento da folha (CF), largura da folha (LF) e diâmetro da flor (CFI).

Caracterização molecular

Para caracterização molecular, folhas jovens de todos os indivíduos selecionados foram coletadas e acondicionadas em envelopes de papel alumínio identificados, o material foi mantido em caixas térmicas com gelo. Encaminhou-se o material coletado para o Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (LBMV/CCA/UFPB), mantendo o material vegetal conservado em freezer até o início das análises.

Para o procedimento de extração do DNA, utilizou-se aproximadamente 200mg do material vegetal coletado. Para extração utilizou-se o protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1995), com modificações. A qualidade e quantidade do DNA foi verificada usando eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado em solução de brometo de etídio (0.2mg/L), e fotografado sob luz UV, em um fotodocumentador tipo Gel logic 112.

As reações de amplificação do DNA foram feitas utilizando-se um volume final de 25µl, sendo 23 µl de Master Mix (Tampão 1x + MgCl₂ 3 mM + dNTP 200 mM + primer 1 mM + Taq DNA polimerase 1 U) e 2 µl de DNA genômico (50 ng) da amostra. Na obtenção das marcas de RAPD foram utilizados 15 iniciadores (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) decâmeros, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos 15 iniciadores utilizados nas reações de RAPD com suas respectivas sequências de bases.

Iniciador	Sequência 5'- 3'
OPAT-01	CAGTGGTTCC
OPAT-02	CAGGTCTAGG
OPAT-03	GACTGGGAGG
OPAT-04	TTGCCTCGCC
OPAT-06	CCGTCCCTGA
OPAT-07	ACTGCGACCA
OPAT-08	TCCTCGTGGG
OPAT-09	CCGTTAGCGT
OPAT-10	ACCTCCGGTC
OPAT-11	CCAGATCTCC
OPAT-12	CTGCCTAGCC
OPAT-13	CTGGTGGAAG
OPAT-14	GTGCCGCACT
OPAT-15	TGACGCACGG
OPAT-16	CTCTCCGTAG

As reações de amplificação foram efetuadas em um termociclador (Modelo: TC-PLUS, da Techne©) com a seguinte programação: desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos; 40 ciclos, cada ciclo com a seguinte sequência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 34 °C e 60 segundos a 72 °C; após os 40 ciclos, foi realizada extensão final a 72 °C por sete minutos. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (0.2mg/L). Ao final da corrida, os géis foram fotografados sob luz UV, em fotodocumentador tipo Gel logic 112.

Análise de dados

Para os caracteres morfológicos os valores obtidos foram submetidos a análise dos componentes principais (PCA). A análise de dados foi realizada com o auxílio de dois pacotes estatísticos, Factoextra (Kassambara, 2016) e FactoMineR (Lê et al., 2008). E os gráficos gerados por meio do pacote ggplot2 (Wickham, 2016). Todas as análises foram realizadas utilizando o *software R Studio* versão 3.2.0 (R Core Development Team, 2016).

A análise de cluster foi realizada com base na leitura das bandas no gel, foi construída uma matriz binária, onde (0) indicava ausência e (1) a presença de bandas. A partir destes dados estimou-se as distâncias genéticas entre pares de indivíduos, gerando uma matriz de dissimilaridade, por meio da distância binária de Sokal (1963). Com base na matriz de distâncias genética realizou-se análise de agrupamento de Ward D2 (Wilks, 2011), resultando no dendrograma. Para o ponto de corte adotou-se o critério proposto por Mojema (1977). A matriz de distâncias genéticas também foi usada para calcular o coeficiente de correlação cofenética (r) e a consistência dos agrupamentos submetidas ao teste de Mantel (1967) ($\alpha \leq 0,05$). Utilizou-se o pacote ggplot2 (Wickham, 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de componentes principais atua resumindo o padrão de correlação entre as variáveis morfológicas analisadas, resultando em um agrupamento destas em componentes principais que são combinações lineares das variáveis originais (Cruz et al., 1997; Cruz et al, 2004). O número de componentes principais utilizados é influenciado pela proporção de variância total acumulada por cada componente, sendo recomendado que esta variância acumulada seja de no mínimo 70% (Regazzi, 2000). Observa-se que os componentes principais 1, 2 e 3 explicam 74,11% da variação, sendo está uma porcentagem aceitável (Tabela 2).

Tabela 2. Componentes principais, autovalores, porcentagem da variância retida em cada componente e porcentagem da variância acumulada pelos componentes principais.

Componentes Principais (CP)	Autovalor	% de variância	% de variância acumulada
CP 1	2,05	34,15	34,15
CP 2	1,39	23,22	57,37
CP 3	1,00	16,74	74,11
CP 4	0,73	12,19	83,08
CP 5	0,54	8,97	92,05
CP 6	0,28	4,73	100,00

Para evitar que descritores importantes para determinação da diversidade entre os indivíduos sejam descartados, utiliza-se os escores dos componentes principais para o cálculo da divergência genética (Rêgo et al., 2003). Observou-se neste estudo que para o componente principal 1, as maiores contribuições foram das variáveis altura da planta (33,52%) e comprimento da folha (33,17%). No componente principal 2, apresentam maiores contribuições as variáveis largura da folha (38,22%) e diâmetro da flor (35,84%), enquanto para o componente principal 3 a diâmetro da copa apresentou 89,75% de contribuição. A variável diâmetro da flor apresentou maior contribuição no componente principal 4 (58,52%), contudo, este CP não foi levado em consideração neste estudo.

Neste trabalho todas as variáveis foram importantes na discriminação dos indivíduos, contudo, em estudo sobre a capacidade de descritores morfológicos discriminar com precisão indivíduos de diferentes variedades de *Lantana*, Maschinski et al. (2010) ao utilizarem 18 marcadores morfológicos concluíram que estes não são eficientes na separação de grupos de acordo com as variedades, segundo os autores, isto se deve pela alta ocorrência de híbridos entre as variedades de *Lantana*.

O padrão de distribuição dos indivíduos das duas populações nos dois primeiros componentes principais pode ser observado na figura 3, onde há uma sobreposição das populações analisadas com base nos dados morfológicos, os indivíduos de ambas as populações estão distribuídos próximo ao eixo central do mapa de fatores. Está sobreposição no mapa indica que baseado nas seis variáveis quantitativas estudadas, esses indivíduos apresentam alta similaridade, com exceção dos indivíduos 5, 7, 8, 9 e 46 são os que se distanciam dos demais.

