



Lara Isabel Ribeiro Correia da Cunha Velho Prazeres

Licenciada em Biotecnologia dos Produtos Naturais

**Revisão do Género *Lavandula* presente em Portugal
Continental**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientadora: Doutora Filomena Nóbrega, INIAV

Co-orientador: Doutor Jorge Capelo, INIAV

FCT FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Fevereiro 2014

Lara Isabel Ribeiro Correia da Cunha Velho Prazeres
Licenciada em Biotecnologia dos Produtos Naturais

**Revisão do Género *Lavandula* presente em Portugal
Continental**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientadora: Doutora Filomena Nóbrega, INIAV
Co-orientador: Doutor Jorge Capelo, INIAV



Fevereiro 2014

“Copyright” Lara Isabel Ribeiro Correia da Cunha Velho Prazeres, FCT/UNL e UNL
A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

***E disse Deus: Produza a terra erva verde, erva que dê semente,
árvore frutífera que dê fruto segundo a sua espécie,
cujas sementes estão nela sobre a terra; e assim foi.***

Gen 1:11

Agradecimentos

Gostaria em primeiro lugar, agradecer a Deus, por ter colocado este propósito na minha vida e pelas pessoas que ao longo deste trabalho contribuíram para a finalização deste relatório, em especial:

À Doutora Filomena Nóbrega (INIAV), minha Orientadora, pela cedência de espaço, pela dedicação, disponibilidade infinita e incentivos na elaboração deste trabalho. Seria impossível descrever em palavras tudo o que passámos e que me permitiu continuar.

Ao Doutor Jorge Capelo (INIAV), meu Orientador, pela sua disponibilidade e transmissão de conhecimentos.

Ao Prof^a Doutor Ricardo Franco, Coordenador do Mestrado de Bioquímica da Faculdade de Ciências de Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, pela disponibilidade e apoio prestado ao longo deste mestrado.

À Prof^a Doutora, Rita Serrano, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pelo auxílio e apoio científico prestado na realização prática deste trabalho, no âmbito do estudo dos tricomas, bem como pela cedência do Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

À Prof^a Doutora Olga Duarte Silva, Responsável do Laboratório de Farmacognosia, por me ter recebido no seu Laboratório do Departamento de Ciências Farmacológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

À Dr^a Paula Nobre, Assistente Técnica do Departamento de Ciências Farmacológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pelo auxílio prestado na realização do trabalho prático.

À minha amiga Verónica Amparo, pelos momentos de apoio ao longo deste trabalho.

À minha amiga Tânia Ferreira, pela disponibilidade em ajudar-me na resolução de problemas.

Ao meu pai, por me ter proporcionado financeiramente este Mestrado.

À minha amiga Rosário Russo, a Titi Rosário, pela sua amizade, apoio, interminável disponibilidade e ajuda com o Daniel. Sem si teria sido mais complicado.

À Mafalda, por ouvir os meus desabafos.

À minha afillhada, Cátia, filha do coração.

Ao meu filho, Daniel por ser a criança que é.

À minha mãe, pelo apoio incansável, companheirismo e principalmente, pelo ombro amigo para comigo. E ainda por continuar a acreditar em mim e a iluminar o meu caminho.

E por fim, ao meu marido, Henrique Prazeres, que sempre esteve ao meu lado nos momentos difíceis, pela atenção, compreensão nas minhas ausências, pelo apoio prestado ao longo deste projeto. Sei que sem ele não estaria aqui. Nunca conseguirei agradecer convenientemente tudo que fez por mim e que continua a fazer. Obrigada, meu amor!

Resumo

De entre as plantas aromáticas da Flora de Portugal inclui-se a família das Lamiáceas, onde se encontra o género *Lavandula* que inclui cinco espécies: *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. pedunculata* subsp. *lusitanica*, *L. viridis* e *L. multifida*. A taxonomia deste género tem sofrido diversas alterações taxonómicas devido à sua variabilidade morfológica e capacidade de hibridização.

Neste trabalho pretendeu-se ampliar o conhecimento sobre o género *Lavandula* através de uma análise conjunta dos estudos morfométrico, micro morfológico e molecular, contribuindo assim para a revisão deste grupo taxonómico. No estudo morfométrico foram analisados 50 caracteres, quantitativos e qualitativos, em 12 espécies existentes no herbário do INIAV e em 16 plantas das diferentes espécies referidas. Estas últimas foram também utilizadas para a análise da variabilidade genética através de marcadores moleculares ISSR.

A análise dos resultados foi realizada através de métodos de taxonomia numérica utilizando o programa NTSYS.

Com este trabalho foi possível detetar 3 táxones claramente distintos: *Lavandula sampaioana* (Rozeira) Rivas Mart. (Alto Tejo substratos duros), *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco Tejo e Sado substratos arenosos e *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira, Calcários e silicatos em sítios chuvosos.

Palavras-chave: *Lamiáceas*, *Lavandula*, taxonomia, morfometria, micromorfologia, marcadores moleculares ISSR.

Abstract

Among the aromatic plants Flora of Portugal includes the family of *Lamiaceas*, where the genus *Lavandula* includes five species: *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. pedunculata* subsp. *lusitânica* *L. viridis*; and *L. multifida*. The taxonomy of this genus has undergone several taxonomic changes due to their morphological variability and capacity for hybridization.

This work was intended to broaden the knowledge of the genus *Lavandula* through a joint analysis of morphometric study, morphological and micro molecular, thus contributing to the revision of this taxonomic group. On the morphometric study were analyzed 50 characters, quantitative and qualitative, in 12 existing species in the Herbarium of INIAV and in 16 plants of different species listed. The latter were also used for the analysis of genetic variability by ISSR molecular markers.

The analysis of the results was carried out by methods of numerical taxonomy using the NTSYS program.

With this work was possible to detect 3 clearly distinct genera: *Lavandula sampaioana* (Rozeira) Rivas Mart. (Alto Tejo hard substrates), *Lavandula pedunculata* (Mill.) CAV. subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco Tejo and Sado Sandy substrates and *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira, Limestones and silicates in rainy places.

Key-words: *Lamiceas*, *Lavandula*, taxonomy, morphometric, morphological, ISSR molecular characters

Índice Geral

Agradecimentos	iv
Resumo.....	v
Abstract	vi
Índice Geral	vii
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
1. Introdução	1
1.1. Taxonomia	1
1.2. Caracterização morfológica das espécies em estudo	2
1.2.1. <i>L. pedunculata</i> subsp. <i>pedunculata</i>	2
1.2.2. <i>L. pedunculata</i> subsp. <i>lusitanica</i>	3
1.2.3. <i>L. luisieri</i>	4
1.2.4. <i>L. multifida</i>	5
1.2.5. <i>L. viridis</i>	6
1.3. Estruturas secretoras na família das <i>Labiadas</i>	7
2. Marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)	8
3. Objectivos.....	9
4. Material e métodos.....	10
4.1. Material Vegetal	10
4.2. Estudo morfométrico	12
4.3. Estudo molecular.....	12
4.3.1. Extração de DNA genómico	12
4.3.2. Amplificação de DNA por PCR	12
4.4. Análise Estatística	14
4.5. Estudo micro morfológico	14
5. Resultados e discussão	15
5.1. Estudo morfométrico	15
5.2. Estudo molecular.....	18
5.3. Morfologia e distribuição de tricomas nas espécies em estudo.....	19
6. Conclusões.....	22

7. Bibliografía.....	23
8. Anexos	26
8.1. Anexo A.....	26
8.2. Anexo B.....	28
8.3. Anexo C.....	31

Índice de Figuras

Figura 1.1 <i>L. pedunculata</i> subsp. <i>pedunculata</i>	2
Figura 1.2 Localização da <i>L. pedunculata</i> subsp. <i>pedunculata</i> em Portugal Continental	2
Figura 1.3 <i>L. pedunculata</i> subsp. <i>lusitanica</i>	3
Figura 1.4 <i>L. luisieri</i>	4
Figura 1.5 Localização da <i>L. luisieri</i> em Portugal Continental	4
Figura 1.6 <i>L. multifida</i>	5
Figura 1.7 Localização da <i>L. multifida</i> em Portugal Continental	5
Figura 1.8 <i>L. viridis</i>	6
Figura 1.9 Localização <i>L. viridis</i> em Portugal Continental	6
Figura 1.10 Esquema dos três tipos de tricomas capitados, em sucessivas fases de secreção	7
Figura 5.1 Dendrograma das plantas arquivadas em herbário e das plantas colhidas, baseado no método UPGMA e utilizando o coeficiente de DICE	15
Figura 5.2 Dendrograma das plantas colhidas, baseado no método UPGMA e utilizando o coeficiente de DICE	16
Figura 5.3 Dendrograma baseado na amplificação de bandas de 12 plantas do género <i>Lavandula</i> com primers ISSR segundo o método UPGMA e utilizando o coeficiente DICE como medida de semelhança genética	17
Figura 5.4 Tipo de Tricomas observados ao microscópio	18
Figura 5.5 Observação microscópica dos Tricomas presentes nas amostras colhidas de <i>Lavandula</i> spp	20
Figura 5.6 Observação microscópica dos Tricomas presentes nas amostras colhidas de <i>Lavandula</i> spp.	21
Figura 8.1 Amplificação das bandas usando o IRSS1	31
Figura 8.2 Amplificação das bandas usando o IRSS2	31