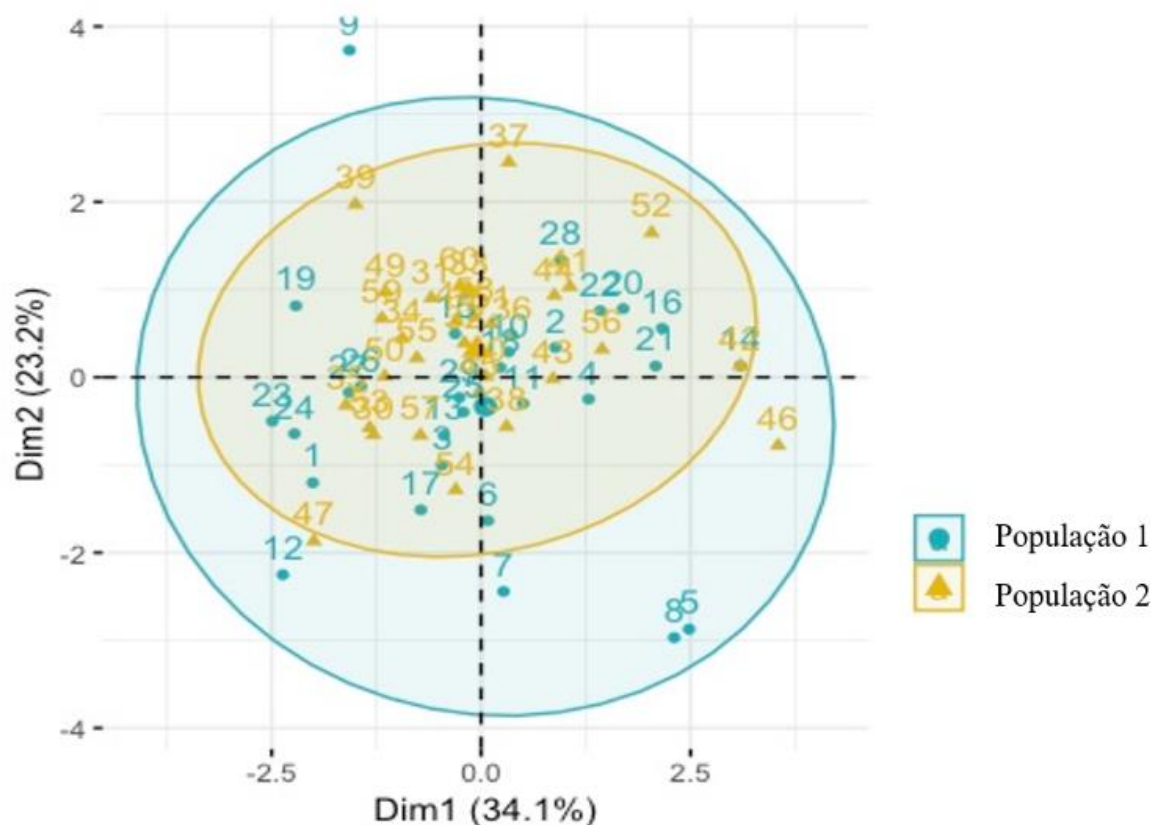


Figura 3. Dispersão gráfica com base nos escores dos caracteres morfológicos, representado pelos componentes principais 1 e 2 de das duas populações de *L. camara L.* coletadas em Areia-PB. População 1 do indivíduo 1 a 30 e população 2 do 31 a 60.

A análise de componentes principais também foi realizada dentro de cada população, onde observou-se que os componentes principais 1, 2 e 3 explicam 79,32% e 73,40% da variação retida nas populações 1 e 2, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Componentes principais, autovalores e porcentagem da variância acumulada (V.A) pelos componentes principais dentro das populações.

Componente Principal (CP)	População 1		População 2	
	Autovalor	% de V.A.	Autovalor	% de V.A.
CP1	2,22	37,07	2,05	34,15
CP2	1,53	62,63	1,30	55,89
CP3	1,00	79,32	1,05	73,40
CP4	0,67	90,46	0,77	86,30
CP5	0,43	97,73	0,52	94,97
CP6	0,13	100,00	0,30	100,00

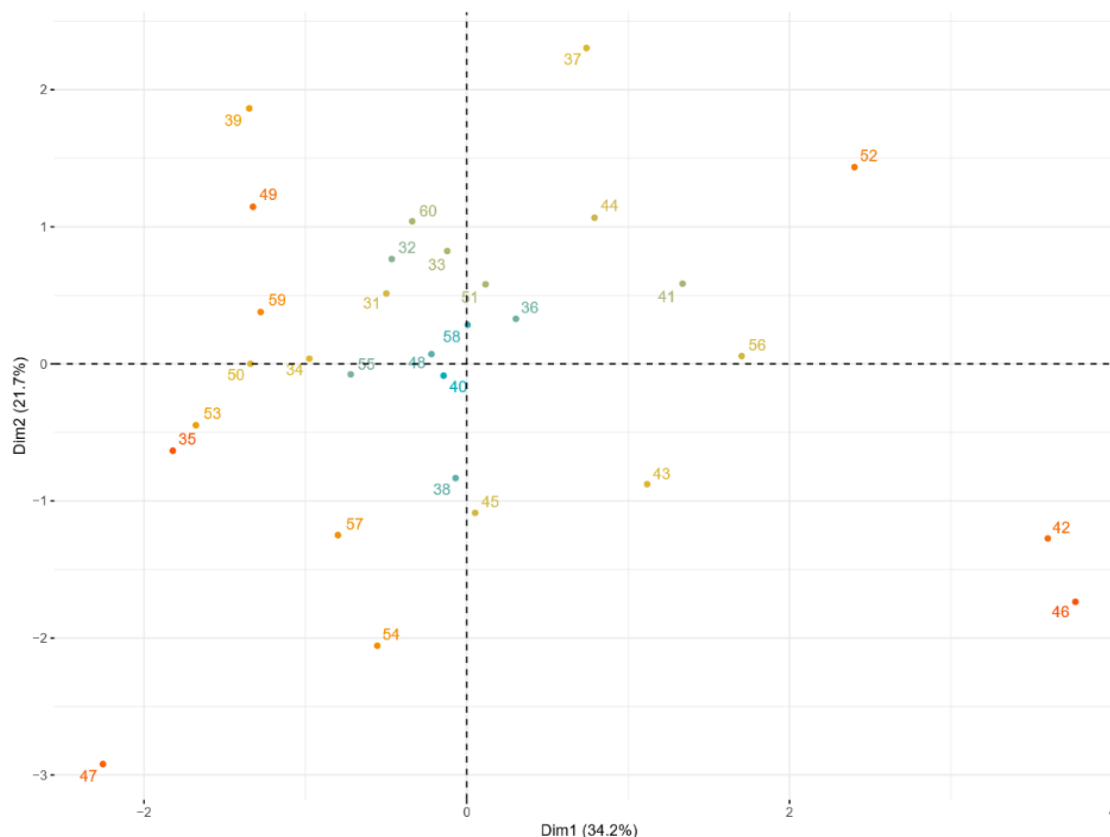


Figura 5. Distribuição dos indivíduos dentro da população 2 de *Lantana camara* L. coletados em Areia-PB, ao longo da PB-087 (no sentido Areia- Pilões), agrupados com base nos componentes principais a partir dos dados morfológicos.

O camará é uma espécie encontrada em todos os estados brasileiros, e em diversas condições ambientais (Vet et al., 2018). É importante salientar que todos os indivíduos de ambas as populações foram caracterizados ao longo das rodovias estaduais (PB-079 e PB-0,87) onde fatores como antropização, solo, clima e idade das plantas devem ser levados em consideração por exercerem influência nos resultados. Segundo Streck et al., (2018), características quantitativas mensuradas por marcadores morfológicos estão sujeitas a elevada influência do ambiente, o que pode ocasionar uma redução na precisão dos resultados. Pereira et al. (2019), analisou o teor dos óleos essenciais de 105 plantas de *L. camara* L. coletadas em diversos locais do estado de Sergipe, no estudo houve diferença significativa entre os indivíduos de diferentes locais. Essas diferenças podem ocorrer devido à variedade genética entre as populações e/ou por fatores ambientais diversos (Silva et al., 2018).

Com o objetivo de aumentar a precisão da detecção de variabilidade genética entre e dentro das populações naturais de Cambará, outras técnicas podem ser usadas para complementar os resultados, como o uso de marcadores moleculares RAPD. Os marcadores moleculares são eficientes por acessar diretamente o material genético e são isentos da influência do ambiente (Kumar & Gurusubramanian, 2011; Silva et al., 2015).

Na análise de RAPD, foram geradas um total de 558 bandas amplificadas a partir de 14 dos 15 iniciadores utilizados, onde 61 locos foram polimórficos e 7 monomórficos. Para população 1, os iniciadores OPAT-09, OPAT-11, OPAT-12 e OPAT-13 não originaram nenhuma amplificação, sendo os iniciadores OPAT-10, OPAT-14, OPAT-15 e OPAT-16 os mais eficientes, produzindo maiores quantidade de bandas nítidas e intensas. O iniciador OPAT-10 amplificou 66,7% (20 indivíduos), sendo eficiente ao detectar fragmentos polimórficos (Figura 6).

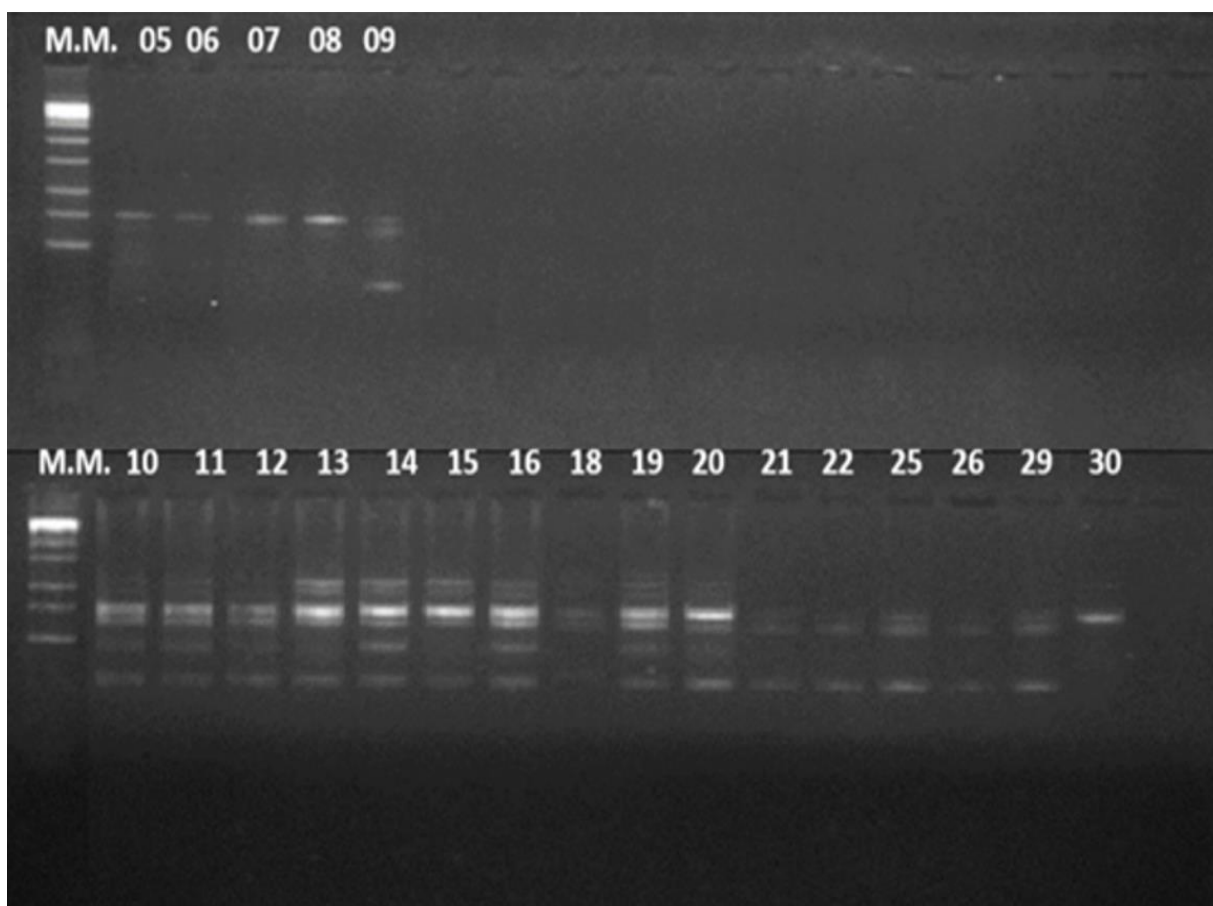


Figura 6. Perfil eletroforético em gel de agarose (0,8%) com marcador RAPD, gerados a partir do primer OPAT-10 em 20 indivíduos da população 1 de *L. camara* L.

Na população 2 (Figura 7), os iniciadores OPAT-01, OPAT-07 e OPAT-14 foram eficientes à medida que produziram maiores quantidades de bandas nítidas e intensas, enquanto os iniciadores OPAT-02, OPAT-04, OPAT-06, OPAT-09, OPAT-10 e OPAT-15 não originaram nenhuma amplificação. O iniciador OPAT-14 amplificou 83,3% (25 indivíduos).