Índice de Tabelas

Tabela 4. 1 Plantas depositadas em herbário do INIAV	10
Tabela 4. 2 Localização e datas de colheita das amostras do género <i>Lavandula</i>	11
Tabela 4. 3 Sequências nucleotídicas 5'-3' e temperaturas de melting dos <i>primers</i> utilizados na análise ISSR.....	13
Tabela 5.1 Tipo de Tricomas observados ao microscópio	19
Tabela 8.1 Matriz de identificação de caracteres morfométricos quantitativos.....	26
Tabela 8.2 Matriz de identificação de caracteres morfométricos qualitativos.....	27
Tabela 8.3 Matriz binária com presença (1) e ausência (0) referente aos dados qualitativos	28
Tabela 8.4 Matriz com os valores das medições.....	28
Tabela 8.5 Matriz binária com presença (1) e ausência (0) referente ao marcador IRSS1	29
Tabela 8.6 Matriz binária com presença (1) e ausência (0) referente ao marcador IRSS2	30

Lista de Abreviaturas e Siglas

dNTPs – Desoxinucleótidos trifosfatados; dATP, dCTP, dGTP, dTTP

ISSRs – *Inter-Simple Sequence Repeat*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

r – Coeficiente de correlação

Tris-HCl – *Tris Hydrochloride*

UPGMA – Agrupamento segundo a média

UV - Radiação ultravioleta

1. Introdução

O género *Lavandula*, de que fazem parte espécies de importante valor económico, tem sofrido diversas alterações taxonómicas devido à sua variabilidade morfológica e capacidade de hibridização. Este género, pertencente à família das Lamiáceas (Labiadas), comporta, em Portugal, cinco espécies: *L. viridis*, *L. pedunculata* subsp. *lusitanica*, *L. luisieri*, *L. pedunculata* ssp. *pedunculata*, *L. multifida*.

Estas espécies são denominadas popularmente de alfazema e rosmaninho e são descritas por vários autores pelas suas propriedades terapêuticas, aromatizantes e condimentares. Normalmente, são usadas para a obtenção de óleos essenciais.

As plantas do género *Lavandula* são perenes, com folhas simples, opostas a verticiladas, lineares a oblongas. As flores são pequenas, hermafroditas e dispõem-se em espigas terminais, bracteadas. O perianto diferencia-se num cálice ovoide-tubular a subtubular, bilabiado, multinérveo e numa corola bilabiada - lábio inferior com três lóbulos e lábio superior com dois lóbulos - de cor púrpura a azulada. O androceu inclui quatro estames didinâmicos. Os frutos são, normalmente, em forma clusa.

1.1. Taxonomia

As espécies portuguesas de *Lavandula* foram sendo descobertas ao longo de vários séculos. Brotero, na sua *Flora Lusitanica* (1804), assinalava apenas *L. spica* L. (a alfazema cultivada, não espontânea), *L. stoechas* L. e *L. multifida* L.. Mais de um século depois, Pereira Coutinho descrevia na *Flora de Portugal* (2ª edição, 1943) cinco espécies: três idênticas às descritas por Brotero (fazendo notar que a *L. stoechas* L. portuguesa pertencia à variedade *pedunculata* Cav. dessa mesma espécie), e ainda *L. latifolia* Villars e *L. viridis* Ait. A *Nova Flora de Portugal* de Amaral Franco (1984), obra atualmente tida como a referência mais correta para este género do nosso país, refere cinco espécies: constata que afinal a *L. stoechas* que se supunha existir aqui é um par de espécies distintas: *L. pedunculata* e *L. luisieri*; *L. viridis*; *L. latifolia* e *L. multifida*; alude ainda ao cultivo da alfazema (nome atribuído a várias espécies: *L. dentata* L., *L. spica* L., *L. angustifolia* L. e, por vezes, às já referidas espontâneas *L. latifolia* e *L. multifida*)

1.2. Caracterização morfológica das espécies em estudo

1.2.1 *L. pedunculata* subsp. *pedunculata*

Em Portugal, esta espécie (Figura 1.1) encontra-se nas regiões apresentadas na Figura 1.2.



Figura 1.1 *L. pedunculata* subsp. *pedunculata*

Esta espécie tem a forma de subarbusto lenhoso, tomentoso, atingindo até 70 cm. As suas folhas têm uma coloração acinzentada-tomentosa ou verde-acinzentada tomentosa, são inteiras e de margens onduladas. As folhas distais dos ramos férteis medem cerca de 12-55 x 1-5mm, são lineares a oblongo-oblanceoladas, enquanto que as dos ramos estéreis são menores e mais estreitas. A espiga mede 10-35 x 8-17mm apresentando uma forma ovóide ou subcilíndrica, de pedúnculo com cerca de 5-24 cm. As brácteas férteis têm 4-7 x 4-6 mm, são mais ou menos obtriangulares e revelam nervuras pouco proeminentes, longitudinais e paralelas. As brácteas estéreis têm 12-30 mm vão de oblongas a lanceoladas, apresentam-se de violáceas a pálido-lilacíneas ou menos vezes brancas. O cálice mede cerca de 4-7 mm, é 13-nérveo, o dente superior apicalmente provido dum apêndice obreniforme com 1.2-1.5 mm de largura. A corola com 6-8 mm apresenta-se com uma coloração púrpura-anegrada (Franco, 1984).

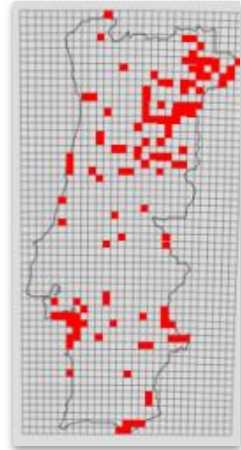


Figura 1.2 Localização da *L. pedunculata* subsp. *pedunculata* em Portugal Continental [in www.flora-on.pt]

1.2.2 *L. pedunculata* subsp. *lusitanica*

Como um caméfito lenhoso ou nanofanerófito até 170 cm com as folhas distais dos ramos férteis com



20-50X1,7-5 mm de cor verdes-acinzentadas. A sua espiga é subcilíndrica com 15-35 X 10-17 mm. Apresenta brácteas férteis proximais com 6-7 X 4-6mm, com forma sub-rectangulares, mais ou menos afastadas entre si, distintamente menores que os respetivos cálices.

Encontra-se apresenta-se nas mesmas regiões que a *L. pedunculata* subsp. *pedunculata*.

Figura 1.3 *L. pedunculata* subsp. *lusitanica*

1.2.3 *L. luisieri*



Figura 1.4 *L. luisieri*

Esta espécie apresenta-se sob a forma de sub-arbusto lenhoso de 20-60 cm, tomentoso e aromático. As folhas são acinzentado-tomentosas, inteiras, as distais dos ramos férteis com oblongas a lanceoladas, planas ou de margens mais ou menos onduladas. As folhas dos ramos estéreis são menores, mais estreitas e de margens bem revolutas com um pedúnculo com cerca de 0-30 (-50) mm. As flores inserem-se em inflorescências do tipo espiga medindo esta cerca de 15-40 (-50) x 8-15 mm de forma cilíndrica e por vezes ovóide, é pedunculada (5-15 mm), de brácteas férteis cordadoreniformes, mais largas que altas, com nervuras proeminentes, bem reticuladas, tomentosas e de brácteas distais estéreis têm 8-30 (-45) mm, oblanceoladas, geralmente purpúreas ou lilacíneas, raramente brancas. O cálice mede cerca de 3-5 mm, é tomentoso mas de dentes viloso-ciliados, o dente superior é apicalmente provido dum apêndice obreniforme com 1-3 mm de largura. A corola com 6-8 mm apresenta uma coloração púrpura-anegrada (Franco,1984).

Para Franco (1984) esta espécie é muito idêntica à *Lavandula stoechas* L., mas esta última distingue-se sobretudo por ter as folhas dos ramos férteis menores (até 30 x 4 mm), pedúnculos com 0-15 (-20) mm, espigas menores (até 35 x 14 mm) e cálices crespo-vilosos.

A localização desta espécie apresenta-se a vermelho na figura 1.5



Figura 1.5
Localização *L.
luisieri* em Portugal
Continental
[in www.flora-

1.2.4 *L. multifida*



Figura 1.6 *L. multifida*

Apresenta-se sob a forma de caméfito lenhoso até 100 cm, de cor acinzentado-tomentoso, de caules novos revestidos por longos pelos vilosos e brancos. As suas folhas na maioria 2-penatissectas, com segmentos lineares, verdes e esparsamente puberulentas, sendo as distais dos ramos férteis com 20-60 X 10-35 mm, com forma peciolada. A espiga tem 20-70 X 7-10 mm, longamente pedunculada (pedúnculo com 5-50 cm), de brácteas férteis com 4-5 mm, ovado-mucronadas, 3-nerveas, com as estéreis nulas. O seu cálice tem 4,5-5,5 mm, 15-nerveo, com o dente superior inapendiculado. A corola com 10-12 mm de cor azul-violácea.