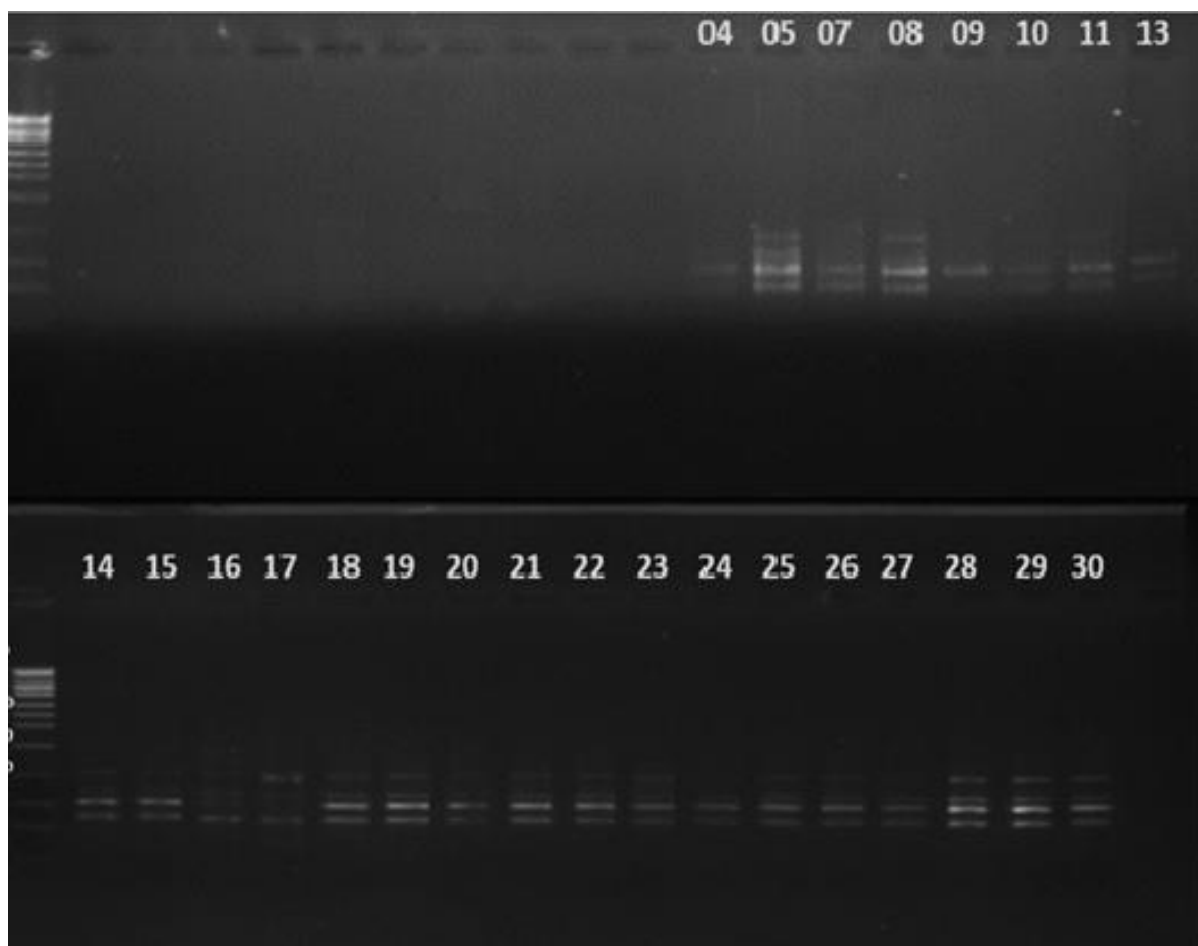


Figura 7. Perfil eletroforético em gel de agarose (0,8%) com marcador RAPD, gerados a partir do primer OPAT-10 em 25 indivíduos da população 2 de *L. camara* L.

A porcentagem de locos polimórficos nas populações 1 e 2 foi 86,05% e 96%, respectivamente (Tabela 4), estes resultados foram superiores ao reportado por Datta (2013), em estudo sobre a variabilidade genética em 6 populações de *L. camara* L. com flores de cores variadas coletadas em Jaipur, na Índia, que obteve média de 37,03% de polimorfismo nas populações, utilizando a técnica RAPD com 8 primers. Segundo Almeida Neto et al. (2019), o alto grau de polimorfismo pode ser utilizado como indicador de áreas geográficas para conservação da diversidade das espécies.

Tabela 4. Iniciadores RAPD, sequências de nucleotídeos, número total de bandas amplificadas, locos polimórficos e monomórficos e de polimorfismo em populações de *Lantana camara* L.

Iniciador	Nº total de bandas amplificadas	Nº de locos polimórficos	Nº de locos monomórficos	Polimorfismo (%)
OPAT-01	54	6	2	75
OPAT-02	6	2	1	67
OPAT-03	37	7	1	75
OPAT-04	29	3	0	100
OPAT-06	23	2	0	100
OPAT-07	67	6	0	100
OPAT-08	23	4	3	57
OPAT-09	0	0	0	0
OPAT-10	52	5	0	100
OPAT-11	4	1	0	100
OPAT-12	14	1	0	100
OPAT-13	7	2	0	100
OPAT-14	121	8	0	100
OPAT-15	48	5	0	100
OPAT-16	73	9	0	100
TOTAL	558	61	7	-

Os 60 indivíduos das duas populações de Cambará foram alocados em três grupos de similaridade genética através da análise de agrupamento pelo método hierárquico de Ward com base nas distâncias genéticas, sendo o ponto de corte (0,58**) realizado segundo os critérios de Mojema (1977).

Observa-se que a maioria dos indivíduos foram alocados nos grupos em função dos locais de coleta. No primeiro grupo de similaridade estão presentes somente indivíduos da população 1. No segundo grupo, estão presentes indivíduos das duas populações, contudo, a alta similaridade apresentada neste grupo entre as plantas 1, 2, 3, 4, 23, 24, 31, 32 e 36 ocorre em função dos primers utilizados nas análises não ter gerado nenhuma banda de amplificação nestes indivíduos, segundo Silva (2013), isso pode ser indicativo do não anelamento do primer à fita- molde de DNA. O terceiro grupo alocou 29 indivíduos, sendo que destes somente 2 pertencem a população 1. Entre as populações os indivíduos 18 e 48 são os mais divergentes geneticamente (Figura 8).