A localização desta espécie apresenta-se a vermelho na figura 1.7

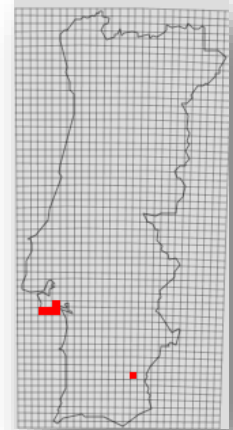


Figura 1.7 Localização *L. multifida* em Portugal Continental
[in www.flora-on.pt]

1.2.5 *L. viridis*



Figura 1.8 *L. viridis*

Apresenta-se como um caméfito lenhoso de 20-40 cm, viloso-pubescente com folhas verdes, viloso-pubescentes, inteiras, sendo as distais dos ramos férteis com 20-49 X 2-6 mm, oblongas a lineares, de margens levemente revolutas, que por sua vez as dos ramos estéreis menores, mais estreitas e de margens bem revolutas. Possui a espiga com 20-40 X 12-18 mm, ovoide-cilíndrica, de pedúnculo com 2-8 cm, brácteas férteis com 5-7-10 mm, ovado-orbiculares, de cor ver-amareladas, com nervuras proeminentes e reticuladas, e brácteas distais estéreis com 8-15 mm, oblanceoladas, esverdeadas a amareladas. O seu cálice tem 5-7 mm, 13-nérveo, sendo o dente superior apicalmente provido dum apêndice obreniforme com 2-3 mm de largura. A sua corola tem 6-8 mm e cor branca.

A localização desta espécie apresenta-se a vermelho na figura 1.9

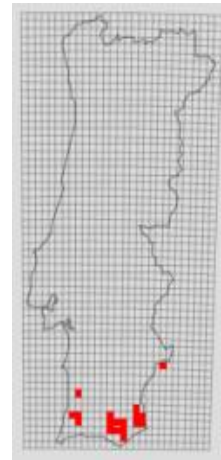


Figura1.9Localização *L. viridis* em Portugal Continental
[in www.flora-on.pt]

1.3 Estruturas secretoras na família das *Labiadas*

As espécies da família *Labiadas* detêm estruturas secretoras externas, tricomas glandulares ou secretores, localizados na epiderme de órgãos aéreos, podendo variar em densidade e morfologia.

Os tricomas secretores podem ser de dois tipos, peltados e capitados.

Estes dois tipos de tricomas diferenciam-se na sua estrutura e na forma de secreção. Os tricomas peltados consistem numa célula base, uma célula pedunculada larga e curta cutinizada nas paredes exteriores e uma cabeça circular com células secretoras dispostas em um ou dois círculos concêntricos. O número de células normalmente varia entre 4 a 12, de acordo com a espécie.

Os compostos secretados acumulam-se no espaço subcuticular, entre a parede celular e a cutícula. Com a maturação a acumulação de substâncias pode levar a um aumento considerável desta área.

Os tricomas capitados são morfologicamente mais variados e podem ser divididos em vários tipos de acordo com a sua estrutura bem como o seu modo de secreção (Feijão, 2011).

De seguida, apresenta-se a descrições dos diferentes tipos de tricomas capitados:

Tipo I – Consiste em uma a duas células no pedúnculo, e uma, ou duas células secretoras na cabeça, de forma circular ou de pêra. Gotas de substâncias polissacáridas e lipofílicas podem ser encontradas na parte superior da célula da cabeça. O material secretado acumula-se num pequeno espaço subcuticular e a sua libertação dá-se através de poros localizados na cutícula.

Tipo II – Consiste em uma a duas células no pedúnculo e uma cabeça unicelular comprida e estreita na sua base como as células do pedúnculo, e um pouco larga na extremidade distal. O material secretado é acumulado num espaço subcuticular maior do que o encontrado nos tricomas capitados tipo I, e a sua libertação dá-se através da ruptura da cutícula.

Tipo III – Consiste em duas a cinco células alongadas no pedúnculo, que ostentam uma célula arredondada na cabeça. Neste tipo de tricoma o material é igualmente secretado para um espaço subcuticular. Pode acontecer o colapso de parte da parede celular, dando uma forma de taça à célula colapsada. Eventualmente a cutícula rompe, parte do que é secretado é libertado e o restante permanece.

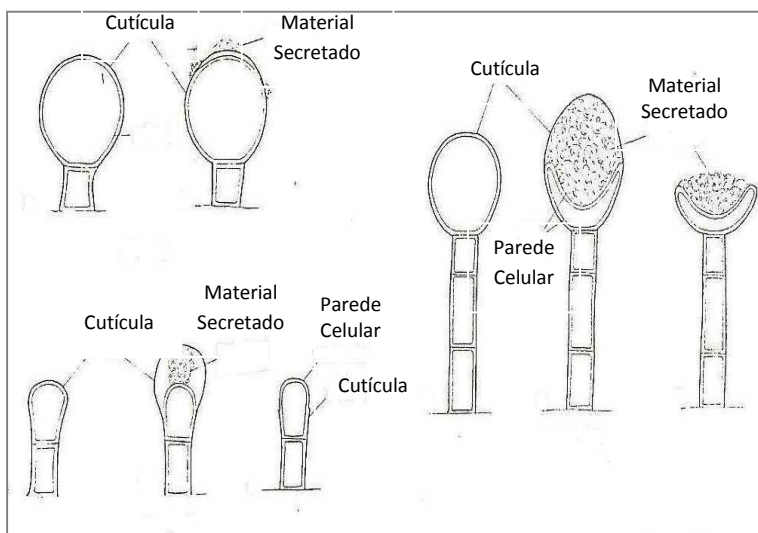


Figura 1.10 - Esquema dos três tipos de tricomas capitados, em sucessivas fases de secreção. Tipo I: a) Antes da secreção; b) Após a secreção, observando-se gotas de material secretado no topo da célula da cabeça. Tipo II: c) Antes da secreção; d) Na fase de secreção, os materiais de secreção acumulam-se no espaço subcuticular; e) Após a secreção; a cutícula permanece apenas na parte inferior da cabeça nas paredes exteriores. Tipo III: f) Antes da secreção; g) Os materiais secretados acumulam-se entre a cutícula e a parede celular; h) Após a secreção, parte dos materiais secretados permanecem no exterior da célula da cabeça. (Feijão, 2011)

2. Marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Marcadores moleculares microssatélites são sequências simples repetidas em tandem, com um a seis nucleotídeos. Estas regiões são conhecidas como SSRs (*Simple Sequence Repeats*) ou STRs (*Short Tandem Repeats*), estão presentes no genoma de eucariotos e procariotos e representam a classe de marcadores moleculares mais polimórficos disponíveis até hoje. Por detetarem variações genéticas, os marcadores moleculares podem fornecer informações úteis a diferentes níveis: estrutura da população, relações filogenéticas, padrões de biogeografia histórica e análises de ascendência e parentesco (Féral 2002).

Os ISSR são uma classe de marcadores moleculares baseados na amplificação de segmentos de DNA através de reacções de PCR, revelando polimorfismos através das sequências repetidas no genoma e têm a vantagem de não necessitar do conhecimento prévio do genoma. São marcadores moleculares dominantes, ou seja, não diferenciam os indivíduos heterozigotos dos homozigotos, no entanto, têm a vantagem de analisar múltiplos loci numa única reacção.

Os alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma ocorra deleção ou inserção em uma sequência, que modifica a distância entre as repetições. Também, ocorre devido a diferenças no comprimento do microssatélite, principalmente nos primers ancorados na posição 5' (Goulão e Oliveira, 2001).

Os marcadores ISSR são recomendados para análises de espécies relacionadas evolutivamente, obtendo-se resultados fiáveis, devido à sua abundância e dispersão no genoma. São marcadores com elevada reprodutibilidade, rápida deteção de loci polimórficos em todo o genoma, e apresentam baixo custo em comparação aos outros marcadores e de fácil execução (Rodrigues, 2010).

Esses marcadores de DNA podem contribuir em estudos de melhoramento vegetal, para seleção de genótipos-e também em estudos de diversidade genética, “fingerprinting” e seleção assistida (Costa, 2010).

3. Objectivos

Com o presente trabalho pretende-se, em primeiro lugar, realizar uma revisão taxonómica do género *Lavandula* utilizando as plantas depositadas em herbário do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), através do estudo morfométrico.

Seguidamente, na tentativa de ampliar o conhecimento sobre este género, pretende-se também caracterizar a diversidade morfológica e genética através de uma análise conjunta dos estudos morfométrico, micro morfológico e molecular, utilizando material vegetal colhido em várias populações naturais.

Neste sentido, o trabalho proposto englobará os seguintes objetivos:

- Observação e medição de caracteres morfológicos de estruturas vegetativas, como folhas e brácteas, e de estruturas reprodutoras, como pétalas, gineceu e androceu e ainda frutos e sementes;
- Caracterização da variabilidade genética através de marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat);
- Classificação e descrição dos tricomas secretores e não secretores, através da caracterização microscópica por microscopia óptica.

4. Material e métodos

4.1. Material Vegetal

Neste trabalho foram utilizadas as amostras arquivadas em herbário do INIAV como se refere na Tabela 4.1.

Tabela 4. 1 Plantas depositadas em herbário do INIAV

Código	Espécie
H1	<i>Lavandula angustifolia</i>
H2	<i>Lavandula angustifolia</i>
H3	<i>Lavandula dentata</i>
H4	<i>Lavandula dentata</i>
H5	<i>Lavandula multifida</i>
H6	<i>Lavandula multifida</i>
H7	<i>Lavandula pedunculata</i>
H8	<i>Lavandula pedunculata</i>
H9	<i>Lavandula stoechas</i>
H10	<i>Lavandula stoechas</i>
H11	<i>Lavandula stoechas luisieri</i>
H12	<i>Lavandula stoechas luisieri</i>

Foram também utilizadas as plantas colhidas em vários locais, como se descreve na Tabela 4.2.

Tabela 4. 2 – Localização e datas de colheita das amostras do género *Lavandula*

Código	Espécie	Local	Data	Zona do País
1	<i>Lavandula</i>	Serra da Estrela	14.05.2013	Beira Interior
2	<i>Lavandula</i>	Arvore 4	03.06.2013	Tejo Internacional
3	<i>Lavandula</i>	Tejo 1	03.06.2013	Tejo Internacional
4	<i>Lavandula</i>	Tejo 2	03.06.2013	Tejo Internacional
5	<i>Lavandula</i>	Tejo 4	03.06.2013	Tejo Internacional
6	<i>Lavandula</i>	Tejo 5	03.06.2013	Tejo Internacional
7	<i>Lavandula</i>	Tejo 6	03.06.2013	Tejo Internacional
8	<i>Lavandula</i>	Tejo 7	03.06.2013	Tejo Internacional
9	<i>Lavandula</i>	Tejo 8	03.06.2013	Tejo Internacional
10	<i>Lavandula</i>	Tejo 3	03.06.2013	Tejo Internacional
11	<i>Lavandula</i>	Serra da Arrábida	15.04.2013	Sul do Tejo
12	<i>Lavandula</i>	Grândola	30.04.2013	Alentejo
13	<i>Lavandula</i>	Barradas da Serra	07.05.2013	Alentejo
14	<i>Lavandula</i>	Grândola Xisto	29.04.2013	Alentejo
15	<i>Lavandula</i>	Grândola Xisto	29.04.2013	Alentejo
16	<i>Lavandula</i>	Grândola areias	29.04.2013	Alentejo

As folhas jovens colhidas foram imediatamente acondicionadas em arcas frigoríficas e transportadas para o laboratório, onde foram adequadamente congeladas a -80 °C até ao momento da extração do DNA para análise.

4.2. Estudo morfométrico

Foram observados 40 caracteres qualitativos: nervuras salientes, forma do corte da espiga, cor, pelos, forma das folhas, forma da espiga, brácteas, forma das brácteas esteréis, forma das brácteas férteis, ápice da bráctea fértil, nervação da bráctea fértil. Foram também medidos 10 caracteres quantitativos: comprimento do pedicelo, da inflorescência sem brácteas esteréis, da corola, do cálice, do total das flores, da bráctea, do pecíolo, do total da folha, o diâmetro da inflorescência e o número de nervuras nas flores (Anexo A).

4.3. Estudo molecular

4.3.1 Extração de DNA genómico

As folhas de cada amostra foram maceradas em azoto líquido e 100 mg transferidas para *ependorfs*. O DNA foi extraído a partir das folhas recorrendo-se ao kit de extracção DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) e seguindo-se as instruções do fornecedor.

Após a extração, a qualidade do DNA foi avaliada por electroforese em gel de agarose (AGE) 0,8%. Após a corrida electroforética, os perfis electroforéticos foram visualizados sob luz ultravioleta no analisador de imagens VersaDoc (Bio-Rad). A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific).

4.3.2 Amplificação de DNA por PCR

As reacções de amplificação do DNA foram realizadas recorrendo-se ao Kit Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Germany) e utilizando o termociclador Biometra TGradient (Biometra, GmbH).

Para os marcadores moleculares ISSR foram testados vários *primers*, utilizados em outros trabalhos desenvolvidos e em curso no Laboratório de Genética Molecular do INIAV, apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4. 3. Sequências nucleotídicas 5'-3' e temperaturas de melting dos primers utilizados na análise ISSR

Sequências nucleotídicas	Tm (°C)	Observações
(CAA) ₅	39.6	Leroy e Leon, 2000
(CAG) ₅	53.3	Leroy e Leon, 2000
(GATA) ₄	38.9	Leroy e Leon, 2000
(GACA) ₄	49.2	Leroy e Leon, 2000
(AG)8YT	49.2	
(TG) 8RT	53.1	
(CA)8RT	51.8	
AACACAATTTGAATTCCT ATTACAGTTCCACAAATCTG	44.6 51.2	Steinkellner et al., 1997 Gómez et al., 2001 Para micro-stDNA do tipo (GA)20
CTGCAAGATTCGGACAAGCAA TCTTTTTCTAATCTCACCTG	57.9 54.0	Steinkellner et al., 1997 Gómez et al., 2001 Para micro-stDNA do tipo (GA)34
GATCAGTGATAGTGCCTCTC GATCAACAAGCCCAAGGCAC	57.3 59.4	Steinkellner et al., 1997 Gómez et al., 2001 Para micro-stDNA do tipo (GA)24
GCTTGAGAGTTGAGATTTGT GCAACACCCTTTAACTACCA	53.2 55.3	Steinkellner et al., 1997 Gómez et al., 2001 Para micro-stDNA do tipo (GT)5(GA)9

Numa câmara de PCR esterilizada com luz UV prepararam-se as misturas de reação para um volume de 25 µL contendo 1 µl (50-150 ng) de DNA, 0.4 µM de cada *primer* e 1x solução tampão, que inclui 1.5 mM MgCl₂ e 0.2 mM de cada dNTP.

As reações de amplificação ocorreram com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94°C por 3 min seguida de 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 1 min, hibridação a 46 °C ou 49 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 2 min), terminando com a extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos PCR obtidos com os diferentes *primers* foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,0 % em 0,5X TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,0, e 1 mM EDTA) contendo 0.5 µg/mL de brometo de etídeo e os perfis electroforéticos resultantes foram visualizados, sob luz ultravioleta, no analisador de imagens VersaDoc (Bio-Rad).

4.4. Análise Estatística

Para a análise dos resultados, recorreu-se a métodos de taxonomia numérica e utilizou-se o programa NTSYS-pc- (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.02 (“Applied Biostatistics In”) (Nóbrega, 1996).

Os caracteres qualitativos e quantitativos foram organizados em matrizes (Anexo B - morfologia molecular).

Para os caracteres qualitativos, a partir da matriz binária com presença (1) e ausência (0), utilizou-se para o coeficiente de semelhança o coeficiente de Dice e o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages), resultando o respectivo dendrograma. Foi calculado o coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de valores cofenéticos e a matriz de dissemelhança (ou semelhança), exprimindo esse coeficiente de correlação cofenética o grau de concordância entre aquelas duas matrizes. Como método de ordenação foi utilizada a análise em coordenadas principais.

Para a análise dos caracteres quantitativos a semelhança calculou-se utilizando como coeficiente a distância Euclidiana média e o método de agregação UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages), resultando o respectivo dendrograma. Para o fenograma, foi calculado o coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de valores cofenéticos e a matriz de dissemelhança (ou semelhança), exprimindo esse coeficiente de correlação cofenética o grau de concordância entre aquelas duas matrizes. Como método de ordenação foi utilizada a análise em componentes principais.

4.5. Estudo micro morfológico

O estudo micro morfológico foi efectuado nas folhas das amostras colhidas e conservadas para herbário. A análise microscópica incidiu ao nível da zona média do limbo foliar de cada amostra.

Cada porção da zona média a analisar foi sujeita a hidratação com água destilada e clarificação em hidrato de cloral, durante cerca de 10 minutos. Recorrendo a técnicas histológicas, foram efectuados manualmente, destacamentos de epiderme e cortes transversais.

As amostras foram posteriormente observadas e analisadas ao microscópio óptico modelo Olympus CX40, com as ampliações de 40x, 100x, 200x e 400x.

O registo fotográfico foi efectuado com uma câmara com sistema fotográfico Olympus ColorView IIIu e as imagens processadas com o Software *Cell D Imaging Software for Life Science Microscopy*.

5. Resultados e discussão

5.1. Estudo morfométrico

Os caracteres qualitativos e quantitativos apresentam-se no Anexo A

A análise estatística para os caracteres qualitativos permitiu a obtenção do dendrograma apresentado na Figura 5.1.