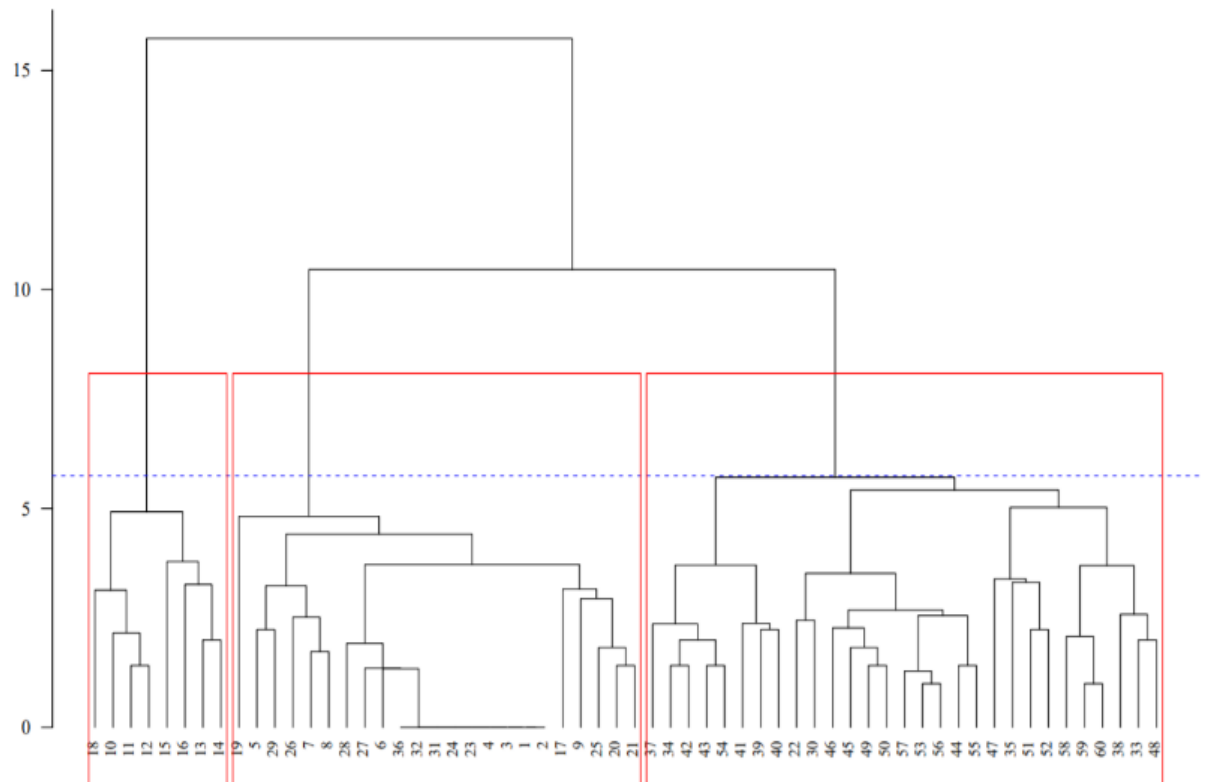


Figura 8. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico de Ward D2, baseado nos padrões de bandas de RAPD, a partir de 2 populações de *L. camara* L., com ponto de corte (1,21**) realizado segundo os critérios de Mojema (1977). População 1 do indivíduo 1 ao 30, população 2 do 31 ao 60.

A análise conjunta apresentou coeficiente de correlação cofenética de 0,87, indicando que o método de agrupamento utilizado é adequado (Rohlf, 1970). Além disso, verificou-se que o teste de Mantel (1967), também revelou alta consistência do dendrograma (Figura 9), observa-se a formação de um único pico, utilizando-se da estatística z e a função de densidade, o valor apresentado foi de 669,5914**.

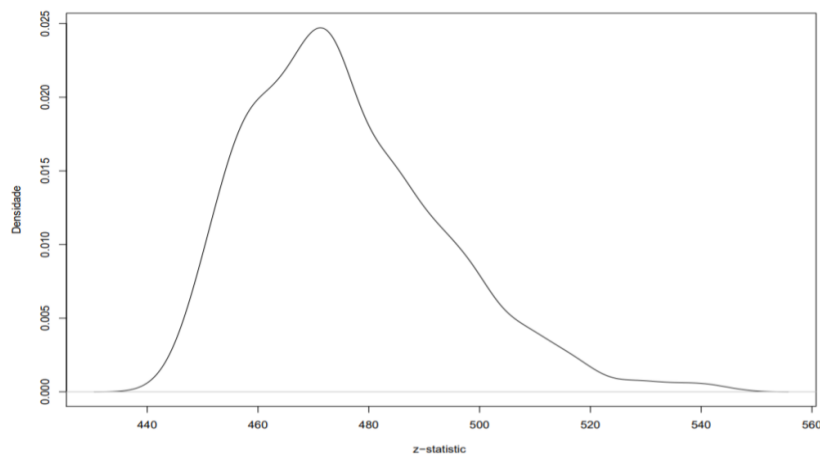


Figura 9. Gráfico de análise da consistência dos agrupamentos entre populações de *L. camara* L. baseado na estatística z em função da densidade, a partir do teste de Mantel (669,5914**).

Ao analisar a diversidade genética dentro das populações por meio do agrupamento pelo método hierárquico de Ward.D2 com base nas distâncias genéticas, observou-se que, os indivíduos da população 1 foram alocados em dois grupos (Figura 10), com o ponto de corte (0,64**) realizado segundo os critérios de Mojema (1977). Para a população 2, os indivíduos foram alocados em cinco grupos de similaridade, com ponto de corte de 0,30** (Figura 11).