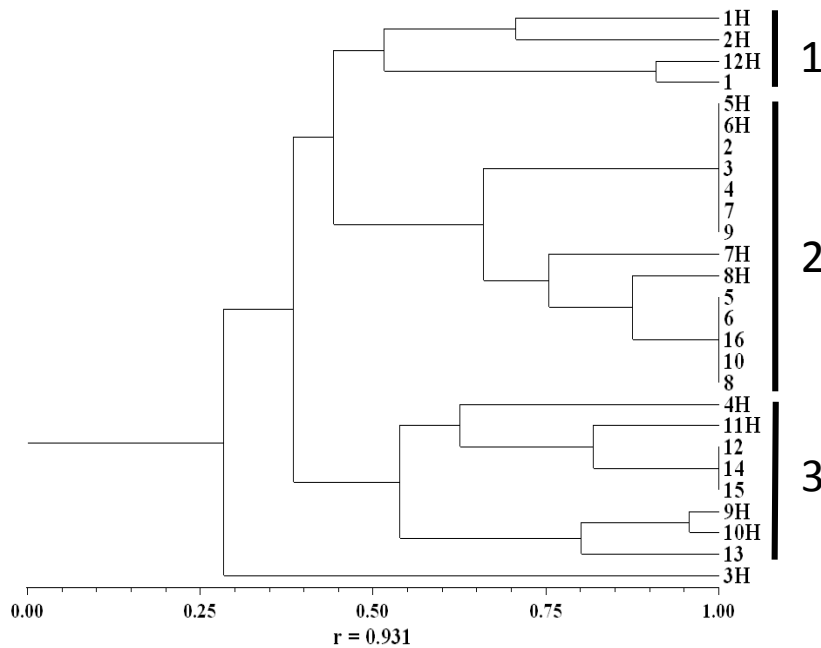


Figura 5. 1 Dendrograma das plantas arquivadas em herbário e das plantas colhidas, baseado no método UPGMA e utilizando o coeficiente de DICE

H1-*Lavandula angustifolia*; H2-*Lavandula angustifolia*; H3-*Lavandula dentata*; H4-*Lavandula dentata*; H5-*Lavandula multifida*; H6-*Lavandula multifida*; H7-*Lavandula pedunculata*; H8-*Lavandula pedunculata*; H9-*Lavandula stoechas*; H10-*Lavandula stoechas*; H11-*Lavandula stoechas luisieri*; H12-*Lavandula stoechas luisieri*
1-Serra da Estrela; 12-Grândola (Mostarda); 14-Grândola (Xisto); 15-Grândola (Xisto);13-Grândola (B. Serra); 3-Tejo 1; 4-Tejo 2; 7-Tejo 6; 9-Tejo 8; 5-Tejo 4; 6-Tejo 5; 16-Grândola (areias); 10-Tejo 3; 8-Tejo 7

Da análise deste dendrograma pode observar-se a existência de 3 agrupamentos e de uma planta isolada (3H).

Considerando apenas as plantas colhidas para o desenvolvimento deste trabalho, apresenta-se na Figura 5.2 o dendrograma obtido.

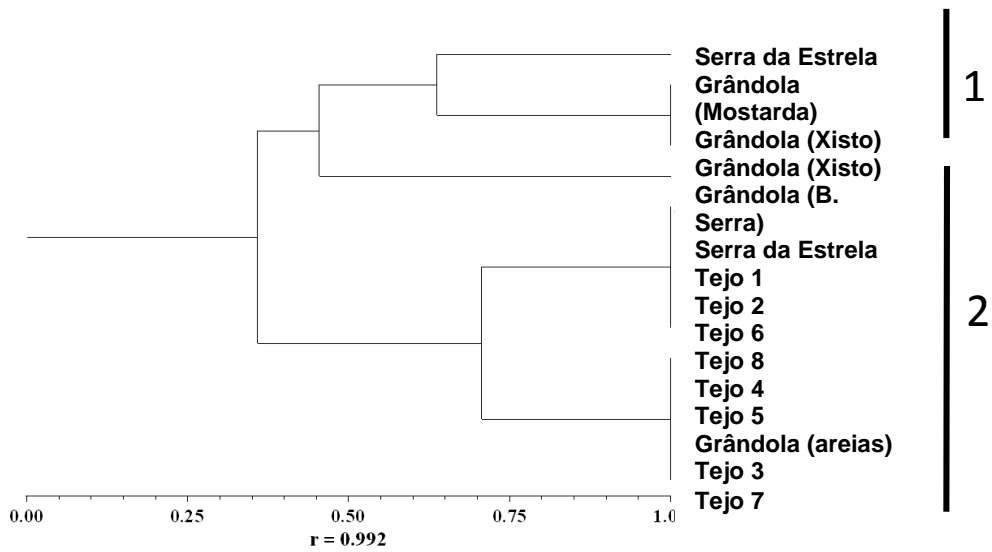


Figura 5. 2 Dendrograma das plantas colhidas, baseado no método UPGMA e utilizando o coeficiente de DICE.

Da análise do dendrograma, observam-se dois agrupamentos.

Procedendo do mesmo modo para os caracteres quantitativos, apresenta-se na Figura 5.3 o respetivo dendrograma.

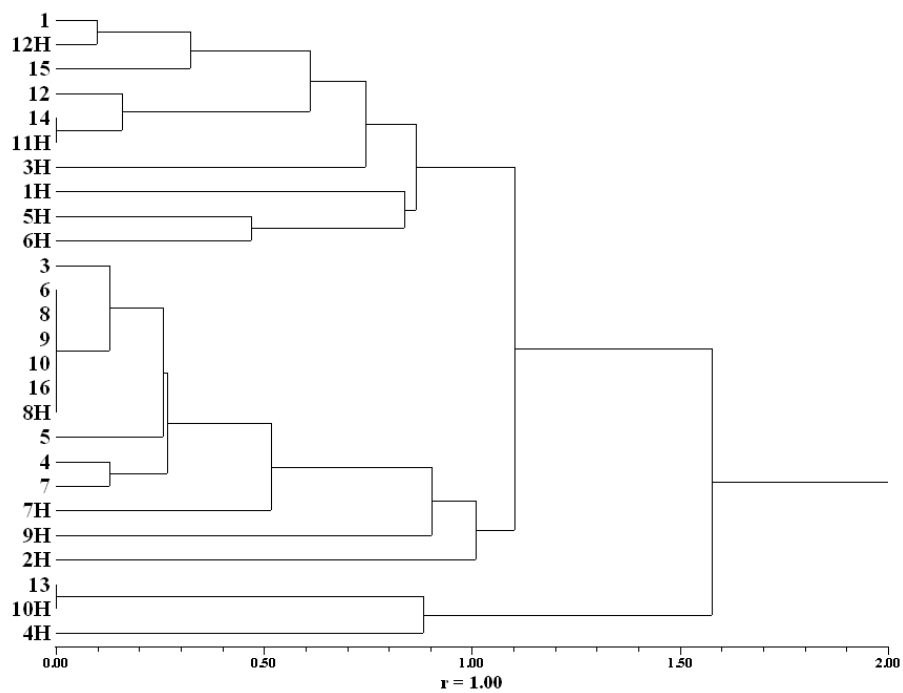


Figura 5. 3 Dendrograma das plantas arquivadas em herbário e das plantas colhidas, baseado no método UPGMA e utilizando como coeficiente a distância Euclidiana média.

H1-*Lavandula angustifolia*; H2-*Lavandula angustifolia*; H3-*Lavandula dentata*; H4-*Lavandula dentata*; H5-*Lavandula multifida*; H6-*Lavandula multifida*; H7-*Lavandula pedunculata*; H8-*Lavandula pedunculata*; H9-*Lavandula stoechas*; H10-*Lavandula stoechas*; H11-*Lavandula stoechas luisieri*; H12-*Lavandula stoechas luisieri*
 1-Serra da Estrela; 12-Grândola (Mostarda); 14-Grândola (Xisto); 15-Grândola (Xisto);13-Grândola (B. Serra); 3-Tejo 1; 4-Tejo 2; 7-Tejo 6; 9-Tejo 8; 5-Tejo 4; 6-Tejo 5; 16-Grândola (areias); 10-Tejo 3; 8-Tejo 7

5.2. Estudo molecular

Relativamente à análise molecular das 16 plantas colhidas em diferentes populações, os *primers* ISSR testados apresentaram uma amplificação fraca ou mesmo nula, embora tenham resultado de uma seleção prévia com base em trabalhos desenvolvidos anteriormente no Laboratório de Genética Molecular. Foram, por isso, selecionados apenas os dois *primers* que apresentaram uma boa amplificação das bandas (Anexo C).

A análise estatística dos perfis electroforéticos obtidos com estes dois *primers* e recorrendo-se também ao programa NTSYS-pc permitiu a obtenção do dendograma apresentado na Figura 5.4. Foram retiradas do estudo 4 amostras por apresentarem uma amplificação muito fraca.

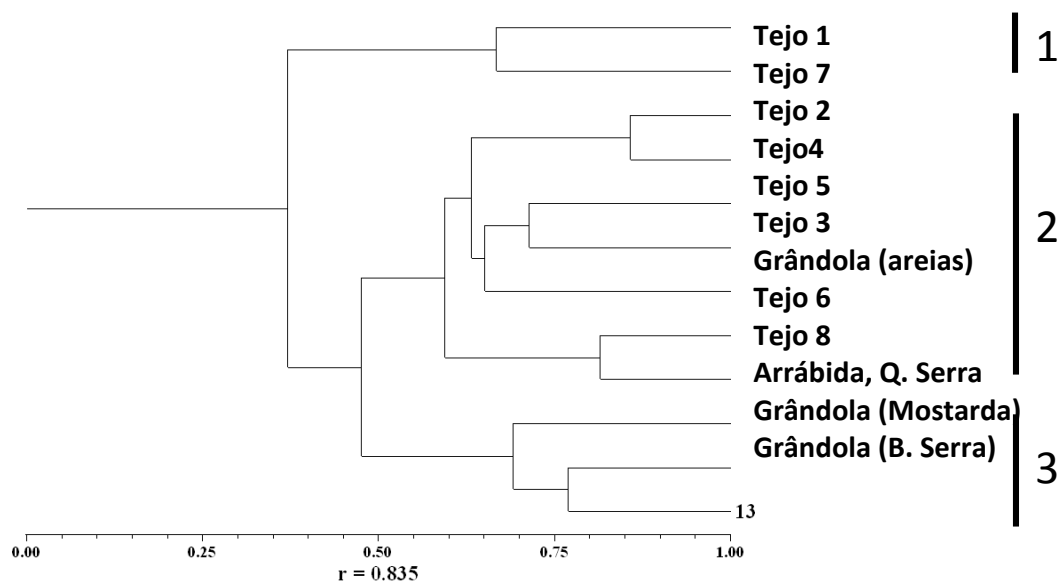


Figura 5. 4 Dendograma baseado na amplificação de bandas de 12 plantas do género *Lavandula* com primers ISSR segundo o método UPGMA e utilizando o coeficiente DICE como medida de semelhança genética.

Da análise deste dendograma, verifica-se a existência de 3 agrupamentos.

5.3 . Morfologia e distribuição de tricomas nas espécies em estudo

Nas folhas das espécies em estudo observou-se tricomas de dois tipos distintos, não glandulares e glandulares. Os resultados obtidos neste estudo preliminar encontram-se resumidos na Tabela 5.1 e que tem de ser confirmado com um maior número de observações para cada amostra.

Tabela 5.1 Tipo de Tricomas observados ao microscópio

Amostras	Tector estrelado	Tector unicelular	Secretor peltado	Secretor capitado Tipo I	Secretor capitado Tipo II
1	✓				
3	✓		✓	✓	
12	✓			✓	
13			✓	✓	
14	✓				
15	✓	✓		✓	
16				✓	✓

Após algumas observações microscópicas as seguintes figuras são referentes aos diferentes tricomas. Em cada uma delas estão identificados com o número da amostra colhida e a indicação com a seta do tipo de tricoma observado

Ao comparar-se o dendograma da figura 5.2 pode-se destacar que as amostras 1, 12,13,14 e 15 pertencentes ao agrupamento 1 apresentam o mesmo tipo de tricoma, o tector estrelado.

Das restantes amostras não se consegue fazer um relacionamento entre si, ou seja, não se consegue inseri-las nos agrupamentos de modo a encontrar tipos de tricomas iguais em espécies semelhantes.

Sendo o género *Lavandula* característico pela pelo seu aroma esperava-se encontrar um vasto número de tricomas secretores peltados.

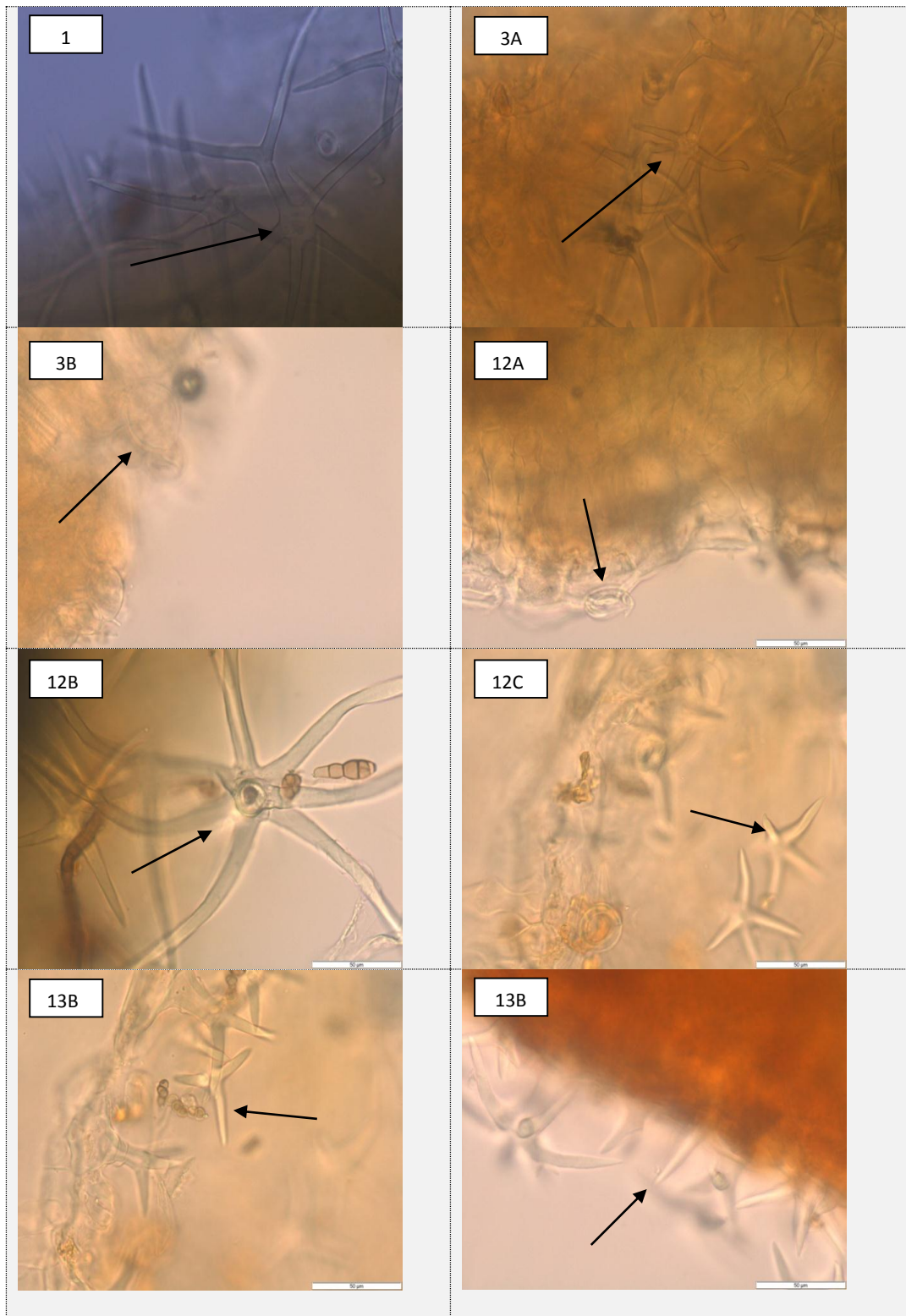


Figura 5.5. – Observação microscópica dos Tricomas presentes nas amostras colhidas de *Lavandula* spp. 1 Tricoma tector estrelado; 3A Tricoma tector estrelado; 3B Tricoma secretor peltado; 12A Tricoma secretor capitado tipo I; 12B Tricoma tector estrelado; 13A Tricoma tector estrelado; 13B Tricoma Tector unicelular