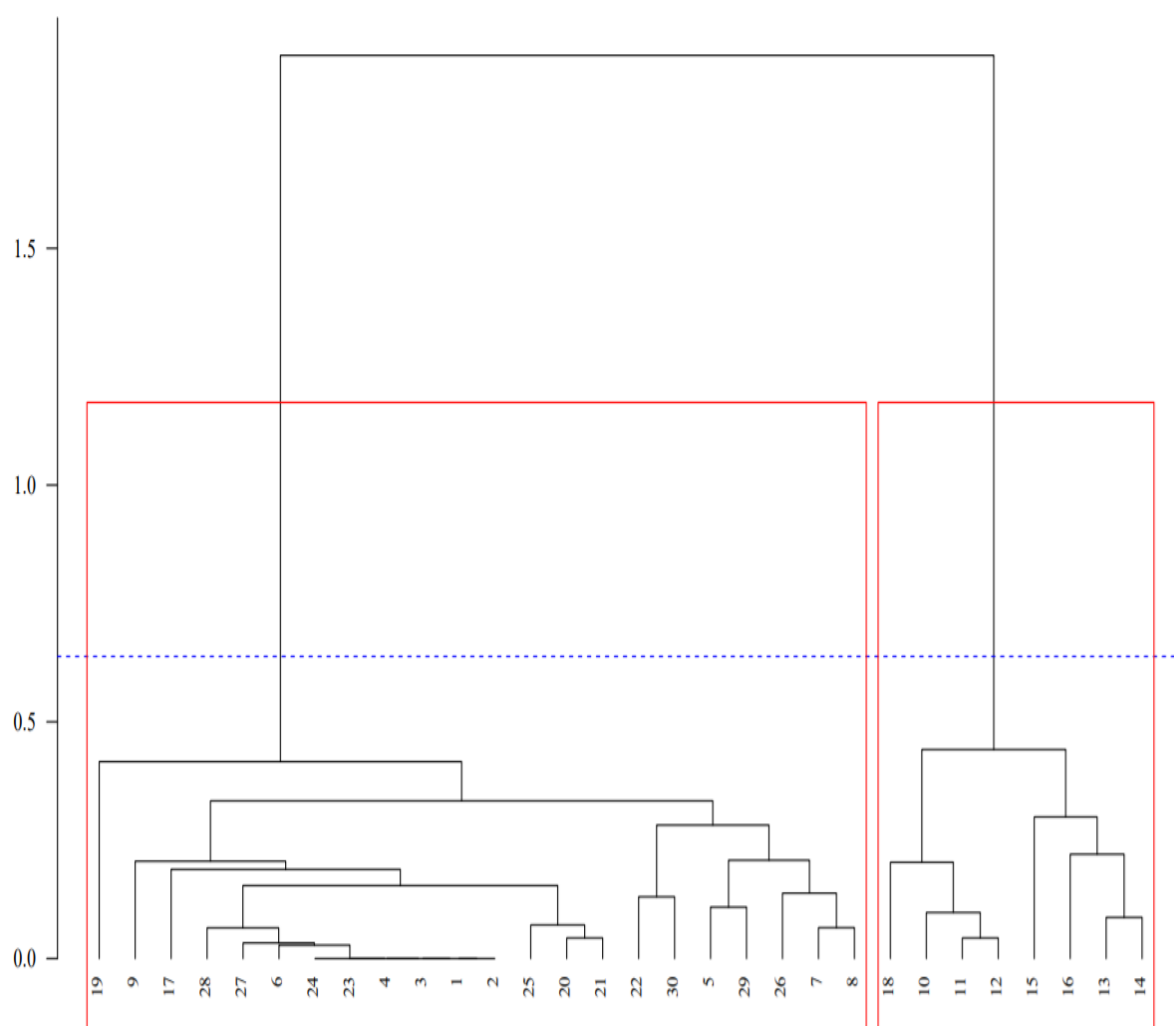


Figura 10. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico de Ward D2, baseado nos padrões de bandas de RAPD, a partir da população 1 de *L. camara* L., com ponto de corte (0,64**) realizado segundo os critérios de Mojema (1977).

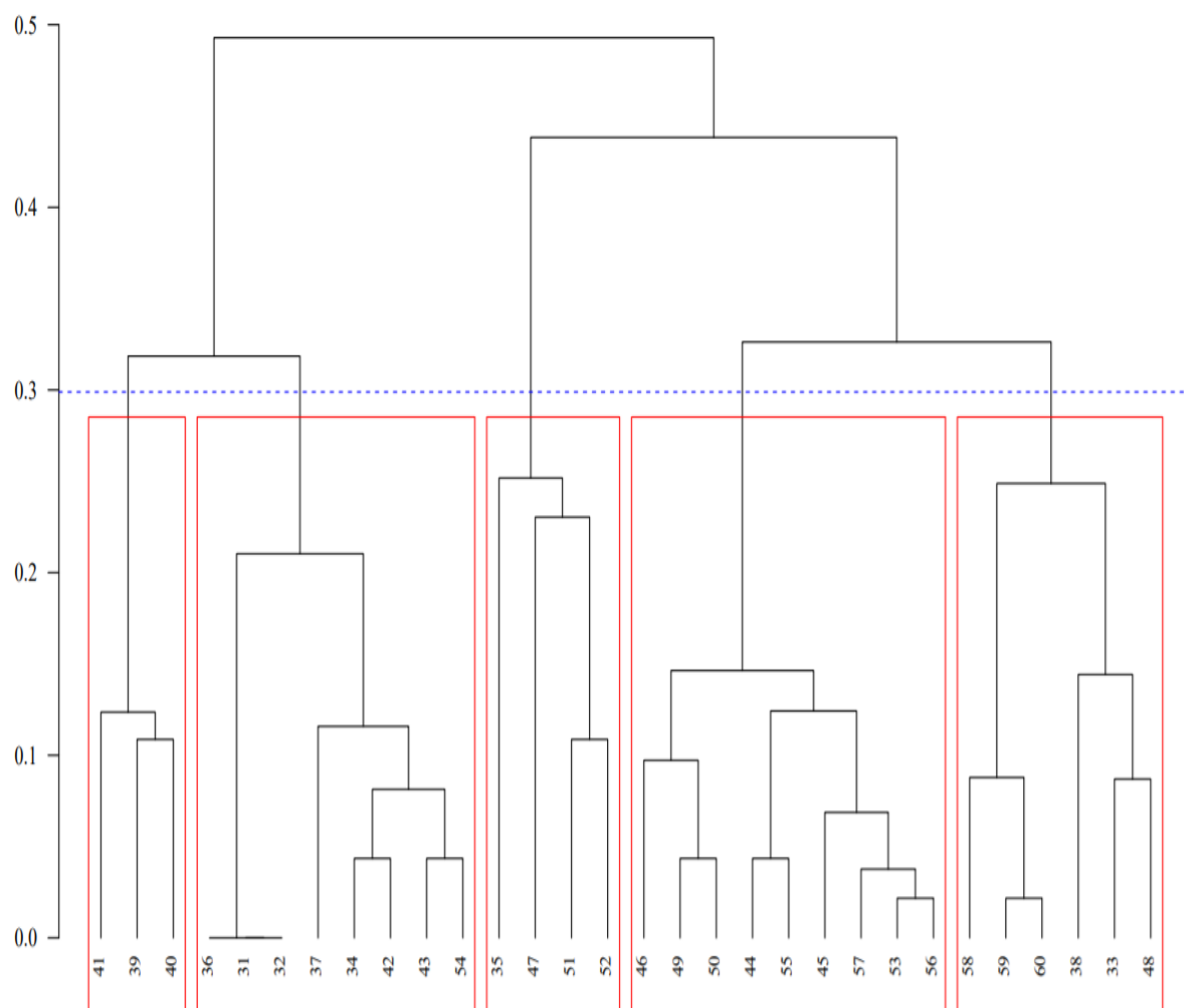


Figura 11. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico de Ward D2, baseado nos padrões de bandas de RAPD, a partir da população 2 de *L. camara* L., com ponto de corte (0,64**) realizado segundo os critérios de Mojema (1977).

Os coeficientes de correlação cofenética obtidos com base nas distâncias genéticas dentro das populações 1 e 2, foram 0,94 e 0,92, respectivamente. O teste de Mantel (1967) foi realizado para confirmar a consistência dos agrupamentos dos indivíduos no dendrograma. As populações 1 (Figura 12) e 2 (Figura 13), apresentaram alta consistência, é possível observar que em ambas só há um pico de elevação, utilizando-se da estatística z em função da densidade os valores apresentados foram 207,7123** e 31,24403**, respectivamente.

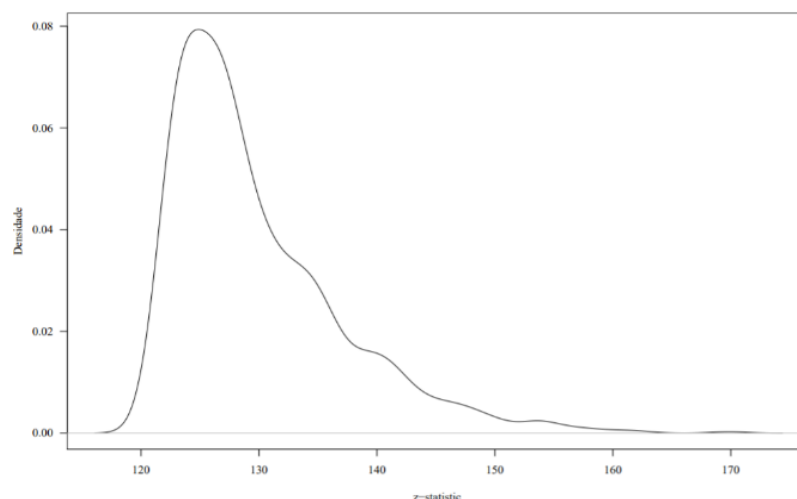


Figura 12. Gráfico de análise da consistência dos agrupamentos dentro da população 1 de *L. camara* L. baseado na estatística z em função da densidade, a partir do teste de Mantel (207,7123**).