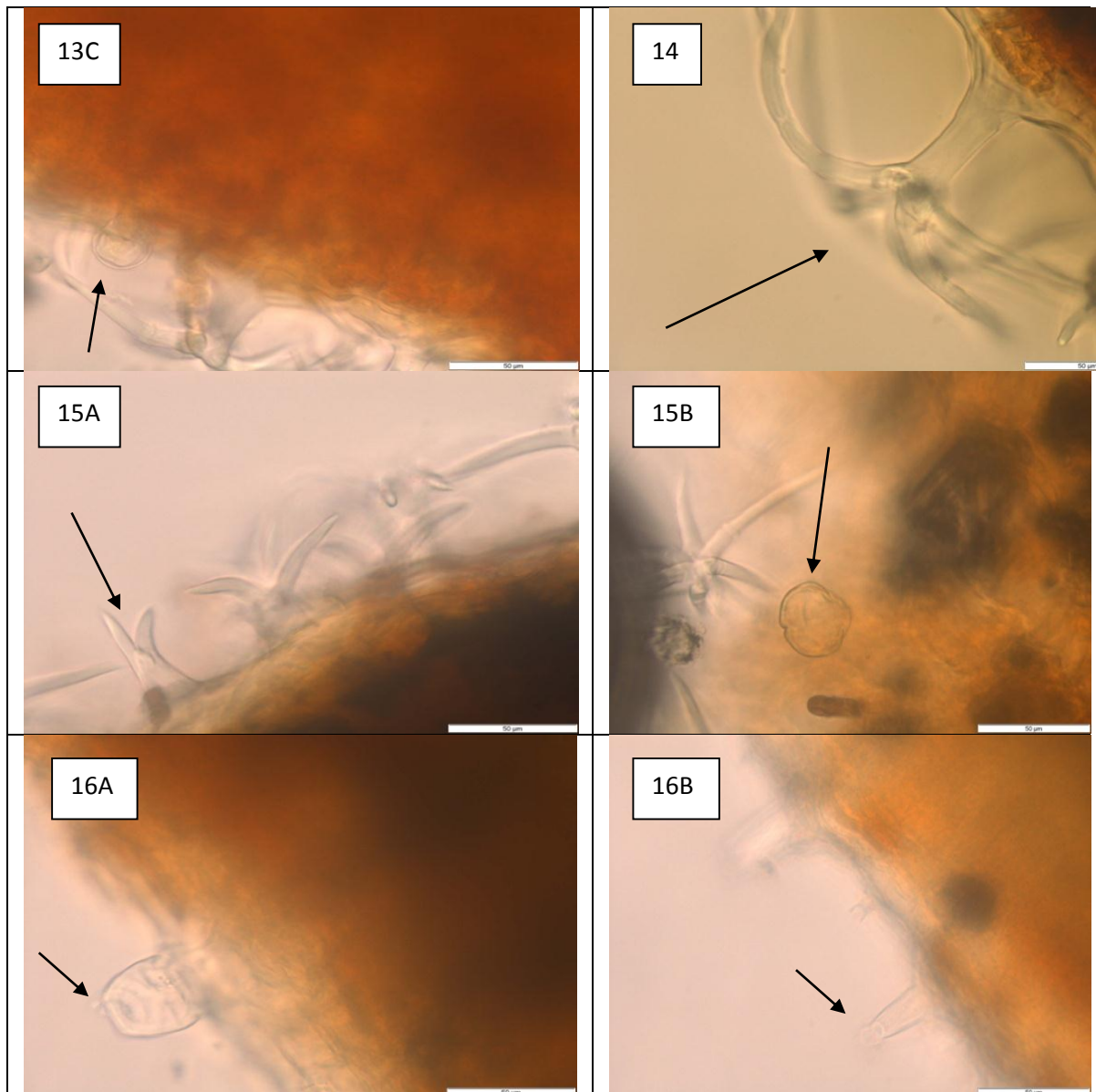


Figura 5.6. – Observação microscópica dos Tricomas presentes nas amostras colhidas de *Lavandula* spp. 13C Tricoma secretor tipo peltado; 14 Tricoma tector estrelado; 15A Tricoma tector ; 15B tricoma secretor tipo peltado capitados tipo I; 16A Tricoma secretor capitado Tipo II (digitiforme); 16B Tricoma secretor capitado tipo I peltado

6. Conclusões

Após os diferentes estudos morfométrico molecular e micromorfológico, e visto tratar-se de um estudo preliminar para o último estudo pode-se afirmar que análise conjunta permitiu identificar 3 táxones claramente distintos:

1 - *Lavandula sampaioana* (Rozeira) Rivas Mart. (Alto Tejo substratos duros)

2 - *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco Tejo e Sado substratos arenosos

3 - *Lavandula stoechas* L. subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira, Calcários e silicatos em sítios chuvosos

Por sua vez, no estudo dos tricomas, apesar dos resultados apresentados não se pode concluir que as espécies em estudo não apresentem mais tipos de tricomas, e até mesmo em maior número, deveria ter sido necessário um maior número de observações.

7. Bibliografia

- Azziam, D. and Moore, D.M., 1982, Morphological and Palynological Studies in *Phlomis* L., *Eromostachys* Bunge and *Paraphlomis* Prain (Labiatae), *Botanical Journal of Linnean Society*, vol.85, pag.225-248
- Bernardo, JM, 1995; *Ecologia das Populações e das Comunidades*, Universidade Aberta Lisboa
- Binney, Ruth (coordenação) 1986, *As Plantas – o génio da natureza*, Circulo de Leitores, Lisboa, Pág14/15
- Brito, Raquel Soeiro (direcção)(1994) *Portugal Perfil Geográfico*, Editorial Estampa, Lisboa, pág11, 50/51, 64
- Castro, V. et al 1986, 1990, 1993, 1997 e 1999; *Flora Iberica, Plantas vasculares de la Peninsula Iberica e Islas Baleares*,
- CJE Biofer, *Flora e Fauna Mediterrânea*, vol.1, Biblioteca CMO
- Costa, J.L.; Oliveira, E.J.; Jesus, O.N.; Oliveira, G.A.F.; Neves, C.G. 2010; Marcadores moleculares como ferramenta para estruturação da diversidade genética em 12 genótipos de maracujazeiro. *Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura*.
- Costa, J. C. Neto, C. Aguiar, J. Capelo, D. Espírito-Santo, J. Honrado, C. Pinto-Gomes, T. Monteiro-Henriques, M. Sequeira & M. Lousã. 2012. *Vascular plant communities in Portugal (Continental, Azores and Madeira)*. *Global Geobotany*. 2 (1) 1-180 ISSN 2253-6523. 2
- Costa, J.C.; Aguiar, C.; Capelo, J, 2000; *Biogeografia de Portugal Continental*, pág.- 5-56, Quelcatea;
- Crawford, D.J.; 1998. *Plant Macromolecular Systematics in Past 50 Years; One View Taxam*, vol,49, pag.479-490
- Feijão, Maria Daniela M. 2011, “A Flora Medicinal e Aromática da Herdade da Ribeira Abaixo, Grândola- Caracterização Micromorfológica e dos Óleos Essenciais da *Lavandula Lusieri*”, no âmbito da tese de mestrado em *Biologia Celular e Biotecnológica*
- Féral JP. 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268: 121-145.
- Fernandes, Francisca; Carvalho, M. Luis, 2003; *Portugal Botânico de A a Z, plantas portuguesas e exóticas*, pag.9; 255-256 Lidel.
- Franco, Amaral, 1984; *A Nova Flora de Portugal*
- Gómez A., Pintos B, Aguiriano E, Manzanera JA, Bueno MA, 2001. SSR markers for *Quercus suber* tree identification and embryo analysis. *The Journal of Heredity* 92: 292-295

- Goulão, L.; Oliveira, C.M. 2001, Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica*, vol. 122, pag. 81-89.
- Gvodall. D; 1954;Objective methods for the classifications of vegetation vol.3; Austlalian Jornal of Botany, pag 304-324,
- Kent,M.e Coker,M.; 1992;Vegetation Description and Analysis.A Practical Approach John Wikey & Sons USA,
- Leroy e Leon, 2000. A rapid method for detection of plant genomic instability using unanchored-microsatellite primers. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 283a-283g.
- Lousã,M.,Elementos de Fitogeografia, , 2000 coast J.C. Cardoso;Esp. Santo
- Mabberley,D.J. and Placito,P.J., .1993;Algarve,Plants and Landscape, Oxford University Press,Oxford, UK
- Michels,An;Van den Ende,Wim,(...),Extraction of High-Quality Genomic DNA from latex-contamining plants,*Analytical Biochemistry*,pag.85-89;315
- Nóbrega, F., 1996. Polimorfismo isoenzimático em *Quercus suber* L.. Contribuição para o estudo da sua relação com a qualidade da cortiça. Tese de Doutoramento. ISA, Univ. Técnica de Lisboa.
- Precznhak, Ana Paula ,2013; Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronómicos em acessos de mini-tomate, Tese de mestrado;
- Ribeiro, J.A, Monteiro, A.M., Silva, M. L Fonseca, 2000, Etnobotânica, Plantas Bravias, Comestíveis, Condimentares e Mediciniais, João Azevedo Editor, Mirandela, pág.66/67
- Rogers,S.O.Badich,A.J1998.”,Extration of DNA from milligram amounts of fresh,herbarium and mumenified plant tissues”,*Plant Molecular Biology* vol,5 n2 pag.69-76,
- Rohlf,F.J.Ntsys-1992P C Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 1.7; Exeter Publications,New York
- Silva, Soares da,1982,Geologia e Litografia,Cartas Litologicas e Geologicas de Portugal; Sousa Real
- Silva, Vasco, 2005 “Caracterização e Av. Da Flora e Vegetação de parcelas permanentes no âmbito do projeto: Proteção das florestas contra a poluição atmosférica; trabalho de fim de curso
- Steinkellner H, Fluch S, Turetschek E, Lexer C, Streiff R, Kremer A, Burg K, Gloss J. 1997 Identification and characterization of (GA/CT)_n – microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology* 33: 1093-1096.
- Taylor,J.M., 1998, ”Phlomis,The Meglected Genus, a guide for gardenenessand horticulturists”,*National Journal for Conservation of Plants and Gardens*,pag,3-87,Wesbury-on-Severn,Gloucester UK,
- Vasconcellos,J.C.;Coutinho,M.P. e Franco,1986; Noções sobre a Morfologia Externa das Plantas Superiores; Ministério da Economia, D.G.Serviços Agrícolas,3ª edição, Lisboa Weberling, Focko, Schwantes, Hans Otto, Taxonomia vegetal, Editora Pedagógica e Universitária Lda, São Paulo, Pag107/108

www.gbif.org

www.jstor.org

www.flora-on.pt

<http://naturlink.sapo.pt/Natureza-e-Ambiente/Fauna-e-Flora/content/O-Rosmaninho-em-Portugal?viewall=true&print=tru>