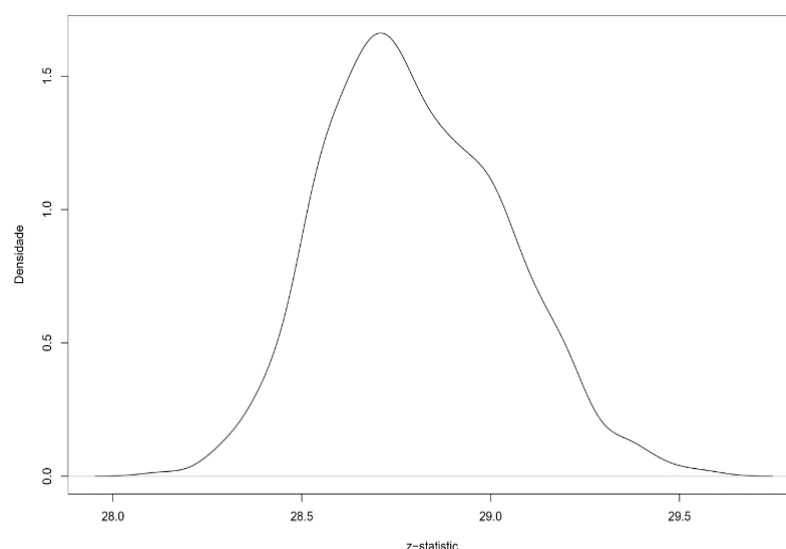


Figura 13. Gráfico de análise da consistência dos agrupamentos dentro da população 2 de *L. camara* L. baseado na estatística z em função da densidade, a partir do teste de Mantel (31,24403**).

Baseado nos dados obtidos com os marcadores moleculares é possível observar que a variabilidade entre populações (houve formação de três grupos) é menor que dentro das populações (cinco grupos), esses resultados corroboram com os observados através dos marcadores morfológicos.

As plantas de *L. camara* L. apresentam flores perfeitas, e são capazes de se autopolinizar (Mathur & Ram, 1986; Tendani & Steven, 2004). Uma das características predominante na maioria das plantas invasoras é a capacidade de se reproduzir sem a necessidade de visitas de agentes polinizadores, o que viabiliza a propagação mesmo em ambientes de polinização incertos (Baker, 1974).

Contudo, a alta variabilidade encontrada dentro da população 2 pode ser explicada pela visita de agente polinizadores, pois a espécie além de apresentar este mecanismo reprodutivo também apresenta flores com características que são bastante atrativas aos polinizadores, como flores coloridas, tubos da corola estreitos e produção de néctar (Carrión-Tacuri et al., 2014). A maioria dos agentes polinizadores registrados em *L. camara* L. são da ordem Lepidóptera (Proctor et al., 1996; Muthoka e Mananze 2005). Entretanto há outras espécies associadas como polinizadores regulares do Cambará como os das ordens Himenópteros e Trochilídeos (Carrión-Tacuri et al., 2012)

Entender os mecanismos reprodutivos e detectar a diversidade presente nas espécies é importante para elaboração de estratégias e ações de uso, manejo e conservação (Smithson, 2006; Vieira et al., 2012). Além disso, a diversidade genética é fundamental para o desenvolvimento de programas de melhoramento da espécie, influenciando na escolha de possíveis genitores (Pádua, 2018). Neste estudo, os indivíduos mais dissimilares geneticamente são 18 e 48.

4 CONCLUSÕES

A diversidade genética foi maior dentro das populações de *Lantana camara* L. e menor entre populações.

Os indivíduos 18 e 48 são os mais divergentes entre as duas populações analisadas e podem ser indicados como possíveis genitores em programa de melhoramento genético da espécie.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA NETO, J.X.; RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; SILVA, A.P.G. Diversidade genética entre e dentro de populações de feijão amarelo (*Capparis flexuosa* L.) avaliadas usando marcadores RAPD. **Revista Caatinga**, v. 32, n.01, p.81-91, 2019. [dx.doi.org/10.1590/1983](https://doi.org/10.1590/1983)
- AMARAL JÚNIOR, A.T.; VIANA, A.P., GONÇALVES, L.S.A., BARBOSA, C.D. Procedimentos Multivariados em Recursos genéticos vegetais. In: PEREIRA, T.N.S. (ed.). **Germoplasma: Conservação, Manejo e Uso no Melhoramento de Plantas**. Viçosa, 205- 254, 2010.
- ANDRADE JUNIOR, M.R.; RÊGO, M.M.; PESSOA, A.M.S.; SILVA, B.R.S.; SILVA, P.D.; RÊGO, E.R. Influência de substratos sobre propagação de cambará por meio de estacas. **Agropecuária Técnica**, v. 40, n. 1-2, p. 25–30, 2019. doi.org/10.25066/agrotec.v40i1-2.42916
- AYUB, A.; TAUSEEF, S.; ZEAHRA, S.Q. Antimicrobial activity of *Lantana camara* Linn. **Fuuast Journal of Biology**, v. 7, n.1, p. 1-10, 2017.
- BAIRAGI, S.M.; PATHAN, I.B.; NEMA, N. Analgesic and anti-inflammatory activity of crude leaf and bark extract of *Lantana Camara*. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 1, p. 810–817, 2017. doi: 10.12991/mpj.2017.7.
- BAKER, H.G. The evolution of weeds. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.7, n.1, p.1–24, 1974.
- BORA, K.S.; SINGH, B. Pharmacognostic evaluation and physico-chemical analysis of *Lantana camara* (Linn.) flowers. **Pharm Biomed Res**, v. 5, n.1, p. 1-5, 2019.
- CARRIÓN-TACURI, J.; BERJANO, R.; GUERRERO, G.; FIGUEROA, M. E.; TYE, A.; CASTILLO, J. M. Nectar production by invasive *Lantana camara* and endemic *L. peduncularis* in the Galápagos Islands. **Pacific Science**, v.66, n.1, p.435–445, 2012.
- CARRIÓN-TACURI, J.; BERJANO, R.; GUERRERO, G.; FIGUEROA, E.; TYE, A.; CASTILLO, J.M. Fruit set and the diurnal pollinators of the invasive *Lantana camara* and the endemic *Lantana peduncularis* in the Galapagos Islands. **Weed Biology and Management**, v.14, n.3, p. 209-219, 2014.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético, Viçosa, 1997.