<http://bgbm3.bgbm.fu.berlin.de/IOPI/GPC/query.htm>

8. Anexos

8.1 Anexo A

Tabela 8.1 – Matriz de identificação de caracteres morfométricos quantitativos

Caracter morfométrico	Medida
Comprimento	
§ do pedicelo	
§ da inflorescência sem brácteas esteréis	
§ da corola	
§ do cálice	
§ total das flores	
§ da bráctea	
diâmetro da inflorescência	
Número de nervuras nas flores	
Comprimento do pecíolo	
Comprimento total da folha	

Tabela 8.2 Matriz de identificação de caracteres morfométricos qualitativos

Caracter morfométrico	N (0)	S (1)
Nervuras salientes		
Forma do corte da espiga		
§ circular		
§ hexagonal		
§ rectangular		
Cor		
§ verde		
§ azul-púrpura		
§ púrpura		
Pêlos		
§ indumento simples		
§ indumento múltiplo		
§ indumento aplicado		
estrelados		
§ vilosos		
§ tearâneos		
Forma das Folhas		
§ oblongo-lanceoladas a lanceoladas		
§ penatissectas		
§ crenado-dentadas a subpenatifendidas		
§ lanceoladas a lineares		
§ oblongo a lanceoladas		
§ viloso-pubescentes		
Forma da espiga		
§ cilíndrica		
§ ovóide		
§ ovóide-cilíndrica		
§ pedunculada		
Brácteas		
§ férteis		
§ estéreis		
Forma das brácteas estéreis		
§ oblongas a oblanceoladas		
§ oblanceoladas		
§ linear-asseoveladas		
Forma das brácteas férteis		
§ obriangulares		
§ cordado-reniformes		
§ sub-rectangulares		
§ suborbiculares		
§ obovado-orbiculares		
§ ovado-mucronadas		

8.2 Anexo B

8.2.1 Estudo morfológico

Tabela 8.3 Matriz binária com presença (1) e ausência (0) referente aos dados qualitativos

Amostras	NS	FC	FH	FR	CV	CAP	CPU	PIS	PIM	PIA	PE
1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
2	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
3	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
5	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
6	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
7	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
8	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
9	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
10	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
11	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
12	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
13	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
14	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
15	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
16	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0

Tabela 8.4 - . Matriz com os valores das medições

Amostras	CP	CI	CO	CA	CT	CB	DI	NN	CPO	CTF
1	1,3	2,9	0,2	0,8	3,3	0,4	1,2	5	0,3	0,7
2	0,9	3,3	1,2	0,2	3,8	1	1,1	8	22	4,9
3	8,7	2,8	0,5	0,1	2,7	2,7	1,3	8,0	0,2	1,5
4	8,7	2,7	0,3	0,1	2,6	2,3	1,3	7,9	0,2	1,4
5	8,8	2,8	0,5	0,2	2,5	2,7	1,2	7,9	0,1	1,6
6	8,8	2,8	0,5	0,2	2,8	2,8	1,3	8	0,2	1,5
7	8,7	2,7	0,2	0,1	2,5	2,6	1,2	8,0	0,1	1,5
8	8,8	2,8	0,5	0,2	2,8	2,8	1,3	8,0	0,2	1,5
9	8,8	2,8	0,5	0,2	2,8	2,8	1,3	8,0	0,2	1,5
10	8,8	2,8	0,5	0,2	2,8	2,8	1,3	8,0	0,2	1,5
11	2,1	1,9	0,3	0,9	2,9	1	0,9	6	0,2	1,2
12	2,1	1,9	0,2	0,9	0,9	1	0,9	6	0,2	1,2
13	3,0	2,1	0,4	0,2	3,1	1,0	0,8	6,0	0,9	1,4
14	2,1	1,9	0,3	0,9	2,9	1,0	0,9	6,0	0,2	1,2
15	2,1	1,8	0,2	0,9	3,0	1,0	1,0	5,8	0,1	1,2
16	8,8	2,8	0,5	0,2	2,8	2,8	1,3	8,0	0,2	1,5

8.2.2. Estudo Molecular

Tabela 8.5 - Matriz binária com presença (1) e ausência (0) referente ao marcador IRSS1

Amostras	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12	b13	b14	b15
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
4	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
5	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
6	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0
8	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
9	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1
9N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
11	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
12	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
13	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0

Tabela 8.6 - Matriz binária com presença (1) e ausência (0) referente ao marcador IRSS2

Amostras	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12	b13	b14	b15	b16	b17	b18
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
5	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
8	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0
9	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
9N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
11	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
12	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
13	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0

8.3 Anexo C

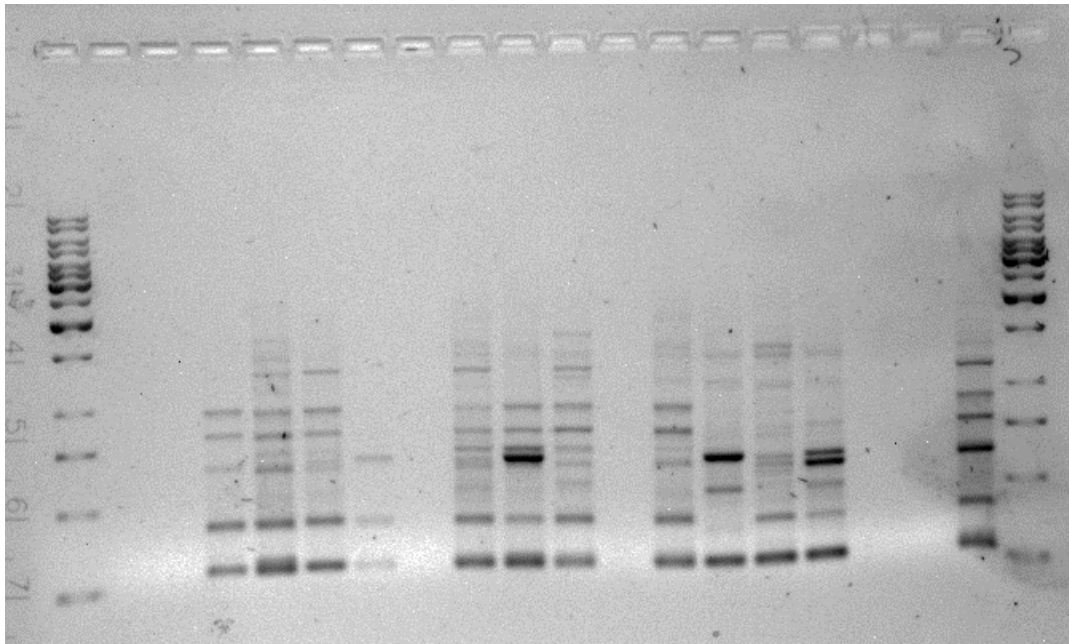


Figura 8.1. - Amplificação das bandas usando o IRSS1

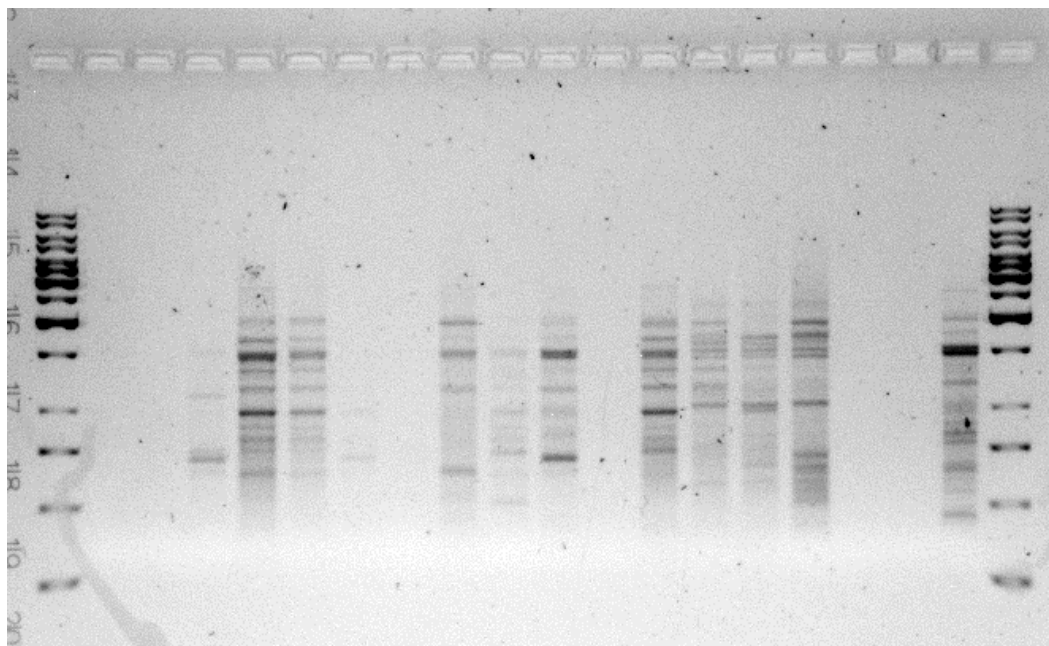


Figura 8.2 - Amplificação das bandas usando o IRSS2