DATTA, S; MEENA, SR; VARMA, P; SAXENA, M.K. Variety specific DNA markers for identification among population of six colored varieties of *Lantana camara* L. **International Journal of Recent Scientific Research**. v.4, n.11, p.1710-1713, 2013

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA Cenargen, v. 3, 1998.

FLORA do Brasil 2020: algas fungos e plantas. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15164>. Acesso em: 20 de dezembro de 2019

HOWARD, R. A. A check list of cultivar names used in the genus *Lantana*. **Arnoldia**, v. 29, p. 73–109, 1969.

JAGTAP, S.; KATARIYA, T.; PHARATE, M.; NAJAN, A. A review on medicinal properties of *Lantana camara* Linn. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.7, p. 288–294, 2018. doi: 10.20959/ wjpps20189-12195.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. Factoextra: Extract and visualize the results of multivariate data analyses, 2016.

KUMAR, N.S.; GURUSUBRAMANIAN, G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. **Science Vision**, v. 11, p.116-124, 2011.

LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, v.25, p.1-18, 2008.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 4. ed. Nova Odessa, Sp: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2008.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, p.209-220, 1967.

MASCHINSKI, J., SIRKIN, E., & FANT, J. Using genetic and morphological analysis to distinguish endangered taxa from their hybrids with the cultivated exotic pest plant *Lantana strigocamara* (syn: *Lantana camara*). **Conservation Genetics**, v.11, n.5, p. 1607–1621, 2010. doi:10.1007/s10592-009-0035-6

MATHUR, G.; RAM, HYM. Floral biology and pollination of *Lantana camara*. **Phytomorphology**, v. 36, n. 1, p. 79-100, 1986.

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, v.20, p.359-363, 1977. <http://dx.doi.org/10.1093/comjnl/20.4.359>

MORALES, E.A.V.; VOLAIS ACC. Recursos genéticos autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, 1:11-42, 2000.

MUTHOKA C.N. AND MANANZE S. 2005. Aspects of the pollination biology of *Lantana camara* (Verbenaceae). Disponível em: <http://easternarc.or.tz/downloads/TBA-East-Usambara/reports-2005/TBA%20Aspects%20of%20pollination%20biology%20of%20Lantana%20camara%20in%20Amani%20NR.pdf>, acessado em 20 de janeiro de 2020.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 466-476, 2007.

PADUA, J.G. Recursos genéticos aplicados ao melhoramento genético de plantas. In: AMABILE RF, VILELA MS, PEIXOTO JR (ed.). **Melhoramento de plantas: variabilidade genética, ferramentas e mercado**. Brasília, pp 23-32, 2018.

PASSOS, J. L.; MEIRA, R. M. S. A.; BARBOSA, L. C. A. Foliar anatomy of the species *Lantana camara* and *L. radula* (Verbenaceae). *Planta Daninha*, v. 27, n. 4, p. 689–700, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582009000400007>

PEREIRA, K. L. G.; NOGUEIRA, P. C. D. L.; Arrigoni-Blank, M. D. F.; Nizio, D. A. D. C.; Silva, D. C.; Pinto, J. A. O.; Blank, A. F. Chemical diversity of essential oils of *Lantana camara* L. native populations. **Journal of Essential Oil Research**, p.1–16, 2019.. doi:10.1080/10412905.2019.1661879

PROCTOR, M., YEO, P. E LACK, A. A **História Natural da Polinização**. Harper Collins, Londres, 1996.

RAO, R. V.; HODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 1–19, 2002.

R Core Team (2016) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

RAMBUDA, TD.;JOHNSON, S. Breeding systems of invasive alien plants in South Africa: does Baker's rule apply?. **Diversity and distributions**. v. 10, n. 5, p; 409-416. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2004.00100.x>

REGAZZI, AJ. Análise multivariada- notas de aula INF 766, Viçosa, 2000.

RÊGO, E.R.; RÊGO, M.M.; CRUZ, C.D.; et al. Genetic diversity analysis of peppers: a comparison of discarding variable methods. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 3, p.19-26, 2003.

ROHLF, FJ. Adaptative hierarquical clustering schemes. **Systematic Zoology**, v.19, p.:58-82, 1970.

SANDERS, R. W. Taxonomy of *Lantana* (Verbenaceae): II. Taxonomic Revision. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, v. 6, n.2, p. 403-441, 2012.

SASTRI, B.N. **The wealth of India**. CSIR New Delhi, India. v. 4, 1962.

SHAMSEE, Z.R.; AL-SAFFAR, A.Z.; AL-SHANON, A.F.; AL-OBAIDI, J.R. Cytotoxic and cell cycle arrest induction of pentacyclic triterpenoides separated from *Lantana camara* leaves against MCF-7 cell line in vitro. **Molecular Biology Reports**, v. 46, p. 381–390, 2019. doi: 10.1007/s11033-018-4482-3.

SILVA, A.P.G., **Diversidade genética de acessos de Maniçoba (*Manihot* spp.) de ocorrência natural no semiárido do Brasil**. 114f, 2013. Tese (doutorado) – Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia (UFC, UFRPE e UFC).

SILVA, R.G.; PINHATI, F.R.; SILVA, J.T. Análise da variabilidade genética por RAPD de linhagens isoladas de solo e lodo impactados com efluente industrial. *Revista da Biologia*, v.14, n.1, p. 1-5, 2015.

SILVA LFL, SOUZA DG, RESENDE LV, et al. Manejo de recursos genéticos vegetais. **Anais da Academia Pernambucana de ciência Agrônômica**, v.15, p109-126, 2018.

SMITHSON, A. Pollinator limitation and inbreeding depression in orchid species with and without nectar rewards. **New Phytologist**, v.169, p. 419-430, 2006.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, n. 01, p. 30-40, 1962.

- STRECK, E.A.; FACCHINELLO, P.H.K.; AGUIAR, G.A. et al. Distância genética entre cultivares de arroz irrigado em experimentos conduzidos a campo e em casa de vegetação. **Journal of Agroveterinaru Sciences**. V. 17, p. 1-11, 2018. doi: 10.5965/223811711732018505
- SWARBRICK, J.T.; WILLSON, B.W.; HANNAN-JONES, M.A. The biology of Australian weeds *Lantana camara* L. **Plant Prot.** v.10, p. 82-95, 1995.
- VED, A.; ARSI, T.; PRAKASH, O.; GUPTA, A. A review on phytochemistry and pharmacological activity of *Lantana camara* Linn. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, p. 37–43, 2018. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9.
- VIEIRA FA, FAJARDO CG, CARVALHO D, et al. Fine-scale genetic dynamics of a dominant neotropical tree in the threatened Brazilian Atlantic Rainforest. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, p.1191-1201, 2012.
- WICKHAM, H. ggplot2: Gráficos elegantes para análise de dados. Springer-Verlag. Nova Iorque, 2016.
- WILKS, D.S. Statistical Methods in the Atmospheric Sciences, 2011. ISBN 9780123850232